



УКРАЇНА

(19) UA (11) 33677 (13) A

(51) 6 A61K31/195

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИХ ІНГІБІТОРІВ СЕРИНОВИХ ПРОТЕЇНАЗ АНТИ-МЕТАСТАТИЧНОЇ, ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ ТА АНТИФІБРИНОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

(21) 99031622

(22) 23.03.1999

(24) 15.02.2001

(33) UA

(46) 15.02.2001, Бюл. № 1, 2001 р.

(72) Верьовка Сергій Вікторович, Петік Андрій
Владиславович, Пясковська Ольга Миколаївна(73) Верьовка Сергій Вікторович, Петік Андрій
Владиславович, Пясковська Ольга Миколаївна

(57) Спосіб одержання високомолекулярних інгібіторів серинових протеїназ антиметастатичної, протизапальної та антифібринолітичної дії, що відрізняється тим, що кінцевий продукт - високомолекулярний інгібітор серинових протеїназ - утворюють ковалентною кон'югацією низькомолекулярного інгібітору серинових протеїназ до високомолекулярного водорозчинного полімеру.

Винахід належить до біотехнології та медицини і представляє собою спосіб одержання ковалентно кон'югованих до водорозчинних полімерів низькомолекулярних інгібіторів серинових протеїназ. Їх може бути використано в клінічній практиці як засіб контролю тканинного протеолізу під час лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом тканинного протеолізу, як-от - метастазування злоякісних пухлин, панкреатит, запальні процеси, надмірна активність фібринолітичної системи крові тощо.

Відомо, що для терапії та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом тканинного протеолізу, використовуються високомолекулярні білкові інгібітори серинових протеїназ [1]. Натомість, клінічне застосування низькомолекулярних синтетичних інгібіторів вкрай обмежене токсичною дією, спричиненою їх здатністю до проникнення через клітинні мембрани та пригнічення внутрішньоклітинного протеолізу [2].

До аналогів поданого винаходу належить отримання фракціонуванням тваринної сировини групи препаратів на основі природних білкових інгібіторів серинових протеїназ: "Trazylol" (Bayer, ФРН), "Contrykal" (Arzneimittelwerk-Dresden, ФРН), "Gordox" (Gedeon Richter, Угорщина), "Tzalo" (Bartch, Швейцарія), "Iniprol" (Choy, Франція), "Zymofren" (Specia, Франція), "Pantrypin" (С-Пб. завод хіміко-фармацевтичних препаратів, Росія) [1]. Всі ці препарати одержуються багатостадійним фракціонуванням білкової сировини тваринного походження.

Недоліки способів виділення цих препаратів полягають в складності процесів фракціонування, малих виходах, високій ціні та обумовленій білковою природою кінцевого продукту високій імуногенності. Висока імуногенність кінцевого препарату спричинює швидку елімінацію аналогів з кровоно-

сного русла, що призводить до необхідності збільшення частоти введень і зниження ефективності терапії протягом курсу [2]. Розповсюдженість повільних вірусних хвороб за відсутності засобів контролю спричинило до заборони використання в фармацевтичній промисловості сировини тваринного походження, що вимагає застосування рекомбінантних технологій та різко ускладнює способи аналогів отримання високомолекулярних білкових інгібіторів [3].

Як прототип вибрано спосіб одержання високомолекулярного білкового інгібітору "Pantrypin" (С-Пб. завод хіміко-фармацевтичних препаратів, Росія) [1]. Отримуваний у спосіб-прототип інгібітор має широке використання як протизапальний засіб [1, 2] та значно менше - як антифібринолітик та антиметастатичний засіб [2]. Діючою компонентою препарату-прототипу є основний панкреатичний інгібітор Кунітца-Нортропа - білок з молекулярною вагою 6531 Да [1].

Спосіб-прототип полягає в багатостадійному фракціонуванні білкової сировини тваринного походження, а саме - легень бика, що послідовно піддаються гомогенізації, подвійній екстракції буферними розчинами, центрифугуванню з відокремленням осаду, кислотному осадженню білків супернанту, центрифугуванню з відокремленням супернанту та розчиненню осаду, афінній хроматографії на трипсин-вміщуючому сорбенті, сольовому осадженню, центрифугуванню, знесоленню гел'фільтрацією, доочистці іонообмінною хроматографією з ліофілізацією кінцевого препарату.

Недоліки способу-прототипу аналогічні до недоліків всієї групи способів одержання високомолекулярних білкових інгібіторів серинових протеїназ і полягають в складності процесів фракціонування, малих виходах, високій ціні та високій імуногенності кінцевого продукту. Окрім того, істотним

(19) UA (11) 33677 (13) A

недоліком прототипу є використання білкової сировини тваринного походження за відсутності методів контролю щодо наявності носіїв повільних вірусних хвороб [3].

Задача винаходу полягає в розробці опрощеного способу одержання високомолекулярних інгібіторів серинових протеїназ антиметастатичної, протизапальної та антифібринолітичної дії з відомою від використання білкової сировини тваринного походження.

