РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 634 253**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2016150657, 22.12.2016**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.12.2016

Дата регистрации:
24.10.2017

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **22.12.2016**

(45) Опубликовано: **24.10.2017** Бюл. № **30**

Адрес для переписки:
115478, Москва, Каширское ш., 24, ФГБУ "Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации, отдел патентной и изобретательской работы

(72) Автор(ы):
Сасов Сергей Александрович (RU),
Толкачев Вадим Никифорович (RU),
Решетникова Вера Владимировна (RU),
Личиницер Михаил Романович (RU),
Степанова Евгения Владиславовна (RU),
Хоченков Дмитрий Александрович (RU),
Оборотова Наталья Александровна (RU),
Орлова Ольга Львовна (RU),
Игнатьева Елена Владимировна (RU),
Ярцева Ирина Вячеславовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "РОНЦ им. Н.Н. Блохина" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **WO 2004045380 A2, 03.06.2004. EA 17659 B1, 28.02.2013. KO TAHARA et all. Identification of a hydrolyzable tannin, oenothein B, as an aluminum-detoxifying ligand in a highly aluminum-resistant tree, eucalyptus camaldulensis //Plant Physiology, Febrary 2014, vol.164, pp 683-693. MARUSKA A et all. Flavonoids of willow herb (Chamerion angustifolium** (см. прод.)

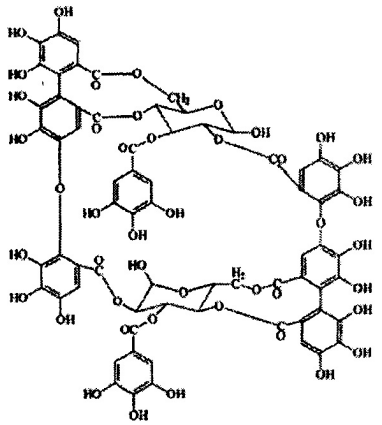
(54) **Антиангиогенное лекарственное средство**

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству, обладающему антиангиогенным действием. Антиангиогенное лекарственное средство в качестве действующего вещества содержит димерный макроциклический танин, выделенный из побегов и соцветий Chamerion angustifolium, состава $C_{68}H_{48}O_{44}$, с молекулярной массой 1568,1518 следующей формулы:

RU 2634253 C1

RU 2634253 C1



1

Вышеописанное средство обладает выраженной антиангиогенной и противоопухолевой активностью. 6 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):
(L.) Holub) and their radical scavenging activity during vegetation //Adv Med Sci., 2014 Mar., 59(1):136-41, PMID: 24797990, реферат. HK 1156881 A1, 28.03.2014. WO 2004045380 A2, 03.06.2004.

RU 2634253 C1

RU 2634253 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 634 253**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 36/185 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2016150657, 22.12.2016**

(24) Effective date for property rights:
22.12.2016

Registration date:
24.10.2017

Priority:
(22) Date of filing: **22.12.2016**

(45) Date of publication: **24.10.2017** Bull. № **30**

Mail address:
115478, Moskva, Kashirskoe sh., 24, FGBU "Rossijskij onkologicheskij nauchnyj tsentr imeni N.N. Blokhina" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii, otdel patentnoj i izobretatelskoj raboty

(72) Inventor(s):
Sasov Sergej Aleksandrovich (RU),
Tolkachev Vadim Nikiforovich (RU),
Reshetnikova Vera Vladimirovna (RU),
Lichinitser Mikhail Romanovich (RU),
Stepanova Evgeniya Vladislavovna (RU),
Khochenkov Dmitrij Aleksandrovich (RU),
Oborotova Natalya Aleksandrovna (RU),
Orlova Olga Lvovna (RU),
Ignateva Elena Vladimirovna (RU),
Yartseva Irina Vyacheslavovna (RU)

