



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 179 850** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 31/195, 31/205**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

- (21), (22) Заявка: 98103503/14, 19.07.1996
(24) Дата начала действия патента: 19.07.1996
(30) Приоритет: 03.08.1995 IT RM 95A 000545
(43) Дата публикации заявки: 10.01.2000
(46) Дата публикации: 27.02.2002
(56) Ссылки: Реферат из АБД: Medline (NCBI).
Levade T., Moser H.W., Fensom A.H., Harzer
K., Moser A.B., Salvayre R.
Neurodegenerative course in ceramidase
deficiency (Farber disease) correlates with
the residual lysosomal turnover in cultured
living patient cells. (J. Neurol. Sci. 1995,
Dec., 134 (1-2):108-14). КОИ Р.М. и др.
Ранняя диагностика болезней обмена веществ.
- М.: Медицина, 1986, с. 472-473. DE 2946563
A, 21.05.1981. EP 0552138 A2, 21.07.93. EP
0400547 A1, 05.12.1990. EP 0517125 A1,
09.12.92. EP 0514357 A1, 19.11.1912.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 03.03.1998
(86) Заявка РСТ:
IT 96/00147 (19.07.1996)
(87) Публикация РСТ:
WO 97/05862 (20.02.1997)
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", Лебедевой Н.Г.

- (71) Заявитель:
СИГМА-ТАУ ИНДУСТРИЕ ФАРМАСЬЮТИКЕ
РИУНИТЕ С.П.А. (IT),
МЕНДЕС С.Р.Л. (IT)
(72) Изобретатель: МОРЕТТИ Сония (IT)
(73) Патентообладатель:
СИГМА-ТАУ ИНДУСТРИЕ ФАРМАСЬЮТИКЕ
РИУНИТЕ С.П.А. (IT),
МЕНДЕС С.Р.Л. (IT)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ОСНОВНЫХ АМИНОКИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ЦЕРАМИДОВ, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

(57)
Предложено применение основных
аминокислот, ацилированных основных
аминокислот, выбранных из группы,
состоящей из аргинина, лизина, гистидина,
орнитина, и их фармакологически пригодных
солей для снижения высокого содержания

церамидов. С аналогичной целью предложено
применение L-карнитина или ацил L-карнитина
или его фармакологически приемлемой соли.
Изобретение расширяет арсенал средств
указанного назначения. 2 с. и 3 з.п. ф-лы, 5
табл.

RU 2 179 850 C2

RU 2 179 850 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 179 850** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 31/195, 31/205**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **98103503/14, 19.07.1996**
(24) Effective date for property rights: **19.07.1996**
(30) Priority: **03.08.1995 IT RM 95A 000545**
(43) Application published: **10.01.2000**
(46) Date of publication: **27.02.2002**
(85) Commencement of national phase: **03.03.1998**
(86) PCT application:
IT 96/00147 (19.07.1996)
(87) PCT publication:
WO 97/05862 (20.02.1997)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMAS'JuTIKE
RIUNITE S.P.A. (IT),
MENDES S.R.L. (IT)
(72) Inventor: **MORETTI Sonija (IT)**
(73) Proprietor:
SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMAS'JuTIKE
RIUNITE S.P.A. (IT),
MENDES S.R.L. (IT)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **APPLICATION OF THE MAIN AMINO ACIDS AND THEIR DERIVATIVES TO DECREASE THE CONTENT OF CERAMIDES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION**

(57) Abstract:
FIELD: pharmacology, pharmaceuticals.
SUBSTANCE: the method puts forward to apply the main amino acids, acylated main amino acids selected from the group which consists of arginine, lysine, histidine, ornithine and their pharmacologically applicable salts

to decrease high content of ceramides. At analogous purpose it is proposed to apply L-carnitine or acyl L-carnitine or its pharmacologically applicable salt. EFFECT: broadened stores of preparations of mentioned indication. 5 cl, 5 tbl, 5 ex

RU 2 179 850 C2

RU 2 179 850 C2

Применение основных аминокислот, ацилированных основных аминокислот и их фармакологически пригодных солей для профилактики заболеваний или терапевтического лечения цитологических нарушений, сопровождающихся высоким содержанием церамидов.

Настоящее изобретение относится к новому терапевтическому применению основных аминокислот, ацилированных основных аминокислот и их фармакологически пригодных солей для профилактики заболеваний или терапевтического лечения цитологических нарушений, сопровождающихся высоким содержанием церамидов. В частности, настоящее изобретение касается применения L-карнитина, ацильных производных L-карнитина и их фармакологически приемлемых солей для профилактики заболеваний или лечения цитологических нарушений, вызванных высоким содержанием церамидов.

