

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

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
19 мая 2023 (19.05.2023)



(10) Номер международной публикации
WO 2023/085973 A1

(51) Международная патентная классификация:
C07K 7/66 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS,
ZA, ZM, ZW.

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2022/000335

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), европейский патент (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Дата международной подачи:
14 ноября 2022 (14.11.2022)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
2021133140 15 ноября 2021 (15.11.2021) RU

Опубликована:

- с отчётом о международном поиске (статья 21.3)
- до истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений (правило 48.2(h))

(71) Заявитель: ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА-ИНТЕЛЛЕКТ" (LTD "VALENТА-INTELLEKT") [RU/RU]; ул. Рябиновая, 26, стр. 10, каб. 6-26 Москва, 121471, Moscow (RU).

(72) Изобретатели: САМСОНОВ, Алексей Алексеевич (SAMSONOV, Aleksey Alekseevich); Лосино-Петровский городской округ, 10, кв. 54 Московская обл., пос. Биокомбината, 141142, Moskovskaya oblast, pos. Biokombinata (RU). ШМЕЛЕВА, Варвара Николаевна (SHMELEVA, Varvara Nikolaevna); ул. Гончарова, 8/13, кв. 69 Москва, 127254, Moscow (RU). ГОЛУБЕВА, Наталья Александровна (GOLUBEVA, Natalia Alexandrovna); Рублевское ш., 24, корп. 2, кв. 65 Москва, 121615, Moscow (RU).

(74) Агент: КВАШНИН, Валерий Павлович (KVASHNIN, Valery Pavlovich); ООО "Патентные поверенные Квашнин, Сапельников и партнеры", а/я 88 Москва, 105064, Moscow (RU).

(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH,

(54) Title: PHARMACUETICAL COMPOSITIONS FOR TREATING INFLAMMATORY INFECTIOUS DISEASES

(54) Название изобретения: ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57) Abstract: The invention relates to the field of medicine and the chemical and pharmaceutical industry, and more particularly to improved Gramicidin S-containing substances comprising specific amounts of novel cyclic decapeptides from the Gramicidin S family, as well as to pharmaceutical compositions containing same for treating inflammatory infectious diseases.

(57) Реферат: Изобретение относится к области медицины и химико-фармацевтической промышленности, а именно к улучшенным субстанциям грамицидина С, содержащих определенные количества новых циклических декапептидов из семейства грамицидинов С, а также к содержащим их фармацевтическим композициям для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний.



WO 2023/085973 A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

ОПИСАНИЕ

Изобретение относится к области медицины и химико-фармацевтической промышленности, а именно к улучшенным субстанциям грамицидина С, содержащих определенные количества новых циклических декапептидов из семейства грамицидинов С, а также к содержащим их фармацевтическим композициям для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний.

Уровень техники

Инфекционно-воспалительные заболевания полости рта и глотки (фарингит, глоссит, стоматит, гингивит и другие) относятся к наиболее частым причинам обращаемости пациентов к участковым терапевтам, оториноларингологам, педиатрам, что связано с высоким уровнем заболеваемости среди людей молодого, трудоспособного возраста и детей, терапевтическая тактика при инфекционно-воспалительных заболеваниях слизистой оболочки полости рта и глотки включает в себя назначение лекарственных препаратов, обладающих противовоспалительным, анальгезирующим, иммунокорректирующим действием, локальных антисептиков, противоотечных и гипосенсибилизирующих препаратов [Морозова С.В. Боль в глотке: причины и возможности медикаментозной терапии. РМЖ, том 13, №21, 2005, с. 1447-1452].

Одной из групп препаратов, используемых для лечения указанной группы заболеваний, остаются топические антибиотики. В медицинскую практику внедряются новые поколения антибиотиков. В то же время существует тенденция наряду с поиском новых фармакологических средств максимально использовать потенциал уже известных средств.

К таким средствам относится грамицидин С - первый оригинальный отечественный антибиотик-полипептид тиротрициновой группы, выделенный из культуры *Bacillus brevis* Г.Ф. Гаузе и М.Г. Бражниковой в 1942 г., предназначенный исключительно для местного применения [Gause, G. G.; Brazhnikova, M. G. Gramicidin S

and its use in the treatment of infected wounds. Nature 1944, 154, 703]. Препараты грамицидина С обладают выраженным бактерицидным действием в отношении патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий [Kondejewski, L. H., et al. Gramicidin S Is Active against Both GramPositive and Gram-Negative Bacteria. Int. J. Pept. Protein Res. 1996, 47(6), 460–466], которые в большинстве случаев либо непосредственно являются причиной заболеваний горла и полости рта, либо присоединяются вторично при изначально вирусной инфекции, - *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, нейссерий, анаэробов и др. Препараты грамицидина С обладают также некоторой фунгистатической и противовирусной активностью. Согласно современным представлениям о рациональной антибиотикотерапии, с целью профилактики возникновения и распространения устойчивых штаммов микроорганизмов во всех случаях, когда с высокой степенью вероятности можно предсказать возбудителя инфекции, предпочтение рекомендуется отдавать именно таким препаратам. Устойчивость к полипептидам развивается достаточно редко. В литературе имеется очень мало сообщений о выделении резистентных к грамицидину С штаммов микроорганизмов от больных или из природных источников. Очень трудно получить устойчивые к этому антибиотику штаммы и в лабораторных условиях [Полин А.Н., Егоров Н.С. Структурно-функциональные особенности грамицидина С в связи с его антибиотической активностью // Антибиотики и химиотерапия. - 2003. - №48(12). - С. 29-32]. Благодаря оригинальности химической структуры, механизма действия и способу применения использование грамицидина С не должно сопровождаться повышением уровня устойчивости к антибиотикам для системного применения.

Известны препараты грамицидина С в виде таблеток [патент РФ №2213558, опубл. 10.10.2003] и в виде жидких композиций [патент РФ №2633635, опубл. 16.10.2017; патент РФ №2604576, опубл. 10.12.2016; патент РФ №2627423, опубл. 08.08.2017]. Также известны комбинации грамицидина С с амброксолом [патент РФ №2749902, опубл. 18.06.2021], грамицидина С с цетилпиридиния хлоридом [патент РФ №2633635, опубл. 16.10.2017] и с оксibuпрокаина гидрохлоридом [патент РФ №2627423, опубл. 08.08.2017].

В настоящее время известны три циклических декапептида из семейства грамицидинов С, имеющих схожую антибактериальную активность: грамицидин С (также имеет обозначение грамицидин С-1), грамицидин С-2 и грамицидин С-3 [Nozaki, S., & Muramatsu, I. (1985). Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin

S-2 and S-3. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 58(1), 331-335.]. Указанные грамицидины С имеют следующие структуры:

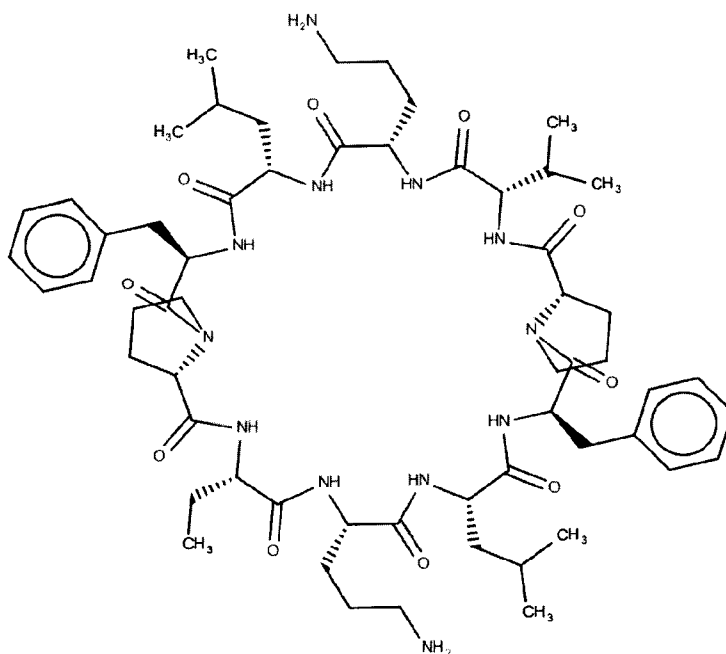
грамицидин С: цикло(–Val–Orn–Leu–D-Phe–Pro–Val–Orn–Leu–D-Phe–Pro–);

грамицидин С-2: цикло(–Val–Orn–Leu–D-Phe–Pro– Abu–Orn–Leu–D-Phe–Pro–);

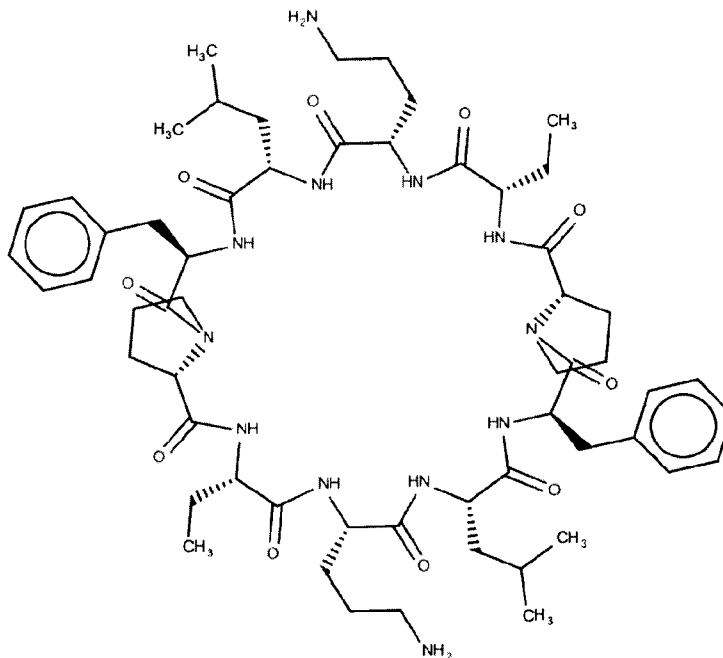
грамицидин С-3: цикло(–Abu–Orn–Leu–D-Phe–Pro–Abu–Orn–Leu–D-Phe–Pro–);

где Abu – остаток 2-аминомасляной кислоты.

