



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 50369

(13) A

(51) 6 A61K38/46

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТУ ПОХІДНИХ ХІМОТРИПСИН-ТРИПСИН-ПОДІБНИХ ПРОТЕОЛІТИЧНИХ ФЕРМЕНТІВ ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ВВЕДЕННЯ**

1

2

(21) 2001129141

(22) 27 12 2001

(24) 15 10 2002

(46) 15 10 2002, Бюл. № 10, 2002р

(72) Верьовка Сергій Вікторович, Волков Георгій
Леонович, Комісаренко Сергій Васильович(73) ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, ТО-
ВАРИСТВО з ОБМЕЖЕНОЮ
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "КОМБІО"

(57) Спосіб одержання препарату похідних хімотрипсин-трипсинподібних протеолітичних ферментів для парентерального введення, який відрізняється тим, що гідролітичний центр ферменту інактивовано хімічною модифікацією чи мутагенною заміною амінокислотних залишків з групи "протонного реле" ферменту (псидину-57, аспарагінової кислоти-102 та серину-195 згідно з послідовністю α -хімотрипсину)

Винахід належить до біотехнології та медицини і являє собою спосіб одержання препарату похідних протеолітичних ферментів трипсинового ряду для внутрішньосудинного та парентерального введення як засобу контролю тканинного протеолізу під час лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом протеолітичних та активаційних процесів, як то - набряк, запалення, порушення імунної та гемостатичної систем, онкозахворювання, тощо

Відомо, що серинові протеїнази відіграють важливу роль у регуляції великої кількості фізіологічних процесів [1]. Зокрема, одна з головних функцій серинових протеїназ трипсинового ряду (трипсину, тромбіну, плазміну, тканинного активатора плазміногену, урокінази та інших) полягає у перетворенні численних білкових проформ (проферментів, профакторів, тощо) у активні форми завдяки конформаційним змінам, спричиненим обмеженням ферментативним гідролізом молекули проформи по так звані ділянках активаційного розщеплення. Ділянки активаційного розщеплення більшості відомих на сьогодні білкових проформ структурно подібні між собою та відповідають субстратній специфічності протеїназ трипсинового ряду [2]. Надмірна активність протеолітичних ферментів обмежується білковими інгібіторами протеїназ та чутливою до утворених фермент-інгібіторних комплексів імунною системою організму [3]. Порушення балансу між активацією та інгібуванням протеїназ трипсинового ряду зумовлює численні патології, як то - набряк, запалення, порушення

імунної та гемостатичної систем, онкозахворювання, тощо [1].

Один з підходів до нормалізації протеолітично-активаційного дисбалансу полягає у введенні в організм оксидних трипсину зі штучно зменшеними гідролітичними властивостями при повністю чи частково збереженій здатності до зв'язування ділянок активаційного розщеплення відповідних білкових проформ, тобто конкурентного блокування останніх

До аналогів поданого винаходу належить спосіб отримання групи препаратів системної ензимотерапії, призначених для перорального введення капсульованих комбінацій ферментних препаратів тваринного та рослинного походження з резорбцією частини ферментів у кровообіг після розчинення капсульних оболонок у нижній ділянці тонкої кишки [4].

Недоліки способу-аналогу полягають у відносно малому перетворенні ферментів у тератогенні деградовані форми під час резорбції у кровообіг, що спричинює до необхідності введення великих кількостей ферментів [5], наявності гідролітичної активності, що обумовлює можливість побічних процесів, високої вартості курсу лікування

В якості прототипу вибрано спосіб одержання призначеного для внутрішньосудинного введення препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів, що полягає у попередній протеолітичній взаємній обмеженій деградації вихідних ферментів з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн за рН 6.7 ± 2.3 при 37°C протягом 30 - 180 хвилин

(13) A

(11) 50369

(19) UA

[6] Обмежена протеолітична деградація ферментів запобігає надмірній гідролітичній та активаторній дії препарату, створює можливість нормалізації активаційного дисбалансу в організмі. Мала імуногенність обмежено деградованих форм дозволяє досягти бажаного терапевтичного ефекту за умов внутрішньо судинного введення значно менших, ніж у способі-аналозі, кількостей ферментних препаратів.

Недоліки способу-прототипу полягають у частковому збереженні активаційної активності деградованими ферментними формами, істотному зменшенні зв'язуючих властивостей деградованих похідних та в зумовленій надмірним гідролізом повній інактивації частини ферментів.

Задача винаходу полягає в розробці способу отримання придатного до внутрішньосудинного введення препарату трипсин-подібних протеолітичних ферментів, позбавленого зазначених для отриманого у спосіб-прототип препарату недоліків, тобто отриманні препарату з повністю збереженими зв'язуючими властивостями за повного пригнічення гідролітичних при якомого більш повній утилізації ферментного препарату.

