РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 742 972**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 45/00 (2020.08)

(21)(22) Заявка: **2020133325, 09.10.2020**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.10.2020

Дата регистрации:
12.02.2021

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **09.10.2020**

(45) Опубликовано: **12.02.2021** Бюл. № **5**

Адрес для переписки:
121099, Москва, Новый Арбат, 32, ФГБУ "НМИЦ РК" Минздрава России, научно-организационный отдел, патентоведу Катыковой И.М.

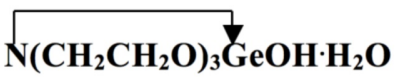
(72) Автор(ы):
Фесюн Анатолий Дмитриевич (RU),
Расулов Ризо Максудович (RU),
Барышок Виктор Петрович (RU),
Стороженко Павел Аркадьевич (RU),
Расулов Максуд Мухамеджанович (RU),
Жигачёва Ирина Валентиновна (RU),
Корсунская Ирина Марковна (RU),
Пирузян Анастас Левонович (RU),
Князева Татьяна Александровна (RU),
Якупова Регина Димьяновна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦ РК" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2545888 C1, 10.04.2015. RU 2733166 C1, 29.09.2020. RU 2732883 C1, 24.09.2020. CN 102250138 B, 23.04.2014. MENCHIKOV L.G. et al. Biological activity of organogermanium compounds (a review) // Pharm. Chem. J. V.46, P.635-638.**

(54) Применение 1-гидроксигерматрана для торможения развития атеросклероза в эксперименте

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, фармакологии и биологии и касается применения водного раствора 1-гидроксигерматрана формулы:  в качестве средства, понижающего общую активность кислой фосфолипазы А1. Изобретение понижает общую (суммарную) активность лизосомального липолитического фермента – кислой фосфолипазы А1. 3 з.п. ф-лы, 2 табл., 1 пр.

RU 2742972 C1

RU 2742972 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 742 972**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 45/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 45/00 (2020.08)

(21)(22) Application: **2020133325, 09.10.2020**

(24) Effective date for property rights:
09.10.2020

Registration date:
12.02.2021

Priority:
(22) Date of filing: **09.10.2020**

(45) Date of publication: **12.02.2021** Bull. № **5**

Mail address:
121099, Moskva, Novyj Arbat, 32, FGBU "NMITS RK" Minzdrava Rossii, nauchno-organizatsionnyj otdel, patentovedu Katykovoj I.M.

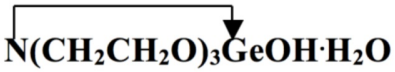
(72) Inventor(s):
Fesiun Anatolii Dmitrievich (RU),
Rasulov Rizo Maksudovich (RU),
Baryshok Viktor Petrovich (RU),
Storozhenko Pavel Arkadevich (RU),
Rasulov Maksud Mukhamedzhanovich (RU),
Zhigacheva Irina Valentinovna (RU),
Korsunskaia Irina Markovna (RU),
Piruzian Anastas Levonovich (RU),
Kniazeva Tatiana Aleksandrovna (RU),
Iakupova Regina Dimianovna (RU)

(73) Proprietor(s):
Federalnoe gosudarstvennoe biudzhetnoe uchrezhdenie «Natsionalnyi meditsinskii issledovatelskii tsentr reabilitatsii i kurortologii» Ministerstva zdravookhraneniia Rossiiskoi Federatsii (FGBU «NMITs RK» Minzdrava Rossii) (RU)

(54) 1-HYDROXYGERMATRANE USAGE FOR INHIBITING THE DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS IN THE EXPERIMENT

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmacology and biology.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, pharmacology and biology and concerns the use of an aqueous solution of 1-hydroxygermatrane of the formula:  as a total activity of acid phospholipase A1 lowering agent.

EFFECT: reduces the overall (total) activity of the lysosomal lipolytic enzyme - acid phospholipase A1.

3 cl, 2 tbl, 1 ex

RU 2742972 C1

RU 2742972 C1

Изобретение относится к медицине, фармакологии и биологии и касается нового средства, влияющего на активность фосфолипаз.

