



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 505 297** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012149656/15, 21.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.11.2012

(45) Опубликовано: 27.01.2014 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ГОРБАЧЕВ В.И. и др. **Нарушения нитроксидергической системы при травматическом повреждении головного мозга.** Иркутск 2006 Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию. с.131, рис.35. с.133, с.135 строка 27, с.138. RU 2136669 C1, 10.09.1999. RU 2404974 C2, 20.06.2010. RU 2209587 C2, 10.08.2003. RU 2298418 C2, 10.05.2007. US 5652255 A, 29.07.1997. WO 00/10564 A1, 02.03.2000.

Адрес для переписки:

69035, Украина, г. Запорожье, а/я 342, А.А. Миюц

(72) Автор(ы):

**Мазур Иван Антонович (UA),
Беленичев Игорь Федорович (UA),
Кучеренко Людмила Ивановна (UA),
Чекман Иван Сергеевич (UA),
Колесник Юрий Михайлович (UA),
Абрамов Андрей Владимирович (UA),
Бухтиярова Нина Викторовна (UA),
Парнюк Наталья Викторовна (UA),
Нагорная Елена Александровна (UA),
Авраменко Николай Александрович (UA),
Волчик Юлия Антоновна (UA)**

(73) Патентообладатель(и):

**Общество с ограниченной
ответственностью "Научно-
производственное объединение
"Фарматрон" (НПО "Фарматрон") (RU)**

(54) СРЕДСТВО ДЛЯ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ НИТРОКСИДЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

(57) Реферат:

Предложено применение бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия в качестве активной основы лекарственных средств для коррекции нарушений функционирования нитроксидергической системы. Показано повышение активности эндотелиальной NO-

синтазы и повышение продукции NO под действием заявленного средства, которое имеет более высокую эффективность по сравнению с уже известными средствами аналогичного действия и не оказывает побочного эффекта. 2 табл., 1 пр.

RU 2 505 297 C1

RU 2 505 297 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/4196 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2012149656/15, 21.11.2012**

(24) Effective date for property rights:
21.11.2012

Priority:

(22) Date of filing: **21.11.2012**

(45) Date of publication: **27.01.2014 Bull. 3**

Mail address:

**69035, Ukraina, g. Zaporozh'e, a/ja 342, A.A.
Mijuts**

(72) Inventor(s):

**Mazur Ivan Antonovich (UA),
Belenichev Igor' Fedorovich (UA),
Kucherenko Ljudmila Ivanovna (UA),
Chekman Ivan Sergeevich (UA),
Kolesnik Jurij Mikhajlovich (UA),
Abramov Andrej Vladimirovich (UA),
Bukhtijarova Nina Viktorovna (UA),
Parnjuk Natal'ja Viktorovna (UA),
Nagornaja Elena Aleksandrovna (UA),
Avramenko Nikolaj Aleksandrovich (UA),
Volchik Julija Antonovna (UA)**

(73) Proprietor(s):

**Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju
"Nauchno-proizvodstvennoe ob"edinenie
"Farmatron" (NPO "Farmatron") (RU)**

(54) AGENT FOR DRUG-INDUCED CORRECTION OF NITROXYDERGIC DISORDERS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: what is presented is using 1-(β -phenylethyl)-4-amino-1,2,4-triazolium bromide as an active drug base for the purpose of correcting the nitroxydergic malfunctions.

EFFECT: higher activity of endothelial NO-synthase and high NO production under the action of the declared agent that has higher efficacy as compared to the known analogues, and has no side effects.

2 tbl, 1 ex

Изобретение относится к фармации и медицине, а именно к лекарственным средствам, положительно влияющим на состояние нитроксидаергической системы.

Известно, что нарушение функционирования нитроксидаергической системы, которое приводит к дефициту оксида азота (NO), резко повышает риск возникновения и развития заболеваний дыхательной, сердечно-сосудистой, гепато-билиарной систем, желудочно-кишечного тракта, а также развития эндокринных нарушений [1]. В патогенезе и клинике таких заболеваний, как атеросклероз, сахарный диабет, артериальная гипертензия и их осложнений, одним из важных аспектов считается нарушение структуры и функции сосудистого эндотелия [1, 3]. Эндотелиальная дисфункция (ЭД) развивается при дефиците оксида азота, нарушении экспрессии или транскрипции эндотелиальной NO-синтазы (eNOS), снижении доступности запасов L-аргинина для eNOS, то есть при нарушении функционирования нитроксидаергической системы.

