



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2002135524/15, 26.12.2002

(24) Дата начала действия патента: 26.12.2002

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2004

(45) Опубликовано: 10.03.2005 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: *Thromb Haemost.* 1999, Mar 1, 81(3):391-5. *Thromb Res.* 1997, Jul. 1, 87(1):113-21. *Thromb Res.* 1999, Oct. 1, 96(1):37-49. *Thromb Res.* 2002, May 15, 106(4-5): 213-21. RU 2132622 C1, 10.07.1999.

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-т 100-лет
 Владивостока, 159, ТИБОХ ДВО РАН, зав. пат.
 отд. Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Шевченко Н.М. (RU),
 Звягинцева Т.Н. (RU),
 Исаков В.В. (RU),
 Кузнецова Т.А. (RU),
 Запорожец Т.С. (RU),
 Беседнова Н.Н. (RU),
 Момот А.П. (RU),
 Мамаев А.Н. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):

Тихоокеанский институт биоорганической химии
 Дальневосточного отделения РАН (RU)

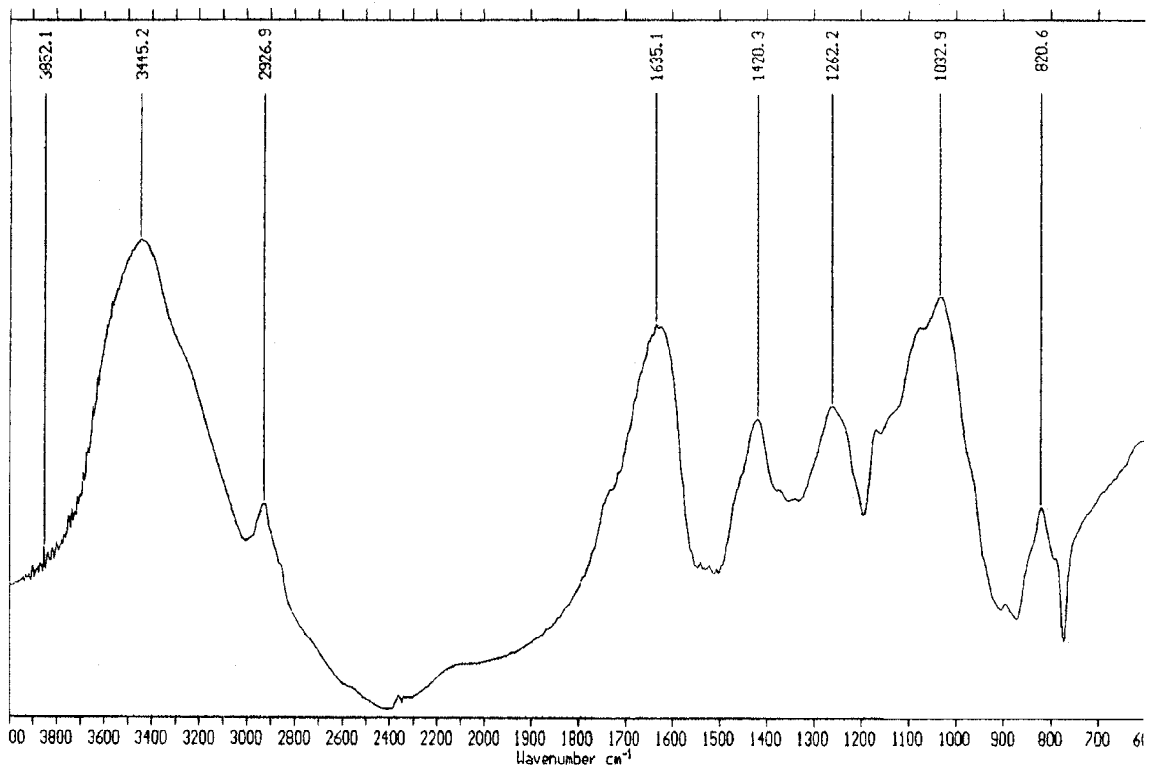
(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИКОАГУЛЯНТНЫМ И ИММУНОТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области создания антикоагулянтов растительного происхождения. Средство, обладающее антикоагулянтным и иммуностропным действием, представляет собой фукоидан, полученный путем экстракции водой бурой водоросли *Fucus evanescens* при температуре 20-60°C с последующим осаждением этанолом, с молекулярной массой 20000-40000 дальтон и содержит нейтральные моносахариды:

