

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 035808

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.08.14

(21) Номер заявки  
201591704

(22) Дата подачи заявки  
2013.05.09

(51) Int. Cl. A61K 38/10 (2006.01)  
A61K 38/17 (2006.01)  
C07K 7/08 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)

---

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ АКТИВНАЯ СОЛЬ ПЕНТАДЕКАПЕПТИДА, УСТОЙЧИВАЯ К ВЛИЯНИЮ ТЕМПЕРАТУРЫ, ВЛАЖНОСТИ И ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ

---

(31) P-201300055

(32) 2013.03.13

(33) SI

(43) 2016.01.29

(86) PCT/SI2013/000026

(87) WO 2014/142764 2014.09.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ДИАГЕН Д.О.О. (SI)

(72) Изобретатель:  
Ручман Рудольф (SI)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A2-2010033240  
CN-A-1296079

---

(57) Изобретение относится к устойчивой к влиянию температуры, влажности и желудочного сока терапевтически активной соли пентадекапептида формулы GlyGluProProGlyLysProAlaAspAspAlaGlyLeuVal-nBAA, способу ее получения, а также фармацевтическому составу, содержащему заявленную соль пентадекапептида, и его применению для профилактики и лечения заболеваний, болезненных состояний и нарушений.

B1

035808

035808

B1

### Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение принадлежит области фармацевтической химии и относится к новым устойчивым солям пентадекапептида, в дальнейшем также называемым соли бепецина, формулы (I)



1 5 10 15

SEQ ID NO 1

(I)

где n представляет собой 1, 2 или 3, и BAA является основной аминокислотой, способу их получения, их применению в производстве фармацевтических составов и их применению в терапии.

### Техническая проблема

Многочисленные фармакологические исследования продемонстрировали защитную, регенеративную и терапевтическую активность пентадекапептида (сокр. BPC-157 или бепецин), имеющего аминокислотную последовательность: Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val (SEQ ID NO: 1) как для человеческого, так и для животного организма. До настоящего времени этот пептид всегда использовали или в свободной форме, или в форме ацетата, или в виде соли с основаниями, такой как соль натрия. Все эти формы характеризуются все еще недостаточной устойчивостью в желудочном соке, которая чрезвычайно ограничивает пероральное использование этих соединений и одновременно снижает их терапевтическую ценность. Вследствие этого было необходимо произвести этот пентадекапептид в форме, которая является существенно более устойчивой как в желудочном соке, так и при повышенной окружающей температуре. Такая форма получения может быть использована более успешно, в особенности в пероральной доставке в организм. Из-за более высокой устойчивости также можно предположить большую эффективность.

### Предшествующий уровень техники

Пентадекапептид BPC 157 или бепецин (сокр. для: Body Protecting Compound) имеет следующую пептидную последовательность: Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val и представляет N-концевую часть природного белка BPC, который обычно представлен в желудочном соке млекопитающих. Природный белок BPC получают из человеческого или животного желудочного сока посредством сложных биохимических способов (патент США № 5288708). Независимо от необходимой работы этот путь получения является неподходящим также с точки зрения неопределенного источника сырьевого материала и возможного заражения вирусами. Вследствие этого, химическим синтезом была получена (P. Sikirić, R. Ručman, B. Rucman, M. Petek, Peptides 1998, Proceed, of 25th EPS, Budapest 1998, p. 814; Z. Pflaum и R. Ručman, Acta Chim. Slov., 2005, 52, 34-39) только N-концевая часть вышеупомянутой последовательности. Неожиданно было обнаружено, что этот фрагмент сохранял практически все эффекты природного белка BPC (EP 0572688 и патент США № 6268346). N-концевая часть с последовательностью из 15 аминокислот оказалась имеющей наибольшую роль в биологической активности целого белка. Соединение является очень интересным с медицинской точки зрения, так как оно имеет эффект почти на все органы с чрезвычайно низкими концентрациями (в диапазоне от нг до мг и более в расчете на килограмм массы тела) и без каких-либо токсических или побочных эффектов.

Фармакологические исследования продемонстрировали, что пентадекапептид бепецин (SEQ ID NO: 1), введенный в организм, имеет следующие эффекты:

- на язвы в любой части желудочно-кишечного тракта (P. Sikirić et al., Life Sci., 1994; 54, PL63-68); (P. Sikirić et al., Exp. Clin. Gastroenterol., 1991, 1, 17-20);

- противовоспалительный независимо от этиологии (P. Sikirić et al., J. Physiol./Paris/, 1997, 91, 113-122);

- против воспалительного заболевания желудочно-кишечного тракта - болезнь Крона (Sikirić et al., J. Physiol./Paris/, 2001, 95, 295-301);

- защитный для печени и поджелудочной железы (Prkaćin et al., J. Physiol./Paris/, 2001, 95, 315-324);

- стимулирует заживление ожогов (D. Mikuš, P. Sikirić et al., Burns 2003, 29, 323-334; Burns, 2001, 127, 817-827);

- стимулирует заживление ран (S. Seiwerth, P. Sikirić et al., J. Physiol./Paris/, 1997, 91, 173-178);

- защита против радиоактивного излучения (P. Sikirić, M. Petek, R. Ručman, J. Physiol./Paris/, 1993, 87, 313-327);

- стимулирует заживление переломов костей (B. Sebečić, V. Miklič, P. Sikirić et al., Bone, 1999, 24, 195-202);

- взаимодействуя с адренергическими и дофаминергическими системами, он защищает слизистые оболочки в условиях стресса (P. Sikirić et al., Dig. Dis. Sci., 1997, 42, 661-671);

- противоопухолевый эффект в некоторых типах опухолей (асциты, меланома) (P. Sikirić, M. Petek, R. Ručman, J. Physiol./Paris/, 1993, 87, 313-327; S. Radelj, S. Seiwert, P. Sikirić, Melanoma Research, 2004, 14 (4), A14-A15);

- противовирусный эффект на вирусы герпеса HSV-1 и HSV-2, LCM, CMV, вирус гриппа А и вирус клещевого энцефалита, P. Sikirić, R. Ručman, M. Petek, J. Physiol./Paris/, 1993, 87, 313-327);

стимулирует регенерацию разорванных нервных соединений (P. Sikirić et al., Dig. Dis. Sci., 41, 1604-1614; M. Ćurašin et al., Dig. Dis. Sci., 2003, 48, 1879);

стимулирует заживление разорванного ахиллова сухожилия (M. Starešinić, P. Sikirić et al., J. Orthoped. Res., 2003, 21, 976-983);

устраняет органические нарушения, связанные с образованием NO (P. Sikirić et al., Eur. J. Pharm., 1997, 332, 23-33).

Пептид бепецин как составляющая часть собственного вещества живого организма не проявляет каких-либо признаков токсичности. Тесты, проведенные на мышах для того, чтобы определить LD<sub>50</sub>, а также с целью получения данных об острой, подострой и хронической токсичности были безуспешными, так как этот пептид, введенный внутривенно, перорально или внутривентриально в широком диапазоне доз от 10 нг до 100 мг/кг массы тела, не индуцировал каких-либо токсических изменений.

В добавление, тесты тератогенности и генотоксичности (Микросомный тест с Salmonella) подтвердили отсутствие признаков такого действия.

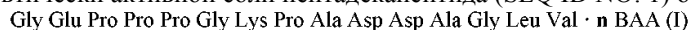
Соли синтетического пентадекапептида ВРС-157 также раскрыты в европейском патенте 0983300 и патенте США № 6288028. Эти соли немного лучше первоначальной формы, т.е. чем свободная кислота или ацетат, но у них все еще отсутствует достаточная устойчивость в желудочном соке.

#### Решение технической проблемы

Фундаментальной проблемой, которая должна быть решена, является устойчивость соединения при повышенной температуре, в особенности устойчивость в желудочном соке. Данное изобретение относится к новым солям пентадекапептида с основными аминокислотами, имеющим значительно улучшенную термическую устойчивость и также устойчивость в желудочном соке.

Желудочный сок является комплексной смесью различных соединений, и его главными компонентами являются: вода, хлорид натрия, хлористоводородная кислота, муцины, ферменты, в частности пепсин и другие. Желудочный сок обычно является кислотным; его значение pH варьируется от 1 до 7 и в исключительных случаях выше. Нормальные значения pH находятся в диапазоне от 2 до 5, который также является диапазоном наибольшей активности пепсина, который разлагает полипептиды, пептиды и белки.

Данное изобретение, таким образом, относится к устойчивой к влиянию температуры, влажности и желудочного сока терапевтически активной соли пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) общей формулы (I)

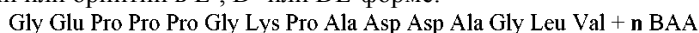


SEQ ID NO 1

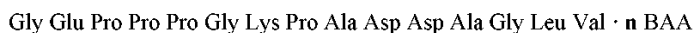
где n означает 1, 2 или 3 и BAA означает основную аминокислоту, представляющую собой аргинин, лизин или орнитин в L-, D- или DL-форме.

В качестве основных аминокислот используют основные аргинин, лизин, орнитин или другие в L-, D- или DL-форме, предпочтительно L-аргинин.

Данное изобретение также относится к способу получения соли пентадекапептида формулы (I), устойчивой к влиянию температуры, влажности и желудочного сока, характеризующийся тем, что пентадекапептид (SEQ ID NO: 1) подвергают взаимодействию с основной аминокислотой BAA, представляющей собой аргинин, лизин или орнитин в L-, D- или DL-форме:



SEQ ID NO 1



SEQ ID NO 1

в молярном соотношении от 1 до 3 молей основной аминокислоты к 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) в водном растворе при комнатной температуре, причем значение pH образованного раствора доводят титрованием до 4,1-5,0 или 6,7-7,8, затем образованную соль формулы (I) выделяют в твердой форме посредством хроматографии ВЭЖХ и лиофилизации.

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению в качестве основной аминокислоты используют L-аргинин.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления способа по изобретению значение pH раствора, полученного посредством взаимодействия 1 моль основной аминокислоты с 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1), доводят до 4,1-5,0, предпочтительно до 4,60±0,05.

В другом предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению значение pH раствора, полученного посредством взаимодействия 2 моль основной аминокислоты с 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) доводят до 6,7-7,8, предпочтительно до 7,40±0,05.

Данное изобретение дополнительно относится к фармацевтическому составу в твердой или жидкой форме для перорального, внутривенного, ректального, вагинального, внутримышечного, местного и другого применения, содержащий терапевтически эффективное количество соли пентадекапептида по изобретению, для лечения заболеваний и нарушений, в отношении которых указанная соль проявляет терапевтическую активность.

Данное изобретение также относится к фармацевтическому составу, дополнительно содержащему антибиотики и/или антиоксиданты.

Данное изобретение также относится к фармацевтическому составу, дополнительно содержащему добавки для увеличения стабильности, выбранные из карбонатов или гидрокарбонатов щелочного металла и щелочноземельного металла, предпочтительно гидрокарбонат натрия.

Данное изобретение также относится к фармацевтическому составу, дополнительно содержащему добавки для увеличения стабильности, выбранные из сахаров, подобных D-манниту, трегалозе или сорбиту, но предпочтительно D-маннит.

Данное изобретение дополнительно относится к применению фармацевтического состава для профилактики и лечения следующих заболеваний, болезненных состояний и нарушений:

связанных со стрессом заболеваний и нарушений, язв в любой части желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечного воспалительного заболевания, болезни Крона, острого панкреатита;

повреждений печени и поджелудочной железы, инфаркта миокарда и мозгового инсульта;

вирусных инфекций, в частности гепатита А, штаммов герпеса, гриппа А и вирусов ARBO, таких как клещевой энцефалит, лихорадка Западного Нила, денге типов 1-4, цитомегаловирус CMV и LCM, вирус лейкоза кошек;

меланомы и схожих опухолей;

ран, ожогов, переломов костей, разорванных нервных соединений, ахиллова сухожилия и разорванных мышц, повреждения спинного мозга;

органических нарушений, связанных с образованием NO: гипертензия, гипотензия, анафилаксия, циркуляторный и септический шок, агрегация тромбоцитов;

неврологических заболеваний и нарушений: множественного склероза, миастении гравис, эритематозной волчанки, невропатии, дисфункции соматосенсорных нервов, астмы, ринита, пемфигуса и экземы;

катехоламинергической дисфункции, шизофрении, эффекта абстиненции от амфетамина, наркотических средств и спирта;

нарушений из-за кортикостероидов и NSAID;

чешуйчатой дегенерации пятна на глазах;

во всех состояниях, где обязательна быстрая реорганизация кровообращения;

Данное изобретение также относится к применению фармацевтического состава в ветеринарной медицине для увеличения прибавления массы у животных и для увеличения устойчивости сперматозоидов при хранении.

Данное изобретение дополнительно относится к применению солей пентадекапептида по данному изобретению для получения биоактивных пищевых добавок.

#### **Подробное описание изобретения**

Состав и структура новых соединений были определены посредством применения масс-спектрометра, посредством аминокислотного анализа, <sup>1</sup>H-ЯМР, спектров ИСПФ и УФ. УФ-спектры были записаны на спектрометре Varian Carry 50, ИСПФ-спектры на спектрометре Perkin Elmer 727B, масс-спектры на спектрометре AutoSpec Q и <sup>1</sup>H-ЯМР спектры на спектрометре Bruker Advance DPX500. Удельное оптическое вращение  $[\alpha]_D^{28}$  было определено спектрометром Perkin Elmer тип 141. Для оптической визуализации в примере 43 использовали камеру Vevo Discovery VMS-001, ×30-30, для термографической визуализации использовали инфракрасную камеру T-335 (FLIR, USA) с программным обеспечением FLIR QuickPlot.

Вышеупомянутая проблема была решена посредством новых солей пентадекапептида бепецина с основными аминокислотами, которые могут быть в L-, D-, или DL-форме. Типичными аминокислотами являются аргинин, лизин, орнитин, 2,4-диаминомасляная кислота, 2,6-диаминокапроновая кислота, 2,6-диаминогексановая кислота, 2,5-диаминопентановая кислота, 2,6-диаминопимелиновая кислота, 2,3-диаминопропионовая кислота, цитруллин, гомоаргинин, гомолизин и подобные. Эти соли могут состоять из одной молекулы пентадекапептида и одной, двух или трех молекул основной аминокислоты.