Коррекция нарушений метаболизма оксида азота, т.е. коррекция нитроксидаергической системы и восстановление выработки NO, приводит к снижению риска возникновения вышеперечисленных заболеваний, в основе которых лежит эндотелиальная дисфункция.

В конце XX столетия было установлено, что оксид азота (NO) является одним из универсальных и необходимых регуляторов клеточного метаболизма. Выяснилось, что эта молекула является короткоживущим и легко подвергающимся химическим трансформациям свободным радикалом, которая непрерывно ферментативно продуцируется в организме млекопитающих, оказывая воздействие на различные физиологические и патофизиологические процессы. Изучение роли NO позволило установить, что оксид азота - мессенджер, выступающий в роли универсального модулятора разнообразных функций организма, включая регуляцию дыхания, поддержания сердечно-сосудистого гомеостаза, иммунного статуса организма, активности макрофагов, экспрессии генов, пластичности нервной ткани, памяти, высвобождения нейротрансмиттеров. Оксид азота выполняет роль нейромодулятора в центральной нервной системе и в нервно-мышечных синапсах.

Открытие разнообразных физиологических ролей оксида азота в организме привело к созданию, изучению и применению лекарственных препаратов, способных корректировать нитроксидаергическую систему.

Однако на сегодняшний день известных лекарственных средств, предназначенных для коррекции нарушений нитроксидаергической системы, не так много, и к ним следует отнести лишь препараты, которые как активное действующее вещество содержат L-аргинин (глутаргин, вазотон, тивортин) [2, 3, 5]. Кроме того, их терапевтическое действие недостаточно эффективно, поэтому актуальной задачей является расширение арсенала препаратов для коррекции нарушений нитроксидаергической системы, которые проявляли бы высокую эффективность и были безвредны для пациентов.

Известно биологически активное соединение бромид 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (МТ), обладающее кардиопротективным, противоишемическим, антигипертензивным, антиоксидантным, протеинсинтетическим и энерготропным действием (патент Российской Федерации №2404974, С07D 249/08 (2006.01), А61Р 9/04 (2006.01), А61Р 9/10 (2006.01), А61Р 9/12 (2006.01), опубл. 27.11.2010; патент Украины №92692, МПК (2009) А61К 31/41, опубл. в бюл. «Промислова власність», 2010, №22).

Однако нигде в доступной нам литературе не описывается свойство указанного вещества корректировать нарушения нитроксидаергической системы.

В основу изобретения поставлена задача получения средства, корректирующего нарушения нитроксидазической системы, которое имеет более высокую эффективность по сравнению с уже известными средствами аналогичного действия и не оказывает побочного эффекта.

Поставленная задача решается тем, что в качестве активной основы лекарственных средств для коррекции нарушений нитроксидазической системы используют бромид 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия.

Суть изобретения поясняется нижеприведенными примерами результатов доклинических исследований.

Пример 1. Для проведения исследований моделировали эндотелиальную дисфункцию (ЭД) (с выраженным дефицитом NO, т.е. нарушением функционирования нитроксидазической системы) путем ежедневного введения N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) белым беспородным крысам-самцам массой 180-190 г один раз в сутки, внутривентриально, в дозе 25 мг/кг в течение 8 дней. Проводили оценку эффективности коррекции нарушений нитроксидазической системы при использовании бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (МТ). В эксперименте сравнивали действие бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (МТ) и референс-препарата L-аргинина (EUROBIOPHARM GmgH, Hamburg). Исследуемые препараты вводили внутривентриально через 30 минут после введения L-NAME: L-аргинин в дозе 200 мг/кг/сутки, бромид 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия - в дозе 5 мг/кг/сутки. Крыс выводили из эксперимента на 8 день от его начала под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), и у них для исследований забирали сердце, которое затем гомогенизировали в жидком азоте и методом дифференцированного центрифугирования выделяли цитозольную фракцию, в которой содержится только эндотелиальная NO-синтаза (eNOS).

