



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007108222/14, 05.03.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.03.2007

(45) Опубликовано: 27.10.2008 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2094438 C1, 27.10.1997. RU 2058138 C1, 20.04.1996. US 2005037976, 27.02.2004. KR 20020085401, 16.11.2001. ПОПОВ Г.К. Роль гликозаминогликанов в регуляции гемопоэза // Материалы конференции Института по итогам научных исследований в XII пятилетке, 1990, с.90-92. BAI Y. et al. Recombinant granulocyte colony-stimulating factor-transferrin fusion (см. прод.)

Адрес для переписки:

634028, г.Томск, пр. Ленина, 3, ГУ НИИ
фармакологии ТНЦ СО РАМН, патентоведу Н.Л.
Малюгиной

(72) Автор(ы):

Гольдберг Евгений Данилович (RU),
Дыгай Александр Михайлович (RU),
Зюзьков Глеб Николаевич (RU),
Жданов Вадим Вадимович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

ГУ Научно-исследовательский институт
фармакологии Томского научного центра
Сибирского отделения Российской академии
медицинских наук ГУ НИИ фармакологии ТНЦ
СО РАМН (RU)

(54) СПОСОБ СТИМУЛЯЦИИ МИЕЛОПОЭЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гематологии, и касается способа стимуляции миелопоэза. Для этого вводят гиалуронидазу в специально разработанной для этого эффективной

дозе. Изобретение обеспечивает широкий спектр гемостимулирующего действия на кроветворную ткань, оказывая при этом минимальную лекарственную нагрузку на организм. 2 табл.

(56) (продолжение):

protein as an oral myelopoietic agent // Proc Natl Acad Sci USA. 2005 May 17; 102(20), p.7292-7296. Epub 2005 May.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2007108222/14, 05.03.2007**

(24) Effective date for property rights: **05.03.2007**

(45) Date of publication: **27.10.2008 Bull. 30**

Mail address:

**634028, g.Tomsk, pr. Lenina, 3, GU NII
farmakologii TNTs SO RAMN, patentovedu N.L.
Maljuginoj**

(72) Inventor(s):

**Gol'dberg Evgenij Danilovich (RU),
Dygaj Aleksandr Mihajlovich (RU),
Zjuz'kov Gleb Nikolaevich (RU),
Zhdanov Vadim Vadimovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**GU Nauchno-issledovatel'skij institut
farmakologii Tomskogo nauchnogo tsentra
Sibirskogo otdelenija Rossijskoj akademii
meditsinskikh nauk GU NII farmakologii TNTs
SO RAMN (RU)**

(54) **METHOD OF MYELOPOIESIS STIMULATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns medicine, namely to haematology, and is referred to the method of stimulation of myelopoiesis. For this purpose administer Hyaluronidasum in effective

dose specially developed for it.

EFFECT: provision of wide spectrum of haemostimulating action on hemopoietic tissue, rendering thus the minimum medicinal load on an organism.

2 tbl, 2 ex

RU 2 336 899 C1

RU 2 336 899 C1

Изобретение относится к области медицины, конкретно к гематологии, и касается способа стимуляции миелопоэза.

Значительный рост частоты встречаемости заболеваний системы крови в клинической практике, а также высокая частота развития осложнений при проведении химио- и лучевой
5 терапии со стороны системы крови, являются основанием для поиска новых медикаментозных патогенетически обоснованных способов гемостимуляции и создания новых эффективных лекарственных препаратов, которые с успехом могли бы применяться в лечении анемий и лейкопений различного генеза.

Известно значительное количество способов гемостимуляции. Наиболее широкое
10 распространение в лечебной практике получили методы, основанные на применении препаратов - рекомбинантных форм естественных регуляторов гемопоэза (цитокинов): эритропоэтина, гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, гранулоцитомакрофагального колониестимулирующего фактора [1, 2]. Данные средства обладают выраженными стимулирующими действиями в отношении отдельных ростков
15 миелопоэза.

Недостатками имеющихся способов являются: высокая тропность препаратов к определенному росту кроветворения. В связи с этим, при патологических состояниях, когда наблюдается депрессия сразу нескольких ростков гемопоэза (цитостатические, лучевые воздействия, наследственные заболевания) требуется комбинированное
20 использование гемостимуляторов. При этом одновременное назначение нескольких препаратов с разнонаправленными (а все цитокины являются полифункциональными регуляторами [3]) механизмами действия, сопровождаемое высокой ксенобиотической нагрузкой на организм, может приводить к нарушению функционирования систем жизнеобеспечения и усилению неблагоприятных побочных действий препаратов [4]. При
25 этом такие побочные эффекты, как гипертензивные состояния, нарушения системы гемостаза, дефицит железа в сыворотке крови, аллергические реакции и др. достаточно часто встречаются даже при монотерапии указанными средствами [5, 6]. В свете вышесказанного чрезвычайно важное значение приобретает проблема создания новых эффективных способов стимуляции гемопоэза, которые могли бы оказывать
30 одновременное действие на разные ростки кроветворения и были бы максимально безопасны.