Значение pH солевых растворов зависит от состава соли, который опосредует устойчивость соли. Предпочтительно использованы соли с L-аргинином. Их обычно получают посредством реакции пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) с основными аминокислотами в молярных соотношениях, варьирующихся от 1:1 до 1:3 (пентадекапептид:основная аминокислота) в водном растворе. Сначала, аминокислоту добавляют в избытке, затем следует повторное титрование избытка разбавленной уксусной кислотой для доведения соответствующего значения pH. Оптимальными значениями pH являются: для солей с молярным соотношением 1:1 (пентадекапептид:ВAA) от 4,1 до 5,0, предпочтительно 4,60±0,05, для солей с

молярным соотношением 1:2 от 6,7 до 7,8, предпочтительно  $7,40 \pm 0,05$ , для солей с соотношением 1:3 это значение не довели. Солевые растворы затем очищали на ВЭЖХ колонке, заполненной обращенно-фазовым сорбентом. После сублимационной сушки соответствующего вытекающего потока получены соли пентадекапептида высокой степени чистоты.

Полученные соли являются очень хорошо растворимыми в воде. Соли пентадекапептида, содержащие 2 моль основных аминокислот в расчете на 1 моль пентадекапептида, имеют наиболее подходящие свойства, предпочтительной является ди-L-аргининовая соль бепецина (сокр.: Arg-BPC).

Исходным соединением для синтеза является пентадекапептид BPC-157 или бепецин, полученный пептидным синтезом на твердом полимерном носителе, как описано в предшествующих европейском патенте 0572688, патенте США 6268346 и публикации Z. Pflaum, R. Rucman, Acta Chem. Slov., 2005, 52, 34-39. Пентадекапептид может быть в свободной форме, в виде соли аммония или натрия или даже в форме ацетата или трифторацетата.

Устойчивость ди-L-аргининовой соли бепецина (1:2, сокр. Arg-BPC) при повышенной температуре была определена способом ускоренного состаривания при  $50^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 65%, который представляет относительно сильно жесткие условия для соединения, имеющего пептидную структуру.

Таблица 1. Снижение содержания пентадекапептида при нахождении при  $50^{\circ}\text{C}$  и относительной влажности 65%

Вещество:	0 день	10 дней	30 дней	60 дней	90 дней
ацетат BPC	99,65%	95,97%	91,98%	85,49%	85,90%
Na соль BPC	99,20%	97,22%	96,46%	97,38%	97,14%
Arg-BPC	99,46%	99,29%	99,20%	98,96%	99,07%
Arg-BPC/ $\text{NaHCO}_3$	99,46%	99,37%	99,29%	99,16%	99,15%
Lys-BPC	99,47%	99,24%	99,27%	98,90%	99,28%

Таблица дополнительно демонстрирует, что добавление гидрокарбоната натрия к соли бепецина увеличивает его устойчивость при повышенной температуре. Это добавление будет в диапазоне от 0,5 до 3,0 мг в расчете на 1 мг бепецина. Это свойство будет принято во внимание в композиции таблеток и капсул. Отдельный эксперимент с добавлением специального сахара, например, трегалозы или D-маннита, демонстрирует схожее улучшение устойчивости.

Устойчивость соли бепецина с L-аргинином в водных растворах была определена после инкубирования водных солевых растворов в концентрации 1 г/100 мл, при  $50^{\circ}\text{C}$ , и в отдельном тесте в очень жестких условиях: при  $100^{\circ}\text{C}$ , где разложение было определено после одного часа.

Таблица 2. Снижение содержания пентадекапептида в воде при  $50^{\circ}\text{C}$ /время (ч)

Вещество:	pH	начало/0	20	65	148	388
BPC ацетат	3,88	98,89%	71,17%	55,25%	52,55%	21,30%
Na-соль BPC	8,42	99,01%	98,36%	97,47%	н.д.	96,74%
Arg-BPC	7,35	99,05%	98,97%	99,04%	99,10%	99,01%
Lys-BPC	7,28	99,07%	99,40%	99,09%	99,35%	99,01%
Orn-BPC	7,12	100,00%	99,64%	99,78%	99,59%	99,44%

Таблица 3. Снижение содержания пентадекапептида в воде при  $100^{\circ}\text{C}$  - 1 ч

Вещество:	начало	после 1 часа
BPC ацетат	98,89%	56,80%
Na-соль BPC	99,01%	98,56%
Arg-BPC	99,05%	99,08% (не изменялось!)

Устойчивость соединения в желудочном соке является важным параметром, в частности в пептидах, которые очень быстро разлагаются в присутствии фермента пепсина и в кислотной среде. Большая устойчивость в желудочном соке означает более длительный период, в течение которого соединение доступно для ресорбции и его терапевтической активности.

Искусственный желудочный сок иллюстрирует условия нормального человеческого желудочного сока и содержит: 0,08 моль хлористоводородной кислоты, 0,03 моль хлорида натрия и 1,0 г пепсина в

1000 мл воды.

Исследуемую пептидную соль в концентрации 10 мг/5 мл инкубировали в искусственном желудочном соке со значениями pH 2, 0, 3, 0 и 4,0 при 37°C.

Таблица 4. Снижение содержания пентадекапептида (отн.%) в желудочном соке при pH=2,0

Вещество:	Время (часы):					
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
ВРС ацетат	100	21,4	8,2	4,75	2,46	2,1
Na-соль ВРС	100	21,6	6,7	4,4	4,2	2,7
Arg-ВРС	100	30,2	13,5	8,2	6,0	4,9

Таблица 5. Снижение содержания пентадекапептида (отн.%) в желудочном соке при pH=3,0

Вещество:	Время (часы):						
	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
ВРС ацетат	100	41,7	26,1	7,8	2,5	1,1	0,08
Na-соль ВРС	100	81,9	71,6	56,0	40,2	29,7	10,1
Arg-ВРС	100	98,1	96,5	93,6	90,0	87,2	84,9

Таблица 6. Снижение содержания пентадекапептида (отн.%) в желудочном соке при pH=4,0

Вещество:	Время (часы):								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
ВРС ацетат	100	89,7	81,3	72,5	60,9	56,4	48,8	44,6	38,0
Na-соль ВРС	100	99,0	98,9	94,6	89,7	78,3	76,3	68,2	60,9
Arg-ВРС	100	99,9	99,5	98,7	96,1	89,8	84,6	73,5	67,2

Содержание пентадекапептида ВРС-157 в тестируемых образцах было определено способом ВЭЖХ в следующей системе:

колонка: Reprosil Orpegen C18, 100, 5 мкм, 250×4,6 мм,  
 подв. фаза А: 0,1% трифторуксусная кислота/5% ацетонитрил/вода  
 подв. фаза В: 0,11% трифторуксусная кислота/40% ацетонитрил/вода  
 градиент: от 100% А до 30% А за 25 мин  
 температура: 20°C  
 поток: 1,5 мл/мин  
 детектирование: UV, 210 нм

Результаты определения устойчивости показывают, что соли бепецина с основными аминокислотами являются существенно более устойчивыми, чем другие до настоящего времени известные соли рассматриваемого пентадекапептида, что неожиданно является огромным преимуществом. В любом случае эти новые соли лучше, чем соли бепецина с различными аминами, щелочными и щелочноземельными металлами в соответствии с европейским патентом 0983300 и патентом США № 6288028, которые предрасположены к образованию полярного продукта деградации (вплоть до 10%, структура еще не определена). Следствием большей устойчивости также является большая биологическая активность, так как неповрежденное соединение представлено в организме в течение более длительного периода времени и доступно для более эффективной ресорбции.

#### Устойчивость на свету

Соединения такого типа очень чувствительны к ультрафиолетовому свету. Водный раствор Arg-ВРС (1 г/100 мл воды) при 20°C подвергали облучению ультрафиолетовым светом с длиной волны 253,7 нм и абсорбцию измеряли в диапазоне длин волн от 230 до 350 нм в течение периода 70 мин каждые 10 мин. Результаты представлены на фиг. 1 и подтверждают то, что соединение является устойчивым.

Новые соли бепецина, которые являются объектом данного изобретения могут быть использованы в качестве терапевтически активного вещества, которое превращается вместе с инертным фармацевтически приемлемым носителем в пригодную форму, такую как таблетки и капсулы, используют для лечения заболеваний и состояний, повреждений, ран, переломов костей и ожогов организма, а также вирусных инфекций, как определено ранее посредством фармакологических исследований.

Объектом изобретения также является пероральный фармацевтический состав, содержащий аминокислоты

кислотную соль солей бепецина, к которой примешаны различные добавки.

Фармацевтически приемлемые добавки, которые используются, являются веществами, обычно хорошо известными специалисту в данной области. Инертные вещества или фармацевтические добавки выбраны из следующих групп:

наполнители, такие как безводная лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, крахмал, ортофосфат кальция, карбонат кальция, мальтодекстрин, D-маннит, трегалоза и другие; связующие вещества, такие как: микрокристаллическая целлюлоза, гидроксилалкилцеллюлозы, повидон, сложные эфиры целлюлозы, крахмал или их смесь;

дизинтегранты, такие как крахмал, перекрестносшитая натрийкроскармеллоза, кросповидон, микрокристаллическая целлюлоза, натрийкарбоксиметилцеллюлоза и другие, в основном в количестве 1-10%;

стабилизаторы, такие как гидрокарбонаты щелочного металла и щелочно-земельного металла или выбранные сахара, предпочтительно гидрокарбонат натрия и D-маннит;

смазывающие вещества и скользящие вещества, используемые в таблетировании: тальк, стеарат магния, стеариновая кислота, стеарат калия и коллоидный диоксид кремния. Такие вещества обычно добавляют к другим ингредиентам в конечной фазе.

Сравнение устойчивости солей бепецина в растворах, имеющих различную кислотность, показывает, что соединение наиболее устойчиво в слегка кислотной, нейтральной или даже слегка щелочной среде, предпочтительно в диапазоне pH от 6,5 до 8,5. Это надлежащим образом должно быть принято во внимание при составлении фармацевтических составов, при получении гранулятов для таблетирования и капсулирования возможно добавлять немного щелочных веществ, таких как гидрокарбонаты и карбонаты щелочного металла и щелочноземельного металла, основные карбонаты и оксиды, такие как гидрокарбонат натрия, гидрокарбонат кальция и оксид магния, которые улучшают устойчивость. Добавление выбранных сахаров предотвращает реакцию Майяра.

Фармацевтические составы получают известными способами, такими как непосредственное смешивание, сухое гранулирование, влажное гранулирование или пульверизация раствора соли бепецина на инертные фармацевтические вещества при одновременном высушивании во встречном потоке теплого воздуха. К грануляту, полученному таким образом, добавляют другие ингредиенты, если необходимо, гомогенизируют и таблетуют или капсулируют общепринятым образом. В конечной фазе таблетки, капсулы или пастилки могут быть покрыты защитной пленкой, резистентной к активности желудочного сока, так что бепецин высвобождается не раньше чем в кишечнике.

Аминокислотный компонент в представленной новой соли является причиной большей гидрофобности активного вещества в этой форме. Вследствие этого обоснованно ожидать превосходящий перенос через биологические мембраны, что также обеспечивает производство трансдермального препарата - такого как крем, мазь или пластырь.

Трансдермальная система состоит из непроницаемого для активного вещества защитного слоя, чувствительного к давлению полимерного слоя, служащего в качестве резервуара для активного вещества, защитной фольги, которая перфорирована в нескольких местах для того, чтобы предоставить возможность проникновения активного вещества через нее, и внешней защитной фольги.

Соль бепецина может быть использована в форме раствора, клизмы, инъекции или также сухой инъекции. В этом случае в качестве растворителя используется буфер водного раствора с оптимальным значением pH между 6 и 8, предпочтительно между 7,0 и 7,5. Раствор может быть стерилизован тонкой фильтрацией через фильтр с порами 0,22 мкм или очень кратковременным нагреванием до 100°C. Сухая инъекция получена таким образом, что стерильный раствор, содержащий соль бепецина, буфер и консервант, заморожен в ампулах и лиофилизирован.

Раствор, предназначенный для глазных или назальных капель, получают посредством использования изотонического и изогидрического раствора со значением pH, варьирующимся от 7,0 до 7,5, который в добавление к активному веществу бепецину также содержит буфер и консервант и подвергается фильтрованию в стерильных условиях.

Суппозитории для ректального и вагинального использования получают посредством применения желатина, масла какао, природных или полусинтетических жиров, имеющих низкую температуру плавления, парафина, глицерина, полиэтиленгликолей с молекулярной массой от 1000 до 6000 в качестве основания, в которое добавляют водный раствор бепецина. Дополнительно добавляют эмульгаторы, антиоксиданты и консерванты.

Соли бепецина также могут быть использованы в форме крема, мази или геля. В этом случае использованы липофильная, гидрофильная или амфифильная жировая основа, основанные на натуральных, растительных или животных жирах и натуральных маслах, к основе которых также добавлены консерванты, красящие вещества, эмульгаторы, вода или буферные растворы и антиоксиданты.

Бепецин представляет собой соединение, которое действует при очень низких дозах. Терапевтические дозы для перорального использования будут варьироваться от  $10^{-5}$  до  $10^{-2}$  мг/кг массы тела, в зависимости от типа и тяжести заболевания. Обычная доза в таблетках, пастилках или капсулах будет варьироваться от 0,1 до не более чем 5 мг. Концентрации при местном использовании являются более высоки-

ми, варьирующимися от 0,001 до 0,5%. Определение оптимальной дозы является объектом оценки и испытания. Очень важным является то, что бепецин не демонстрирует никаких побочных эффектов или токсичности. На основании вышеприведенного и многочисленных благоприятных эффектов на организм существует также возможность его использования в форме биоактивной пищевой добавки при очень низких дозах, варьирующихся от 1 мкг до не более чем 0,1 мг ежедневно. В составах, полученных для этой цели, он также может быть комбинирован с витаминами, минералами и другими благоприятно действующими веществами.