Грамицидин С-2 имеет следующую структурную формулу:



Грамицидин С-3 имеет следующую структурную формулу:



С учетом распространенности инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и глотки есть необходимость в создании новых эффективных лекарственных средств с антибактериальной активностью.

Таким образом, задачей настоящего изобретения является расширение арсенала лекарственных препаратов грамицидина С, включающее разработку новых эффективных композиций на основе грамицидина С, обладающих повышенной антибактериальной активностью.

Задача решается получением улучшенных субстанций и композиций грамицидина С, содержащих определенные количества циклических декапептидов из семейства грамицидинов С, и создание содержащих их эффективных антибактериальных фармацевтических композиций.

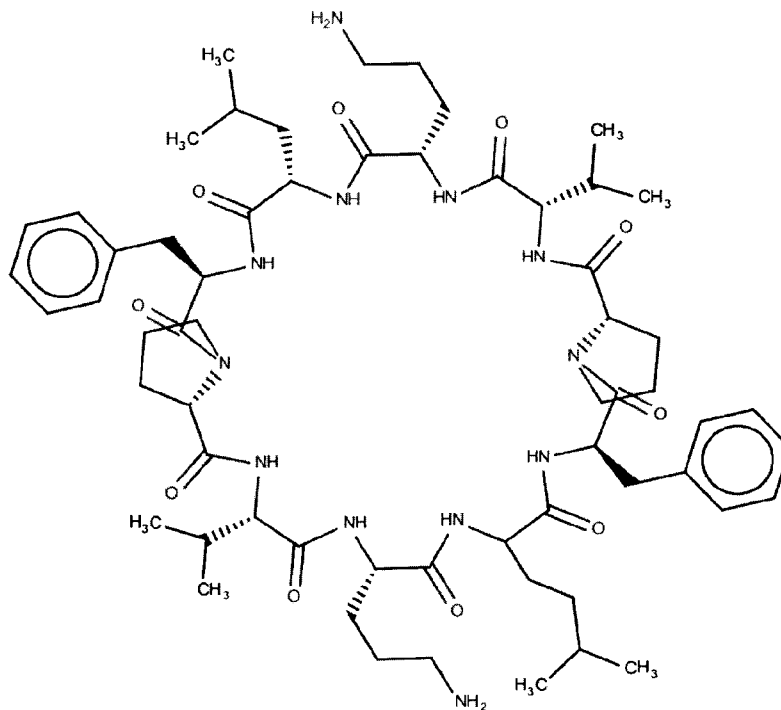
Раскрытие сущности изобретения

Авторы изобретения получили новые, ранее неизвестные циклические декапептиды из семейства грамицидинов С, которым были присвоены следующие названия: грамицидин С-4-1, грамицидин С-4-2, грамицидин С-5.

Таким образом, предметом настоящего изобретения является грамицидин С-4-1, представляющий собой циклический декапептид из семейства грамицидинов С,

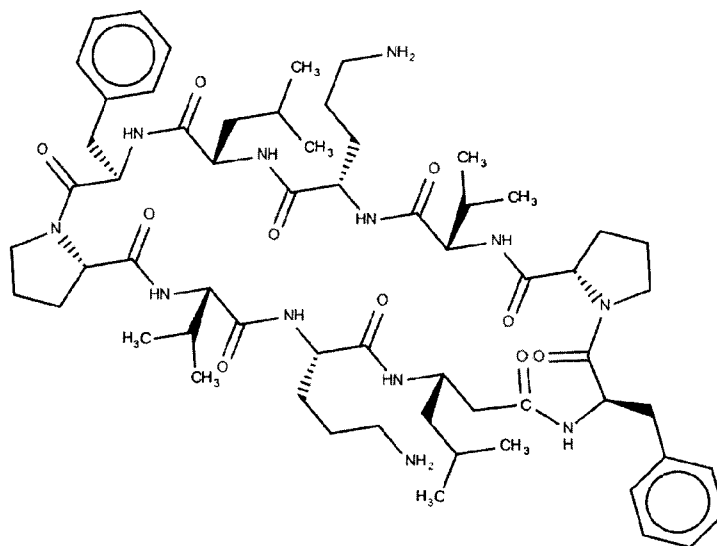
отличающийся тем, что он имеет следующую структуру: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-2-амино-(5-метилгексановая кислота)-D-Phe-Pro-).

Грамицидин С-4-1 имеет следующую структурную формулу:



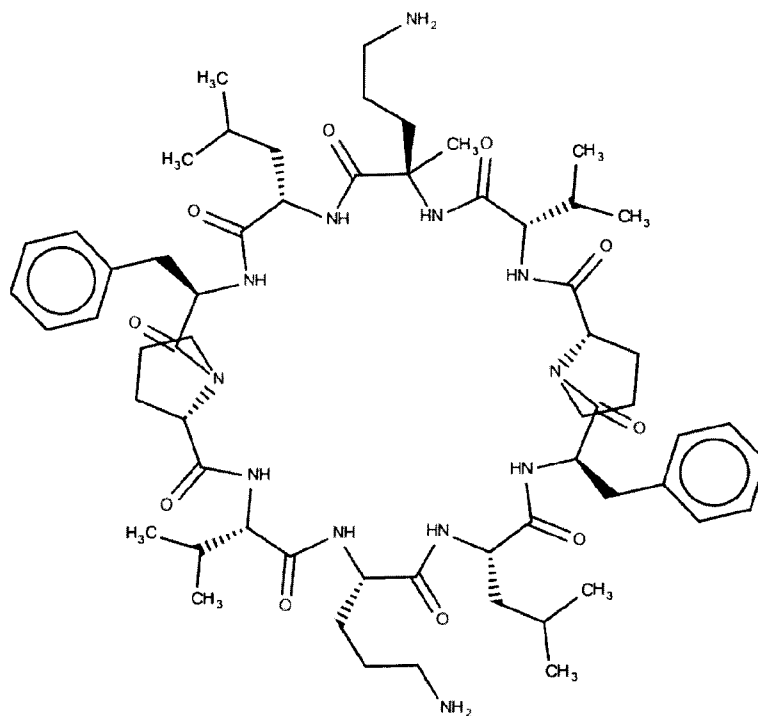
Предметом настоящего изобретения также является грамицидин С-4-2, представляющий собой циклический декапептид из семейства грамицидинов С, отличающийся тем, что он имеет следующую структуру: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-β-гомолейцин-D-Phe-Pro-).

Грамицидин С-4-2 имеет следующую структурную формулу:



Предметом настоящего изобретения также является грамицидин С-5, представляющий собой циклический декапептид из семейства грамицидинов С, отличающийся тем, что он имеет следующую структуру: цикло(-Val- α -метил-L-орнитин-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-).

Грамицидин С-5 имеет следующую структурную формулу:



Предметом настоящего изобретения также является активная фармацевтическая субстанция грамицидина С, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль, грамицидин С-4-1 и/или грамицидин С-4-2 и/или грамицидин С-5 в следующем соотношении (% масс.):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

Грамицидин С-4-1 и/или С-4-2 – 0-3,5% масс.;

Грамицидин С-5 – 0-5,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-1 в количестве не более 3,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-1 в количестве не более 2,5% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-2 в количестве не более 2,5% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-2 в количестве не более 2,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-2 в количестве не более 1,5% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-2 в количестве не более 1,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит грамицидин С-4-2 в количестве не более 0,5% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-4-2 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме его фармацевтически приемлемой соли.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-4-2 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме дигидрохлорида.

В одном из вариантов настоящего изобретения активная фармацевтическая субстанция содержит дополнительно неидентифицируемые примеси в количестве не более 2,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме дигидрохлорида.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-4-1 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме его фармацевтически приемлемой соли.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-4-1 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме дигидрохлорида.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-5 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме его фармацевтически приемлемой соли.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-5 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме дигидрохлорида.

Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний для местного применения, содержащая описанную выше активную фармацевтическую субстанцию в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний для местного применения, содержащая циклические декапептиды из семейства грамицидинов С и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, отличающаяся тем, что она в качестве циклических декапептидов из семейства грамицидинов С содержит грамицидин С, грамицидин С-4-1 и/или грамицидин С-4-2 и/или грамицидин С-5 в следующем соотношении (% масс.):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

Грамицидин С-4-1 и/или С-4-2 – 0-3,5% масс.;

Грамицидин С-5 – 0-5,0% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-5 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме его фармацевтически приемлемой соли.

В одном из вариантов настоящего изобретения грамицидин С-5 в составе активной фармацевтической субстанции находится в форме дигидрохлорида.

Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний для местного применения, содержащая описанную выше активную фармацевтическую субстанцию в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

Предметом настоящего изобретения также является фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний для местного применения, содержащая циклические декапептиды из семейства грамицидинов С и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, отличающаяся тем, что она в качестве циклических декапептидов из семейства грамицидинов С содержит

граммицидин С, грамицидин С-4-2 и/или грамицидин С-5 в следующем соотношении (% масс.):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

Грамицидин С-4-2 – 0-3,5% масс.;

Грамицидин С-5 – 0-5,0% масс.

Предметом настоящего изобретения также является активная фармацевтическая субстанция грамицидина С, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и 0-3,5% масс. циклического декапептида, имеющего структуру цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-2-амино-(5-метилгексановая кислота)-D-Phe-Pro-) и/или цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-β-гомолейцин-D-Phe-Pro-).

