

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **025399**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2016.12.30

(21) Номер заявки
201300490

(22) Дата подачи заявки
2010.11.22

(51) Int. Cl. **C07K 1/06** (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
G06F 19/18 (2011.01)
C07B 47/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ СИНТЕЗА ЛЕЧЕБНЫХ И ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

(43) **2014.03.31**

(86) **PCT/RU2010/000694**

(87) **WO 2012/070968 2012.05.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ФАРБЕР БОРИС СЛАВИНОВИЧ;
ФАРБЕР СОФЬЯ БОРИСОВНА (RU)**

(72) Изобретатель:
**Мартынов Артур Викторович (UA),
Фарбер Борис Славинович, Фарбер
Софья Борисовна (RU)**

(74) Представитель:
Васильева Г.С. (RU)

(56) Martynov A.V. et al. New approach to design and synthesis of therapeutic and preventive drugs, taking into account interspecies polymorphism of receptors (metod of precision partial modification). Annals of Mechnicov Institute, № 4, 2007, с. 5-13

Masaaki Iigo et al. Orally administered bovine lactoferrin induces caspase-1 and interleukin-18 in the mouse intestinal mucosa: a possible explanation for inhibition of carcinogenesis an metastasis Cytokine, 2004, 25 26-44, особенно, реферат, с. 42, пар. 4,1, дискуссия

Francis R. Carbone et al. Induction of ovalbumin-specific cytotoxic T cell by in vivo pertide immunization J Exp. Med., 1989, vol. 169, 603-612, особенно, с. 605, строки 8-20, фиг. 1, дискуссия

Bhuvanesh Dave et al. Tp53-associated growth arres and DNA damage repair gene expression is attenuated in mammary epithelial cells of rats fed whey proteins. J. Nutr., 2006, 136: 1156-1160, особенно, реферат, с. 1157, левая кол., фиг. 1-4

US-A-5854224

US-A1-20030088366

Robert Haner et al. The sequence-specific cleavage of RNA by artificial chemical ribonucleases. Antisense & Nucleic acid drug development, 1997, 7: 423-430

Robert E. Canfield. Peptides derived from tryptic digestion of egg white lysozyme. The Journal of Biological Chemistry, 1963, vol. 238, No 8: 2691-2697, реферат

(57) Изобретение может быть использовано в медицине и ветеринарии для дизайна (создания и синтеза) лечебных и профилактических препаратов, эффективных для лечения онкологических, вирусных заболеваний человека и животных и для дизайна новых лекарственных средств. Предлагается новый способ дизайна и синтеза лечебных и профилактических лекарственных препаратов, в котором берут биополимер-мишень (белок, ДНК, РНК или их смесь), а в качестве лиганда используют тот же биополимер-мишень, но нарезанный на олигомерные фрагменты (нуклеазами, синтетическими нуклеазами и протеазами), которые модифицируют путем замены заряда на противоположный (ацилированием ангидридами дикарбоновых кислот или алкилированием галогенкарбоновыми кислотами), а также в качестве лиганда используют тот же биополимер-мишень, который модифицируют путем частичной замены заряда молекулы на противоположный знак с образованием супрамолекулярных ансамблей биополимеров.

B1**025399****025399****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится к медицине, фармации, а именно к методам проектирования и синтеза новых лекарственных средств.

Предшествующий уровень техники

Важное место в современной структуре фармацевтического рынка занимают препараты - продукты биотехнологии различного происхождения. Это такие важные для жизни пациентов препараты, как рекомбинантные инсулины, интерфероны, интерлейкины, эритропоэтины и др. При этом статистика вывода на рынок таких препаратов, равно как и ряда низкомолекулярных препаратов, свидетельствует о незначительном превышении процента эффективности над плацебо. Например, превышение процента эффективности бета-интерферона (в лечении рассеянного склероза) над плацебо составляет всего 8% (30% - плацебо и 38% - бета-интерферон). Очень близка картина и для низкомолекулярных средств, например для гипотензивных препаратов. Эффективность амлодипина на 3 фазе клинических испытаний только на 22% превышала плацебо: 52% против 30% плацебо). Причины, объясняющие, почему для 48% пациентов лекарственный препарат оказывается неэффективным или малоэффективным до настоящего момента не выяснены. Особенно непонятным является факт неэффективности препаратов, акцепторами которых являются давно изученные клеточные рецепторы - адрено-, холино- и гистаминовые рецепторы. Абсолютная неэффективность одного и того-же препарата для одной группы пациентов при эффективности его-же в другой группе остается загадкой. Именно благодаря этой малоизученной особенности организма человека большинство гипотензивных препаратов применяется в комбинации. Особенно необходимо сочетание как минимум трех препаратов с разными механизмами действия, но с одинаковым конечным результатом: например, гипотензивным или цитостатическим. В последнем случае особенно ярко выражены отличия не только различных видов опухолей по чувствительности, но и по индивидуальным особенностям конкретной опухоли и организма-хозяина. В лечении пациентов с онкологическими заболеваниями часто оказывается неэффективна даже полихимиотерапия. Удручающая статистика FDA по третьей фазе клинических испытаний лекарственных препаратов, свидетельствует о низкой эффективности практических всех лекарственных средств, имеющихся на фармацевтическом рынке. Средняя эффективность самого сильного лекарственного препарата (морфина) составляет 75%. В остальных случаях наблюдается либо непереносимость и токсические эффекты, либо противоположное действие. Даже в случаях применения наркотических лекарственных препаратов только у 60% людей, принимавших эти средства, наблюдаются классические эффекты. У другой части людей применение, например, кокаина вызывает сильную головную боль и головокружения вообще без признаков анестезии. Такое расхождение эффектов может быть вызвано полиморфностью рецепторного аппарата в пределах человеческой популяции. Ранее структура рецепторов считалась абсолютно консервативной и неизменной для одного, а иногда и нескольких видов животных. В настоящее время все больше ученых склоняются к точке зрения, что рецепторы даже в пределах одного вида отличаются подобно отличиям между человеческими лицами. Отличия эти вызваны не только и не столько изменением первичной аминокислотной последовательности белковой основы рецепторов, сколько конформационными изменениями вторичной и третичной структуры. При внешней схожести по первичной структуре и молекулярной массе, фактически рецепторы разных людей представляют собой комбинации изоформ белков. Особенно ярко это видно на примере комбинации изоформ антигенов комплекса гистосовместимости (МНС) подбор которого весьма важен при трансплантации органов. Если для системы МНС существуют тысячи вариантов и комбинаций, то почему структура других рецепторов организма должна быть консервативной в рамках вида. Скорее всего, подобно антигенам МНС, третичные структуры большинства клеточных рецепторов значительно отличаются по изоформному профилю в рамках популяции.

В данную гипотезу хорошо вписывается низкая эффективность лекарственных препаратов. Консервативная структура классического лекарственного препарата (подобно одному "ключу") не может одинаково и с одинаковой афинностью подходить к специфичному рецептору ("множеству разных, хоть и похожих, замков") у всех особей одного вида.

Для увеличения эффективности препаратов необходимо изменить саму концепцию проектирования препаратов и подходы к этому процессу. Например, в докинге [1], одном из наиболее эффективных методов современного драг-дизайна [2, 3], использует консервативную последовательность одного рецептора. Иногда используют конформации мишени в разных растворителях с последующим наложением конформаций. Получить бесконечное множество рецепторов и найти одно вещество-ингибитор для всех конформаций не удастся никогда. Одним из удачных решений природы является эволюция системы иммуноглобулинов для защиты высших организмов от внешних агрессивных факторов - вирусов, микроорганизмов и грибов. Фактически одинаковая основа иммуноглобулина (Fc-области и тяжелые цепи) при огромном количестве различных вариантов по FАВ-участкам, специфичным к своим мишеням, является весьма удачным решением.

При этом афинность к мишеням может колебаться от 5% у IgM до 95% у IgG. Иногда к одному антигену-мишени может вырабатываться несколько сот тысяч вариантов иммуноглобулинов с разной моноклональной специфичностью к разным эпитопам. Такой полиморфизм себя оправдывает - большинство населения все-же выживают при инфекционных заболеваниях. И во многих случаях донорские имму-

ноглобулины реконвалесцентов остаются единственным эффективным средством лечения многих болезней, например САРС и лихорадки Марбурга.

Если следовать логике природы, то идти по классическому пути - синтезировать одно соединение для лечения одного заболевания - является нерациональным и неэффективным. Об этом свидетельствует все уменьшающееся с каждым годом количество внедренных в мире лекарственных препаратов с оригинальной структурой.

Для обеспечения максимальной аффинности для максимального количества людей необходимо иметь смесь миллионов очень похожих, но все же отличающихся друг от друга молекул в одном флаконе. В этом случае мы получаем не один "ключ", а целую связку.

И хотя-бы один "ключ" из этой "связки" подойдет конкретному пациенту с его оригинальным рецептором. Если синтезировать конкретный ингибитор для конкретного пациента фактически нереально в современных условиях, то остается единственный вариант - получение миллионов изоформ ингибитора в одном моле вещества.

Одним из наиболее рациональных методов решения проблемы низкой эффективности препаратов, на наш взгляд, является получение прецизионно частично химически модифицированных рекомбинантных биотехнологических препаратов - биополимеров и их неполных гидролизатов (белков, полисахаридов, полинуклеотидов, танинов, самоорганизующихся структур - фосфолипидов и др.). Использование этой технологии позволит перевести на интенсивный уровень развития фармацевтическую науку, значительно упростит методы молекулярного моделирования и увеличивает вероятность практического выхода с внедрением лекарственных препаратов.

Одной из главных проблем в современном молекулярном моделировании является абсолютная непредсказуемость как физико-химических, так и биологических свойств спроектированных соединений. Как правило, кроме первичной структуры соединений наиболее важную роль играют стереохимические свойства. А вот здесь вступают в силу законы случайности. Например, левомецитин имеет 2 стереоизомера. Активными среди них является только один - левовращающий.

Аналогично выглядит картина с вновь спроектированными с помощью докинга соединениями: прекрасная аффинность к белку мишени в модели и полное отсутствие активности у синтезированных соединений. Это вызвано тем, что идеальные условия моделирования не учитывают всего многообразия влияний на процесс взаимодействия препарат - мишень. Это такие параметры, как температура, характер и свойства растворителя, наличие вспомогательных веществ - посредников, гравитация, давление и конечно конформация вещества. Именно стереохимическая структура спроектированного вещества в большинстве случаев не совпадает со структурой синтезированного соединения. Часто вообще синтезировать нужное вещество не представляется возможным. Чтобы исключить неправильные конформации при моделировании нужно использовать в качестве действующих веществ соединения со структурой, давно подтвержденной физико-химическими методами. Опять возникает противоречие - а сможет ли такое давно известное вещество ингибировать новую мишень? Для этих целей можно использовать "конструктор" - белки и полинуклеотиды.

