

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042943**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.04.06**

**(21)** Номер заявки  
**202090755**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.06.16**

**(51)** Int. Cl. *A61K 31/352* (2006.01)  
*A61K 31/409* (2006.01)  
*A61K 8/49* (2006.01)  
*A61K 31/593* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)  
*C40B 40/04* (2006.01)  
*A61K 8/67* (2006.01)  
*A61P 9/10* (2006.01)  
*A61P 17/02* (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ КОМБИНАТОРНОГО ПРОИЗВОДНОГО КВЕРЦЕТИНА**

**(43)** 2020.08.11

**(86)** РСТ/RU2017/000425

**(87)** WO 2018/231092 2018.12.20

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ;  
ФАРБЕР СОФЬЯ БОРИСОВНА (RU)**

**(72)** Изобретатель:

**Фарбер Борис Славинович, Фарбер  
Софья Борисовна (RU), Мартынов  
Артур Викторович (UA)**

**(74)** Представитель:

**Васильева Г.С. (RU)**

**(56)** WO-A1-2013130020  
RU-C1-2124884  
RU-C1-2416423  
SU-A3-1774871

ZHILKINA V. JU. at al. Fitosomy -  
innovatsionnaia tekhnologia dostavki rastitelnykh  
komponentov. Uspekhi sovremennogo estestvoznania,  
2015, No. 11, p. 31-34  
WO-A2-2010053573

**(57)** Изобретение относится к комбинаторной химии, фармации и позволяет синтезировать новые комбинаторные библиотеки кверцетина для применения в фармации и косметологии, в том числе для создания средств омоложения организма, лечения таких заболеваний человека, как атеросклероз и его осложнения, гипертоническая болезнь. В основу изобретения поставлена задача разработать косметологическую и фармацевтическую композицию на основе комбинаторного производного кверцетина в виде наночастиц (липосом) для терапии атеросклероза и его осложнений, а также гипертонической болезни, для омоложения организма и заживления ран. Поставленная задача решается путем получения фармацевтической композиции на основе комбинаторного производного кверцетина, отличающейся тем, что модифицированное комбинаторное производное кверцетина представлено в виде комбинаторной библиотеки (смеси) производных кверцетина, полученных путем одновременной комбинаторной модификации кверцетина двумя модификаторами, такими как янтарный ангидрид и уксусный ангидрид в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных кверцетина из 92 молекул. На основе комбинаторного производного кверцетина получают фармацевтическую композицию в форме наночастиц - везикул с антигипертензивным и антиатеросклеротическим действием, омолаживающим и ранозаживляющим действием. Технический результат заключается в разработке новой фармацевтической композиции на основе комбинаторного производного кверцетина в виде наночастиц для терапии атеросклероза и его осложнений, а также эффективной в лечении гипертонической болезни.

**B1****042943****042943****B1**

### Область техники

Изобретение относится к комбинаторной химии, фармации и косметологии, позволяет синтезировать новые комбинаторные библиотеки кверцетина для применения в фармации и косметологии и фармации, в том числе для создания средств омоложения организма, лечения таких заболеваний человека, как атеросклероз и его осложнения, гипертоническая болезнь.

### Предшествующий уровень техники

Комбинаторная химия, методология органического химического синтеза имеют своей целью синтез большого массива однотипных химических соединений (комбинаторных библиотек) наиболее быстрым и экономичным способом, используя специфические подходы и технологии. Необходимость синтеза обширных комбинаторных библиотек возникла в 1990-х гг. и была продиктована запросами тех областей промышленности, где поиск веществ с полезными свойствами нередко эффективнее вести путём эмпирического перебора свойств на больших выборках однотипных соединений. Основой для разработки нового направления химического синтеза послужил предложенный Р. Меррифилдом твердофазный пептидный синтез. Особенно интенсивно методы комбинаторной химии применяются в фармацевтике (дизайн новых лекарственных средств), при поиске эффективных катализаторов (полимеризации и пр.), дизайне наноматериалов. Для тестирования комбинаторных библиотек разработаны автоматизированные системы-роботы, производительность которых достигает 100 тысяч образцов в день (так называемый высокопроизводительный скрининг; от английского screening - просеивание).

На практике комбинаторная химия представляет собой совокупность приёмов и методов комбинирования многообразных исходных химических реагентов для получения как можно более разнообразных массивов химических продуктов путём проведения десятков, сотен, а иногда и тысяч параллельных химических превращений с образованием огромного числа конечных продуктов. Комбинаторная химия решает задачи, редко возникавшие в классическом химическом синтезе, а именно - быстро синтезировать много веществ, как правило, сложных по структуре и достаточно чистых. Разработка новых экономичных и скоростных технологий параллельного синтеза и параллельной очистки веществ достигается разнообразными путями. Вместо стандартного жидкофазного синтеза (одно вещество в одном сосуде за один приём) ставится множество синтезов (например, в пластиковой плашке с множеством ячеек, куда вещества вносят многоканальными пипетками). Вместо кипячения с обратным холодильником используют нагревание множества герметичных капсул (в ячеистом термостате или СВЧ-печи). Для фильтрации множества веществ используют "сосуды-фильтры" (например, плашки с пористым дном). Упаривание осуществляют вакуумным вымораживанием растворителя из центрифугируемых (для предотвращения вспенивания) плашек. Для очистки используют методы параллельной хроматографии, объединяя в блоки множество хроматографических колонок. В методах жидкофазной комбинаторной химии стараются использовать лишь те реакции, которые протекают с высокими выходами и требуют минимальных усилий по очистке веществ. Для достижения большего разнообразия продуктов обычные двухкомпонентные реакции заменяют на многокомпонентные. Мощной технологией комбинаторной химии является твердофазный синтез - проведение реакций на модифицированной полимерной подложке. В этом случае сложная молекула (например, полипептид требуемой последовательности или сложное гетероциклическое соединение) иммобилизуется ("наращивается") на поверхность полимера в ходе последовательности реакций, а затем, на заключительном этапе, отщепляется с твёрдой подложки вследствие каких-либо химических превращений. Поэтому реакции можно проводить при большом избытке реагента, отмывая последний от полимера с целевым веществом и сводя синтез к принципу "чайного пакетика" (пористые пакеты с гранулами полимера последовательно помещают в стаканчики с реагентами). Новой технологией является замена твёрдых полимеров на перфторированные жидкости (не смешивающиеся с водой и стандартными растворителями). Для иммобилизации (перевода вещества в перфторированную фазу) к молекуле исходного реагента присоединяют протяжённый перфторалкильный фрагмент. Это позволяет проводить синтез в эмульсиях с последующим разделением жидких фаз. Комбинированным методом комбинаторной химии является использование твердофазных реагентов (окислитель, кислота, основание иммобилизованы на полимере). Избыток твёрдого реагента вносят в растворы веществ, а затем отделяют фильтрованием. Другим приёмом является использование так называемых скавенджеров (от английского scavenger - мусорщик) - в раствор вносят модифицированный полимер, который селективно удаляет из реакционной смеси ненужный реагент, взятый в избытке. Всё шире используются программируемые промышленные роботы, выполняющие последовательность рутинных однообразных процедур по выделению и очистке веществ (автоматические синтезаторы). Эффективность использования комбинаторной химии доказана на примерах обнаружения новых лекарственных препаратов и катализаторов [1-4].

Предложенная авторами схема синтеза комбинаторных производных на основе полифункциональных исходных молекул путем реакции с двумя и более исходными модификаторами без последующего разделения и выделения каждого отдельного производного является уникальной и показала увеличение биологической активности от 2 до 300 раз для разных исходных молекул: полимиксина, гентамицина, стрептомицина, отдельных олигомерных РНК и ДНК, полисахаридов, белков, кверцетина и многих других веществ. Важным новшеством в данном подходе является правильный расчет мольного соотношения количества реагентов: как исходного полифункционального соединения (в данном случае - кверцетина),

так и модификаторов. При корректном соотношении компонентов образуется максимально возможная комбинация производных. Эта смесь не является классическим раствором или смесью после синтеза, а в водных растворах образует супрамолекулярные структуры друг с другом в произвольных положениях и ведет себя как исходный кверцетин, но с более выраженной биологической активностью и пролонгированным действием. Образование супрамолекулярных структур можно проследить по отсутствию разделения полосы комбинаторного производного на хроматографическом пике: любые изменения условий разделения не смогли привести к разделению смеси, при этом на  $^1\text{H}$  ЯМР спектре наблюдался явный хаос из полос поглощения водородов как метильных групп остатка уксусной кислоты, так и этильных групп остатка янтарной кислоты и водородов, не замещенных фенильных гидроксильных групп. Таким образом, данная комбинаторная супрамолекулярная структура ведет себя совершенно по-иному, проявляет новые физико-химические свойства и биологическую активность в меньших концентрациях и значительно дольше, чем исходный кверцетин.

#### Кверцетин.

Защита головного мозга от ишемического повреждения и улучшение функционального исхода ишемического инсульта - одна из главных задач современной неврологии. Кроме того, при мозговом инсульте необходимы профилактика и лечение сердечно-сосудистых нарушений. С учетом этого оправдан поиск лекарств, обладающих полимодальным воздействием, что позволит расширить выбор и возможности лечения мозгового инсульта и его осложнений. К таким лекарственным средствам можно отнести препарат Корвитин (Борщаговский химико-фармацевтический завод, Украина, Киев), позволяющий сразу воздействовать на различные звенья патобиохимического процесса. Кверцетин, активное вещество препарата, проявляет свойства модулятора активности различных ферментов, принимающих участие в деградации фосфолипидов, влияющих на свободнорадикальные процессы и отвечающих за биосинтез в клетках оксида азота, протеиназ и других, которое проявляется кардиопротекторным действием при ишемическом и реперфузионном поражениях миокарда. Корвитин проявляет также антиоксидантные и иммуномодулирующие свойства, тормозит процессы тромбогенеза. Препарат восстанавливает региональное кровообращение и микроциркуляцию без заметных изменений тонуса сосудов, повышая реактивность микрососудов. Корвитин нормализует церебральную гемодинамику при ишемических поражениях, снижает коэффициент асимметрии мозгового кровотока при ишемическом инсульте. Эти качества препарата особенно важны при терапии у пациентов с инсультом и его сердечно-сосудистыми осложнениями, особенно, когда перед врачом стоит вопрос, как лечить таких больных. Поскольку многие церебральные вазоактивные препараты имеют побочный эффект - синдром обкрадывания - и их невозможно применять при лечении пациентов с инсультом с сердечно-сосудистыми осложнениями. Результаты проведенных клинико-неврологических исследований свидетельствуют о безопасности и высокой эффективности Корвитина при лечении пациентов с ишемическим инсультом и сердечно-сосудистыми нарушениями. Препарат можно применять у больных с сердечно-сосудистыми осложнениями при ишемическом инсульте на фоне базового лечения. Установлено благоприятное влияние препарата в суточной дозе 0,5 г на течение острого периода ишемического инсульта при разной тяжести заболевания. Установлено благоприятное влияние препарата в суточной дозе 0,5 г на течение острого периода ишемического инсульта при разной тяжести заболевания. Использование препарата Корвитин достоверно повышает уровень социальной адаптации у пациентов в остром периоде инфаркта мозга. Отмечено достоверное улучшение когнитивных функций и психоэмоционального состояния у пациентов, получавших Корвитин на фоне стандартной терапии. Одновременное использование Корвитина на фоне стандартной терапии приводит к улучшению качества жизни. Корвитин способствует нормализации баланса между возбуждающими нейромедиаторами нервной системы и тормозящими ее функциями. Получение комбинаторных производных с разбросом физико-химических свойств позволит как пролонгировать действие кверцетина, расширить спектр его действия, так и увеличить его биодоступность.

