



(51) МПК  
*A61K 31/00* (2006.01)  
*A61K 31/095* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(21)(22) Заявка: 2010136613/15, 31.08.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 31.08.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.08.2010

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2012 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 20.12.2013 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2235541 C2, 27.02.1999. WO 2008148016 A1, 04.12.2008. AMIE J. DIRKS NAYLOR, Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle, *Life Sciences* 84 (2009) 637-640. ГОЛУБЕВ А.Г. Биохимия продления жизни. - Успехи геронтологии, 2003, №12. GALVIELLO G et al., Repeated exposure to pyrrolidine-dithiocarbamate induces peripheral nerve alterations in rats, *Toxicol Lett.* 2005 Jul 28; 258(1):61-71.

Адрес для переписки:

167982, г.Сыктывкар, ул.  
 Коммунистическая, 28, Институт биологии  
 Коми научного центра УрО РАН,  
 инновационная группа

(72) Автор(ы):

Москалев Алексей Александрович (RU),  
 Шапошников Михаил Вячеславович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (RU)

**(54) СРЕДСТВО ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к биологии, преимущественно к медицинской генетике, и описывает средство для увеличения продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, содержащее аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTС). Средство вводят перорально в концентрации 20 мг/л на

протяжении всей жизни. Средство не является пол-специфическим и позволяет значительно увеличить продолжительность жизни как у самцов, так и у самок *Drosophila melanogaster*: среднюю (улучшает качество жизни) и максимальную (замедляет скорость старения). 2 н.п. ф-лы, 1 табл., 2 ил.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/00* (2006.01)  
*A61K 31/095* (2006.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2010136613/15, 31.08.2010**

(24) Effective date for property rights:  
**31.08.2010**

Priority:

(22) Date of filing: **31.08.2010**

(43) Application published: **10.03.2012 Bull. 7**

(45) Date of publication: **20.12.2013 Bull. 35**

Mail address:

**167982, g.Syktyvkar, ul. Kommunisticheskaja, 28,  
Institut biologii Komi nauchnogo tsentra UrO  
RAN, innovatsionnaja gruppa**

(72) Inventor(s):

**Moskalev Aleksej Aleksandrovich (RU),  
Shaposhnikov Mikhail Vjacheslavovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Institut biologii Komi  
nauchnogo tsentra Ural'skogo otdelenija  
Rossijskoj akademii nauk (RU)**

**(54) AGENT FOR INCREASING LIFE SPAN AND METHOD FOR USING IT**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biology, preferentially to medical genetics, and describes the agent for increasing life span of *Drosophila melanogaster* containing ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). The agent is orally administered in the concentration of 20 mg/l in the

course of a lifetime. The agent is not gender-specific and enables increasing the life span of both male, and female *Drosophila melanogaster* considerably: average (improves quality of life) and maximum (delays the ageing rate).

EFFECT: increasing the life span.

2 cl, 1 tbl, 2 dwg

Изобретение относится к биологии, преимущественно к медицинской генетике и может быть использовано для замедления процесса старения.

Увеличение продолжительности жизни человека является одной из важнейших задач геронтологии и, в целом, современной профилактической медицины. В последнее время большое внимание уделяется поиску и изучению препаратов, обладающих свойствами, замедляющими старение.

В ряде исследований, проведенных на модельных организмах, таких как мышь, дрозофила, нематода и дрожжи удалось показать благотворное влияние на процессы старения различных синтетических и природных антиоксидантов или индукторов антиоксидантных ферментов.

Например, витамин Е снижает количество окислительно-поврежденных белков, липидов и ДНК в клетках мышечной ткани, однако он не изменяет максимальную продолжительность жизни животных (Porta E.A., Joun N.S., Nitta R.T. Effect of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Life span, serum biochemical parameters and pathological changes // Mech. Ageing Dev. 1980. V.13. P.1-39.).