Фосфолипазы играют важную роль в обмене липидов в живых организмах. Составной частью многих тканей и секретов живых организмов являются фосфолипазы группы А. Фосфолипазы А1 в большинстве своем – внутриклеточные ферменты, часто мембраносвязанные, не нуждаются в коферменте. Их молекулярные массы варьируют в пределах 15-90 тыс; оптимальная каталитическая активность проявляется при pH 4,0 (для лизосомальных ферментов) или 8,0-9,5 (для ферментов микросом, плазматических мембран и цитозоля); широко распространены в животных тканях (печень, сердце, мозг) и в микроорганизмах (*Bacillus subtilis, B. megateiium, Mycobacter phlei, Escherichia coli*). Фосфолипазы А1 отщепляют ацильную цепь фосфолипида в sn-1 положении. При действии фосфолипазы А1 на фосфолипид образуется 1-лизофосфолипид и жирная кислота.

Доказано, что фосфолипазы являются биомаркерами активности атеросклеротического процесса [см. Душкин М.И. Макрофаги и атеросклероз: патофизиологические и терапевтические аспекты. // Бюлл. СО РАМН (2006); № 2 (120), с.47-55.], эффективности проводимой терапии как у больных атеросклерозом, так и у больных с осложнениями атеросклероза, в частности ишемической болезни сердца – ИБС (стенокардией напряжения II ФК) [см. Богданова С.Н. Клинико-экспериментальное изучение влияния фактора питания на активность лизосомальных гидролаз тромбоцитов и мононуклеарных лейкоцитов при атеросклерозе. Автореф. дисс. канд., Москва (1992), 28 с., Данковцев Е.Н., Затейщиков Д.А. Биомаркеры в кардиологии: липопротеинассоциированная фосфолипаза А2. // Фарматека (2007); № 15 (149). Кардиология, неврология, с.22-28].

Известно, что на раннем этапе атерогенеза происходит активация эндотелия, который экспрессирует на своей поверхности адгезионные молекулы для моноцитов, нейтрофилов и лейкоцитов крови и продуцирует хемоаттрактанты, привлекающие моноциты в интиму сосудов. Моноциты, мигрирующие в субэндотелиальное пространство, дифференцируются в макрофаги, которые выступают как катализаторы образования окисленных ЛНП, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток из мышечной оболочки в интиму. Частицы модифицированных ЛНП предпочтительно захватываются с помощью специфических рецепторов макрофагами, которые трансформируются в пенистые клетки. Активированные макрофаги, продуцирующие металлопротеиназы и коллагеназу, в определенных ситуациях способствуют распаду коллагена в бляшке и возникновению такого грозного осложнения, как разрыв бляшки, образование тромба и развитие инфаркта миокарда. Липидный профиль в значительной мере определяется состоянием макрофагов, их ферментативными реакциями. В этом плане заслуживают внимания исследования и разработки средств, изменяющих активность липаз макрофагов, в частности кислой фосфолипазы А1 (кФЛА1) (КФ 3.1.1.32) с оптимумом pH 4,0, вызывающей деградацию структуры фосфолипидов, отщепляя ацильные остатки от углеродных атомов C_1 в молекуле лецитина и других фосфолипидов с образованием промежуточных продуктов гидролиза – лизолецитина и лизофосфолипидов, обладающих сильным мембранотоксическим действием [см. Покровский А.А., Тутельян В.А. Лизосомы. - Наука, 1976, 380 с., Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты, пер. с англ., М., 1978, с.242-356].

В литературе имеются сведения о возможности снижения общей (суммарной) активности кФЛА различными химическими соединениями [см. Губергриц Н.Б. «Эссенциале форте Н», «Эссенциале Н» в гепатологии и гастроэнтерологии. Сучасна

гастроентерологія, № 5 (43), 2008, с.79-89].

Известно также, что при введении некоторых препаратов, например, липостабила, который оказывает гиполипидемическое действие, происходит активация кислых и щелочных фосфолипаз [см. Самсонов М.А., Васильев А.В., Погожева А.В., Бобкова С.Н. Сравнительная оценка гиполипидемического действия ПНЖК w-3 и липостабила. //Вопр. питания, 1996, № 4, с.12-16].

