



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013115643/10, 08.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.04.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 08.04.2013

(45) Опубликовано: 27.08.2014 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2034457 C1, 10.05.1995. RU 2031121
C1, 20.03.1995. RU 2011100104 A, 20.07.2012.
RU 2337708 C1, 10.11.2008. WO03064619 A2,
07.08.2003

Адрес для переписки:

117041, Москва, ул. Адмирала Лазарева, 35, корп.
1, а/я 19, Чикину И.А.

(72) Автор(ы):

ЮДИН Сергей Михайлович (RU),
ЮДИНА Тамара Ивановна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Юдин Сергей Михайлович (RU)

(54) ИНЪЕКЦИОННЫЙ ПРЕПАРАТ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СПЕРМОПРОДУКЦИИ ЧЕЛОВЕКА И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии и представляет собой инъекционный препарат в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апирогенной воды для инъекций. Изобретение относится также к способу повышения спермопродукции человека,

который предусматривает двукратную подкожную инъекцию с интервалом в 14-18 суток указанного препарата из расчета 50-100 мкг белка на 1 кг живой массы тела. Изобретение позволяет повысить репродуктивную способность мужчин за счет увеличения объема эякулята, количества сперматозоидов, доли живых, активно подвижных сперматозоидов при использовании препарата для инъекций с низкой реактогенностью адьюванта, позволяющего осуществлять инъекции без болезненных ощущений. 2 н. и 4 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2 526 571 C1

RU 2 526 571 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2013115643/10, 08.04.2013**(24) Effective date for property rights:
08.04.2013

Priority:

(22) Date of filing: **08.04.2013**(45) Date of publication: **27.08.2014** Bull. № 24

Mail address:

**117041, Moskva, ul. Admirala Lazareva, 35, korp.
1, a/ja 19, Chikinu I.A.**

(72) Inventor(s):

**JuDIN Sergej Mikhajlovich (RU),
JuDINA Tamara Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

Judin Sergej Mikhajlovich (RU)(54) **INJECTION DRUG FOR INCREASING HUMAN SPERM PRODUCTION AND METHOD FOR USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention discloses an injection drug in form of a water-oil suspension of a chimeric protein with water-insoluble enzymatically inactive chloramphenicol acetyltransferase without 10 C-terminal amino acids, amino acid spacer (Sp)_n, where n=1, 2, 4, 8, and a somatostatin-14 amino acid sequence AGCFWKTFTSC in refined vegetable oil with addition of apyrogenic water for injection. The invention also relates to a method of increasing human sperm

production, which comprises hypodermic injection of said drug twice with an interval of 14-18 days in amount of 50-100 mcg protein per kg body weight.

EFFECT: invention improves reproductive capacity of men by increasing ejaculate volume, sperm count, the percentage of live, active sperm when the injection drug is used with low reactogenicity of the adjuvant, which allows painless injection.

6 cl, 1 tbl

Область применения

Изобретение относится к андрологии, а конкретно к инъекционному препарату для повышения спермопродукции человека и способу его применения. Изобретение предназначено для повышения репродуктивной способности человека, позволяя
5 увеличить объем эякулята и повысить некоторые качественные характеристики спермы человека.

Известный уровень

Современная медицинская наука несколькими путями решает проблему повышения объема эякулята, увеличения количества сперматозоидов в эякуляте и улучшения их
10 качественных характеристик - это применение гормональных, адаптогенных, растительных препаратов. В качестве гормональных средств терапии, направленных на увеличение количества сперматозоидов в эякуляте, используют препараты из группы антиэстрогена - кломифен цитрат и препараты на основе хорионического гонадотропина (Р.В. Роживанов, Н.С. Парфенова, Д.Г. Курбатов. Лечение олигоспермии у мужчин с
15 бесплодием. Проблемы эндокринологии, 2010, №1, стр.31-34).