Предметом настоящего изобретения также является активная фармацевтическая субстанция грамицидина С, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и 0-5,0% масс. циклического декапептида, имеющего структуру цикло(-Val-α-метил-L-орнитин-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-).

Предметом настоящего изобретения также является применение фармацевтических композиций по настоящему изобретению для лечения или улучшения состояния при инфекционно-воспалительном заболевании полости рта и горла.

Предметом настоящего изобретения также является лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль, грамицидин С-4-1 и/или С-4-2, и грамицидин С-5 (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидина С):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

Грамицидин С-4-1 и/или С-4-2 – 0-3,5% масс.;

Грамицидин С-5 – 0-5,0% масс.

Предметом настоящего изобретения также является лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его

фармацевтически приемлемую соль грамицидин С-4-1 и/или С-4-2 в следующем количестве (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидина С):

Грамицидин С – 96,5-99,9% масс.;

Грамицидин С-4-1 и/или С-4-2 – 0-3,5% масс.

Предметом настоящего изобретения также является лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и грамицидин С-5 в следующем количестве (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидина С):

Грамицидин С – 95,0-99,9% масс.;

Грамицидин С-5 – 0-5,0% масс.

Предметом настоящего изобретения также является способ разделения циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанциях, основанный на методе ВЭЖХ, включающий следующие стадии:

- приготовление буферного раствора с рН 2,5 путем смешивания перхлората лития, воды, фосфорной кислоты и натрия гидроксида;
- приготовления растворителя путем смешивания буферного раствора с рН 2,5 и ацетонитрила в соотношении 1:1 (о:о);
- приготовление испытуемого раствора путем растворения порошка субстанции в растворителе;
- разделение циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанции методом ВЭЖХ с использованием колонки «Kinetex® C18» (2,6 мкм; 100 x 4,6 мм фирмы Phenomenex) при скорости потока 0,9 мл/мин, температуре колонки (15 ± 1)°С и при следующем градиентном режиме:

Время, мин	Подвижная фаза А (буферный раствор рН 2,5), %	Подвижная фаза Б (ацетонитрил для жидкостной хроматографии), %
0 -...18	52 => 40	48 => 60
18 -...24	40 => 20	60 => 80

24 -...27	20	80
27 -...28	20 => 52	80 => 48
28 -...35	52	48

В одном из вариантов настоящего изобретения способ разделения циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанциях включает определение содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в испытуемом растворе по получаемым хроматограммам.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что активные фармацевтические субстанции грамицидина С и фармацевтические композиции по настоящему изобретению обладают:

- повышенной антибактериальной активностью по отношению к патогенным бактериям;
- сниженной антибактериальной активностью по отношению к непатогенным бактериям нормальной микробиоты человека;
- сниженной антибактериальной активностью по отношению к непатогенным бактериям нормальной микробиоты дыхательных путей человека;
- сниженной частотой возникновения и интенсивностью побочных эффектов;
- повышенной противовоспалительной активностью;
- улучшенной стабильностью при хранении;
- сниженной гигроскопичностью.

Таким образом, техническими результатами настоящего изобретения являются:

- расширение арсенала лекарственных препаратов грамицидина С;
- повышенная антибактериальная активность по отношению к патогенным бактериям у активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению;
- сниженная антибактериальная активность по отношению к непатогенным бактериям нормальной микробиоты человека у активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению;

- сниженная антибактериальная активность по отношению к непатогенным бактериям нормальной микробиоты дыхательных путей человека у активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению;
- сниженная частота возникновения и интенсивности побочных эффектов;
- повышенная противовоспалительная активность активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению;
- улучшенная стабильность при хранении активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению;
- сниженная гигроскопичность активных фармацевтических субстанций и фармацевтических композиций по настоящему изобретению.

В одном из вариантов настоящего изобретения содержание циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в составе активных фармацевтических субстанций и/или композиций (в % масс.) рассчитывается методом нормализации по хроматограмме, полученной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), следующим образом: площадь пика целевого циклического декапептида делится на сумму площадей всех учитываемых пиков и умножается на 100 %. При определении содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С используется хроматографическая система, пригодная для разделения грамицидина С, грамицидинов группы С-4 и грамицидина С-5.

В одном из вариантов настоящего изобретения минимальное детектируемое количество циклического декапептида, определяемое методом ВЭЖХ, составляет 0,5% масс.

В одном из вариантов настоящего изобретения субстанции грамицидина С могут дополнительно содержать грамицидин С-2 и/или грамицидин С-3.

В одном из вариантов настоящего изобретения субстанции грамицидина С содержат грамицидин С в количестве 85,0-99,9 % масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидина С в субстанции.

В одном из вариантов настоящего изобретения инфекционно-воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ангины, пародонтоза, фарингита, тонзиллита, пародонтита, гингивита, стоматита, глоссита, аденоидита, ларингита.

В одном из вариантов настоящего изобретения инфекционно-воспалительное заболевание относится к инфекционно-воспалительным заболеваниям полости рта и горла.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция выполнена в форме раствора для местного применения.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция выполнена в форме спрея.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическую композицию в форме раствора для местного применения применяют после еды, местно путем орошения или путем распыления на слизистую оболочку полости рта и горла.

В одном из вариантов настоящего изобретения при применении фармацевтической композиции в форме спрея для максимального терапевтического эффекта следует хорошо прополоскать горло. Непосредственно после применения препарата следует воздержаться от приема пищи и напитков в течение 1 часа.

В одном из вариантов настоящего изобретения при применении фармацевтической композиции в форме спрея дозировка составляет 3-4 впрыска (1 впрыск = 200 мкл, 0,3 мг/мл грамицидина С) на 1 применение, 3-4 раза в день в течение 3-7 дней.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция выполнена в форме таблетки.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция выполнена в форме буккальной таблетки.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция выполнена в форме таблетки для рассасывания.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическую композицию в форме таблетки для рассасывания применяют после еды, путем рассасывания во рту не разжевывая. Непосредственно после применения препарата следует воздержаться от приема пищи и напитков в течение 1-2 часов.

В одном из вариантов настоящего изобретения при применении фармацевтической композиции в форме таблетки для рассасывания дозировка составляет по 1 таблетке (3 мг грамицидина С) 1-4 раза в день в течение 7 дней.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит антисептик. В качестве антисептика используются цетилпиридиний, бензалконий, бензетоний, цеталкония хлорид, цетримония хлорид, цетримид, хлоргексидин, дидецилдиметиламмония хлорид, домифен бромид, дофания хлорид, тетраэтиламмония бромид и др. Группа не исчерпывается данным списком.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит анестетик. В качестве анестетика используются лидокаин, тримекаин, ультракаин, мепивакаин, прокаин, дикаин, бензокаин, оксибупрокаин, бупивакаин. Группа не исчерпывается данным списком.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению дополнительно содержат цетилпиридиния хлорид и/или оксибупрокаина гидрохлорид.

В одном из вариантов настоящего изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут вводиться (не ограничиваясь указанным) перорально, ингаляционно, местно.

Лекарственные формы фармацевтических композиций по настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанным: таблетки, в частности, буккальные таблетки, шипучие таблетки, диспергируемые в полости рта таблетки и т.п.; растворы, аэрозоли, спреи, и другие лекарственные формы.

Терапевтическая дозировка активной фармацевтической субстанции или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащие в терапевтически эффективном количестве грамицидин С, у пациентов может корректироваться в зависимости от терапевтической эффективности, возраста, пола и стадии заболевания пациента.

Ниже приведены определения терминов, которые используются в описании настоящего изобретения.

Если не указано иное, все технические и специальные термины, использованные в данном контексте, имеют общепринятое в данной области техники значение.

Термин «лекарственное начало», «лекарственная субстанция», «лекарственное вещество» означает физиологически активное вещество (действующее вещество) синтетического или иного (биотехнологического, растительного, животного,

микробного и прочего) происхождения, обладающее фармакологической активностью и являющееся активным началом фармацевтической композиции, используемой для производства и изготовления лекарственного препарата (средства).

Термин «лекарственное средство» означает вещество (или комбинацию веществ), вступающее в контакт с организмом человека или животного, проникающее в органы и ткани организма человека или животного, и предназначенное для восстановления, исправления или изменения физиологических функций у человека и животных, а также для лечения и профилактики болезней. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Термин «лекарственный препарат», «препарат» означает лекарственное средство в виде лекарственной формы, применяемой для лечения и профилактики заболевания.

Термин «лекарственная форма» означает состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» в контексте настоящего изобретения характеризует вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств.

«Фармацевтическая композиция» в контексте настоящего изобретения обозначает композицию, включающую в себя активное вещество и, по крайней мере, одно из фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ, применяемых в данной области техники, где «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» в контексте настоящего изобретения выбрано из группы, состоящей из фармацевтически приемлемых и фармакологически совместимых носителей, вспомогательных средств, таких как растворители, разбавители, консерванты, стабилизаторы, наполнители, дезинтегранты, увлажнители, эмульгаторы, суспендирующие агенты, загустители, подсластители, отдушки, ароматизаторы, антибактериальные агенты, фунгициды, лубриканты, регуляторы пролонгированной доставки, антисептики, анестетики, солюбилизаторы, буферные агенты, выбор и соотношение которых зависит от их природы, способа введения композиции и дозировки. Защита от действия микроорганизмов может быть обеспечена с помощью разнообразных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, таких как бензиловый спирт, уротропин, этилендиаминтетрауксусная кислота, бензойная кислота,

хлорбутанол, сорбиновая кислота, парабены, алкилпиридиний, бензетоний и их фармацевтически приемлемые соли и подобные им соединения. Фармацевтическая композиция может включать также изотонические агенты, например, сахара, хлористый натрий и им подобные. Пролонгированное действие композиции может быть обеспечено с помощью агентов, замедляющих абсорбцию активного начала, например, таких как гидрофильные полимерные замедлители высвобождения, например, производные целлюлозы, в частности, гидроксипропилметилцеллюлоза, полиэтиленоксид, желатин, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, альгинаты, карбомеры, гидрофобные замедлители высвобождения, такие как глицерилбегенат, моностеарат алюминия. Примерами подходящих носителей, растворителей и разбавителей являются вода, этанол, полиспирты, буферные растворы, а также их смеси, растительные масла (такие, например, как оливковое масло) и органические сложные эфиры (такие, например, как этилолеат). Примерами наполнителей являются лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, цитрат натрия, карбонат кальция, фосфат кальция и им подобные. Примерами лубрикантов являются стеарат магния, лаурилсульфат натрия, тальк, а также полиэтиленгликоль. Примерами скользящих агентов являются кремния диоксид коллоидный, крахмал, тальк и тому подобное.