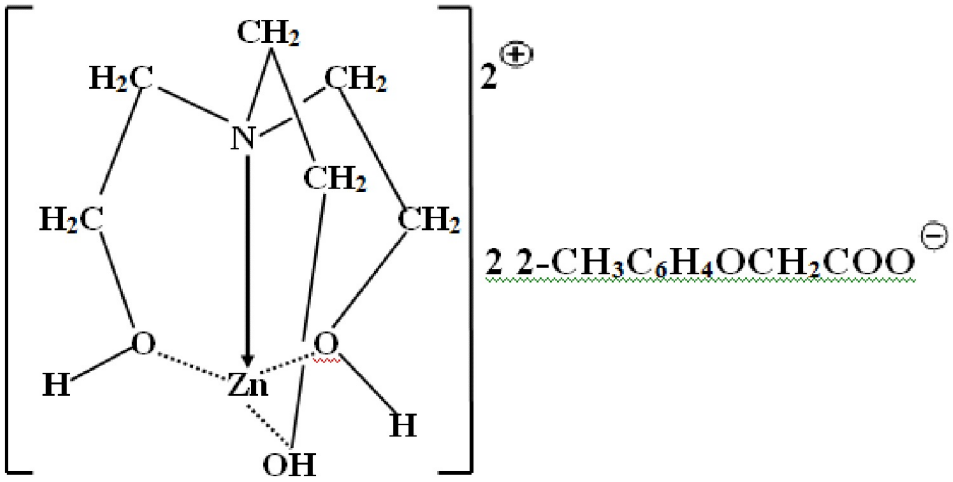
Однако существует потребность в поиске и внедрении в практику новых диагностических и лекарственных средств, обладающих активностью в отношении фосфолипаз.

В качестве ближайшего **аналога** может быть указан источник: Расулов М.М., Стороженко П.А. и др. Трис-(2-гидроксиэтил)амина с бис-(2-метилфеноксиацетатом) цинка (цитримина или цинкатрана) для снижения общей активности кислой фосфолипазы А1// Патент на изобретение RU №2545888 C1, 10.04.2015.

Комплекс трис-(2-гидроксиэтил)амина с бис-(2-метилфеноксиацетатом) цинка (**цитримин**)обладает широким спектром терапевтического действия и отвечает формуле:

$(HOCH_2CH_2)_3N$ - $Zn(OOCCH_2OC_6H_4CH_3\text{-}2)_2$

цитримин имеет следующий вид:

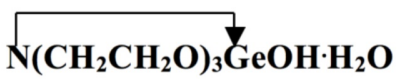


К недостатку прототипа можно отнести меньший эффект угнетения активности фосфолипазы.

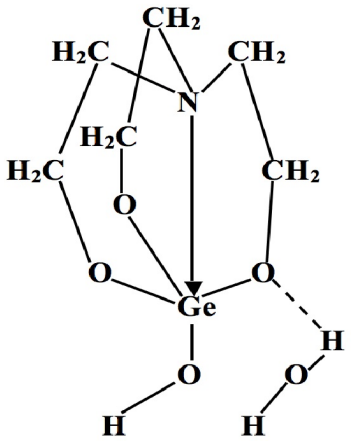
Задача настоящего изобретения состоит в разработке нового средства, которое возможно применить для снижения общей активности кислой фосфолипазы А1.

Технический результат – расширение арсенала средств, обладающих свойством снижать общую активность кислой фосфолипазы А1 за счет выявленной новой биологической активности 1-гидроксигерматрана.