По литературным данным, медикаментозная терапия олигоспермии не всегда оказывается успешной. В этом случае рекомендуют альтернативные методы лечения - назначают препараты-антиоксиданты, вещества, содержащие повышенные количества
20 витамина С, селена, фолиевой кислоты, L-карнитина. По данным клинических исследований эти вещества нейтрализуют свободные радикалы и усиливают активность метаболических процессов в сперматозоидах, благотворно влияют на фертильность мужчины. ("Андрология и генитальная хирургия" - научно-практический медицинский рецензируемый междисциплинарный журнал, Гамидов С.И., Тажетдинов О.Х. Результаты открытого сравнительного исследования препаратов "Спеман" и
25 "Спермактин" в качестве средств лечения идиопатической патозооспермии. №2, 2011, стр.61-66.)

Иной метод увеличения объема эякулята и повышения качественных характеристик спермы человека основан на повышении в организме концентрации эндогенного соматотропина за счет индукции синтеза аутосоматостатиновых антител. Это приводит
30 к снижению концентрации эндогенного соматостатина и повышению содержания соматотропина, что, в свою очередь, оказывает стимулирующее влияние на рост и пролиферацию клеток половых желез человека.

Соматостатин - биологически активный тетрадекапептид, вырабатывающийся в гипоталамусе и желудочно-кишечном тракте млекопитающих. Впервые биологическая
35 активность вещества, впоследствии определенная как соматостатиновая, была обнаружена в 1968 году Крюликом. В последующем из гипоталамуса животных было выделено вещество, представляющее собой низкомолекулярный пептид, обладающий способностью регулировать концентрацию гормона роста в организме животных.

Соматостатин-14 оказывает сильное ингибирующее действие на ряд гормонов (соматотропин, тиреотропный гормон, инсулин, глюкагон, гастрин, пепсин), инициирует
40 угнетение секреции желудочных ферментов, поджелудочной железы, тонкого отдела кишечника, замедление моторики желудочно-кишечного тракта и эвакуации его содержимого.

Изучение аминокислотного состава соматостатина у различных представителей
45 животного царства показало достаточную степень гомологии пептидов, синтезируемых живыми организмами, находящимися на различных ступенях эволюционного развития. Аминокислотная последовательность соматостатина-14 идентична у живых организмов - от рыб до млекопитающих и человека.

Широкий спектр физиологического действия соматостатина-14 и отсутствие, в отличие от гормона роста, видовой специфичности для млекопитающих явились основанием для изучения возможности его использования с целью оптимизации выращивания и откорма, повышения молочной продуктивности животных, а также 5 повышения спермопродукции производителей сельскохозяйственных животных и петухов.

Метод соматостатиновой иммунокоррекции лишен многих недостатков, возникающих при использовании анаболических гормонов или рекомбинантного соматотропина. Механизм действия основан на временном связывании эндогенного соматостатина-14 10 специфическими антисоматостатиновыми антителами и возрастании концентрации эндогенного соматотропного гормона в физиологических пределах. Однако широкое применение метода активной иммунизации животных против эндогенного соматостатина-14 длительное время было невозможно вследствие его высокой стоимости, поскольку основным путем получения пептида являлся химический синтез, 15 что экономически не позволяло реализовать данный подход на практике. Поскольку небольшие размеры соматостатина-14 не позволяют его прямой микробный синтез с помощью технологии рекомбинантной ДНК, описано несколько способов его синтеза в форме химерных белков с последующим выделением целевого продукта, не давших удовлетворительных результатов. Основным недостатком упомянутых методов является 20 крайне низкая иммуногенность полученных препаратов в отношении соматостатина, обусловленная его маскированием в молекуле химерного белка, вследствие чего данные методы получения химерных белков не нашли широкого практического использования (Itakura R. et al., 1977. Expression in E. Coli of a chemically synthesized gene of hormone somatostatin. Science, 1986, 1056-1063; Шишкина А.А. и др. Синтез фрагмента генов 25 соматостатина. Химия природных соединений, 1988, №6, с.614-615).