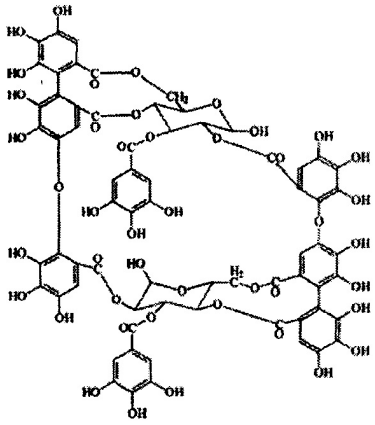
(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Rossijskij onkologicheskij nauchnyj tsentr imeni N.N. Blokhina" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU "RONTS im. N.N. Blokhina" Minzdrava Rossii) (RU)

(54) ANTIANGIOGENIC DRUG

(57) Abstract:

FIELD: pharmacology.

SUBSTANCE: antiangiogenic drug contains dimeric macrocyclic tannin isolated from shoots and inflorescences of Chamerion angustifolium, with $C_{68}H_{48}O_{44}$ composition as an active substance, with a molecular weight of 1568.1518 of the following formula:



1

EFFECT: pronounced antiangiogenic and antitumour activity.

6 dwg, 1 ex

RU 2634253 C1

RU 2634253 C1

Изобретение относится к медицине, онкологии и фармацевтической промышленности, а именно к созданию лекарственных средств, обладающих антиангиогенным действием.

Важная роль в развитии и метастазировании опухолей принадлежит ангиогенезу - процессу формирования новых кровеносных сосудов в опухоли. Ключевым моментом для инициации процесса ангиогенеза является повышение концентрации проангиогенных факторов, которые способствуют ускоренному формированию сосудистой сети новообразования. Основным из них является фактор роста эндотелия сосудов - VEGF (Vascular endothelial growth factor). Проангиогенное действие VEGF зависит от экспрессии его рецепторов VEGFR1 и VEGFR2 на эндотелиальных и опухолевых клетках.

Использование антиангиогенной терапии для лечения злокачественных новообразований позволяет снизить рост опухоли. Как правило, антиангиогенные препараты обладают более низкой степенью токсичности, что позволяет комбинировать их с другими противоопухолевыми препаратами для повышения эффективности терапии.

В настоящее время природные соединения являются одними из активно изучаемых классов при разработке новых антиангиогенных и противоопухолевых средств (Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е., Барышников А.Ю., Личиницер М.Р. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. // Росс. биотерапевтический журнал 2010 Т. 9 С. 3-10.).

Среди соединений растительного происхождения наиболее перспективным источником новых антиангиогенных лекарственных средств являются танины, присутствующие в составе различных лекарственных растений. Ранее было показано, что танины, выделенные из растений, обладают противоопухолевой активностью (Miyamoto K., Murayama T., Nomura M., et al. Antitumor activity and interleukin-1 induction by tannins. // Anticancer. Res. 1993. V. 13. P. 37-42.; Sakagami H., Jiang Y., Kusama K., et al. Cytotoxic activity of hydrolyzable tannins against human oral tumor cell lines - a possible mechanism. // Phytomedicine. 2000. V. 7. P. 39-47.).

Известны антиангиогенные средства в виде полифенольных экстрактов из растительного материала, которые обладают способностью ингибировать миграцию эндотелиальных и опухолевых клеток (патент US 2006/0228426 A1, 2006 г.).

Недостатком данных средств является ограниченное антиангиогенное действие, выражающееся только в ингибировании активности матричных металлопротеиназ, что приводит к снижению миграционной активности эндотелиальных и опухолевых клеток.

Известны средства, представляющие экстракты из Rubus suavissimus, содержащие галловую кислоту и ее производные, которые обладают антиангиогенной активностью (патент US 8334000 B2).

Недостатком данных средств является отсутствие противоопухолевого действия.

Наиболее близким к заявляемому средству является антиангиогенное средство в виде фармацевтической композиции на основе высших танинов, имеющих формулу $C_{76}H_{52}O_{46}$ и молекулярную массу 1690, обладающее способностью ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток и процессы неоваскуляризации в тканях (патент WO 2004/045380 A2).

