

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040876**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.10**

**(21)** Номер заявки  
**202090070**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.11.14**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/44* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01)  
*A61P 3/06* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)  
*A61P 25/28* (2006.01)

---

**(54) L-ЭНАНТИОМЕР 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНИЯ L-ГИДРОКСИБУТАНДИОАТ, ОБЛАДАЮЩИЙ ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЙ, ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ, ЛИПИДРЕГУЛИРУЮЩЕЙ, ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОЙ И НЕЙРОТРОПНОЙ АКТИВНОСТЬЮ**

---

**(31)** 2017143801; 2018137717

**(32)** 2017.12.14; 2018.10.25

**(33)** RU

**(43)** 2020.04.23

**(86)** PCT/SK2018/050013

**(87)** WO 2019/117820 2019.06.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"ВАЛЕНТА-ИНТЕЛЛЕКТ" (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Скачилова София Яковлевна,  
Мясников Дмитрий Георгиевич,  
Иванов Андрей Николаевич (RU)**

**(74)** Представитель:  
**Ловцов С.В., Левчук Д.В. (RU)**

**(56)** EA-B1-024773  
DATABASE WPI Week 201051 Thomson  
Scientific, London, GB; AN 2010-C56259  
XP002787431, & RU 2 377 237 C1 (MEDIMENKS  
STOCK CO) 27 December 2009 (2009-12-27) abstract  
VLASOV A.P. ET AL.: "NEW  
METHODICAL APPROACHES TO PREVENTING  
SYSTEMIC TOXIC DAMAGES", FARMATSIYA,  
IZDATEL'SKII DOM RUSKII VRACH, RU, no.  
4, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 42-46,  
XP009509940, ISSN: 0367-3014 page 46, right-hand  
column, last paragraph  
RU-C1-2663836

---

**(57)** Предметом данного исследования является новое химическое соединение L-энантиомер 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоат и его антигипоксическая активность. Оценка его острой токсичности показала, что энантиомер 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоат относится к 3 классу токсичности по его токсикологическим свойствам в соответствии с классификацией, указанной в ГОСТ 12.1.007 - 76. Сравнительные исследования антигипоксического действия энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоата и препарата Этоксидол после однократного внутривенного профилактического введения в дозе, соответствующей 5% от значения DL<sub>50</sub>, определенного для этого способа введения для мышей, показали, что продолжительность электробиологической активности сердца у животных, которым вводили энантиомер, была выше, чем у мышей, которым профилактически вводили препарат Этоксидол в дозе 25,0 мг/кг.

---

**040876 B1**

**040876 B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области медицины, конкретно к новому химическому соединению - L-энантиомеру 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксипуандиоату, обладающему церебропротекторной, гепатопротекторной, липидрегулирующей, противоишемической и нейротропной активностью.

### Предшествующий уровень техники

Одно из перспективных направлений, развиваемых отечественными фармакологами, относится к инновационным отечественным лекарственным препаратам в ряду производных гидроксипиридина.

Среди производных 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина известен ряд препаратов, обладающих широким спектром биологической активности.

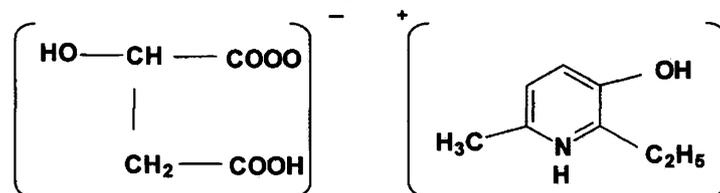
В начале 1980-х гг. в ГУ НИИ Фармакологии РАМН Смирнов Л.Д. и Кузьмин В.И. синтезировали мексидол - сукцинат 2-этил-6-метил-3-оксипиридина. Мексидол - препарат с многокомпонентным спектром фармакологических эффектов и многофакторным механизмом действия. Наиболее важными компонентами активности мексидола являются его антиоксидантные, мембранотропные эффекты, способность модулировать функционирование рецепторов и мембрано-связанных ферментов и восстанавливать нейромедиаторный баланс. (Мексидол: основные нейросихотропные эффекты и механизм действия. Т.А. Воронина. ГУ "НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова".М., РАН).

Мексидол широко применяется в медицине, а также ветеринарии в качестве антиоксидантного и антигипоксического средства, характеризующегося широким спектром фармакологического действия и высокой эффективностью (ноотропное и транквилизирующее действие - пат. RU 2065299, противоишемическое и антиатеросклеротическое действие - пат. RU 2144822, антиангинальное - пат. RU 2168993, гепатопротекторное - пат. RU 2189817, антимикробное - пат. RU 2157686 и др.).

Известны композиции на основе 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината в виде различных лекарственных форм: раствора для парентерального введения (Приказ МЗ РФ от 31.12.1996 №432 "Раствор Мексидола® 5% для инъекций", пат. RU 2205640, 2380089, 2398583), таблеток (Приказ МЗ РФ от 26.01.1998 №21 "Мексидол® таблетки, покрытые оболочкой, 0,125 г"), капсул (пат. RU 2144822, 2145855), перевязочного материала (пат. RU 2149648) и др.

Предложена фармацевтическая композиция в виде таблеток для перорального применения на основе 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (RU 2444359).

Известно также лекарственное средство этоксидол - 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиний гидроксипуандиоат (рацемат), обладающий противоишемической, церебропротекторной, нейротропной и липидрегулирующей активностями (RU 2377237), формулы:



Также известны фармацевтические композиции, содержащие этоксидол: таблетки, растворы для инъекций.