фукозы 70-80%, галактозы 2-9%, ксилозы 5-10% и глюкозы 2-7%, а также - сульфатов - 20-22%, при этом интенсивные сигналы в спектре ¹³C-ЯМР при 16,0-18,0 м.д. и полосу поглощения в ИК-спектре при 820-822 см⁻¹. Фукоидан как в большой, так и в малой дозах стимулирует фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофилов, обладает иммуностимулирующим действием в широком диапазоне доз. 2 ил., 3 табл.

RU 2247574 C2



фиг. 1

RU 2247574 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2002135524/15, 26.12.2002**

(24) Effective date for property rights: **26.12.2002**

(43) Application published: **20.07.2004**

(45) Date of publication: **10.03.2005 Bull. 7**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-t 100-let Vladivostoka,
159, TIBOKh DVO RAN, zav. pat. otd. N.I.
Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Shevchenko N.M. (RU),
Zvjagintseva T.N. (RU),
Isakov V.V. (RU),
Kuznetsova T.A. (RU),
Zaporozhets T.S. (RU),
Besednova N.N. (RU),
Momot A.P. (RU),
Mamaev A.N. (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Tikhookeanskij institut bioorganicheskoj khimii
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN (RU)**

(54) **AGENT ELICITING ANTICOAGULATING AND IMMUNOTROPIC EFFECT**

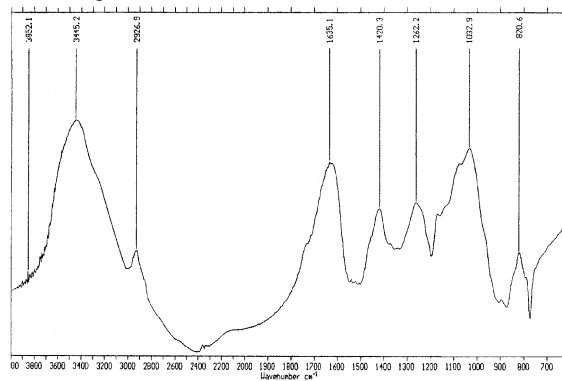
(57) Abstract:

FIELD: chemistry of natural compounds, medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the development of anticoagulant of vegetable origin. Agent eliciting anti-coagulating and immunotropic effect represents fucoidan prepared from brown alga *Fucus evanescens* by extraction with water at temperature 20-60°C followed by precipitation with ethanol. Fucoidan has molecular mass 20000-40000 Da and contains the following neutral monosaccharides, %: fucose, 70-80; galactose, 2-9; xylose, 5-10, and glucose, 2-7, and also sulfates, 20-22%. Fucoidan shows intensive signals in [¹³C]-NMR spectrum at 16.0-18.0 m.d. and the absorption band in IR-spectrum at 820-822 cm⁻¹. Fucoidan stimulates phagocyte and bactericidal activity of neutrophils being in the large and small

doses and elicits immunostimulating effect in the broad range of doses.

EFFECT: valuable medicinal properties of agent.
2 dwg, 3 tbl



фиг. 1

Изобретение относится к области медицины и, в частности, касается средства, обладающего антикоагулянтным и иммунотропным действием.

Среди известных фармацевтических препаратов антикоагулянтного действия широко применяется гепарин - антикоагулянт прямого действия. Однако гепарин является
5 лекарственным препаратом животного происхождения, а его применение в клинике может вызывать ряд побочных эффектов. Наибольшую опасность при гепаринотерапии представляет снижение свертываемости крови, тромбоцитопения, возникновение
10 желудочно-кишечных кровотечений, гематурия, кожные геморрагии, аллергические реакции, а после его отмены у больных могут возникать тромбоэмболические осложнения в виде так называемых "рикошетных" тромбозов [1, 2, 3]. Кроме того, гепарин в
15 высоких дозах (100-200 мг/кг) проявляет иммунодепрессивные свойства путем угнетения формирования антителобразующих клеток [4], а также индуцирует депрессию в системе
20 нейтрофильных гранулоцитов [5].