Антиоксиданты цистеин, 2-меркаптоэтиламин, дигидрохлорид 2,2-диаминодиэтилсульфида, аскорбиновая кислота, 2-меркаптоэтанол увеличивают продолжительность жизни мышечной ткани различных линий, однако их действие не всегда воспроизводится (Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Экспериментальные пути продления жизни. Л.: Наука, 1988. 248 с.; Обухова Л.К., Эммануэль Н.М. Молекулярные механизмы замедления старения антиоксидантами // Общие проблемы биологии / ВИНТИ. Т.4, с.44-80.).

Резвератрол, полифенол в составе красного вина, являющийся стимулятором деацетилаз-сиртуинов, умеренно увеличивает продолжительность жизни у дрожжей, нематод, дрозофил, рыб и млекопитающих (Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kaira A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., Ingram D.K., de Cabo R., Sinclair D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet // Nature. 2006. V.444. N 7117. P.337-342. Viswanathan M., Kim S.K., Berdichevsky A., Guarente L.A. Role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining C. elegans life span // Developmental Cell, 2005. V.9. P.605-615.).

Известно применение гидрированных пиридо(4,3-b) индолов в качестве средства для профилактики преждевременного старения млекопитающих, обладающих выраженными геропротекторными свойствами, содержащее индолы (патент RU 2283108, 09.10.2006).

Известное средство увеличивает продолжительность жизни животных путем снижения вероятности проявления несмертельных старческих патологий.

Известный способ способствует профилактике преждевременного старения путем введения пациенту фармакологического средства, содержащего эффективное количество гидрированного пиридо[4,3-b] индолов в дозе 0.1-10 мг/кг массы тела, по крайней мере, один раз в день в течение периода, необходимого для достижения профилактического эффекта.

Известно применение иммунодепрессанта «рапамицин», выбранного за прототип, в качестве средства увеличивающего продолжительность жизни, взятое в эффективном количестве (Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice // Nature. 2009. Vol.460, №7253. P.392-395.).

Известный способ применения средства «рапамицин» для увеличения продолжительности жизни, выбранный за прототип, включает влияние на биохимические показатели жизнедеятельности клеток посредством перорального введения рапамицина, взятого в эффективном количестве, на протяжении всей жизни.

5 Эксперименты, проведенные тремя независимыми лабораториями, показали, что самцы мышей, начавшие принимать рапамицин в пожилом возрасте (600 дней), живут на 9%, а самки - на 13% дольше, чем контрольные мыши, не принимавшие лекарства. (Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice // Nature. 2009. Vol.460, №7253. P.392-395.).

10 Исследованиями ученых показано, что механизм действия рапамицина у мышей такой же, как у беспозвоночных. При этом измеряли уровень фосфорилирования рибосомного белка S6. У беспозвоночных рапамицин подавляет активность TOR, что ведет (через ряд промежуточных этапов) к пониженному уровню фосфорилирования

15 белка S6. Рапамицин замедляет работу рибосом, то есть синтез белков. Аналогично, у мышей, получающих рапамицин, уровень фосфорилирования S6 понижен 4-5 раз. Это говорит о том, что механизм действия рапамицина у мышей, такой же, как у беспозвоночных. Лекарство замедляет жизнедеятельность клеток.

20 Известна форма твердой дисперсии для перорального введения, содержащая рапамицин и среду-носитель (WO 97/03654 (06.02.1997)).

Задачей настоящего изобретения является расширение арсенала средств для увеличения продолжительности жизни и разработка способа его применения для замедления процесса старения. А также расширение арсенала средств, обладающих геропротекторными свойствами.

25 Технический результат состоит в том, что новое средство не является пол-специфическим и позволяет значительно увеличить продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*, как у самцов, так и у самок: среднюю (улучшает качество жизни) и максимальную (замедляет скорость старения). Способ применения

30 средства позволяет:

- у самцов увеличить среднюю продолжительность жизни на 47%, медианную - на 53% и максимальную - на 25%;

35 - у самок увеличить среднюю продолжительность жизни на 11%, медианную - на 8% и максимальную на 11%.

