



УКРАЇНА

(19) UA (11) 37445 (13) A

(51) 6 A61K35/16, A61K38/55, A61K38/57

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРОТИЗАПАЛЬНИЙ ЗАСІБ

(21) 98126668

(22) 17.12.1998

(24) 15.05.2001

(33) UA

(46) 15.05.2001, Бюл. № 4, 2001 р.

(72) Яковенко Світлана Борисівна, Тимченко Ана-
толій Сергійович, Борисевич Ольга Сергіївна(73) Яковенко Світлана Борисівна, Тимченко Ана-
толій Сергійович, Борисевич Ольга Сергіївна

(57) Протизапальний засіб, який включає регуля-
торні білки плазми крові людини, в тому числі аль-
бумін, бета-гама-глобуліни, **відрізняється** тим, що
додатково містить полівалентний інгібітор альфа-
2-макроглобулін при наступному співвідношенні
компонентів, мас. %: альбумін - 1-3; альфа-2-гло-
буліни - 35-45; бета-гама-глобуліни - 54-62.

Винахід відноситься до галузі медицини і фа-
рмації та може використовуватись в хірургічних та
терапевтичних клініках при лікуванні запальних
процесів.

Прогресуванню запальних процесів притаман-
не розбалансування системи протеолізу, тому ан-
тиферментні препарати широко використовуються
в клінічній практиці. Лікувальна дія інгібіторів по-
в'язана з нейтралізацією активованих протеїназ
нейтрофільних гранулоцитів та мікроорганізмів, які
інфільтрують вогнище запалення, із зменшенням
їх деструктивної дії на тканинні структури та галь-
муванням утворення кінінів, що обмежує запальну
реакцію.

Перспективними в плані створення протизапа-
льних препаратів є природні інгібітори плазми кро-
ві людини. Три інгібітори плазми - альфа-1-ан-
титрипсин, альфа-1-антихімотрипсин та альфа-2-
макроглобулін здійснюють в організмі, в основно-
му, захист від запальної та деструктивної дії лей-
коцитарних протеїназ. На основі альфа-1-антихі-
мотрипсину розроблено фармацевтичні компози-
ції, які застосовуються при лікуванні запалення
легень завдяки фізіологічній функції інгібітора спе-
цифічно зв'язувати еластазу та катепсин G, захи-
щаючи еластичну тканину легень від надмірного
гідролізу [1].

Найбільш близьким до рішення є концентрат
інгібітору плазми крові альфа-1-антитрипсину,
який містить не більше 20 % альбуміну, не менше
70 % альфа-1-глобулінів, не більше 20 % бета-
гама-глобулінів [2]. Препарат отримують комбіна-
цією методів фракціонування та іонообмінної хро-
матографії. До пулу плазми крові додають ети-
ловий спирт до концентрації його в суміші від 7 до
9 % та виділяють спочатку осад фракції I білків;
потім встановлюють рН суміші в межах від 6, 7 до

6, 9, додають спирт до концентрації від 19,5 до
22,5% та виділяють осад фракції II+III білків. В су-
пернатанті встановлюють рН в межах від 5,1 до
5,3 та при концентрації спирту 17% виділяють
фракцію Y-I білків. Її розчиняють в 0,05-0,15 М ро-
зчині хлориду натрію та 0,05-0,15 М трис-бу-фері,
добавляють розчин поліетиленгліколю концен-
трацією (115±5) г/л та осаджують баластні білки. По-
тім добавляють розчин поліетиленгліколю концен-
трацією (170±5) г/л та виділяють білкову фракцію,
збагачену альфа-1-антитрипсином. Проводять
хроматографічну очистку концентрату альфа-1-
антитрипсину на аніонообміннику. Елюат концент-
рують ультрафільтрацією.

Препарат альфа-1-антитрипсину ефективно
використовується при лікуванні хворих емфіземою
легень завдяки його здатності нейтралізувати ела-
стазу, яка викликає руйнування еластину альвео-
лярних структур [3].

Однак, вказаний препарат має ряд недоліків,
так як характеризується обмеженою специфічніс-
тю дії. Альфа-1-антитрипсин взаємодіє з серино-
вими протеїназами з трипсиноподібною активніс-
тю, а інші ферменти, що вивільняються із лейко-
цитів при запальних процесах, знаходяться поза
сферою його впливу. Вони накопичуються в ура-
жених тканинах та розщеплюють їх структурні
елементи, що призводить до поглиблення та хро-
нізації запального процесу.

Завданням винаходу є створення протизапа-
льного засобу на основі регуляторних білків плаз-
ми крові людини більш розширеного спектру дії,
що дозволить посилити терапевтичну ефектив-
ність засобу та розширити сферу його застосу-
вання.