В цитозольной фракции гомогената сердца определялись биохимические маркеры эндотелиальной дисфункции - стабильные метаболиты NO и активность общей NO-синтазы [4]. Уровень экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) определяли в цитозольной фракции гомогената сердца методом иммуоблоттинга [4].

Полученные результаты представлены в таблице №1.

| Таблица 1 | | | |
|---|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Влияние бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазаолия (МТ) и референс-препарата L-аргинина на показатели системы NO в цитозольной фракции гомогената сердца крыс с эндотелиальной дисфункцией при введении в течение 8 суток | | | |
| Группа животных | NOS, мкмоль НАДФ/мин/г белка | Нитриты, мкмоль/г ткани | Концентрация eNOS, у.е./г белка |
| интактные (n=10) | 12,4±0,63 | 18,5±0,77 | 15,7±0,65 |
| ЭД (контроль) (n=10) | 4,22±0,45 | 5,81±0,53 | 3,2±0,17 |
| ЭД+МТ(5 мг/кг) (n=10) | 8,7±0,55*1 (+106,2%) | 12,2±0,85*1 (+110%) | 10,2±0,45*1 (+218,7%) |
| ЭД+L-аргинин (200 мг/кг) (n=10) | 5,00±0,47 (+18,4%) | 7,12±0,32* (+22,5%) | 3,5±0,27 (+9,3%) |
| Примечание: | | | |
| * - изменения достоверны по отношению к животным контрольной группы (p<0,05); | | | |
| ¹ - изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших L-аргинин (p<0,05) | | | |

Как видно из таблицы 1, при моделировании эндотелиальной дисфункции (ЭД) у животных наблюдается дефицит NO, о чем свидетельствует достоверное снижение его стабильного метаболита - нитрит-аниона на 68,6% на фоне угнетения активности общей NOS на 66% и снижение экспрессии eNOS на 79,6% в цитозоле миокарда по сравнению с интактными животными.

Курсовое назначение животным с эндотелиальной дисфункцией препарата МТ в дозе 5 мг/кг/сутки приводило к повышению продукции NO в цитозоле миокарда

на 110%. МТ усиливал физиологический путь синтеза NO, повышая активность эндотелиальной NO-синтазы. Так, в группе животных с ЭД, получавших МТ, активность общей NO-синтазы в цитозоле возросла на 106,2%, а также отмечалось увеличение экспрессии эндотелиальной NO-синтазы на 218,7% по сравнению с нелеченными животными. L-Аргинин влиял только на образование NO, достоверно повышая уровень нитритов на 22,5%, однако он не оказывал достоверного влияния на активность и экспрессию NO-синтазы в миокарде.

Пример 2. Для оценки эффективности коррекции нарушений нитроксидергической системы при использовании бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ) были использованы 30 крыс обоего пола массой 180-200 г со спонтанной артериальной гипертензией линии НИСАГ (наследственно индуцированная стрессом артериальная гипертензия на фоне дефицита NO) и 8 нормотензивных контрольных животных линии WKR (normotensive Wistar-Kyoto rats), массой 180-220 г. МТ вводили внутрибрюшинно ежедневно в дозе 5 мг/кг в течение 15 суток. L-аргинин (EUROBIOPHARM GmgH, Hamburg) вводили в дозе 200 мг/кг по той же схеме. На 15 день эксперимента животных выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг), и у них забиралось сердце, которое затем гомогенизировали в жидком азоте и методом дифференцированного центрифугирования выделяли цитозольную фракцию, в которой содержится только эндотелиальная NO-синтаза (eNOS). В цитозольной фракции гомогената сердца определялись биохимические маркеры эндотелиальной дисфункции - стабильные метаболиты NO и активность общей NO-синтазы [4]. Уровень экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) определяли в цитозольной фракции гомогената сердца методом иммуноблотинга [4]. Результаты исследований представлены в таблице №2.