В настоящее время следует считать актуальной задачей необходимость поиска новых
15 высокоэффективных, малотоксичных физиологически активных препаратов из доступных природных источников, в том числе антикоагулянтов прямого действия растительного происхождения. Наибольшее признание в качестве таких веществ получили соединения
20 полисахаридной природы. Их низкая токсичность для организма, большая степень свободы дозирования, экологически чистые и экономичные технологии производства привлекают
25 внимание исследователей.

Известен антикоагулянт растительного происхождения, представляющий собой гепариноподобный полисахарид, связанный с пептидом, характеризующийся молекулярной
30 массой 5-6 кДа, и выделенный экстракцией водой корней пиона древовидного [6].

Бурые водоросли являются богатым и легко возобновляемым сырьевым источником
25 интересных по структуре и физиологической активности полисахаридов. Эти источники, наряду с широко известной альгиновой кислотой, содержат уникальные водорастворимые полисахариды - ламинараны и фукоиданы, которые пока не нашли широкого практического
30 использования. Из этих полисахаридов наибольший интерес представляют фукоиданы, которым принадлежит основная роль в биологическом действии водорослей. У фукоиданов обнаружены антикоагулянтная, противоопухолевая, гиполипидемическая, антивирусная (в
35 том числе против ВИЧ-инфекции) активности [7-9].

Несмотря на то что антикоагулянтные свойства сульфатированных полисахаридов
известны давно, существует проблема их терапевтического применения, с одной стороны,
35 по причине сравнительно высокого остаточного содержания протеинов, что чревато риском иммунногенных явлений, а с другой стороны, по причине их высокого молекулярного веса (100-800 кДа),
40 результатом которого является плохая растворимость, которая в значительной мере ограничивает их применение в высоких концентрациях.

Обнаружено, что для фукоиданов величина оптимальной молекулярной массы для
45 проявления ими антикоагулянтной активности лежит в диапазоне 10-50 кДа. Чтобы получить фракции с оптимальной молекулярной массой дополнительно проводят
кислотный или радикальный гидролиз в присутствии соли меди. Это требует дополнительных затрат и усложнения процесса получения фукоиданов с
50 антикоагулянтными свойствами [7]. Кроме того, рассечение на фрагменты длинной полисахаридной цепи фукоидановых молекул требует использования процесса лизиса,
45 который необходимо контролировать таким образом, чтобы избежать чрезмерного разложения фукоидана, ведущего к потере его свойств.

В связи с этим поиск в бурых водорослях низкомолекулярных фукоиданов, обладающих антикоагулянтным и иммунотропным действием, является актуальной задачей.

Описана антикоагулянтная и стимулирующая липолиз активность сульфатированных
50 полисахаридов из дальневосточных бурых водорослей, таких как *Laminaria japonica*, *L. sichorioides*, *Sphaerotrichia divaricata*, *Costaria costata* и *Pelvetia wrightii* [10]. При этом только сульфатированный полисахарид из *Sphaerotrichia divaricata* показал сравнимую с
гепарином антикоагулянтную активность. Этот сульфатированный полисахарид выделен в

виде соли кальция путем экстракции водоросли смесью метанол, хлороформ, вода, затем хлористым кальцием, высаждением солевого продукта цетавлоном с последующим получением кальциевой соли фукоидана и высаждением этанолом [11]. Полисахариды, выделенные из остальных водорослей, показали слабое антикоагулянтное действие.

5 Сульфатированный полисахарид из *Sphaerotrichia divaricata* охарактеризован следующими параметрами: содержание SO_3Ca^+ - 27,9%, фукозы – 60,3%, галактозы - 3,1%, ксилозы - следы, уроновых кислот - 1,9%. Однако водоросль *Sphaerotrichia divaricata* относится к малораспространенному, труднодоступному виду водоросли. Поэтому применение ее для практического использования с целью получения препарата с
10 антикоагулянтными свойствами бесперспективно. В литературе не было сообщений о последующих работах по получению и применению в качестве антикоагулянта сульфатированного полисахарида из *Sphaerotrichia divaricata*.

Задачей изобретения является расширение арсенала лекарственных средств из бурых водорослей с антикоагулянтным и иммуностропным действием.