Предлагаемый способ стимуляции миелопоэза адекватного прототипа по широте эффективного гемостимулирующего эффекта и терапевтической сущности среди существующих способов не имеет.

35 Задачей, решаемой данным изобретением, является создание эффективного средства с широким спектром гемостимулирующего действия на кроветворную ткань при минимальной лекарственной нагрузке на организм.

Поставленная задача достигается техническим решением, представляющим собой способ стимуляции миелопоэза, заключающийся во внутрибрюшинном введении
40 лабораторным животным (мыши) препарата гиалуронидазы в дозе 1000 УЕ/кг 1 раз в сут, в течение 2 дней.

Новым в предлагаемом изобретении является использование препарата гиалуронидазы, вводимого внутрибрюшинно в дозе 1000 УЕ/кг 1 раз в сут, в течение 2 дней.

Гиалуроновая кислота (ГК) является одним из основных компонентов межклеточного
45 матрикса тканей организма. Согласно современным представлениям молекулы ГК с различной длиной полисахаридной цепи оказывают разное влияние на многие биологические процессы и функциональную активность клеточных элементов [7, 8]. Известно, что низко- и среднемолекулярные формы ГК стимулируют ангиогенез, пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток. В то время как молекулы ГК с
50 высокой молекулярной массой, напротив, тормозят сосудообразование, ингибируют деление клеток и снижают их способность к миграции [7, 8]. При этом важная роль в метаболизме и поддержании баланса различных форм ГК in situ принадлежит гиалуронидазе - ферменту, под действием которого происходит гидролитическое

расщепление полимеров [7]. Вместе с тем установлено, что состояние межклеточного матрикса кроветворной ткани, значительная часть которого представлена именно ГК (около 40% от всех гликозаминогликанов [9]), способно влиять на гемопоэз [10]. Тем не менее, роль гиалуронидазы в регуляции кроветворения до сих пор во многом остается не известна, также как не известна и принципиальная возможность управления гемопоэзом путем введения в организм гиалуронидазы извне.

Факт применения гиалуронидазы с достижением нового технического результата: создание эффективного способа стимуляции миелопоэза за счет изменения свойств межклеточного матрикса путем введения гиалуронидазы, для специалиста является не очевидным.

Заявляемые существенные признаки проявили в совокупности новые свойства, не вытекающие явным образом из уровня техники в данной области. Новые признаки позволяют расширить спектр эффективного стимулирующего влияния на миелопоэз при минимальной лекарственной нагрузке на организм. Предлагаемое изобретение может быть использовано в экспериментальной биологии и медицине с выходом в практическое здравоохранение. Идентичной совокупности признаков при исследовании уровня техники по патентной и научно-медицинской литературе не обнаружено.

Исходя из вышеизложенного, следует считать заявляемое техническое решение соответствующим критериям: «новизна», «изобретательский уровень», «промышленная применимость».

Способ осуществляют следующим образом:

Лабораторному интактному животному (мыши), либо животному после моделирования у него цитостатической миелосупрессии путем однократного введения максимально переносимой дозы (МПД) циклофосфана, 1 раз в сутки в течение 2 дней внутрибрюшинно вводят гиалуронидазу в дозе 1000 УЕ/кг.

Заявляемая доза и режим введения гиалуронидазы подобраны опытным путем и являются оптимальными для получения заявленного технического результата. Повышение дозы и кратности введения отменяет получение заявленного технического результата. Снижение дозы и/или однократное введение препарата значительно снижают эффективность способа.

Предлагаемый способ был изучен в экспериментах на мышах линии СВА/СаЛас в количестве 456 штук, массой 18-20 г. Мыши 1 категории (конвенциональные линейные мыши) получены из питомника отдела экспериментального биомедицинского моделирования НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется).