Поставлена задача досягнута завдяки ковалентній кон'югації низькомолекулярних інгібіторів серинових протеїназ з водорозчинним високомолекулярним полімером. Відповідний підбір інгібіторної та полімерної складових частин дозволяє досягти низької імуногенності отримуваних у такий спосіб препаратів, тоді як різке збільшення молекулярної маси одержаних у даний спосіб інгібіторів обмежує їх здатність до проникнення крізь клітинні мембрани, запобігає можливості пригнічення внутрішньоклітинних процесів, чим різко зменшує токсичність. Тим самим розроблено спосіб одержання малоімуногенних, малотоксичних та недорогих високомолекулярних інгібіторів серинових протеїназ антиметастатичної, протизапальної та антифібринолітичної дії, які можуть бути використані для підвищення ефективності терапії ряду патологічних процесів, обумовлених дисбалансом тканинного протеолізу.

Спосіб одержання препаратів та їх дія визначаються відповідно до наведених прикладів.

Приклад 1. Одержання високомолекулярного інгібітору серинових протеїназ.

Одержання полімерної водорозчинної матриці полягає у синтезі регулярного співполімеру біологічно сумісного мономеру (I) та мономеру (II), що містить активовану групу для подальшого зв'язування α -аміногрупи L-лізину. В даному прикладі розглядається синтез регулярного співполімеру N-вініл-піролідону (мономер I) і малеїнового ангідриду (мономер II) [4]. До тригорлого двофазного реактора з мішалкою, термометром і спіраллю водяного охолодження вміщують розчин 200 г малеїнового ангідриду, 240 г N-вініл-піролідону та 4 г динітрилу 2-2-азо-ди-ізомасляної кислоти в 1 л діоксану. За постійного перемішування протягом години на гліцериновій бані піднімають температуру до 50°C, до початку саморозігрівання реакційної суміші, після чого, не зупиняючи перемішування, комбінуючи охолодження з нагрівом, протягом двох годин підтримують температуру 70°C. Реакційну суміш лишають на ніч до повного охолодження. Застиглу масу невеликими порціями розтирають в ефірі, промивають на нутч-фільтрі ефіром і сушать. Вміст ангідридних груп визначають титриметрично, гідролізуючи наважку співполімеру аліквотою титрованого лугу з подальшим титруванням 0,1 N соляною кислотою.

Одержаний у такий спосіб білий порошок є регулярним співполімером малеїнового ангідриду з молекулярним співвідношенням компонентів 1:2-1:3. Визначена методом ультрацентрифугування [5] середньостатистична молекулярна маса сягає 27-32 кДа. Вихід співполімеру коливається в межах від 64 до 47 відсотків від теоретичного.

Кон'югація співполімеру з низькомолекулярним інгібітором серинових протеїназ. До розчину

14,5 г L-лізину гідрохлориду в 300 мл 0,25 M розчину бікарбонату натрію, pH 8,5, за інтенсивного перемішування з п'ятихвилинним інтервалом додають однограмовими порціями 25 г лінійного співполімеру, утримуючи pH розчину 8,0-8,5 за допомогою 0,5 N розчину лугу. Після розчинення останньої порції продовжують перемішування протягом трьох годин, після чого піддають розчин ультрафільтраційному концентруванню та відокремленню надлишку вільного лізину та низькомолекулярних фракцій ультрафільтрацією на мембрані з пропускною межею нижче за 5 кДа з послідовним використанням 0,5 M розчину хлориду натрію, 0,3 M розчину оцтової кислоти та води. Одержаний концентрат високомолекулярної фракції піддавали ліофільній сушці. Вихід лізин-вміщуючого полімеру становить 14-18 г. Вміст лізину визначають за даними амінокислотного аналізу гідролізату, одержаного 12-годинним гідролізом наважки в 6 N соляної кислоти. Показано, що за умов кон'югації практично всі ангідридні групи зв'язують лізин, доля спонтанно гідролізованих ангідридних груп не перевищує одного відсотка. Етерифікацію карбоксильних груп кон'югованого лізину проводять за стандартною методикою етерифікації амінокислот розчином хлористого водню у відповідному абсолютному спирті чи в розчині відповідного спирту в абсолютному діоксані [6].

Приклад 2. Антиангіогенна дія.

Антиангіогенну дію препарату розглянуто на прикладі пригнічення неоваскуляризації хоріоалантоїсної мембрани курячих ембріонів [7]. У ембріонів 9-10 доби розвитку за допомогою ангіогенного фактору, виділеного з тканини пухлини [8], у дозі 10 нг/мл індуковано високу ангіогенну активність порівняно з контролем (фізіологічний розчин). Додаванням препарату у дозі 20 та 40 мкг досягнуто дозозалежне пригнічення ангіогенної активності, індукованої ангіогенним фактором (на 50% і 90% відповідно).

Приклад 3. Протипухлинна та антиметастатична дія.