15 Задача решена новым средством, обладающим антикоагулянтным и иммуностропным действием, характеризующимся тем, что оно представляет собой фукоидан, полученный путем экстракции водой бурой водоросли *Fucus evanescens* при температуре 20-60°C с последующим осаждением этанолом. Средство имеет молекулярную массу 20000-40000 дальтон и содержит нейтральные моносахариды: фукозы - 70-80%, галактозы - 2-9%,
20 ксилозы - 5-10% и глюкозы - 2-7%, а также - сульфатов - 20-22%, при этом интенсивные сигналы в спектре ^{13}C -ЯМР при 16,0-18,0 м.д. и полосу поглощения в ИК-спектре при 820-822 cm^{-1} .

Антикоагулянтное действие заявляемого фукоидана из *Fucus evanescens* характеризуется следующими параметрами при испытании *in vitro*: активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) от 80 до 900 с, тромбиновое время (ТВ) от 40 до 400 с в зависимости от дозы. По антикоагулянтному действию оно сравнимо с гепарином, который также оказывает дозозависимый эффект.

30 Экспериментально установлено, что заявляемое средство в большом диапазоне доз в отличие от гепарина обладает иммуностропным действием.

Источник получения нового средства - бурая водоросль *Fucus evanescens* с практической точки зрения имеет преимущество перед другими видами водорослей, и, в частности, перед *Sphaerotrichia divaricata*. Это преимущество заключается в том, что водоросль *Fucus evanescens* имеет обширный ареал распространения, растет на
35 мелководье и легко доступна.

Получение фукоидана.

Свежую или замороженную (после дефрестации) водоросль *Fucus evanescens* обрабатывают этанолом с целью ее обезжиривания и удаления пигмента. Затем водоросль сушат на воздухе, грубо измельчают и обрабатывают водой (1:20 вес/объем) сначала при
40 комнатной температуре (5 часов), а затем при 50-60°C при перемешивании в течение 5 часов. Экстракт концентрируют при пониженном давлении до 1/4-1/5 первоначального объема и доводят рН суспензии до значения 3,0. Затем отделяют образовавшийся осадок центрифугированием, доводят рН супернатанта до нейтрального титрованием гидроокисью натрия, диализуют против воды. Затем высаждают натриевую соль фукоидана двумя
45 объемами 96% этанола. Осадок трижды промывают 50% водным этанолом и сушат 96% этанолом. Получают целевой продукт с выходом 7,5-10% (от веса сухой водоросли).

Фукоидан, полученный из бурой водоросли *Fucus evanescens*, имеет следующие физико-химические характеристики:

- порошок кремового цвета хорошо растворим в воде, диметилсульфоксиде,
- 50 - нерастворим в спирте, ацетоне, гексане, серном эфире;
- молекулярная масса: 20000-40000 дальтон (определена методом гель-фильтрации с применением Superdex 75 HR 10/30 Amersham Pharmacia Biotech AB, анализ фракций фенол-серноокислотным методом [12]);

- содержание сульфатов: 20-22%; степень сульфатирования определена после гидролиза образцов 4N HCl при 100°C, используя турбидиметрический метод [13];

- содержание нейтральных моносахаридов: фукозы - 70-80%, галактозы - 2-9%, ксилозы 5-10%, глюкозы 2-7%.

5 Моносахаридный состав определен высокоэффективной жидкостной хроматографией. Образцы полисахаридов (5 мг) подвергали гидролизу 4N HCl при 100°C (2 ч). Моносахаридный состав продуктов кислотного гидролиза определяли методом ВЭЖХ на углеводном анализаторе IC-5000 Biotronik (смола Durrum DA-X8-11, колонка 385×3,2 мм, 60 °C), обнаружение проводили бицинхонинатным методом [14]; интегрирующая система
10 Shimadzu C - R2 AX). Моносахариды (Rha, Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) использовали как стандарты для ВЭЖХ.

- ИК-спектр (KBr), см⁻¹: 1230-1255 (S=O), 900-950 (OH), 820-822 (C-O-S);

ИК-спектры полисахаридов регистрировались для KBr таблеток исследуемого образца на спектрометре Carl Zeiss IR-75 (фиг.1);

15 - ¹³C-ЯМР-спектр представлен в виде кривой (фиг.2);

¹³C-ЯМР спектры были получены при 60°C на ЯМР-спектрометре Bruker-Physic WM-250 с рабочей частотой 62,9 МГц в D₂O при температуре 70°C. Образцы полисахаридов растворяли в D₂O.