Показано, что этоксидол в дозе 10 мг/кг устраняет фибрилляцию желудочков при окклюзии коронарных артерий и уменьшает количество животных с фибрилляцией желудочков до 2 из 8 экспериментальных животных при введении в дозе 10 мг/кг и до 2 из 9 - при введении в дозе 23 мг/кг.

Этоксидол достоверно увеличивает порог фибрилляции желудочков у кошек в дозе 23,0 мг/кг в период с 5 до 60 мин окклюзии коронарных артерий, в то время как Анаприлин оказывает такое действие в изотоксической дозе в период с 30 до 60 мин.

В условиях острой ишемии миокарда в дозе 15 мг/кг оказывает выраженное кардиопротекторное действие на сердечную гемодинамику, приближая значения сократимости (dP/dt), артериального кровяного давления (АД) и др. к уровню интактного контроля.

Этоксидол в дозе 1 мг/кг обладает способностью снижать интенсивность перекисного окисления липидов у лабораторных кроликов, вызванного их 30-дневной иммобилизацией, о чем свидетельствует снижение уровня малонового диальдегида (МДА) в плазме крови на 46% и в ткани почек. При этом уровень общего холестерина снижается на 41,7%, а индекс атерогенности снижается на 82,9%.

Успехи стереофармакологии, достигнутые за последние десятилетия, обогатили науку пониманием общих закономерностей: структура - активность и структура - токсичность, для веществ, представляющих собой рацемические смеси лево- и правовращающих изомеров. Были получены D- и L-энантиомеры, обладающие различными фармакологическими свойствами. Исследования показали, что левовращающие изомеры, как правило, более токсичны, но также и более активны, тогда как правовращающие и рацематы уступают им по силе фармакологических эффектов.

Классическим примером является L-адреналин: его внутрисердечная концентрация в 11 раз выше, чем правовращающего изомера. Высокой стереоспецифичностью характеризуются рецепторные взаимо-

действия, в том числе процессы печеночного метаболизма, которые также определяются характером взаимосвязи лекарство-рецептор.

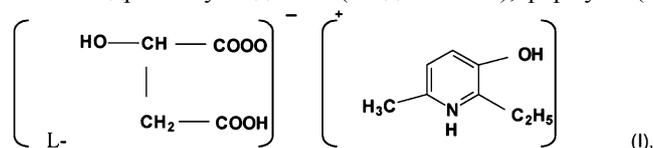
Клинические исследования S-амлодипина. Антигипертензивный и антиангинальный эффекты S-амлодипина подтверждаются результатами клинических исследований. Показано, что для достижения оптимального терапевтического действия S-амлодипина требуются вдвое меньшие дозы препарата.

В настоящее время только 15% лекарственных средств - это хирально чистые вещества, то есть состоящие из энантиомеров одного типа. Использование оптических изомеров известных сердечно-сосудистых средств - путь к повышению их эффективности и переносимости (М.И. Лутай, А.Ф. Лысенко, О.И. Моисеенко. Национальный научный центр "Институт кардиологии им. акад. Н.Д. Стражеско" АМН Украины, г. Киев).

В настоящее время в клинической практике используются такие производные 3-гидроксипиридина как мексидол, эмоксипин (Г.И. Клебанов и др. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина. Вопросы медицинской химии №3 2001). Данные препараты обладают антиоксидантным, антигипоксическим, ноотропным, противосудорожным, анксиолитическим действием.

### Сущность изобретения

Целью изобретения является разработка нового химического соединения L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоата (соединение 1), формулы (I):



его использование в качестве церебропротекторного средства, а также изучение его антигипоксической активности с учетом требований, предъявляемых к доклиническим исследованиям лекарственных средств. Соединение проявляют церебропротекторную активность, которая обеспечивает пролонгирующий период биоэлектрической активности миокарда, по сравнению с рацематом.

Также, целью изобретения является создание нового средства, обладающего гепатопротекторной липидрегулирующей, противоишемической и нейротропной активностью, содержащего соединение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоата (соединение 1).

Соединение 1 в виде композиции с фармацевтически приемлемыми носителями (целевыми добавками) может быть введено в виде различных лекарственных форм. Соединение применяется в терапевтически эффективных дозах, которые зависят от веса, пола и возраста пациентов, этиологии и тяжести их заболеваний. Предпочтительные дозы составляют от 20 до 300 мг.

Технический результат: эффективность нового производного 3-гидроксипиридина, а именно L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоата для лечения и профилактики широкого спектра заболеваний в качестве средства, проявляющего гепатопротекторную липидрегулирующую, противоишемическую и нейротропную активность, обеспечивающего пролонгированный период биоэлектрической активности миокарда, по сравнению с рацематом.

### Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

#### Пример 1.

1. Получение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксибутандиоата.

К 13,7 г (0,1 м) 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина добавляли 13,41 г (0,1 м) L-гидроксибутандиоатной кислоты, тщательно перемешивали и нагревали до температуры плавления 100-110°C. К полученной смеси постепенно добавляли около 120 мл воды, полученный раствор фильтровали, и удаляли 60-70% воды вакуумной перегонкой. Затем к полученному остатку добавляли 80 мл ацетона и кристаллизовали, полученный осадок фильтровали и сушили в вакууме. Получали 23,8 г белого кристаллического вещества, обладающего высокой гигроскопичностью, расплывающегося на воздухе.

$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_6$

Найдено, %: С 53,07; Н 6,38; N 5,11.

Вычислено, %: С 53,14; Н 6,27; N 5,17.

ИК-спектр,  $\nu$  см<sup>-1</sup>: 3510, 3230, 1660, 1610, 1560, 1292, 1161.

УФ-спектр, нм: 228,291 (вода)

Угол вращения  $[\alpha]_{\text{D}20}$  -13,6 (4,5% ацетонитрил).