Протипухлинну та антиметастатичну дію препарату розглянуто на прикладі пригнічення метастазування та росту карциноми Льюїс [9]. Мишам лінії C57Bl/6 з перещепленою карциномою Льюїс вводили препарат у дозі 125 мг/кг внутрішньовенно з інтервалом 48 годин 10 разів, починаючи з сьомої доби після перещеплення. Досягнуто гальмування росту первинної пухлини на 61,1% порівняно з контролем, пригнічення метастазування на 94,98% за кількістю та 99,1% за сумарним об'ємом метастатичного ураження. Побічних імуногенних ефектів не спостерігали.

Приклад 4. Антифібринолітична дія.

Антифібринолітичну дію препарату оцінювали за часом лізису фібринового згустку [10]. Введення до системи препарату в концентрації 2 mM за вмістом лізину призводило до збільшення часу лізису в 24 рази порівняно з контролем (530 ± 34 та 12720 ± 415 секунд відповідно).

Приклад 5. Токсичність отриманого препарату.

Оцінку гострої токсичності отриманого у захищений спосіб високомолекулярного інгібітору серинових протеїназ проводили згідно з ГОСТ 12.1.007-76 [11]. Розрахунок значень токсичності проводили з використанням методу Лігфільда-Уілкінсона [12]. ЛД₅₀ становила 280 мг/кг, ЛД₁₆ - 200 мг/кг, ЛД₉₉ встановити не вдалося.

Результати прикладів 4-5 свідчать, що даний спосіб дає змогу значно простіше та з відмовою від використання сировини тваринного походження отримати високомолекулярні інгібітори серинових протеїназ з вираженою антиметастатичною, антиангіогенною та антифібринолітичною дією. Одержаний у цей спосіб інгібітор має низьку імуногенність, чим досягнуто пролонгованість дії препарату, що дало змогу скоротити кількість введення препарату порівняно з білковими аналогами та зумовило збереження ефективності дії препарату протягом всього курсу. Окрім того, отриманий у захищений спосіб високомолекулярний інгібітор серинових протеїназ на відміну від синтетичних низькомолекулярних інгібіторів нездатний до проникнення через клітинні мембрани, тому не може пригнічувати внутрішньоклітинний протеоліз і, як наслідок, практично не виявляє токсичної дії. Побічна дія отриманого у даний спосіб високомолекулярного інгібітору обмежується помірним збільшенням кровоповнення печінки.

Таким чином, запропонований винахід дає змогу одержати високоефективний терапевтичний засіб для лікування та профілактики захворювань, пов'язаних з дисбалансом в регуляції активності протеолітичних ферментів. Кон'югація низькомолекулярного інгібітору до водорозчинного полімеру дає змогу різко знизити імуногенність та токсичність кінцевого препарату. На відміну від основаних на фракціонуванні тваринної сировини способів виділення білкових інгібіторів даний спосіб дозволяє отримувати високомолекулярні небілкові інгібітори серинових протеїназ з низькою вартістю та великими виходами. Небілкова природа кінцевого продукту забезпечує малу імуногенність, що знижує ймовірність побічних ефектів, збільшує час перебування препарату в кровоносному руслі та дає змогу різко зменшити разові та курсову дози препарату.

Джерела інформації.

1. Сысновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. – Киев: Здоров'я, 1979. – С. 17-21.
2. Сысновец А. С., Левицкий А. П. Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. – Киев: Здоров'я, 1979. – С. 27-29.
3. Anderson R. M., Donnelly C. A., Ferguson N. M. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle // *Nature*. - 29 August 1996. - 382. - P. 779-788.
4. Conix A., Smets G. Ring opening in lactam polymers // *J. Polym. Sci.* - 1955. - 15. - P. 221-229.
5. Самойлова Н. А., Андреев С. М., Галкин О. М., Давидович Ю. А., Рогожин С. В. Гидрофильные полимерные реагенты для пептидного синтеза // *Биоорганическая химия*. - 1981. - 7, № 11. - С. 1627-1637.
6. Гринштейн Дж., Виниц М. Метилловые и этиловые эфиры аминокислот // *Химия аминокислот и пептидов*. - Москва: Мир, 1965. - С. 426-431.
7. Ausprunk D. H., Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cell in performed and new formed vessels during tumor angiogenesis. *Microvascul. Res.* - 1977. - 14, № 1. - P. 53-65.
8. Лисняк И. А. Ангиогенный фактор из метастазирующей карциномы Льюис // *Укр. биохим. журн.* - 1986. - 58, № 6. - С. 58-61.
9. Dumont P., Abessi G. and Jeger R. Ineffectiveness of inicarene, a fibrinolytic agent, alone or in combination with chemotherapeutic agents on spontaneously metastasizing murine tumors // *Clin. Exp. Methastasis*. - 1983. - 1, № 4. - P. 349-357.
10. Muramatsu M., Onishi T., Makino S., Fujii S. and Yamamura Y. Inhibition of fibrinolytic activity of plasmin by various synthetic inhibitors // *J. Biochem.* - 1965. - 57, № 3. - P. 450-453.
11. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества, классификация и общие требования безопасности. - М. - 1990. - С. 5.
12. Беленький М. Д. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. - Л.: Медицина. - 1963. - 152 с.

33677

Обсяг _____ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

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