Технический результат достигается тем, что средство для увеличения продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, содержащее действующее вещество, взятое в концентрации 20 мг/л, согласно изобретения, в качестве действующего

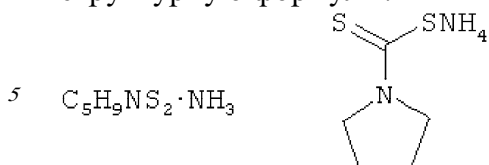
40 вещества используют аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTC) - низкомолекулярное тиоловое соединение.

Технический результат достигается тем, что способ применения средства для увеличения продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, включающий влияние на биохимические показатели жизнедеятельности клеток посредством перорального

45 введения действующего вещества, взятого в концентрации 20 мг/л, на протяжении всей жизни, отличающийся тем, что в качестве действующего вещества используют аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTC) - низкомолекулярное тиоловое соединение.

50 Высокая биологическая активность тиоловых соединений обусловлена наличием сульфгидрильных (-SH) функциональных групп, отличающихся высокой реакционной способностью, позволяющей проводить различные химические реакции (Торчинский Ю.М. Сульфгидрильные и дисульфидные группы белков. М.: Наука. 1971. 228 с.).

Аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTC) имеет следующую молекулярную и структурную формулы:



PDTC представляет собой желтый кристаллический порошок, не имеющий запаха, хорошо растворимый в воде.

PDTC предотвращает индукцию синтазы оксида азота (NOS) ингибируя трансляцию мРНК NOS, индуцирует апоптоз в клетках гладкой мускулатуры крысы и ингибирует апоптоз в клетках лимфолейкоза человека HL-60 (Sherman, M.P., et al., Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol.191, P.1301-1308).

Обоснование нового свойства PDTC и его применение для увеличения продолжительности жизни осуществляли следующим образом.

*Drosophila melanogaster* является эффективным модельным организмом для исследования генетики продолжительности жизни и старения. Около 75% генов наследственных болезней человека имеют гомологов у дрозофилы и более трети этих генов человека очень близки к соответствующим генам плодовой мушки. Не только отдельные белки, но и целые многокаскадные сигнальные пути, такие как ответ на повреждение ДНК являются эволюционно консервативными между мушкой и человеком (Chien S., Reiter L.T., Bier E., et al. Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila* // Nucleic Acids Res. 2002. Vol.30, №1. P.149-151.).

Проверку геропротекторных свойств и влияние препарата PDTC на увеличение продолжительности жизни осуществляли пероральным введением действующего вещества, взятого в эффективном количестве, путем скармливая его имаго плодовой мушки *Drosophila melanogaster* в составе дрожжевой пасты в концентрации 20 мг/л на протяжении всей жизни. Контрольным животным скармливали дрожжевую пасту без PDTC. Для получения пасты дрожжи гидролизировали, подвергая предварительному кипячению на водяной бане в течение 30 мин. При приготовлении 100 мл пасты исходили из расчета 50 г сухих дрожжей на 60 мл воды. Опыты проводили на самцах и самках имаго *Drosophila melanogaster*, содержащихся в термостатируемом помещении при температуре  $25 \pm 10^\circ C$  и искусственном режиме освещения 12 ч день: 12 ч ночь.

При статистической обработке результатов применяли непараметрические методы. Функции дожития оценивали с помощью процедуры Каплана-Мейера и представляли в виде кривых дожития. При сравнении функций дожития использовали модифицированный критерий Колмогорова-Смирнова. Критерии Гехана-Бреслоу-Вилкоксона и Ментеля-Кокса применяли для оценки достоверности различий по медианной продолжительности жизни. Дополнительно оценивали максимальную продолжительность жизни, возраст гибели 90% особей, параметры  $\alpha$  и  $R_0$  уравнения Гомпертца  $\mu(x) = R_0 e^{\alpha x}$  и время удвоения интенсивности смертности ( $MRDT = \ln 2 / \alpha$ ).