Недостатком данного средства является отсутствие избирательного действия на рецепторы фактора роста эндотелия сосудов и отсутствие противоопухолевого действия.

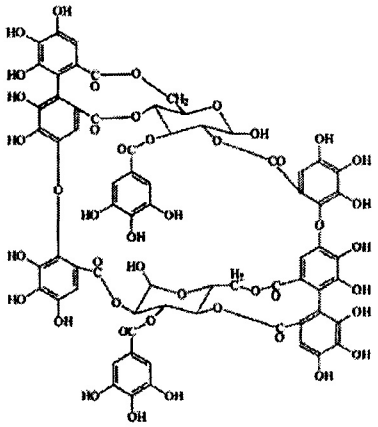
Задачей заявляемого изобретения является создание нового лекарственного средства, обладающего антиангиогенным действием без недостатков прототипа.

Технический результат заявляемого изобретения состоит в том, что получено новое лекарственное средство с высокой антиангиогенной и противоопухолевой активностью

при более низких концентрациях средства направленного действия в отношении рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа.

Задача решается тем, что заявляемое средство создано на основе димерного гидролизуемого макроциклического танина, выделенного из побегов и соцветий Chamerion angustifolium (Кипрей узколистный, Иван-чай).

Заявляемое средство получают из измельченного растительного сырья - побегов и соцветий Chamerion angustifolium (Кипрея узколистного) путем экстракции водным раствором ацетона, фильтрации и упаривания в вакууме, осаждения полученного экстракта уксуснокислым свинцом, последовательной промывки дистиллированной водой и этиловым спиртом, обессоливания промывных вод при помощи катионита КУ-2-8 чС (H^+), упаривания в вакууме, последовательной переэкстракции диэтиловым эфиром, этилацетатом и водой, разделением полученного экстракта методом колоночной хроматографии с полиамидом и лиофильного высушивания и получают лиофилизат димерного макроциклического танина состава $C_{68}H_{48}O_{44}$, с молекулярной массой 1568,1518 (формула 1).



1

Подтверждением подлинности полученного заявляемого средства является наличие инфракрасных спектров и показателей удельного вращения.

Заявляемое изобретение иллюстрируется фиг. 1-6 и таблицей.

Заявляемое средство имеет характеристический инфракрасный (ИК) спектр, представленный на фиг. 1. Регистрацию ИК-спектров проводили на ИК-Фурье-спектрометре «Nicolet-iS10» (детектор DTGS, светоделитель KBr) с приставкой Smart OMNI-Transmission, оснащенного ZnSe-кристаллом с разрешением 4 $см^{-1}$, среднее значение 32 сканов. ИК-спектры лекарственного средства в области от 4000 до 400 $см^{-1}$ содержат полосы поглощения, связанные с различными колебаниями связей замещенных бензольных циклов [1616, 1508, 1452, 870, 833, 745, 729] $см^{-1}$, полосы поглощения, связанные с углеводным циклом [1197, 1033, 600] $см^{-1}$ и указывающие на присутствие в молекуле пиранозного кольца в конформации C_1 [910, 765] $см^{-1}$; в ИК-спектре лекарственного средства имеются полосы, соответствующие валентным и деформационным колебаниям связи O-H [3317, 1318, 1196, 1033] $см^{-1}$, а также валентным колебаниям карбонильной группы, характерным для альдегидов, карбоновых кислот и сложных эфиров [1729] $см^{-1}$. Антиангиогенное лекарственное средство является оптически активным веществом. Величина угла оптического вращения для 1%-ного раствора лекарственного средства в воде составляет +306,0°±1,0.