В соответствии с изобретением другие индивидуальные активные вещества, которые улучшают главную активность бепецина или действуют синергически, также могут быть добавлены. Они представляют собой вещества из следующих групп:

вещества с антибиотической активностью, такие как гентамицин, азитромицин, ампициллин, цефалоспорины и

доксициклин, в частности в составах для местного применения, в которых желательно, чтобы противовирусная и антибиотическая активности были достигнуты одновременно. Такими примерами являются клещи, по отношению к которым намерение является двойным: предотвратить боррелии и клещевой энцефалит одновременно;

вещества с антиоксидантной активностью, такие как сухой экстракт зеленого чая, коэнзим Q<sub>10</sub>, идебенон, куркумин, абигенон, пикногенон и другие.

Особенный интерес представляет комбинация с коэнзимом Q<sub>10</sub> или убихиноном. Коэнзим Q<sub>10</sub> является очень эффективным антиоксидантом и акцептором свободных радикалов и может дополнительно быть использован для сердечных заболеваний, связанных со сниженным кровообращением, гипертензией и при признаках сердечной недостаточности. Недавно было показано, что куркумин также является важным антиоксидантом, который имеет сильную антиканцерогенную активность.

Исследование авторов изобретения продемонстрировало очень благоприятную активность новых солей бепецина в терапии неврологических заболеваний, например множественного склероза. Это воспалительное заболевание вызывает разрушение миелиновых оболочек вокруг аксонов в головном и спинном мозге. Нервные клетки обычно взаимодействуют посредством отправки электрических сигналов через нервные волокна, аксоны, где миелиновые оболочки являются изоляторами. В случае разрушения миелиновой оболочки проводимость электрических сигналов прерывается или сильно нарушается. При множественном склерозе иммунная система организма атакует и повреждает миелиновые оболочки. Эффективное излечение множественного склероза не известно. Существующая терапия направлена на улучшение функций после атак, предотвращая новые атаки, но обычно имеет нежелательные эффекты или плохо переносится.

Бепецин обладает противовоспалительной, реконструктивной, защитной и иммуномодулирующей активностью.

На основании фармакологического исследования предполагается высокий хороший терапевтический эффект бепецина на множественный склероз. Применение состава соли бепецин L-аргинин может быть пригодно во вспомогательном лечении вторичного повреждений и нарушений, вызванных инфекциями боррелиозом Лайма (L. Reik et al., *Neurology*, 46, 1989, 790-795) или сифилисом (D. Grey, *The Lancet*, July 12, 1986, 75-77). Во всех этих случаях миелиновые оболочки повреждены и повреждения в головном мозге различимы с МРТ.

Множественный склероз будет подвергаться лечению пероральными составами, содержащими соли бепецина в стабилизированной форме с дозами от 1 до 5 мг. С использованием составов бепецина не было связано никаких нежелательных или неблагоприятных побочных эффектов, и они также являются безопасными для длительного применения.

На основании фармакологических экспериментов на животных авторы изобретения полагают, что применение солей бепецина с основными аминокислотами в форме пригодных фармацевтических составов будет выгодным также для других неврологических заболеваний, таких как невропатия, миастения гравис и другие.

Бепецин имеет также очень благотворный эффект на реорганизацию коллатеральных кровеносных сосудов после тяжелого повреждения бедренных артерий.

Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано, но не ограничено, следующими примерами, предназначенными для разъяснения способа. Примеры 18-44 описывают эксперименты, проведенные для определения фармакологической активности бепецина. Их выполняли посредством использования различных экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*, широко используемых на практике и приведенных в литературных источниках. Во всех экспериментах бепецин был использован в форме соли с L-аргинином.

#### Краткое описание фигур

Фиг. 1 - иллюстрация устойчивости раствора бепецина при облучении ультрафиолетовым светом; абсорбции образцов с 1 по 7 измеряли по 10 мин на каждый;

фиг. 2 - иллюстрация активности бепецина на клетки В-16 меланомы;

фиг. 3 - иллюстрация эффекта бепецина на вирус клещевого энцефалита (ТВЕ):



А) одновременное применение  $10^2$  ТВЕ вируса (i.c.v.) и солевого раствора 0,9% NaCl (i.p.) без бепецина;

В) одновременное применение  $10^2$  ТВЕ вируса (i.c.v.) и бепецина 10 мкг/кг (i.p.), инфекционные симптомы происходят на значительно более поздней стадии;

С) применение бепецина 10 мкг/кг (i.p.) за 4 ч перед инфекцией с  $10^2$  ТВЕ вирусом (i.c.v.). Нет клинических признаков заболевания. Животных умерщвляли после 30 дней и часть гомогенизата головного мозга переносили новому животному; см.: D;

Д) одновременное применение гомогенизата головного мозга и новой инфекции с  $10^2$  вируса ТВЕ (i.c.v.). Нет признаков заболевания даже после 50 дней;

фиг. 4 -  $^1\text{H}$ -ЯМР спектры бепецина соли, записанные в  $\text{D}_2\text{O}$ :

А) спектр соли бепецин L-лизин (1:3),

В) спектр соли бепецин L-аргинин (1:2),

С) спектр соли бепецин L-орнитин (1:2);

фиг. 5 - иллюстрация коллатеральных кровеносных сосудов:

А) контрольную группу подвергали только местному погружению в солевой раствор в течение 1 мин - не были видны коллатеральные васкулярные сосуды;

В) тестовую группу подвергали погружению в бепецин в течение 1 мин - обильные коллатеральные васкулярные сосуды видны со всеми взаимосвязями.

### Примеры

Пример 1. Получение соли бепецин D-аргинин (1:2)

Бепецин трифторацетат (500 мг, 0,34 ммоль) растворяли в 25 мл воды. Аккуратно перемешивая, постепенно добавляли D-аргинин (212 мг, 1,22 ммоль) и перемешивали в течение дополнительных 15 мин. Значение pH раствора затем доводили до  $7,40 \pm 0,05$  разбавленной уксусной кислотой (50%) Раствор фильтровали до прозрачности и высушивали замораживанием. Лиофилизат растворяли в небольшом объеме воды и вносили в начало ВЭЖХ колонки (ID=2,2 см, h=25 см, сорбент Reprosil C18, 10 мкм), предварительно промытой и уравновешенной чистой водой. Элюирование повышенной концентрацией изопропанола в воде: в 30 мин от 0 до 5% изопропанола. Первые фракции, содержащие соли и примеси, выбрасывали. Собранную главную фракцию высушивали замораживанием. Получали 550 мг сухой соли, которая содержала два моля D-аргинина/1 моль пентадекапептида.

Аминокислотный анализ соответствует композиции:

2-Ala, 1-Val, 3-Gly, 4-Pro, 1-Leu, 2-Asp, 1-Glu, 1-Lys, 2-Arg.

MS (TOF MS ES+):  $M_1=1419,8$  (пентадекапептид +  $\text{H}^+$ )

$M_2=175,1$  (D-аргинин +  $\text{H}^+$ )

ИСПФ  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3275, 3057, 2958, 2872, 1628, 1533, 1448, 1394, 1315, 1244, 1204, 1161, 1096, 1044, 919, 875.

Специфическое оптическое вращение ( $c=1$  г/100 мл)  $[\alpha]_{\text{D}}^{28}=-154^\circ$ . ВЭЖХ чистота: 99,48%.

Пример 2. Получение соли бепецин L-аргинин (1:1)

Раствор с бепецин ацетатом и L-аргинином получали, как описано в примере 1. Значение pH раствора доводили до  $4,60 \pm 0,05$  с разбавленной уксусной кислотой (50%) и полученный раствор обрабатывали, как в примере 1. Получали 232 мг аморфного порошка, который содержал 1 моль L-аргинина в расчете на 1 моль бепецина.

Аминокислотный анализ соответствует композиции:

2-Ala, 1-Val, 3-Gly, 4-Pro, 1-Leu, 2-Asp, 1-Glu, 1-Lys, 1-Arg.

MS (TOF MS ES+):  $M_1=1419,8$  (пентадекапептид + H)

$M_2=175,1$  (L-аргинин + H)

ИСПФ  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3265, 3060, 2960, 2875, 1629 (CONH), 1534, 1448, 1394, 1312, 1243, 1202, 1160, 1043, 919, 873.

Специфическое оптическое вращение ( $c=1$  г/100 мл)  $[\alpha]_{\text{D}}^{28}=-119,0^\circ$ . ВЭЖХ чистота: 98,57%.

Пример 3. Получение соли бепецин L-аргинин (1:2), (сокр. Arg-BPC)

Бепецин ацетат (1 г, 0,705 ммоль) и L-аргинин (420 мг, 2,41 ммоль) растворяли в 4 мл воды (значение pH раствора составляло 8,92) и перемешивали 20 мин. Значение pH затем доводили до  $7,40 \pm 0,05$  разбавленной уксусной кислотой (50%). Этот раствор вносили в начало колонки ВЭЖХ (ID=2,2 см, h=25 см, сорбент: Reprosil C18, 10 мкм), предварительно хорошо промытой и уравновешенной чистой водой. Это элюировали постепенно возрастающей концентрацией изопропанола в воде: в течение 30 мин от 0 до 5% изопропанола. Фракции, содержащие соли и примеси, выбрасывали. Главную фракцию высушивали замораживанием. Получали 1,10 г белого аморфного порошка, легко растворимого в воде.

Аминокислотный анализ соответствует композиции:

2-Ala, 1-Val, 3-Gly, 4-Pro, 1-Leu, 2-Asp, 1-Glu, 1-Lys, 2-Arg.

MS (TOF MS ES+):  $M_1=1419,8$  (пентадекапептид +  $\text{H}^+$ )

$M_2=175,1$  (L-аргинин +  $\text{H}^+$ )

ИСПФ  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3271, 3057, 2958, 2875, 1632 (CONH), 1539, 1448, 1394, 1244, 1205, 1161, 1097, 1044,

919, 873, 652.

Спец. оптическое вращение ( $c=1$  г/100 мл)  $[\alpha]_D^{28}=-124,3^\circ$ . ВЭЖХ чистота: 99,54%.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр проиллюстрирован на фиг. 4/В.

Пример 4. Получение соли бепецин L-лизин (1:3), (сокр. Lys-BPC)

Бепецин ацетат (500 мг, 0,34 ммоль) и L-лизин (176 мг, 1,2 ммоль) растворяли в 3 мл воды и перемешивали в течение 20 мин. Раствор вносили в ВЭЖХ колонку и очищали, как описано в примере 3. Получали 283 мг белого аморфного порошка, легко растворимого в воде.

Аминокислотный анализ соответствует композиции:

2-Ala, 1-Val, 3-Gly, 4-Pro, 1-Leu, 2-Asp, 1-Glu, 4-Lys

MS (TOF MS ES+):  $M_1=1419,8$  (пентадекапептид +  $\text{H}^+$ )

$M_2=147,1$  (L-лизин +  $\text{H}^+$ )

ИСПФ  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3269, 3060, 2958, 2875, 1981, 1627 (CONH), 1532, 1447, 1393, 1315, 1241, 1203, 1160, 1008, 919, 873, 654.

Специфическое оптическое вращение ( $c=1$  г/100 мл)  $[\alpha]_D^{28}=-130^\circ$ . ВЭЖХ чистота: 99,47%.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр проиллюстрирован на фиг. 4/А.

Пример 5. Получение соли бепецин L-орнитин (1:2), (сокр. Orn-BPC)

Бепецин ацетат (500 мг, 0,34 ммоль) и L-орнитин (1,77 мг, 1,05 ммоль) растворяли в 5 мл воды и значение pH доводили до  $7,40 \pm 0,05$  с разбавленной уксусной кислотой. Этот раствор очищали на колонке для ВЭЖХ, как описано в предыдущем примере. Получали 412 мг белого аморфного порошка, легко растворимого в воде.

Аминокислотный анализ соответствует композиции:

2-Ala, 1-Val, 3-Gly, 4-Pro, 1-Leu, 2-Asp, 1-Glu, 1-Lys, 2-Orn

MS (TOF MS ES+):  $M_1=1419,8$  (пентадекапептид +  $\text{H}^+$ )

$M_2=170,1$  (L-Орнитин +  $\text{H}^+$ )

ИСПФ  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3269, 2958, 2875, 2162, 1636 (CONH), 1522, 1442, 1389, 1311, 1243, 1203, 1160, 1094, 1040, 911, 873, 654, 610

Специфическое оптическое вращение ( $c=1$  г/100 мл)  $[\alpha]_D^{28}=-137^\circ$ . ВЭЖХ чистота: 99,30%.

$^1\text{H}$ -ЯМР-спектр проиллюстрирован на фиг. 4/С.

Пример 6. Таблетки

Ингредиент:	мг/таблетка
Arg-BPC	1,00
Целлюлоза Avicel	20,04
Безводная лактоза	60,53
Гидрокарбонат натрия	2,25
Кросповидон	5,25
Коллоидный диоксид кремния	0,33
Стеарат магния	0,60
	90,00 мг

Пример 7. Таблетки, покрытые пленкой

Ингредиент:	мг/таблетка
Arg-BPC	2,00
Трегалоza	96,20
Гидроксипропилцеллюлоза	11,20
Гидрокарбонат натрия	2,60
Куркумин	5,00
Кроскармеллоза натрия	2,00
Стеарат магния	1,20
Кишечнорастворимое покрытие:	
Эудрагит S100	0,48
Гидроксид аммония, 1 моль/л	0,25
Триэтилацетат	0,24
Тальк	0,16
Вода	2,90

## Пример 8. Глазные капли

Ингредиент:	
Arg-ВРС	0,50 мг
Буфер ортофосфат натрия 0,05 моль/л, рН 7,4	85 мл
Хлорид натрия	0,44 г
Бензиловый спирт	0,20 мл
Доб. воды	100 мл

## Пример 9. Капсулы

Ингредиент:	мг/капсула
Lys-ВРС	1,0
Гидрокарбонат натрия	2,5
Моногидрат лактозы	80,6
Прежелатинизированный кукурузный крахмал	15,4
Стеарат магния	0,5
	100 мг

## Пример 10. Раствор для местного применения

Ингредиент:	г/100 мл
Инъекционная вода	20,00
Arg-ВРС	0,05
Глицерин	22,00
Хлорид бензалкония	0,02
Буфер ортофосфат натрия, 0,05 моль/л, рН 6,5	доб 100 мл

## Пример 11. Гель

Ингредиент:	г/100 г
Инъекционная вода	70,00
Arg-ВРС	0,20
Карбопол 974, Noveon®	1,00
Метил-п-гидроксibenзоат	0,18
Пропил-п-гидроксibenзоат	0,02
Гидроксид натрия 0,01 моль/л для доведения значения рН до 7,0	
Инъекционная вода доб.:	В общем 100 мл

## Пример 12. Крем

Липофильные ингредиенты 100 г крема: стеариновая кислота, цетеариловый и стеариловый спирт, насыщенные среднецепочечные триглицериды с каприловой и каприновой кислотой, силиконовое масло Dimeticon и цетеарил сульфат натрия 16,4 г в сумме расплавляли при 60°C.