Термин «наполнитель» или «разбавитель» означает вспомогательные вещества, используемые для придания твердым лекарственным формам заданного объема или массы. В качестве наполнителей могут быть использованы крахмал, глюкоза, сахароза, лактоза (молочный сахар), магния карбонат основной, магния окись, натрия хлорид, натрия гидрокарбонат, глина белая (каолин), желатин, целлюлоза микрокристаллическая (МЦК), метилцеллюлоза (МЦ), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na КМЦ), кальция карбонат, кальция фосфат двузамещенный, глицин (аминоуксусная кислота), декстрин, амилопектин, ультраамилопектин, сорбит, маннит, пектин и др. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «связывающие» означает вещества, входящие в состав таблетуемой массы для придания ей необходимой вязкости. В качестве связывающих веществ используются вода, спирт этиловый, крахмальный клейстер, сахарный сироп, растворы: карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), оксиэтилцеллюлозы (ОЭЦ), оксипропилметилцеллюлозы (ОПМЦ); поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон (ПВП), альгиновая кислота, натрия альгинат, желатин и др. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «разрыхлитель» означает вещества, используемые для улучшения распадаемости или растворения, обеспечивая механическое разрушение таблеток в жидкой среде, что необходимо для скорейшего высвобождения действующего вещества. Разрыхлитель может быть представлен одним или несколькими из числа микrokристаллической целлюлозы, кроскармеллозы натрия, кросповидона, натриевой соли гликолята крахмала, крахмала, пектина, желатина, амилопектина, ультраамилопектина, агар-агар, альгиновой кислоты, калия и натрия альгината, твин-80 и др. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «скользящее вещество» означает вспомогательные вещества, используемые в технологическом процессе производства таблеток на стадии прессования для улучшения текучести гранул или порошка за счет уменьшения трения между частицами. Скользящее вещество может быть представлено одним или несколькими из числа крахмала, талька, полиэтиленоксида-4000, стеариновой кислоты, кальция и магния стеарата и др. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «смазывающее вещество» или «лубликант» означает вспомогательные вещества, способствующие уменьшению силы трения между поверхностью таблетки и стенками кюветы пуансона, в которой таблетка формируется, используемые в технологическом процессе производства таблеток на стадии прессования. Смазывающее вещество может быть представлено одним или несколькими из числа стеарата магния, стеарата кальция, стеарил фумарата натрия, полиэтиленгликоля (с молекулярной массой свыше 3350), лаурилсульфата натрия, талька, минерального масла, лейцина и полоксамера и др. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «антисептик» означает четвертичные аммониевые соли, а также другие соединения: цетилпиридиний, бензалконий, бензетоний, цеталкония хлорид, цетримония хлорид, цетримид, хлоргексидин, дидецилдиметиламмония хлорид, домифен бромид, дофания хлорид, тетраэтиламмония бромид. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «анестетик» означает лидокаин, тримекаин, ультракаин, мепивакаин, прокаин, дикаин, бензокаин, оксипрокаин, бупивакаин. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «ароматизатор» означает ароматические вещества, относящиеся к ароматизаторам искусственным, идентичным натуральным либо натурального происхождения.

Термин «увлажнитель» означает также загуститель для замедления гидролиза компонентов; в качестве увлажнителя можно использовать: пропиленгликоль, гексиленгликоль, бутиленгликоль, глицерил триацетат (он же триацетин, если не ошибаюсь), неоагаробиоза, сорбитол, ксилит, мальтитол, мальтол. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «подсластитель» означает сукралозу, ацесульфам калия, сахаринат натрия. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «консервант» означает пропил парабен, метил парабен, бензойную кислоту, этилпарабен, бензоат натрия, калия. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «солубилизатор» означает полисорбат, ПАВ, в присутствии которого лучше растворяются труднорастворимые антибиотики. Группа включает плуроники, полиэтилгликоли. Группа не исчерпывается данным списком.

Термин «фармацевтически приемлемый» в контексте настоящего изобретения означает, что данное вещество или композиция, в отношении которых применяется этот термин, должны быть совместимы с точки зрения химии и/или токсикологии с другими ингредиентами, входящими в состав препарата, и безопасны для того, кого лечат (снимают симптомы) этим веществом или композицией.

Выражение «находится в твердой форме» в данном контексте характеризует фармацевтические композиции и лекарственные средства твердой, плотной или вязкой консистенции, в которых частицы не могут свободно перемещаться, а могут только совершать малые колебания около положения равновесия, при этом частицы активно взаимодействуют между собой.

Термин активная фармацевтическая субстанция (АФС) в контексте настоящего изобретения означает продукт синтеза, содержащий любое вещество или смесь веществ синтетического или иного (биотехнологического, растительного, животного, микробного и прочего) происхождения, предназначенный для производства лекарственных средств, который в процессе производства лекарственного средства (препарата) становится активным ингредиентом этого лекарственного средства. Такие продукты предназначены для проявления фармакологической активности или другого прямого эффекта при диагностике, лечении, облегчении симптомов или профилактике болезни, или для воздействия на структуру или функцию организма.

Термин «фармацевтически приемлемые соли» или «соли» включает соли активных соединений, которые получены с помощью относительно нетоксичных кислот. Примерами фармацевтически приемлемых нетоксичных солей могут служить соли, образованные неорганическими кислотами, такими как соляная, бромоводородная, фосфорная, серная и хлорная кислоты, или органическими кислотами, такими как уксусная, щавелевая, малеиновая, винная, янтарная, лимонная или малоновая кислоты, или полученные другими методами, используемыми в данной области. К другим фармацевтически приемлемым солям относятся адипинат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, формиат, fumarat, глюкогептонат, глицерофосфат, глюконат, гемисульфат, гептанат, гексанат, гидройодид, 2-гидрокси-этансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурил сульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат (мезилат), 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, полуфумарат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, п-толуолсульфонат (тозилат), ундеканат, валериат и подобные.

Термины «содержащий», «содержит» в контексте настоящего изобретения означает, что указанные фармацевтические композиции и лекарственные средства включают перечисленные компоненты, но не исключают включение других компонентов.

Термин «эффективное количество» в контексте настоящего изобретения относится к количеству фармацевтической композиции или лекарственного средства, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или нарушения является достаточным для воздействия такого лечения на заболевание, нарушение или симптом. "Эффективное количество" может изменяться в зависимости от заболевания, нарушения и/или симптомов заболевания или нарушения, тяжести заболевания, нарушения и/или симптомов заболевания, возраста субъекта, подлежащего лечению, и/или веса субъекта, подлежащего лечению. Надлежащее количество в каждом конкретном случае будет очевидно специалисту в данной области или может быть определено путем стандартных экспериментов.

Термин «дозировка», используемый здесь, характеризует содержание одного или нескольких действующих веществ в количественном выражении на единицу дозы, или единицу объема, или единицу массы в соответствии с лекарственной формой либо для некоторых видов лекарственных форм количество высвобождаемого из лекарственной формы действующего вещества за единицу времени.

Термины «лечение», «терапия» охватывают лечение патологических состояний у млекопитающих, предпочтительно у человека, и включают: а) снижение, б) блокирование (приостановку) течения заболевания, в) облегчение тяжести заболевания, т.е. индукцию регрессии заболевания, г) реверсирование заболевания или состояния, к которому данный термин применяется, или одного или более симптомов данного заболевания или состояния.

Термин «профилактика», «предотвращение» охватывает устранение факторов риска, а также профилактическое лечение субклинических стадий заболевания у млекопитающих, предпочтительно у человека, направленное на уменьшение вероятности возникновения клинических стадий заболевания. Пациенты для профилактической терапии отбираются на основе факторов, которые, на основании известных данных, влекут увеличение риска возникновения клинических стадий заболевания по сравнению с общим населением. К профилактической терапии относятся: а) первичная профилактика и б) вторичная профилактика. Первичная профилактика определяется как профилактическое лечение у пациентов, клиническая стадия заболевания у которых еще не наступила. Вторичная профилактика - это предотвращение повторного наступления того же или близкого клинического состояния или заболевания.

Термин «ВЭЖХ» относится к методу высокоэффективной жидкостной хроматографии, одному из эффективных методов разделения сложных смесей веществ, широко применяемому как в аналитической химии, так и в химической технологии.

Термин «раствор для ППХС» относится к раствору для проверки пригодности хроматографической системы, используемому в процессе определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанциях методом ВЭЖХ.

Термин «раствор для ОЧХС» относится к раствору для оценки чувствительности хроматографической системы, используемому в процессе определения содержания

циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанциях методом ВЭЖХ.

Если не указано иное, все технические и специальные термины, использованные в данном контексте, имеют общепринятое в данной области техники значение.

Осуществление изобретения

Настоящее изобретение дополнительно поясняется, но не ограничивается следующими примерами, которые иллюстрируют настоящее изобретение.