Первые состоят из давно изученных L-аминокислот, а вторые - из моонуклеотидов. Структуры мономеров очень хорошо изучены и подтверждены, равно как и их структуры в пределах полимера, а также влияние близлежащих мономеров друг на друга (что учитывается и используется при проектировании и соответственно при синтезе праймеров для полимеразной цепной реакции).

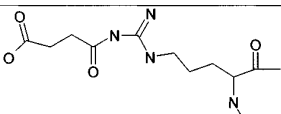
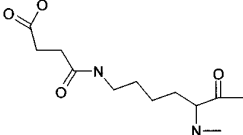
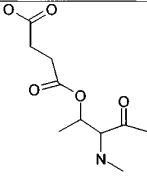
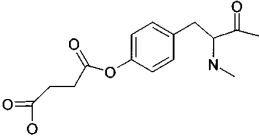
Соответственно, если заранее искать препарат среди пептидов и полинуклеотидов и просто перебирать последовательность мономеров, то можно с высокой долей вероятности не только найти нужный ингибитор или активатор, но и получить его синтетическое производное.

При этом возникает ряд проблем: как варьировать гидрофобностью и зарядами полученных олигомеров и как защитить их от действия лизирующих факторов в организме - пептидаз и нуклеаз. Кроме того, эти соединения не должны быть большого размера, так как проникнуть внутрь клеток и в ткани они не смогут. Одним из методов модификации структуры белков для их лучшей кристаллизации и изучения X-гау структуры является ацилирование концевых аминокислот - лизинов и гистидинов разнообразными агентами, среди которых самыми простыми являются ангидриды карбоновых (и поликарбоновых) кислот - уксусной, янтарной, малеиновой.

Наибольшее количество изученных с помощью рентгеноструктурного метода анализа кристаллов белков представляют собой полностью сукцинизированные производные.

Сукцинирование приводит к изменению заряда молекулы через замену позитивно заряженных аминокислот на негативно заряженные карбоксильные группы. Если сукцинирование заменить на ацетилирование, то будет меняться не только заряд молекул, но и уровень гидрофобности молекул.

Таблица 1. Структуры модифицированных аминокислот-мономеров, которые образуются при ацилировании янтарным ангидридом белков

№ п/п	Структура мономера	Название мономера
1	2	3
1		Сукцинамид агринина
2		Сукцинамид лизина
3		Эфир треонина и янтарной кислоты
4		Эфир тирозина и янтарной кислоты

При этом конформационные изменения всех аминокислот при ацилировании янтарным и уксусными ангидридами довольно хорошо изучены, что исключает большую долю фактора случайности при проектировании лекарственного препарата. Подходы к моделированию агонистов (активаторов) и антагонистов в данном случае разнятся кардинальным образом с учетом полиморфности рецепторов равно как и проектирование вакцин.

Известен классический метод поиска и получения лекарственных препаратов, который получил название классический эмпирический скрининг. Данный метод характеризуется определенной последовательностью процедур: сперва синтезируют несколько тысяч химических соединений, подтверждают структуру синтезированных соединений, проводят предварительный отсев неактивных соединений на скрининговых моделях *in vitro*. Наиболее активные соединения затем изучают на животных моделях. Недостатком этого метода является низкий процентный выход активных соединений: из нескольких десятков тысяч синтезированных веществ 1-2 доходят до клинических исследований. При этом до производства может не дойти ни одно из веществ. Кроме ресурсоемкости такого подхода часто невозможно предсказать побочные эффекты синтезированных соединений и высокоактивные, на первый взгляд, вещества оказываются высоко токсичными. На поиск одного высоко активного соединения могут уйти десятки лет. Все синтезированные по такому принципу соединения являются ксенобиотиками, то есть они ранее не встречались в природе. Соответственно, такие вещества наносят неоценимый вред экологии при экскреции из организма человека после лечения, т.к. в природе не существует механизмов обезвреживания этих веществ. Кроме того, такие вещества относятся к группе статических жестких структур, что обуславливает быструю адаптацию организмов к препарату: адаптация микроорганизмов к антибиотикам, вирусов к антивирусным препаратам и вакцинам, опухолей к противоопухолевым препаратам и др. [4]. По этой же причине средняя эффективность ксенобиотиков немного выше плацебо и редко превышает 50%.

Известен другой подход к дизайну и синтезу лекарственных препаратов, который получил условное название драг-дизайн. Прототипом изобретения является способ по [5]. Он включает ряд процедур: сперва определяют мишень для действия препарата -как правило это либо белок либо гликопротеидный рецептор. Выделяют данный белок, устанавливают его структуру с помощью рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии. Определяют активный центр белка или точку взаимодействия с потенциальными препаратами [5]. С помощью методов молекулярного моделирования на компьютере изучают взаимодействие между мишенью и несколькими моделями препарата, отбирают модели препаратов с наибольшим соответствием (аффинностью) по структуре и заряду молекулы к активному центру белка (рецептора)-мишени. Аналогичные процедуры проводят и в других модификациях метода драг-дизайна [6, 7]. Затем проводят синтез и другие процедуры, как и в методе классического скрининга. Преимуществами в сравнении со скринингом является значительно менее ресурсоемкий процесс драг-дизайна: синте-

зируется всего несколько десятков веществ со значительно более высокой вероятностью получить реально эффективный препарат (иногда до 20% спроектированных и синтезированных соединений обладают заявленной активностью). При этом многие недостатки классического скрининга применимы и к драг-дизайну: высокая токсичность большинства продуктов и опасность их попадания в окружающую среду, быстрая адаптация организма к препарату, неэффективность препарата у 50% популяции в связи с консервативным характером структуры. Но новой проблемой, возникшей при использовании методов драг-дизайна является несоответствие свойств смоделированного и синтезированного вещества: высокоактивное вещество с максимальной степенью афинности оказывается на практике неактивным и токсичным.

Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставлена цель разработать новый способ проектирования и синтеза новых высоко эффективных (при эффективности в популяции близкой к 100%) быстро метаболизируемых в организме и деградируемых в природе лекарственных препаратов с минимальными затратами на разработку.

Поставленная цель реализована путем применения нового способа молекулярного дизайна и синтеза лечебных и профилактических лекарственных препаратов, включающем определение мишени для действия препарата, с помощью методов молекулярного компьютерного моделирования, изучения взаимодействия между мишенью и несколькими моделями препаратов - лигандами и синтез наиболее активного препарата, отличающегося тем, что в качестве лиганда используют тот же биополимер-мишень, который нарезают на олигомерные фрагменты или используют в неизменном виде, но модифицируют путем замены заряда на противоположный с образованием супрамолекулярного ансамбля, который используют как активный препарат. В качестве биополимера-мишени может использоваться, например, белок или смесь белков, молоко, яичный белок, ДНК, РНК, смесь ДНК, РНК, белков и их сочетания. Биополимер -мишень предлагается нарезать на фрагменты с помощью протеаз, или нуклеаз или синтетических нуклеаз. Полученные фрагменты биополимера-мишени предлагается модифицировать путем замены заряда на противоположный ацилированием ангидридами дикарбоновых кислот или алкилированием галогенкарбоновыми кислотами. Также в качестве лиганда предлагается использовать тот же биополимер-мишень, но в нативном неизменном виде, который предлагается модифицировать путем частичной замены заряда молекулы на противоположный знак с образованием супрамолекулярных ансамблей биополимеров.

Авторами использован супрамолекулярный ансамбль из олигомеров - продуктов гидролиза биополимеров, но с измененными на противоположные зарядами молекул, а также с частично измененными зарядами цельных биополимеров. Ансамбль - термин из супрамолекулярной химии. Объекты супрамолекулярной химии - супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т.е. имеющих геометрическое и химическое соответствие фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке [8, 9]. Так как эта смесь олигомерных биополимеров способна к адаптации и самоорганизации, но не обладает способностью к размножению как живой организм, она была названа квазживой системой.

Это позволяет исключить все процедуры молекулярного моделирования, связанные с проектированием ксенобиотиков, исключить токсические свойства последних, сократить время получения препарата до нескольких месяцев и значительно повысить эффективность полученных средств в человеческой популяции.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Структура α -2b-интерферона по данным рентгенструктурного анализа (публичная база данных on line национальной медицинской библиотеки США, международный шифр 1RH2), где нами выделены остатки аминокислот лизина, гистидина и аргинина.

Фиг. 2. Индекс антипролиферативной активности производных интерферона по высокочувствительной культуре CaOv.

Фиг. 3. Индекс антипролиферативной активности производных интерферона по малочувствительной культуре SW-480.

Фиг. 4А. Специфичная гибридизация ацилированных РНК только со своими предшественниками

Фиг. 4В - та же реакция с ДНК-плазидами.

Фиг. 5. Замена водородной связи на ионную при образовании гибридов между антиканом и мишенями.

Фиг. 6. Саркома. Окраска гематоксилин-эозин.

Фиг. 7. Электронная микрофотография вируса гриппа (с сайта www.news.wisc.edu/newsphotos/influenza.html). Ярко выраженный полиморфизм вируса: вирионы разного размера и формы.

Фиг. 8. Зависимость между титром индуцируемых специфических антител и степенью ацилирования корпускулярного синегнойного антигена.

Фиг. 9. Зависимость между титром индуцируемых специфических антител и степенью ацилирования растворимого высокомолекулярного синегнойного антигена.

Примеры конкретного выполнения

Пример 1. Синтез квазиживой структуры на основе частично модифицированного альфа-интерферона

Средняя эффективность альфа-интерферона в лечении, например, цервикального рака достаточно низкая (около 15%). Причиной этого является неспособность интерферона взаимодействовать с клеточными рецепторами. В некоторых случаях этот рецептор блокируют внешние факторы, в других случаях этот рецептор отличается от идеального в связи с раковой трансформацией клетки и ее мутационными изменениями. Для проявления эффектов у интерферона необходимо заменить одно индивидуальное соединение - альфа-интерферон (Ключ) на смесь очень похожих, но отличающихся молекул модифицированных интерферонов (связки отмычек). Получить набор "отмычек" из сотен молекул интерферонов можно путем частичной комбинаторной модификации структуры альфа-интерферона.

Например, нативный альфа-интерферон содержит 8 остатков лизина и три остатка гистидина, которые могут быть ацилированы с помощью янтарного ангидрида (фиг. 1). Для того чтобы получить "набор отмычек", нужно получить смесь максимального количества различных производных интерферона в одном объеме с незначительно измененным активным центром (область соединения с рецептором): от целиком ацилированного до монозамещенного в различной комбинации молекул друг с другом. Это требует определения степени замещения, которая обеспечила бы максимальную высокую активность препарата при максимальном количестве различных молекул в одном объеме субстанции.

Для альфа-интерферона - это трехзамещенное полиморфное производное. Мы специально использовали термин " полиморфный " в связи с фактом, что фактически в растворе содержится $3! \cdot 8!$ производных интерферона, сюда же входят целиком замещенные и монозамещенные производные интерферона и смесь производных со степенью замещения замены больше и меньше трех. Поэтому частичная прецизионная модификация позволяет получить "набор отмычек" к одному полиморфному рецептору, что значительно увеличивает фармакологическую активность препарата в популяции людей.