Гидрофильные ингредиенты: к стерильно отфильтрованной чистой воде (70 г) добавляли пропиленгликоль (3 г) и консервант бутил-4-гидроксibenзоат (0,5 г), перемешивали и нагревали до 60°C, значение рН доводили до 6,5 посредством использования 0,1 молярного раствора гидроксида натрия. После этого добавляли гидрофильную фазу при перемешивании к липофильной фазе, охлаждали и перемешивали до достижения 30-35°C. В эту смесь добавляли антиоксидант ацетат токоферола (0,05 г), хорошо перемешивали и в заключение добавляли 10 г водного раствора, содержащего Arg-ВРС (0,1 г). Смесь хорошо перемешивали и наполняли в соответствующие контейнеры.

## Пример 13. Суппозитории

Ингредиент:	мг/суппозиторий
Arg-BPC	0,5
Вода	25,0
Глицерин	30,5
Масло какао	180,0
Метил-п-гидроксibenzoат	2,0
Полиэтиленгликоль ПЭГ 1000	61,0
Токоферол	1,0
	300 мг

## Пример 14. Диспергируемые в полости рта таблетки

Ингредиент:	мг/таблетка
Arg-BPC	0,5
StarLac®	48,9
Ацесульфам К	0,4
Стеарат магния	0,1
Коллоидный диоксид кремния	0,1
	50,0 мг

## Пример 15. Трансдермальный препарат - пластырь

Активные ингредиенты: Arg-BPC (5,0 мг) и доксоцилин (1,0 г) растворяли в смеси воды (10 г), моноэтилового эфира диэтиленгликоля (1,8 г), полиэтиленгликоля монолаурата (0,5 г) и диэтанолamina (0,2 г). Добавляли 25 г полимерного раствора геля VA. RTM. 2484 (Monsanto) и хорошо перемешивали. Раствор затем оставляли на 20 мин для деаэрирования. Затем его наносили на непроницаемую мембрану (полиэтиленовая пленка или алюминированная полиэтиленовая пленка), такую как 3M-Scotchpack 1006), и высушивали при 40-50°C. Этот слой затем покрывали пористой фольгой с контролируемым высвобождением вещества и защитной фольгой и разрезали на подходящий размер.

## Пример 16. Таблетки с пролонгированной устойчивостью

Предварительное составление:

Соль бепецин L-аргинин 1:2(1,0 г) и D-маннит (1,0 г) растворяли в 20 мл воды, стерильно фильтровали (0,22-мкм фильтр) и высушивали замораживанием. Полученный белый аморфный порошок содержит 50% соли бепецина.

Получение таблеток:

Ингредиент:	мг/таблетка
Предварительно составленный Arg- BPC (50%)	2,0
D-маннит фарм. степень (пепарлитол 300DC)	70,0
Целлюлоза Авицел (PH 102)	60,6
Гидрокарбонат натрия	1,3
Коллоидный диоксид кремния (Aerosil 200)	0,7
Стеарат магния	1,0
	100 мг

Тест устойчивости:

Таблетки, полученные в соответствии с описанным способом, инкубировали при -15°C, +25°C и +50°C/ОВ 65% и анализ бепецина осуществляли со способом ВЭЖХ. Продолжительность инкубирования: 18 месяцев.

Температура: -15°C, +25°C, +50°C.

Анализ (ВЭЖХ) бепецина: 99,8, 96,6, 92,35%.

Используя способ экстраполяции, можно сделать вывод, что полученные таблетки будут ус-

тойчивы при комнатной температуре по меньшей мере 2 года.

Пример 17. Биоактивная пищевая добавка с бепецином шипучие таблетки

Ингредиент:	мг/таблетка
Соль бепецина	0,5
Глюкоза	150,0
Фруктоза	29,0
Витамин С	50,0
Гидрокарбонат натрия	30,0
Природный аромат	0,5
	260 мг

Пример 18. Активность бепецина в NO-системе

Оксид азота (NO) играет роль сигнальной молекулы в эндотелиальных и нервных клетках и также для так называемой уничтожающей молекулы, которая активируется иммунными клетками.

В целом, по-видимому, как при избытке, так и при недостатке NO, NO вносит большой вклад в формирование различных отклонений и нарушений в организме, таких как гипертензия, ангина, импотенция, циркуляторный и септический шок, сердечные недостаточности, аритмии, инсульт, воспалительные процессы, адгезия и агрегирование тромбоцитов и лейкоцитов, плохое заживление ран и ожогов, повреждение мышц, сухожилия, связки и кости, желудочно-кишечные повреждения, диабет, панкреатит, циркуляторный и септический шок, эндотелиальные нарушения, пороки сердца и болезнь Паркинсона.

Бепецин обладает характерным свойством воздействия на высвобождение и нормализацию NO-уровня и противодействия нарушению после применения блокирующих NO веществ, таких как L-NAME и против побочных эффектов применения предшественников NO, таких как L-аргинин. Эта активность бепецина по отношению к NO-системе в некоторой степени разъясняет очень широкий спектр его фармакологической активности.

Посредством использования способов, описанных в литературе: J. Physiol. Paris, 1007, 91, 139-49; Regul. Pept., 2009, 156 (1-3), 83-89; J. Pharm. Sci., 2008, 108 (1), 7-1; J. Clin. Exp. Cardiology, 2012, 3, 201, Regul. Pept. 2013, 181C, 50-66, Med. Sci. Monit. 2006, 12, 36-45 и Eur. J. Pharmacol., 1997, 332 (1), 23-33, авторы изобретения экспериментально продемонстрировали, что бепецин может вызвать "in vitro" NO-высвобождение и противодействовать эффектам L-аргинина и L-NAME. Это таким образом нормализует нарушения кровяного давления, которые, следовательно, вызваны посредством NO.

Бепецин также защищает против инфаркта миокарда с изопренилином, и аритмий, вызванных метилдигоксидом (6 мг/кг i.v. или i.p.), при использовании в диапазоне доз от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела, парентерально или перорально. Это предотвращает усугубление повреждений, вызванных NO-блокатором L-NAME. Бепецин противодействует нарушениям, вызванным слишком высокими и слишком низкими величинами NO и восстанавливает нормальные функции NO-системы.

Бепецин обычно обладает модулирующим эффектом в NO-системе при использовании в дозах, варьирующихся от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела, парентерально или перорально. Это предотвращает усугубление повреждений, вызванных NO-блокатором L-NAME.

Пример 19. Эффект заживления ран

Посредством использования способов, подробно описанных в литературе: J. Physiol. Pharmacol., 2009, 60 (Suppl. 7), 191-196; J. Orthop. Res., 2010, 28, (9), 1155-1161; Burns, 2005, 31 (3), 310-315; Bone, 1999, 24 (3), 195-202; Surg. Today, 2007, 37 (9), 768-777, авторы изобретения обнаружили, что бепецин заметно увеличивает заживление указанных ниже заболеваний из-за улучшения им ангиогенеза и выработки коллагена:

кожные надрезы;

глубокие ожоги кожи;

различные анастомозы в виде кишечных ран;

диабетические раны;

различные фистулы;

различные поперечные разрезы тканей, в частности связок, сухожилий, мышц и поперечный разрез нерва;

переломы костей, включая одновременное повреждение мягкой ткани;

корнеальные раны, даже с полной абразией эпителия или корнеальной язвой.

На основании этих результатов и сходства между процессами заживления у крыс и людей бепецин будет успешно использован в заживлении ран, ожогов и переломов костей у людей.

Пример 20. Эндотелиальная защита, ангиогенез, тромбоз и нарушения свертываемости

На основании подробно рассмотренных доказательств (J Physiol Paris. 1993; 87, 313-27, Inflammopharmacol 2006; 14, 214-21, Curr Pharm Des 2010; 16, 1224-34, J. Physiol. Pharmacol., 2009, Dec, 60, Suppl,

7, 161-5, *Thromb. Res.*, 2012, May, 129 (5), 652-9; авторы изобретения доказали, что бепецин влияет на активности после потери васкулярной целостности. Бепецин восстанавливает поддержание эндотелиальной целостности после внутрижелудочной инстиляции абсолютного спирта (т.е. он проявляет цитопротекторный эффект), и также бепецин проявляет эффект быстрого заживления ран как при желудочно-кишечных повреждениях, так и при повреждениях снаружи желудочно-кишечной ткани. Авторы изобретения, следовательно, продемонстрировали, что после анастомоза брюшной аорты у крыс, применение бепецина предотвращает формирование обтурационного тромба, по меньшей мере в течение 24 ч, и при введении при наличии уже сформированного тромбоза и васкулярной обструкции, быстро разрушает уже сформированный обтурационный тромбоз вместе с восстановлением функционирования нижних конечностей.

В других экспериментах, проведенных на крысах после ампутации, авторы изобретения продемонстрировали, что бепецин последовательно противодействует пролонгированному кровотечению и тромбоцитопении, а также аспири-, варфарин- и гепарин-продолгированному кровотечению. Бепецин вводили внутривенно, внутривенно или внутривенно (10 мкг/кг, 10 нг/кг массы тела).

Важное обнаружение для предотвращения и устранения уже сформированного сгустка, пролонгированного кровотечения и тромбоцитопений, вызванных аспири-, варфарин- и гепарин-продолгированными кровотечениями, а также тромбоцитопений, вызванных огромными дозами гепарина (250 мг/кг, 25 мг/кг, 10 мг/кг i.v.), варфарина (1,5 мг/кг i.g. раз в сутки в течение 3 последовательных дней), аспирина (0,1 г/кг i.g. (раз в сутки/3 последовательных дня или 1,0 г/кг i.p. один раз), заключалось в том, что бепецин не воздействует на параметры коагулирования сам по себе.

Как следствие, бепециновая терапия может быть распространена на все релевантные состояния, где имеет место или тромбоз или нарушения крови. Бепецин также может являться первоначальной терапией для состояний, где повреждена функция egr-1 и/или паВ2.

#### Пример 21. Формирование адгезии

Наши предшествующие исследования продемонстрировали характерный эффект бепецина на воспалительные процессы и их последствия. В добавление, авторы изобретения также продемонстрировали терапевтический эффект бепецина против формирования адгезии (слипания) и в защите от развития адгезий (или по меньшей мере в значительном снижении).

Несколькими пригодными способами (т.е. удаление хирургическим путем париетальной брюшины у крыс в соответствии со способами, описанными в *Gastroenterology*, 2010, 138, (5, Suppl. 1) 753; подвздошно-подвздошный анастомоз в соответствии с *Surg. Today*, 2007, 37 (9), 768-777; еюно-подвздошный анастомоз в соответствии с *Dig. Dis. Sci.*, 2009, 54 (10), 2070-2083), авторы изобретения продемонстрировали, что бепецин в целом снижает формирование адгезий (как макроскопически, так и микроскопически), связанных с функциональными улучшениями (т.е., усиление анастомоза, прибавление массы животного до нормального уровня). Бепецин использовали в обычном диапазоне низких доз от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела парентерально, перорально или местно.

Принимая во внимание существующее соответствие между животными моделями и состояниями в человеческом организме, авторы изобретения заявляем терапевтическое использование бепецина в этих нарушениях.

#### Пример 22. Иммуномодуляция

Иммуномодуляция (в частности в качестве функционирования жизнеспособных макрофагов), индуцированная природными или синтетическими веществами, считается хорошей альтернативой предотвращению и лечению как инфекционных, так и неопластических заболеваний.

Посредством использования способа, описанного *J. Physiol. Pharmacol.*, 2009, 60, Suppl. 2, 69, определяли "in vivo" эффективность бепецина для увеличения активности макрофагов в качестве главных иммунологически активных клеток у мышей (т.е. повышенная подвижность макрофагов, восстановление М/Р соотношения между моноядерными и полиядерными лейкоцитами). Мышей инъецировали ежедневно с дозой 50 мкг или 100 мкг/кг массы тела (i.p.) бепецина в течение 3 последовательных дней.

Активированные макрофаги индуцировали выработку и высвобождение факторов, регулирующих функцию В-, Т- и НК-клеток, которые важны для иммуномодулирующего действия. Это иммуномодулирующее действие бепецина будет преимущественно использовано для содействия терапии нескольких инфекционных и неопластических заболеваний.

#### Пример 23. NSAID - Нестероидные противовоспалительные лекарственные средства

Как уже обнаружено, бепецин обладает сильным действием против всех воспалительных параметров и одновременно значительно улучшает лечение и предотвращает поражения и повреждения, особенно после применения NSAID. Парацетамол, аспирин, диклофенак, ибупрофен и индометацин индуцируют многочисленные побочные эффекты, описанные в литературе: *J. Physiol. Pharmacol.*, 2010, 61 (2), 241-250; *Gastroenterology*, 2010, 138, 5, Suppl. 1, S-369. Это, в частности, доказано формированием поврежденный желудка, кишечника, печени и головного мозга, пролонгированного кровотечения и различных поведенческих нарушений (включая конвульсии). Этому всему противодействовало применение бепецина парентерально или перорально.

Помимо повышенного кровотечения бепецин также эффективно противодействует тромбоцитопе-

нии после применения аспирина (1 г/кг, i.p.) или диклофенака (12,5 мг массы тела/кг, i.p.), все еще в очень низких дозах, варьирующихся от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела с введением парентерально, внутривенно или в питьевой воде.

Бепецин противодействует побочным эффектам NSAID. Кроме того, принимая во внимание благотворные эффекты на острое и хроническое воспаление (в которых также используются NSAID) наилучшим способом будет использование бепецина отдельно без NSAID.

#### Пример 24. Анафилаксия и анафилактоидная реакция

При введении парентерально яичный белок и декстран индуцируют тяжелую анафилактоидную реакцию у крыс (B. N. Halpern, Histamine, Ciba Found. Symp., J. и A. Churchill Ltd, London, 1956, 92-123 и H. Selye, Endocrinology, 1937, 21, 169). Природные и синтетические полимеры могут индуцировать существенное эндогенное высвобождение гистамина.