Пример 1. Получение и определение новых циклических декапептидов из семейства грамицидинов С

Новые циклические декапептиды из семейства грамицидинов С (грамицидины С-4-1, С-4-2 и С-5) выделили и идентифицировали из субстанции грамицидина С, полученной при культивировании мутантного штамма, происходящего от штамма *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212 (RU2627182, 03.08.2017).

Мутантный штамм получали следующим образом.

Исходный штамм *Aneurinibacillus migulanus* ВКПМВ-10212, продуцирующий грамицидин С, растили на стандартной жидкой полусинтетической среде, содержащей дрожжевой автолизат, в качалочных колбах вместимостью 0,75 л (0,1 л среды) на круговой качалке (частота вращения 220 об/мин, амплитуда 1 м) при 37°C в течение 48 часов. Затем клетки последовательно обрабатывали рубомицином и акридиновым оранжевым в течение 20 минут каждый путем последовательного добавления указанных мутагенов к клеткам в финальных концентрациях 100 и 40 мкг/мл, соответственно.

Обработанные мутагенами клетки помещали на агаризованную среду Гаузе-Браунниковой в чашках Петри (по 50 мкл суспензии клеток на 1 чашку Петри). Затем клетки инкубировали при 37°C в течение 24 часов. По окончании инкубации исследовали полученные колонии клеток и отбирали те, которые морфологически отличались от исходного штамма.

В результате проведенного мутагенеза было отобрано семь колоний клеток. Далее для каждой отобранной мутантной колонии определяли выход грамицидина С.

Грамицидин С экстрагировали при помощи смеси этанол:НСl (соотношении 2:1 соответственно). Для количественного определения грамицидина С в получаемых субстанциях грамицидина С использовали метод ВЭЖХ.

Проведенный анализ ВЭЖХ показал, что в хроматограмме субстанции грамицидина С, полученной при культивировании одного из полученных мутантных штаммов, выявляются пики, отличающиеся от пиков известных из литературы грамицидинов С, С-2 и С-3.

Далее для анализа использовали ВЭЖХ методику, совместимую с масс-спектрометрической детекцией. В качестве водной фазы, совместимой с масс-спектрометрией, был выбран 0,1% раствор муравьиной кислоты (рН 2,7). Вещества с хроматографическими пиками, отличными от пиков грамицидинов С, С-2 и С-3, экстрагировали и проводили хромато-масс-спектрометрический анализ собранных образцов с получением MS и MS/MS спектров для собранных веществ. Для получения спектров сначала определяли ионы, время выхода которых совпадало с временем выхода интересующих веществ (MS1). Затем данные ионы подвергали фрагментации и детектировали полученные фрагменты (MS/MS). На основании анализа фрагментов проводили идентификацию выделенных веществ, которые относились к ранее не описанным в литературе циклическим декапептидам. Для определения структуры выделенных циклических декапептидов также проводили их гидролиз с последующим хромато-масс-спектрометрическим анализом продуктов гидролиза. Для определения аминокислотных замен, находящихся в выделенных декапептидах по сравнению со структурой грамицидина С, были построены экстрагированные ионные хроматограммы для аминокислот и их гомологов.

В результате проведенного анализа были определены следующие аминокислотные замены в выделенных декапептидах по сравнению со структурой грамицидина С:

1) остаток лейцина заменен на остаток 2-амино-5-метилгексановой кислоты (декапептиду присвоено название грамицидин С-4-1);

2) остаток лейцина заменен на остаток β -гомолейцина (декапептиду присвоено название грамицидин С-4-2);

3) остаток орнитина заменен на остаток α -метил-L-орнитина (декапептиду присвоено название грамицидин С-5).

Для проверки правильности определения структур полученных декапептидов, методом пептидного синтеза было синтезировано три референсных вещества:

- вещество №1, имеющее предполагаемую структуру грамицидина С-4-1: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-2-амино-(5-метилгексановая кислота)-D-Phe-Pro-);

- вещество №2, имеющее предполагаемую структуру грамицидина С-4-2: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn- β -гомолейцин-D-Phe-Pro-);

- вещество №3, имеющее предполагаемую структуру грамицидина С-5: цикло(-Val- α -метил-L-орнитин-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-).

Проведение хромато-масс-спектрометрического анализа референсных веществ подтвердило идентичность структур референсных веществ и новых циклических декапептидов - грамицидинов С-4-1, С-4-2, С-5, выделенных из субстанции грамицидина С мутантного штамма. Полученные результаты подтвердили правильность определения структур грамицидинов С-4-1, С-4-2, С-5.

При исследовании полученного штамма также было измерено количественное содержание грамицидинов С-4-1, С-4-2, С-5 в субстанции грамицидина С, полученной при его культивировании, методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы, пригодной для разделения грамицидина С, грамицидинов группы С-4 и грамицидина С-5.

Перед ВЭЖХ анализом субстанцию грамицидина С отделяли от культуральной жидкости и биомассы.

Полученные результаты показали, что в зависимости от условий культивирования штамма (варьирование оптической плотности культуры, температуры, освещения, состава и типа среды, длительности культивирования, объема ферментера, рН, уровня кислорода и др.) в субстанции грамицидина С, полученной при культивировании полученного мутантного штамма, обнаруживаются следующие количества грамицидинов группы С-4 и грамицидина С-5:

- 1) грамицидин С-4-1 или С-4-2 – 3,5% масс. или меньшее количество;
- 2) грамицидин С-5 – 5,0% масс. или меньшее количество.

При этом в независимости от условий культивирования субстанция грамицидина С, полученная при культивировании полученного мутантного штамма, всегда содержала детектируемые методом ВЭЖХ количества грамицидина С-5 и/или одного из грамицидинов группы С-4: С-4-1 или С-4-2. Минимально детектируемое количество циклического декапептида при используемом методе ВЭЖХ определили как 0,5% масс.

Также в независимости от условий культивирования субстанция грамицидина С, полученная при культивировании полученного мутантного штамма, всегда содержала не более 3,5% масс. грамицидина С-4-1 или С-4-2 и не более 5,0% масс. грамицидина С-5.

Пример 2. Метод ВЭЖХ с использованием хроматографической системы, пригодной для разделения грамицидина С, грамицидинов группы С-4 и грамицидина С-5

Для разделения и определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С методом ВЭЖХ использовали следующие реактивы: ацетонитрил для жидкостной хроматографии; фосфорная кислота концентрированная; перхлорат лития; натрия гидроксид.

В качестве буферного раствора использовали раствор с рН 2,5, который готовили следующим образом: 6,00 г перхлората лития помещали в мерную колбу вместимостью 1000 мл, прибавляли 900 мл воды для хроматографии, перемешивали до полного растворения соли, прибавляли 1,0 мл фосфорной кислоты концентрированной, перемешивали, доводили рН полученного раствора до $2,5 \pm 0,05$ с помощью раствора натрия гидроксида 30 %, доводили объем раствора водой для хроматографии до 1000 мл, перемешивали и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

В качестве растворителя использовали раствор, который готовили следующим образом: смешивали достаточные количества буферного раствора с рН 2,5 и ацетонитрил в соотношении 1:1 (о/о).

Испытуемый раствор готовили следующим образом: 25,0 мг порошка субстанции помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 20 мл

растворителя, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

В качестве стандартного раствора использовали раствор, который готовили следующим образом: 25,0 мг стандартного образца грамицидина С дигидрохлорида (образца, содержащего в своем составе детектируемые количества грамицидина С, грамицидина С-4-1 или С-4-2, грамицидина С-5) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в 20 мл растворителя, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

В качестве раствора для проверки пригодности хроматографической системы (раствор для ППХС) использовали раствор, который готовили следующим образом: 1,0 мл стандартного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 20,0 мл, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

В качестве раствора для оценки чувствительности хроматографической системы (раствор для ОЧХС) использовали раствор, который готовили следующим образом: 1,0 мл раствора для ППХС переносили в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, доводили объем раствора растворителем до метки и перемешивали.

Для разделения и определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С методом ВЭЖХ использовали следующие хроматографические условия:

Колонка - «Kinetex® C18», 2,6 мкм; 100 x 4,6 мм фирмы Phenomenex,
Подвижная фаза - А: буферный раствор pH 2,5,
Б: ацетонитрил для жидкостной хроматографии;

Градиентный режим

Время, мин	Подвижная фаза А, %	Подвижная фаза Б, %
0 -...18	52 => 40	48 => 60
18 -...24	40 => 20	60 => 80
24 -...27	20	80
27 -...28	20 => 52	80 => 48
28 -...35	52	48

Скорость потока - 0,9 мл/мин;
Температура колонки - (15 ± 1) °С;
Температура отделения для - (20 ± 3) °С;

образцов
Детектор - спектрофотометрический или диодно-матричный, 210 нм;
Объем вводимой пробы - 20 мкл.

Для разделения и определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С методом ВЭЖХ последовательно хроматографировали растворитель (2 инъекции), раствор для ОЧХС (1 инъекция), раствор для ППХС (1 инъекция), стандартный раствор (3 инъекции) и испытуемый раствор (3 инъекции).

Время удерживания пика грамицидина С определяли как около 17 мин, относительное время удерживания пика грамицидинов группы С-4 по отношению к пику грамицидина С – как около 1,20, пика грамицидина С-5 – как около 0,95.

Точные времена удерживания пиков грамицидинов С, С-4-1, С-4-2, С-5 устанавливали по хроматограмме раствора для ППХС. Типичную хроматограмму раствора для ППХС (раствора, содержащего в своем составе детектируемые количества грамицидина С, грамицидина С-4-1 или С-4-2, грамицидина С-5), получают методом ВЭЖХ с использованием хроматографической системы, пригодной для разделения грамицидина С, грамицидинов группы С-4 и грамицидина С-5.

Для определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С методом ВЭЖХ не учитывали пики из растворителя, пики до 7,0 мин (вещества, не относящиеся к циклическим декапептидам из семейства грамицидинов С), пики после 25 мин (возвращение системы в исходное состояние) и пики с площадью менее площади пика грамицидина С на хроматограмме раствора для ОЧХС (менее 0,10 %).