Зависимость интенсивности смертности дрозофилы (функции дожития) от возраста (сут.) представлены на фиг.1 и 2. Варианты без обработки PDTC обозначены сплошной линией ( — ), после обработки PDTC - пунктиром ( - - - - - ), \* -  $p < 0.001$  (критерий Колмогорова-Смирнова).

У самцов (фиг.1, табл.) добавление в корм имаго PDTC привело к увеличению

средней (на 47%), медианной (на 53%) и максимальной (на 25%) продолжительности жизни, а также возраста гибели 90% выборки (на 38%) и времени удвоения интенсивности смертности (на 10%) по сравнению самцами, не получавшими PDTC. После воздействия PDTC у самцов также выявлено снижение параметра  $\alpha$  уравнения Гомпертца и замедление времени удвоения интенсивности смертности (на 10%).

Таблица									
Параметры продолжительности жизни особей <i>Drosophila melanogaster</i> после фармакологического ингибирования транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B с помощью PDTC (20 мг/л)									
Вариант	$\bar{x} \pm \Delta m$	M	90%	Min	Max	MRDT	$\alpha$	$R_0$	n
самцы									
Контроль	36.2±0.7	38	47	3	57	5.9	0.117	0.00039	179
PDTC	53.4±1.1	58*	65*	5	71	6.5	0.107	0.00101	176
самки									
Контроль	62.3±0.7	66	72	19	74	4.6	0.152	6.06E-06	191
PDTC	69.2±0.7	71*	76*	9	82	3.8	0.184	2.86E-07	175

Принятые обозначения:  $\bar{x} \pm \Delta m$  - средняя продолжительность жизни и ошибка среднего (сут.); M - медианная продолжительность жизни; 90% - возраст гибели 90% выборки; Min и Max - минимальная и максимальная продолжительность жизни;  $\alpha$  и  $R_0$  - параметры уравнения Гомпертца; MRDT - время удвоения интенсивности смертности ( $\ln 2/\alpha$ ); n - количество особей в выборке. \* -  $p < 0.001$ , статистическую значимость определяли: для медианной продолжительности жизни - по критериям Гехана-Бреслоу-Вилкоксона и Мантеля-Кокса; для возраста гибели 90% выборки - по тесту Ванг-Аллисона; для параметров уравнения Гомпертца - по методу максимального правдоподобия. Различия статистически значимы по сравнению с Контролем.

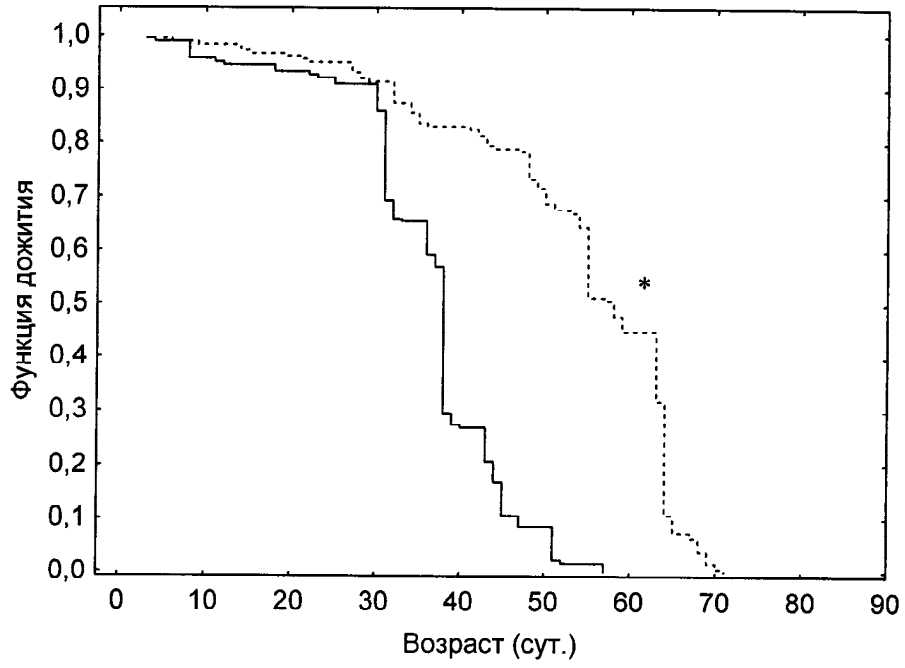
Аналогичные данные получены для самок (фиг.2, табл.), у которых после обработки PDTC произошло статистически значимое ( $p < 0.001$ ) увеличение средней (на 11%), медианной (на 8%) и максимальной (на 11%) продолжительности жизни, а также времени гибели 90% выборки (на 6%) по сравнению самками, не получавшими PDTC.