Анестезированные животные получали внутривенные растворы декстрана с концентрациями 6, 10, 20, 40, 60, 80, 90% и/или раствора яичного белка (1 мл/крыса или 0,15 мл/мышь) в их хвосты. Выраженная эдема появлялась на лице, верхней и нижней губах, морде, лапах и мошонке (представлено с чрезмерным цианозом). Животные имели недостаточное дыхание и имело место несколько случаев смертей после применения декстрана и/или яичного белка. В противоположность этому, бепецин с режимом введения (10 мкг, 1 мкг, 10 нг, 10 пг/кг) эффективно предотвращает как анафилактоидные реакции и сосудистый коллапс, так и заметно улучшает действие антигистаминных средств, таких как клемипрамин (20 мг/кг) и циметидин (10 мг/кг), которые отдельно были лишь слабо эффективны или даже неэффективны.

Таким образом, принимая во внимание тот факт, что используемые модели являются обычными моделями точного имитирования человеческой анафилактоидной реакции, обеспечен благотворный эффект бепецина при анафилактических состояниях.

#### Пример 25. Кортикостероиды

Кортикостероиды, в частности, вводимые систематически, могут привести в результате к тяжелым нарушениям (т.е. иммуносупрессии, плохому заживлению ран, и т.д.). Посредством использования способа, описанного в литературе: Med. Sci. Monit., 2010, 16 (3), BR 81-88; и Burns, 2005, 31 (3), 310-315, было обнаружено, что бепецин полностью противодействует неудавшемуся с кортикостероидами заживлению ран (т.е. 6-альфа-метилпреднизолон, 1 и 10 мг/кг массы тела, i.p. у мышей и крыс), эффект систематически проявлялся в систематическом подвергнутом кортикостероиду повреждении мышц с разрывом, глубокими ожогах кожи, рассеченном ахиллово сухожилии или медиальной коллатеральной связке, различных фистулах, дефектах желудка, толстой кишки и кожи или кортикостероидной иммуносупрессии (проверка клеток селезенки).

Бепецин использовали в диапазоне доз от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела, парентерально, перорально или местно, в виде тонкого слоя крема (т.е. 1 мкг/г нейтрального крема).

Таким образом, представляя значительное совмещение с условиями для человека, бепецин может быть использован в устранении нарушений, индуцированных применением кортикостероидов, и/или при некоторых показаниях даже вместо кортикостероидов.

#### Пример 26. Регулирование гипертензии, гипотензии и кровяного давления

Эксперименты, проведенные, как описано в: J. Physiol. Paris, 1993, 87 (5), 313-327 и Eur. J. Pharmacol. 1997, 332 (1), 23-33, продемонстрировали, что бепецин не имеет никакого эффекта на кровяное давление у животных с нормальным кровяным давлением, но он мог как снижать повышенное кровяное давление, так и повышать сниженное кровяное давление. Конкретно, бепецин снижает повышенное кровяное давление у гипертензивных животных с гипертензией Гольдблатта с двумя почками - 2K1C - или с одной почкой - 1K1C -; крыс кормили питанием или с высоким содержанием фруктозы (80%) или с высоким содержанием соли (15%) в течение продолжительного периода; крыс обрабатывали с NOS-блокатором L-NAME (5 мг/кг, i.v.); или огромной дозой KCl i.p. Бепецин действует против гипотензии, т.е. нормализует кровяное давление у крыс с хронической сердечной недостаточностью и повышенным значением сывороточного эндотелина-1, доксорубин-индуцированной гипотензией (2,5 мг/кг, i.p. 6 раз в течение 15 дней) и также обращенной хронической сердечной недостаточностью. Также, бепецин противодействует гипотензии у крыс, подвергаемых лечению с NO-предшественником L-аргинина (100 мг/кг i.v.). Бепецин вводили регулярно или профилактически, или терапевтически.

Бепецин в дозах от 10 нг до 10 мкг/кг, парентерально или перорально, вызывал значительное снижение или даже исчезновение других повреждений и нарушений, отличных от представленных в этих процессах.

При гиповолемическом шоке бепецин восстанавливал кровяное давление и предотвращал иной летальный исход. Он может также увеличивать объем потери крови, который может в ином случае вызвать смерть.

Учитывая значительное подобие между моделями нарушений кровяного давления и человеческими нарушениями, бепецин подтвержден в терапии нарушений кровяного давления, гипертензии и гипотензии и родственных нарушениях.

#### Пример 27. Спирт - острая и хроническая интоксикация, обезболивающие

Исследование эффективности бепецина при интоксикации спиртом выполняли с применением спо-

собов, описанных в *Curr. Pharm. Des.*, 2010; 16 (10), 1224-1234; *J. Physiol. Pharmacol.*, 2009, 60 (Suppl. 7), 177-181; *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, 364 (1), 23-31; *Life Sci.*, 1994, 54, (5), PL68; *Dig. Dis. Sci.*, 1997, 42 (5), 1029-1037.

Бепецин в дозах, варьирующихся от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела, парентерально или перорально, предотвращал и ингибировал эффект острой интоксикации спиртом, абстиненцию и острые и хронические повреждения желудка и печени, а также портальную гипертензию в результате или острого потребления спирта или продолжительного хронического питья спирта. Аналогично, бепецин противодействует симптомам абстиненции у зависимых от морфина мышей. В добавление, схожим с налоксоном (10 мг/кг s.c.) образом бепецин противодействует анестезирующему действию морфина (16 мг/кг s.c.).

Если в качестве прототипа брали спирт, бепецин соответственно действует против эффектов пропофола, тиопентала и кетамина. Он снижал эффект как анестезии, так и катаlepsии (т.е. фентанил, де-гидробензперидол).

Так как потребление спирта у людей также продуцирует подобные эффекты, бепецин может быть использован при острой и хронической интоксикации спиртом и симптомах абстиненции (также, например, морфином и подобными веществами), и также с анестезирующими средствами для модулирования их анестезирующего эффекта.

Пример 28. Активность бепецина в отношении опухолей

Общепринятая модель для исследования экспериментальных опухолей содержит оценку количества метастазов карциномы и меланомы B-16 у мышей. Эти экспериментальные опухоли обладают значительным подобием с опухолями у людей.

Асцитная опухоль Эрлиха (EAT) растет во всех линиях мышей и общепринято используется в этих экспериментах.

Мыши, инфицированные с опухолевыми клетками EAT, вживали максимум в течение 25 дней. Предварительное инкубирование мышей с бепецином (2 мкг/мл) значительно продлеvalo выживаемость животных, особенно к концу наблюдения (45 дней). Бепецин также предотвращает возникновение нейтропении, снижает ретикулоциты и улучшает значения гемоглобина после применения циклофосфамидного цитостатика.

#### Эксперименты *in vitro*

Активность в отношении клеток меланомы исследовали в клеточной культуре человеческой меланомы в RPMI.

Среду 1840 дополняли ортофосфатным буфером и антибиотиками. Клеточную культуру выращивали в инкубаторе при 37°C и влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. К выросшей клеточной культуре добавляли бепецин с концентрациями 2 пг/мл, 2 и 10 нг/мл, также отдельно в комбинации с васкулярным эндотелиальным фактором роста (VEGF - 10 нг/мл) в течение периода 48 ч. За клеточной морфологией наблюдали посредством светового микроскопа и проточной цитометрии. После добавления бепецина к клеточной культуре плотность меланоцитных клеток была значительно снижена. В добавление, клеточный фенотип был изменен с круглых меланоцитных клеток на веретеннообразные эпителиальные клетки с тонко сформированным клеточным переплетением. Наиболее выраженные результаты были видны при концентрации бепецина 10 нг/мл. Подобные изменения также наблюдали в случае клеток сперва стимулированных VEGF и впоследствии с бепецином, фиг. 2.

Анализ проточной цитометрией продемонстрировал, что при концентрации 2 пг/мл бепецина количество клеток в S-фазе было снижено на 20% по сравнению с контролем, и при концентрациях 2 и 10 нг/мл бепецина на 55%.

Анализ Вестерн-блот выявил, что бепецин действовал антимитогенически посредством ингибирования митоген-активированной белковой киназы (MAPK), реагирующей на фактор VEGF.

Бепецин обладает явно выраженным противоопухолевым потенциалом. Принимая во внимание подобность между животными моделями и человеческими условиями и благотворные результаты, полученные как в *in vivo*, так и в *in vitro* экспериментах, бепецин будет эффективным в противоопухолевой терапии. Он также пригоден для уменьшения побочных эффектов цитостатиков.

Пример 29. Повреждения желудочно-кишечного тракта

Способы и материалы, описанные в многочисленных публикациях (*Curr. Pharm. Des.*, 2010, 16 (10), 1224-34; *J. Physiol. Pharmacol.* 2009, 60 (Suppl. 7), 107-114; *Dig. Dis. Sci.* 2008, 108 (11), (7-17); *Dig. Dis. Sci.* 2009, 54 (1) 46-56), использовали для определения терапевтической активности бепецина в дозах, варьирующихся от 10 нг до 10 мкг/кг (i.p., i.g.) по сравнению со стандартными образцами в нескольких экспериментальных моделях язвы (например, 24-часовое стресс-ограничение, цистеамин подкожно или ректально, инстилляция 96% этанола в желудок, NSAID-повреждения, DNFB (динитрофторбензол) повреждения, рефлюксный эзофагит в предварительном, совместном или последующем лечении. Во всех моделях бепецин был успешно использован парентерально или перорально.

Бепецин эффективно ингибировал возникновение ран и ускорял терапию существующих ран во всех моделях.

Учитывая значительное подобие с человеческими нарушениями, бепецин может быть успешно применен в терапии всех повреждений желудочно-кишечного тракта.



### Пример 30. Калий-гипокалиемия и гиперкалиемия

Калий имеет ключевое значение для нормального функционирования сердечных гладких мышц, пищеварительного тракта, скелетных мышц и нервов. Нормальная концентрация калия очень важна для сердечного ритма, таким образом, как слишком низкая концентрация (гипокалиемия), так и слишком высокая концентрация (гиперкалиемия) индуцируют нарушения сердечного ритма и многочисленные другие отклонения в организме.

Посредством применения способов, описанных в *J. Clin. Exp. Cardiol.* 2012, 3, 201; *Regul. Pept.*, 2013, 181C, 50-66, был применен фуросемид (100 мг/кг, i.p.) и затем после 90-150 мин наблюдали за продолжительностью PR, RR, QRS, QT интервалов, P, R, S, T волнами и их амплитудами электрокардиографически; дополнительно авторы изобретения анализировали возникновение AV блокирования, преждевременных желудочковых сокращений, желудочковой тахикардии. Несмотря на представленную гипокалиемию, все режимы введения бепецина (10 мкг/кг и 10 нг/кг, i.p. и i.g.) поддерживали синусовый ритм, не имели преждевременных желудочковых сокращений, желудочковой тахикардии, AV блокирования, не имело место удлинение интервалов и волн без снижения в амплитуде. Бепецин вводили 90 мин после фуросемида (с гипокалиемией, при этом имела место 3<sup>бн</sup> степень AV блокирования и/или желудочковой тахикардии). В пределах 5-10 мин режимы введения бепецина нормализовали волны P, R, S, T, продолжительность интервала PR, RR, QRS, QT, R, S, T амплитуду волны, общее AV блокирование и прекращали желудочковую тахикардию.

Используя способы, описанные ранее в *J. Pharmacol. Sci.*, 2007, 104 (1), 7-18; *J. Pharmacol. Sci.*, 2006, 102 (3), 269-277, была продемонстрирована способность бепецина к полному противодействию чрезмерной дозе KCl (интраперитонеальная (i), внутрижелудочная (ii), in vitro (iii)). Таким образом, бепецин может быть пригоден в качестве первоначальной терапии для нормализования всех нарушений, которые появляются вместе с проявлением гипокалиемии и гиперкалиемии.

### Пример 31. Кальций-гиперкальциемия

Кальций играет важную роль в организме, так как он действует на клетки сердечной мышцы, кровеносные сосуды и нейроны. Наиболее частой причиной слишком высокого уровня кальция - гиперкальциемии - является первичный гиперпаратиреоз, и второй причиной является злокачественность и гранулематоз. Гиперкальциемия может привести в результате к различным нарушениям, таким как гипертензия, кальцификация мягких тканей и роговицы глаза, нефролитиаз и пептическая язва.

Патофизиологическая кальциемия может быть вызвана заболеваниями, которые увеличивают активность остеокластов и костную реабсорбцию, которую не могут сопровождать почки. Это также может произойти также при чрезмерной дозе витамина D и при использовании заменителей кальция - антацидов и тиазидных диуретиков. Очень широко распространенной причиной является частое применение блокаторов кальциевого канала для пациентов с гипертензией.

Было продемонстрировано, что бепецин является очень эффективным при гиперкальциемии, противодействуя эффекту чрезмерной дозы CaCl<sub>2</sub>. Подобным образом, бепецин может противодействовать эффектам чрезмерной дозы блокаторов кальциевого канала.

Чрезмерная доза кальция и, в частности, продолжительная гиперкальциемия индуцируют острый панкреатит и укорачивание QT<sub>C</sub> интервала и удлинение PQ интервала у крыс. Крысы получали раствор CaCl<sub>2</sub> (200 мг и 400 мг/кг, i.p.). Непрерывно регистрировали ECG и K, Na, Cl, амилазу, креатинкиназу и LDH (при 5, 10, 15, 25 и 60 мин) и острый панкреатит при 60 мин определяли, как описано в *Dig. Dis. Sci.*, 1996, 41(7), 1518-1526; *Regul. Pept.*, 2009, 156 (1-3), 83-89; *J. Pharmacol. Sci.*, 2004, 95 (1), 19-26. Бепецин (10 мкг/кг, i.p.) вводили также профилактически за 30 мин перед CaCl<sub>2</sub>.

Крысы получали болюс верапамила (40 мг/кг, i.p.). Бепецин (10 мкг/кг и 10 нг/кг, i.p.) вводили за 30 мин перед верапамилем (предварительное лечение) или в виде последующего лечения через 5 мин после.

Бепецин противодействовал последствиям тяжелой гиперкальциемии, элиминировал как укорачивание QT<sub>C</sub> интервала, так и удлинение PQ интервала и противодействовал иным образом тяжелому острому панкреатиту и снижению значению сывороточной амилазы.