Церамид является основной молекулой для структуры сфинголипидов и их метаболизма. Все сфинголипиды содержат церамид в качестве основного гидрофильного компонента и получают из церамидов путем биосинтеза, при этом модифицируется, главным образом, его 1-гидроксильное положение. Сфинголипиды, в свою очередь, играют важную роль в передаче сигнала через клеточную мембрану.

Церамид играет важную роль в передаче сигнала через клеточную мембрану. Молекулы, способные реагировать на внутриклеточные рецепторы (то есть кальцитриол) или трансмембранные рецепторы [то есть гамма-интерферон (IFN- γ), интерлейкин 1 (IL-1) и фактор роста нерва (NGF)], гидролизуют сфингомиелин до церамидов. Церамид активирует фосфатазы и протеинкиназы и с биологической точки зрения индуцирует клеточный апоптоз, рост и дифференцировку клеток, модулирует экспрессию циклооксигеназы и фосфолипазы и активацию κ ядерных факторов (NF κ B) [Kuno, K. и др., J.Leukoc. Biol., 56(5): 542-7; Cifone, M.G. и др., J.Exp. Med., 180(4): 1547-52; Kolesnick R., Mol. Chem. Neuropathol., 21(2-3): 287-97; Jarvis, W.D. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91(1): 73-7; Obeid, L.M. и др., Science, 259(5102): 1769 -71].

Обнаружено, что вариации концентраций или метаболизма церамидов вносят вклад в патогенез многих заболеваний или в индуцирование метаболических клеточных нарушений. К сожалению, на сегодня не существует методов понижения уровня церамидов *in vivo*.

Следовательно, целью данного изобретения является обеспечение нового применения основных аминокислот, ацилированных основных аминокислот и их фармакологически приемлемых солей для понижения содержания церамидов *in vivo*.

Второй целью настоящего изобретения является обеспечение нового применения основных аминокислот, ацилированных основных аминокислот и их фармакологически приемлемых солей для профилактики заболеваний или терапевтического лечения цитологических нарушений, сопровождающихся высокими уровнями

церамидов. Действительно, обнаружено, что введение больших доз основных аминокислот, основных соединений с низким молекулярным весом, или их ацильных производных и их фармакологически приемлемых солей снижает содержание церамидов, и, следовательно, такие соединения можно применять для лечения заболеваний, характеризующихся высоким содержанием церамидов.

В частности, обнаружено, что такие основные аминокислоты, как аргинин, лизин, гистидин, орнитин и карнитин или их ацильные производные и их фармакологически приемлемые соли можно применять для лечения заболеваний, характеризующихся высоким содержанием церамидов.

Согласно данному изобретению обеспечивают новое применение основных аминокислот, ацильных производных основных аминокислот и их фармакологически пригодных солей для снижения содержания церамидов *in vivo*.

Подходящие аминокислоты включают любую аминокислоту с основным зарядом, такие как аргинин, лизин, гистидин, орнитин и карнитин. Эти соединения доступны коммерчески. Предпочтительно использовать L-аминокислоты. Более предпочтительно использовать карнитин. Эти соединения можно применять в виде свободных аминокислот или фармацевтически пригодных солей.

В настоящем изобретении можно также использовать ацильные производные основных аминокислот. Можно использовать C₂₋₆ ацил-аминокислоты, линейные или разветвленные, эти кислоты хорошо известны фармакологам и специалистам в области технологии лекарственных форм. Особо предпочтительными ацильными группами являются ацетил, пропионил, бутирил, валерил и изовалерил.

Фармацевтически подходящие соли могут быть образованы указанными выше основными аминокислотами и обычными анионами, такими как хлорид, бромид, иодид или аспартат, в частности, кислый аспартат, цитрат, в частности, кислый цитрат, тартрат, в особенности, кислый тартрат, фосфат, в частности, кислый фосфат, фумарат, в частности, кислый фумарат, гликофосфат, такой как глюкофосфат, кислый лактат, кислый малеат, оротат, кислый оксалат, в особенности, щавелевая кислота, сульфат; особенно предпочтительны сульфат, трихлорацетат, трифторацетат и метансульфонат.