2. Биологические исследования.

Общая характеристика лабораторных животных.

Исследования проводили на 69 самцах и 69 самках белых мышей линии SHK весом 20-22 г, полученных из питомника Филиала "Андреевка" Федерального Государственного Бюджетного Учреждения Науки "Научный Центр Биомедицинских Технологий Федерального Медико-Биологического Агентства" России.

Количество животных.

Экспериментальные группы животных по 6 мышей каждого пола в группе для изучения острой токсичности и антигипоксической активности являются репрезентативной выборкой, которая позволяет получать статистически достоверные данные, о чем свидетельствует многолетняя практика токсикологических исследований. Во время исследований животные содержались в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха 20-24°C, относительная влажность 50-60%.

#### 2.1. Определение острой токсичности соединения 1.

В настоящем исследовании острую токсичность оценивали на лабораторных мышах обоего пола при однократном внутривенном введении соединения 1 или препарата сравнения "Этоксидол".

Белым аутбредным мышам (по 6 мышей каждого пола в группе) вводили соединение 1 или препарат сравнения в нарастающих дозах 300, 400, 500, 600, 700 мг/кг в виде раствора в воде для инъекций общим объемом 0,5 мл, допустимого для данного вида животных.

Наблюдение за животными проводили в течение не менее 14 дней после введения. О токсичности препаратов судили по гибели животных и общей картине интоксикации.

Фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные или болевые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова. Производили подсчет количества погибших животных в ходе эксперимента.

Полученные данные обрабатывались общепринятым методом вариационной статистики с вычислением среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего значения (m). В качестве критерия оценки достоверности различия средних величин использовали парный t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони при уровне значимости  $P < 0,05$ ; для определения достоверности различий абсолютных величин использовали непараметрический критерий "хи-квадрат"; при объеме выборки менее 10 - точный критерий Фишера; для определения достоверности различий до и после введения фармакологического агента использовали критерий Уилкоксона.

На основании полученных результатов определяли характеристики "острой" токсичности с помощью пробит-анализа по Миллеру-Тейнтеру [10] (табл. 1-4).

Клиническая картина интоксикации у мышей при введении обоих сравниваемых фармакологических агентов была идентичной. При введении токсических доз соединения 1 и препарата сравнения "Этоксидол", Россия отмечалось снижение двигательной активности животных. При увеличении дозы наблюдался кратковременный (2-3 мин) период гиперкинезии с явлениями беспокойства. Была нарушена координация движений, тонус скелетных мышц был повышен, наблюдались тонические и клонические судороги. В этот период наблюдались непроизвольные акты дефекации и мочеиспускания. Часть животных погибала на фоне судорог. Выжившие животные находились в "заторможенном" состоянии, что выражалось в сниженной реакции на световые, звуковые, тактильные и болевые раздражители (раздражение корня хвоста). При этом наблюдались судорожные подергивания мышц, снижение аппетита, диарея или обстипация на фоне возрастающего потребления воды. Дыхание было учащенным и поверхностным, регистрировали гипертермию. В указанном выше состоянии животные находились в течение первых двух суток, после чего их физиологическое состояние постепенно возвращалось к исходному.

В течение последующих 14 суток явления интоксикации у животных проявлялись в виде сниженной реакции на раздражители. Волосяной покров терял блеск, характерный для здоровых животных, кожные покровы оставались без изменений. В дальнейшем состояние животных постепенно возвращалось к норме.

При наблюдении за животными в течение 14 суток не было зарегистрировано случаев смерти среди выживших животных.

Результаты исследования летальности мышей после введения соединения 1 или препарата сравнения "Этоксидол" представлены в таблицах 1-4.

Таблица 1. Зависимость доза-эффект (летальные исходы) при внутрижелудочном введении мышам-самцам соединения 1.

Доза мг/кг	300	400	500	600	700
Кол-во животных в группе	6	6	6	6	6
Кол-во выживших	6	3	2	0	0
Кол-во погибших	0	3	4	6	6
% летальности	0	50,0	66,4	100,0	100,0

Расчет параметров острой токсичности дал следующие результаты:  $DL_{50} = 419,74$  (364,2-474,3) мг/кг,  $DL_{16} = 304,3$  мг/кг,  $DL_{84} = 523,8$  мг/кг.

Таблица 2. Зависимость доза-эффект (летальные исходы) при внутрижелудочном введении мышам-самцам препарата сравнения "Этоксидол".

Доза мг/кг	300	400	500	600	700
Кол-во животных в группе	6	6	6	6	6
Кол-во Выживших	6	5	3	1	0
Кол-во погибших	0	1	3	5	6
% летальности	0	16,7	50,0	83,3	100,0

Расчет параметров острой токсичности дал следующие результаты:  $DL_{50} = 498,93$  (414,4-643,9) мг/кг,  $DL_{16} = 391,2$  мг/кг,  $DL_{84} = 622,3$  мг/кг.

Таблица 3. Зависимость доза-эффект (летальные исходы) при внутрижелудочном введении мышам-самкам соединения 1

Доза мг/кг	300	400	500	600	700
Кол-во животных в группе	6	6	6	6	6
Кол-во Выживших	6	3	3	0	0
Кол-во погибших	0	3	3	6	6
% летальности	0	50,0	50,0	100,0	100,0

Расчет параметров острой токсичности дал следующие результаты:  $DL_{50} = 428,81$  (291,8-554,4) мг/кг,  $DL_{16} = 313,4$  мг/кг,  $DL_{84} = 574,7$  мг/кг.