Поставлена задача вирішується завдяки інактивації гідролітичного центру ферменту за збереження зв'язуючих властивостей та структури хімічною модифікацією чи мутагенною заміною амінокислотних залишків з групи "протонного реле" ферменту (гістидину-57, "аспарагінової кислоти-102 та серину-195 згідно послідовності α -хімотрипсину [7]). Відомо, що часткова чи повна мутагенна заміна зазначених амінокислот призводить до практично повного знищення гідролітичних властивостей ферменту [8, 9]. При цьому структура та зв'язуючі властивості ферменту лишаються практично незмінними. Подібний же ефект досягається за вибіркової хімічної модифікації амінокислот гідролітичного центру [10 - 13].

На відміну від способу-прототипу, що полягає в отриманні та внутрішньому судинному введенні підданих попередній обмеженій взаємній протеолітичній деградації вихідних ферментів з групи трипсин, хімотрипсин, папаїн та бромелаїн, отримувани у запропонований спосіб ферментні препарати повністю позбавлені гідролітичної та активаторної дії за збереження зв'язуючих властивостей та структури вихідних ферментів.

Отримувані у запропонований спосіб препарати за умов внутрішньо судинного введення не виявляють помітної імунної реакції та не викликають активації білків крові, чим усуваються побічні негативні ефекти та зумовлюється можливість застосування препарату в якості внутрішньо судинного лікарського засобу. Мала імуногенність отримуваних у запропонований спосіб препаратів дозволяє проводити їх клінічне застосування в широкому діапазоні умов щодо концентрацій, доз, часу введення, тощо. В порівнянні зі способом-аналогом запропонований підхід дозволяє досягти необхідного терапевтичного ефекту завдяки значно меншим кількостям ферментного препарату, чим запобігаються можливі побічні ефекти та істотно зменшується вартість лікарського курсу.

Тим самим розроблено спосіб одержання придатних до парентерального введення мало імуно-

генних та малотоксичних препаратів похідних протеолітичних ферментів хімотрипсин-трипсинового ряду, що можуть бути використані для підвищення ефективності терапії обумовлених дисбалансом тканинного та судинного протеолізу патологічних процесів.

Спосіб одержання препарату та дослідження його дії визначається відповідно до наведених прикладів.

Приклад 1 Отримання ангідротрипсину

Інактивацію гідролітичного центру серинових протеїназ хімотрипсин-трипсинового ряду за збереження структури та зв'язуючих властивостей отриманого похідного розглянуто на прикладі ангідротрипсину - підданого хімічній модифікації β -трипсину з перетворенням серину-195 каталітичної триади на дегідроаланін [10]. Обробку фермента феніл-метил-сульфоніл-фторидом до 2 - 3 відсотків активності порівняно до вихідної проводять згідно [11]. Елімінацію феніл-сульфонільної групи у лужному середовищі та афінно-хроматографічне виділення похідного білка на пара-амінобензамідин-сефарозі проводять згідно до [12]. Отримуваний білок діалізують проти 0.001 н соляної кислоти та піддають ліофільній сушці. Кінцевий препарат являє собою білий гігроскопічний порошок зі вмістом білку не нижче 94 відсотків. Гомогенність отриманого препарату визначають за допомогою ДСН-гель-електрофорезу у поліакриламідному гелі [14].

Приклад 2 Протипухлинна та антиметастатична дія

Онкологічні захворювання відносяться до найпоширеніших патологій, пов'язаних з надмірною активаційною дією серинових протеїназ [1]. Протипухлинну та антиметастатичну дію препарату розглянуто на прикладі пригнічення метастазування та росту карцином Л'юїс [15]. Мишам лінії C57B1/6 з перещепленою карциномою Л'юїс вводять препарат у дозі 250мг/кг внутрішньовенне з інтервалом 48 годин 8 разів, починаючи з сьомої доби після перещеплення. Досягнуто гальмування росту первинної пухлини на 42.6% порівняно до контролю, пригнічення метастазування на 64.4% за кількістю та 73.5% за сумарним об'ємом метастатичного ураження. Побічних імуногенних ефектів не спостерігали.

Приклад 3 Дослідження токсичності отриманого препарату. Оцінку гострої токсичності отриманого у захищений спосіб препарату трипсин-подібних серинових протеїназ проводять згідно до ГОСТ 12.1.007-76 [16]. Розрахунок значень токсичності проводять з використанням методу Лігфілда-Уілкінсона [17]. В дослідках на мишах ЛД₅₀ становила 388мг/кг, на кролях - 76мг/кг в порівнянні до 277мг/кг та 47мг/кг для отриманого у спосіб-прототип деградованого ферментативного комплексу [6]. За умов разового введення дози, що дорівнює 20 відсоткам від ЛД₅₀, будь-яких побічних негативних ефектів не спостерігали.