Примеры заболеваний или нарушений, характеризующихся повышенным содержанием церамидов, включают воспалительные заболевания кишечника, диффузную внутрисосудистую коагуляцию, жар, протеиновый катаболизм и/или липидное истощение, гепато-спленомегалию, ассоциированную с воспалительными или метаболическими заболеваниями печени, эндо-миокардит, активацию эндотелиальных клеток и лейкоцитов, тромбоз капилляров, менингоэнцефалит, вызванный инфекционными агентами, трансплантацию органов, ревматоидный артрит и заболевания соединительных тканей, аутоиммунные заболевания, гипертиреоз, поражения радиацией и/или химиотерапевтическими

агентами и синдром хронического утомления.

Так как применение некоторых лекарств также может вызывать повышение содержания церамидов, настоящее изобретение также предполагает снижение содержания церамидов у пациентов, лечившихся такими лекарствами. Например, в соответствии с настоящим изобретением основную аминокислоту можно вводить вместе с кортикостероидами (такими как дексаметазон), противовоспалительными препаратами (такими как индометацин), противовирусными агентами (такими как интерферон), иммунодепрессантами (такими как циклоспорин), химиотерапевтическими агентами (такими как адриамицин), иммуностимуляторами (такими как иммуноглобулин и вакцины) и эндокринологическими агентами (такими как метимазол) для предупреждения увеличения содержания церамидов.

Нормальное содержание церамидов у здоровых пациентов зависит от возраста, роста и веса индивидуума, но в основном составляет величину в интервале от 5 до 50 пикомолей/10⁶ клеток (предпочтительно лимфоцитов периферической крови). Уровни выше 50 пикомолей/10⁶ клеток считаются высокими. Использование в соответствии с настоящим изобретением основных аминокислот, ацилированных основных аминокислот и их фармакологически приемлемых солей снижает такое высокое содержание церамидов, по крайней мере, на 25%.

Согласно настоящему изобретению основные аминокислоты вводят в основном в таких концентрациях, которые снижают содержание церамидов, по крайней мере, на 25%. Соответственно, такого результата достигают при введении примерно от 50 мг до 15 г основных аминокислот в день, пероральным или парентеральным способом. Предпочтительно требуется вводить большие количества таких основных аминокислот, а именно, >1 г в день, >2 г в день; в частности, предпочтительно 4-10 г в день.

Контролировать содержание церамидов можно либо путем прямого контроля содержания церамида в клетке (такой как лимфоцит), либо посредством непрямого контролирования концентраций метаболита церамида в клетке. Чтобы количественно оценить понижение уровня церамида у пациента, предпочтительно контролировать его и до, и после введения основной аминокислоты. Контроль можно начинать в любое время после введения, но для гарантии правильности результатов удобно начинать определения через 3 ч после введения.

Содержание церамида можно определять прямым способом путем выделения лимфоцитов периферической крови пациента. После этого клетки центрифугируют, удаляют супернатант, и удаляют из клеточного осадка липиды. Органическую фазу, содержащую церамид, можно исследовать, применяя способ с использованием диацилглицеринкиназы ("DAG kinase assay") для фосфорилирования церамида, который затем проявляется способом ауторадиографии [Cifone, M.G. и др., J. Exp. Med., 180(4): 1547-52].

После общего описания данного изобретения дополнительное понимание

предмета можно получить, обратившись к конкретным примерам, которые, если специально не указано, приведены здесь только с иллюстративной целью и не являются ограничительными.

5 Пример 1

Согласно классической методологии выделяют лимфоциты периферической крови. Клетки инкубируют с L-карнитином (200 мкг/мл) или с изовалерил-L-карнитином в течение 30 мин при 37°C и после этого еще в течение 30 мин с anti-Fas моноклональным антителом. Затем клетки центрифугируют, удаляют супернатант и проводят делипидирование клеточного осадка. Органическую фазу (содержащую церамид) исследуют способом с использованием диацилглицеринкиназы ("DAG kinase assay") для фосфорилирования церамида, который затем проявляется при ауторадиографии.

Результаты приведены ниже в таблице 1.

Известно, что стимулированные подходящим образом клетки (а именно, Fas-L, интерлейкин-1 и др.) генерируют церамид. Для увеличения производства церамида от исходного значения (20 пикомолей на 10⁶ клеток) до 81,6 пикомолей на 10⁶ клеток применяют anti-Fas антитела.

Как показано, L-карнитин и изовалерил-L-карнитин ингибируют синтез церамида in vitro.

30 Пример 2

Двум пациентам с симптоматической нейромииопатией (синдром хронического утомления) вводят в течение двух месяцев L-карнитин, по 3 г в день пероральным способом.