Изучение антиангиогенной активности заявляемого средства в отношении

эндотелиальных клеток проводили методом ингибирования пролиферативной активности. Клетки SVEC-4-10 вносили в концентрации 15×10^3 клеток/мл в 96-луночный планшет в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки, 2 мМ глутамина и 10 нг/мл VEGF. Спустя 24 часа вносили заявляемое средство в концентрациях от 1 до 50 мкг/мл. Клетки инкубировали с заявляемым средством в течение 72 часов, затем добавляли реагент МТТ в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали 4 часа, затем среду отбирали, добавляли ДМСО для растворения формазана и проводили оценку реакции на планшетном фотометре при 540 нм. График зависимости «доза-эффект» представлен на фиг. 2.

Для оценки влияния антиангиогенного лекарственного средства на дифференцировку эндотелиальных клеток был использован метод формирования сосудоподобных структур из эндотелиальных клеток SVEC-4-10 на Матригеле. Охлажденный Матригель наносили на 24-луночные планшеты для культивирования клеток в концентрации 250 мкл/лунка и инкубировали в течение 30 мин при 37°С для полимеризации. Клетки SVEC-4-10 в концентрации 2×10^6/мл были ресуспендированы в полной среде DMEM с 10% ЭТС, содержащей заявляемое средство в концентрации 10 мкг/мл. В качестве контроля использовали DMEM с 10% ЭТС без добавления лекарственного средства. Суспензию клеток наносили на планшеты и инкубировали в течение 5 ч при 37°С. Добавление заявляемого средства в концентрации 10 мкг/мл ингибирует образование сосудоподобных структур из эндотелиальных клеток SVEC-4-10, что выражается в уменьшении длины структур и количества узлов ветвления (фиг. 3 (а, б): а - контрольная группа, б - опытная группа).

Противоопухолевая активность заявляемого средства in vivo изучали на модели перевиваемой аденокарциномы Льюиса, перевитой мышам BDF_1 (C57Bl/6×DBA/2), самцам массой 20-25 г подкожно суспензией клеток в количестве 2×10^6 клеток/мышь в объеме 0,2 мл среды 199. Динамику роста перевитой LLC оценивали путем измерения размеров подкожной опухоли. Заявляемое средство вводили внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг в физиологическом растворе пятикратно. Противоопухолевый эффект оценивали по показателю торможению роста опухоли (ТРО), рассчитанному как соотношение средних объемов опухолей у мышей опытной и у мышей контрольной групп (в %). ТРО вычисляли по формуле $(V_K-V_O)/V_K\times100$, где V_K - средний объем опухоли в контрольной группе ($мм^3$); V_O - средний объем опухоли в опытной группе ($мм^3$). Объем опухолей у мышей вычисляли по формуле V ($мм^3$)=a×b×c, где a, b, c - длина, ширина и высота опухоли (мм). ТРО перевитой LLC составляет 60,7% на 19-й день наблюдения (фиг. 4). Достоверность полученных результатов определяли по стандартному методу Фишера-Стьюдента. Различия считали достоверными при $p<0,05$.

Исследования количества микрососудов в опухолях проводили на гистологических срезах при помощи иммуногистохимического окрашивания с антителами к CD31 и VEGF в течение 18 часов при температуре +4°С. Проявку антител проводили при помощи Envision+ kit с последующим внесением раствора диаминобензидина (DAB). Срезы докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло. Результаты иммуногистохимического окрашивания исследовали под микроскопом с фотокамерой при увеличении ×200. Количество окрашенных антителами CD31 и VEGF структур представлено в табл. и на фиг. 5 (а-г), где а, б - контрольная группа; в, г - опытная группа.

Среднее количество микрососудов в поле зрения	Контрольная группа	Опытная группа
$CD31^+$ микрососуды	12±3	6±2

Табл.

Согласно полученным данным введение мышам заявляемого средства вызывает снижение количества микрососудов экспрессии VEGF в ткани опухоли по сравнению с контрольной группой.

Пример 1.