Таблица 4. Зависимость доза-эффект (летальные исходы) при внутрижелудочном введении мышам-самкам препарата сравнения "Этоксидол"

Доза мг/кг	300	400	500	600	700
Кол-во животных в группе	6	6	6	6	6
Кол-во Выживших	6	4	3	3	0
Летальность	0	2	3	3	6
% летальности	0	33,3	50,0	50,0	100,0

Расчет параметров острой токсичности дал следующие результаты:  $DL_{50} = 499,36$  (350,1-628,3) мг/кг,  $DL_{16} = 367,3$  мг/кг,  $DL_{84} = 628,0$  мг/кг.

Динамика массы тела выживших мышей, получавших токсические дозы соединения 1 или препарата сравнения "Этоксидол", значимо не отличалась от таковых в контрольных группах. При анализе динамики потребления воды и пищи после внутривенного введения токсических доз соединения 1 или препарата сравнения "Этоксидол" существенной разницы по сравнению с контрольными группами мышей также не обнаружено (табл. 5-10).

Таблица 5. Суточное потребление сухого корма (г) и воды (мл) на мыш (самцы) при внутрижелудочном введении токсичных доз соединения 1

№	Группа, доза мг/кг	Водопотребление, мл			Потребление корма, г		
		Фон	7 сутки	14 сутки	Фон	7 сутки	14 сутки
1	300,0	6,0	6,9	6,8	9,1	8,9	9,2
2	400,0	6,1	6,7	7,0	9,0	8,7	9,1
3	500,0	6,1	7,3*	6,7	9,1	8,9	9,0
4	Контроль	6,1	6,4	6,7	9,0	9,2	9,4

\* Различия при сравнении с контролем достоверны при  $p < 0,05$  (критерий "хи-квадрат").

Таблица 6. Суточное потребление сухого корма (г) и воды (мл) на мышь (самцы) при внутрижелудочном введении токсичных доз препарата сравнения "Этоксидол"

№	Группа, доза мг/кг	Водопотребление, мл			Потребление корма, г		
		Фон	7 сутки	14 сутки	Фон	7 сутки	14 сутки
1	300,0	6,1	6,4	6,6	9,2	9,1	9,1
2	400,0	6,1	6,8	6,5	9,2	8,9	8,9
3	500,0	6,0	6,4	7,0	9,1	8,8	9,0
4	600,0	6,2	7,3*	7,4*	9,0	8,3*	8,7*
5	Контроль	6,1	6,3	6,6	9,1	9,3	9,6

\* Различия при сравнении с контролем достоверны при  $p < 0,05$  (критерий "хи-квадрат").

Таблица 7. Суточное потребление сухого корма (г) и воды (мл) на мышь (самки) при внутрижелудочном введении токсичных доз соединения 1

№	Группа, доза, мг/кг	Водопотребление, мл			Потребление корма, г		
		Фон	7 сутки	14 сутки	Фон	7 сутки	14 сутки
1	300,0	6,0	6,5	6,7	9,1	8,9	9,0
2	400,0	6,2	6,9	6,6	9,2	9,3	9,3
3	500,0	6,1	7,2*	6,7	9,2	9,0	9,1
4	Контроль	6,0	6,3	6,5	9,2	9,5	9,7

\* Различия при сравнении с контролем достоверны при  $p < 0,05$  (критерий "хи-квадрат").

Таблица 8. Суточное потребление сухого корма (г) и воды (мл) на мышь (самки) при внутрижелудочном введении токсичных доз препарата сравнения "Этоксидол"

№	Группа, доза, мг/кг	Водопотребление, мл			Потребление корма, г		
		Фон	7 сутки	14 сутки	Фон	7 сутки	14 сутки
1	300,0	6,2	6,4	6,6	9,2	8,9	9,4
2	400,0	6,0	6,9	6,6	9,2	9,0	9,2
3	500,0	6,2	6,4	6,8	9,0	8,3*	9,1
4	600,0	6,0	7,2*	6,9	9,0	7,5*	9,0
5	Контроль	6,3	6,6	6,7	9,1	9,3	9,7

\* Различия при сравнении с контролем достоверны при  $p < 0,05$  (критерий "хи-квадрат").

Таблица 9. Динамика массы тела выживших мышей (самцы, г), при определении острой токсичности соединения 1 и препарата сравнения "Этоксидол"

