



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/197 (2022.05); A61P 7/02 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021124245, 12.08.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.08.2021

Дата регистрации:
23.08.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.08.2021

(45) Опубликовано: 23.08.2022 Бюл. № 24

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Павлов Валентин Николаевич (RU),
Пурыгин Пётр Петрович (RU),
Зарубин Юрий Павлович (RU),
Абзалилов Тимер Айратович (RU),
Хайрзаманова Ксения Александровна (RU),
Мочалов Константин Сергеевич (RU),
Фахретдинова Альбина Камилевна (RU),
Муминов Диор Дильшатович (RU),
Климович Анастасия Кирилловна (RU),
Самородов Александр Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

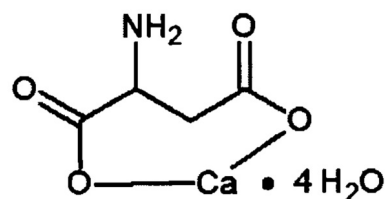
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2731106 C1, 28.08.2020. RU
2709017 C1, 13.12.2019. Patrono C., Andreotti F.,
Arnesen H., et al., "Antiplatelet agents for the
treatment and prevention of atherothrombosis",
European Heart Journal, 2011, vol. 32(23),
pp.2922-2932. US 0004221805 A1, 09.09.1980.

(54) Средство с антиагрегационной активностью и способ его получения

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической химии и фармакологии и может быть использовано для создания новых лекарственных средств профилактики тромбоза и тромбозмболических осложнений. Раскрывается применение L-аспартата кальция тетрагидрата формулы в качестве средства, проявляющего антиагрегационную активность. Технический

результат: получение средства с антиагрегационной активностью. 2 табл., 3 пр.





FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/197 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 31/197 (2022.05); A61P 7/02 (2022.05)(21)(22) Application: **2021124245, 12.08.2021**

(24) Effective date for property rights:
12.08.2021

Registration date:
23.08.2022

Priority:

(22) Date of filing: **12.08.2021**(45) Date of publication: **23.08.2022 Bull. № 24**

Mail address:

**450008, g. Ufa, ul. Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Pavlov Valentin Nikolaevich (RU),
Purygin Petr Petrovich (RU),
Zarubin Yuriy Pavlovich (RU),
Abzalilov Timer Ajratovich (RU),
Khajrzamanova Kseniya Aleksandrovna (RU),
Mochalov Konstantin Sergeevich (RU),
Fakhretdinova Albina Kamilevna (RU),
Muminov Dior Dilshatovich (RU),
Klimovich Anastasiya Kirillovna (RU),
Samorodov Aleksandr Vladimirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

(54) AGENT WITH ANTIAGGREGATORY ACTIVITY AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

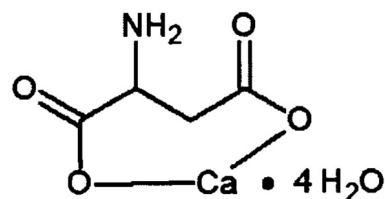
(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to pharmaceutical chemistry and pharmacology and can be used to create new medicinal products for preventing thrombosis and thromboembolic complications. Disclosed is an application of calcium L-aspartate tetrahydrate by the formula as an agent exhibiting antiaggregatory activity.

EFFECT: production of an agent with

antiaggregatory activity.



1 cl, 2 tbl, 3 ex

Группа изобретений относится к химии и медицине, а именно к фармацевтической химии и фармакологии, и может быть использовано для создания новых лекарственных средств профилактики тромбоза и тромбоэмболических осложнений.

Известно, что в качестве антиагрегационных средств последнего поколения

разрешены к клиническому применению препараты L-цистеинамид, N⁶-

(аминоиминометил)-N²-(3-меркапто-1-оксопропил)-L-лизилглицил-L-α-аспартил-L-триптофил-L-пролил-, циклический(1-6)-дисульфид («Интегрилин», Glaxo Operations UK Limited, Великобритания), M-(бутилсульфонил)-4-[4-(пиперидил)бутоксид]-L-фенилаланин гидрохлорид моногидрат (Тирофибан, «Агратат», Correvio, Великобритания), F(ab')₂ фрагменты мышинных моноклональных антител FRaMon против рецептора фибриногена тромбоцитов - GPIIb/IIIa («Монафрам»[®], ЗАО «Фрамон», Россия) [см. Holmes L.E. A randomized trial assessing the impact of three different glycoprotein IIb/IIIa antagonists on glycoprotein IIb/IIIa platelet receptor inhibition and clinical endpoints in patients with acute coronary syndromes / L.E. Holmes, R. Gupta, S. Rajendran, J. Luu, J.K. French, C.P. Juergens // Cardiovasc. Ther. - 2016, N21. doi: 10.1111/1755-5922.12203.].