Для определения содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С методом ВЭЖХ содержание целевого декапептида (*i*) в процентах (X_i) вычисляли по формуле:

$$X_i = \frac{S_i \times 100}{\sum S_i},$$

где S_i – площадь пика целевого декапептида *i* на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение по трем хроматограммам);

$\sum S_i$ – сумма площадей всех пиков декапептидов из семейства грамицидинов С на хроматограмме испытуемого раствора (среднее значение по трем хроматограммам).

Пример 3. Активные фармацевтические субстанции по настоящему изобретению

Для исследования свойств новых субстанций грамицидина С получали составы 1-14 (Таблица 1) путем добавления определенного количества грамицидинов С-4-1, С-4-2, С-5, синтезированных методом пептидного синтеза, к очищенной субстанции грамицидина С, содержащей только грамицидин С-1.

Содержание грамицидинов С, С-4-1, С-4-2 и С-5 в полученных составах субстанций указаны в Таблице 1.

Таблица 1. Составы активных фармацевтических субстанций по настоящему изобретению с указанием соотношения грамицидинов С (в % масс.)

№ состава	Грамицидин С, % масс.	Грамицидин С-4-1, % масс.	Грамицидин С-4-2, % масс.	Грамицидин С-5, % масс.
Состав 1	99,0	0,5	0	0,5
Состав 2	96,0	3,5	0	0,5
Состав 3	94,5	0,5	0	5,0
Состав 4	91,5	3,5	0	5,0
Состав 5	99,0	0	0,5	0,5
Состав 6	96,0	0	3,5	0,5
Состав 7	94,5	0	0,5	5,0
Состав 8	91,5	0	3,5	5,0
Состав 9	99,5	0	0	0,5
Состав 10	95,0	0	0	5,0
Состав 11	99,5	0,5	0	0
Состав 12	96,5	3,5	0	0
Состав 13	99,5	0	0,5	0
Состав 14	96,5	0	3,5	0

Пример 4. Антибактериальная активность активных фармацевтических субстанций по настоящему изобретению *in vitro*

Для полученных в примере 3 активных фармацевтических субстанций (составы 1-14) определяли их антибактериальную активность *in vitro* согласно следующей методике: методом диффузии в агаре определяли минимальную ингибирующую концентрацию (в мкг/мл) каждого из составов 1-14, которая полностью ингибировала рост тестового бактериального штамма на агаризованной мясопептонной среде.

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли методом серийных микроразведений исходных субстанций и добавления каждого микроразведения к тестируемому бактериальному штамму. Минимальную ингибирующую концентрацию определяли как последнее разведение, в котором отсутствовал рост тестового бактериального штамма.

В качестве тестируемого бактериального штамма использовали штамм *Bacillus cereus* var. *Mycoides* 537.

В качестве составов сравнения готовили субстанции, которые либо содержат грамицидин С-4-1 или С-4-2 в количестве более 3,5% масс. и/или грамицидин С-5 более 5% масс. (составы 15-21), либо не содержат грамицидины С-4-1, С-4-2 и С-5 (составы 22, 23). Составы сравнения указаны в Таблице 2.

Грамицидины С-2 и С-3 в составе 22 были получены согласно методике, описанной в [Nozaki, S., & Muramatsu, I. (1985). Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 58(1), 331-335].

Грамицидин С в составе 23 был получен согласно методике, описанной в [Bu, X., Wu, X., Ng, N. L. J., Mak, C. K., Qin, C., & Guo, Z. (2004). Synthesis of Gramicidin S and Its Analogues via an On-Resin Macrolactamization Assisted by a Predisposed Conformation of the Linear Precursors. The Journal of Organic Chemistry, 69(8), 2681-2685].

Таблица 2. Составы сравнения с указанием соотношения грамицидинов С (в % масс.)

Состав №	Грамицидин С, %	Грамицидин С-2, % масс.	Грамицидин С-3, % масс.	Грамицидин С-4-1, % масс.	Грамицидин С-4-2, % масс.	Грамицидин С-5, % масс.
Состав 15	90,5	0	0	2,5	0	7
Состав 16	92,5	0	0	0	1,5	6
Состав 17	89	0	0	1	0	10
Состав 18	91,5	0	0	7	0	1,5
Состав 19	90,5	0	0	0	8,5	1
Состав 20	94	0	0	4	0	2
Состав 21	90,5	0	0	0	4	5,5
Состав 22	95	3	2	0	0	0
Состав 23	100	0	0	0	0	0

Полученная антибактериальная активность фармацевтических субстанций по настоящему изобретению и составов сравнения приведена в Таблице 3.

Таблица 3. Антибактериальная активность *in vitro* фармацевтических субстанций по настоящему изобретению (составы 1-14) и составов сравнения (составы 15-23) (приведена минимальная ингибирующая концентрация (в мкг/мл) в отношении штамма *Bacillus cereus* var. *Mycoides* 537)

Состав	Антибактериальная активность (минимальная ингибирующая концентрация в мкг/мл)
1	6,5

2	4,3
3	5,8
4	6,3
5	5,0
6	3,8
7	5,5
8	6,0
9	6,8
10	7,0
11	6,8
12	6,5
13	6,5
14	6,3
15	8,0
16	8,5
17	8,0
18	8,8
19	8,3
20	9,0
21	8,8
22	13,5
23	14,3

Из таблицы 3 видно, что активные фармацевтические субстанции по настоящему изобретению имеют более низкие значения минимальной ингибирующей концентрации, чем составы сравнения, то есть субстанции по настоящему изобретению обладают более высокой антибактериальной активностью, чем составы сравнения.

Таким образом, содержание грамицидина С-4-1 или С-4-2 в количестве не более 3,5% масс. и грамицидина С-5 в количестве не более 5,0% масс. в субстанции грамицидина С приводит к неожиданному улучшению их антибактериальных свойств против патогенных бактерий *in vitro*. При этом субстанции сравнения, не содержащие грамицидины С-4 и С-5, характеризуются сниженной антибактериальной активностью

против патогенных бактерий *in vitro* по сравнению с субстанциями по настоящему изобретению.

Активные фармацевтические субстанции по настоящему изобретению также имеют неожиданно более высокие значения минимальной ингибирующей концентрации по отношению к штаммам непатогенных бактерий микробиоты здоровых людей, чем составы сравнения, то есть субстанции по настоящему изобретению обладают более низкой антибактериальной активностью против непатогенных бактерий, чем составы сравнения. Обнаруженная избирательность антибактериального действия субстанций по настоящему изобретению является большим преимуществом заявляемого изобретения, поскольку обеспечивает:

- (1) усиленный антибактериальный эффект против патогенных микроорганизмов,
- (2) одновременное снижение частоты возникновения и интенсивности побочных эффектов, связанных с негативным влиянием на нормальную микробиоту пищеварительной и дыхательных систем.

Для субстанций по настоящему изобретению, полученных при культивировании мутантного штамма из Примера 1, результаты антибактериальной активности были аналогичны результатам, указанным в Таблице 3.

Кроме того, соединения грамицидина С-4-1, С-4-2, С-5 показали самостоятельную антибактериальную активность против патогенных бактерий.

Пример 5. Гемолитическая активность активных фармацевтических субстанций по настоящему изобретению

Для полученных в примере 3 активных фармацевтических субстанций по настоящему изобретению (составы 1-14) и полученных в примере 4 составов сравнения (составы 15-23) определяли их гемолитическую активность.

Исследование гемолитической активности проводили следующим способом.

Свежесобранную кровь человека с гепарином центрифугировали для удаления лейкоцитов, полученные эритроциты трижды промывали физиологическим раствором и хранили при 4°C. Серийные разведения составов 1-23 в физиологическом растворе готовили в круглодонных микротитровальных планшетах, используя объемы 100 мкл. Эритроциты разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:25 (объем

клеток : объем физиологического раствора). Получившиеся суспензии добавляли по 50 мкл в каждую лунку с разведениями составов 1-23. Планшеты инкубировали при качании при 37°C, и концентрацию, необходимую для полного лизиса, определяли визуально через 4 часа. Полученные результаты приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Гемолитическая активность фармацевтических субстанций по настоящему изобретению (составы 1-14) и составов сравнения (составы 15-23)

Состав	Гемолитическая активность (концентрация в мкг/мл, необходимая для 100% лизиса эритроцитов)
1	15,5
2	18,0
3	17,5
4	17,0
5	16,5
6	17,5
7	15,0
8	16,0
9	18,0
10	16,5
11	18,0
12	17,5
13	18,0
14	16,0
15	11,5
16	11,5
17	10,0
18	11,0
19	10,5
20	10,5
21	11,0
22	13,0

23	12,5
----	------

Из Таблицы 4 видно, что субстанции по настоящему изобретению (составы 1-14) неожиданно обладают более высокими значениями концентрации, необходимой для лизиса 100% эритроцитов, то есть обладают сниженной гемолитической активностью по сравнению с составами сравнения (составы 15-23). Пониженная гемолитическая активность является большим преимуществом субстанций по настоящему изобретению, поскольку обеспечивает снижение частоты возникновения и интенсивности побочных эффектов.

Таким образом, содержание грамицидина С-4-1 или С-4-2 в количестве не более 3,5% масс. и/или грамицидина С-5 в количестве не более 5,0% масс. в субстанции грамицидина С приводит к неожиданному улучшению ее свойств, а именно, к снижению гемолитической активности. При этом субстанции сравнения, не содержащие грамицидины С-4 и С-5 или содержащие грамицидин С-4-1 или С-4-2 в количестве более 3,5% масс. или грамицидин С-5 в количестве более 5,0% масс., характеризуются повышенной гемолитической активностью по сравнению с субстанциями по настоящему изобретению.