№№ групп	Доза препарата, мг/кг	№№ животных	Соединение 1			Препарат сравнения		
			Исход	Через 7 дней	Через 14 дней	Исход	Через 7 дней	Через 14 дней
1	300,0	1	21,2	20,2	20,8	20,5	18,8	20,2
		2	20,9	18,3	20,6	21,7	18,6	20,8
		3	21,3	19,9	21,0	21,7	19,8	20,2
		4	21,4	18,6	20,6	21,9	18,2	20,4
		5	20,7	18,4	20,4	20,6	18,6	21,0
		6	21,6	19,3	21,2	20,2	17,8	19,7
		<b>М</b>	<b>21,18</b>	<b>19,12*</b>	<b>20,77</b>	<b>21,10</b>	<b>18,63*</b>	<b>20,38</b>
		<b>±m</b>	<b>0,14</b>	<b>0,33</b>	<b>0,12</b>	<b>0,30</b>	<b>0,28</b>	<b>0,19</b>
2	400,0	1	20,3	18,6	19,1	21,0	18,3	20,6
		2	21,7	18,2	20,0	21,4	17,3	20,1
		3	22,4	18,6	20,2	20,8	16,2	18,7
		4	-	-	-	20,6	16,0	18,8
		5	-	-	-	21,8	17,5	20,3
		<b>М</b>	<b>20,78</b>	<b>17,84*</b>	<b>19,40</b>	<b>21,12</b>	<b>17,06*</b>	<b>19,70</b>
		<b>±m</b>	<b>0,65</b>	<b>0,41</b>	<b>0,29</b>	<b>0,22</b>	<b>0,43</b>	<b>0,40</b>
3	500,0	1	20,8	15,2	18,0	21,4	17,5	18,2
		2	19,5	16,1	18,8	20,8	15,9	18,0
		3	-	-	-	19,7	16,4	19,8
		<b>М</b>	<b>20,8</b>	<b>15,2</b>	<b>18,0</b>	<b>20,63</b>	<b>16,60*</b>	<b>18,67</b>
		<b>±m</b>	<b>19,5</b>	<b>16,1</b>	<b>18,8</b>	<b>0,50</b>	<b>0,47</b>	<b>0,57</b>
	600,0	1	-	-	-	20,4	16,6	19,3
		<b>М</b>				<b>20,4</b>	<b>16,6</b>	<b>19,3</b>
		<b>±m</b>						
5	Контроль	1	21,6	21,8	22,0	20,0	21,5	22,7
		2	21,8	21,9	22,4	20,4	21,3	23,0
		3	20,9	21,3	21,8	22,4	22,8	23,9
		4	19,3	20,7	22,4	21,5	22,1	24,1
		5	20,4	21,9	23,2	20,7	21,7	23,9
		6	21,5	21,9	23,3	22,0	22,9	24,3
		<b>М</b>	<b>20,92</b>	<b>21,58</b>	<b>22,52</b>	<b>21,17</b>	<b>22,05</b>	<b>23,65</b>
		<b>±m</b>	<b>0,39</b>	<b>0,20</b>	<b>0,25</b>	<b>0,39</b>	<b>0,28</b>	<b>0,26</b>

\* Различия при сравнении с исходными значениями (критерий Уилкоксона) и соответствующими значениями контроля (t-критерий Стьюдента) достоверны при  $p < 0,05$ .

Таблица 10. Динамика массы тела выживших мышей (самки, г), при определении острой токсичности соединения 1 и препарата сравнения "Этоксидол"

№№ групп	Доза препарата мг/кг	№№ животных	Соединение 1			Этоксидол		
			Исход.	Через 7 дней	Через 14 дней	Исход.	Через 7 дней	Через 14 дней
1	300,0	1	21,5	20,8	20,9	21,3	20,4	21,4
		2	20,7	18,7	20,6	19,8	18,6	20,8
		3	22,2	20,0	20,6	22,3	20,8	21,1
		4	21,8	19,4	20,6	18,9	18,3	19,7
		5	20,9	18,6	19,3	21,5	20,1	19,6
		6	21,2	20,2	19,5	22,0	20,2	20,4
	<b>M</b>		<b>21,38</b>	<b>19,62*</b>	<b>20,25</b>	<b>20,97</b>	<b>19,73*</b>	<b>20,50</b>
	<b>±m</b>		<b>0,23</b>	<b>0,36</b>	<b>0,27</b>	<b>0,54</b>	<b>0,42</b>	<b>0,30</b>
2	400,0	1	21,1	18,6	19,4	20,5	17,7	19,2
		2	22,4	19,6	19,8	20,9	18,0	19,8
		3	20,7	16,7	17,6	20,8	16,4	20,0
		4	-	-	-	22,3	17,3	18,8
	<b>M</b>		<b>20,65</b>	<b>17,30*</b>	<b>18,75</b>	<b>21,13</b>	<b>17,35*</b>	<b>19,45</b>
	<b>±m</b>		<b>0,68</b>	<b>0,64</b>	<b>0,50</b>	<b>0,40</b>	<b>0,35</b>	<b>0,28</b>
3	500,0	1	22,4	17,6	18,4	22,0	19,4	20,0
		2	21,8	17,3	19,3	20,2	17,0	20,1
		3	19,0	16,4	19,0	20,4	15,8	17,9
	<b>M</b>		<b>21,07</b>	<b>17,10*</b>	<b>18,90</b>	<b>20,87</b>	<b>17,40*</b>	<b>19,33</b>
	<b>±m</b>		<b>1,05</b>	<b>0,36</b>	<b>0,26</b>	<b>0,57</b>	<b>1,06</b>	<b>0,72</b>
4	600,0	1	-	-	-	21,6	15,0	17,8
		2	-	-	-	21,3	17,1	20,2
		3	-	-	-	19,9	16,0	20,1
	<b>M</b>		-	-	-	<b>20,93</b>	<b>16,03*</b>	<b>19,37</b>
	<b>±m</b>		-	-	-	<b>0,52</b>	<b>0,61</b>	<b>0,78</b>
5	Контроль	1	21,4	21,9	22,5	18,2	19,8	21,2
		2	20,3	21,0	23,5	19,4	21,0	23,2
		3	22,0	23,6	24,1	21,3	22,7	24,0
		4	21,7	22,9	23,7	22,1	22,9	23,8
		5	19,4	20,6	23,0	22,0	22,7	24,2
		6	19,1	21,5	22,6	19,1	21,0	22,6
	<b>M</b>		<b>20,65</b>	<b>21,92</b>	<b>23,23</b>	<b>20,35</b>	<b>21,68</b>	<b>23,17</b>
	<b>±m</b>		<b>0,50</b>	<b>0,47</b>	<b>0,26</b>	<b>0,68</b>	<b>0,52</b>	<b>0,46</b>

\* Различия при сравнении с исходными значениями (критерий Уилкоксона) и соответствующими значениями контроля (t-критерий Стьюдента) достоверны при  $p < 0,05$ .

Таким образом, проведенный анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что соединение 1 по показателю "острой" токсичности относится к 3 классу токсичности (умеренно токсичные) [11] по ГОСТ 12.1.007-76.