Таким образом, аммоний пирролидин дитиокарбамат значительно увеличивает продолжительность жизни *Drosophila melanogaster*: среднюю (улучшает качество жизни) и максимальную (замедляет скорость старения). Эффект проявляется в равной мере как у самцов, так и у самок (не являлся пол-специфическим).

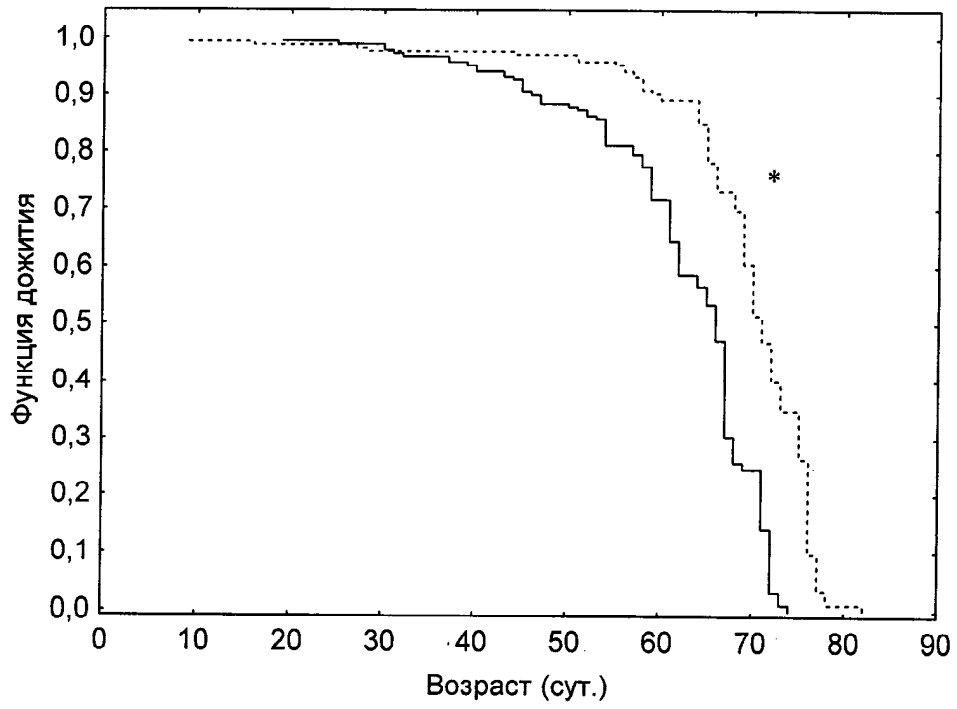
#### Формула изобретения

1. Средство для увеличения продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, содержащее действующее вещество, взятое в концентрации 20 мг/л, отличающееся тем, что в качестве действующего вещества используют аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTC) низкомолекулярное тиоловое соединение.

2. Способ применения средства для увеличения продолжительности жизни *Drosophila melanogaster*, включающий влияние на биохимические показатели жизнедеятельности клеток посредством перорального введения действующего вещества, взятого в концентрации 20 мг/л, на протяжении всей жизни, отличающийся тем, что в качестве действующего вещества используют аммоний пирролидин дитиокарбамат (PDTC) - низкомолекулярное тиоловое соединение.



Фиг. 1



Фиг. 2