| Влияние МТ иреференс-препарата L-аргинина на показатели системы NO в цитозольной фракции гомогената сердца крыс со спонтанной артериальной гипертензией при введении в течение 15 суток | | | |
|---|------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Группа животных | NOS, мкмоль НАДФ/мин/г белка | Нитриты, мкмоль/ г ткани | Концентрация eNOS, у.е./г белка |
| Нормотензивные (интакт) (n=8) | 11,75±0,75 | 17,23±0,84 | 15,2±0,73 |
| SHR (контроль) (n=10) | 5,15±0,64 | 7,76±0,67 | 4,1±0,21 |
| SHR+МТ (5 мг/кг) (n=10) | 9,71±0,65*1 (+88,5%) | 15,15±0,77*1 (+95,2%) | 12,3±0,65*1 (+200%) |
| SHR+L-аргинин (200 мг/кг) (n=10) | 6,20±0,55 (+20,4%) | 9,87±0,44* (+27,2%) | 4,77±0,53 (+16,3%) |
| Примечание: | | | |
| * - изменения достоверны по отношению к животным контрольной группы (p<0,05); | | | |
| 1 - изменения достоверны по отношению к группе животных, получавших L-аргинин (p<0,05) | | | |

Как видно из таблицы 2, у крыс линии НИСАГ наблюдается уменьшение образования NO, о чем свидетельствовало достоверное снижение его стабильного метаболита - нитрит-аниона на 55,0% на фоне угнетения активности общей NOS на 56,2% и снижение экспрессии eNOS на 73,0% в цитозоле миокарда по сравнению с нормотензивными крысами.

Курсовое назначение НИСАГ крысам препарата МТ в дозе 5 мг/кг/сутки приводило к повышению продукции NO в цитозоле миокарда на 95%. МТ усиливал физиологический путь синтеза NO, повышая активность эндотелиальной NO-синтазы. Так, в группе НИСАГ крыс, получавших МТ, активность общей NO-синтазы в цитозоле повысилась на 88% на фоне повышения экспрессии эндотелиальной NO-синтазы на 200% по сравнению с нелеченными животными. L-Аргинин не оказывал достоверного влияния на активность и экспрессию NO-синтазы в миокарде, а влиял только на образование NO, достоверно повышая уровень нитритов на 27,2%.

В результате проведенных исследований установлено, что МТ в дозе 5 мг/кг достоверно превосходит референс-препарат L-аргинин в дозе 200 мг/кг по таким показателям нитроксидергической системы, как активность общей NOS, экспрессия eNOS, продукция оксида азота. Терапевтическая эффективность МТ

значительно превышала эффективность референс-препарата L-аргинина. Таким образом, у известного средства - бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ) - нами выявлено новое свойство - проявлять коррегирующий эффект по отношению к нитроксидергической системе. По активности МТ достоверно превышает препарат сравнения - L-аргинин. По токсичности препарат МТ относится к IV классу (малотоксичен). Таким образом, использование предлагаемого изобретения позволит в дальнейшем создавать высокоэффективные безвредные лекарственные средства, содержащие как активное действующее вещество бромид 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия (МТ), для коррекции нарушений нитроксидергической системы.

Литература

1. Новый взгляд на коррекцию эндотелиальной дисфункции / Корокин М.В., Покровский М.В., Кочкаров В.И. и др. // Russian journal of immunology. - 2006. - Vol.9, supp.3. - P.59-63.

2. Корокин М.В., Артюшкова Е.Б. Принципы фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции // Кубанский научный медицинский вестник. - 2007. - №1-2. - С.146-150.

3. Диагностика и лечение артериальной гипертензии. Российские рекомендации (третий пересмотр). - М., 2008.

4. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных препаратов: метод, рекомендации ГФЦ МЗ Украины / И.С. Чекман, Ю.И. Губский, И.Ф. Беленичев. - К., 2010. - 81 с.

5. Компендиум. Лекарственные препараты. - К.: Морион, 2010. - С. Л-418, Л-1505.

Формула изобретения

Применение бромида 1-(β-фенилэтил)-4-амино-1,2,4-триазолия в качестве активной основы лекарственных средств для коррекции нарушений функционирования нитроксидергической системы.