#### Хлорофиллипт.

Хлорофиллипт представляет собой купрофиллин, полученный из хлорофилла эвкалипта, и предназначен для применения в качестве антимикробного средства для лечения стафилококковых инфекций. Производится он в виде спиртовых растворов для перорального и внутривенного введения (после разведения физ. раствором). В последнее время у хлорофиллипта было выявлено ряд новых свойств, неизвестных ранее, в частности противовоспалительное действие, антиаллергические свойства. Полученные данные свидетельствуют о том, что включение в комплексное лечение больных сахарным диабетом хлорофиллипта оказывает выраженный нейтрализующий эффект на агрессивные аутоиммунные процессы. Известно, что мелко- и среднемолекулярные ЦИК, наряду с микробами, выступают активным фактором активации комплемента, сопровождающейся образованием анафилатоксинов и факторов с цитолитическими свойствами. Помимо того, взаимодействие иммунных комплексов с полиморфноядерными лейкоцитами приводит к выбросу в межклеточное пространство активных форм кислорода, оксида азота, катионов, лизосомных литических энзимов - субстанций, действующих на ткани разрушающе. Агрессивными факторами также выступают аутоантитела к коллагену и эластину и ФНО $\alpha$ , способные индуцировать дегенеративные процессы в ткани. Массивная продукция полиморфноядерными лейкоцитами и мононуклеарными клетками *in situ* провоспалительных цитокинов и супероксидных радикалов способству-

ет развитию воспаления и усилению экссудации из плазмы крови клеточных и гуморальных факторов с литическими свойствами. Кроме того, иммунные комплексы и цитокины, индуцируя агрегацию тромбоцитов, способствуют формированию микротромбов, затрудняющих капиллярный кровоток, что, в свою очередь, приводит к ишемизации ткани и способствует развитию атеросклероза и его осложнений. Помимо того, активация тромбоцитов, полиморфноядерных лейкоцитов, мононуклеаров, лимфоцитов микробами и их токсинами, а также поступление в общий кровоток различных провоспалительных факторов индуцируют генерализованную воспалительную реакцию, которая негативно отражается на общем клиническом статусе больных и их иммунореактивности. У больных с осложнениями атеросклероза на фоне иммунной воспалительной реакции как одного из этиологических факторов, которые в комплексной терапии получали внутривенно хлорофиллипт, отмечается значительное снижение экзопродукции клетками супероксидных радикалов и снижение содержания в сыворотке крови провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$  по сравнению с больными, которые в комплексном лечении не получали хлорофиллипт. При включении в комплексное лечение больных, хлорофиллипта отмечается более динамичное снижение содержания аутоантител к коллагену и эластину и ЦИК в сыворотке крови, чем у больных, не получавших хлорофиллипт. Включение хлорофиллипта в фармацевтическую композицию для коррекции последствий атеросклероза может значительно улучшить качество жизни пациентов, устранить рецидивы атеросклероза и затормозить его дальнейшую прогрессию. Недостатком хлорофиллипта является его полная гидрофобность, для решения этой проблемы авторами предложено получение нановезикулярных суспензионных форм с интегрированным в мембраны хлорофиллиптом - липосом и молочных везикул.

#### Холекальциферол.

Последние данные подтверждают взаимосвязь атеросклероза с остеопорозом, что свидетельствует о параллельности прогрессирования этих двух заболеваний. Несколько эпидемиологических и клинических исследований показали, что существует зависимость между гиповитаминозом Д и сердечно-сосудистыми заболеваниями, эпидемиологические и экспериментальные исследования показали, что низкий уровень витамина Д может играть важную роль при сердечно-сосудистых заболеваниях, включая ИБС, застойную сердечную недостаточность, клапанные кальцификации, инсульт, гипертония и когнитивные нарушения. Гиповитаминоз Д считается фактором риска развития атеросклероза. Дефицит витамина Д приводит к изменению сосудистых гладкомышечных клеток, эндотелиальной дисфункции, увеличению перекисного окисления различных аутоиммунных заболеваний, это связано с несколькими иммуносупрессивными свойствами витамина. Существует много текущих исследований в связи с возрастающей ролью витамина Д в иммунопатологии. Все больше публикаций выделяют витамин Д в патологии иммунных заболеваний, в том числе аллергических, хотя патогенез до конца остается неясным. Обнаружено, что синтетические агонисты VDR обладают антипролиферативными, пролифференцированными, антибактериальными, иммуномодулирующими и противовоспалительными свойствами, и это может быть использовано для лечения различных аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, болезнь Крона. Исследования, проведенные на животных моделях рассеянного склероза, инсулинозависимого сахарного диабета, воспалительных заболеваний кишечника и при трансплантации, подтвердили гипотезу, что 1 альфа, 25-(ОН) $_2$ Д $_3$  приводит к усилению функции Т-супрессоров. И эти данные стимулируют интерес к иммунологической роли витамина Д. Также обнаружено, что 1,25-дигидроксид Д $_3$  задерживает клеточное репликативное старение в человеческих мезенхимальных стволовых клетках при сохранении их мультипотентной мощности. Кроме того, фармакологические дозы 1,25-дигидроксид Д (1,25-(ОН) $_2$ Д $_3$ ) предотвращают сахарный диабет 1 типа при ожирении у мышей, вызывая иммунную модуляцию, напрямую воздействуя на бета-клетки поджелудочной железы. В ткани поджелудочной железы, в частности в бета-клетках, как и в клетках иммунной системы, присутствуют рецепторы витамина Д и витамин Д-связывающего белка. Предполагается, что витамин Д может способствовать сохранению секреции инсулина. При сахарном диабете 2 типа витамин Д увеличивает чувствительность клеток к инсулину и снижает воспаление в тканях поджелудочной железы. Многие доклинические исследования подтверждают роль витамина Д в патогенезе обоих типов диабета. Так, пациенты с обоими типами сахарного диабета имеют более высокий уровень гиповитаминоза Д, чем здоровые люди. Клинические исследования подтвердили, что гиповитаминоз Д является фактором риска для развития резистентности к инсулину независимо от наличия ожирения у детей. Возможно в дальнейшем необходимо ориентироваться на терапевтический потенциал витамина Д в профилактике/лечении сахарного диабета 1 и 2 типов, а также его осложнений. На основные вопросы еще предстоит ответить - может ли увеличение потребления витамина Д в максимальных дозах у здоровых людей снизить риск развития диабета, тяжесть заболевания и его осложнения, в том числе и сердечно-сосудистую патологию. Обнаружено, что активация VDR в почках предотвращает проявления почечной патологии. И лечение *in vivo* агонистом доксеркальциферола (1- $\alpha$ -гидроксивитамина Д $_2$ ) предотвращает заболевание почек. Результаты показывают, что при лечении витамин Д $_3$  действует несколькими механизмами: развитие иммунитета легких, снижение воспаления, уменьшая гиперплазию и повышая воздействие экзогенных стероидов. Обнаружено, что ядерный статус VDR может быть прогностическим маркером при раке легкого. Существует высокая распростра-

ненность дефицита витамина Д у пациентов с болезнями легочной интерстициальной ткани, и это связано с со снижением функции легких. Так, дефицит витамина Д способствует развитию легочного фиброза. Выявлено, что Д(3) тормозит профиброзный фенотип легочных фибробластов и эпителиальных клеток. Установлено, что толстая кишка, молочная железа, простата, макрофаги и кожа имеют ферментативные механизмы для производства 1,25-дигидрокси Д. Циркулирующий в крови 25-гидроксивитамин Д<sub>3</sub> (25-[ОН]Д), наиболее часто используемых для оценки статуса витамина Д, превращается в активный гормон 1,25-дигидроксивитамина Д<sub>3</sub> (1,25-[ОН]<sub>2</sub>Д), который, действуя через VDR, подавляет пролиферацию клеток *in vitro*, индуцирует дифференцировку и апоптоз, клеточную миграцию, таким образом, и 25-гидроксивитамин Д<sub>3</sub> (25-[ОН]Д), и 1,25-дигидроксивитамин Д<sub>3</sub> (1,25-[ОН]<sub>2</sub>Д) могут предотвращать онкозаболевания. На современном этапе ряд исследований подтверждают роль витамина Д в качестве профилактического и лечебного средства против онкологических заболеваний. Недостаточный уровень 25-гидроксивитамина Д (25-(ОН)Д) связан с повышенным риском и неблагоприятным прогнозом нескольких типов рака. С помощью мета-анализа рандомизированных исследований доказано, что витамин Д добавки сокращают общую смертность и прогрессирование меланомы. Эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что низкий уровень витамина Д может играть определенную роль в возникновении и прогрессировании рака молочной железы, легких, толстой кишки и рака предстательной железы, а также злокачественной лимфомы. Кальцитриол обладает сильным антипролиферативным действием в простате, молочной железе, толстой кишке, голове/шее, при раке легких, а также лимфатической системы, лейкемии, миеломе. Антипролиферативные эффекты проявляются и *in vitro*, и в клинических условиях. Механизм этих эффектов связан с блокадой G0/G1, индукцией апоптоза, дифференциации и модуляции фактора роста в опухолевых клетках. Кроме прямого воздействия на опухолевые клетки, последние данные убедительно подтверждают гипотезу о стромальных эффектах витамина Д аналогов (например, прямое воздействие на сосудистую сеть опухоли). Giovannucci и др., которые разработали и утвердили оценки уровня в сыворотке 25-(ОН) холекальциферола и сообщили, что среди более 40000 лиц в исследовании увеличение уровня 25-(ОН) холекальциферола до 62,5 нг/мл было связано со снижением риска рака головы/шеи, пищевода, поджелудочной железы, острого лейкоза на более чем 50%. В последнее время было проведено большое количество исследований генов VDR (полиморфизм фрагментов) для различных типов рака. Было высказано предположение, что VDR полиморфизм может влиять как на риск возникновения рака, так и на его прогноз. Определено влияние витамина Д на аспекты нервно-мышечных функций. По исследованиям авторов изобретения добавки витамина Д повышают нервно-мышечную или нейропротекторную функцию, которая может объяснить механизм роль витамина Д в снижении падений и переломов. Установлено, что витамин Д обладает потенциальной антимикробной активностью, снижая восприимчивость к инфекции у пациентов с атопическим дерматитом. Витамин Д способен регулировать местные иммунно-воспалительные реакции представляя большой потенциал для понимания патогенеза и лечения хронических воспалительных дерматитов. Риск заражения инфекцией снижается посредством нескольких механизмов: стимуляцией врожденного иммунитета путем модуляции производства антимикробных пептидов (АМП) и влиянием на цитокины. По данным исследований эти механизмы играют все более важную роль в развитии атопического дерматита, псориаза, витилиго, акне и розацеа. Витамин Д<sub>3</sub> рассматривается в качестве основ- показателями обеспеченности витамином Д являются: концентрация в плазме крови 25-гидроксивитамина Д и паратиреоидного гормона, а также наличие или отсутствие клинических проявлений рахита. Таким образом, холекальциферол или витамин Д<sub>3</sub> является одним из наиболее интересных кандидатов в разработку композиций для предотвращения и лечения атеросклероза и его осложнений. Витамин Д<sub>3</sub> подобно хлорофиллипту является гидрофобным соединением и авторами изобретения предложено ввести его в везикулы (в фосфолипиды липосом, молочные везикулы, полимерные везикулы на основе полисорбатов).

### Терминология

Формилирование - процесс присоединения остатка муравьиной кислоты к аминогруппам, спиртовым группам с образованием остатка альдегидной группы. Известно множество именных реакций формилирования (реакция Даффа, реакция Гаттермана, реакция Губена-Гёша, реакция Гаттермана-Коха).

Ацилирование - введение ацильного остатка RCO-(ацила) в состав органического соединения, как правило, путём замещения атома водорода, введение остатка уксусной кислоты CH<sub>3</sub>CO- называют ацетилированием, бензойной C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CO- - бензоилированием, муравьиной HCO- - формилированием. В зависимости от атома, к которому присоединяется ацильный остаток, выделяют С-ацилирование, N-ацилирование, О-ацилирование. В качестве ацилирующих агентов используют галогенангидриды и ангидриды кислот.

Алкилирование - введение алкильного заместителя в молекулу органического соединения. Типичными алкилирующими агентами являются алкилгалогениды, алкены, эпоксисоединения, спирты, реже альдегиды, кетоны, эфиры, сульфиды, диазоалканы. Катализаторами алкилирования являются минеральные кислоты, кислоты Льюиса а также цеолиты. Алкилирование широко применяется в химической и нефтехимической промышленности.

Комбинаторный синтез - синтез методами комбинаторной химии, включает одновременную реакцию между тремя и более реагентами с образованием комбинаторного продукта синтеза, состоящего из

десятков производных. Эти производные затем разделяют хроматографически, подтверждают их структуру и изучают биологическую активность.

Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами - если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу, имеющую более двух доступных для модификации групп, и в реакцию сразу вводят два модифицирующих агента, например уксусный ангидрид и янтарный ангидрид. В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях - ацетил-сукцинил производных.

Комбинаторная библиотека (combinatorial library) [лат. combinare - соединять, сочетать; греч. biblion - книга и theke - хранилище] - набор большого числа всевозможных химических соединений, белков, генов или олигонуклеотидов, позволяющий осуществлять в нем быстрый поиск целевых генов или белков-мишеней. Например, набор, состоящий из миллионов различных химических веществ, или совокупность рекомбинантных молекул ДНК, полученная встраиванием в вектор кДНК легкой и тяжелой цепей различных антител, и др.

Известны вицианозилированные производные кверцетина [US Patent 3888842]. Данные производные лучше накапливаются в стенках капилляров и более крупных сосудов, дольше там находятся. Недостатком патентуемых производных является искусственная вицианозильная группа, которая довольно токсична и не метаболизируется до полного усвоения организмом. Предложенные производные являются полностью ксенобиотическими, не представляют собой комбинаторных смесей в виде супрамолекулярных структур и не могут "подстраиваться" под индивидуальные особенности организма подобно комбинаторным системам. Кроме того, патентуемые в прототипе производные вообще не проявляли антиатеросклеротического и гипотензивного эффекта. Известен другой аналог - композиция и методы для предотвращения сердечно-сосудистых заболеваний [US Patent application US 2012/0100123 A1 и US Patent 9278109 B2], композиция базируется на смеси из витаминов CoQ10, омега-жирных кислот, природных биофлавоноидах (в том числе кверцетине), натуральном витамине Е, аминокислотах, минералах, оливковом масле, лецитине, витаминах группы В, антиоксидантах. Отличием данной композиции от предложенной авторами изобретения является отсутствие хлорофиллипта, комбинаторной смеси кверцетина и витамина Д<sub>3</sub> в форме наночастиц (липосом или молочных липидных везикул), которые являются ядром предлагаемой композиции и обеспечивают явный фармакологический эффект в отличие от предложенной в заявке композиции. При этом композиция-прототип также содержит биофлавоноиды (в том числе кверцетин) и витамины (кроме витаминов группы Д). Двойная модификация кверцетина позволяет получить 92 производных, которые друг с другом образуют более сложную супрамолекулярную структуру (суперструктуру), биологические свойства которой значительно превышают таковые у чистого кверцетина, а такая структура способна адаптироваться к изменяющимся внешним условиям (адаптироваться).

#### Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставлена задача разработать фармацевтическую композицию на основе комбинаторного производного кверцетина для терапии атеросклероза и его осложнений, а также гипертонической болезни, омоложения организма, создания композиций для заживления ран. Поставленная задача решается путем получения косметологической и фармацевтической композиции на основе комбинаторного производного кверцетина, которая содержит в качестве действующих веществ густой экстракт хлорофиллипта и холекальциферол, при этом комбинаторное производное кверцетина представлено в виде неразделенной супрамолекулярной смеси модифицированных комбинаторных производных кверцетина в липофильной фазе, полученных путем одновременной комбинаторной модификации кверцетина двумя модификаторами, такими как янтарный ангидрид и уксусный ангидрид в мольном соотношении компонентов (кверцетин:1-й модификатор:2-й модификатор = 92:155:155) в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных кверцетина из 92 молекул, при таком соотношении компонентов, мас. %:

неразделенная супрамолекулярная смесь модифицированных комбинаторных производных кверцетина: 0,5-20;

формообразующее вещество: 50-70;

густой экстракт хлорофиллипта: 2-7;

холекальциферол: 1,0-3,0;

вспомогательные вещества: до 100.

При этом полученную комбинаторную смесь производных кверцетина не очищают на отдельные компоненты, а используют целиком в качестве основного действующего вещества для предотвращения адаптации организма (эффекта соскальзывания). Двойная модификация кверцетина приводит к увеличению количества его производных, что проявляется в усилении его фармакологической активности, расширению спектра действия и пролонгированию его нахождения в организме. Суперэффектом такого производного кверцетина и композиций на его основе является высокая антиатеросклеротическая активность *in vivo*, редукция атеросклеротических бляшек, в том числе кальцинированных, чего пока не удалось добиться другими препаратами за счет комплексного противовоспалительного действия, а также новый эффект - выраженный гипотензивный.

### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схема химического синтеза комбинаторно модифицированных производных кверцетина.

Фиг. 2. ВЭЖХ (Милихром А-02) кверцетина (I), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 3. ВЭЖХ (Милихром А-02) пентасукцинил-кверцетина (IVc), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 4. ВЭЖХ (Милихром А-02) пентаацетил-кверцетина (IVb), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 5. ВЭЖХ (Милихром А-02) комбинаторного супрамолекулярного производного кверцетина (IVd), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

### Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы получения патентуемой фармацевтической композиции (ПФК). ПФК композицию можно вводить перорально или можно вводить внутрисосудистой, подкожной, внутривенной инъекцией, в форме аэрозоля, глазным способом введения, в мочевого пузыря, местно и т.д. Например, способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники. Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого антимикробного ПФК, природы заболевания, частоты введения, способа введения, клиренса используемого агента из организма хозяина и т.п. Начальная доза может быть более высокой с последующими более низкими поддерживающими дозами. Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки, два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы. Во многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза, чем для внутривенного введения ПФК могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения. Более конкретно, ПФК по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляционного применения, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. Как таковое, введение соединений может быть осуществлено различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, ректальное, парентеральное, внутривенное, внутрикожное, чрескожное, интратрахеальное введение и т.д. ПФК по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. ПФК по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например, клопидогрелем, противовоспалительными агентами и т.д.). В фармацевтических лекарственных формах соединения могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей. Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения соединения могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами. ПФК могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. ПФК могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения. Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п. Кроме того, ПФК могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ, таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать наполнители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, расплавляющиеся при температуре тела, но твердые при комнатной температуре. Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая единица дозы, например чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит predetermined количество композиции, содержащей одно или более соединений по настоящему изобретению. Сходным образом, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в сте-

рильной воде, нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо известны в данной области техники. Имплантаты изготавливают в форме микросфер, пластинок и так далее с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер, хорошо переносимый хозяином. Имплантат, содержащий ПФК по изобретению, располагают близко к очагу патологии, так чтобы локальная концентрация активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела. При использовании здесь термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных, при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению, которого, согласно вычислениям, достаточно для оказания желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения, и эффекта, который должен быть достигнут, и фармакодинамики используемого соединения у хозяина. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители, общедоступны. Кроме того, общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п. Типичные дозы для системного введения варьируют от 0,1 мкг до 1000 мг на 1 кг массы тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект длительного высвобождения может быть обусловлен материалами, из которых изготовлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения. Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных соединений обладают большей активностью, чем другие. Предпочтительные дозы данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение физиологической активности ПФК. Один из интересующих способов представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток. Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных способов поддержания контакта, таких как выделение, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы разработаны для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами, опосредующими слияние мембран, такими как вирус Сендай или вирус гриппа и т.д. Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды будут обычно нейтральными или кислыми липидами, такими как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и т.п. Для получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al. (1991), J. Biol. Chem. 266:3361. Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую пептиды, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 с, пробирку помещают в теплую водяную баню приблизительно при 25-40°C и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем приблизительно в 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы супрамолекулярные структуры с высокой суммарной молекулярной массой. Также вместо хлорофиллипта может быть использован краситель купрофиллин хлорофиллин, а вместо холекальциферола - его синтетические производные.

Композиции с другими активными агентами.

Для применения в рассматриваемых способах ПФК по изобретению могут быть включены в композиции с другими фармацевтически активными агентами, в частности другими кардиотропными и антиатеросклеротическими агентами. Другие интересующие агенты включают широкий спектр ангионитических, гипотензивных, тромболитических, противовоспалительных средств, известных в данной области техники. Классы средств для терапии атеросклероза и его осложнения представлены в стандартизованных протоколах лечения данной патологии и могут комбинироваться с патентуемыми ПФК. В композицию ПФК по изобретению могут также быть включены цитокины, например интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа, интерлейкин 12 и т.д. Далее настоящее изобретение описано следующими примерами, которые не следует толковать как ограничивающие объем изобретения.



Пример 1. Получение комбинаторной смеси кверцетина (ККПВ).

В 10 мл диоксана растворяют 92 мМ кверцетина (I), добавляют 155 мМ янтарного ангидрида (III) и 155 мМ уксусного ангидрида, раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты. Комбинаторную смесь используют для получения фармацевтических композиций, изучения структуры, определения биологической активности. На фиг. 1 приведена схема синтеза комбинаторных производных кверцетина.

Одна исходная молекула кверцетина содержит 5 доступных для модификации фенольных гидроксильных групп.

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики:  $m=4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$ ;  $k=n \times (2^n - 1)$ , где  $m$  - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей кверцетина для реакции;  $n$  - количество доступных для модификации фенольных гидроксидов в структуре кверцетина ( $n=5$ );  $k$  - количество молей каждого модификатора. Таким образом, имея только одну исходную молекулу кверцетина и два модификатора после комбинаторного синтеза, получаем 92 комбинаторных производных с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной смеси. Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно, так и последовательно - либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь с обратным холодильником 20 мин, а затем ввести уксусный ангидрид и также прогреть смесь еще 20 мин. Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид, этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлоруксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилахлорид). В связи со сложностью полученной структуры  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры определяли только для трех соединений - (I), (IVb), (IVc) на спектрометре Bruker 300.

$^1\text{H}$  ЯМР для исходного кверцетина: s: 10,68; 16,47; 10,18; 10,68; 16,77; 6,02; 5,94; d: 6,51; 9,48; m 6,5-7,0.

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития. Комбинаторное производное на хроматограмме (фиг. 4) давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты, хотя время удержания отличалось как от кверцетина, так и от его полностью замещенных производных. Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в данном случае их 92) образовывались сложные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (ККПВ) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил:вода) и дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных.

В табл. 1 приведен результат скрининга производных кверцетина с разным соотношением модификаторов в качестве ингибиторов уреазы (на примере соевой уреазы). Известно, что исходный кверцетин является ингибитором уреазы с умеренной степенью ингибирования ( $\text{ED}_{50}=200$  мкг/мл). Тест проводили микрометодом в планшете по способности производных кверцетина ингибировать процесс разрушения мочевины уреазой. Выделение аммиака окрашивало раствор в лунках в зеленый цвет в присутствии рН-чувствительного индикатора, интенсивность окраски определяли спектрофотометрически на СФ-ридере СтатФакс-303. Эффективную концентрацию определяли двукратными разведениями до момента 50% ингибирования уреазы ( $\text{ED}_{50}$ ). Ошибка спектрофотометра составила 10%.