На 3, 5 и 8-е сут после начала введения препарата гиалуронидазы интактным животным, и на 4, 6, 8, 10 и 14-е сут при введении препарата гиалуронидазы животным на фоне моделирования цитостатической миелосупрессии (однократное внутрибрюшинное введение циклофосфана в МПД (250 мг/кг) в 0,2 мл) стандартными гематологическими методами определяли количество эритроцитов, ретикулоцитов, содержание различных форм лейкоцитов в периферической крови и показатели костномозгового кроветворения [11]. Кроме того, изучали число эритроидных (КОЕ-Э) и грануломоноцитарных (КОЕ-ГМ) клеток-предшественников в костном мозге [12]. Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

Пример 1.

Гиалуронидазу («Лидаза», ФГУП «НПО Микроген» МЗ РФ), растворенную в 0,3 мл физиологического раствора, вводили интактным животным внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 2-х дней в дозе 1000 УЕ/кг. Контрольным мышам в эквивалентном объеме внутрибрюшинно вводили физиологический раствор.

Введение интактным животным гиалуронидазы приводило к существенному возрастанию количества ретикулоцитов во все сроки исследования с максимальными значениями до 253,6% от контроля на 8-е сут и числа эритроцитов на 8-е сут в периферической крови. При этом имело место достоверное увеличение числа палочко- (3,

5-е сут) и сегментоядерных нейтрофилов (3, 5, 8-е сут). Указанные изменения явились отражением динамики костномозгового кроветворения. Так, гиалуронидаза приводила к значительной гиперплазии эритроидного ростка кроветворения. Имело место увеличение содержания эритрокариоцитов в гемопоэтической ткани, достигающее максимальной величины на 5-е и 8-е сут опыта. Число незрелых нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге было достоверно выше на 3, 5-е сут, а их зрелых форм на протяжении всего эксперимента. Кроме того, введение фермента сопровождалось увеличением содержания лимфоидных элементов в кроветворной ткани на 5, 8-е сут эксперимента (табл.1). При этом количество других морфологически распознаваемых форм миелокариоцитов оставалось в пределах фоновых значений.

Культуральные исследования механизмов формирования описанных реакций системы крови показали зависимость их развития от состояния пула коммитированных клеток-предшественников. Расщепление ГК приводило к возрастанию числа КОЕ-Э (3, 5, 8-е сут) и КОЕ-ГМ (3, 5, 8-е сут) в костном мозге (с максимумом КОЕ-Э до 276,8% на 3-е и КОЕ-ГМ до 313, 3% на 5-е сут соответственно) (табл.1).

В целом, изменение свойств межклеточного матрикса с помощью используемой дозы гиалуронидазы приводило к существенной гиперплазии эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения (миелопозз).

Пример 2.

Моделирование цитостатической миелосупрессии осуществляли путем однократного внутрибрюшинного введения циклофосфана в максимально переносимой дозе (250 мг/кг) в 0,3 мл физиологического раствора. Опытным животным на фоне моделирования миелосупрессии вводили внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 2-х дней гиалуронидазу в дозе 1000 УЕ/кг («Лидаза», ФГУП «НПО Микроген» МЗ РФ), растворенную в 0,3 мл физиологического раствора.

Введение циклофосфана закономерно приводило к выраженной депрессии костномозгового кроветворения. Отмечалось падение содержания эритрокариоцитов (4, 6-е сут), незрелых (4, 6-е сут) и зрелых (4, 6, 8, 10-е сут) нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге. При этом указанная динамика сменялась в дальнейшем нормализацией показателя зрелых нейтрофильных гранулоцитов и увеличением количества эритрокариоцитов и незрелых нейтрофильных гранулоцитов на 10, 14-е сут относительно фоновых значений, свидетельствующих о высокой интенсивности регенераторных процессов в гемопоэтической ткани. Динамика содержания остальных морфологически распознаваемых клеточных элементов в костном мозге в целом носила аналогичный характер. Отражением состояния костномозгового кроветворения явилась картина периферической крови. Имело место резкое снижение содержания ретикулоцитов (4, 6, 8-е сут) и эритроцитов (8-е сут), сменяющееся возрастанием их числа на 10, 14-е сут и на 10-е сут соответственно. Схожая тенденция наблюдалась и со стороны динамики содержания нейтрофилов в периферической крови. В начальные сроки абсолютно не регистрировались их палочкоядерные формы. Данные элементы определялись лишь на 10, 14-е сут, причем их количество было все же ниже исходного уровня. При этом восстановление числа сегментоядерных нейтрофилов начиналось раньше, и их количество с 8-х сут превосходило аналогичные параметры у интактных животных. Изучение механизмов регенерации кроветворной ткани показало, что введение циклофосфана сопровождалось падением числа КОЕ-Э и КОЕ-ГМ до 6-х сут исследования. Однако в дальнейшем отмечалось значительное увеличение количества кроветворных прекурсоров с максимумом на 8-е сут до 265,5% и до 159,3% от фона для КОЕ-Э для КОЕ-ГМ соответственно (табл.2).