20 Острую токсичность исследовали на неинбредных мышах. Заявляемое средство нетоксично при его внутрибрюшинном введении в дозах от 0,05 до 100 мг/кг.

Исследование антикоагулянтного действия.

Влияние фукоидана на показатели коагулограммы изучали в тестах in vivo и in vitro. Исследования in vitro проводили на бедной тромбоцитами плазме, полученной от здоровых
25 доноров. Фукоидан вносили в плазму в дозах от 1 до 1000 мкг/мл плазмы, гепарин - в дозе 1,0 Ед/мл плазмы. Исследования in vivo проводили на мышах линии BALB/c, которым вводили фукоидан внутрибрюшинно в дозе 5 мг/кг. Смесь образцов плазмы крови получали от 10-15 животных через 15, 30, 60 и 180 мин после введения препарата.

Изучали следующие параметры коагулограммы с использованием реактивов фирмы
30 "Технология-Стандарт" (Россия) и коагулометра CD-4 фирмы "Diamed" (Швейцария): 1) активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ) для оценки внутреннего механизма свертывания; 2) протромбиновое время (ПВ) для оценки внешнего механизма свертывания; 3) тромбиновое время (ТВ) для оценки конечного этапа свертывания. Результаты представлены в таблицах 1 и 2.

35

Время после введения (мин)	Время свертывания плазмы крови (с)			
	АПТВ	К (опыт/контр.)	ТВ	К (опыт/контр.)
15	150±54,3	3,3	80,0±14,5*	4,7
30	84,0±26,0	1,8	31,0±0,9*	1,8
60	46,8±2,4	-	17,3±1,5	-
180	43,2±1,6	-	17,5±1,2	-
Контроль	45,5±1,6		17,0±1,2	

40

Однократное внутрибрюшинное введение мышам фукоидана в дозе 5 мг/кг приводило к
45 гипокоагуляции, о чем свидетельствует увеличение по сравнению с контролем времени свертывания в АПТВ в 3,3 раза и по ТВ - в 4,7 раза через 15 мин после инъекции. По истечении же 30 мин время свертывания в этих тестах отличалось от контрольного в 1,8 раза, а через 60 мин исследованные показатели возвращались к нормальному уровню.

Изучение влияния фукоидана in vitro на показатели АПТВ, ПВ и ТВ в пулированной
50 контрольной, нормальной плазме здоровых людей представлены в таблице 2.

Доза фукоидана (мкг/мл)	Время свертывания плазмы крови (с)		
	АПТВ	ТВ	ПВ

	АПТВ	К (опыт/контр.)	ТВ	К (опыт/контр.)	ПВ	К (опыт/контр.)
100	940±207,3*	25,9	385±70,8*	22,4	42±3,5*	3,0
50	610±135,4*	16,9	-	-	-	-
10	210±39,2*	5,8	130±20,7*	7,6	33±4,8*	2,4
1	81,7±10,3*	2,3	42,8±8,5*	2,5	21±3,5*	1,5
Контроль	36,2±1,0		17,1±0,9		14±0,8	
Гепарин	730±95,3**	20,2	420±86,4*	24,6	380±87*	27,2

Примечание: здесь и в табл.1* - p<0,05; ** - p<0,01 (по отношению опыта к контролю).

Под влиянием фукоидана наблюдалось дозозависимое удлинение времени свертывания во всех использованных коагуляционных тестах. Из представленного материала следует, что оптимальная концентрация фукоидана для проявления максимального антикоагулянтного эффекта находится в интервале 50-100 мкг/мл. Аналогичным дозозависимым эффектом обладает, как известно, и гепарин.

Исследование иммуотропного действия.