Для субстанций по настоящему изобретению, полученным при культивировании мутантного штамма из Примера 1, результаты гемолитической активности были аналогичны результатам, указанным в Таблице 4.

Пример 6. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению

На основе полученных в примере 3 активных фармацевтических субстанций грамицидина С (составы 1-14, таблица 1) готовили фармацевтическую композицию в форме спрея следующего состава:

Грамицидин С (любой из составов 1-14 таблицы 1)	0,027-0,033	%
масс.		
Этанол 96%	7,3-10,9	% масс.
Сукралоза	0,09-0,11	% масс.
Глицерол	14,9-18,2	% масс.

Ароматизатор мятный	0,37-0,44 % масс.
Лимонной кислоты моногидрат масс.	0,026-0,032 %
Натрия цитрат масс.	0,0099-0,012 %
Полисорбат 80	0,18-0,22 % масс.
Метилпарагидроксибензоат (метилпарабен) масс.	0,0736-0,1104 %
Пропилпарагидроксибензоат (пропилпарабен) масс.	0,0080-0,0120 %
Вода очищенная	остальное

Указанную фармацевтическую композицию в виде спрея готовили следующим способом: добавляли глицерол в воду очищенную, перемешивали, затем добавляли лимонную кислоту моногидрат, натрия цитрат и сукралозу, перемешивали до полного растворения. Отдельно готовили раствор грамицидина С путем перемешивания воды очищенной, этанола 96% и полисорбата 80, добавлением грамицидина С, метилпарагидроксибензоата, пропилпарагидроксибензоата и перемешивания до полного растворения с последующим добавлением ароматизатора мятного и перемешивания. Полученные растворы перемешивали до полной гомогенизации и фильтровали.

На основе полученных в примере 3 активных фармацевтических субстанций грамицидина С (составы 1-14, таблица 1) готовили фармацевтическую композицию в форме таблетки для буккального введения следующего состава:

Грамицидин С (любой из составов 1-14 таблицы 1)	0,2-0,4 % масс.
Сахарная пудра	48,1-48,4% масс.
Сахар молочный	48,1-48,4% масс.
Метил целлюлоза МЦ-100	0,2-0,4% масс.
Кальция стеарат	2,8-3% масс.

Указанную фармацевтическую композицию в виде таблетки для буккального введения готовили следующим способом: сахар-рафинад в виде пудры и лактозу при соотношении 1:1 просеивали через сито 38, перемешивали, увлажняли смесью растворов из 5%-ного водного раствора метилцеллюлозы и спиртового раствора грамицидина С. Увлажненную массу гранулировали через сито с Д-1,2 мм, сушили на воздухе или в сушилке при температуре не более 40°C до содержания влаги 1,5-2,5%. По окончании сушки массу пропускали через гранулятор с диаметром отверстий барабана 1-1,2 мм. Полученный гранулят опудривали стеаратом кальция и таблетировали.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению ни в коем случае не ограничиваются представленными примерами, которые приведены лишь в качестве иллюстрации настоящего изобретения.

Настоящее изобретение ни в коем случае не ограничивается представленными примерами, которые приведены лишь в качестве иллюстрации настоящего изобретения.

Список цитируемой литературы

Патент РФ №2213558, опубл. 10.10.2003.

Патент РФ №2633635, опубл. 16.10.2017.

Патент РФ №2604576, опубл. 10.12.2016.

Патент РФ №2627423, опубл. 08.08.2017

Патент РФ №2749902, опубл. 18.06.2021

Патент РФ №2627182, опубл. 03.08.2017

Морозова С.В. Боль в глотке: причины и возможности медикаментозной терапии. РМЖ, том 13, №21, 2005, с. 1447-1452.

Полин А.Н., Егоров Н.С. Структурно-функциональные особенности грамицидина С в связи с его антибиотической активностью // Антибиотики и химиотерапия. - 2003. - №48(12). - С. 29-32.

Bu, X., Wu, X., Ng, N. L. J., Mak, C. K., Qin, C., & Guo, Z. (2004). Synthesis of Gramicidin S and Its Analogues via an On-Resin Macrolactamization Assisted by a Predisposed Conformation of the Linear Precursors. *The Journal of Organic Chemistry*, 69(8), 2681–2685.

Gause, G. G.; Brazhnikova, M. G. Gramicidin S and Its Use in the Treatment of Infected Wounds. *Nature* 1944, 154, 703.

Kondejewski, L. H.; Farmer, S. W.; Wishart, D. S.; Hancock, R. E. W.; Hodges, R. S. Gramicidin S Is Active against Both GramPositive and Gram-Negative Bacteria. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1996, 47(6), 460–466.

Nozaki, S., & Muramatsu, I. (1985). Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58(1), 331-335.

Swingle K., Hamilton R., Harrington J., Kvam D. “3-Benzoyldifluoromethanesulfonamide, sodium salt (diflumidone sodium, MBR 4164-8): a new anti-inflammatory agent” // *Arch. Int. Pharmacodyn*, 1971, vol. 189, pp. 129-144.

Формула изобретения

1. Циклический декапептид, обладающий следующей структурой:
Цикло – (X1 –X2- Leu–D-Phe–Pro–X6- Orn–X8- D-Phe–Pro–), где
X1 – валин или 2-аминомасляная кислота,
X2 – орнитин, α -метил-L-орнитин или 2-аминомасляная кислота,
X6 - валин или 2-аминомасляная кислота,
X8 - 2-амино-(5-метилгексановая кислота), β -гомолейцин или лейцин,
или его фармацевтически приемлемая соль.
2. Циклический декапептид или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, имеющий следующую структуру: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-2-амино-(5-метилгексановая кислота)-D-Phe-Pro-).
3. Циклический декапептид или его фармацевтически приемлемая соль по п.1, имеющий следующую структуру: цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe—Pro-Val-Orn- β -гомолейцин–D-Phe–Pro–).
4. Циклический декапептид или его фармацевтически приемлемая соль по п. 1, имеющий следующую структуру: цикло(-Val- α -метил-L-орнитин–Leu–D-Phe—Pro–Val–Orn– Leu– D-Phe–Pro–).
5. Активная фармацевтическая субстанция, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая по меньшей мере один декапептид по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемую соль.
6. Активная фармацевтическая субстанция, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль, циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 или п.3 и/или циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4.
7. Активная фармацевтическая субстанция по п. 6, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль в количестве 80-99,9% масс.
8. Активная фармацевтическая субстанция по п. 6, содержащая циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 – от 0 до 3,5% масс.

9. Активная фармацевтическая субстанция по п. 6, содержащая циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.3 – от 0 до 3,5% масс.;

10. Активная фармацевтическая субстанция по п. 6, содержащая циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4 – от 0 до 5,0% масс.

11. Активная фармацевтическая субстанция по п.6, дополнительно содержащая грамицидин С-2 и/или грамицидин С-3 или их фармацевтически приемлемые соли.

12. Активная фармацевтическая субстанция по п.6, где грамицидин С находится в форме дигидрохлорида.

13. Активная фармацевтическая субстанция по п.6, где инфекционно-воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ангины, пародонтоза, фарингита, тонзиллита, пародонтита, гингивита, стоматита, глоссита, аденоидита, ларингита.

14. Активная фармацевтическая субстанция по п.6, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль, циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 и/или по п.3 и циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4 в следующем количестве (% масс.):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

циклический декапептид или его фармацевтически приемлемая соль по п.2 и/или п.3 – 0-3,5% масс.;

циклический декапептид или его фармацевтически приемлемая соль по п.4 – 0-5,0% масс.

15. Фармацевтическая композиция для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний для местного применения, содержащая активную фармацевтическую субстанцию по любому из пп.5-14 в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, дополнительно содержащая цетилпиридиния хлорид и/или оксibuпрокаина гидрохлорид.

17. Фармацевтическая композиция по п.15, где инфекционно-воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ангины, пародонтоза, фарингита, тонзиллита, пародонтита, гингивита, стоматита, глоссита, аденоидита, ларингита.

18. Фармацевтическая композиция по п.15, где композиция выполнена в форме спрея или таблетки.

19. Применение фармацевтической композиции по пп. 15-18 для лечения или улучшения состояния при инфекционно-воспалительном заболевании полости рта и горла.

20. Применение по п.19, где инфекционно-воспалительное заболевание полости рта и горла выбрано из группы, состоящей из ангины, пародонтоза, фарингита, тонзиллита, пародонтита, гингивита, стоматита, глоссита, аденоидита, ларингита.

21. Активная фармацевтическая субстанция грамицидина С, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и 0-3,5% масс. циклического декапептида, имеющего структуру цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-2-амино-(5-метилгексановая кислота)-D-Phe-Pro-) или цикло(-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-β-гомолейцин-D-Phe-Pro-) или их фармацевтически приемлемые соли.

22. Активная фармацевтическая субстанция грамицидина С, предназначенная для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащая грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и 0-5,0% масс. циклического декапептида, имеющего структуру цикло(-Val-α-метил-L-орнитин-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-) или его фармацевтически приемлемую соль.

23. Лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее по меньшей мере один декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по любому из пп. 1-4.

24. Лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее по меньшей мере грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 или п.3 и/или циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4.

25. Лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль, циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 и/или по п.3 и циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4 в

следующем количестве (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С):

Грамицидин С – 91,5-99,9% масс.;

циклический декапептид по п.2 и/или п.3 – 0-3,5% масс.;

циклический декапептид по п.4 – 0-5,0% масс.

26. Лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.2 и/или по п.3 в следующем количестве (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С):

Грамицидин С – 96,5-99,9% масс.;

циклический декапептид по п.2 и/или п.3 – 0-3,5% масс.