Как минимум одно из $3! \cdot 8!$ производных будут соответствовать данному рецептору и лекарственное средство будет обладать биологической активностью в данном конкретном случае. Кроме того, появление таких лекарственных средств может препятствовать микроорганизмам и вирусам адаптироваться к лекарственному средству. Например, это, возможно, имеет место в случае модификации бактериоцинов. Такая модификация может значительно расширить спектр действия бактериоцинов и увеличить их протеолитическую стабильность; это позволит получать новые пептидные антибиотики на их основе в промышленном масштабе.

Для синтеза квазиживой системы на основе α -2b-интерферона использовали интерферон (ИФН) (Biolek, Kharkiv, Ukraine) и янтарный и аконитовый ангидрид (Aldrich-Sigma, USA). Ацилирование ИФН осуществляли в слабощелочном буферном растворе путем добавления измельченного ангидрида в количествах, представленных в табл. 1 и 2. Окончание реакции контролировали по изменению молекулярного веса ИФН методом пульс-гель-электрофореза в ПААГ, используя в качестве контроля неацилированный ИФН. Гели проявляли методом серебрения [10]. Модифицированные ИФН очищали хроматографией на Sephadex G-25, а затем хранили при -20°C . Их антипролиферативную активность изучали на клетках линии CaOv, высоко чувствительной к интерферонам *in vitro*, и SW-480, клеточной линии с низкой чувствительностью к действию ИФН *in vitro*. Клетки культивировали в среде DMEM (Aldrich-Sigma, USA) с добавлением 10% FCS and 50 мкг/мл гентамицина (Aldrich-Sigma, USA) с плотностью 10^4 клеток/см² в 96-луночных планшетах (Bayer) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Чувствительность клеточных культур к ИФН оценивали по уровню торможения прироста клеток после обработки квазиживыми производными ИФН.

Индекс антипролиферативной активности (ИАА) ИФН (%) был рассчитан как соотношение количества клеток в экспериментальной лунке к количеству клеток в контроле помноженное на 100. Неспецифический цитотоксический эффект определяли путем окраски клеток трипановым синим инкубированием после 24-часовой инкубации клеток с производными ИФН. Ни одно из производных ИФН не проявило неспецифической цитотоксичности. Оригинальный титр немодифицированного ИФН был 2.5×10^3 МЕ/мл; ИФН и его квазиживые производные были добавлены к среде в дозе 1000 ЕД/мл (0,05 мкл/лунку); ацилированные интерфероны были добавлены согласно расчету концентрации белка. Клетки инкубировали с интерферонами 72 ч. Количество клеток определяли с применением инвертного микроскопа (Leica, Germany) каждые 12 ч.

Интерферон представляет собой низкомолекулярный белок с молекулярной массой 18 кДа. Он содержит 8 остатков лизина и 3 остатка гистидина [11, 12], которые способны ацилироваться янтарным (ЯА) и аконитовым ангидридом (АА). На фиг. 1 представлена структура α -2b-интерферона.

Как видно из фиг. 1, свободные лизины находятся на поверхности молекулы и выполняют буферную функцию. Рецепторная зона (нижняя часть молекулы ИФН на фиг. 1) содержит только по одному лизину и гистидину. При этом аминокислоты этих аминокислот были недоступны для ацилирования ангидридами. Остатки гистидина из регуляторной области молекулы ИФН (верхняя часть молекулы на фиг. 1), наоборот, принимают участие в образовании внутренней структуры интерферона. Таким образом, гистидиновые аминокислоты не будут принимать участие в реакции ацилирования в связи со стерическими препятствиями.

ческими препятствиями. Но могут быть ацилированы и гидроксильные группы таких аминокислот, как треонин и серин, а также сульфгидрильные аминокислоты. Для предотвращения протекания реакции по гидрооксильным и сульфгидрильным группам реакцию ацилирования проводили в слабощелочной среде. При pH, большем 7,5, наблюдается депротонирование свободных лизиновых аминогрупп, а лизины являются значительно более сильными нуклеофилами, чем гидроксильные и сульфогруппы. Соответственно, при точном расчете соотношения ИФН и ангидридов можно получить по 7 производных, в молекулах которых будут ацилированы от одного до 7 лизиновых аминогрупп. В табл. 1-2 приведено соотношение реагентов и результаты анализа синтезированных сукцинилированных и аконитилированных производных α -2b-интерферона.

Таблица 1. Результаты анализа сукцинилированных производных α -2b-интерферона (СИФ)

Молярное соотношение ИФН к ангидриду	Rf	Mr, Da	
		Рассчитано	Установлено
1:1	0,490±0,005	18359±10	18360±50
1:2	0,462±0,005	18458±10	18460±50
1:3	0,460±0,005	18557±10	18560±50
1:4	0,456±0,005	18656±10	18655±50
1:5	0,442±0,005	18755±10	18750±50
1:6	0,440±0,005	18854±10	18855±50
1:7	0,436±0,005	18953±10	18920±50
0 (Контроль ИФН)	0,492±0,005	18260±10	18250±50

Таблица 2. Результаты анализа аконитилированных производных α -2b-интерферона (АИФ)

Молярное соотношение ИФН к ангидриду	Rf	Mr, Da	
		Рассчитано	Установлено
1:1	0,489±0,005	18280 ±10	18300 ±50
1:2	0,463±0,005	18457 ±10	18470 ±50
1:3	0,461±0,005	18555 ±10	18580 ±50
1:4	0,455±0,005	18634 ±10	18640 ±50
1:5	0,443±0,005	18754 ±10	18760 ±50
1:6	0,441±0,005	18857 ±10	18860 ±50
1:7	0,438±0,005	18956 ±10	18980 ±50
0 (Контроль ИФН)	0,492±0,005	18260 ±10	18250 ±50

Как видно из таблицы, рассчитанные и установленные массы фактически не отличаются, что свидетельствует о завершении реакции ацилирования как при синтезе сукцинилированных, так и в группе аконитилированных производных ИФН.

Изменение антипролиферативного эффекта ИФН может меняться как в зависимости от степени его афинности к клеточной мембране, так и от изменения самой структуры молекулы и соответственно проявления новых ранее неизвестных эффектов (ведь фосфорилирование белков иногда увеличивает их биологическую активность в несколько десятков раз). Для исследований брали две культуры человеческих опухолевых клеток - высокочувствительную к действию интерферона и малочувствительную. На фиг. 2-3 представлены результаты изучения антипролиферативной активности аконитилированных и сукцинилированных производных ИФН.

Как видно из фиг. 2, ацилирование одного лизина в структуре ИФН янтарным ангидридом приводит к увеличению индекса антипролиферативной активности (ИАА) в 3,2 раза. У производных с 2-5 замещенными лизинами ИАА продолжает снижаться и фактически антипролиферативная активность у 6-замещенного СИФ не проявляется вовсе. У аконитилированных производных ИФН наблюдается несколько иная картина: ацилирование одного лизина в ИФН аконитовым ангидридом приводит к увеличению антипролиферативного эффекта в 3,6 раза при том, что уже у производного с четырьмя замещенными лизинами подобной активности не наблюдается.

Для малочувствительной к интерферону культуры SW-480 наблюдается иная картина (фиг. 3): немодифицированный интерферон не обладает антипролиферативной активностью, тогда как максимальная активность проявляется у производного с тремя замещенными лизинами. При этом у трехзамещенного АИФ активность была на 16% больше, чем у СИФ. У СИФ наблюдалось плато стабильности от 3 до 5 замещенных лизинов, тогда как у АИФ титр начинал падать уже при замещении следующего лизина.

Таким образом, наблюдается определенная закономерность, характерная скорее не для культур ин-

гибируемых клеток, а для групп производных ИФН: наибольшую антипролиферативную активность проявляли аконитилированные производные ИФН с 1 замещенным лизином и тремя - для культуры SW-480. Сукцинилизированные производные хотя и были менее активны, но стабильно высокая активность сохранялась у многих производных вплоть до 6-7 замещенных. При переходе на нечувствительную к интерферону культуру наблюдался сдвиг максимальной активности в сторону более кислых производных. Интересным является также тот факт, что деление клеток полностью ингибировалось уже через 12 ч после внесения в культуру ацилированных интерферонов (в течение следующих 60 ч количество клеток не увеличивается). В некоторых живых клетках наблюдались характерные для апоптоза цитологические изменения: фрагментация ядра клетки и кариолизис. При этом наблюдалось торможение роста более 95% клеток уже через 12 ч инкубации, тогда как контрольный ИФН в той же концентрации фактически был неэффективен.

Таким образом, можно сделать ряд выводов:

1. Ацилирование одного лизина α -2b-интерферона цис-аконитовым и янтарным ангидридом приводило к увеличению антипролиферативной активности интерферона в 3-3,5 раза на чувствительной культуре цитоденокарциномы яичника человека CaOv.
2. На малочувствительной к нативному интерферону культуре рака прямой кишки SW-480 наибольшую антипролиферативную активность проявили производные с тремя замещенными лизинами как среди аконитилированных, так и среди сукцинилизированных производных.
3. Ацилирование интерферона приводит к расширению спектра его антипролиферативной активности на нечувствительные культуры раковых клеток.
4. Максимальный антипролиферативный эффект ацилированных интерферонов как на чувствительной, так и на нечувствительной культурах раковых клеток проявлялся уже через 12 ч при 95% индексе антипролиферативной активности (для 1- и 3-замещенных производных соответственно).
5. Ацилированные янтарным и аконитовым ангидридом интерфероны являются новым классом перспективных антипролиферативных средств и требуют более интенсивного и расширенного изучения на моделях *in vivo*.