Антиангиогенное действие заявляемого средства было изучено на мышах линии C57Bl/6 с имплантами Матригеля, содержащими гепарин 60 МЕ./мл и VEGF 50 нг/мл. Аликвоты Матригеля, приготовленные на льду, вводили мышам подкожно в проекции нижнего угла лопатки. Через 24 часа после образования импланта вводили заявляемого средство в дозе 15 мг/кг внутрибрюшинно в течение 5 дней. Через 24 часа после окончания введения заявляемого средства импланты Матригеля были извлечены и исследованы методом иммуногистохимического окрашивания.

При внутрибрюшинном введении заявляемого средства в дозе 15 мг/кг наблюдали выраженный антиангиогенный эффект: количество микрососудов в имплантах с VEGF было снижено на 55,7% (7,4±3,2) по сравнению с контрольной группой - 16,7±3,2 (в поле зрения).

Пример 2.

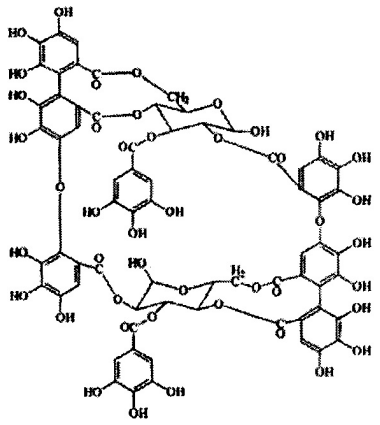
Изучение ингибирования экспрессии рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа (VEGFR1) под действием заявляемого средства было проведено на культуре эндотелиальных клеток мыши SVEC-4-10. Эндотелиальные клетки, экспрессирующие VEGFR1, культивировали с заявляемым средством в концентрации от 10 до 50 мкг/мл на адгезионных культуральных стеклах в течение 24 часов, затем окрашивали флуоресцентным конъюгатом антител мыши к VEGFR1. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33258. Клетки обрабатывали полимерным фиксатором и исследовали под флуоресцентным микроскопом. Результаты исследования представлены на фиг. 6 (а-г), где а - эндотелиальные клетки без заявляемого средства; б, в, г - эндотелиальные клетки с добавлением заявляемого средства в концентрации 10, 25, 50 мкг/мл соответственно.

Показано, что при введении заявляемого средства в концентрации 50 мкг/мл снижается количество VEGFR1-положительных эндотелиальных клеток до 30% по сравнению с клетками без заявляемого средства.

Таким образом, заявляемое средство на основе димерного макроциклического танина, выделенного из побегов и соцветий Chamerion angustifolium, обладает выраженным антиангиогенным и противоопухолевым действием.

(57) Формула изобретения

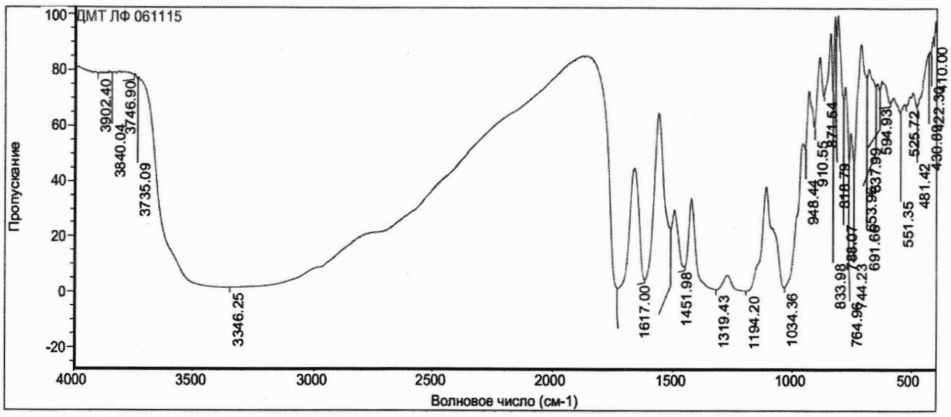
Антиангиогенное лекарственное средство на основе танинов, отличающееся тем, что в качестве действующего вещества содержит димерный макроциклический танин, выделенный из побегов и соцветий Chamerion angustifolium, состава $C_{68}H_{48}O_{44}$, с молекулярной массой 1568,1518 (формула 1).