Несмотря на то что данные соединения по результатам клинических исследований оказываются наиболее эффективными в условиях интервенционной кардиологии, применение их ограничено по причине высокой стоимости, развития аутоиммунных реакций [Patrono, C. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis / C. Patrono, F. Andreotti, H. Arnesen // European Heart Journal. - 2011. - Vol. 32. - P. 2922-2932.].

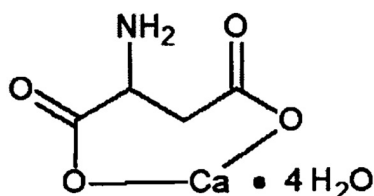
Наиболее близким аналогом изобретения является клопидогрел (метил-(+)-(S)-α-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3,2-с]пиридин-5(4H)-ацетат) из известных антиагрегантов, наиболее близкий по химическому строению. [М.Д. Машковский. Лекарственные средства. Том 1, Москва ООО «Новая Волна», изд. С.Б. Дивов, 2002, с. 468.]. Ингибирует агрегацию тромбоцитов, блокируя связывание аденозиндифосфата (АДФ) с рецепторами тромбоцитов. Применяют для профилактики тромбообразования у больных ишемической болезнью сердца (после инфаркта миокарда), при атеросклерозе мозговых и периферических сосудов.

Недостатками данного препарата являются возможные геморрагические явления, тромбопения, лейкопения, агранулоцитоз. Нельзя назначать данный препарат одновременно с антикоагулянтами.

Задачей изобретения является расширение арсенала биологически активных веществ, проявляющих антиагрегационную активность.

Технический результат при использовании изобретения - получение средства с антиагрегационной активностью.

Сущность изобретения: применение L-аспартата кальция тетрагидрата (соединение I) формулы:



в качестве средства, проявляющего антиагрегационную активность.

Известен аспартат кальция, являющийся результатом связывания L-аспарагиновой кислоты с кальцием. Данный препарат производства США используется в качестве биологической активной добавки к пище в качестве источника биодоступного кальция

[Кальций биодоступный (аспаратат) 1000 мг 60 капе [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://besuto.com.ua/p525287103-kaltsij-biodostupnyj-aspartat.html> Дата доступа: 08.02.2021].

В доступной научно-медицинской и патентной литературе сведений об известности применения L-аспартата кальция в качестве средства, проявляющего антиагрегационную активность, не найдено.

Препаратом сравнения выбрана ацетилсалициловая кислота (2-ацетилоксибензойная кислота), которая длительно и успешно применяется в практической медицине и имеет доказанную эффективность в качестве средства профилактики и лечения тромбоза и тромбоэмболических осложнений [см. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke.2018; 49:e138].

Тем не менее, недостатком известного препарата является высокая частота аспиринорезистентности, нежелательные клинические явления в виде ulcerогенного и геморрагических эффектов [Patrono, C. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis / C. Patrono, F. Andreotti, H. Arnesen // European Heart Journal. - 2011. - Vol. 32. - P. 2922-2932.].

Антиагрегационная активность и острая токсичность соединения

Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. Общее количество доноров составило 28 человек. Забор крови для исследования соединений в отношении системы гемостаза проводился из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Все тесты проводились на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы - при 3000 об/мин в течение 20 минут. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия). Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born (Born G.G.V. Nature (London). - 1962. - V. 194.) на агрегометре «АТ-02» (НПФ «Медтех», Россия). Определение антиагрегационной активности соединения I и ацетилсалициловой кислоты проводили в конечной концентрации 10^{-3} моль/л. В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства «Технология-Стандарт» (Россия). Проводили оценку максимальной амплитуды агрегации, скорости агрегации, время достижения максимальной амплитуды и дезагрегацию в присутствии изучаемых соединений при агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. При коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали латентный период, во время которого происходит активация фосфолипазы C (что приводит к образованию вторичных посредников, вследствие чего развивается секреция тромбоцитарных гранул и синтез тромбоксана A_2).