Таблица 1. Результаты анализа сукцинилизированных производных α -2b-интерферона (СИФ)

Мольное соотношение ИФН к ангидриду	Rf	Mr, Da	
		Рассчитано	Установлено
1:1	0,490±0,005	18359±10	18360±50
1:2	0,462±0,005	18458±10	18460±50
1:3	0,460±0,005	18557±10	18560±50
1:4	0,456±0,005	18656±10	18655±50
1:5	0,442±0,005	18755±10	18750±50
1:6	0,440±0,005	18854±10	18855±50
1:7	0,436±0,005	18953±10	18920±50
0 (Контроль ИФН)	0,492±0,005	18260±10	18250±50

Таблица 2. Результаты анализа аконитилированных производных α -2b-интерферона (АИФ)

Мольное соотношение ИФН к ангидриду	Rf	Mr, Da	
		Рассчитано	Установлено
1:1	0,489±0,005	18280 ±10	18300 ±50
1:2	0,463±0,005	18457 ±10	18470 ±50
1:3	0,461±0,005	18555 ±10	18580 ±50
1:4	0,455±0,005	18634 ±10	18640 ±50
1:5	0,443±0,005	18754 ±10	18760 ±50
1:6	0,441±0,005	18857 ±10	18860 ±50
1:7	0,438±0,005	18956 ±10	18980 ±50
0 (Контроль ИФН)	0,492±0,005	18260 ±10	18250 ±50

Пример 2. Дизайн самоорганизующейся квазизивой системы с противораковыми свойствами на основе модифицированных олигонуклеотидов с названием "Антикан"

Среди существующих новых направлений в лечении онкологических заболеваний существует ряд весьма перспективных подходов. Одним из таких подходов можно считать разработку препаратов для генной терапии рака [13]. В данном подходе основным действующим началом являются полинуклеотиды. Генную терапию можно разделить на две большие группы: средства для инактивации генов [14] и средства для внесения генного материала внутрь клетки [15]. Инактиваторы генов еще называют ап-

antisense полинуклеотиды [16]. Многочисленные исследования, которые проводятся в данном направлении, реально эффективных *in vivo* препаратов не выявили. Это связано с целым рядом проблем: синтезированные ДНК (РНК) быстро разрушались нуклеазами крови [17], не проникали внутрь клеток, разрушались системами репарации генома [18]. Иногда *in vitro* наблюдалась кратковременная блокада экспрессии белков-мишеней, накопление в гепатоцитах [19]. Существуют разные подходы к проектированию antisense олигонуклеотидов, но принцип их взаимодействия с мишенями остается один: образование водородных связей между комплементарными нуклеотидами при увеличении степени устойчивости к нуклеазам [20]. В одних случаях разработчики защищали от действия нуклеаз 5'-конец олигонуклеотида, в других - модифицировали 3'-конец [21, 22]. Разработчики компании AVI-biopharma заменили дезоксирибозильные остатки на фрагменты морфолина с целью создать устойчивые к действию нуклеаз фрагменты ДНК (РНК) [23, 24]. При этом принцип инактивации генов путем их комплементарного взаимодействия с antisense-нуклеотидами остался прежним - образование водородных связей. Именно эта водородная связь и является основной причиной неэффективности существующих препаратов на основе antisense - ДНК (РНК). Ферменты типа геликаз [25] очень быстро и легко раскручивают гибридизованную с геном-мишенью antisense - ДНК и активность гена снова восстанавливается. В наших ранних исследованиях при изучении ацилированных полинуклеотидов был выявлен новый феномен: ацилированные по экзоциклическим аминогруппам полинуклеотиды селективно гибридизуются только со своими неацилированными предшественниками. Плазмида pUC18 гибридизовалась только со своим ацилированным производным, а плазмида pBR322 гибридизовалась соответственно только с ацилированной pBR322 (фиг. 4). При этом образовывались нерастворимые, неплавкие конъюгаты. Именно свойство неплавкости отличало классические двухспиральные ДНК от полученных гибридов. Они не плавилась ни при какой температуре и не растворялись ни в чем, кроме концентрированных щелочей. Данное свойство синтезированных ацил-ДНК мы объясняем изменением самого принципа образования связи между цепями ДНК: с водородной на ионную и смешанную.

Такая связь (фиг. 5) абсолютно не предусмотрена природными механизмами репарации. Таким образом, клеточные геликазы и нуклеазы будут неэффективными при образовании гибридов между такими ацил-ДНК (РНК) и их неацилированными предшественниками. Кроме полинуклеотидов, нами была показана зависимость заряд-активность и в ряду других ацилированных биополимеров: белков, полисахаридов, полинуклеотидов, таннидов, бактериофагов, иммуноглобулинов. На основе этих исследований разработан и внедрен новый ветеринарный противовирусный препарат [26]. Нами было установлено, что определенная прецизионная модификация структуры биополимера способна или увеличить его биологическую активность, полностью изменить свойства или привести к образованию самоорганизующихся структур. Обнаруженные нами закономерности были положены в основу принципа получения микроРНК с ацилированными экзоциклическими аминогруппами. Данный препарат получил название антикан.

МикроРНК - это новый класс некодирующих РНК длиной 18-25 нуклеотидов, которые негативно регулируют посттрансляционную экспрессию генов. Механизм действия этих малых фрагментов РНК основан на взаимодействии (гибридизации) микроРНК с матричной РНК прямо в полирибосомальном комплексе. Такая гибридизация приводит к остановке синтеза конкретного белка. Роль микроРНК в онкогенезе и перспективы использования микроРНК в терапии рака представлены в обзоре [27]. Но микроРНК не способны самопроизвольно проникать через клеточную мембрану. В настоящий момент ведутся исследования по созданию разнообразных транспортных систем для доставки микроРНК в клетки-мишени. Наиболее перспективными носителями являются липосомы, полимерные наночастицы, самоорганизующиеся полимеры [29].

Известна способность многих аденокарцином захватывать из межклеточного матрикса посредством пиноцитоза олигонуклеотиды и наночастицы [28, 29]. При этом здоровые клетки не способны захватывать малые олигонуклеотиды и липосомы [30]. Это обеспечивает селективность накопления антикана в раковых клетках и отсутствие токсичности у препарата. Для получения антикана нами была использована суммарная дрожжевая РНК, фрагментированная панкреатической нуклеазой до фрагментов размерами от 2 н до 15 н с. Затем экзоциклические аминогруппы этих олигонуклеотидов были модифицированы с заменой заряда. Для усиления накопления антикана в опухоли, он был включен в моноламелярные фосфотидилхолиновые липосомы. Селективное накопление в раковой клетке антикана приводит к его гибридизации с комплементарными мишенями в матричной РНК раковой клетки и к постепенной остановке синтеза белка. Антикан блокирует не только интронные, но экзонные области в матричной РНК, что приводит практически к мгновенной остановке синтеза белка. Действие антикана основано на индукции апоптоза через остановку синтеза белка. Антикан фактически не влияет на здоровые клетки, блокирует синтез всех клеточных белков, исключает адаптацию раковой опухоли к терапии и селекцию устойчивых клеток.

Молекулярный механизм действия препарата не изучался.

Антикан кроме противораковой активности *in vitro* также проявил высокую активность *in vivo* на моделях бензидиновой саркомы у крыс, асцитной аденокарциномы Эрлиха у мышей.

Пример 3. Получение субстанции Антикана

Микробная биомасса содержит до 11% нуклеиновых кислот и может служить сырьем для получения микробной РНК, на основе которой возможно получение дериватов, представляющих собой смесь олигонуклеотидов. Объектом исследований данного этапа работы явилась РНК, выделенная из биомассы дрожжей р. *Saccharomyces cerevisiae*.

Выделение суммарной РНК из пекарских дрожжей

Размораживали при комнатной температуре 4 кг прессованных дрожжей, измельчали их и суспендировали в 8 л кипящей воды, содержащей 300 г ДДС-На. Суспензию кипятили 40 мин при непрерывном перемешивании, затем разливали по стальным центрифужным стаканам, помещали их немедленно в лед и охлаждали до 5°C (-15 мин), после чего центрифугировали на центрифуге 6K15 производства Германии (17000 g, 10 мин, 4°C). Осадок и часть желеобразной интерфазы отбрасывали, а перешедшую в надосадочную жидкость РНК очищали. Для этого к надосадочной жидкости, полученной на предыдущей стадии, добавляли NaCl до конечной концентрации 3 М. После растворения соли суспензию выдерживали в течение 1 ч для формирования осадка, который далее отделяли центрифугированием при 17000 g, в течение 10 мин. Осадок промывали двумя порциями по 8 л 3 М NaCl, суспендировали в 2 л этанола и оставляли на ночь. На следующий день суспензию центрифугировали при 17000 g, в течение 10 мин. Осадок растворяли в дистиллированной воде до концентрации РНК 450 D260, ед./мл (~1,6 л). Раствор осветляли центрифугированием при тех же условиях, после чего из надосадочной жидкости РНК осаждали, добавляя NaCl до конечной концентрации 0,15 М и равный объем этанола (~2 л). Сформировавшийся осадок отделяли от супернатанта центрифугированием (17000 g, 10 мин), промывали 1 л этанола и высушивали в вакуум - эксикаторе над CaCl. Все операции проводили при 0-4°C.

Выделение высокополимерной РНК из пекарских дрожжей

День 1 - экстракция РНК. Растворяли 7,5 г ДДС-На в 300 мл воды в термостойком стеклянном стакане на 1 л, доводили раствор до кипения и высыпали в него в течение 5 мин 30 г сухих дрожжей так, чтобы температура суспензии не опускалась ниже 98°C. Полученную суспензию кипятили 40 мин при непрерывном перемешивании и по мере упаривания добавляли в нее кипящую воду до 300 мл. По окончании экстракции суспензию охлаждали до ~ 60°C, добавляли в нее свежевскипяченную воду до 450 мл, перемешивали, переносили в мерный цилиндр на 500 мл и ставили отстаиваться при 20°C на 22 ч. День 2 - высаливание РНК и промывка высолненной РНК 3 М NaCl. Отстоявшийся супернатант (280 мл) переносили в мерный стеклянный стакан объемом 500 мл, добавляли в него 81 г NaCl и воду до 450 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на 6 ч. Через 6 ч образовавшуюся интерфазу (250 мл) отбирали, а в разделившуюся на 2 фракции (часть осела, часть всплыла) высолненную РНК добавляли 3 М NaCl до 450 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на ночь. День 3 - промывка высолненной РНК 3 М NaCl. Интерфазу (300 мл) отбирали, а к высолненной РНК добавляли 3 М NaCl до 450 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на 5 ч. Через 5 ч интерфазу (280 мл) отбирали, а к высолненной РНК добавляли 3 М NaCl до 450 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на 3 ч. Через 3 ч интерфазу (250 мл) отбирали, а к высолненной РНК добавляли 3 М NaCl до 450 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на ночь. День 4 - промывка высолненной РНК спиртом. Верхнего слоя почти нет. Осадок занимает объем ~ 100 мл. Супернатант удаляли, а к осадку добавляли этанол до 300 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 18°C на 5 ч. Через 5 ч супернатант сливали, а к осадку (140 мл) добавляли свежую порцию этанола до 320 мл, перемешивали и ставили отстаиваться при 19°C на 40 мин, после чего супернатант сливали, а к осадку (120 мл) добавляли 120 мл свежего этанола, перемешивали и через 30 мин отстоя супернатант сливали. К осадку (110 мл) добавляли 110 мл свежего этанола, перемешивали и через 30 мин отстоя супернатант сливали, а суспензию РНК выливали тонким слоем в плоскую ванночку и сушили на воздухе при комнатной температуре до отсутствия запаха спирта. Чистую высокополимерную РНК из высушенного полуфабриката выделяли экстракцией водой в целлофановом диализном мешке.

Ферментативный гидролиз полученной суммы РНК

В качестве нуклеазы была выбрана панкреатическая рибонуклеаза (РНК-аза) с активностью 14000 ед./мг в количестве 0,4% от массы РНК. Гидролиз РНК проводили в течение 4 часов. Гидролизат высушивали в распылительной сушилке.