## 2.2. Определение антигипоксической активности.

Эксперименты по определению антигипоксической активности веществ проводили на белых мышах массой 20-22 г, наркотизированных тиопенталом натрия (50 мг/кг внутривенно).

Соединение 1 или препарат сравнения вводили в течение 3 мин внутривенно (в вену хвоста) в дозе, соответствующей 5% от значения  $LD_{50}$ , при помощи электронного дозатора ("Kent Scientific", США) за 5 мин до перевязки трахеи. Результаты исследования представлены в табл. 11.

Как показали результаты экспериментов, препарат сравнения "Этоксидол", применяемый в высшей терапевтической дозе, приводил к увеличению времени жизни подопытных животных - наименьшее время сохранения биоэлектрической активности составило 592 с, а наибольшее - 610 с, что значительно отличалось от аналогичных показателей у мышей контрольной группы. Кроме того, при приеме препарата не наблюдалось заметного уменьшения частоты сердечных сокращений (табл. 11).

Таблица 11. Влияние соединения 1 и препарата сравнения "Этоксидол" на продолжительность жизни мышей (время биоэлектрической активности миокарда) на фоне остро развивающейся асфиксии

Вещество (препарат)	Доза, мг/кг (% от $LD_{50}$ )	Номер животного	Продолжительность жизни, с	ЧСС, уд/мин
1	2	3	4	5
0,9% раствор NaCl (контроль)	-	1	429	384
		2	388	352
		3	416	367

		4	394	393
		5	410	348
		6	422	366
		M±m	410±7	368±7
Этоксидол	25,0 (5)	7	585	376
		8	592	412
		9	617	399
		10	574	405
		11	631	386
		12	609	404
		M±m	601±9 <sup>a</sup>	397±10
		13	716	380
		14	722	396
		15	693	374
		16	674	361
1	2	3	4	5
соединение 1	21,2 (5)	17	709	385
		18	663	390
		M±m	696±10 <sup>ab</sup>	381±9

<sup>a</sup> Отличие от группы контроля достоверно (критерий выживаемости Гехана с поправкой Йейтса);

<sup>b</sup> Отличие от группы "Этоксидол" статистически достоверно при  $p < 0,05$  (одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса);

\* Отличие от контроля статистически достоверно при  $p < 0,05$  (одномерный дисперсионный анализ, критерий Ньюмена-Кейлса).

Соединение 1 при введении мышам в дозе, составляющей 5% от значения  $LD_{50}$ , продлевало период биоэлектрической активности миокарда до  $696 \pm 10$  с, что статистически значимо больше аналогичного показателя в контрольной группе и в группе препарата сравнения. Кроме того, под влиянием исследуемого препарата сократительная способность миокарда составила  $381 \pm 9$  уд./мин.

Проведенное исследование острой токсичности энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксипуандиоата (соединение 1) в сравнении с препаратом "Этоксидол" показало, что при однократном внутривенном введении мышам линии SHK показатель  $DL_{50}$  соединения 1 для мышей-самцов составил  $419,7$  мг/кг, для мышей-самок -  $428,8$  мг/кг; показатель  $DL_{50}$  препарата сравнения "Этоксидол" для мышей-самцов составил  $498,9$  мг/кг, для мышей-самок -  $499,4$  мг/кг. Соединение 1 относится к 3 классу токсичности при парентеральном пути введения согласно ГОСТ 12.1.007-76.

При изучении антигипоксической активности соединения 1 в сравнении с готовой лекарственной формой препарата "Этоксидол" установлено, что левовращающий изомер при однократном профилактическом введении в хвостовую вену мышей за 5 мин до воспроизведения гипоксии в дозе, составляющей 5% от значения  $DL_{50}$ , обладает антигипоксической активностью. При этом указанная активность соединения 1 статистически значимо превосходит соответствующую активность препарата сравнения, о чем свидетельствует продолжительность биоэлектрической активности сердца. Ни препарат сравнения, ни соединение 1 не обладают брадикардическим эффектом.

Пример 2.

Раствор для инъекций (масса/объем):

L-энантиомер 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксипуандиоат - 5,00%;

натрия метабисульфит - 1,0%;

1 М раствор хлористо-водородной кислоты до pH 4,5;

Вода для инъекций - до 100%.

Пример 3.

Капсулы:

L-энантиомер 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксипуандиоат - 30 мас.%;

крахмал - 25 мас.%;

поливинилпирролидон - 3,5 мас.%;

микрористаллическая целлюлоза - 12,5 мас.%;

лактоза - 29,0 мас.%;

Пример 4. Изучение липидрегулирующего действия L-энантиомера.

Исследования проводили на экспериментальной модели дислипидемии у крыс линии Вистар (сам-

цы, массой 250-280 г, по 10 животных в группе). Модель холестериновой дислипидемии индуцировали введением масляного раствора холестерина в дозе 40 мг/кг и витамина D3 в дозе 25000 МЕ/кг (инъекции проводили ежедневно в течение 20 суток). До начала эксперимента и в динамике (через 20 и 30 суток) у крыс определяли следующие показатели:

1. Общий холестерин (ОХС) в плазме крови.
  2.  $\beta$ -липопротеиды ( $\beta$ -ЛП).
  3. Холестерин липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП).
  4. Концентрация триглицеридов (ТГ).
  5. Индекс атерогенности (ИА).
- ИА рассчитывали по формуле:  $ИА = (ОХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП$ .

Содержание холестерина липопротеидов высокой плотности определяли по методу Абея после гепарин-марганцовой преципитации и осаждения из сыворотки липопротеидов низкой плотности. Содержание триглицеридов определяли при помощи диагностических тест-наборов.