После 5 мин верапамил индуцировал брадикардий (200-230/мин) вместе с 2<sup>ой</sup> степенью атриовентрикулярной блокады, продолжавшиеся в течение 30-45 мин. С бепецином синусовый ритм был сохранен или восстановлен (в терапевтическом применении атриовентрикулярная блокада также была элиминирована).

Эксперименты продемонстрировали, что бепецин предотвращает или восстанавливает все последствия гиперкальциемии. Таким образом, бепецин может быть пригоден в качестве первоначальной терапии для нормализования всех нарушений, которые появляются вместе с проявлением гиперкальциемии.

### Пример 32. Влияние на миастенический синдром

Миастенический синдром, проявляемый в повышенной мышечной релаксации с огромным количеством различных лекарственных средств, который, как известно, ухудшает миастению гравис, индуцировали в соответствии с *Acta Neurol. Scand., Suppl.*, 1984, 100, 39-47, используя интраперитонеальное введение чрезмерной дозы сульфата магния. Самцы и самки крыс с массой тела 200-300 г, которые получали сульфат магния (500 мг/кг массы тела, i.p.), представляли выраженную миастению, уже после 5 мин

(прогрессирующая слабость, изнеможение, слабость в мышцах), прогрессирующую в полную неподвижность. Бепецин применяли за 15 мин перед или одновременно с сульфатом магния (10 мкг/кг и 10 нг/кг массы тела, i.p.), и он полностью противодействовал нарушениям сульфат магния, и все животные были обычно активными.

Тесты на беговой дорожке выявили, что после применения бепецина для нормальных крыс их результаты улучшались и они были способны бежать намного дольше, чем раньше.

Таким образом, в целом, бепецин может быть пригоден в качестве первоначальной терапии для нормализования всех нарушений, которые появляются в качестве миастенического синдрома, и, в частности, для противодействия всем нарушениям, которые появляются вместе с терапией с магнием. Подобным образом, бепецин может являться первоначальной терапией для улучшения функционирования скелетной мышцы в целом.

Пример 33. Влияние на нейромышечные и невропсихиатрические нарушения

Дофаминовая система общепринято считается существенной для моторных функций (J. Neural. Transm. 2010 Dec; 117(12): 1359-69). С использованием предварительно описанных способов в Life Sci. 2001 Mar. 9; 68 (16), 1905-12. J. Physiol. Paris. 2000 Mar-Apr; 94(2), 105-110 было продемонстрировано, что бепецин может сильно взаимодействовать с дофаминовой системой, особым образом, обеспечивая то, что он противодействует последствиям блокирования дофаминовых рецепторов, катаlepsии и соматосенсорным нарушениям, индуцированным различными нейролептиками, такими как галоперидол, флуфеназин и клозапин, истощение дофаминовых везикул, нигростриарное дофаминовое разрушение, индуцированное нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТР). Бепецин сильно улучшал МРТР-повреждаемую соматосенсорную ориентацию и снижал МРТР-индуцированную гиперактивность, и, что наиболее важно, МРТР-моторные отклонения (тремор, акинезия, катаlepsия - в ином случае сильно выраженная в солевом контрольном растворе), приводя к почти полному устранению в ином случае обычно летального течения заболевания при лечении с МРТР в контролях.

Как упомянуто выше, бепецин сильно улучшает мышечное заживление после мышечного рассечения или контузии и заживление нерва после рассечения нерва без или с анастомозом. Как следствие, это может означать, что бепецин может также быть пригоден для улучшения нарушения нервномышечного соединения и передачи сигнала от нерва к мышце.

На самом деле бепецин может быть использован для улучшения нарушений мышечных функций в целом. Принимая во внимание общую значимость упомянутых дофаминовой и серотининовой систем в животных моделях и человеческих нарушениях, бепецин может быть использован для соответствующих невропсихиатрических нарушений, в частности нарушений, связанных с дофаминовой и/или серотининовой системами.

Пример 34. Инсулин - диабеты

Используя процедуры, описанные ранее в Skin. Pharmacol. Physiol. 2006, 19(5), 266-274, J. Physiol. Paris, 1999 Dec; 93(6), 501-4, бепецин, введенный местно, может значительно увеличить заживление кожных ран у диабетических животных. Дополнительно было продемонстрировано, что бепецин ингибирует развитие аллоксан-индуцированной язвы, гипертензии, индуцированной потреблением фруктозы, и инсулиновую резистентность. Подобным образом, бепецин (10 мкг/кг), примененный (i) внутрибрюшинно или (ii) внутривентриально, непосредственно после инсулина, в качестве пептида против язвы, может кроме язвы желудка систематически противодействовать всем инсулиновым (избыточная доза 250 МЕ/кг i.p.) нарушениям и смертельному исходу (т.е. пароксизм (в конечном счете, смертельный), тяжело разрушенным нейронам в коре головного мозга и гиппокампе, гепатомегалии, жировой печени, разрушению гликогена печени с глубокой гипогликемией. Таким образом, успех бепециновой терапии может указывать на потенциальную роль бепецина в контроле инсулина, и бепецин может влиять на один или более являющихся причиной процессов после избыточного применения инсулина, таким образом, его можно применять для контроля различных нарушений у диабетических пациентов, и в частности для (неправильного) применения инсулиновой терапии.

Пример 35. Противовоспалительная активность, боль и температура

На основании доказательства, подробно рассмотренного (J. Physiol. Paris. 1993; 87, 313-27, Inflammopharmacol. 2006; 14, 214-21, Surg. Pharm. Des. 2010; 16, 1224-34), было доказано, что бепецин снижал высвобождение воспалительных медиаторов (т.е. миелопероксидазы, лейкотриена В<sub>4</sub>, тромбоксана В<sub>2</sub>) как *in vitro*, так и *in vivo*. Бепецин успешно противодействовал нескольким моделям острого, неспецифического воспаления (т.е. каррагинин, терпентин, ватный тампон) также DNFB-повреждению. Кроме того, бепецин действует против снижения (т.е. водный иммерсионный тест) и увеличения (индуцированного дрожжами) температуры. Соответственно бепецин противодействовал воспалительной боли (уксусная кислота) и невоспалительной боли (MgSO<sub>4</sub>). Кроме того, бепецин увеличивает болевой порог в каррагининовом тесте у крыс и проявляет антигиперболевого эффект в тесте Рэндалла-Селитто.

В случае рассеченного седалищного нерва без и с анастомозом бепецин сильно снижает невропатическую боль.

Эффект бепецина на хронические воспалительные повреждения, такие как адьювантный артрит (индуцированный у животных с адьювантом Фрейнда), и нестероидных противовоспалительных агентов

(NSAIA), индуцировавших желудочно-кишечные повреждения, одновременно исследовали у крыс, и он являлся очень убедительным.

В лечении сильно развитого адьювантного артрита, преимущественный эффект бепецина является очевидным уже после 2 недель лечения и он мог быть хорошо виден даже после одного года после применения.

Соответственно бепецин может быть использован в качестве первоначальной терапии для снижения негативных последствий острого и хронического воспаления для нормализования температуры тела, и в особенности для снижения боли.

Пример 36. Эффект на повреждение нерва

Используя способы, предварительно описанные в Regul. Pept., 2010 Feb 25; 160(1-3), 33-41, было продемонстрировано заживление рассеченного седалищного нерва у крыс и улучшение, достигаемое посредством применения бепецина (10 мкг/кг, 10 нг/кг), применяемого вскоре после повреждения (внутрибрюшинно/внутрижелудочно/местно) в месте анастомоза. Улучшение было продемонстрировано клинически (аутономия), микроскопически/морфометрически и функционально (EMG, один или два месяца после повреждения, восстановление хождения с еженедельными интервалами). Подверженные лечению с бепецином крысы проявляли более быструю аксонную регенерацию: гостоморфометрически (повышенная плотность и размер волокон, эпинеуральная и перинеуральная регенерация, увеличенный диаметр миелинизированных волокон, толщина миелинового слоя, количество миелинизированных волокон в расчете на плотность), электрофизиологически (повышенные двигательные действия) и функционально (улучшенный фактор SFI).

Таким образом, бепецин заметно улучшал заживление седалищного нерва у крыс. Принимая во внимание отмеченную подобность между экспериментальными моделями и человеческой патологией, эти обнаружения пригодны практически в терапии различных повреждений нерва.

Пример 37. Соматосенсорные нейроны, повреждение двигательного нерва, повреждение головного мозга и прерванная передача сигнала в отношении нервов/мышцы

Дисфункция или гиперфункция соматосенсорных нейронов была доказана при множестве нарушений, таких как врожденная нейросенсорная невропатия, вызванная диабетом, опоясывающий герпес, постгерпетическая невралгия, атопический дерматит, нарушенное заживление поврежденных тканей, псориаз, экзема, астма, хронический артрит и т.д.

Соматосенсорные нейроны представляют собой систему первой линии защиты от травмы. Они контролируют гомеостаз и также инициируют соответствующие меры в случае опасности.

Их защитная способность была доказана экспериментальными разрушениями кожи и желудочно-кишечной слизистой оболочки с капсаицином. Это вещество, вводимое с высокими дозами, разлагает сенсорные волокна, тогда как низкая доза (ниже 0,5 мг/кг) активирует высвобождение нейромедиатора и имеет защитный эффект в отношении слизистой оболочки. В эксперименте, описанном в Dig. Dis. Sci., 1996, 41(8), 1604-1614, использовали высокую дозу капсаицина, которая разлагала сенсорные волокна. Бепецин, используемый в дозах от 10 нг до 10 мкг/кг массы тела животного, вводимый перорально или местно, сильно снижал эффект капсаицина.

Бепецин также сильно снижал последствия повреждения головного мозга животного, индуцированного падающей массой. Модель описана в Regulat. Pept., 2010, 160 (1-3), 26-32. Эксперимент с инъекцией сукцинилхолина (0,2 мг/кг) в правую мышцу - четырехглавая мышца - также индуцировал нервномышечное нарушение в действии мышцы из-за нарушенной передачи сигнала от нерва к мышце. Бепецин, введенный перед или после инъекции сукцинилхолина, полностью элиминировал местный эффект сукцинилхолина.

Принимая во внимание нейрозащитный эффект бепецина, отмеченную подобность между экспериментальными моделями и человеческой патологией, эти обнаружения могут быть практически применимы для усиленного клинического эффекта в терапии различных повреждений нерва.

Пример 38. Эффект на энцефалопатию и множественный склероз

Посредством использования способов, описанных ранее в (Eur. J. Pharmacol. 2011, 667, 322-9; Life Sci. 2011, 88, 535-42; J. Physiol. Pharmacol. 2010, 61, 241-50; J. Physiol. Pharmacol., 2009, 60 Suppl. 7, 107-14; Regul. Pept., 2010, 160, 26-32) было продемонстрировано, что бепецин действует против всех факторов, как следствие приводящих к энцефалопатии с чрезмерной дозой NSAID. Он дополнительно действует против повреждений головного мозга, которые появляются после введения огромной дозы инсулина. Бепецин в полной мере действует против опасной для жизни инсулиновой токсичности и смертельного пароксизма, тяжело разрушенных нейронов в коре головного мозга и гиппокампе. Бепецин может дополнительно снижать повреждение головного мозга, являющееся результатом травмы. На настоящий момент, натализумаб, гуманизированное моноклональное антитело против клеточной адгезии молекулы  $\alpha 4$ -интегрина, преимущественно используют в лечении множественного склероза и болезни Крона. Принимая во внимание предшествующее применение бепецина и его эффективность в различных моделях активного язвенного колита, уже упомянутой эффективности бепецина в терапии разрушенных мышц, нервов и повреждений головного мозга, может быть предположен благотворный эффект бепецина в пригодной модели для множественного склероза.

Среди различных экспериментальных моделей аллергического энцефалита, самым достоверным явлен купризон. Использовали недавно описанный протокол (J. Physiol. Pharmacol. 2013, Brain, 2006, 129, 1940-1952). Крысам Вистар вводили 2,5% купризона в их режиме питания, комбинированном с добавлением бепецина в их питьевую воду 10 мкг/кг или 10 нг/кг, 0,16 мкг/мл/12 мл/день/крысу или 0,16 нг/мл/12 мл/день/крысу вплоть до безболезненного умерщвления после четырех дней; им дополнительно вводили купризон 1 г/кг внутрижелудочно раз в сутки, и бепецин вводили 10 мкг/кг или 10 нг/кг внутрижелудочно. Таким образом, крысам многократно вводили более высокие дозы купризона в их пищу, что ускоряло формирование разрушения. В результате нервное разрушение наблюдали в различных частях мозга, наиболее выраженное разрушение происходило в мозолистом теле, латеродорсальном таламусе и ядерных скоплениях. Крысы, подвергаемые лечению с купризоном и бепецином, испытывали меньшее нервное разрушение во всех частях. Бепецин демонстрировал наиболее благотворный эффект в тех частях, которые были наиболее подвержены воздействию.

Как следствие, на основании результатов экспериментов бепецин подтверждает то, что он пригоден для лечения как воспалительного заболевания кишечника, так и множественного склероза. Бепецин дополнительно может являться первичной терапией при различных энцефалопатиях.

#### Пример 39. Противовирусная активность

Арбовирусы, гепатит, герпес и LCM вирусы

Противовирусную активность исследовали на новорожденных мышах линии BALB-C возрастом 24 дня, самцах и самках. Арбовирусы (TBE = Вирус клещевого энцефалита, Bhanja, Денге типы 1, 2, 3 и 4, Синдбис, Западного Нила и вирусы Calovo), вирус гепатита А, вирус лимфатического хориоменингита (LCM) и вирус герпеса типов 1 и 2 использовали i.e. (или p.o. для гепатита А) в виде вирусной суспензии в разбавлении  $10^{-2}$  (0,02 мл/мышь). Дозы довели так, чтобы они были сопоставимы относительно LD<sub>100</sub> при 0,02 мл i.c. (или p.o. при гепатите А)/мышь и инокулировали в разбавлении  $10^{-2}$ . Бепецин (20 мкг/кг массы тела) или 0,9% NaCl раствора (0,02 мл/мышь) использовали i.c. или i.p. следующим образом:

- (i) лечение за 2 ч перед вирусной инфекцией (-2 ч),
- (ii) одновременно с вирусной инфекцией (0),
- (iii) через 4 дня после при наличии инфекционных симптомов.