Химическая модификация олигонуклеотидов гидролизата

Получали 3,5% водный раствор гидролизата, добавляли янтарный ангидрид в количестве от 10 до 45% от сухой массы гидролизата, перемешивали на холоду до полного растворения ангидрида. Полученный раствор стерилизовали 120 минут текучим паром. Готовый раствор далее исследовали на предмет наличия противораковых свойств.

Пример 4. Изучение острой токсичности Антикана

Было поставлено 36 серий опытов на 220 животных.

Среднесмертельную дозу антикана устанавливали на 3 видах животных: беспородных белых мышах массой 20-22 г, белых крысах массой 190-200 г и морских свинках массой 300-400 г обоего пола при внутривенном введении. С целью сравнения широты терапевтического действия антикана и препарата сравнения - таксотера - устанавливали среднесмертельную дозу таксотера также при внутривенном вве-

дении.

Расчет среднесмертельной дозы проводили по методу Б.М. Штабского с использованием уравнения

$$X = \frac{Y - a}{a} \quad (1)$$

Where Y- % of effect

$$a = \frac{Y_1 - Y_2}{X_1 - X_2}$$

$$b = \frac{\sum Y - a \sum X}{n}$$

где

X1 и X2 - значение двух крайних из трех исследованных доз, которые имеют эффект в менее или более 50% животных, третья доза является промежуточной;

Y1 и Y2 - проценты летальности, которые отвечают дозам X1 и X2;

$\sum Y$ - сумма трех исследованных доз;

количество доз, которые использовались при расчетах, равно 3.

При подстановке к формуле (1) значения Y, которое составляет 50,84,16 процентов смертности, рассчитывали LD₅₀, LD₈₄ и LD₁₆. Потом находили d-среднюю ошибку среднесмертельной дозы благодаря использованию формулы Миллера-Тейнтера

$$m = \frac{2 \delta}{\sqrt{2N}}$$

2- LD₈₄- LD₁₆;

N - общее количество животных в группах, в которых погибло или выжило хоть одно животное, и устанавливали доверительные интервалы.

Мышам антикан вводили внутривенно медленно (перед использованием готовили векторные липосомы: к сухому лиофилизированному порошку Антикан, который брали в соответствующих дозах, добавляли раствор 0,9% натрия хлорида) в дозах 1000, 1500, 2000, 2500, 3500 мкг/кг массы животного. Анализ результатов свидетельствует о том, что среднесмертельная доза препарата для этого вида животных составляет 2780 мкг/кг.

Исследование антикана на крысах в дозах 1000, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 мкг/кг дало возможность рассчитать среднесмертельную дозу для этого вида животных - 2590 мкг/кг. Среднесмертельная доза антикана для морских свинок составляет 2420 мкг/кг массы.

При внутривенном пути использования таксотера крысам LD 50 = 120 мкг/кг массы тела.

Таблица 4. Сравнительные характеристики Антикана и Таксотера

Препарат	ED ₅₀ , мкг/кг	LD 50, мкг/кг у крыс при внутрисосудистом введении	Терапевтический индекс	Относительный терапевтический индекс
Антикан	5	2590	518	151,5
Таксотер	35	120	3,42	1

Анализ полученных данных, которые показаны в табл. 4, приводит к выводу о том, что антикан в липосомах менее токсичен, чем препарат таксотер, и превосходит препарат сравнения по эффективной дозе. Терапевтический индекс, который характеризует широту терапевтического действия, у антикана в 151,5 раз больше, чем у препарата сравнения благодаря липосомальной форме. Для экстраполяции токсичности антикана на человека рассчитали коэффициент видовой чувствительности (КВЧ) по формуле

$$КВЧ = \frac{LD_{50} \text{ (для крыс)}}{LD_{50} \text{ (для мышей)}} = \frac{2590}{2780} = 0,9$$

Таким образом, антикан не имеет видовой чувствительности, или она медленно выражена.

Определение цитотоксичности антикана проводили в культуре клеток HeLa-2. Для этого к среде 199 добавляли разное количество антикана от 2 до 12 мкг/мл среды (см. табл. 2). Для контроля использовали культуру без антикана. Наблюдение за культурами клеток вели в течение 5 суток с ежедневным просмотром. Минимальной активной дозой (МАД) антикана считали такое его минимальное количество, которое вызывало дегенерацию 90-95% клеток (табл. 5).

Таблица 5. Сравнительная характеристика чувствительности культуры опухолевых клеток HeLa-2 относительно антикану

-----		Активность антикана при разной кислотности среды 199 ¹	
		культуры клеток.	
Препарат	МАД в мкг/мл	Контроль	Опыт
Анти-кан	10	0	++++
Таксотер	10	0	++
Липосомы пус- тые	-----	0	0

¹ Цитопатическое действие;

++++ дегенерация 100% клеток

0 отсутствие дегенерации.

При установлении минимальной концентрации антикана, которая тормозит рост клеток, проведено сопоставление количества клеток, которые выжили, и концентрацией антикана в растворе.

Таблица 6. Влияние антикана на клетки HeLa

Доза, мкг/мл	Количество клеток до инкубации, млн	Количество живых клеток после инкубации, млн, ±1000		Количество живых клеток после инкубации, %	
		анти-кан	таксотер	анти-кан	таксотер
2	150000±1000	72000	150000	48	100
4	153000±1000	21400	150000	14	98
6	150000±1200	9800	145000	6,5	97
8	152000±1000	0	135000	0	89
10	158000±1000	0	130000	0	82
12	162000±1000	0	153000	0	94

Как видно из табл. 6, эффективная доза антикана находится в пределах между 8-12 мкг/мл раствора.

Антикан приводил к 95% дегенерации опухолевых клеток. Для подтверждения противоопухолевого действия *in vivo* антикан был исследован на моделях бензидиновой кожной саркомы и перевивной асцитной аденокарциномы у барбадосских мышей. На 5 мышях с аденокарциномой также исследовали распределение липосом антикана по организму животных благодаря флуоресцентному зонду, растворенному в фосфолипидной оболочке.

Пример 5. Изучение противораковой активности антикана на модели бензидиновой саркомы

Перед применением к силикагелю добавляли 7 мл раствору 2% бензидина в 0,9% натрия хлориде до образования опалесцирующей суспензии (1 г силикагеля на 5 мл физраствора). Двадцати пяти мышам барбадосской линии массой 18-20 г обоего пола, которых удерживали на рационе вивария через каждые 3 суток подкожно вводили возле шеи иммобилизованные на силикагеле бензидин и форболацетат. Через две недели у 18 животных появились опухоли разных размеров в виде небольшого бугра на шее около силикагелевой гранулы. Каждой группе животных вводили парентерально соответствующее соединение в дозе 100 мкг/кг массы два раза на сутки два недели, начиная с 16 дня после введения канцерогена.

Таблица 7. Сравнение противоопухолевого действия антикана против соединения-аналога (таксотера) и липина

Название препарата	Масса животных (г)	
	До лечения	После лечения
Таксотер	28 ± 1,2	23 ± 1,1 (2 мыши погибли)
Антикан	25 ± 1,7	15 ± 1,5
Липосомы пустые	26 ± 2,1	34 ± 1,3 (5 мышей погибло)

Примечание: n=7, p>0,05 по сравнению с контролем и предыдущими данными.

Как видно из табл. 7, антикан уменьшал массу подопытных животных на 10 г, при этом у контрольных животных масса тела продолжала расти, и некоторые из них умерли. После анатомического исследования силикагелевой грануломы было установлено, что животные, которых лечили антиканом, не имели признаков злокачественного превращения грануломы в саркому.

Сроки гибели животных приведены в табл. 8.

Таблица 8. Сроки гибели животных с бензидиновой саркомой кожи

Название препарата	сроки гибели животных, суток.
Таксотер	28 ± 1,1
Антикан	49 ± 1,2
Липосомы пустые	17 ± 0,9

Примечание: n=10, p>0,05 по сравнению с контролем и предыдущими данными.

Таким образом, антикан увеличивает вдвое против таксотера продолжительность жизни животных.

Пример 6. Исследование противоопухолевого действия Антикана на асцитной аденокарциноме Эрлиха

Противоопухолевое действие композиций исследовали на моделях асцитной карциномы Эрлиха у молодых мышей барбадосской линии обоего пола массой 15-17 г (68 штук), которых выдерживали на рационе вивария.

45 мышам инокулировали от мыши с аденокарциномой инсулиновым шприцем 0,1 мл асцитной жидкости в область печени. Через 7 суток у 42 мышей появились признаки опухоли (увеличилась масса тела и размеры живота), 2 мыши погибли на второй день, 1 мышь не подала признаки опухоли.

Десяти мышам вводили антикан в липосомальном виде (см. табл. 4). Еще 10 мышам вводили субстанцию антикана, еще десяти - 0,9% раствор натрия хлорида с липином.

Таблица 9. Количественные биологические и статистические характеристики при исследовании противоопухолевой активности антикана

Средство	Липосомы	Срок гибели животных после первой инъекции. Среднее значение Суток.	
		Опытные животные	Контрольные животные
антикан	+	37,4 ± 0,88	3,2 ± 0,44
-/-	-	18 ± 3,2	3,1 ± 0,48
Таксотер	+	15 ± 0,5	3 ± 0,5
-/-	-	14 ± 0,12	3 ± 0,6

Примечание: n=10, p>0,05 в сравнении с контролем и предыдущими данными.

Антикан вводили тем мышам, в которых брали кровь. Мыши с аденокарциномой Эрлиха после перевивки опухоли и лечения жили 18 суток при использовании субстанции антикана, что в 6 раз дольше, чем в контроле, и 37 суток при использовании антикана в липосомах, что в 12 раз дольше, чем в контроле. При достоверности больше 99,5% можно утверждать о значительном усилении противораковой активности липосомального антикана против контроля - таксотера. После анатомирования животных признаков опухолей и метастазов в органах животных найдено не было.

Пример 7. Исследование распределения липосом Антикана по организму животных

Для исследования распределения липосом по органам животных использовали биологически инертный 5,6-бензокумарин, который имеет липофильный характер и флуоресцентные свойства. Последний растворяли в спирте (0,5 М раствор), и добавляли к раствору Фосфолипиду при создании липосом в количестве 0,01 мл раствора кумарину на 10 мл раствора фосфолипида. Наибольшая флуоресценция наблюдалась в печени и в асцитной жидкости, которая подтверждает тропность липосом к опухоли. В контроле липосомы распределялись в селезенку, печень и лимфоузлы.

Распределение липосом изучали в организме мышей-опухоленосителей (5 животных) и здоровых

крыс (5 животных) после инфузионного введения антикана. Антикан вводили в дозе 100 мкг/кг. Через 5 ч животных забивали и исследовали интенсивность флуоресценции на флуориметре HP-F-40M.