Двукратное введение гиалуронидазы сразу после моделирования цито-статической миелосупрессии значительно стимулировало процессы регенерации эритроидного и гранулоцитарного ростков кроветворения. Практически во все сроки опыта отмечалось существенное увеличение содержания кроветворных прекурсоров в гемопоэтической ткани относительно цитостатического контроля (КОЕ-Э с максимумом в 6,3 раза, а КОЕ-ГМ в 4,4

раза на 6-е сут). Состояние пула родоначальных клеток закономерно приводило к более быстрому и значительному возрастанию эритрокариоцитов (число данных элементов на 6-е сут было больше, чем в контроле в 2,01 раза), незрелых (было больше в 1,72 раза на 6-е сут) и зрелых (на 6-е и 8-е сут превосходило более чем в 2 раза) нейтрофильных гранулоцитов в костном мозге. Аналогичные изменения имели место со стороны периферической крови. Количество исследуемых зрелых элементов крови значительно превосходило число соответствующих показателей в контрольной группе практически во все сроки наблюдения (табл.2).

Таким образом, гиалуронидаза оказывала выраженный стимулирующий эффект в отношении как эритроидного, так и гранулоцитарного роста кроветворения, подавленного цитостатиком (т.е. отмечалась стимуляция миелопоэза). Данный препарат увеличивал количество кроветворных клеток-предшественников в гемопозэтической ткани и приводил к более быстрому восстановлению показателей костного мозга и периферической крови. Причем полученные результаты, согласно «Методическим указаниям по изучению гемостимулирующей активности фармакологических веществ» [13], позволяют охарактеризовать используемый препарат как эффективный. При этом механизмом гемопозэстимулирующего действия гиалуронидазы, очевидно, является изменение свойств межклеточного матрикса гемопозэтической ткани.

Предлагаемый способ позволяет эффективно стимулировать миелопоэз как в условиях оптимальной жизнедеятельности, так и при миелосупрессирующих воздействиях.

Цитируемая литература:

1. Glaspy J.A. Hematopoietic management in oncology practice. Part 1. // Myeloid growth factors Oncology (Huntingt). - 2003. - Vol.17. - №11. - P.1593-1603.

2. Волкова М.А. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор граноцит и его клиническое применение // Тер. архив. - 1998. - №4. - С.80-84.

3. Система цитокинов: Теоретические и клинические аспекты / Под ред. В.А.Козлова, С.В.Сенникова. - Новосибирск: Наука, 2004. - С.7.

4. Зборовский А.Б., Тюренок И.Н. Осложнения фармакотерапии. - М.: Медицина, 2003. - 543 с.

5. Vial T., Descotes J. Clinical toxicity of cytokines used as haemopoietic growth factors // Drug Saf. - 1995. - Vol.13. - №6. - P.371-406.

6. Ancliff P.J., Gale R.E., Liesner R. e.a. Long-term follow-up of granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in patients with severe congenital neutropenia: implications for leukaemogenesis and therapy // Br. J. Haematol. - 2003. - Vol.120. - №4. - P.685-690.

7. Stern R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? // Glycobiology. - 2003. - Vol.13. - №12. - P.105-115.

8. Noble P.W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair // Matrix Biol. - 2002. - №21. - P.25-29.

9. Avigdor A., Goichberg P., Shvitiel S. e.a. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34⁺ stem/progenitor cells to bone marrow // Blood. - 2004. - Vol.103. - №8. - P.2981-2989.

10. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. - С.15-17, 47-48.

11. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова, М. - 1987. - 152 с.

12. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. - Томск: Изд-во ТГУ, 1992. - С.130-145.

13. Дыгай А.М., Жданов В.В., Гольдберг В.Е. и др. Методические указания по изучению гемостимулирующей активности фармакологических веществ // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств. - 2002. - №1(9). - С.29-32.