Определение острой токсичности соединения I и аспирина проведено на 200 белых мышцах самцах в возрасте 2 месяцев со средней массой тела 20-21 г. при внутрибрюшинном способе введения. Животные прошли карантин в течение 14 дней в условиях отдельного бокса вивария кафедры биологической химии БГМУ. Температурный режим помещения вивария поддерживался от +18 до +22°C. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминесцентное). Ежедневно в помещении вивария проводилась 20 мин. бактерицидная обработка стационарным настенным бактерицидным облучателем. Животные имели круглосуточный свободный доступ к

поилкам, получали набор натуральных продуктов (овощи, зерно) и стандартную диету, представленную в виде экструдированного гранулированного корма для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) соответствующий Декларации о соответствии № РОСС RU. ПР 98, Д 00497 до 07.02.2016 г. и содержащий в своем составе пшеницу, ячмень, шрот соевый, муку рыбную, дрожжи, отруби, а также витамины и минеральные вещества, витаминно-минеральный комплекс, растительный жир, антиоксидант.

Исследования выполнялись в соответствии правилами лабораторной практики (GLP), со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (М., 2012).

При проведении исследований на белых беспородных мышах при внутрибрюшинном введении вещества исследовали в дозах 100-500 мг/кг с шагом в 50 мг/кг. Количество вводимого вещества рассчитывали по объему введенного раствора в зависимости от массы тела с учетом максимально допустимого количества жидкости. Контрольная (интактная) группа животных включена в эксперимент для проведения сравнительной оценки состояния и поведения особей в контрольной и опытных группах. Данная группа животных по окончании первых суток наблюдений исключалась из эксперимента. Наблюдение за опытными группами проводилось в течение 14 суток.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05. Величину LD50 вычисляли методом пробит-анализа с использованием программы BioStat 5.9 (Analyst Soft Inc.).

Пример 1. Антиагрегационная активность соединения.

Установлено, что введение соединения I в кювету агрегометра приводит к удлинению реакции высвобождения тромбоцитов (lag-периода) на 15,7% ($p < 0,05$), снижению амплитуды агрегации тромбоцитов на 29,4% ($p < 0,05$), скорости агрегации тромбоцитов на 13,6% ($p < 0,05$) и удлинению времени достижения максимальной агрегации на 25,7% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (табл. 1). При этом ацетилсалициловая кислота не влияет на реакцию высвобождения тромбоцитов, уступая соединению I по действию на уровень агрегации тромбоцитов более чем в 2,2 раза ($p < 0,05$), показатели скорости агрегации тромбоцитов на 28,6% ($p < 0,05$) и времени достижения максимума агрегации более чем в 2,4 раза ($p < 0,05$).

Пример 2. Изучение острой токсичности при внутрибрюшинном введении мышам.

В результате исследования установлено, что соединение I согласно классификации химических веществ по параметрам острой токсичности И.В. Березовской и критерию токсичности при оценке опасности химических соединений по И.В. Саноцкому и И.П. Улановой относится к классу малотоксичных веществ (табл. 2).

Таким образом, соединение I является малотоксичным и эффективнее аспирина ингибирует процессы активации и агрегации тромбоцитов.

Наиболее близким аналогом способа получения L-аспартата кальция является способ синтеза аспартата кальция тетрагидрата по схеме:

L-Аспартата кальция тетрагидрат, $\text{Ca}(\text{L-Asp}) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Суспензию L-аспарагиновой кислоты (1,33 г, 10,0 ммоль) в 15 мл воды нагревали до 60°C и небольшими порциями добавляли гидроксид кальция (0,76 г, 10,0 ммоль). Полученную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 3 ч, фильтровали в горячем состоянии и давали

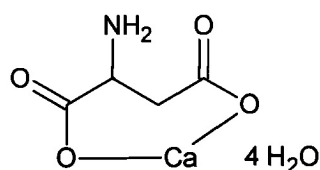
медленно остыть до комнатной температуры. Кристаллизация наблюдалась в течение примерно 12 часов. Через несколько дней был достигнут выход 1,4 г (75%).