Нами проведено сравнительное изучение не только антикоагулянтного, но и иммуотропного действия средства из *Fucus evanescens* при условии внутрибрюшинного введения неинбредным мышам в большом диапазоне доз (от 5 до 100 мг/кг) и гепарина в дозе 100 мг/кг на функциональную активность нейтрофильных лейкоцитов перитонеального экссудата. С этой целью использовали тесты по изучению фагоцитарной функции нейтрофилов (фагоцитарный показатель - ФП и фагоцитарное число - ФЧ) и активности кислородзависимых механизмов их бактерицидности (тест восстановления нитросинего тетразолия - НСТ-тест спонтанный). Под влиянием фукоидана как в малой (5 мг/кг), так и в большой (100 мг/кг) дозах наблюдалось статистически достоверное по сравнению с контролем увеличение ФП и ФЧ, тогда как при введении гепарина выявлено значительное снижение ($p \leq 0,01$) этих показателей (табл.3).

Группа животных, получивших	Фагоцитарный показатель (%)	Фагоцитарное число	НСТ-тест (спонт.) ($OD \times 10^{-3}$)
Фукоидан (5 мг/кг)	78,9±4,1*##	4,8±0,32*##	15,9±1,31*##
Фукоидан (100 мг/кг)	81,2±5,9*##	4,9±0,43*##	19,7±1,25*##
Гепарин (100 мг/кг)	38,7±3,1*	1,4±0,28**	3,50±0,41**
Контроль (физ. раствор)	62,3±4,2	3,6±0,26	11,5±1,62

Примечание: * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$ (различия достоверны по отношению к контролю); ## - $p \leq 0,01$ (различия достоверны по отношению к гепарину).

Под действием фукоидана повышались также показатели НСТ-теста: на 33% при введении малой дозы ($p \leq 0,05$) и на 71% при введении большой дозы ($p \leq 0,01$), а под действием гепарина наблюдалось угнетение активности кислородзависимых механизмов бактерицидности (до 70%, $p \leq 0,01$). Полученные результаты свидетельствуют о высокой степени различий ($p \leq 0,01$) всех показателей функциональной активности нейтрофилов в группах животных, которым вводили фукоидан в сравнении с группой мышей, получивших гепарин.

Таким образом, фукоидан как в большой, так и в малой дозах стимулировал фагоцитарную и бактерицидную активность нейтрофилов, а гепарин в большой дозе оказывал депрессивный эффект на эти функции. Последнее согласуется с результатами [5] по индуцированию иммунодефицита в системе нейтрофильных гранулоцитов путем внутрибрюшинного введения гепарина в дозах 100-200 мг/кг.

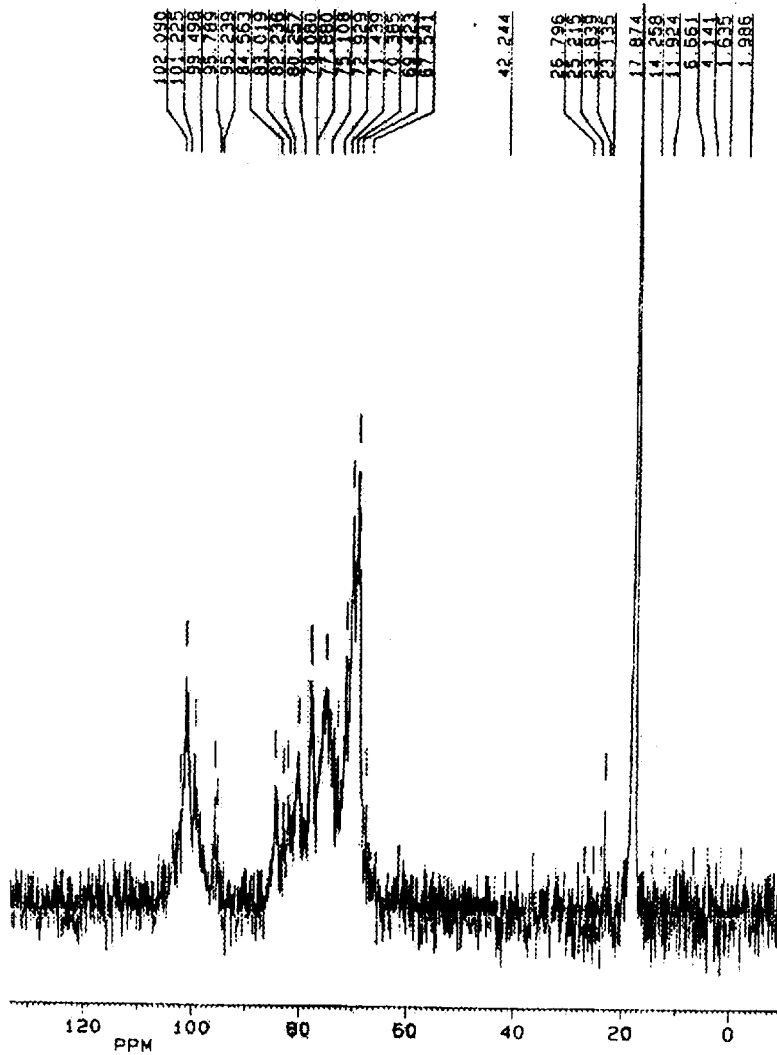
На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что заявляемое средство проявляет сравнимую с гепарином антикоагулянтную активность, но в отличие от последнего обладает иммуностимулирующим действием в широком диапазоне доз. Низкий молекулярный вес обеспечивает его растворение в воде и кислых растворах даже при высокой концентрации, что обуславливает возможность терапевтического применения нового средства из бурых водорослей.