Результаты приведены в табл. 7.

Когда бепецин применяли перед вирусной инфекцией (i) не было отмечено никаких признаков заболевания или смертей во время наблюдения. Если бепецин вводили сопутствующе с инфекцией (ii), симптомы заболевания появлялись на значительно более поздних стадиях, после 20 дней (в контрольной группе без бепецина все животные умирали в пределах 5 дней). Если бепецин вводили при наличии первых симптомов, вспышка заболевания была значительно замедлена (iii).

Числа в табл. 7 представляют время в днях, когда все инфицированные животные умирали (включая контрольную группу). Во второй контрольной группе, состоящей из здоровых неподверженных лечению животных, не было смертельных случаев. Обозначение "+" указывает на пероральную дозировку, обозначение "а" указывает ARBO вирус и обозначение "н.с." означает не было смертельных случаев. За всеми животными наблюдали в течение 40 дней после инфицирования.

#### Вирус клещевого энцефалита

Активность бепецина против вируса клещевого энцефалита в тестовых мышах очевидным образом продемонстрирована на фиг. 3. Бепецин использовали в дозе 0,02 мг/кг массы тела. Бепецин значительно пролонгирует выживаемость тестовых животных или даже предотвращает инфекцию посредством использования пригодной дозировки.

Для подтверждения результатов вирулентности используемой вирусной суспензии, отбирали часть ткани головного мозга животного, инфицированного ранее с TBE вирусом и бепецином, и готовили гомогенизат головного мозга в виде суспензии. Используя эту суспензию инокулировали новых животных и инфицировали новой вирусной суспензией (TBE). Подверженные лечению животные не проявляли никаких симптомов заболевания даже после 50 дней, тогда как животные, которым вводили только солевой раствор вместо гомогенизата головного мозга, умирали в течение 5 дней.

Таблица 7

Вирусная инфекция	Время (дней) до смерти после вирусной инфекции мышей							
	Лечение животных							
	Солевой раствор 0,9%				Бепецин			
	Применение за 2 часа перед вирусной инфекцией (-2ч)		Применение сопутствующе с вирусной инфекцией (0)		Применение за 2 часа перед вирусной инфекцией (-2ч)		Применение сопутствующе с вирусной инфекцией (0)	
	ip	ic	ip	ic	ip	ic	ip	ic
ТБЕ <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Bhanja <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Денге 1 <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Денге 2 <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Денге 3 <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Денге 4 <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Синдбис <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Западного Нила <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Čalovo <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	15	15
Гепатит А+	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
LCMa	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Герпес HSV-1 <sup>a</sup>	5	5	5	5	н.с.	н.с.	20	20
Нет инфекции	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.	н.с.

#### Вирус герпеса

Исследование с применением клеток VERO (TICD<sub>50</sub>, HSV-1, 10<sup>10</sup>, ID<sub>50/200</sub> мкл и HSV-2: 10<sup>11</sup>, ID<sub>50/100</sub> мкл, инкубирование в течение 24, 48 и 72 ч) продемонстрировало, что клеточная система *in vitro*, инокулированная вирусами герпеса HSV-1 и HSV-2, бепецином ингибирует репродукцию HSV вируса и защищает клетки против цитопатогенного действия HSV вирусов.

Активность бепецина "in vivo" была определена экспериментами на новорожденных мышях линии BALB/C с использованием внутримозговой инокуляции с HSV-1 в концентрации 10<sup>10</sup> ID<sub>50/100</sub> мкл и HSV-2 в концентрации 10<sup>11</sup> ID<sub>50/100</sub> мкл. Соль бепецин L-аргинин применяли в дозах 10 и 100 мкг/кг. Группы не подверженных лечению животных служили для целей сравнения, этих животных подвергали лечению только с солевым раствором и ацикловиром в дозах 10 и 100 мг/кг. В одной группе все агенты были применены через 48 ч и в другой через 72 ч после вирусной инфекции. Результаты демонстрируют, что бепецин значительно снижает количество больных животных среди летально инфицированных мышей и является более эффективным, чем общепризнанное медицинское средство ацикловир. Время выживаемости мышей, подверженных лечению с ацикловиром, составляло 112/105/115 ч (среднее/мин./макс.), тогда как время выживаемости мышей, подверженных лечению с бепецином (в меньшей дозе!), было значительно более длительным: 131/128/135 ч.

Эффективность бепецина в дозах 10 и 100 мкг/кг, как было подтверждено, была лучше, чем у ацикловира в значительно более высоких дозах 10 и 100 мг/кг - при идентичных условиях теста.

Подобные результаты получали в случае инфекции цитомегаловирусом CMV.

#### Вирус гриппа А

Исследование активности бепецина на вирусы гриппа А типов H1N1 и H3N2 выполняли в модели MDCK (клетки почек Мадин-Дарби собак). В качестве культуральной среды использовали MEM (минимальная питательная среда), дополненную с 5% фетальной бычьей сыворотки и антибиотиками (Naruse N. et al., J. Antibiot., 1991, 44, 733-740). Бепецин продемонстрировал сильный ингибирующий эффект на вирус гриппа А даже при очень низкой концентрации 32 мкг/мл, и он был значительно более эффективен, чем до настоящего времени известные используемые соединения.

#### Вирус лейкоза кошек

Вирус лейкоза кошек (FeLV) является ретровирусом и в силу этого переносится как РНК вирус, но

РНК является обратно транскрибируемой в ДНК. Он является передаваемым среди кошек со слюной или носовыми выделениями. Иммунная система животного выходит из строя и инфекция является летальной для животного. Заболевание этого типа является типом рака лимфоцитов крови (лейкемия).

Активность бепецина исследовали (с согласия владельцев) тестами, выполняемыми на 32 кошках (обоих родов) возрастом от 6 месяцев до 5 лет, которые не были предварительно вакцинированы против этого заболевания. Все из них были на стадии сильно выраженного заболевания, тест Combo FeLV/FIV был позитивным. Все животные имели высокую температуру тела вплоть до 41,5°C, а также признаки тяжелого заболевания: желтуха, диарея, тахикардия, абдоминальная боль, обезвоживание и ослабление.

После диагностирования все кошки получали раствор бепецина в форме подкожной инъекции в дозе 1 мкг/кг массы тела (в 1 мл) раз в день в течение первых 8 дней, затем такую же дозу перорально вплоть до в общем одного месяца.

Улучшение наблюдали незамедлительно, температура тела снижалась лишь за 30 мин на мин. 1°C и общее состояние восстанавливалось в течение одной недели. Однако состояние некоторых животных снова временно ухудшалось после 4-5 дней на 24 ч, но улучшалось снова на день 6 и затем наблюдали полное восстановление за приблизительно 10 дней.

Вывод: кошки, которые не были превентивно вакцинированы и становились больными вирусом лейкоза кошек, могли полностью восстановиться за 10 дней, если им вводили ежедневно дозу бепецина 1 мкг/кг массы тела. До настоящего времени не существовало эффективного медицинского средства против этого заболевания за исключением вакцинации и очень дорогого интерферона-омега.

На основании схожей генетики подтипов вирусов можно предположить, что бепецин является эффективным в случаях некоторых других вирусных инфекций, например, герпесом варицелла зостер (VZV или HHV-3), вирусом Эпштейна-Барр (EBV), человеческими вирусами герпеса HHV-6, HHV-7, HHV-8 (Капоши) и Чикунгунья (CHIKV).

Принимая во внимание тот факт, что некоторые из этих вирусов также индуцируют схожее болезненное явление у людей, авторы изобретения полагаем, что бепецин может быть использован в терапии этих заболеваний также у людей, особенно, когда аспекты для пациентов являются очень неблагоприятными (например, СПИД и связанные со СПИДом синдромы).

Пример 40. Действие сфинктеров

Способ экспериментального тестирования подробно описан в J. Pharmacol. Sci., 2007, 104 (1), 7-18 и J. Pharmacol. Sci., 2006, 102 (3), 269-277 и Regul. Pept., 2013, 181, 50-66. Было обнаружено, что бепецин (от 10 нг/кг до 10 мкг/кг массы тела, парентерально или перорально) сохраняет сфинктерную функцию у крыс (пищеводный сфинктер, пилорический сфинктер и уретральный сфинктер) и давление в сфинктере, которое в ином случае было бы нарушено. Кроме того, бепецин также может быстро восстанавливать функцию сфинктера и его давление даже после долго длящихся нарушений (т.е. эзофагит, острый панкреатит) или после различных процедур с недержанием мочи при напряжении. В добавление, бепецин также облегчал и элиминировал эзофагит и другие нарушения, являющиеся результатом нарушения работы сфинктера (острый панкреатит; различное недержание мочи при напряжении).

Таким образом, принимая во внимание подобность используемых моделей и человеческой патологии, бепецин может являться первоначальной терапией для всех нарушений, связанных с нарушенным функционированием сфинктера.

Пример 41. Увеличение массы животных - ветеринарная медицина

Посредством использования способов, описанных в Dig. Dis. Sci., 2009, 54 (1), 45-56, крыс с запущенным синдромом укороченной тонкой кишки и прогрессирующей потерей массы после обширной резекции тонкой кишки исследовали в течение 4 недель. После операции истощение животных повышалось с сопутствующим снижением массы тела, двукратным увеличением, четырехкратным увеличением мышечной толщины в первую неделю, дилатацией тощей и подвздошной кишки и нарушенным соотношением тощая кишка/подвздошная кишка. Непосредственно после применения бепецина наблюдали постоянное увеличение массы и впоследствии повышались: рост ворсинок, смерть крипт и мышечная толщина (круговой мышечный слой). Крысы, подверженные лечению с бепецином в дозах от 10 нг/кг до 10 мкг/кг массы тела, i.m. или p.o., не имели различия между тощекишечным и подвздошным диаметрами. Они имели постоянное соотношение тощая кишка/подвздошная кишка и повышенную точку разрыва анастомоза.

Соответственно, поросята подверженные лечению с указанными дозами бепецина со дня 1 по день 21, имели существенно лучшее увеличение массы и не имели диареи.

Таким образом, принимая во внимание подобность используемых моделей и животных патологий, бепецин может являться первоначальной терапией во всех нарушениях, связанных с функционированием тонкой кишки. Дополнительно, бепецин может быть соответственно использован для улучшения прироста массы, также для сельскохозяйственных животных.

Пример 42. Влияние бепецина на сохранение сперматозоидов

Общезвестно, что процесс замораживания сперматозоидов в сохранении сперматозоидов приводит к примерно 50% снижению подвижности сперматозоидов из-за изменения температуры и осмотического эффекта. Морфологические изменения происходят из-за строения, проницаемости и липидной компози-

ции мембран спермиев.

Авторы изобретения обнаружили благотворное действие бепецина на подвижность сперматозоидов быка, которые были заморожены в соответствии с немного модифицированным стандартным способом (в среду добавляли бепецин перед замораживанием).

Первая часть эксперимента была предназначена для определения эффекта *in vitro* наиболее эффективной дозы бепецина, которая составляла 20 нг/мл, на качество сперматозоидов после оттаивания, если сперматозоиды подвергали обработке таким образом перед замораживанием. Во второй части исследовали эффект на форму сперматозоидов. Результаты оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа с компьютерной обработкой CASA.

Обработка с бепецином перед замораживанием среды улучшала подвижность после оттаивания при 37°C по сравнению с контрольным образцом спермы ( $p < 0,05$ ; субъективный способ:  $p = 0,0046$ ; CASA:  $p = 0,014$ ).

Совместная обработка спермы с бепецином непосредственно после оттаивания улучшала ее подвижность по сравнению с контрольным образцом ( $p < 0,05$ ; субъективный способ:  $p = 0,0018$ ; CASA:  $p = 0,014$ ).

Принимая во внимание, результаты можно сделать вывод, что замораживание спермы быка с добавлением бепецина имело очень хороший эффект на качество сперматозоидов *in vitro* после оттаивания. Для подтверждения этих результатов было бы целесообразно дополнительное исследование *in vivo*.

Вывод: в соответствии с доступными в настоящее время результатами бепецин имеет благоприятный эффект на качество сперматозоидов при криоконсервации.

Пример 43. Эффект после экстирпации кровеносного сосуда

Бепецин имеет особенно благотворный эффект после удаления большого кровеносного сосуда. В отличие от L-NAME и L-аргинина, бепецин быстро устанавливает соединение между культями сосуда, таким образом, даже в случае худшего сценария быстро реорганизуя кровоснабжение.

Часть бедренной артерии у крыс (между каудальной надчревной артерией и латеральной артерией, огибающей бедренную кость) удаляли для того, чтобы исследовать проявление коллатерального сосуда в васкулярном дефекте после формирования критического размера васкулярного дефекта. Проявление коллатерального сосуда в васкулярном дефекте оценивали в соответствии со способом, описанным для микроангиографической оценки в *Cardiovasc Res.* 1997 Sep; 35(3): 547-52. Термографическую визуализацию выполняли с применением инфракрасной камеры.

Не наблюдалось проявления коллатерального сосуда в васкулярном дефекте в контрольной группе через 5-10 мин после удаления определенной части бедренной артерии у крыс, для которых осуществляли местное погружение на 1 мин в солевой раствор (1 мл/крыса, 5 мл/кг) непосредственно после возникновения васкулярного дефекта. Фиг. 5А.

Были представлены мельчайшие коллатеральные сосуды, все еще без взаимных соединений, в васкулярном дефекте через 5-10 мин после удаления определенной части бедренной артерии у крыс, для которых осуществляли местное 1 мин погружение в L-аргинин (1 мл/крыса, 100 мг/кг) непосредственно после возникновения васкулярного дефекта.

Область васкулярного дефекта являлась полностью пустой, и не было представлено коллатеральных сосудов в васкулярном дефекте через 5-10 мин после удаления определенной части бедренной артерии у крыс, для которых осуществляли местное 1 мин погружение в L-NAME (1 мл/крыса, 5 мг/кг) непосредственно после возникновения васкулярного дефекта.