Таблица 1

Ингибирующая способность в отношении уреазы со стороны  
супрамолекулярных комбинаторных производных кверцетина,  
полученных в реакции с разным мольным соотношением модификаторов

| № п/п | Мольные соотношения реагентов* |        |        | ЕД <sub>50</sub> по отношению к уреазе,<br>мкг/мл, ошибка измерений 10% |
|-------|--------------------------------|--------|--------|-------------------------------------------------------------------------|
|       | m                              | k1     | k2     |                                                                         |
| 1     | 92                             | 930*** | 930*** | >400                                                                    |
| 2     | -//-                           | 465    | 465    | 200                                                                     |
| 3     | -//-                           | 155    | 155    | 1                                                                       |
| 4     | -//-                           | 77     | 77     | 50                                                                      |
| 5     | -//-                           | 39     | 39     | 200                                                                     |
| 6     | -//-                           | 19     | 19     | 200                                                                     |
| 7     | -//-                           | 10     | 10     | 100                                                                     |
| 8     | -//-                           | 5      | 5      | 200                                                                     |
| 9     | -//-                           | 2      | 2      | 200                                                                     |
| 10    | -//-                           | 1      | 1      | 200                                                                     |
| 13    | -//-                           | 0      | 0      | 200                                                                     |
| 14    | -//-                           | 930*** | 0      | >400                                                                    |
| 16    | -//-                           | 465    | 0      | 200                                                                     |
| 17    | -//-                           | 155    | 0      |                                                                         |
| 18    | -//-                           | 77     | 0      |                                                                         |

|    |      |         |         |      |
|----|------|---------|---------|------|
| 19 | -//- | 39      | 0       |      |
| 20 | -//- | 19      | 0       | 100  |
| 21 | -//- | 10      | 0       | 100  |
| 22 | -//- | 5       | 0       | 200  |
| 23 | -//- | 2       | 0       | 200  |
| 24 | -//- | 1       | 0       | 200  |
| 25 | -//- | 0       | 1860*** | >400 |
| 26 | -//- | 1       | 930     | >400 |
| 27 | -//- | 0       | 465     | 200  |
| 28 | -//- | 0       | 155     | 200  |
| 29 | -//- | 0       | 77      | 200  |
| 30 | -//- | 0       | 39      | 200  |
| 31 | -//- | 0       | 19      | 200  |
| 32 | -//- | 0       | 10      | 200  |
| 33 | -//- | 0       | 5       | 200  |
| 34 | -//- | 0       | 2       | 200  |
| 35 | -//- | 0       | 1       | 200  |
| 36 | -//- | 1860*** | 1       | >400 |
| 37 | -//- | 930     | 1       | >300 |
| 38 | -//- | 465     | 2       | 200  |
| 39 | -//- | 155     | 5       | 200  |
| 40 | -//- | 77      | 10      | 200  |
| 41 | -//- | 39      | 19      | 200  |
| 42 | -//- | 19      | 39      | 200  |
| 43 | -//- | 10      | 77      | 200  |
| 44 | -//- | 5       | 155     | 200  |
| 45 | -//- | 2       | 465     | 200  |
| 46 | -//- | 1       | 930     | >400 |

\* m- количество молей кверцетина в реакции комбинаторного синтеза; k1- количество молей янтарного ангидрида в реакции; k2 – количество молей уксусного ангидрида в реакции;

\*\* ЕД50 мкг/мл ингибирования уреазы, определялась разведением исходной концентрации 400 мкг/мл производного кверцетина;

\*\*\* максимальное мольное соотношение, при котором замещаются все группы в кверцетине, превышение этого соотношения приводит к тому, что в реакционной среде остаются непрореагировавшие модификаторы – янтарный ангидрид и уксусный ангидрид.

Как видно из табл. 1, только при рассчитанном соотношении компонентов, когда образуется максимальное количество разных производных кверцетина, образуется биологическая активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное 3 или ККПВ), способная в дозе 1 мкг/мл на 50% ингибировать уреазу, что на 3 порядка меньше, чем исходная доза немодифицированного полимиксина. Другие производные либо не отличались от немодифицированного кверцетина по способности ингибировать уреазу, либо были значительно менее активными. Это свидетельствует, что при оптимальном соотношении модификаторов при образовании в растворе всех возможных производных (92 вариаций производных кверцетина с разными перестановками и размещениями в заместителях) образуется более сложная надмолекулярная "квазизивая" структура с другими свойствами и более чем на 3 порядка большей фармакологической активностью.

Пример 2. Получение полностью сукцинированного кверцетина (контроль 1).

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ кверцетина (I), добавляют 50 мМ янтарного ангидрида (II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

<sup>1</sup>H ЯМР пентасукцинил кверцетина (IVc): s: 7,63; 7,63; 7,03; 7,1; 7,6; m 2,59-2,71; 12,00-12,2; HPLC (Milichrom A-02; Gradient HClO<sub>4</sub>/LiClO<sub>4</sub>:AcCN 5-100%).

Пример 3. Получение полностью ацетилированного кверцетина (контроль 2).

В 10 мл диоксана растворяют 10 мМ кверцетина (I), добавляют 50 мМ уксусного ангидрида (II), раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют.

<sup>1</sup>H ЯМР пентаацетил кверцетина (IVb): s: 7,68; 7,63; 7,03; 7,1; 7,6; 6,02; 5,94; m 2,12-2,4;

HPLC (Milichrom A-02; Gradient HClO<sub>4</sub>/LiClO<sub>4</sub>:AcCN 5-100%).

На фиг. 2 приведена хроматограмма исходного кверцетина (I), 2б-комбинаторного модифицированного двумя ангидридами (IVd) (фиг. 2).

На фиг. 3, 4 показаны ВЭЖХ - хроматограммы двух производных: полностью сукцинилированного (IVc) и полностью ацетилированного кверцетина (IVb) соответственно в качестве контрольных образцов. Как видно из графиков, время (объем) удержания производных отличается как от исходного кверцетина, так и между собой. Кроме того, при той же концентрации кверцетина площадь пика и ширина его основания больше, что свидетельствует о том, что это именно производные кверцетина и что их несколько. Отличия между объемом удержания (I), (IVb) и (IVc) свидетельствуют о завершении реакции полного сукцинилирования и ацетилирования в структуре кверцетина соответственно.

Полностью сукцинилированный и полностью ацетилированный кверцетины не проявляли биологической активности.

Пример 4. Получение фармацевтических композиций на основе комбинаторного производного кверцетина.

Поставленная задача достигается тем, что фармацевтическая композиция с противовоспалительной, кардио- и ангиопротекторной активностью содержит биофлавоноид кверцетин в виде комбинаторных модифицированных производных (ККМП получены как показано в примере 1), содержит хлорофиллипт, усиливающей его фармакологического действия, снижающий токсичность и побочные эффекты, а также целевые добавки, способствующие формированию лекарственных форм. Согласно изобретению, ККМП, основной действующий агент вводится в количестве 0,5-20%, как солюбилизатор используют поливинилпирролидон, поверхностно-активное вещество лаурилсульфат натрия основные компоненты фармацевтической композиции, при определенной технологической операции вследствие механохимического взаимодействия образуют комплекс с изученными фармацевтическими и фармакологическими свойствами. При этом в фармацевтической композиции хлорофиллипт содержится в количестве от 2 до 7%. Вместо хлорофиллипта может быть использован другой купрофиллин - хлорофиллин. При этом ККМП в композиции содержится в количестве от 50 до 70%. Вещества предварительно растворяются в этаноле вместе с лецитином или ТВИН-80, а этанол отгоняется при нагревании или под вакуумом. Кроме того, как целевые добавки выбраны солюбилизатор поливинилпирролидон в количестве 10-50% и поверхностно-активный агент лаурилсульфат натрия в количестве 0,25-10%. При этом наполнители содержат, как минимум, один связующий агент, один разрыхлитель и один смазывающий агент. При этом как связующий агент выбрана микрокристаллическая целлюлоза в общем количестве 10-20%. При этом в качестве разрыхлителя выбрана кроскармеллозы натриевая соль в общем количестве 1-15%. При этом как смазывающий агент выбран стеарат магния в общем количестве 0,25-5%. Кроме того, фармацевтическая композиция выполнена в лекарственных формах таблеток, покрытых полимерной пленкой, или капсул.

Поставленная задача достигается также тем, что в способе получения фармацевтической композиции с противовоспалительной, кардио- и ангиопротекторной активностью согласно изобретению, предварительно хлорофиллипт, ККПВ (IVd) и целевые добавки смешивают, компактируют, размалывают, полученную смесь смешивают с фармацевтически приемлемыми наполнителями, проводят сухую или влажную грануляцию смеси, после того гранулятом наполняют твердые желатиновые капсулы или пресуют и таблетки покрывают полимерной пленкой. Согласно изобретению разработанный способ получения фармацевтической композиции позволяет получать лекарственные формы с комплексной фармацевтической композицией в виде таблеток, покрытых оболочкой, или капсулы, 10 содержащей в своем составе компоненты в таких количественных пределах, в %:

хлорофиллипт густой экстракт: 5-25;

ККПВ (IVd): 10-40;

Наполнители: до 100.

Оба активных вещества новой фармацевтической композиции сочетались в нем с учетом знаний об их фармакологических и лечебных свойствах, полученных при применении монопрепаратов на основе их субстанций. Подобранные целевые добавки, в силу своих физико-химических свойств, способствуют солюбилизации активных субстанций и их достаточно высокому растворению в водной физиологической среде желудочно-кишечного тракта. Противовоспалительное и атеросклеротическое действие ККПВ (IVd) имеет несколько нетрадиционный механизм, в основе которого лежит выраженная антилейкотриеновая активность. Вместе с тем следует отметить много других позитивных свойств исходного кверцетина, что позволяет прогнозировать его незаменимость в коррекции воспалительного процесса и уместность в составе композиционного препарата с хлорофиллиптом. Целесообразность применения ККПВ (IVd), с учетом его фармакодинамики, в таком новом лекарственном средстве очевидна. Механизм про-

тивовоспалительного действия ККПВ (IVd) схематически сводится к ингибированию 5-липоксигеназы (ЛОГ-5) - ключевого фермента биотрансформации арахидоновой кислоты за липоксигеназным путем метаболизма. Биохимическая трансформация арахидоновой кислоты заканчивается образованием конечных продуктов - лейкотриенов, которые и обуславливают возникновение воспалительных процессов. Таким образом, блокирование кверцетином дальнейшей стадии синтеза лейкотриенов обеспечивает торможение этих негативных процессов. Вместе с тем для лейкотриенов характерны снижение интенсивности кровоснабжения органов, активация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и др. [5]. Кверцетин и ККПВ (IVd) соответственно свойственно ангиопротекторное, сосудорасширяющее, противовоспалительное, гепатопротекторное, желчегонное действие. Он способен снижать интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов, протеинурии, гипергликемии и также проявлять гипоазотемичну и диуретическое действие [6-8]. Кверцетин, обладая антилейкотриеновым действием, предотвращает повреждение эндотелия сосудов ишемизированного участка и уменьшает постишемические нарушения микроциркуляции - патологические состояния, вызываемые лейкотриенами. Таким образом, кверцетин защищает эндотелий сосудов не только от таких факторов агрессии, индуцированных ишемией, как ПОЛ, так и от лейкотриенов [9-11]. Кверцетин, в отличие от традиционных НПВП, не только не проявляет ulcerогенное действие, но и, наоборот, создает гастропротективный эффект благодаря способности подавлять функционирование  $H^+-K^+-ATP$ -азы (снижение синтеза соляной кислоты). Он также способен стимулировать выработку клетками слизистой оболочки желудка цитопротективного простагландина E2 и уменьшать количество активных форм кислорода в ткани желудочной стенки. Комбинированный препарат ДН с ККПВ (IVd) неизвестен. Сочетание в одной лекарственной форме двух активных веществ с различными физико-химическими свойствами является довольно сложной задачей для фармации. Решение поставленной задачи в техническом плане осуществлялось последовательной разработкой технологии изготовления фармацевтической композиции и в соответствии с фармакопейными методами ее исследования. Прежде всего, фармацевтическая разработка фармацевтической композиции начиналась с оценки физико-химических свойств ДН и ККПВ (IVd), в первую очередь ориентируясь на их способности эмульгироваться в водных средах с тем, чтобы эти активные вещества имели максимальную биодоступность при пероральном применении лекарственного средства в физиологических условиях желудка субстанций возможно только с применением вспомогательных веществ со свойствами. Достичь высокой растворимости удалось, используя солюбилизаторы и поверхностно-активные вещества. Такими модуляторами растворимости является поливинилпирролидон (повидон, ГТВП) и лаурилсульфат натрия (ЛСН), ТВИН-80 и лецитин, количественные величины их введения в фармацевтическую композицию было определено в ходе фармацевтической разработки состава, ориентируясь на профили растворимости образцов, выполняя тест "Растворимость". Исследуя кинетику растворения образцов фармацевтической композиции как гранулята для капсул, так и для таблеток, при переменных массовых величинах ПВГТ, ЛСН, ТВИН-80 и лецитина было установлено оптимальное их соотношение с ККПВ (IVd). Известно, что в силу отсутствия кристаллической структуры ККПВ (IVd) растворимость его субстанции очень низкая (1 мг в 100 мл воды). Комплексообразование его с ПВП путем механохимического взаимодействия, т.е. прессованием (компактированием) исходного гранулята позволило повысить растворимость ККПВ (IVd) до 200 мг в 100 мл воды. Таким образом, полученный комплекс ККПВ (IVd) с ПВП практически одинаково растворяется в водных растворах с различными показателями pH, которые за фармацевтическими требованиями имитируют физиологическую среду организма.