Результаты исследований приведены в табл. 12.

Таблица 12. Влияние L-энантиомера на показатели липидного спектра плазмы крови крыс с индуцированной холестеринемией и витамином D3 дислипидемией

Группа животных	ОХС, ммоль/л	ХС ЛПВП, ммоль/л	ИА	ТГ, ммоль/л	$\beta$ -ЛП, у.е.
Интактные	1,02 ± 0,07	0,40 ± 0,02	1,50 ± 0,01	0,56 ± 0,14	6,25 ± 0,05
Контроль	1,77 ±	0,39 ±	3,53 ±	0,67 ±	16,7 ±
ль 20 суток	0,22	0,02	0,21	0,22	1,12
Контроль 30 суток	1,49 ± 0,14	0,39 ± 0,04	3,04 ± 0,32	1,12 ± 0,21	14,8 ± 2,31
L-энантиомер, 25 мг/кг	1,09 ± 0,11	0,53 ± 0,12	1,05 ± 0,04	0,42 ± 0,01	6,83 ± 1,87

Достоверность различий по сравнению с интактными и контрольными животными составляет  $p < 0,001$  и  $p < 0,01$  соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение холестерина в сочетании с витамином D3 вызывает негативные изменения в спектре плазмы крови животных, характерные для дислипидемии ПА (по классификации ВОЗ). Через 20 суток эти нарушения проявлялись в существенном повышении уровня  $\beta$ -ЛП ( $p < 0,001$ ) и увеличении ИА ( $p < 0,001$ ). Через 30 суток у животных контрольной группы помимо этих проатерогенных изменений наблюдалось также повышение ТГ ( $p < 0,01$ ) и ОХС ( $p < 0,01$ ).

Кроме того, наблюдали выраженный дисбаланс окислительно-восстановительной системы. Уровень каталазы в плазме крови был существенно снижен. Обнаружено накопление продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Введение животным, которым предварительно вводили холестерин с витамином D3, L-энантиомера в дозе 25 мг/кг перорально (с 20 по 30 сутки) оказывало выраженное липид-корректирующее действие: существенно увеличилась фракция ХС ЛПВП, снизилось содержание ОХС,  $\beta$ -ЛП и значение ИА снизилось до нормы (значение у интактных животных). Таким образом, L-энантиомер является эффективным липидрегулирующим средством.

Пример 5. Исследования острой токсичности и антигипоксической активности.

Исследования проводили на 69 белых мышах-самцах и 69 белых мышах-самках линии SHK весом 20-22 г. Экспериментальные группы животных, по 6 мышей каждого пола в группе, для проведения эксперимента по изучению острой токсичности и антигипоксической активности является репрезентативной выборкой, которая позволяет получать статистически достоверные данные, о чем свидетельствует многолетняя практика токсикологических исследований. Во время эксперимента животных содержали в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха 20-24°C, относительная влажность 50-60%.

В настоящем исследовании острую токсичность оценивали на белых аутбредных мышах обоего пола при однократном внутривенном введении соединения 1 и препарата сравнения. Белым аутбредным мышам (по 6 мышей каждого пола в группе) вводили соединение 1 или препарат сравнения в нарастающих дозах 300, 400, 500, 600, 700 мг/кг веса животного в виде раствора в воде для инъекций общим объемом 0,5 мл, что допустимо для данного вида животных.

Наблюдение за животными проводили в течение не менее 14 дней после введения. О токсичности

препаратов судили по гибели животных и общей картине интоксикации.

Фиксировали общее состояние животных: особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координацию движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные или болевые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова. Производили подсчет количества погибших в ходе эксперимента животных.

Полученные данные обрабатывались общепринятым методом вариационной статистики с вычислением среднего значения ( $M$ ) и стандартной ошибки среднего значения ( $m$ ). В качестве критерия оценки достоверности различия средних величин использовали парный  $t$ -критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони при уровне значимости  $P < 0,05$ ; для определения достоверности различий абсолютных величин использовали непараметрический критерий "хи-квадрат"; при объеме выборки менее 10 - точный критерий Фишера; для определения достоверности различий до и после введения фармакологического агента использовали критерий Уилкоксона.

На основании полученных результатов определяли характеристики "острой" токсичности с помощью пробит-анализа по Миллеру-Тейнтеру.

Клиническая картина интоксикации у мышей при введении обоих сравниваемых фармакологических агентов была идентичной. При введении токсических доз соединения 1 и препарата сравнения "Этоксидол (рацемат)" (Россия), отмечалось снижение двигательной активности животных. При увеличении дозы наблюдался кратковременный (2-3 мин) период гиперкинезии с явлениями беспокойства. Была нарушена координация движений, тонус скелетных мышц был повышен, зарегистрированы тонические и клонические судороги. В этот период наблюдались непроизвольные акты дефекации и мочеиспускания. Часть животных погибала на фоне судорог. Выжившие животные находились в "заторможенном" состоянии, что выражалось в сниженной реакции на световые, звуковые, тактильные и болевые раздражители (раздражение корня хвоста), при этом наблюдались судорожные подергивания мышц, снижение аппетита, диарея или обстипация на фоне возрастающего потребления воды. Дыхание было учащенным и поверхностным, регистрировали гипертермию. В указанном выше состоянии животные находились в течение первых двух суток, после чего их физиологическое состояние постепенно возвращалось к исходному.

В течение последующих 14 суток явления интоксикации у животных проявлялись в сниженной реакции на раздражители. Волосяной покров терял блеск, характерный для здоровых животных, кожные покровы оставались без изменений. В дальнейшем состояние животных постепенно возвращалось к норме.