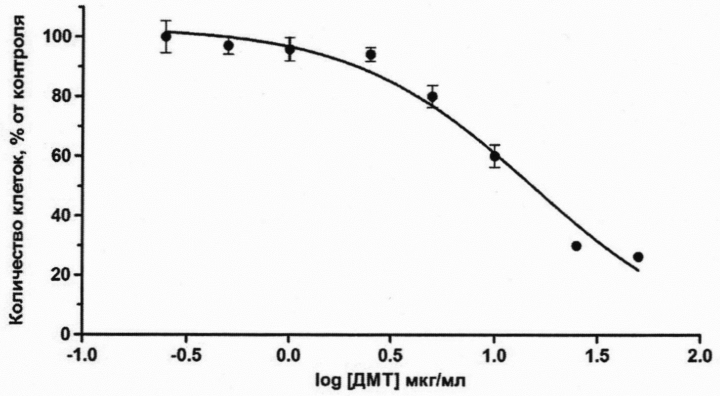
1

1

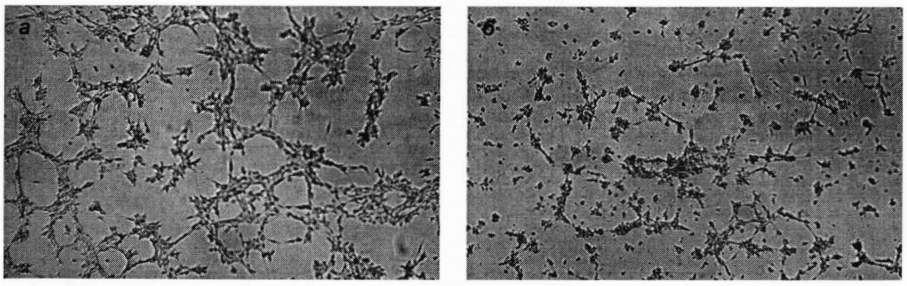
АНТИАНГИОГЕННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО



Фиг.1.



Фиг.2.



Фиг. 3 (а, б).