Таблица 2

Состав и соотношение ингредиентов в одной капсуле или ядре таблетки фармацевтической композиции ГринФло

| № п/п                                 | Наименование ингредиента          | в мг   | в %    |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|
| 1                                     | 2                                 | 4      | 5      |
| 1                                     | Липосомы ККПВ (IVd)               | 40,00  | 20,00  |
| 2                                     | Поливинилпирролидон К-25          | 40,00  | 20,00  |
| 3                                     | Густой экстракт хлорофиллита      | 25,00  | 12,50  |
| 4                                     | Целлюлоза<br>микрокристаллическая | 80,00  | 40,00  |
| 5                                     | ТВИН-80                           | 10,00  | 5,00   |
| 6                                     | Холекальциферол                   | 3,00   | 1,50   |
| 6                                     | Магния стеарат                    | 2,00   | 1,00   |
| Содержание капсулы или ядра таблетки: |                                   | 200,00 | 100,00 |

Для обеспечения физико-химической стабильности комплекса весовое соотношение между ККПВ (IVd) и ПВП должно находиться в пределах 1:1-1:3. Следует отметить, что эти массовые величины ПВП

также достаточны для повышения растворимости субстанции ДН вследствие образования соответствующей комплексной соединения. Применяемые повидоны по своим молекулярным массам отличаются следующим образом: K90 - 1000000; K25 - 30000; C17 - 10000. Учитывая характеристики кинетики растворения комплекса кверцетина с ПВП, было подобрано достаточное количество ЛСН - поверхностно-активного вещества, способствующее быстрому и равномерному смачиванию поверхности комплексной гранулята. Это также отражалось на ускорении растворения комплекса в начальные периоды времени и, таким образом, могло создавать оптимальные условия для всасывания стенками желудка растворимой формы кверцетина. При значительной гидрофобности поверхности кристаллов ДН эти выбранные вспомогательные вещества - ПВП и ЛСН также способствовали растворимости этой субстанции, а тем самым могли повышать биодоступность этого НПВП. Положительное влияние на растворимость ККПВ (IVd) также оказывает подобранное количество ПВП и ЛСН, о чем свидетельствуют профили растворимости.

Все образцы фармацевтической композиции, начиная с комплекса активных веществ - ККПВ (IVd) и ДН с ПВП и ЛСН, получали в условиях последовательных технологических операций путем сухой или влажной грануляции ингредиентов комплекса и вспомогательных веществ. Приготовленные гранулы применялись для наполнения капсул или их таблетировали и исследовали растворимость этих лекарственных форм в соответствии с фармакопейным тестом "Растворение". Характеристики растворимости ДН и ККПВ (IVd) в фармацевтической композиции свидетельствовали о значительно более высокой растворимости этих активных 10 ингредиентов по сравнению с растворимостью индивидуальных субстанций. В ходе фармацевтической разработки был изготовлен образец фармацевтической композиции, определенного состава (см. табл. 2), названный авторами "ГринФло" и нашедший применение в исследованиях фармакологических свойств.

Фармацевтическая композиция приведенного состава, получаемая в соответствии с технологией сухого гранулирования, включает смешивание активных веществ с наполнителями, компактирование или брикетирование смеси, помол, смешивание помола с наполнителями и гранулирование, прессование гранулята в таблетки или наполнение ею твердых желатиновых капсул. Технология влажной грануляции отличается стадией гранулирования смеси, где вместо компактора или прессы используется оборудование для влажной грануляции и сушилка, такое как смеситель-гранулятор с мешалками типа Rota P или гранулятор-сушилка псевдокипящего слоя типа Hurling.

Приводим конкретные примеры осуществления изобретения. Нижеследующие примеры иллюстрируют основные аспекты данного изобретения, но не должны рассматриваться как имеющие ограничительное значение. Получение всех образцов гранул комплекса активных веществ - ККПВ (IVd) и ДН, с ПВП осуществлялось в условиях технологических операций грануляции сухим или мокрым способом, применяя сухое прессование (компактирование) смеси активных ингредиентов, с последующим размоллом брикетированного материала. Влажную грануляцию выполняли в гранулятор-сушилках в вакууме или теплым проточным воздухом в устройствах с псевдокипящим слоем. Полученными гранулами наполняли капсулы или их таблетировали, исследуя растворимость этих лекарственных форм по тесту "Растворение". Характеристики растворимости ДН и ККПВ (IVd) в фармацевтической композиции свидетельствовали о значительно более высокой растворимости комплекса активных ингредиентов по сравнению с растворимостью индивидуальных субстанций. Таким образом, в ходе фармацевтической разработки был изготовлен образец фармацевтической композиции, названный авторами изобретения "ГринФло", который нашел как препарат определенного состава применение в исследованиях токсико-фармакологических свойств.

Таблица 3

Состав и соотношение ингредиентов на одну капсулу или таблетку фармацевтической композиции ГринФло

| № п/п | Наименование ингредиентов               | мг     | %      |
|-------|-----------------------------------------|--------|--------|
| 1     | 2                                       | 3      | 4      |
| 1     | Липосомы ККПВ (IVd) поливинилпирролидон | 40,00  | 20,00  |
| 2     | К-25                                    | 40,00  | 20,00  |
| 3     | Густой экстракт хлорофиллита            | 25,00  | 12,50  |
| 4     | Целлюлоза микрокристаллическая          | 80,00  | 40,00  |
| 5     | ТВИН-80                                 | 10,00  | 5,00   |
| 6     | Холекальциферол                         | 3,00   | 1,50   |
| 7     | Магния стеарат                          | 2,00   | 1,00   |
| 8.    | Содержимое капсулы или ядра таблетки    | 200,00 | 100,00 |

Фармацевтическая композиция приведенного состава, полученная по технологии сухой грануляции, включает смешивание активных веществ с наполнителями, компактирование или брикетирование смеси, помол и смешивание ее с наполнителями, в конце гранулят прессуют в таблетки или наполняют им твердые желатиновые капсулы. Технология влажной грануляции отличается стадией гранулирования смеси, где вместо компактора или пресса используется оборудование для влажной грануляции и сушки, такое как гранулятор-смеситель с мешалками 25 типа Rota P или гранулятор-сушилка типа Nuttling с псевдокипящим слоем. Нижеследующие примеры осуществления изобретения иллюстрируют аспекты данного изобретения, но они не должны рассматриваться как имеющие ограничительное значение.

Пример 5. Образец фармацевтической композиции с хлорофиллиптом.

Субстанции ККПВ (IVd), хлорофиллипта густого экстракта и поливинилпирролидона (К-25) и холекальциферол смешивают в грануляторе и прессуют с помощью компактора. Затем полученную брикетированную массу размалывают в мельнице, просеивают и к полученному грануляту в смесителе добавляют ранее приготовленную смесь из целлюлозы микрокристаллической и кроскармеллозы натриевой соли. После 2-3 ч смешивания к грануляту добавляют холекальциферол и затем продолжают перемешивать еще в течение 30 мин. Готовый гранулят передают на наполнение желатиновых капсул или на таблетирование. Образец фармацевтической композиции данного состава приведен в табл. 4. В случае таблеток ядра покрывали готовой смесью пленочного покрытия Colorcon Opadry II. Тесты "Распадение", "Растворение" и "Равномерность дозирования" выполнялись в соответствии с государственной фармакопеей.

Таблица 4

Состав и соотношение ингредиентов фармацевтической композиции  
на одну капсулу или таблетку

| № п/п | Наименование ингредиентов            | мг     | %      |
|-------|--------------------------------------|--------|--------|
| 1     | 2                                    | 3      | 4      |
| 1.    | Липосомы ККПВ (IVd)                  | 40,00  | 17,02  |
| 2.    | Поливинилпирролидон К-25             | 80,00  | 34,04  |
| 3.    | Густой экстракт хлорофиллипта        | 25,00  | 10,63  |
| 4.    | Целлюлоза микрокристаллическая       | 71,00  | 30,57  |
| 5.    | Кроскармеллоза натрия                | 13,00  | 5,53   |
| 6.    | Холекальциферол                      | 3,00   | 1,27   |
| 7.    | Магния стеарат                       | 2,15   | 0,91   |
| 8.    | Содержимое капсулы или ядра таблетки | 235,00 | 100,00 |

Пример 6. Получение сухого гранулята.

Субстанции ККПВ (IVd), густого экстракта хлорофиллипта и поливинилпирролидона (полипластон К-25), а затем холекальциферол помещают в гранулятор-смеситель типа Rota P и перемешивают в течение 1,5-2 ч, добавляют целлюлозу микрокристаллическую и кроскармеллозы натриевую соль. Смесь перемешивают в течение 30 мин, к ней постепенно при перемешивании приливают достаточное количество воды очищенной, влажный гранулят перемешивают в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем осуществляют сушку гранулята, подключив вакуум и 10 обогрев, в течение 3-4 ч. Сухой гранулят опудривают стеаратом магния, перемешивая 40 мин, и затем передают на изготовление готовых лекарственных форм. Таким образом, состав образца полученной фармацевтической композиции приведен в табл. 5.

Таблица 5

**Состав и соотношение ингредиентов фармацевтической композиции  
на одну капсулу или таблетку**

| №<br>п/п | Наименование ингредиентов               | мг     | %      |
|----------|-----------------------------------------|--------|--------|
| 1        | 2                                       | 3      | 4      |
| 1.       | Липосомы ККПВ (IVd) поливинилпирролидон | 40,00  | 13,33  |
| 2.       | К-25                                    | 140,00 | 46,67  |
| 3        | Густой экстракт хлорофиллипта           | 25,00  | 12,50  |
| 4.       | Целлюлоза микрокристаллическая          | 65,50  | 21,83  |
| 5.       | Лецитин+ТВИН-80                         | 21,00  | 7,00   |
| 6.       | Холекальциферол                         | 5,00   | 1,67   |
| 7.       | Магния стеарат                          | 3,50   | 1,17   |
| 8.       | Содержимое капсулы или ядра таблетки    | 300,00 | 100,00 |

Пример 7. Получение липосомальной суспензионной формы для дальнейшего получения гранулята, таблеточной массы и таблетированных форм ККПВ.

В 80-200 мл 96% этанола растворяют 2-20 г ККПВ (IVd), 1-3 г холекальциферола, 1-7 г густого экстракта хлорофиллипта и 20-50 г фосфатидилхолина, затем этанол отгоняют под вакуумом, в полученную смесь добавляют 50 мл дистиллированной воды и обрабатывают ультразвуком при 44 кГц 15-50 мин, полученную суспензию липосом высушивают в лиофильной сушке, а полученный порошок используют, как показано в предыдущих примерах, для получения таблетированных форм. Размер липосомальных наночастиц при ультразвуковом эмульгировании составляет 120-300 нм. Если вместо лецитина использовать сухое молоко, размер частиц составит 500-1000 нм.

Доклиническое изучение фармацевтической композиции осуществлялось с применением образца ГринФло в тестах исследования с целью установления в полном объеме токсико-фармакологических свойств будущего препарата, который может стать перспективным лекарственным средством.

Пример 8. Исследования острой токсичности ГринФло при пероральном введении.

Экспериментальные исследования проводились по методу В.Б. Прозоровского [12] в диапазоне доз 500-1500 мг/кг по сумме действующих веществ, при внутрижелудочном введении ГринФло мышам и крысам. Наблюдения за животными проводились в течение двух недель после ввода препарата. Результаты исследования приведены в табл. 6.