Поставлене завдання вирішується шляхом
включення до складу протизапального засобу по-

(19) UA (11) 37445 (13) A

лівалентного інгібітору альфа-2-макроглобуліна та інших регуляторних білків плазми крові людини при наступному співвідношенні компонентів, мас. %: альбумін - 1-3; альфа-2-глобуліни - 35-45; бета-гама-глобуліни - 54-62.

Засіб отримують наступним чином :

В якості вихідного продукту використовують фракцію III білків, яку одержують при промисловому виробництві препаратів крові різними модифікаціями етанолового методу Кона.

Виділення концентрату альфа-2-макроглобуліна проводять в 2 етапи: 1) з метою очистки фракції III від ліпідів та гама-глобулінів її розчиняють в охолоджену 0,05 М розчині ацетату натрію (рН 6,9) до концентрації білку від 3 до 5%. Добавляють охолоджений етиловий спирт до концентрації його в суміші від 13 до 15%. В ацетатному розчині з іонною силою 0,05 при концентрації спирту 13-15% більшість молекул ліпідів та гама-глобулінів переходить в осад, який видаляють центрифугуванням; 2) в одержаному супернатанті з допомогою 1 М розчину оцтової кислоти встановлюють рН в межах $5,4 \pm 0,05$ - на рівні ізоелектричної точки молекули альфа-2-макроглобуліну. Добавляють охолоджений етиловий спирт до концентрації від 23 до 25% та осаджують білок. Осад концентрату альфа-2-макроглобуліну виділяють центрифугуванням, розчиняють в 0,1% розчині хлориду натрію до концентрації білку ($30 \pm 0,5$) г/л, встановлюють рН в межах від 6,8 до 7,0, негайно заморожують при температурі не вище мінус 40°C та ліофілізують, використовуючи м'який режим сублімаційного висушування. Одержаний порошок добре розчинний в фізіологічних розчинах.

Експериментальні дослідження показали, що одержаний препарат характеризується наступними фізико-хімічними та біологічними властивостями: масова концентрація білку ($0,9 \pm 0,05$) мг/мг порошку; електрофоретичний склад білкових фракцій - альбумін - 1-3%, альфа-2-глобуліни - 35-45%, бета-гама-глобуліни - 54-62%; специфічна активність від 0,18 до 0,25 мг функціонально активного альфа-2-макроглобуліну на 1 мг білку; препарат не виявляє гострої та хронічної токсичності.

Приклад 1

Прикладом його виготовлення служить проти-запальний засіб наступного складу, мас. %: альбумін - 3; альфа-2-глобуліни - 35; бета-гама-глобуліни - 62.

Збільшення вмісту бета-гама-глобулінів до 62 % призводило до погіршення розчинності засобу, що спричиняло зниження його специфічної активності.

Приклад 2

Збільшення вмісту альфа-2-глобулінової фракції до 45% потребувало спеціального відбору вихідної сировини - фракції III білків з високим вмістом альфа-2-макроглобуліну, що становить невеликий відсоток від її загальної кількості. Разом з тим достовірно не зростала специфічна активність засобу наступного складу, мас. %: альбумін - 1; альфа-2-глобуліни - 45; бета-гама-глобуліни - 54.

Приклад 3

Специфічна активність засобу наступного складу, мас. %: альбумін - 2; альфа-2-глобуліни - 40; бета-гама-глобуліни - 58.

складала 0,2 мг функціонально активного альфа-2-макроглобуліну на 1 мг білку, що в 6-7 разів перевищує його активність в плазмі крові людини.

Таким чином, експериментально встановлено, що оптимальним є наступний склад протизапального засобу, мас. %: альбумін - 2; альфа-2-глобуліни - 40; бета-гама-глобуліни - 58.

Протизапальний засіб виявляє наступні переваги: використання в якості активного компоненту засобу полівалентного інгібітору плазми альфа-2-макроглобуліну, який зв'язує більшість відомих протеїназ різної специфічності та каталітичних механізмів, в той час як альфа-1-антитрипсин є класоспецифічним і інактивує тільки серинові протеїнази трипсиноподібної дії; більш широкий спектр терапевтичної дії завдяки тому, що поряд з антипротеїназною дією засіб виявляє протиінфекційні властивості; розширення номенклатури білкових препаратів з донорської крові, що сприяє більш повному використанню цієї унікальної сировини.

Вказаний результат досягнутий завдяки особливим властивостям даного засобу. Нами одержано новий препарат протизапальної дії на основі концентрату полівалентного інгібітору альфа-2-макроглобуліна в комплексі з іншими регуляторними білками плазми крові людини, що дозволяє використовувати засіб для терапії патологій, пов'язаних з активацією протеїназ при запальних процесах.