Таблица 10. Накопление антикана в зависимости от скорости введения

Животные	Орган	Форма введения анти- кана	Флуоресценция, % *
здоровые крысы		медленное инфузионное введение	
- -	плазма		23,4±0,1
- -	печень		26,1±0,1
- -	легкие		0,5±0,1
- -	селезенка		6,2±0,1
- -	почки		32,2±0,1
- -	кровь		25,6±0,1
	быстрое в/в введения		
- -	плазма		25,3±0,1
- -	печень		56,2±0,1
- -	легкие		0,5±0,1
- -	селезенка		0,3±0,1
- -	почки		0,2±0,1
- -	кровь		5,5±0,1
мыши с адено- карциномой		медленное инфузионное введение	
- -	плазма		15,2±0,1

Животные	Орган	Форма введения анти- кана	Флуоресценция, % *
- -	печень		12,2±0,1
- -	легкие		0,5±0,1
- -	селезенка		8,2±0,1
- -	нирки		52,2±0,1
- -	асцитная жидкость		45,6±0,1
	быстрое в/в введение		
- -	плазма		23,2±0,1
- -	печень		60,2±0,1
- -	легкие		0,2±0,1
- -	селезенка		0,5±0,1
- -	почки		0,3±0,1
- -	асцитная жидкость		5,2±0,1

* относительная флуоресценция - процент флуоресценции относительно интенсивности флуоресценции введенного раствора антикана.

Как видно из таблицы, при наличии опухоли, накопление антикана идет там, но в зависимости от срока инфузии. Чем быстрее вводится антикан, тем больше его накапливается в печени. Поэтому рациональным является введение антикана в виде медленных инфузий.

Пример 8. Способ получения самоорганизующейся системы на основе суммы модифицированных пептидов с противовирусными свойствами (препарат Альбувир)

500 мг сухого обезжиренного молока всыпают в 50 мл дистиллированной воды, доводят pH до 8,0 1 М раствором гидроксида натрия. К полученному раствору белка добавляют иммобилизованный на

капроновых гранулах трипсин в соотношении фермент:субстрат 1:100 на 0,1 М фосфатном буферном растворе, оставляют на 4 ч при постоянном перемешивании. Затем иммобилизованный фермент удаляют фильтрацией. К полученной надосадочной жидкости смеси пептидов добавляют 750 мг твердого янтарного ангидрида, перемешивают до растворения ангидрида при комнатной температуре. Смесь пептидов консервируют путем добавления 0,04% от объема препарата бензалкония хлорида. Образованную смесь пептидов лиофилизируют в стерильных флаконах и используют дальше для исследования противовирусного действия и подтверждения механизма действия.

Пример 9. Подтверждение механизма действия препарата Альбувир. Универсальным белком, который транспортирует вирусный полинуклеотид (РНК или ДНК) к ядру клетки, является комплекс α - β -импортинов. Он имеет консервативную сигнальную последовательность аминокислот, которую узнают белки ядерной поры и открывают ее для прохождения комплекса нуклеопротеид-комплекс импортинов. Для подтверждения механизма действия пептида мы использовали ДНК вируса герпеса 1 типа штамм Л-2. ДНК выделяли за известной методикой. Проводили конъюгацию ДНК с частицами коллоидного золота. Полученный комплекс вводили в липосомы. обстоятельно эксперимент был описан с вирусом SV40 мартышки в [31].

Такие липосомы сливались с мембранами клеток из культуры куриных фибробластов. После объединения липосом с мембраной клеток, ДНК вируса с частями золота попадала к цитоплазме. Клеточный аналог Т-антигена переносил коллоидные части с полинуклеотидом к ядерным пор. Если клетки инкубировали с суммой пептидов, которые патентуются, то накопление частей коллоидного золота на ядерных порах не наблюдалось. Все части равномерно распределялись по цитоплазме клеток. В этом случае цитопатического действия вируса не наблюдалось. Таким образом, спроектированный препарат тормозит процесс транспорта вирусной ДНК в клеточное ядро, что и необходимо было подтвердить.

Пример 10. Лечебное действие препарата Альбувир на белых мышях, больных герпетическим энцефалитом.

20 белых мышей BALB-C инфицировало внутрибрюшинно летальной дозой 0,01 мл 7,0 lg ВПГ-1 штамм Л2. Через 2 суток у большинства животных появились признаки энцефалита: нарушение двигательной активности, уменьшения потребления еды, судороги. Лечение начинали на вторые сутки после инфицирования. Сумму модифицированных пептидов использовали перорально в дозе 10 мг/кг веса животных два раза на сутки 5 суток. Как контрольных использовали инфицированных животных, которым давали 0,9% раствор натрия хлорида. Основным критерием эффективности препарата был процент выживших животных в основной группе против контроля на 17 сутки. В опытной группе животных, которым давали препарат, погибли только 2 животного с 25 (8%), тогда как в контрольных группе погибло 18 из 20 животных (90%). Кроме того, на второй день после начала лечения суммой модифицированных пептидов симптомы герпетического энцефалита исчезали. Таким образом, препарат имел четкий терапевтический эффект в лечении герпетического энцефалита у мышей.

Пример 11. Лечебное действие препарата на модели герпетического офтальмогерпеса (ОГ) у кролей

Наиболее удобными для воссоздания ОГ и оценки эффективности химиопрепаратов в этих условиях есть модели герпетического кератита и кератоконъюнктивита у кролей. ВПГ-1 штамм Л2 использовали в виде культуральной жидкости зараженной культуры клеток Нер-2. Максимальное значение инфекционного титра составляло 5,0-5,5 lg LD₅₀/0,03 мл. Использовали кролей обоего пола весом 2,5 кг. Для создания модели ОГ глаза кролям промывали физраствором и обезболивали дикаином, закапывая его в конъюнктиву. ВПГ-1 в инфекционной дозе (6-7 капель) наносили на скарифицированную роговицу. Интенсивность клинической симптоматики ОГ кроликов оценивали по 4-балльной системе для каждого симптома, которые потом грустили. Оценку эффективности химиопрепаратов проводили с учетом разницы в выразительности симптоматики (СИВС в баллах) в опыте и контроле (инфицированные животные, которым вводили 0,9% раствор натрия хлорида и группа животных, которым вводили препарат из прототипа). СИВС в контроле (нелеченные животные) принимали за 100%. Препарат вводили через 48 ч после инфицирования в дозе 0,01 г препарата на кроля 3 раза на сутки перорально в растворе на дистиллированной воде. Аналогично, но парентеральный (в ушную вену) вводили ацилваний альбумин из прототипа и 0,9% раствор натрия хлорида. В 90% кролей выраженность лишь конъюнктивиту составляла 3-4 баллы. Длительность симптоматики - в среднем составляла 21 день. Максимального развития она достигала на 4-8 день (СИВС уровни 8-10 баллам) Критериями оценки лечебного эффекта препаратов были: а) уменьшение выразительности клинической симптоматики; б) сокращение длительности заболевания; в) предотвращение летального менингоэнцефалита (выживаемость). Данные об эффективности исследуемых препаратов представленные в табл. 11.

Таблица 11. Эффект лечения больных кролей препаратом Альбувир

Название препарата	Количество животных	Длительность заболевания (дни)	СИВС (баллы)
Альбувир	7	7,5± 2,5*	36,3 ± 4,8

Название препарата	Количество животных	Длительность заболевания (дни)	СИВС (баллы)
Парентеральный ацилированный альбумин	7	25,5 ± 2,5*	100± 2
Не леченный контроль	5	26 ± 2,5**	109,2± 2,2

* P < 0,001

** P < 0,01

Как видно из таблицы, применение Альбувира приводило к снижению в 2 раза проявлений болезни в сравнении с инфицированными, но не лечеными животными. При его применении наблюдалось не только снижения интенсивности симптоматики, но и длительности заболевания в 3 раза при 100% выживаемости. СИВС препарата был вдвое меньшим за СИВС контроля. Тогда как ацилированный альбумин из прототипа, использованный в той же дозе парентеральный (внутривенно в ушную вену) не влиял и сроки жизни и длительность заболевания.

Пример 12. Исследование противогриппозных свойств вещества, которое патентуется, на модели *in ovo*

В опытах использовали штамм вируса Гриппа-А-Гонконг-95 H3N2. Всего в опыте использовали 60 штук 10-11 суточных куриных эмбрионов. Использовали по 20 эмбрионов на каждый препарат: 0,1 мл культуральной жидкости с титром вируса 7 lg вводило в амниотическую полость эмбрионов, инкубировали 1 сутки при 35°C. До амниотической полости 20 инфицированных эмбрионов вводило по 0,3 мл (из пересчета 0,003 г препарата на кг веса) подопытного средства, которое патентуется, еще 20 эмбрионам вводили по 0,3 мл ацилированного альбумина из прототипа и 20 эмбрионам вводили по 0,3 мл 0,9% раствора натрия хлорида. Через 3 сутки эмбрионы анатомировали и ставили реакцию гематоглютинации на скале с 5% суспензией эритроцитов. Как материал в реакции гематоглютинации использовали аллантоисную и амниотическую жидкость. Титр вируса устанавливали за 10-кратным разведением аллантоисной и амниотической жидкости против чистого вируса (табл. 12).

Таблица 12. Противогриппозное действие суммы ацилированных пептидов на модели *in ovo*

Препарат	Титр вирусу * (lg)		
	в аллантоисной жидкости	в амниотической жидкости	В контроле (смесь амниотической и аллантоисной жидкости неинфицированных эмбрионов)
Альбувир	1,5±0,2	0	0
Ацилированный альбумин из прототипа	7,2±1,2	6,5±1,5	0
0,9% раствор натрия хлорида	7,5±1,0	6,5±1,5	0

* при P < 0,001

Как видно из табл. 12, средство, которое патентуется, на 6 lg уменьшает концентрацию вируса гриппа, тогда как ацилированный альбумин не имеет противогриппозных свойств. В амниотической жидкости, куда вводили раствор препарата, вовсе не было обнаружено вируса. Возможно он, попав в цитоплазму клетки, потом разрушается под воздействием протеаз и нуклеазы. Это свидетельствует о другом механизме действия гидролизата ацилированного альбумина против чистого ацилированного альбумина. Последний как ингибитор адгезии вируса способен только защищать клетки от инфицирования вирусами, а не блокировали репликацию вируса в инфицированных клетках.

Пример 13. Проектирование вакцины для профилактики псевдомонозов на основе квазживых самоорганизующихся систем

В современном мире вакцинация является одним из основных методов предотвращения эпидемий. Существуют две основных группы инфекционных заболеваний: группа инфекций, контролируемых вакцинами (применение которых предотвращает эпидемию) - входящих в схемы обязательной вакцинации и вторая группа инфекции, вакцинопрофилактика которых малоэффективна или неэффективна вовсе [32]. К первой группе инфекций относятся консервативные микроорганизмы и вирусы, антигенный состав которых неизменен и вакцина индуцирует высокие уровни защитных антител в крови. Это такие инфекции, как дифтерия, коклюш, корь, краснуха и др. Ко второй группе инфекционных заболеваний, при которых вакцинация неэффективна, относят грипп, герпесвирусные инфекции, ВИЧ/СПИД и некоторые другие [33, 34, 35]. Неэффективность вакцин в профилактике этой группы инфекций обусловлена целым рядом причин. Например, вирус гриппа представляет собой полиморфный (вирусная частица не имеет четкой структуры и формы) вирус с фрагментированным изменчивым геномом (фиг. 7).