Таблица 6

**Показатели летальности при изучении острой токсичности ГринФло (n=72)**

| Доза, мг/кг | Летальный эффект, гибель<br>животных/количество животных |       | Средняя летальность, % |       |
|-------------|----------------------------------------------------------|-------|------------------------|-------|
|             | мыши                                                     | крысы | мыши                   | крысы |
| 500         | 0/6                                                      | 0/6   | 0                      | 0     |
| 700         | 1/6                                                      | 1/6   | 16,7                   | 16,7  |
| 900         | 2/6                                                      | 3/6   | 33,3                   | 50,0  |
| 1100        | 3/6                                                      | 4/6   | 50,0                   | 66,6  |
| 1300        | 4/6                                                      | 5/6   | 66,7                   | 83,3  |
| 1500        | 6/6                                                      | 6/6   | 100                    | 100   |

Среднелетальную дозу ГринФло рассчитывали на основании зависимости уровня летальности от использованной дозы методом пробит-анализа. В результате расчетов было определено, что ЛД<sub>50</sub> ГринФло для мышей составляет 1051,3±52,5 мг/кг (404,2 мг/кг по холекальциферолу) и для крыс - 952,5±45,2 мг/кг (366,5 мг/кг по холекальциферолу). Таким образом, результаты изучения токсикологических характеристик ГринФло у мышей и крыс позволяют отнести данное средство к классу малотоксичных веществ (501 мг/кг < ЛД<sub>50</sub> < 5000 мг/кг), согласно общепринятой классификации токсичности по К.К. Сидорову.

Пример 9. Исследование среднеэффективных доз ГринФло в условиях развития экспериментального воспаления - основного промотора атеросклероза и его осложнений.

Изучение среднеэффективных доз ГринФло проводили на модели карагенинового отека конечностей у крыс с использованием препарата в дозах 5, 10 и 20 мг/кг по сумме действующих веществ, что



соответствует примерно 1/200, 1/100 и 1/50 показателю ЛД<sub>50</sub>. Показатель ЕД<sub>50</sub> определяли методом про-бит-анализа зависимости "активность-доза" по состоянию через 3 ч после введения флогогена. Результаты исследования приведены в табл. 7.

Таблица 7

Влияние ГринФло на течение карагенинового отека стопы у крыс через 3 ч после введения флогогену (n=40)

| Опытная группа                                                    | Доза, мг/кг | Прирост объема стопы, у.е. | Антиэкссудативная активность, % |
|-------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------|---------------------------------|
| Контрольная патология                                             |             | 36,7±2,0                   | -                               |
| Гринфло                                                           | 5,0         | 33,2±1,2                   | 9,2±0,4                         |
| Гринфло                                                           | 10,0        | 23,5±0,9*                  | 36,1±1,3                        |
| Гринфло                                                           | 20,0        | 17,6±0,7*                  | 52,2±2,2                        |
| Примечание. * - P<0,05 относительно группы контрольной патологии. |             |                            |                                 |

В ходе проведенных расчетов были определены ЕД<sub>50</sub> ГринФло по антиэкссудативной активности, которая составила 18,24±2,06 мг/кг по сумме действующих веществ, что соответствует 7,02±0,79 мг/кг по контрольному НПВС - диклофенаку натрия (ДН).

По результатам изучения острой токсичности и среднееффективных доз ГринФло был рассчитан терапевтический индекс (ТИ), что характеризует широту терапевтического действия препарата (табл. 8).

Таблица 8

Характеристика широты терапевтического действия ГринФло

| Препарат | ЕД <sub>50</sub> , мг/кг | ЛД <sub>50</sub> , мг/кг | ТИ   | Относительный ТИ по ДН |
|----------|--------------------------|--------------------------|------|------------------------|
| Гринфло  | 18,2 (7,0 за ДН)         | 952,5 (366,5 за ДН)      | 523  | 4,4                    |
| ДН       | 8,0 [14, 16]             | 95,0 [17]                | 11,9 | 1                      |

Результаты расчетов свидетельствуют о значительно большей широте терапевтического действия исследуемого средства по сравнению с ДН, что обусловлено как снижением токсичности, так и более высокой активностью ГринФло, которое, в свою очередь, обусловлено суммацией фармакологических эффектов обеих субстанций и подтверждает целесообразность создания комбинированной лекарственной формы на их основе.

Пример 10. Исследование антиальтеративной активности ГринФло на модели скарифицированных ран у крыс.

Изучение антиальтеративных свойств ГринФло проводили на модели стандартных скарифицированных ран у крыс по сравнению с монокомпонентами композиции - липосом ККПВ (IVd) и хлорофиллиптом. Антиальтеративную активность препаратов оценивали по их влиянию на показатели уменьшения площадей ран. Результаты исследования приведены в табл. 9.

Таблица 9

Антиальтеративная активность ГринФло, % (n=40)

| Исследуем, препарат                                                          | Доза, мг/кг | 7 сутки     | 9 сутки     | 11 сутки    | 13 сутки    | 15 сутки  |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| Гринфло                                                                      | 18,2        | 32,75±0,87* | 52,09±1,39* | 58,06±1,55* | 79,26±2,11* | 100,0     |
| ККПВ (IVd)                                                                   | 11,2        | 16,52±0,44  | 17,87±0,48  | 27,96±0,75  | 31,85±0,85  | 48,86±1,3 |
| хлорофиллипт                                                                 | 7,0         | 10,72±0,29  | 12,17±0,32  | 15,05±0,40  | 14,81±0,4   | 4,55±0,12 |
| Примечание. * - P<0,05 относительно животных, получавших референс-препараты. |             |             |             |             |             |           |

Полученные результаты свидетельствуют о значительно более высоком уровне активности ГринФло по сравнению с его монокомпонентами, поскольку полное ранозаживление и, соответственно, 100%-ный уровень антиальтеративного действия исследуемого средства было зарегистрировано на 15 сутки эксперимента. По уровню показателей альтернативной активности ГринФло достоверно превышал ККПВ (IVd) и густой экстракт хлорофиллипта в 2,0-2,9 и 2,2-5,4 раза соответственно. Таким образом, диклор оказывает положительное влияние на альтеративное воспаление на модели скарифицированных ран у крыс, способствуя ускорению скорости заживления ран, уменьшению площади ран и проявляя достоверно более высокие показатели альтернативной активности в сравнении с кверцетином и ДН.

Пример 11. Исследование антипролиферативным свойствам ГринФло на модели "ватной" гранулемы у крыс.

Антипролиферативную активность ГринФло исследовали на модели "ватной" гранулемы у крыс по сравнению с действием монокомпонентов исследуемого средства. Результаты изучения исследования представлены в табл. 10.

Таблица 10

Антипролиферативная активность ГринФло на модели  
"ватной" гранулемы у крыс (n=40)

| Исследуемая группа                                                                                                                                                                                  | Доза,<br>мг/кг | Количество грануляционной<br>ткани, мг | Активность, %  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|----------------|
| Контрольная патология                                                                                                                                                                               | -              | 45,2±1,7                               | -              |
| Гринфло                                                                                                                                                                                             | 18,2           | 34,3±1,3*/•                            | 24,12±0,88**/• |
| ККПВ (IVd)                                                                                                                                                                                          | 11,2           | 37,0±1,4*                              | 18,14±0,66     |
| Хлорофиллипт                                                                                                                                                                                        | 7,0            | 39,1±1,4*                              | 13,50±0,49     |
| Примечания: * - $p \leq 0,05$ относительно контрольной патологии; ** - $p \leq 0,05$ относительно животных, получавших ККПВ IVd); • - $p \leq 0,05$ относительно животных, получавших хлорофиллипт. |                |                                        |                |

Данные проведенных исследований показали, что по степени антипролиферативной активности ГринФло достоверно превышает действие ККПВ (IVd) в 1,3 раза и хлорофиллипта в 1,8 раза. Таким образом, в условиях развития пролиферативного воспаления ГринФло оказывает выраженное антипролиферативное действие, что является весьма полезным в плане лечения воспалительно-деструктивных заболеваний паренхиматозных органов, таких как печень, почки, сердце и пр., поскольку может способствовать подавлению развития в них склеротических процессов.

Пример 12. Углубленное изучение антипролиферативных свойств ГринФло на модели доксорубициновой кардиомиопатии у крыс.

Углубленное изучение антипролиферативным свойствам Диклора проведено в условиях развития доксорубицин-индуцированной пластической недостаточности миокарда у крыс, воспроизводя ее путем внутрибрюшинного введения доксорубина в дозе 20 мг/кг. В ходе эксперимента по состоянию на 10 сутки оценивали влияние ГринФло на некоторые биохимические показатели лабораторных животных по сравнению с активностью ДН в эквивалентной дозе (табл. 11).

Таблица 11

Влияние ГринФло на некоторые биохимические показатели крыс с  
доксорубициновой кардиомиопатией (n=31)

| Опытная группа                                                                                                                                                                       | АсАТ крови,<br>ммоль/год*л | ЛДГ крови,<br>ммоль/год*л | ТБК-реактанты<br>крови,<br>мкмоль/л | ТБК-реактанты<br>миокарда, мкмоль/г |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Интактный<br>контроль (n=12)                                                                                                                                                         | 0,63±0,03                  | 5,10±0,23                 | 2,27±0,07                           | 63,60±1,82                          |
| Контрольная<br>патология (n=4)                                                                                                                                                       | 1,51±0,12*                 | 7,75±0,71*                | 4,25±0,28*                          | 151,61±8,62*                        |
| Гринфло 18,2<br>мг/кг (n=9)                                                                                                                                                          | 0,82±0,06**/**/•           | 5,97±0,35**/**            | 3,59±0,11**/**                      | 97,20±3,40**/**/•                   |
| Хлорофиллипт<br>7,0 мг/кг (n=6)                                                                                                                                                      | 1,33±0,07*                 | 6,85±0,42*                | 4,02±0,21*                          | 136,63±6,7*                         |
| Примечания: * - $P \leq 0,05$ относительно интактных животных; ** - $p \leq 0,05$ относительно группы контрольной патологии; • - $p \leq 0,05$ относительно животных, получавших ДН. |                            |                           |                                     |                                     |

Результаты биохимических исследований показали ингибирующее влияние со стороны исследуемых средств на накопление продуктов перекисного окисления липидов и рост ферментемии в условиях развития кардиомиопатии. Наиболее значимое лечебное действие проявил ГринФло, что подтверждается вероятной динамикой показателей относительно контрольной патологии. При этом активность АсАТ и

содержание ТБК-реактантов в ткани миокарда были достоверно ниже, чем у животных, которых лечили ДН, в 1,7 и 1,4 раза соответственно. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии у ГринФло, кроме противовоспалительных, еще и кардиопротекторных свойств, что обуславливает целесообразность его применения в лечении воспалительно-деструктивных заболеваний миокарда.

Пример 13. Исследование влияния ГринФло на течение экспериментального аутоиммунного артрита.

Исследование проведено на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс, который воспроизводили путем подкожного двукратного введения (с интервалом в неделю) эмульгированной смеси бычьего коллагена II типа и полного адьюванта Фрейнда (1:1) в дозе 2 мг/кг по коллагену [22]. В ходе исследования в сыворотке крови 10 животных по состоянию на 28 суток оценивали динамику содержания эйкозаноидов (простагландина E2 (PGE2), 6-кето-простагландина F1 $\alpha$  (6-кето-PGF 1 $\alpha$ ), тромбоксана B2 (TxB2) и лейкотриена B4 (LTB4) с помощью наборов для иммуноферментного анализа производства "Neogen Corporation" (США). Эффективность ГринФло изучали в сравнении с действием его монокомпонентов в эквивалентных дозах. Результаты исследования приведены в табл. 12.