Поставленная задача решается тем, что в качестве средства, понижающего общую активность кислой фосфолипазы А1, предлагается использовать синтезированное ранее (см. Воронков М.Г., Адамович С.Н. и др. Синтез новых биологически активных О-гидрометаллоатранов //ЖОХ, 2009, т.79, №1, С.162-163), биологически активное соединение – 1-гидроксигерматран, или герматранол-гидрат, который имеет формулу:



1-гидроксигерматран, имеет следующий вид:



Известно свойство герматранол-гидрата стимулировать экспрессию матричной РНК триптофанил-тРНК-синтетазы [*см.* Расулов М.М., Стороженко П.А. и др. Герматранол-гидрат, стимулирующий экспрессию матричной РНК триптофанил-тРНК-синтетазы. Патент РФ № 2553986 C1, 20.06.2015].

1-гидроксигерматран может быть применён в клинической медицине для создания препаратов, обладающих антигиперлипидемическим действием и не имеющих побочных эффектов.

Заявляемая биологическая активность 1-гидроксигерматрана в качестве средства, обладающего свойством снижать активность кислой фосфолипазы А1, не была известна и в литературе не описана.

Впервые показано, что введение 1-гидроксигерматрана влияет на активность лизосомального липолитического фермента из класса гидролаз (КФ 3.1.1): кФЛА1 (КФ 3.1.1.32).

Предлагается применение 1-гидроксигерматрана в качестве средства, угнетающего общую (суммарную) активность лизосомального липолитического фермента кислой фосфолипазы А1.

При этом 1-гидроксигерматран может применяться в виде раствора в официальном растворе 0,9% натрия хлорида или в воде для инъекций, официальной дистиллированной воде.

При этом раствор может содержать 5-20 мас.% 1-гидроксигерматрана.

Активное вещество может применяться в дозе 5,0 мг/кг массы животного.

При разработке изобретения авторы использовали различные растворители для получения средства для воздействия на активность кислой ФЛА1. Были испытаны различные растворы на водной основе, в частности раствор вышеуказанного активного вещества в воде для инъекций, официальной дистиллированной воде и в официальном 0,9% растворе натрия хлорида. При этом во всех случаях были получены аналогичные результаты.Следует отметить, что нами исследовались полученные таким образом растворы с различной концентрацией активного вещества – 1-гидроксигерматрана (5%, 10%, 20%, 50%, 70%). При этом положительные эффекты от их использования, отмеченные ниже, значимо не различались. В исследованиях использовали различные дозы активного вещества: от 0,1 мг/кг до 20 мг/кг массы животного. Эффект угнетения активности фермента кФЛА1 присутствовал во всех случаях и был прямо пропорционален дозе используемого активного вещества. Соответственно, для достижения указанного нами технического результата важным является как таковое новое свойство данного соединения, а не его доза или конкретный водный растворитель. Поэтому ниже, в примере, приведен для демонстрации только опыт с использованием

активного вещества в дозе 5,0 мг/кг ежедневно.В данном случае применяли раствор активного вещества, который приготовляли ex tempore, используя официальную дистиллированную воду, смешивая с ней активное вещество.

Возможность осуществления изобретения может быть проиллюстрирована представленным ниже примером.

Пример

Эксперименты проводили на кроликах Шиншилла с исходной массой тела 1,8-2,0 кг в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации». Правила утверждены приказом Министерства здравоохранения РФ от 19.06.2003 г №267 (Правила лабораторной практики в Российской Федерации Министерства здравоохранения РФ Приказ от 19 июня 2003 года № 267 http:// www.kodeks.ru (24 апреля 2010г)). Животных содержали в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемыми для экспериментальных и иных научных целей. По окончании эксперимента животным проводили эвтаназию цервикальной дислокацией 5-го позвонка, соблюдая правила «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

1-гидроксигерматран смешивали «ex tempore» до полного растворения в официальной дистиллированной воде.

Комплекс трис-(2-гидроксиэтил)амина с бис-(2-метилфеноксиацетатом) цинка(аналог, **цитримин**) так же смешивали «ex tempore» до полного растворения в официальной дистиллированной воде.

Гиперлипидемию вызывали методом Н.Н. Аничкова (известная модель развития атеросклероза).

Животных группировали по 10 голов следующим образом:

1) группа опыта, которым вводили внутримышечно свежеприготовленный водный раствор 1-гидроксигерматрана в дозе активного вещества 5,0 мг/кг массы животного ежедневно в течение 2 месяцев.