Наведені результати свідчать про малу токсичність отриманого у запропонований спосіб препарату та його придатність до внутрішньо судинного введення. Одержаний у запропонований спосіб препарат має низьку імуногенність, що дозволяє досягти пролонгованої дії препарату, дає

змогу обмежити кількість введень та зумовлює збереження ефективності дії препарату протягом всього курсу

Таким чином, запропонований винахід дає змогу одержати ефективний терапевтичний засіб для лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом в регуляції активності протеолітичних ферментів. Захищений спосіб дає змогу різко знизити імуногенність та токсичність кінцевого препарату.

Отримуваний у запропонований спосіб препарат дозволяє стримувати бажаного терапевтичного ефекту за допомогою істотно менших кількостей препарату, що веде до зниження вартості курсу.

Застосування позбавлених гідролітичної дії похідних серинових протеаз серинового ряду з повністю збереженими зв'язуючими властивостями та структурою вихідних ферментів знижує ймовірність побічних ефектів, збільшує час перебування препарату в кровоносному руслі та дає змогу різко зменшити разову та курсову дози препарату.

Посилання

1. Pathy L. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis assembly from modules/ *Cell* - 1985 - 41, №3 - P 657 - 663
2. Верева С.В. О структурном подобии участков активационных и расщеплений белков-предшественников реактивным центрам серпинов/ *Укр биохим журн* - 1995 - 67, №5 - С 24 - 28
3. Mast A., Enghild J., Pizzo S., Salvesen G. Analysis of the Plasma Elimination Kinetics and Conformational Stabilities of Native, Proteinase-complexed, and Reactive-site Cleaved Serpins/ *Biochemistry* - 1991 - 30, №6 - P 1723 - 1730
4. Теоретические основы системной энзимотерапии /в кн. Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения, под ред. К.Н. Веремеенко, К.Н. Коваленко. Киев, изд-во "Морион", 2000г., С 7 - 115
5. Системная энзимотерапия. Исследования и клиническая практика / под ред. К. Ноуза, З. Масиновски и Р. Мухова - изд-во Медицинского общества по изучению энзимов, Мюнхен-Прага - 1994 - 56С
6. Волоков О., Качалов М., Бляговский М. Спосіб одержання препарату трипсин-подібних протеолі-

тичних ферментів для внутрішньо судинного введення / Патент №38270А (Україна) від 15.05.2001. Пріоритет від 14.06.2000. 7A61K31/195. Публікація 15.05.2001, Бюллетень №4, II ч., 2001р.

7. Blow D., Birkoff J., Hartley B. Role of the buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin/ *Nature* - 1969 - 221, №5178 - P 337 - 340

8. Craik C., Rocznik S., Langman C., Rutter W. The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases/ *Science* - 1987 - 237, №4817 - P 909 - 913

9. Carter P., Wells J. Dissecting the catalytic triad of a serine protease/ *Nature* - 1988 - 332, №6164 - P 564 - 568

10. Feinstein G., Feeney R. Interaction of inactive derivatives of chymotrypsin and trypsin with protein inhibitors/ *J Biol Chem* - 1966 - 241, №22 - P 5183 - 5189

11. Ako H., Ryan C., Foster R. The purification by affinity chromatography of a proteinase inhibitor binding species of anhydro-chymotrypsin/ *Biochem Biophys Res Commun* - 1972 - 46, №4 - P 1639 - 1645

12. Ashton R., Sheraga H. Preparation and characterization of anhydrothrombin/ *Biochemistry* - 1995 - 35, №2 - P 6454 - 6463

13. Hikosawa K., Onishi T., Shima M., et al. Preparation of anhydrothrombin and characterization of its interaction with natural thrombin substrates/ *Biochem J* - 2001 - 354, №2 - P 309 - 313

14. Weber K., Osborn D. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis/ *J Biol Chem* - 1969 - 244, №16 - P 4406 - 4412

15. Dumont P., Abessi G. and Jeger R. Ineffectiveness of incarene, a fibrinolytic agent, alone or in combination with chemotherapeutic agents on spontaneously metastasizing murine tumors/ *Clin Exp Metastasis* - 1983 - 1, №4 - P 349 - 357

16. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества, классификация и общие требования безопасности - М - 1990 - С 5

17. Бельский М.Д. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта, - Л. Медицина - 1963 - 152с

ДП «Український інститут промислової власності» (Укрпатент)

вул. Сим'ї Хохлових, 15, м. Київ, 04119, Україна

(044) 456 - 20 - 90

ТОВ «Міжнародний науковий комітет»

вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна

(044) 216 - 32 - 71