Таблица 12  
Влияние ГринФло на содержание эйкозаноидов в сыворотке крови крыс с коллаген-индуцированным артритом (n=50)

| Опытная группа                                                                                                                                                                                                                                  | PGE2, пг/мл          | 6-keto-PGF 1 $\alpha$ ,<br>пг/мл | TxB2, пг/мл         | LTB4, пг/мл              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Интakтный контроль                                                                                                                                                                                                                              | 879,8 $\pm$ 12,5     | 261,6 $\pm$ 4,2                  | 242,6 $\pm$ 9,5     | 261,4 $\pm$ 6,3          |
| Контрольная патология                                                                                                                                                                                                                           | 1248,4 $\pm$ 26,1*   | 294,3 $\pm$ 4,1*                 | 493,2 $\pm$ 4,8*    | 421,3 $\pm$ 4,7*         |
| Гринфло 18,2 мг/кг                                                                                                                                                                                                                              | 901,5 $\pm$ 17,5**/• | 272,5 $\pm$ 6,7**                | 256,6 $\pm$ 8,9**/’ | 345,6 $\pm$ 3,1*/**/•/•• |
| ККПВ (IVd) 11,2 мг/кг                                                                                                                                                                                                                           | 1198,7 $\pm$ 22,1*   | 286,8 $\pm$ 7,4*                 | 472,7 $\pm$ 6,7*/** | 282,9 $\pm$ 8,4**        |
| Хлорофиллипт липосомальный/ на молоке 7,0 мг/кг                                                                                                                                                                                                 | 925,5 $\pm$ 13,6*/** | 279,2 $\pm$ 5,4*/**              | 265,4 $\pm$ 5,9**   | 398,3 $\pm$ 6,5*/**      |
| Примечания: * - p $\leq$ 0,05 относительно интактных животных; ** - p $\leq$ 0,05 относительно контрольных животных; • - p $\leq$ 0,05 относительно животных, получавших Кверцетин; 4) •• - p $\leq$ 0,05 относительно животных, получавших ДН. |                      |                                  |                     |                          |

В ходе исследования было выявлено, что применение ГринФло на фоне развития коллаген-индуцированного артрита способствует вероятностной нормализации содержания эйкозаноидов в сыворотке крови крыс. Так, уровень PGE2 снижался в 1,4 раза; содержание 6-кето-PGF1 $\alpha$  - в 1,1 раза; TxB2 - в 1,9 раза и уровень LTB4 - в 1,2 раза. При этом по степени фармакологического воздействия на большинство исследуемых показателей диклокор превосходил препараты сравнения кверцетин и хлорофиллипт. Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат ГринФло имеет комплексный механизм действия с влиянием как на циклооксигеназный (благодаря содержанию хлорофиллипта), так и липоксигеназный (наличие ККПВ (IVd)) пути метаболизма арахидоновой кислоты. В таком случае ГринФло является перспективным корректором воспалительно-деструктивных заболеваний суставов с аутоиммунным компонентом, например, таких как ревматоидный артрит.

Пример 14. Исследование влияния ГринФло на структуру суставного хряща в условиях развития экспериментального остеоартроза.

Влияние ГринФло на морфоструктуру суставных тканей на фоне развития экспериментального остеоартроза изучали в сравнении с действием его монокомпонентов в эквивалентных дозах. Исследования проводили на модели системного стероидного артроза у крыс, которую воспроизводили путем трехразового внутримышечного введения дексаметазона в дозе 7 мг/кг с интервалом в одну неделю. Исследуемые средства вводили ежедневно в течение 1 месяца, начиная через 2 недели после последней инъекции дексаметазона. В ходе морфологического исследования микропрепаратов суставного хряща по состоянию на 56 суток эксперимента проводили морфометрические определения его толщины, плотности расположения хондроцитов и полуколичественную оценку состояния основных его структур (табл. 13).

Таблица 13

**Морфометрические показатели суставного хряща крыс  
с экспериментальным остеоартрозом под влиянием ГринФло (n=50)**

| Исследуемая группа                             | Толщина хряща, услов. ед. | Клеточная плотность по услов. ед. площади | Сумма баллов по системе оценки состояния хряща |
|------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Интakтный контроль                             | 15,33±1,15                | 42,40±5,64                                | 24,46±0,22                                     |
| Контрольная патология                          | 12,62±0,58*               | 28,63±1,85*                               | 12,68±0,85*                                    |
| Гринфло 18,2 мг/кг                             | 15,73±0,59**/*            | 35,83±4,31**/*                            | 20,19±0,93**/*/*                               |
| ККПВ (IVd) 11,2 мг/кг                          | 15,66±1,35                | 32,67±2,48*                               | 18,09±0,94**/*/*                               |
| Хлорофиллитг липсомальный/ на молоке 7,0 мг/кг | 13,77±0,52                | 32,20±3,02*                               | 14,66±0,95*                                    |

Примечания: \* -  $p \leq 5 \cdot 10^{-5}$  относительно интактных животных; \*\* -  $p \leq 0,05$  относительно

группы контрольной патологии; • -  $p \leq 0,05$  относительно животных, получавших ДН.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что в условиях развития экспериментального остеоартроза под влиянием ГринФло происходит достоверное увеличение толщины суставного хряща и плотности расположения хондроцитов в среднем на 20%, а также суммы баллов по полуколичественной системе оценки состояния хрящевой ткани в 1,6 раза. Следует отметить, что по большинству данных параметров ГринФло достоверно превышал активность хлорофиллита и без достоверных различий - ККПВ (IVd). Все вышеизложенное свидетельствует о наличии у ГринФло определенных хондропротекторных свойств, обусловливаемых содержанием в его составе ККПВ (IVd). Применение ККПВ (IVd). В составе ГринФло позволяет положительно модифицировать влияние хлорофиллита на хрящевую ткань и значительно расширить возможности его применения на фоне развития дегенеративно-дистрофических поражений суставов.

Пример 15. Антигипертензивная активность ГринФло.

Двум группам белых крыс по 5 животных в каждой вводили внутривенно в дозе 0,0025 ммоль/кг октадин и липсомальную суспензию ГринФло (в пересчете на хлорофиллитг), а затем наблюдали динамику САД в течение 3 ч. Гипотензивный эффект препаратов оценивали через 3 ч наблюдения. Полученные результаты обработаны статистически с применением критерия t Стьюдента и приведены в табл. 14. Цифровые данные табл. 13 показывают, что ГринФло в эквимолекулярной дозе понижает САД у нормотензивных белых крыс в 2 раза больше, чем октадин. То есть, при действии октадина гипотензивный эффект составил в среднем  $19,7 \pm 2,2\%$ , а при действии ГринФло гипотензивный эффект составил в среднем  $36,8 \pm 3,1\%$ .

Таблица 14

**Влияние ГринФло и октадина на САД белых крыс**

| Препарат | Доза препарата |            | Гипотензивный эффект, % |
|----------|----------------|------------|-------------------------|
|          | в мг/кг        | в ммоль/кг |                         |
| Октадин  | 6,2            | 0,025      | $19,7 \pm 2,2$          |
| Гринфло  | 5,0*           | 0,025*     | $36,8 \pm 3,1$          |

\* В пересчете на количество густого экстракта хлорофиллита

В целях сравнения гипотензивной активности ГринФло и октадина на кроликах двум группам животных по 5 кроликов обоего пола в каждой внутривенно вводили прототип и ГринФло и регистрировали динамику САД в течение 3 ч. Результаты опытов приведены в табл. 15.

Таблица 15

**Сравнительная гипотензивная активность ГринФло и октадина на кроликах**

| Препарат | Доза препарата |            | Гипотензивный эффект, % |
|----------|----------------|------------|-------------------------|
|          | в мг/кг        | в ммоль/кг |                         |
| Октадин  | 15,0           | 0,06       | $32,0 \pm 6,1$          |
| Гринфло  | 10,0           | 0,05       | $29,0 \pm 5,6$          |

Таким образом, у кроликов для достижения статистически равного, в пределах 30%, гипотензивного эффекта потребовалось октадина 15 мг/кг, или на 0,01 ммоль/кг больше, чем ГринФло.

Для сравнительной оценки гипотензивной активности ГринФло на кошках двум группам по пять животных в каждой внутривенно вводили липсомальную суспензию ГринФло и октадин и регистриро-

вали динамику системного артериального давления в течение 3 ч. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл. 3. Цифровые данные табл. 16 показывают, что у кошек для достижения статистически равного гипотензивного эффекта (в пределах 30%) потребовалось октадина 20 мг/кг, что составляет дозу 0,08 ммоль/кг. Это превышает дозу ГринФло на 0,03 ммоль/кг и свидетельствует о том, что ГринФло обладает значительно большей гипотензивной активностью, чем октадин.

Таблица 16

## Сравнительная гипотензивная активность ГринФло на кошках

| Препарат | Доза препарата |            | Гипотензивный эффект, % |
|----------|----------------|------------|-------------------------|
|          | в мг/кг        | в ммоль/кг |                         |
| Октадин  | 20,0           | 0,08       | 35,0±9,9                |
| Гринфло  | 10,0           | 0,05       | 36,2±6,3                |

Для объективного сравнения активности исследуемых веществ экспериментально была установлена ЕД<sub>30</sub> (единица действия, вызывающая понижение САД на 30%) для каждого препарата. С этой целью определяли в опыте величину гипотензивного эффекта различных доз веществ на трех группах из пяти белых крыс, рассчитывали средние арифметические полученных рядов и их стандартные ошибки. Затем цифровые данные наносили на график и рассчитывали ЕД<sub>30</sub>. Полученные результаты представлены в табл. 17.

Таблица 17

Зависимость "доза-эффект" и ЕД<sub>30</sub> гипотензивного эффекта ГринФло и октадина

| Препарат | Доза, мг/кг | Эффект, % | ЕД <sub>30</sub> |          |
|----------|-------------|-----------|------------------|----------|
|          |             |           | мг/кг            | ммоль/кг |
| Октадин  | 5,0         | 18,0±2,7  | -                | -        |
| То же    | 10,0        | 26,0±1,5  | -                | -        |
| То же    | 20,0        | 33,0±4,9  | -                | -        |
| То же    | -           | -         | 11,2             | 0,045    |
| Гринфло  | 1,5         | 17,6±2,7  | -                | -        |
| То же    | 3,0         | 25,2±2,9  | -                | -        |
| То же    | 5,0         | 36,8±3,1  | -                | -        |
| То же    | -           | -         | 4,0              | 0,02     |

Как показывают данные табл. 16, гипотензивная активность ГринФло превышает таковую октадина более чем в 2 раза. ЕД<sub>30</sub> гипотензивного эффекта ГринФло составляет 4,0 мг/кг, или 0,02 ммоль/кг в пересчете на хлорофиллипта густой экстракт.

Показателем истинного гипотензивного действия нового химического вещества является его способность понижать патологически повышенное САД. Для решения этого вопроса использовали пять взрослых белых крыс со спонтанной гипертензией (масса - 260-280 г), у которых до эксперимента уровень САД составил в среднем 180±1,7 мм рт.ст. Для сравнения проведен опыт на пяти белых крысах с нормальным САД. Результаты опытов представлены в табл. 18.

Таблица 18

## Антигипертензивное действие ГринФло на белых крысах (5 мг/кг)

| Этапы эксперимента               | Исходное САД, мм рт.ст. | Антигипертензивный эффект |           |
|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------|
|                                  |                         | мм рт.ст.                 | %         |
| Крысы со спонтанной гипертензией | 180±1,7                 | 69,6±5,1                  | 38,6±2,47 |
| Нормотензивные крысы             | 119±1,6                 | 44,4±3,7                  | 37,0±2,72 |

Данные табл. 18 показывают, что ГринФло в дозе 5 мг/кг понизил системное артериальное давление у "гипертензивных" белых крыс на 69,6±5,1 мм рт.ст., т.е. в 1,57 раза больше, чем у "нормотензивных" крыс (44,4 мм рт.ст.). Это свидетельствует о том, что ГринФло является истинным гипотоником.