2) группа плацебо-контроля, которым вводили внутримышечно эквиобъёмное количество официального 0,9% раствора натрия хлорида ежедневно в течение 2 месяцев.

3) группа животных, получавших внутримышечно свежеприготовленный раствор аналога – цитримина в дозе активного вещества 5,0 мг/кг массы животного ежедневно в течение 2 месяцев.

Эталоном служили данные, полученные у интактных кроликов.

В конце экспериментов у животных в грудном отделе аорты стандартными методами определяли содержание липидов, триацилглицеринов, β-липопротеинов и холестерина. Для определения активности кислой фосфолипазы из кусочков грудной аорты диспергированием выделяли клетки интимы методом, описанным в: Нагорнев В.А. Методология в изучении проблемы атеросклероза. // Мед. акад. ж. 2005, т.5, в.3, с.121-133. Для этого использовали раствор (0,5 мл), содержащий коллагеназу – тип 4 и эластазу – тип 3 («sigma», США). Время диспергирования – 75 мин при 37°С (1 мл/50 мг ткани). Полученную суспензию клеток промывали холодным раствором Хенкса. Осадок при последней промывке гомогенизировали в 2 мл 0,25М раствора сахарозы pH 7,4 с 0,001 м ЭДТА. Конечное разведение гомогенатов аорты соответствовало 1:20 (вес:объем). Супернатант использовали для исследования активности кислой фосфолипазы (кФЛА1). Активность кФЛА1 определяли спектрофотометрически по известному методу [см. Булычев А.Г., Семенова Е.Г., Ассиновская О.А. Влияние агрегации нейтрального красного, акридинового оранжевого и хлористого аммония клетками (сублинии) на

активность лизосомальных гидролаз. // Цитология. - (1986). Т.28, № 7. С.703-711], используя в качестве субстрата ß-нафтилкаприлат («sigma», США). К 0,2 мл исследуемого материала добавляли 0,5 мл субстратного раствора в 0,2 М ацетатного буфера, pH 5,2, с 0,2% тритоном Х-100, инкубировали на водяной бане в течение 30 мин при 37°С. Реакцию останавливали добавлением 0,5 мл «fast blue B» («serva», ФРГ) (1 мг/мл в 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,2), через 5 мин добавляли 1 мл 10% охлажденного раствора трихлоруксусной кислоты, еще через 3 мин – 1,5 мл этилового эфира уксусной кислоты, затем образцы встряхивали, центрифугировали на центрифуге WKH-1 при 150 g 15 мин. Отбирали 0,5 мл верхней фазы в микрокювету и проводили спектрометрию при 525 нм. Суммарную активность кФЛА1 выражали в микромолях β-нафтола, образовавшегося за 1 мин на 1 г белка.

Статистическую обработку данных проводили методом Стьюдента. Данные представляли в виде средних и стандартных значений ошибки – **M** и **m**, соответственно. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$ (см. Петри А., Сэбин К., 2009).

Результаты ферментативного анализа представлены в таблице 1 и демонстрируют улучшение липолитических показателей и уровня кФЛА1 при заявленном применении как по сравнению с контролем, так и по сравнению с аналогом.

Корреляционный анализ выявил связь средней силы между уровнем активности кФЛА1 и показателями липидного обмена после введения 1-гидроксигерматрана (таблица 2).

Активацию системы лизосомального липолиза можно рассматривать как компенсаторную реакцию ферментных систем на фоне преобладания неспецифического, нерегулируемого эндоцитоза модифицированных липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) или надмолекулярных ЛПНП-содержащих комплексов. При этом в условиях субстратного насыщения может возникнуть относительная недостаточность отдельных лизосомальных ферментов (в частности, кФЛА1), расщепляющих этерифицированный холестерин (ЭХС), что приводит к аккумуляции ЭХС и триглицеридов в клетках крови и повышению риска развития атеросклероза [см. Нагорнев В.А. Методология в изучении проблемы атеросклероза. // Мед. акад. ж. 2005, т.5, в.3, с.121-133]. Наряду с этим изменения в состоянии лизосомального аппарата интимы можно расценивать и как адаптационные перестройки на стадии липоидоза, и как результат функциональной недостаточности на стадии образования фиброзной бляшки.