27. Лекарственное средство для лечения инфекционно-воспалительных заболеваний, содержащее грамицидин С или его фармацевтически приемлемую соль и циклический декапептид или его фармацевтически приемлемую соль по п.4 в следующем количестве (% масс. от общего содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С):

Грамицидин С – 95,0-99,9% масс.;

циклический декапептид по п.4 – 0-5,0% масс.

28. Способ разделения циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанциях, основанный на методе ВЭЖХ, включающий следующие стадии:

- приготовление буферного раствора с рН 2,5 путем смешивания перхлората лития, воды, фосфорной кислоты и натрия гидроксида;

- приготовления растворителя путем смешивания буферного раствора с рН 2,5 и ацетонитрила в соотношении 1:1 (о:о);

- приготовление испытуемого раствора путем растворения порошка субстанции в растворителе;

- разделение циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в субстанции методом ВЭЖХ при градиентном режиме.

29. Способ по п.28, при котором по получаемым хроматограммам проводится определение содержания циклических декапептидов из семейства грамицидинов С в испытуемом растворе.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2022/000335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 7/66 (2006.01) A61K 38/12 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K, A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Espacenet, Google, PatSearch, STN Online, USPTO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUKEKASU NOZAKI and ICHIRO MURAMATSU. Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1985, 58(1), 331-335, p.331 left column, p.333 table 1	1,5-15, 17, 19-23,25-27
Y A		16, 18, 2-4, 24
Y	RU 2604576 C1 (OBSCHESTVO S OGRANICHENNOI OTVETSTVENNOSTIU "VALENTA - INTELLEKT"), 10.12.2016, the claims, example 1	16, 18
A	WO 2010/113042 A1 (UNIVERSITEIT LEIDEN), 07.10.2010, the claims	1-27
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 February 2023 (17.02.2023)		Date of mailing of the international search report 16 March 2023 (16.03.2023)
Name and mailing address of the ISA/ RU Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2022/000335

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

(see the supplemental sheet)

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-27**

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

This Authority has determined that the application PCT/RU2022/000335 does not satisfy the requirement of unity of invention, and comprises two groups of inventions, specifically:

Group I: claims 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 and 27, for which the special technical feature common to the group is that of the specific cyclic decapeptides described in claim 1; and

Group II: a method for the separation of cyclic decapeptides according to claim 28.

The reasons for which these inventions are not so linked as to form a single general inventive concept as required by PCT Rule 13.1 are the following:

The method for the separation of cyclic polypeptides claimed in claim 28 does not involve a corresponding special technical feature which would make it possible, when separating the cyclic polypeptides using the claimed method, to obtain cyclic polypeptides according to claims 1-4 or products containing said peptides according to claims 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 and 27. The method for the separation of cyclic peptides according to claim 28 relates to the separation of any cyclic decapeptides of the family Gramicidin S, which is not specifically intended either to produce any peptide according to claims 1-4 or to produce a product according to claims 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26 and 27.

As a result, claim groups I and II are not linked by the same or corresponding special technical features and they define different inventions that are not linked by a single general inventive concept. Therefore, the application does not satisfy the requirement of unity of invention pursuant to PCT Rule 13.1 and 13.2.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Номер международной заявки

PCT/RU 2022/000335

<p>A. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ C07K 7/66 (2006.01) A61K 38/12 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)</p> <p>Согласно Международной патентной классификации МПК</p>																		
<p>B. ОБЛАСТЬ ПОИСКА</p> <p>Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации)</p> <p style="text-align: center;">C07K, A61K, A61P</p> <p>Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки</p> <p>Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)</p> <p style="text-align: center;">Espacenet, Google, PatSearch, STN Online, USPTO</p>																		
<p>C. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Категория*</th> <th>Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей</th> <th>Относится к пункту №</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>SUKEKASU NOZAKI and ICHIRO MURAMATSU. Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1985, 58(1), 331-335, с.331 левый столбец, с.333 таблица 1</td> <td>1, 5-15, 17, 19-23, 25-27</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td rowspan="2">RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1</td> <td>16, 18,</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>2-4, 24</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1</td> <td>16, 18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2010/113042 A1 (UNIVERSITEIT LEIDEN), 07.10.2010, формула изобретения</td> <td>1-27</td> </tr> </tbody> </table>		Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	X	SUKEKASU NOZAKI and ICHIRO MURAMATSU. Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1985, 58(1), 331-335, с.331 левый столбец, с.333 таблица 1	1, 5-15, 17, 19-23, 25-27	Y	RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1	16, 18,	A	2-4, 24	Y	RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1	16, 18	A	WO 2010/113042 A1 (UNIVERSITEIT LEIDEN), 07.10.2010, формула изобретения	1-27
Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №																
X	SUKEKASU NOZAKI and ICHIRO MURAMATSU. Natural Homologs of Gramicidin S. II. Synthesis of Gramicidin S-2 and S-3, Bulletin of the Chemical Society of Japan, 1985, 58(1), 331-335, с.331 левый столбец, с.333 таблица 1	1, 5-15, 17, 19-23, 25-27																
Y	RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1	16, 18,																
A		2-4, 24																
Y	RU 2604576 C1 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВАЛЕНТА - ИНТЕЛЛЕКТ"), 10.12.2016, формула изобретения, пример 1	16, 18																
A	WO 2010/113042 A1 (UNIVERSITEIT LEIDEN), 07.10.2010, формула изобретения	1-27																
<p><input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы C. <input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении</p>																		
<p>* Особые категории ссылочных документов:</p> <p>“А” документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным</p> <p>“D” документ, цитируемый заявителем в международной заявке</p> <p>“E” более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее</p> <p>“L” документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)</p> <p>“O” документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.</p> <p>“P” документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета</p> <p>“T” более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение</p> <p>“X” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности</p> <p>“Y” документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста</p> <p>“&” документ, являющийся патентом-аналогом</p>																		
<p>Дата действительного завершения международного поиска</p> <p style="text-align: center;">17 февраля 2023 (17.02.2023)</p>	<p>Дата отправки настоящего отчета о международном поиске</p> <p style="text-align: center;">16 марта 2023 (16.03.2023)</p>																	
<p>Наименование и адрес ISA/RU: Федеральный институт промышленной собственности, Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация тел. +7(499)240-60-15, факс +7(495)531-63-18</p>	<p>Уполномоченное лицо: <p style="text-align: center;">Николаева Т.В.</p> Телефон № (8-499) 240-25-91</p>																	

Графа II Замечания для случая, когда некоторые пункты формулы не подлежат поиску
(Продолжение пункта 2 первого листа)

Настоящий отчет о международном поиске не был подготовлен в отношении некоторых пунктов формулы в соответствии со статьей 17(2)(a) по следующим причинам:

1. пункты №:
т.к. они относятся к объектам, по которым данный Международный поисковый орган не обязан проводить поиск, а именно:

2. пункты №:
т.к. они относятся к частям международной заявки, настолько не соответствующим установленным требованиям, что по ним нельзя провести полноценный международный поиск, а именно:

3. пункты №:
т.к. они являются зависимыми пунктами и не составлены в соответствии со вторым и третьим предложениями Правила 6.4(a).

Графа III Замечания для случая несоблюдения единства изобретения
(Продолжение пункта 3 первого листа)

Настоящий Международный поисковый орган обнаружил несколько групп изобретений в данной международной заявке, а именно:
(см. дополнительный лист)

1. Т.к. все необходимые дополнительные пошлины были уплачены своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает все пункты формулы изобретения, по которым можно провести поиск.
2. Т.к. все пункты формулы, по которым можно провести поиск, могут быть рассмотрены без затрат, оправдывающих дополнительную пошлину, Международный поисковый орган не требовал оплаты дополнительной пошлины.
3. Т.к. только некоторые из требуемых дополнительных пошлин были уплачены заявителем своевременно, настоящий отчет о международном поиске охватывает лишь те пункты формулы, за которые была произведена оплата, а именно пункты №:
4. Необходимые дополнительные пошлины своевременно не были уплачены заявителем. Следовательно, настоящий отчет о международном поиске ограничивается группой изобретений, упомянутой первой в формуле изобретения; а именно пунктами №: 1-27

Замечания по возражению

- Уплата дополнительных пошлин за поиск сопровождалась возражением заявителя и, если применимо, уплатой пошлины за возражение.
- Уплата дополнительных пошлин за поиск сопровождалась возражением заявителя, но соответствующие пошлины за возражение не были уплачены в течение срока, указанного в предложении.
- Уплата дополнительных пошлин за поиск не сопровождалась возражением заявителя.

Данный МПО считает, что заявка PCT/RU2022/000335 не отвечает требованию единства изобретения и существует 2 группы изобретений, указанные ниже:

I группа: пункты 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 формулы изобретения, для которых особым техническим признаком, объединяющим их в группу, является указанные в пункте 1 конкретные циклические декапептиды;

II группа: способ разделения циклических декапептидов по пункту 28 формулы изобретения.

Причины, по которым изобретения не связаны настолько, чтобы образовать единый общий изобретательский замысел, как того требует Правило 13.1 PCT, следующие:

Заявленный способ разделения циклических полипептидов по пункту 28 не содержит соответствующего особого технического признака, который при разделении циклических полипептидов заявленным способом позволит получить циклические полипептиды по пунктам 1-4 или продукты, содержащие такой пептид, по пунктам 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27. Способ разделения циклических пептидов по пункту 28 относится к разделению любых циклических декапептидов из семейства грамицидинов С, то есть не является специально предназначенным ни для получения любого пептида по пунктам 1-4, ни для получения продукта по пунктам 5, 6, 15, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.

Таким образом, группы I и II пунктов формулы изобретения не связаны между собой общими или соответствующими особыми техническими признаками и определяют разные изобретения, не связанные единым общим изобретательским замыслом. Следовательно, заявка не отвечает требованиям единства изобретения, определенным в Правилах 13.1 и 13.2 PCT.