Вирус гриппа очень изменчив и способен к персистенции (пожизненному нахождению в организме человека) [36]. В организме человека и животных (в т.ч. птицы [37]) этот вирус размножается в несколько стадий - в острую продуктивную фазу инфицированная клетка выделяет вирусные частицы, способные заражать соседние клетки [38]. В фазу персистенции (латентную фазу) этот вирус "переживает" внутри клетки, при этом утрачивая часть фрагментированного генома или захватывая куски человеческой РНК в цитоплазме [39]. Согласно статистике, антигенный состав вируса гриппа в месяц меняется на 5% [40]. Соответственно, применение стандартных подходов к разработке антигриппозных вакцин является бесперспективным. Даже применение рекомбинантных белков и новых видов генных вакцин не избавляет такие препараты от быстрого устаревания. Наличие в одной ампуле нескольких консервативных белков (например, гемагглютининов и нейраминидаз для вируса гриппа) не позволяет защитить организм от вирусной агрессии через индукцию выработки специфических антител. Эти антитела будут иметь совершенно не ту моноклональную специфичность, которая будет необходима при таком уровне мутации вирусов. Изменение подхода к проектированию вакцин должно сопровождаться включением в состав вакцин таких антигенов, которые еще не появились в результате мутации вирусов [41]. Так называемое предиктивное включение антигенов возможно двумя путями: классическим с применением методов эпидемиологического прогнозирования антигенного дрейфа и путем частичной модификации антигенов с получением неограниченного количества комбинаций антигена в одной ампуле антигена. Первое направление себя оправдало лишь частично: ни в одном случае прогноз антигенного дрейфа не совпал с реальными мутационными изменениями нейраминидазы и гемагглютинина гриппа [42, 43]. Если использовать технологию частичной модификации белкового компонента вакцинного антигена, например, нейраминидазы 1 типа, в процессе приготовления вакцины, то в одной дозе вакцины вместо одного белка с одним антигенным профилем появится более миллиона белков с одной первичной и вторичной структурой, но разными сайтами замещения и разным антигенным профилем.

Индукцированные этим белком антитела будут перекрывать все возможные комбинации сайтов присоединения. Соответственно, количество индуцированных моноклонов будет на порядок выше, хотя белок останется тот же самый. При этом любой "будущий" эпитоп структуры нейраминидазы будет перекрыт уже синтезированными антителами.

Такой подход позволяет: резко сократить количество антигена для вакцинации, защищать организм от вирусов с фрагментированным геномом и высокоизменчивых микроорганизмов небольшим количеством антител, но со значительно большим спектром моноклональной специфичности. Грубо говоря, вакцина будет содержать набор даже тех антигенов нейраминидазы, которые еще не существуют. При этом в крови вакцинированных ранее животных уже будет находиться необходимый пулл антител к "будущему" штамму вируса. Применение такой вакцины позволит успешно защищать организм от высокоизменчивых персистирующих, а также низкоиммуногенных вирусов и микроорганизмов.

Синегнойную палочку культивировали на твердой питательной среде (МПБ с добавлением 1% глюкозы). Через трое суток поверхность питательной среды сплошную была покрыта синегнойной палочкой. Из поверхности среды в чашке Петри делали смыв 0,9% раствором натрия хлорида, а полученную суспензию трехкратно отмывали и центрифугировали. После повторного суспендирования суспензию микроорганизмов прогревали в термостате в течение 140 мин при 80°C, а затем опять засеивали на ПМА с целью контроля инаktivации. По количеству микробных тел полученная суспензия отвечала 10 млрд. клеток/мл; затем 0,1 мл суспензии разводили в 100 раз 0,9% раствором натрия хлорида и устанавливали концентрацию поверхностных белков с помощью Биуретового метода и в реакции комплексообразования с бромфеноловым голубым методом Флореса [3]. В пересчете на белок проводили реакцию ацилирования раствором янтарного ангидрида, как было показано в примере 1 [6]. Получили 8 образцов с разными степенями ацилирования: 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%. Превышение 15% полностью лишает иммуногенности сукцинированные белки, потому производные со степенями модификации, большими за 15% не считали целесообразным получать и использовать в дальнейшем. Корпускулярный антиген с разной степенью ацилирования дальше использовали для установления его иммуногенности. Другую часть антигена центрифугировали 40 мин при 3 тыс. об/мин. Осадок отбрасывали, а надосадочную жид-

кость пропускали через колонку из сефадекса G-75. Первую, самую тяжелую фракцию собирали и использовали дальше для установления концентрации белка и степени химической модификации. Полученный антиген представлял собой однородную фракцию (одно полимерное вещество) и имел молекулярную массу 1,5 МДа и заряд -186000. Получали растворимый гликопротеидный антиген с такими степенями ацилирования: 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%, 15%.

Общеизвестно, что при использовании фильтрации геля распределение белков проходит по размерам белковой глобулы. Гель-фильтрацию [7] проводили на колонках, заполненных гелем сефадекс G-75. Общий объем столбика геля определяли V_t . В течение элюирования крупные молекулы, которые не проникают в гранулы геля, двигаются с большой скоростью совместно с межгранульным растворителем и появляются в виде узкой полосы. Объем элюента, который соответствует появлению этой зоны, определяли как V_0 (свободный объем). Менее крупные молекулы проходили колонку медленно, проникали в гранулы геля, а выход их из колонки был весьма долговременным. В связи с тем, что степень диффузии в гранулы геля зависит от размера молекул, вещества выделяются из колонки в порядке уменьшения их молекулярной массы. Молекулярная масса M опытного протеида устанавливалась путем сравнения объема элюирования V_e с аналогичным параметром белков-маркеров.

Для выделения антигена использовали колонку диаметром 25 мм и длиной 1000 мм Гель сефадекс G-75 и G-25 предварительно готовили таким образом: к буферному раствору (ОДМ ТРИС -HCl и 0,1 М NaCl, pH 8,0) медленно добавляли гранулы геля, удерживали в термостате 72 ч при $t = 37^\circ\text{C}$. Потом гель диаэрировали (постепенно и осторожно перемешивали в избыточном количестве буферного раствора для удаления газовых пузырей) на шейкере на протяжении часа. На дно колонки клали фильтровальную бумагу. К колонке медленно добавляли немного буферного раствора, потом по стенке переносили небольшое количество (5 г) суспензии набухнувших гранул геля сефадекс G-25. После формирования столбика геля, через колонку пропускали не менее двух объемов рабочего буферного раствора. Затем наносили микропипеткой 100 мкл раствора образца. Постоянную скорость элюирования задавали благодаря установлению над колонкой капельницы с буферным раствором и роликом регулировали скорости элюирования. Элюат собирали в пробирки по 0,5 мл и анализировали на спектрофотометре СФ-56 при длине волны 280 нм за методикой [4].

Антисинегнойная сыворотка для диагностических целей с титром специфических антисинегнойных антител (1:1000) была получена по стандартной схеме иммунизации мышей, по схеме [1] термически инактивированной корпускулярной синегнойной вакциной с концентрацией частиц 10 млрд/мл, которую вводили на 3; 5 и 7 сутки в дозе 0,2 мл внутримышечно. Для получения контрольной сыворотки использовали 20 мышей.

Для иммунизации животных в опыт взяты ацилированные образцы как корпускулярного антигена (по 10 животных в группе на один образец, 8 групп), так и ацилированного растворимого антигена (8 образцов по 10 животных на образец). Первой группе животных вводили 8 образцов антигена (по 10 животных на каждый образец перорально по 0,2 мл) по схеме Пастера (в 1; 3 и 7 дни), второй группе - по схеме профессора Бабица Е.М. (через день по 0,2 мл перорально в течение 15 дней) [1]. Уровень антител устанавливали двумя методами: реакцией гемагглютинации и методом флуоресцирующих антител. По 3 животных из каждой группы оставляли живыми до 15 суток, убивали эфиром и получали сыворотку, где также устанавливали уровень специфических антител вышеприведенными методами. Для реализации указанного готовили тест-систему для реакции прямой гемагглютинации, которую проводили в 96-луночных круглодонных иммунологических планшетах, куда добавляли по 0,02 мл 0,1% суспензии термостатированных эритроцитов барана и по 0,02 мл суспензии термоинактивированных клеток синегнойной палочки в концентрации 10 млрд. клеток /мл. Уровень антител устанавливали последовательными десятикратными (но двукратными) разведениями сывороток крови мышей, которые добавляли в количестве 0,02 мл к лункам планшетов. Наличие агглютинатов свидетельствовало об образовании иммунных комплексов. Как контрольные использовали нормальный человеческий иммуноглобулин (титр антисинегнойных антител составлял от 0 к (1:10) согласно АНД) и сыворотку крови невакцинированных мышей (титр от 0 до 1:10).

Первым образцом была модель корпускулярной вакцины на основе инактивированной пастеризацией синегнойной палочки. Ацилировали только поверхностные антигены. Степень ацилирования колебалась от 1 до 15% с шагом в 2%. Всего исследовано по 8 образцов модифицированного растворимого антигена и по 8 корпускулярного антигена. Результаты исследования иммуногенности полученных образцов иллюстрируют данные фиг. 8.

Как видно из фиг. 8, на 15 сутки после инъекционного введения нативного вакцинного препарата средний титр антител у вакцинированных животных составлял (1:640). При этом пероральное использование нативного корпускулярного антигена не вызывало индукцию синтеза специфических антител.

Химически модифицированный антиген со степенью модификации в 1% от концентрации в нем белка индуцировал синтез такого же уровня антител, как и нативный антиген (1:640). Модификация поверхностных антигенов на 3% приводила к индукции антител на уровне (1:320) для перорального варианта и на уровне (1:2560) для инъекционного варианта.

Для производных антигенов с другими степенями ацилирования при их пероральном применении

не наблюдалось индукции синтеза специфических антисинегнойных антител. При этом инъекционный вариант был эффективным даже к производному с 15% степенью ацилирования. Так, производное со степенью ацилирования 5% индуцировало синтез антител на уровне (1:1280), производное с 7% степенью ацилирования антигена - на уровне (1: 320), производное из 9% - на уровне (1:40), другие варианты (с 11 и 15% степенью модификации) - на уровне (1:20).

Таким образом, наиболее эффективным оказалось производное со степенью ацилирования 3%, которое индуцировало синтез специфических антител, как при использовании классической схемы вакцинации Л. Пастера при инъекционном применении, так и при использовании схемы вакцинации Е. Бабица при пероральном применении вакцины.

На следующем фиг. 9 приведенная зависимость между уровнем индуцируемых специфических антител и степенью ацилирования растворимого модифицированного антигена (первая фракция).