Растворимость в воде 0,028 г/л при 22°C. pH насыщенного раствора 10,50. $C_4H_3CaNO_8$ (243,2). Вычислено: C: 19,75, H: 5,39, N: 5,76, O: 52,62. Найдено: C: 19,65, H: 5,28, N: 5,67, O: 53,10 [Schmidbaur, H., Bach, I., Wilkinson, D.L., & Muller, G. (1989). Metal ion binding by amino acids. Preparation and crystal structures of two calcium L-asparatate hydrates. *Chemische Berichte*, 122(8), 1439-1444.]. Недостатком прототипа является низкий выход целевого продукта.

Задачей изобретения является расширение арсенала методов синтеза биологически активных веществ, проявляющих антиагрегационную активность.

Технический результат при использовании изобретения - повышение выхода целевого соединения.

Предлагаемый способ получения L-аспартата кальция тетрагидрата формулы:



осуществляется следующим образом. Суспензию аспарагиновой кислоты в 20 мл воды смешивают с порошком гидроксида кальция ($Ca(OH)_2 \cdot H_2O$) в мольном соотношении 1:1. Реакционную смесь нагревают при 95°C в течение 40 минут. Гомогенный раствор упаривают и сушат при комнатной температуре до получения целевого продукта.

Пример 3. Синтез аспартата кальция тетрагидрата. К суспензии 6,60 г (0,05 моль) аспарагиновой кислоты в 20 мл воды прибавляют порциями 3,70 г (0,05 моль) гидроксида кальция $Ca(OH)_2 \cdot H_2O$. Реакционную смесь нагревают при 95°C в течение 40 минут.

Гомогенный раствор упаривают и сушат при комнатной температуре. Получают 8,75 г (85,0%) аспартата кальция тетрагидрата, $C_4C_{13}CaNO_8$. Аспартат кальция тетрагидрат - продукт белого цвета, хорошо растворим в воде, нерастворим в спирте, ацетоне, т.пл. 98-100°C (из водного ацетона). R_f 0,61 (этанол - вода - 1:1).

Элементный анализ. Найдено, %: C 19,82; H 5,44; N 5,79. $C_4H_{13}CaNO_8$. Вычислено, %: C 19,75; H 5,39; N 5,76.

Заявляемое соединение представляет собой белое кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде, нерастворимое в спирте, ацетоне.

ИК спектр, ν , cm^{-1} : 3367 (NH_2 , вал.), 1688, 1647 ($C=O$, вал.), 1431, 1416 (CH_2 , ножн., CH_2-CO).

Спектр ЯМР 1H (D_2O), δ , м.д.: 2.76 (2H, м, $\beta-CH_2$); 3.90 (1H, м, $\alpha-CH$).

Таблица 1

**Показатели антиагрегационной активности соединения I и
ацетилсалициловой кислоты, n=10**

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю
1	Соединение I	+15,7 (13,2–19,6)*, #	–29,4 (28,5–30,2)*, ##	–13,6 (10,5–16,3)*, ##	+25,7 (24,9–28,5)*, ##
2	Ацетилсалициловая кислота	–2,1 (1,1–2,6)	–13,7 (10,8–16,4)*	–10,5 (7,6–12,3)*	+10,5 (8,7–13,4)*

Примечание: Латентный период представлен для агрегации тромбоцитов, индуцированной коллагеном, остальные параметры для АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ – в сравнении с контролем; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,001$ – в сравнении с ацетилсалициловой кислотой.

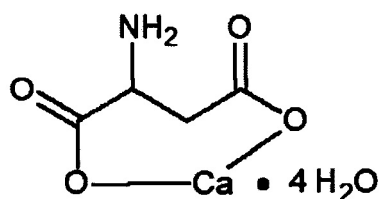
Таблица 2

**Показатели острой токсичности соединения I и ацетилсалициловой
кислоты, M $\pm$ SD**

Показатель	Аспирин	Соединение I
LD ₅₀ , мг/кг	302,9 $\pm$ 32,6	327,5 $\pm$ 29,3

(57) Формула изобретения

Применение L-аспартата кальция тетрагидрата формулы:



в качестве средства, проявляющего антиагрегационную активность.