При наблюдении за животными в течение 14 суток не было зарегистрировано гибели среди выживших животных.

Соединение 1 при введении мышам в дозе, составляющей 5% от значения  $LD_{50}$ , продлеvalo период биоэлектрической активности миокарда до  $696 \pm 10$  с, что статистически значимо больше аналогичных значений в контрольной группе и в группе препарата сравнения. Кроме того, под влиянием исследуемого препарата сократимость миокарда составляла  $381 \pm 9$  уд./мин. В то время как рацемат, применяемый в высшей терапевтической дозе, приводил к увеличению времени жизни подопытных животных, при котором наименьшее время сохранения биоэлектрической активности составляло 592 с, а наибольшее - 610 с.

Пример 6. Изучение противоишемической активности.

Эксперименты проводили на белых нелинейных самцах крыс, мышей, кроликов и кошек.

Изучали влияние дозы, составляющей 5% от  $LD_{50}$ , на соотношение зоны некроза к зоне ишемии при ишемическом повреждении миокарда крыс. Кроме того, изучали влияние той же дозы на развитие реперфузионных аритмий. Фибрилляцию желудочков вызывали окклюзией коронарных артерий. Затем определяли влияние препарата на кардиогемодинамику и перекисное окисление липидов (ПОЛ), индуцированные иммобилизационным стрессом.

Показано, что соединение 1 в дозе 5 мг/кг устраняет фибрилляцию желудочков при окклюзии коронарных артерий и снижает количество животных, у которых возникает фибрилляция желудочков, до 1 из 10 экспериментальных животных.

Препарат в дозе 10 мг/кг оказывает отчетливое кардиопротекторное действие на кардиогемодинамику, приближая значения сократимости ( $dP/dt$ ), АД и других значений к уровню интактного контроля.

Пример 7. Изучение нейропротекторной активности.

Нейротропная активность подтверждена на модели "обучаемость условного рефлекса пассивного избегания у необученных крыс" и тесте амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванной скополамином.

Исследование проводили на белых аутбредных половозрелых крысах-самцах массой 250-280 г.

Тест на воспроизведение обучаемости проводили через 24 ч после обучения, регистрировали латентный период захода животного в темную камеру и затем регистрировали число животных, совсем не зашедших в темную опасную камеру и оставшихся на освещенной висящей платформе (крысы, хоро-

шо помнящие ситуацию).

Соединение 1 или препарат сравнения Этоксидол вводили однократно (интрагастрально) при помощи специального зонда в объеме 0,2 мл на 100 г веса крысы за 40 мин до обучения. Животным контрольной группы вводили дистиллированную воду.

Все исследуемые вещества существенно не изменяли латентное время выполнения навыка захода в темную камеру. Латентный период захода в темную камеру при выполнении "норкового рефлекса" при первом помещении животных в камеру не изменялся по сравнению с контролем.

После этого осуществляли обучение условному рефлексу пассивного избегания (УРПИ), для чего крыса получала в темной камере небольшое болевое раздражение.

После 24 ч обучения, при последующем воспроизведении обученного, крысы помнили о болевом раздражении, полученном в темной камере, и заходили туда с большим латентным периодом. Только 1 крыса из 15-ти не зашла в темную камеру вовсе.

Результаты экспериментов показывают, что соединение 1 в дозе 200 мг/кг улучшает обучение условному рефлексу пассивного избегания у необученных крыс, что выражается в достоверном увеличении латентного времени захода в темную камеру при воспроизведении рефлекса. Препарат сравнения в дозе 200 мг/кг также улучшал обучение условному рефлексу пассивного избегания по показателю латентного периода воспроизведения рефлекса и по показателю увеличения процента животных, которые вообще не заходили в темную камеру. Таким образом, препараты имеют сходную нейропротекторную эффективность в дозе 200 мг/кг. Энантиомер в дозе 100 мг/кг проявил большую активность, чем рацемат в той же дозе.

Пример 8. Изучение гепатопротекторных свойств.

Исследование проводили на 30 пациентах-добровольцах с хроническим гепатитом, получавших стандартную терапию. Соединение 1 вводили внутривенно в виде 5% раствора в 0,9% растворе натрия хлорида по 2 мл один раз в сутки в течение 2 недель. У всех пациентов до и после назначенной терапии проводили биохимические исследования в отношении их уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), циклофосфана, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), малонового диальдегида, билирубина, общего белка и белковых фракций.

К 14 суткам у 22 больных нормализовалась активность АЛТ, которая составила  $1,30 \pm 0,2$  ммоль/л. У 89% пациентов нормализовалась концентрация билирубина. У пациентов, которым вводили соединение 1, индекс повреждения гепатоцитов был достоверно ниже, чем у пациентов, которым вводили препарат сравнения (Этоксидол, 5% раствор).

Таким образом, L-энантиомер 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния L-гидроксипуандиоата проявил гепатопротекторную активность, которая была более значимой, чем таковая у препарата сравнения "Этоксидол".

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксипуандиоата формулы  $C_{12}H_{17}NO_6$  в качестве церебропротекторного средства.
2. Применение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксипуандиоата формулы  $C_{12}H_{17}NO_6$  в качестве гепатопротекторного средства.
3. Применение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксипуандиоата формулы  $C_{12}H_{17}NO_6$  в качестве липидрегулирующего средства.
4. Применение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксипуандиоата формулы  $C_{12}H_{17}NO_6$  в качестве противоишемического средства.
5. Применение L-энантиомера 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния гидроксипуандиоата формулы  $C_{12}H_{17}NO_6$  в качестве нейротропного средства, обладающего нейропротекторной активностью.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---