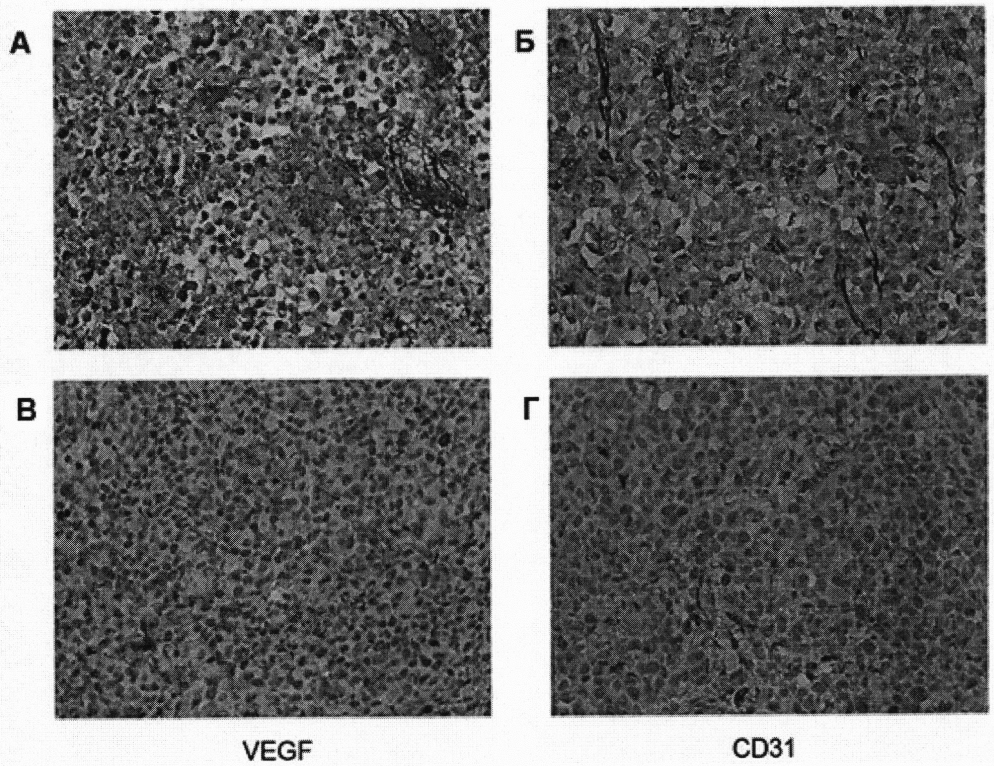
1

2

АНТИАНГИОГЕННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО



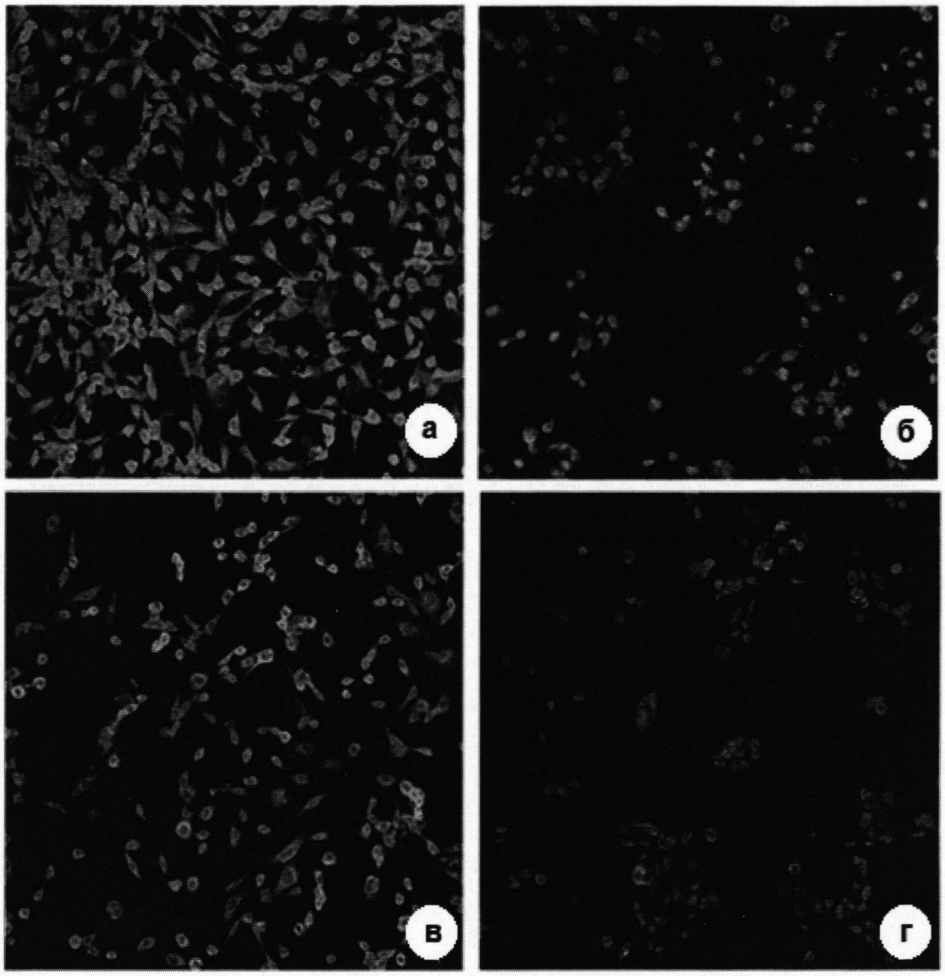
Фиг.4.



Фиг.5 (А. Б, В, Г).

3

АНТИАНГИОГЕННОЕ ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО



Фиг.6 (а, б, в, г).