## Список литературы

- <sup>1</sup> Accounts of Chemical Research. 1996. Vol. 29. № 3
- <sup>2</sup> Chemical Reviews. 1997. № 3-4
- <sup>3</sup> Handbook of combinatorial chemistry: drugs, catalysts, materials. Weinheim, 2002. Vol. 1-2
- <sup>4</sup> Combinatorial chemistry on solid supports. B., 2007
- <sup>5</sup> Morales A.I., Vicente-Sánchez C., Jerkic M. et al. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic 35 cadmium nephrotoxicity in rats // Toxicology and Applied Pharmacology. - 2006. - Vol.210 (12). - P.128-135.
- <sup>6</sup> Actis-Goretta L., Ottaviani J.I., Fraga C.G. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2006. Vol.54 (1). - P.229-234.
- <sup>7</sup> Duarte J., Perez-Palencia R., Vargas F. et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats // British Journal of Pharmacology. - 2001. Vol.133 (1). - P.117-124.
- <sup>8</sup> Garcia-Saura M.F., Galisteo M., Villar I.C. et al. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension // Molecular And Cellular Biochemistry. - 2005. - Vol.270 (1-2). - P.147-155.
- <sup>9</sup> Mojzis J., Hviscova K., Germanova D. et al.: Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. Physiol. Res. 2001, V50, P.501-506.
- <sup>10</sup> Alarcon de la Lastra C., Martin M.J., Motilva V. Antiulcer and gastroprotective effect of quercetin: A gross and histologic study. Pharmacology 1994. V.48. P.56-62.
- <sup>11</sup> Guerrero J.A., Lozano M.L., Castillo J. et al. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A2 receptor // Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2005. - Vol.3. - P.369-376.
- <sup>12</sup> Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентрации биологически активных веществ. - СПб, 1992. - 42 с.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина, которая содержит в качестве действующих веществ густой экстракт хлорофиллипта и холекальциферол, при этом комбинаторное производное кверцетина представлено в виде неразделенной супрамолекулярной смеси модифицированных комбинаторных производных кверцетина в липофильной фазе, полученных путем одновременной комбинаторной модификации кверцетина двумя модификаторами, такими как янтарный ангидрид и уксусный ангидрид в мольном соотношении компонентов 92:155:155 в реакции комбинаторного синтеза для получения максимального количества разных производных кверцетина из 92 молекул, при следующем соотношении эмульгированных компонентов композиции, мас. %:

неразделенная супрамолекулярная смесь модифицированных комбинаторных производных кверцетина: 0,5-20;

густой экстракт хлорофиллипта: 2-7;

холекальциферол: 1,0-3,0;

формообразующее вещество: 50-70;

вспомогательные вещества: до 100.

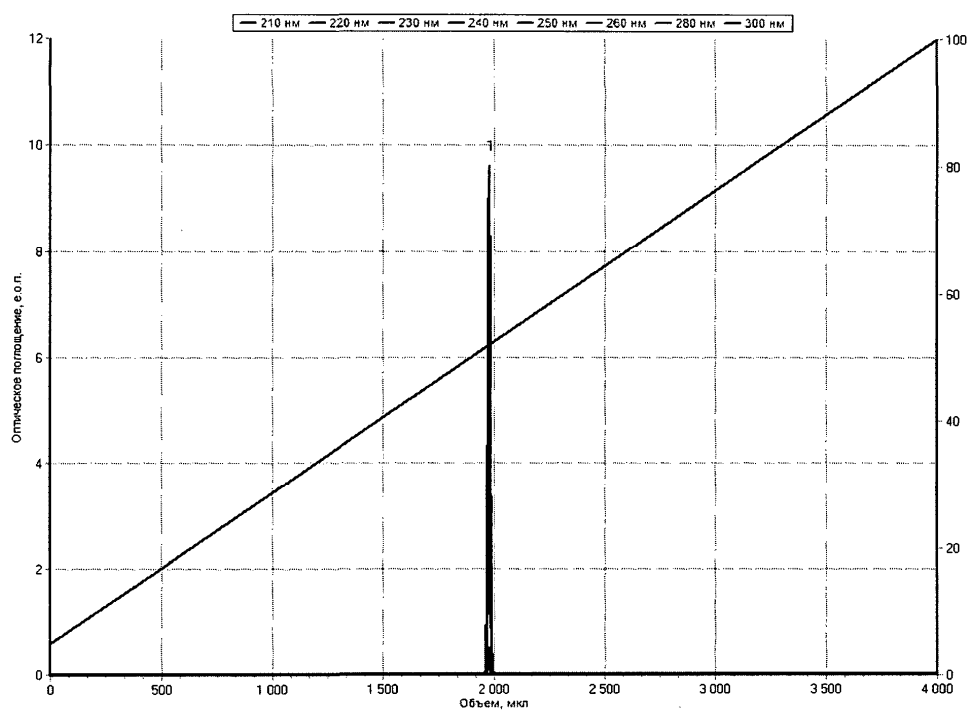
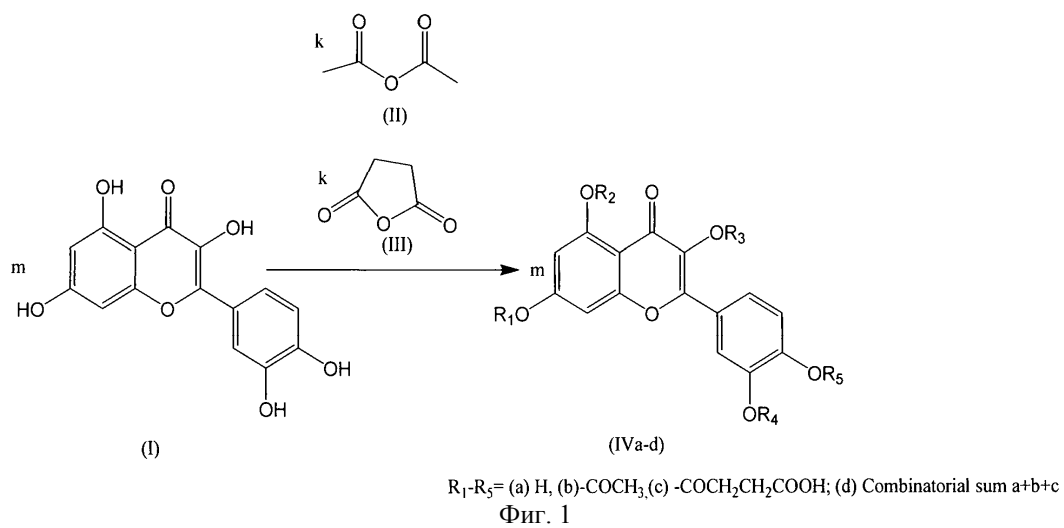
2. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина по п.1, отличающаяся тем, что формообразующее вещество - это фосфотидилхолин.

3. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина по п.1, отличающаяся тем, что формообразующее вещество - это фосфотидилэтаноламин.

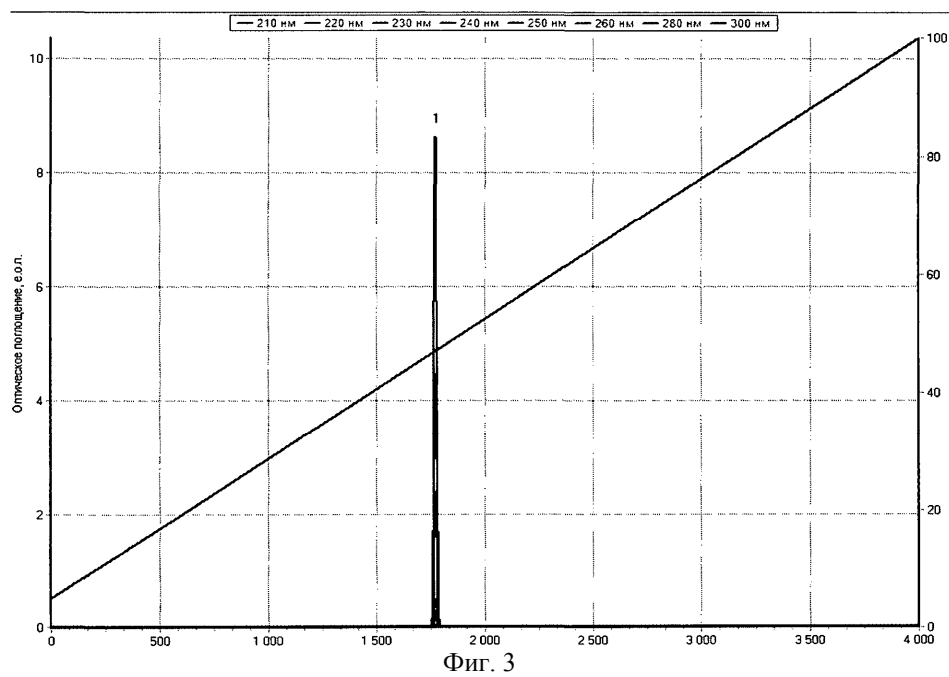
4. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина по п.1, отличающаяся тем, что формообразующее вещество - это сухое молоко.

5. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина по п.1, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция изготовлена в виде капсул.

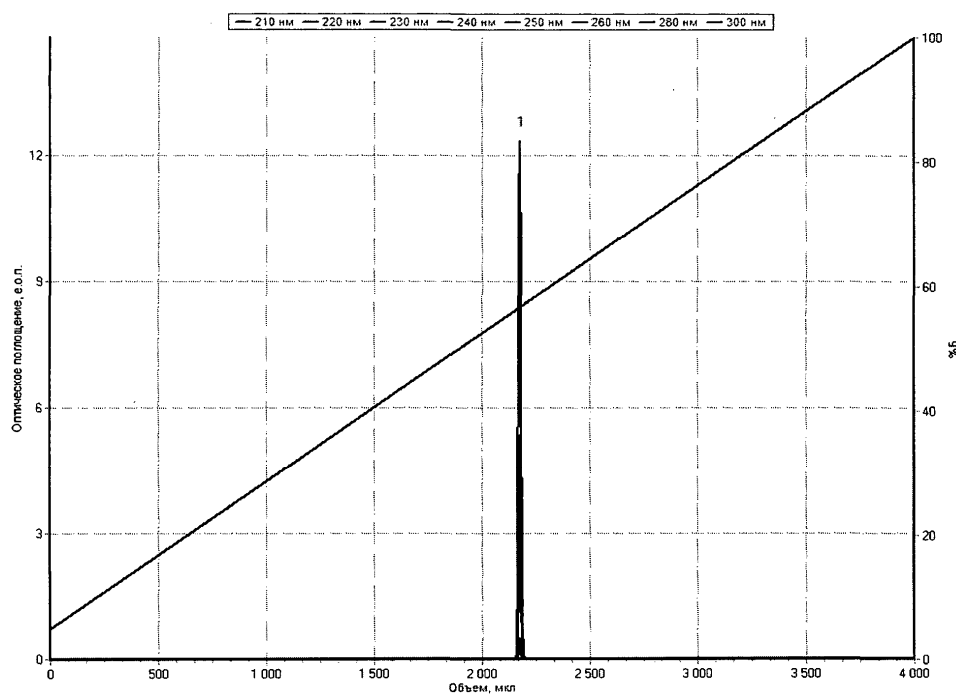
6. Фармацевтическая композиция на основе комбинаторного производного кверцетина по п.1, отличающаяся тем, что фармацевтическая композиция изготовлена в виде раствора.



Фиг. 2

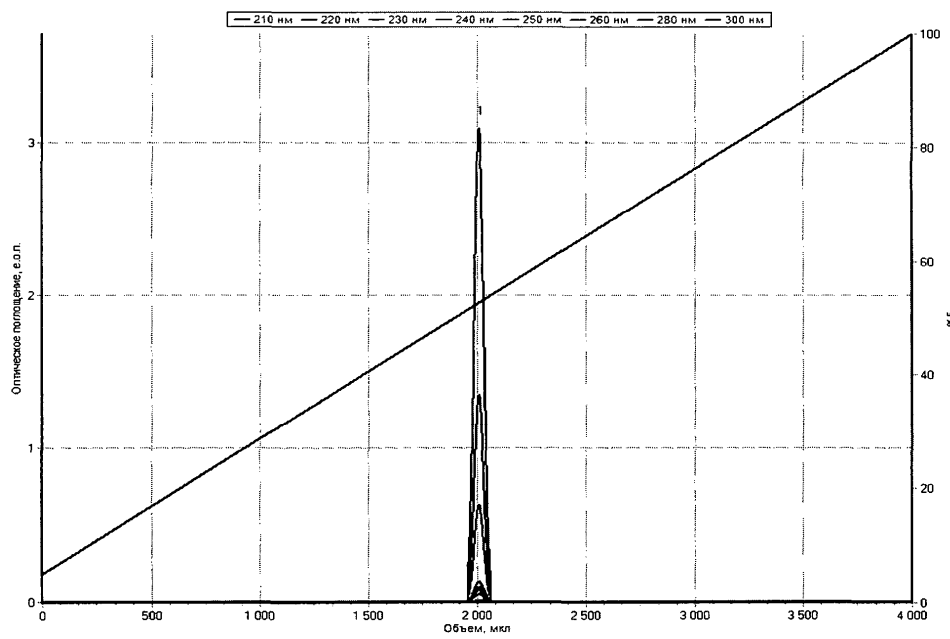


Фиг. 3



Фиг. 4





Фиг. 5