Показатели эритроидного и грануломоноцитарного роста кроветворения при введении интактным мышам линии СВА гиалуронидазу в дозе 1000 УЕ/кг, (X±m) Таблица 1

Сроки/сутки	Ретикулоциты, %	Эритроциты, Т/л	Палочко-ядерные нейтрофилы, Г/л	Сегменто-ядерные нейтрофилы, Г/л	Незрелые нейтрофильные гранулоциты, ×10 ⁶ /бедро	Зрелые нейтрофильные гранулоциты, ×10 ⁶ /бедро	Эритрокарициты, ×10 ⁶ /бедро	КОЕ-Э, на 10 ⁶ миелокарицитов	КОЕ-ГМ, на 10 ⁶ миелокарицитов
контроль	9,12±1,2	11,21±0,4	0,3±0,02	2,44±0,23	1,12±0,4	3,64±0,21	1,71±0,29	5,31±0,12	5,11±0,21
3-е	13,0±0,57*	10,9±1,2	0,46±0,01*	4,6±0,69*	2,56±0,03*	5,02±0,38*	2,01±0,37	14,7±0,42*	12,68±0,8*
5-е	15,4±1,1*	12,6±0,8	1,03±0,09*	5,01±0,9*	2,98±0,2*	5,4±0,67*	4,8±0,79*	12,4±2,0*	16,01±1,4*
8-е	23,12±2,1*	13,4±0,2*	0,04±0,02	8,5±0,79*	1,6±0,34	6,37±1,2*	5,0±1,1*	8,09±0,56*	9,1±1,7*

* - отмечена достоверность различия показателя от его контрольного значения при p≤0,05.

5

Таблица 2

Показатели эритроидного и грануломоноцитарного роста кроветворения при моделировании цитостатической миелосупрессии (1) и при введении гиалуронидазы в дозе 1000 УЕ/кг на фоне моделирования миелосупрессии (2), (X±m)

Срок и/сутки	Ретикулоциты, %	Эритроциты, Т/л	Палочко-ядерные нейтрофилы, Г/л	Сегменто-ядерные нейтрофилы, Г/л	Незрелые нейтрофильные гранулоциты, ×10 ⁶ /бедро	Зрелые нейтрофильные гранулоциты, ×10 ⁶ /бедро	Эритрокарициты, ×10 ⁶ /бедро	КОЕ-Э, на 10 ⁶ миелокарицитов	КОЕ-ГМ, на 10 ⁶ миелокарицитов
конт роль	9,12±1,2	11,21±0,4	0,3±0,02	2,44±0,23	1,12±0,2	3,64±0,21	1,71±0,12	5,31±0,12	5,11±0,21
4-е	1,2±0,04*	10,1±0,42	0±0	0±0	0,2±0,01*	0,4±0,02*	0,4±0,02*	1,24±0,26*	4,5±0,45
	1,86±0,03*#	10,42±0,51	0±0	0,98±0,04*#	0,36±0,02*#	0,7±0,03*	0,24±0,07*	2,99±0,12*#	9,6±1,2*#
6-е	3,0±0,64*	12,03±1,2	0±0	3,71±0,56	0,6±0,02*	0,68±0,14*	0,68±0,14*	2,34±0,75*	2,68±0,3*
	6,54±1,01*#	11,7±0,99	0,11±0,02*#	4,86±0,67*	1,03±0,05#	1,32±0,17*#	1,37±0,09#	14,89±1,4*#	11,74±1,36*#
8-е	4,5±0,23*	7,06±0,87*	0±0	5,04±0,55*	1,74±0,3	1,2±0,6*	1,2±0,6	14,1±2,3*	8,14±0,78*
	7,19±1,2*#	12,78±0,65*#	0,18±0,04*#	6,56±0,2*#	2,56±0,31*#	2,76±0,84#	2,3±0,04*#	18,64±3,1*	10,12±2,4*
10-е	12,64±0,38*	12,4±0,21*	0,01±0,01*	6,32±0,48*	2,4±0,02*	2,42±0,04*	3,42±0,04*	7,8±1,34	6,3±1,4
	24,3±1,4*#	13,5±0,34*#	0,07±0,04*	8,66±0,35*#	2,7±0,31*	3,56±0,14#	4,78±0,98*#	13,01±1,7*#	4,36±1,08
14-е	29,7±3,4*	11,24±0,79	0,04±0,01*	4,78±0,36*	2,78±0,2*	5,41±0,99	2,41±0,99	4,03±1,56	3,78±0,89*
	32,4±2,4*	13,78±0,37*	0,32±0,08#	6,34±0,41*#	3,54±0,03*#	7,66±0,97*#	4,37±0,64*#	5,7±2,3	3,98±1,7

* - отмечена достоверность различия показателя от его контрольного значения при p≤0,05.
- отмечена достоверность различия показателя от его значения у животных после введения циклофосфана при p≤0,05.

10

15

20

25

Формула изобретения

Способ стимуляции миелопоэза путем введения лекарственного препарата, отличающийся тем, что в качестве препарата используют гиалуронидазу в эффективной для этого дозе.

30

35

40

45

50