В случае применения бепецина коллатеральные сосуды со всеми взаимными соединениями, образующими соединительную сеть и функциональную сеть, можно наблюдать (подтвержденный термографической записью) в васкулярном дефекте через 5-10 мин после удаления определенной части бедренной артерии у крыс, для которых осуществляли местное погружение на 1 мин в бепецин (1 мл/крыса, 10 мкг/кг) непосредственно после возникновения васкулярного дефекта. Фиг. 5В.

Это доказательство показывает, что опосредованная бепецином адаптация быстро появляется в существующих коллатеральных артериях после удаления бедренной артерии и окклюзии для того, чтобы восстановить васкулярную проводимость и, следовательно, кровяной поток в конечности. На самом деле, поздняя адаптация представляет собой артериогенез, процесс который является ремоделированием коллатеральной артерии, тогда как ранняя адаптация представляет собой вазодилатацию *J. Vasc. Surg.* 2010 Jan; 51(1): 165-73. В любом случае, очевидное различие между L-аргинином и бепецином доказывает, что ранняя адаптация (в настоящее время исследованная в дневных (и не в минутных периодах) после васкулярного повреждения и не в самом васкулярном дефекте), не является простой вазодилатацией, а особенным опосредованным бепецином соединяющим процессом. Можно говорить о важном процессе, который имеет значительный эффект на первоначальное увеличение кровяного потока через коллатеральные сосуды так, что это становится постоянным. Как следствие, достигается высокоразвитая стадия и улучшенные окончательные результаты (образование васкулярной сети из обеих культей).

На основании результатов эксперимента бепецин может являться первоначальной терапией для всех состояний, где может быть обязательно быстрое перестроение кровоснабжения.

## Пример 44. Острая токсичность

Во всех исследованиях бепецин продемонстрировал очень безопасный профиль. Бепецин в виде соли ди-L-аргинина (1:2), также во всех другой солевых формах, вводимый как самцам, так и самкам крыс-альбиносов Вистар, с режимом очень высоких доз, т.е. 1 г/кг массы тела, внутривенно, внутривенно или внутривенно, демонстрировал отсутствие токсичности и отсутствие неблагоприятных эффектов.

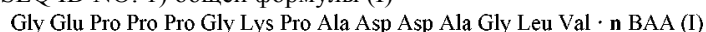
## Список последовательностей

<110> Diagen d.o.o., Ljubljana, Sp. Gameljne 72  
 <120> ТЕРАПЕВТИЧЕСКИ АКТИВНАЯ СОЛЬ ПЕНТАДЕКАПЕПТИДА, УСТОЙЧИВАЯ К ВЛИЯНИЮ ТЕМПЕРАТУРЫ, ВЛАЖНОСТИ И ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА, СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ  
 <130> 01 - 0001  
 <140> SI P-201300055  
 <141> 2013-03-13  
 <150> патент США № 6288028  
 <151> 1998-05-20  
 <160> 1  
 <210> 1  
 <211> 15  
 <212> Белок  
 <213> Синтетическая последовательность  
 <220>  
 <221> Связывание  
 <222> 15  
 <223> Соли SEQ ID NO 1 с основными аминокислотами  
 <300>  
 <301> P. Sikirić, R. Rućman, B. Rućman, M. Petek  
 <302> Синтез и фармакологическая активность фрагмента белка человеческого желудочного сока  
 <303> Пептиды 1998  
 <304> 1998  
 <305>  
 <306> 814-815  
 <307> 1998  
 <400>  
 Gly Glu Pro Pro Pro Gly Lys Pro Ala Asp Asp Ala Gly Leu Val

1

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устойчивая к влиянию температуры, влажности и желудочного сока терапевтически активная соль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) общей формулы (I)

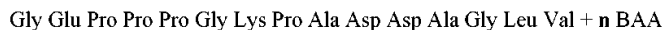


## SEQ ID NO 1

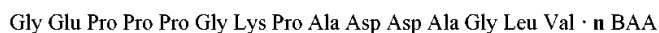
где n означает 1, 2 или 3 и BAA означает основную аминокислоту, представляющую собой аргинин, лизин или орнитин в L-, D- или DL-форме.

2. Соль пентадекапептида формулы (I) по п.1, характеризующаяся тем, что основная аминокислота представляет собой L-аргинин.

3. Способ получения соли пентадекапептида по п.1, устойчивой к влиянию температуры, влажности и желудочного сока, характеризующийся тем, что пентадекапептид (SEQ ID NO: 1) подвергают взаимодействию с основной аминокислотой BAA, представляющей собой аргинин, лизин или орнитин в L-, D- или DL-форме:



SEQ ID NO 1



SEQ ID NO 1

в молярном соотношении от 1 до 3 моль основной аминокислоты к 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) в водном растворе при комнатной температуре, причем значение pH образованного раствора доводят титрованием до 4,1-5,0 или 6,7-7,8, затем образованную соль формулы (I) выделяют в твердой



форме посредством хроматографии ВЭЖХ и лиофилизации.

4. Способ по п.3, характеризующийся тем, что в качестве основной аминокислоты используют L-аргинин.

5. Способ по п.3, характеризующийся тем, что значение pH раствора, полученного посредством взаимодействия 1 моль основной аминокислоты с 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) доводят до 4,1-5,0.

6. Способ по п.5, характеризующийся тем, что значение pH доводят до 4,60±0,05.

7. Способ по п.3, характеризующийся тем, что значение pH раствора, полученного посредством взаимодействия 2 моль основной аминокислоты с 1 моль пентадекапептида (SEQ ID NO: 1) доводят до 6,7-7,8.

8. Способ по п.7, характеризующийся тем, что значение pH доводят до 7,40±0,05.

9. Фармацевтический состав в твердой или жидкой форме для перорального, внутривенного, ректального, вагинального, внутримышечного, местного и другого применения, содержащий терапевтически эффективное количество соли пентадекапептида по п.1 или 2, для лечения заболеваний и нарушений, в отношении которых указанная соль проявляет терапевтическую активность.

10. Фармацевтический состав по п.9, дополнительно содержащий антибиотики и/или антиоксиданты.

11. Фармацевтический состав по пп.9 и 10, содержащий добавки для увеличения стабильности, выбранные из карбонатов или гидрокарбонатов щелочного металла и щелочно-земельного металла.

12. Фармацевтический состав по п.11, характеризующийся тем, что указанная добавка представляет собой гидрокарбонат натрия.

13. Фармацевтический состав по пп.9, 10 и 11, содержащий добавки для увеличения стабильности, выбранные из сахаров, подобных D-манниту, трегалозе или сорбиту.

14. Фармацевтический состав по п.13, характеризующийся тем, что указанная добавка представляет собой D-маннит.

15. Применение фармацевтического состава по пп.9-13 для профилактики и лечения следующих заболеваний, болезненных состояний и нарушений:

связанных со стрессом заболеваний и нарушений, язв в любой части желудочно-кишечного тракта, желудочно-кишечного воспалительного заболевания, болезни Крона, острого панкреатита;

повреждений печени и поджелудочной железы, инфаркта миокарда и мозгового инсульта;

вирусных инфекций, в частности гепатита А, штаммов герпеса, гриппа А и вирусов ARBO, таких как клещевой энцефалит, лихорадка Западного Нила, денге типов 1-4, цитомегаловирус CMV и LCM вирус, вирус лейкоза кошек;

меланомы и схожих опухолей;

ран, ожогов, переломов костей, разорванных нервных соединений, ахиллова сухожилия и разорванных мышц, повреждения спинного мозга;

органических нарушений, связанных с образованием NO: гипертензии, гипотензии, анафилаксии, циркуляторного и септического шока, агрегации тромбоцитов;

неврологических заболеваний и нарушений: множественного склероза, миастении гравис, эритематозной волчанки, невропатии, дисфункции соматосенсорных нервов, астмы, ринита, пемфигуса и экземы;

катехоламинергической дисфункции, шизофрении, эффекта абстиненции от амфетамина, наркотических средств и спирта;

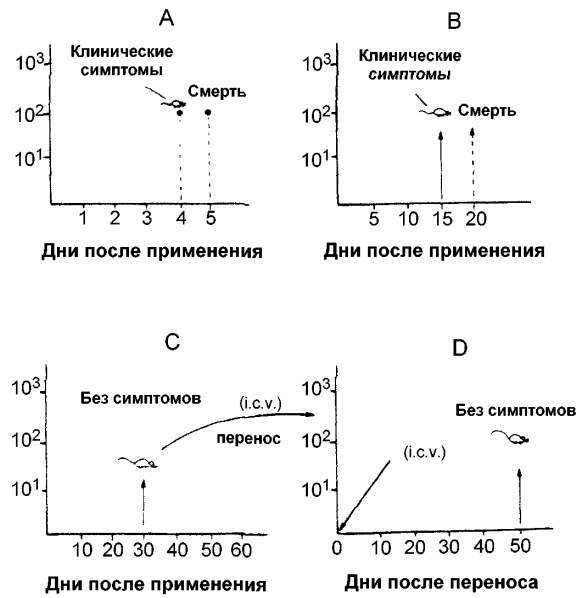
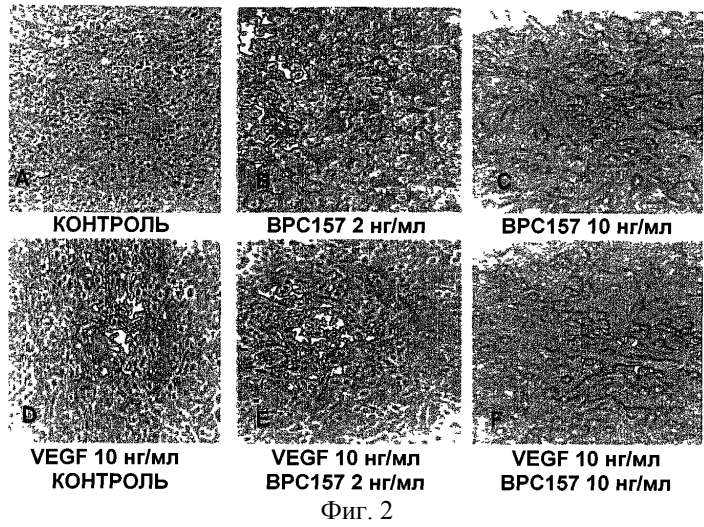
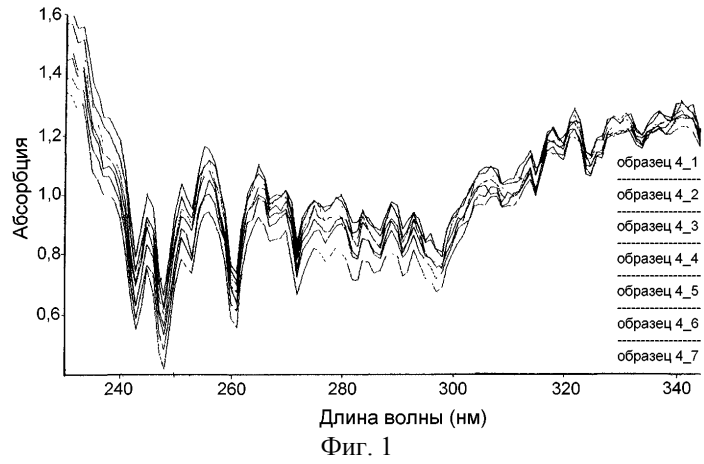
нарушений из-за кортикостероидов и NSAID;

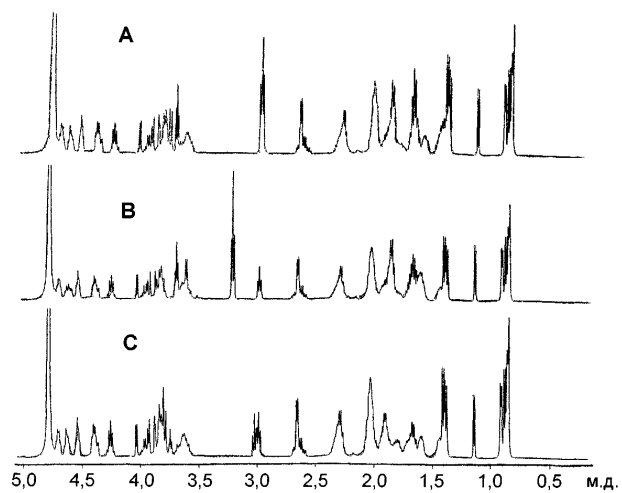
чешуйчатой дегенерации пятна на глазах;

во всех состояниях, где обязательна быстрая реорганизация кровоснабжения.

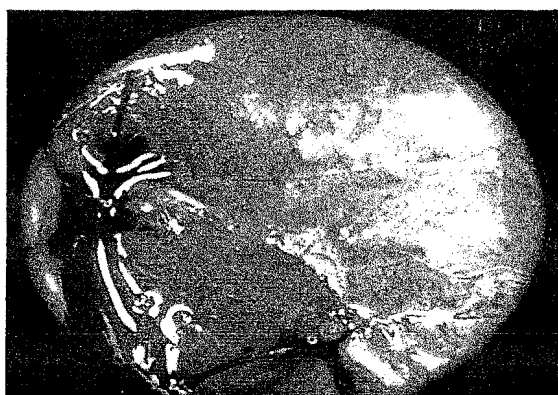
16. Применение фармацевтического состава по пп.9-13 в ветеринарной медицине для увеличения прибавления массы у животных и для увеличения устойчивости сперматозоидов при хранении.

17. Применение соли пентадекапептида по п.1 или 2 для получения биоактивных пищевых добавок.

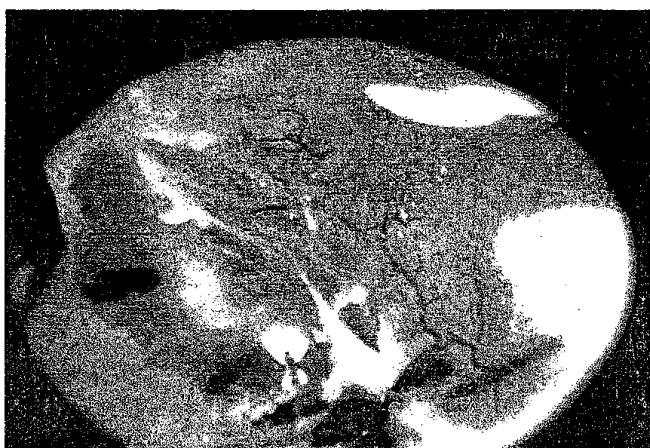




Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В