Відомо, що альфа-2-макроглобулін, який є головним активним компонентом засобу, характеризується високою антипротеїназною ємністю та унікальним механізмом інгібіторної дії. Це дозволяє йому зв'язувати протеїнази всіх 4 класів: серинові, цистеїнові, кислі та метало залежні, серед них головні ферменти нейтрофільних гранулоцитів - еластази, колагенази, катепсини G, B, D, H, що спричиняють найбільші руйнування тканинних структур та ініціюють розширення та хронізацію запальних процесів. Альфа-2-макроглобулін також здатен нейтралізувати активність панкреатичних серинових протеїназ (трипсину, хімотрипсину, калікреїну, еластази). Причому, спорідненість до трипсину у нього в 6-8 разів вища ніж у інших інгібіторів [4].

Альфа-2-макроглобулін створює в організмі захисний бар'єр, знижуючи інвазійність мікроорганізмів та затримуючи розмноження вірусів [5].

Прикладом протизапальної дії засобу служить ефективність та швидкість нейтралізації серинової протеїнази трипсину.

Приклад 4

Трипсинзв'язуючу активність засобу визначали ензиматичним методом [6].

Встановили, що 1 г протизапального засобу за дуже короткий час (15 хв.) зв'язує від 10 до 15 мг трипсину, що перевищує даний показник плазми крові людини в 7 разів.

Прикладом антивірусної активності засобу служить наступний приклад.

Приклад 5

Антивірусну активність засобу досліджували на культурі клітин Нер 2. В якості модельних вірусів застосовували вакцинний штам вірусу поліомієліту Р типу та вірус везикулярного стоматиту. Залишкову інфекційність вірусів визначали шляхом їх титрування методом бляшкоутворення.

Встановлено, що інфекційний титр вірусів в присутності протизапального засобу знижувався майже на 100 відсотків (табл.), що вказувало на здатність нейтралізувати як прості, так і складні віруси та запобігати генералізації вірусних інфекцій.

Приведені приклади ілюструють, та не обмежують винахід.

Таким чином, відповідно винаходу.

1. Отримано протизапальний засіб на основі полівалентного інгібітору альфа-2-макроглобуліна в комплексі з іншими регуляторними білками плазми крові людини, здатний регулювати рівень активності протеолітичних ферментів при запальних процесах, обмежуючи їх деструктивну та ініціюючу запалення дію.

2. Одержаний протизапальний засіб поряд з антиферментною виявляє антивірусну здатність, створюючи захисний бар'єр проти вірусів шляхом ефективної інгібіції їх розмноження.

Джерела інформації.

1. Pat. № 5114917 US, A61K37/64 Treatment Inflammation using Alpha-1-Antichymotrypsin / J. Lezdey, A. Wachter. - Опыбл. 19.05.92. - Т. 1 138, № 3.

2. Coan M. N., Brockway W. J., Equizabal H. Et al. Preparation and properties of Alpha-1-Proteinase Inhibitor Concentrate from Human Plasma // Vox Sang. - 1985. - 48. - № 6. - P. 333-342.

3. Wewers M. D., Casolaro M. A., Sellers S. E. et al. Replacement Therapy for Alpha-1-Antitrypsin Deficiency associated with Emphysema // N. Engl. J. Med. - 1987. - 316. - № 17. - P. 1055-1062.

4. Borth W. Alpha-2-Macroglobulin, a multifunctional Binding Protein with targeting Characteristics // FASEB-J. - 1992. - № 6. - P. 3345-3353.

5. Shin-ichi M., Sumio S. Alpha-2-Macroglobulin-like Plasma Inactivator for *Vibrio vulnificus* Metalloprotease // J. Biochem. - 1991. - 110. - № 4. - P. 548-552.

6. Веремеенко Л.Н., Голобородько О.П., Кизим А.М. Протеолиз в норме и при патологии. - Киев: Здоров'я, 1988. - 198 с.

Таблиця

Антивірусна активність протизапального засобу

Назва вірусу	Вихідний титр, БУО \ мл	Залишкова інфекційність, БУО \мл	Ефективність, %
Вірус поліомієліту (штам Р-712, Ch2ab)	$22,25 \pm 1,00 \cdot 10^5$	$7,50 \pm 0,58 \cdot 10^2$	96,68
Вірус везикулярного стоматиту (Індіана)	$2,00 \pm 0,95 \cdot 10^6$	$4,77 \pm 0,46 \cdot 10^3$	99,76

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2001 р. Формат 60x84 1/8.
Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.
(044) 268-25-22