Известен способ конструирования химерных соматостатинсодержащих белков с применением аминокислотного спейсера, содержащего аргинин и пролин, обуславливающего локализацию соматостатина на поверхности белка-носителя и тем самым самую высокую иммуногенность препарата (RU 2031121 C1, МПК C12N 15/12, 1995). 30 Конструкция состоит из водонерастворимого белка - носителя (фрагмента бактериальной хлорамфениколацетилтрансферазы без 10 С-концевых аминокислот), тетрамерного спейсера и С-концевого соматостатина-14. Молекулярный вес химерного белка составляет 28 кДа. Данный химерный белок экспрессируется штаммом кишечной палочки В-6519, трансформированным плазмидой рC(Sp)4 S. Штамм депонирован во 35 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером В-6519. Химерный белок с экспонированным соматостатином представляет собой водонерастворимую ферментативно неактивную хлорамфениколацетилтрансферазу без 10 С-концевых аминокислотных остатков, к которой через спейсерную последовательность присоединена аминокислотная последовательность соматостатина- 40 14. Метод антисоматостатиновой иммунизации животных с использованием указанного химерного соматостатинсодержащего белка используется в промышленном животноводстве (RU 2034457 C1, МПК A01K 67/02, 1995).

Сущность изобретения

Задача изобретения заключается в повышении репродуктивной способности мужчин 45 за счет увеличения объема эякулята, количества сперматозоидов, доли живых, активно - подвижных сперматозоидов при использовании препарата для инъекций с низкой реактогенностью адьюванта, позволяющего осуществлять инъекции без болезненных ощущений.

Решение этой задачи обеспечивает инъекционный препарат для повышения спермопродукции человека в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апирогенной воды для инъекций.

Механизм действия препарата основан на временном блокировании активности эндогенного соматостатина человека, повышении концентрации соматотропного гормона и усилении активности сперматогенеза.

В наилучшем варианте осуществления инъекционный препарат для повышения спермопродукции человека содержит химерный белок с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC из расчета 200-400 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апирогенной воды для инъекций.

Препарат для повышения спермопродукции человека может содержать рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

Способ повышения спермопродукции человека включает двукратную подкожную инъекцию с интервалом в 14-18 суток инъекционного препарата в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апирогенной воды для инъекций из расчета 50-100 мкг белка на 1 кг живой массы тела.

В наилучшем варианте осуществления изобретения используют инъекционный препарат в виде суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp)_n, где n=1, 2, 4, 8, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в количестве из расчета 200-400 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апирогенной воды для инъекций. В частном случае используемый препарат может содержать рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

Осуществление изобретения и эффективность препарата

Возможность осуществления изобретения поясняется примером получения инъекционного препарата для повышения сперматогенеза человека.

Полученный и очищенный от примесей препарат белка растворяют в буфере 0,2 М трис-HCL pH 8,0, содержащем 6 М гуанидинхлорид и 2 М МЭДТА (M-EDTA). Добавляют 50-кратный молярный избыток β-меркаптоэтанола в расчете на количество S-S групп химерного белка и раствор быстро разбавляют 10-кратным объемом буфера без гуанидинхлорида. Образовавшийся преципитат гибридного белка отделяют центрифугированием в течение 15 минут при 12000 g и температуре 4°C и лиофильно высушивают для последующего хранения или приготовления водно-масляной суспензии.

Для приготовления готовой формы инъекционного препарата используют рафинированное растительное масло и апирогенную воду для инъекций. В растительное масло добавляют воду из расчета 5-10%. Затем добавляют навеску сухого белка из

расчета 200 мг на 100 мл водно-масляной суспензии. Суспензию гомогенизируют в течение 1-2 минут и передают на разливное оборудование. Готовую суспензию препарата расфасовывают в тару (например, шприцы одноразовые). Готовую лекарственную форму препарата стерилизуют ионизирующим облучением при суммарной дозе облучения порядка 6 кГр.

При иной концентрации компонентов инъекционный препарат приготавливается аналогично. Предпочтительными являются следующие содержания компонентов на 95 мл рафинированного растительного масла: 200 мг химерного белка - 5,0 мас.% апиrogenной воды для инъекций; 400 мг химерного белка - 10 мас.% апиrogenной воды для инъекций.