Таким образом, реакции кислой фосфолипазы 1 указывают на структурно-функциональные нарушения в деятельности субклеточных структур при развитии атеросклероза и, соответственно, полезными могут быть средства – модуляторы таких реакций.

Установление новых свойств 1-гидроксигерматрана позволит использовать его, например, для повышения устойчивости сосудистой системы к холестерину при развитии атеросклеротического процесса. Также он может быть использован для образования вторичных посредников или предшественников в синтезе биологически активных веществ – эйкозаноидов. Ввиду важности выявленного механизма корреляции активности ферментной системы в зависимости от состояния организма 1-гидроксигерматран можно будет использовать не только для профилактики и/или лечения состояний, связанных с нарушением нормальной функции фосфолипаз А1 макрофагов, но и при скрининге, например, соединений, обладающих аналогичной активностью.

Таблица 1.

Показатели липидного обмена при применении водного раствора 1-

гидроксигерматрана

Показатели	*Ткань аорты*
Эталон - интактные	
Липиды общие (мМ/л)	0,2±0,014
Холестерол (мМ/л)	0,11±0,02
Триацилглицерины (мМ/л)	0,13±0,01
β-липопротеины (мМ/л)	0,09±0,002
Кислая фосфолипаза А1 (мкМ/мин/ на 1г белка)	0,9±0,03
Плацебо - контроль	
Липиды общие (мМ/л)	5,1±0,09**
Холестерол (мМ/л)	4,2±0,9**
Триацилглицерины (мМ/л)	4,16±0,1**
β-липопротеины (мМ/л)	4,1±0,1**
Кислая фосфолипаза А1 (мкМ/мин/ на 1г белка)	5,3±0,2**
Аналог – цитримин в дозе 5,0 мг/кг	
Липиды общие (ммоль/л)	1,52±0,07*
Холестерол (ммоль/л)	2,15±0,05*
Триацилглицерины (ммоль/л)	2,8±0,08*
β-липопротеины (ммоль/л)	1,61±0,04*
Кислая фосфолипаза А1 (мкМ/мин/ на 1г белка)	2,15±0,1*
Опыт – 1-гидроксигерматран в дозе 5,0 мг/кг	
Липиды общие (мМ/л)	0,61±0,02*
Холестерол (мМ/л)	0,24±0,03*
Триацилглицерины (мМ/л)	0,2±0,01*
β-липопротеины (мМ/л)	0,21±0,02*
Кислая фосфолипаза А1 (мкМ/мин/ на 1г белка)	0,99±0,04*

Примечание : * - **p<0.05** по отношению к плацебо - контролю;

** - **p<0.05** по отношению к эталону.

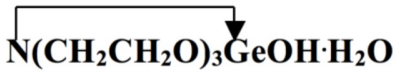
Таблица 2.

Коэффициенты корреляции (**r**) активности кислой ФЛА1 в ткани аорты с показателями липидного обмена при применении водного раствора 1-гидроксигерматрана

Энзим	Липиды общие	Холестерол	Триацил - глицерины	ß-липо-протеины
кФЛА1	r=0,35	r=0,34	r=0,44	r=0,43

(57) Формула изобретения

1. Применение 1-гидроксигерматрана формулы:



в качестве средства, угнетающего суммарную активность лизосомального липолитического фермента – кислой фосфолипазы А1.

2. Применение по п. 1, отличающееся тем, что 1-гидроксигерматран используют в виде водного раствора в официальном растворе 0,9% натрия хлорида или в воде для инъекций, официальной дистиллированной воде.

3. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что 1-гидроксигерматран используют в виде раствора, содержащего 5-20 мас.% активного вещества.

4. Применение по п. 3, отличающееся тем, что применяют раствор, содержащийактивное вещество 1-гидроксигерматран в дозе 5,0 мг/кг массы животного.