Литература

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. - М.: "Ньюдиамед". 2001. 296 С.
2. Макацария А.Я., Смоляницкий А.С. Проблемы лечения гепарином // Клин. мед., 1980, 10, с.18-21.
3. Godel H.C. In Heparin. Chemical and biological properties. Clinical applications. Ed. D.A. Lane and U. Lindahl, Edward Arnold, London, p.533-548.
4. Sztejn M.B., Serrate S.A. Characterization of immunoregulatory properties of thimosin alfa 1 on interleukin-2 production and reseptor expression in normal lymphocytes // Int. J. Immunopharmacol.1989, v.11,7, p.789-900.
5. Колесникова Н.В., Нестерова И.В. Способ моделирования иммунодефицита по системе нейтрофильных гранулоцитов. Патент РФ №2107330 от 20.03.1998.
6. Патент РФ 2068702, А 61 К 35/78, опубл., 10.11.1996.
7. Nagumo T., Nishino T. Fucan Sulfates and Their Anticoagulant Activities // In: Polysaccharides in Medicinæ Applications. (Ed. S. Dumitriu). University of Sherbrooke. Quebec, Canada. N. -York-Basel-Hong Kong. 1996. P.545-574.
8. Zhuang C., Itoh H., Mizuno T., Ito H. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*) // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1995. Vol.59. P.563-567.
9. Beress A., Wassermann O., Bruhn T. et al. A New Procedure for the Isolation of Anti-HIV Compounds (Polysaccharides and Polyphenols) from the Marine Alga *Fucus Vesiculosus* // Natural Products-Lloydia. 1993. V.56.4. - P.478-488.
10. Розкин М.Я., Левина М.Н., Ефимов В.С., Усов А.И. Антикоагулянтная и стимулирующая липолиз активность полисахаридов из бурых морских водорослей. // Фармакология и токсикология. 1991. Т.54. С.40-42.
11. Усов А.И., Кирьянов А.В. Полисахариды водорослей. 47. Выделение фракций фукоидана из бурой водоросли *Laminaria sichorioides* Miyabe // Биоорган. химия. 1994. Т.20. С.1342-1348.
12. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal. Chem. 1956. Vol.28. P.350-356.
13. Craigie, J.S., Wen, Z.C. and Van der Meer J.P. // Anal. Biochem. 1987. Vol.165. P.337-340.
14. Waffenschmidt S., Jaenicke L. // Anal. Biochem. 1987. Vol.165. P.337-340.

Формула изобретения

1. Средство, обладающее антикоагулянтным и иммуностропным действием, характеризующееся тем, что оно представляет собой фукоидан, полученный путем экстракции водой бурой водоросли *Fucus evanescens* при температуре 20-60°C с последующим осаждением этанолом, с молекулярной массой 20000-40000 дальтон и содержит фукозу, галактозу, ксилозу и глюкозу, а также сульфаты, при этом имеет интенсивные сигналы в спектре ¹³C-ЯМР при 16,0-18,0 м.д. и полосу поглощения в ИК-спектре при 820-822 см⁻¹.
2. Средство по п.1, содержит фукозы 70-80%, галактозы 2-9%, ксилозы 5-10%, глюкозы 2-7%, сульфатов 20-22%.



фиг. 2