Использование в качестве адьюванта для такого рода препарата растительного масла, полностью метаболизирующегося в организме, позволяет в значительной степени снизить уровень реактогенности адьюванта и создает необходимые условия для постепенного поступления действующего вещества в организм человека («депо» препарата). Могут использоваться хлопковое и арахисовое масла. Наличие апиrogenной воды в конечной прописи препарата обосновано необходимостью получения водно-масляной эмульсии препарата.

Эффективность применения инъекционного препарата для повышения сперматогенеза человека иллюстрируется следующим примером.

В опытную группу были включены мужчины в возрасте 30-53 года с признаками олигоспермии (концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята варьировала от 11 до 15 млн клеток), объемом эякулята, равным 1,5-2,1 мл, количеством активно подвижных (а) сперматозоидов, равным 18-23%. Количество живых сперматозоидов находилось на нижней границе норм ВОЗ и составляло 48-53%. Пациенты не страдали сахарным диабетом, гипотиреозом, тиреотоксикозом, гиперкортицизмом, онкологическими заболеваниями, острыми или хроническими заболеваниями печени, урологическими и/или инфекционно-воспалительными заболеваниями в стадии обострения, варикоцеле.

Обобщенные результаты лабораторных анализов представлены в таблице 1.

Оцениваемые показатели спермограммы	Значения показателей спермограммы до введения препарата, (min-max)	Значения показателей спермограммы по истечении указанного числа суток после первой инъекции препарата, (min-max)		
		30 суток	60 суток	90 суток
Объем эякулята, мл	1,5-2,1	2,6-2,9	3,0-3,5	2,8-3,7
Консистенция	вязкая	вязкая	вязкая	вязкая
pH	7,2-8,0	7,2-8,0	7,2-8,0	7,2-8,0
Количество сперматозоидов в 1 мл эякулята, млн/мл	11-15	14-21	18-28	21-34
Доля активно подвижных сперматозоидов (а), %	18-23	21-28	23-32	22-41
Доля живых сперматозоидов, %	48-53	52-61	54-68	54-72

Всем пациентам была введена подкожно в область лопатки водно-масляная суспензия соматостатинсодержащего препарата в дозе 50 мкг/кг массы тела дважды с интервалом между инъекциями 14-18 суток.

По истечении 30, 60, 90 суток после первой инъекции препарата пациентами были сданы образцы спермы и проанализированы лабораторные показатели.

Приведенные примеры осуществления изобретения не являются исчерпывающими. Возможны иные варианты осуществления изобретения, соответствующие объему

патентных притязаний.

Формула изобретения

5 1. Инъекционный препарат для повышения спермопродукции человека в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp) n , где $n=1, 2, 4, 8$, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апирогенной воды для инъекций.

10 2. Препарат по п.1, отличающийся тем, что он содержит химерный белок с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp) n , где $n=1, 2, 4, 8$, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC из расчета 200-400 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апирогенной воды для инъекций.

15 3. Препарат по п.1 или 2, отличающийся тем, что он содержит рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

20 4. Способ повышения спермопродукции человека, включающий двукратную подкожную инъекцию с интервалом в 14-18 суток инъекционного препарата в виде водно-масляной суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp) n , где $n=1, 2, 4, 8$, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в рафинированном растительном масле с добавлением апирогенной воды для инъекций из расчета 50-100 мкг белка на 25 1 кг живой массы тела.

30 5. Способ по п.4, отличающийся тем, что используют инъекционный препарат в виде суспензии химерного белка с водонерастворимой ферментативно неактивной хлорамфениколацетилтрансферазой без 10 С-терминальных аминокислот, аминокислотным спейсером (Sp) n , где $n=1, 2, 4, 8$, и соматостатином-14 с последовательностью аминокислот AGCFWKTFTSC в количестве из расчета 200-400 мг указанного химерного белка на 100 мл рафинированного растительного масла, включающего 5,0-10,0 мас.% апирогенной воды для инъекций.

35 6. Способ по п.4 или 5, отличающийся тем, что используют инъекционный препарат, содержащий рафинированное хлопковое масло или рафинированное арахисовое масло.

40

45