Церамид определяют в мышцах до и после введения.

Результаты приведены ниже в таблице 2.

35 Пример 3

Четырем пациентам с гипертиреозом, которых в течение периода более восьми месяцев лечили метимазолом (15 мг в день, перорально), вводят в течение 4 недель L-карнитин, по 8 г в день перорально.

Церамид, ассоциированный с лимфоцитами, определяют до и после введения.

Результаты приведены ниже в таблице 3.

40 Пример 4

Трем пациентам с гепато-спленомегалией, вызванной вирусным гепатитом С-типа, вводят внутривенно 4-граммовую ударную дозу L-карнитина.

Церамид, ассоциированный с лимфоцитами, определяют до введения и через 3 и 48 ч после введения.

Результаты приведены ниже в таблице 4.

Очевидно, что введение ударной дозы L-карнитина ингибирует увеличение содержания церамида уже через 3 ч после введения. Эффект сохраняется, по крайней мере, в течение двух дней.

45 Пример 5

Четырем пациентам с протеиновым катаболизмом и липидным истощением, являющихся следствием туберкулезной инфекции, вводят в течение 2 недель L-карнитин, по 8 г в день парентерально.

Церамид, ассоциированный с лимфоцитами периферической крови, определяют до и после введения.

Результаты приведены ниже в таблице 5.

После полного описания данного

изобретения специалисту будет ясно, что можно допустить многие изменения и модификации, не отступая от духа или объема заявленного изобретения.

Формула изобретения:

1. Применение основной аминокислоты, ацилированной основной аминокислоты, причем указанную аминокислоту выбирают из группы, состоящей из аргинина, лизина, гистидина, орнитина, или ее фармакологически приемлемой соли в качестве активного ингредиента лекарственно препарата для снижения высокого содержания церамида в клетках.

2. Применение L-карнитина или ацил L-карнитина или его фармакологически приемлемой соли в качестве активного ингредиента лекарственного препарата для снижения высокого содержания церамида в клетках.

3. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что высокое содержание церамида в клетках вызвано нарушениями, выбранными из группы, состоящей из катаболизма белков и/или липидного

истощения, являющихся следствием туберкулезной инфекции, гепатоспленомегалии, связанной с гепатитом, гипертиреоза и синдрома хронической усталости.

5 4. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что ацильную группу выбирают из группы, состоящей из ацетила, пропионила, бутирила, валерила и изовалерила.

10 5. Применение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что фармакологически приемлемую соль выбирают из группы, состоящей из хлорида, бромида, иодида, кислого аспартата, кислого цитрата, кислого тартрата, кислого фосфата, кислого фумарата, гликофосфата, кислого лактата, кислого малеата, оротата, кислого оксалата, сульфата, трихлорацетата, трифторацетата или метансульфоната.

Приоритет по пунктам и признакам:

20 19.07.1996 - по признаку п. 3 "катаболизма белков и/или липидного истощения";

03.08.1995 - по остальным пунктам и остальным признакам п. 3.

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1
Церамид (пико-
молей на 10^6 клеток

Контроль	20
Контроль anti-Fas антитело	81,6
Контроль anti-Fas антитело + L-картинин (100 мкг/мл)	7,3
Контроль anti-Fas антитело + изовалерил-L-карнитин (50 мкг/мл)	8,6
Контроль anti-Fas антитело + изовалерил-L-карнитин (100 мкг/мл)	7,3

Таблица 2

	Церамид до лечения (пико- молей на мг протеинов)	Церамид после лечения (пико- молей на мг протеинов)
Пациент 1	76	28
Пациент 2	142	46

Таблица 3

	Церамид до лечения (пико-молей/ 10^6 клеток)	Церамид после лечения (пико-молей/ 10^6 клеток)
Пациент 1	73	26
Пациент 2	45	27
Пациент 3	11	36
Пациент 4	69	18

	Таблица 4		
	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3
	Церамид (пико- молей/10 ⁶ клеток)	Церамид (пико- молей/10 ⁶ клеток)	Церамид (пико- молей/10 ⁶ клеток)
До лечения	65	77	79
Через 3 час	12	32	24
Через 48 час	31	21	23

	Таблица 5	
	Церамид до лечения (пикомолей/10 ⁶ клеток)	Церамид после лечения (пикомолей/10 ⁶ клеток)
Пациент 1	127	59
Пациент 2	265	77
Пациент 3	301	152
Пациент 4	78	54

RU 2179850 C2

RU 2179850 C2