Этот вариант антигена-кандидата представляет собой химическую монокомпонентную вакцину на основе гликопротеидного модифицированного высокомолекулярного антигена с массой 1,5 мДа и зарядом молекулы 186000. Именно наибольшая молекулярная масса или первая фракция, которая выходит из колонки при разделе фракций, оказывалась наиболее иммуногенной. При исследовании структуры полученного антигена была подтверждена корреляция между изменением заряда и массы антигена, который подтверждает состояние завершения химической реакции модификации структуры антигена. Следует обратить внимание на интересный факт, обнаруженный во время инъекционной вакцинации мышей: введение немодифицированной вакцины (на седьмой день - третий раз) вызывало у части животных проявления аллергической реакции в виде тремора, падения двигательной активности и отказа от употребления пищи на протяжении суток.

При этом введение всех модифицированных вариантов вакцины не вызывало побочных явлений у животных. Ацилированный вариант растворимого антигена со степенью ацилирования 1% (фиг. 9), как и неацилированный антиген вызывал индукцию синтеза одинакового количества антител в титре (1:1280). Пероральное применение растворимого антигена и антигена со степенью ацилирования в 1% не приводило к существенной индукции синтеза специфических антисинегнойных антител. Производное растворимого антигена со степенью ацилирования 3% активировало синтез антител на уровне (1:5120) в инъекционном варианте и (1:1280) при пероральном использовании. Ацилированное на 5% производное индуцировало синтез специфических антител на уровне (1:640) для пероральной формы применения и на уровне (1:2560) - для инъекционной формы. Производное со степенью ацилирования 7% индуцировало синтез специфических антител на уровне (1:640) - для пероральной формы и (1:1280) для инъекционной. Для растворимого антигена со степенью ацилирования 11% соответствующий уровень индуцируемых специфических антител составлял (1:320) для оральной формы вакцины и (1:640) - для инъекционной формы. Уровни синтеза антител у вакцинированных животных при пероральном и инъекционном применении лишь при использовании вакцинного препарата с уровнем ацилирования 13% и равнялись 1:40, а при степени ацилирования в 15% иммуногенной была только инъекционная форма вакцины - кандидата, она индуцировала синтез антител на уровне (1:20).

Таким образом, характерным отличием растворимого высокомолекулярного антигену оказалась индукция синтеза антител не только производным со степенью ацилирования 3%, но производными со степенями ацилирования 5%, 7%, 11%, 13% при пероральном применении по вышеотмеченной схеме Бабица Е.М. В четыре раза большим был титр антител при инъекционном применении самого эффективного производного со степенью ацилирования 3%, чем при его же пероральном применении. В сравнении с корпускулярным модифицированным антигеном, ацилированное на 3% производное растворимого антигену было вдвое эффективнее по иммуногенности при инъекционном и в четыре раза более эффективным - при пероральном его применении. Невзирая на значительно большую антигенную нагрузку, чем при инъекционном использовании, пероральное применение частично ацилированный растворимый антиген оказался эффективным и индуцировал уровень антител, который в перспективе в состоянии долго-временно (год и больше) защищать организм от синегнойной инфекции. Использование пероральной вакцинации, несомненно, является перспективным направлением усовершенствования иммунобиологических средств.

Среди полученных вариантов ацилированных антигенов выбрано сукцинизированный на 3% от массы белка растворимый гликопротеидный антиген, который при пероральном применении на 15 сутки вызывал индукцию синтеза специфических антител в титре (1:1280) и к титра (1:5120), - при его же инъекционном применении.

Промышленная применимость

Изобретение относится к медицине и фармации и может быть использовано для проектирования и создания новых, более дешевых и более эффективных лекарственных препаратов, представляющих собой динамические самоадаптирующиеся и самоорганизующиеся системы. Полученные таким образом препараты являются полностью экологически безопасными, биodeградируемыми и полностью метаболизируемыми как в организме пациентов, так и в окружающей среде, а технологии их получения относятся к группе полностью безотходных, себестоимость проектирования и производства в сотни раз меньше существующих аналогов на существующем оборудовании фармацевтических предприятий и лаборато-

рий.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

1. Lundström K. Structural genomics and drug discovery. *J Cell Mol Med.* 2007 Mar-Apr;11(2):224-38.
2. Ma B, Nussinov R. Trp/Met/Phe hot spots in protein-protein interactions: potential targets in drug design. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(10):1007-13. Links
3. Keskin O, Gursoy A, Ma B, Nussinov R. Towards drugs targeting multiple proteins in a systems biology approach. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(10):945-53.
- 4 Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Susova O.Y., Glazunova V.A., Luzikov Y.N., Sinkovich Y.B., Buyanov V.N., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. Naphthoindole-based analogues of tryptophan and tryptamine: synthesis and cytotoxic properties.// *Bioorg.Med.Chem.* 2007. - V.15. - P.2651-2659.
- 5 Patent N: US 5,495,423 General strategy for vaccine and drug design
- 6 Patent N: US 6,226,603 BI Method for the prediction of binding targets and the design of ligands
- 7 Patent N: US 5,854,992 System and method for structure-based drug design that includes accurate prediction of binding free energy
- 8 <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/79240>
- 9 Jean-Marie Lehn. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives.*- Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1995.-P. 103 (Chapter 7)
10. Butcher LA, Tomkins JK. A comparison of silver staining methods for detecting proteins in ultrathin polyacrylamide gels on support film after isoelectric focusing. *Anal Biochem* 1985; 1: 384-8.
- 11 Melen K, Ronni T, Broni B, Krug RM, von Bonsdorff CH, Julkunen I. Interferon-induced Mx proteins form oligomers and contain a putative leucine zipper. *J Biol Chem.* 1992;267, 25898-907.
- 12 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Structure?1RH2
- 13 Galasso M, Elena Sana M, Volinia S. Non-coding RNAs: a key to future personalized molecular therapy?// *Genome Med.* 2010 Feb 18;2(2):12.
- 14 Jung J, Solanki A, Memoli KA, Kamei K, Kim H, Drahl MA, Williams LJ, Tseng HR, Lee K. Selective inhibition of human brain tumor cells through multifunctional quantum-dot-based siRNA delivery// *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010;49(1):103-7.
- 15 Li X, Liu Y, Wen Z, Li C, Lu H, Tian M, Jin K, Sun L, Gao P, Yang E, Xu X, Kan S, Wang Z, Wang Y, Jin N. Potent anti-tumor effects of a dual specific oncolytic adenovirus expressing apoptin in vitro and in vivo// *Mol Cancer.* 2010 Jan 20;9:10.
- 16 Emmrich S, Wang W, John K, Li W, Pützer BM. Antisense gapmers selectively suppress individual oncogenic p73 splice isoforms and inhibit tumor growth in vivo// *Mol Cancer.* 2009 Aug 11;8:61.
- 17 Fisher M, Abramov M, Van Aerschot A, Rozenski J, Dixit V, Juliano RL, Herdewijn P. Biological effects of hexitol and alditol-modified siRNAs targeting B-Raf// *Eur J Pharmacol.* 2009 Mar 15;606(1-3):38-44
- 18 Czauderna F, Fechtner M, Dames S, Aygün H, Klippel A, Pronk GJ, Giese K, Kaufmann J. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells// *Nucleic Acids Res.* 2003 Jun 1;31(11):2705-16.
- 19 Crooke RM, Graham MJ, Martin MJ, Lemonidis KM, Wyrzykiewicz T, Cummins LL. Metabolism of antisense oligonucleotides in rat liver homogenates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jan;292(1):140-9.
- 20 Monia BP, Johnston JF, Sasnor H, Cummins LL. Nuclease resistance and antisense activity of modified oligonucleotides targeted to Ha-ras. *J Biol Chem.* 1996 Jun 14;271(24):14533-40.
- 21 Giles RV, Spiller DG, Green JA, Clark RE, Tidd DM. Optimization of antisense oligodeoxynucleotide structure for targeting bcr-abl mRNA. *Blood.* 1995 Jul 15;86(2):744-54.
- 22 Xodo L, Alunni-Fabbroni M, Manzini G, Quadrifoglio F. Pyrimidine phosphorothioate oligonucleotides form triple-stranded helices and promote transcription inhibition. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 25;22(16):3322-30.
- 23 Sazani P, Weller DL, Shrewsbury SB. Safety pharmacology and genotoxicity evaluation of AVI-4658. *Int J Toxicol.* 2010 Mar-Apr;29(2):143-56.
- 24 Mourich DV, Jendrzewski JL, Marshall NB, Hinrichs DJ, Iversen PL, Brand RM. Antisense targeting of cFLIP sensitizes activated T cells to undergo apoptosis and desensitizes responses to contact dermatitis. *J Invest Dermatol.* 2009 Aug;129(8):1945-53.

- 25 Belon CA, Frick DN. Helicase inhibitors as specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C. *Future Virol.* 2009 May 1;4(3):277-293
- 26 <http://www.agrovet.com.ua/index.php?id=25>
- 27 Bagnyukova I T.V., Pogribny I.P. Chekhun V.F. MicroRNAs in normal and cancer cells: A New class of gene expression regulators// *Experimental Oncology.*-2006, N 28.- P. 263-269
- 28 Steinhauser I, Langer K, Strebhardt K, Spänkuch B. Uptake of plasmid-loaded nanoparticles in breast cancer cells and effect on Plk1 expression. *J Drug Target.* 2009 Sep;17(8):627-37.
- 29 Lu JJ, Langer R, Chen J.A novel mechanism is involved in cationic lipid-mediated functional siRNA delivery. *Mol Pharm.* 2009 May-Jun;6(3):763-71.
- 30 Moreira JN, Santos A, Moura V, Pedrosa de Lima MC, Simões S. Non-viral lipid-based nanoparticles for targeted cancer systemic gene silencing. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008 May;8(5):2187-204.
- 31 Lanford R.E., Butel J.S. *Cell.*- 1984.Vol.37., P. 801-813
32. Robbins, J. B., R. Schneerson, and S. C. Szu. 1995. Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious disease by inactivating the inoculum. *J. Infect. Dis.* 171:1378-1398.
33. Del Val, M., H. J. Schlicht, H. Volkmer, M. Messerle, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 1991. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J. Virol.* 65:3641-3646
34. Larsen, D. L., A. Karasin, and C. W. Olsen. 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. *Vaccine* 19:2842-2853
35. Cicin-Sain, L., Brune, W., Bubic, I., Jonjic, S., Koszinowski, U. H. (2003). Vaccination of Mice with Bacteria Carrying a Cloned Herpesvirus Genome Reconstituted In Vivo. *J. Virol.* 77: 8249-8255
36. Levin SA, Dushoff J, Plotkin JB. Evolution and persistence of influenza A and other diseases. *Math Biosci.* 2004 Mar-Apr;188:17-28.
37. Terregino C, Toffan A, Beato MS, De Nardi R, Drago A, Capua I. Conventional H5N9 vaccine suppresses shedding in specific-pathogen-free birds challenged with HPAI H5N1 A/chicken/Yamaguchi/7/2004. *Avian Dis.* 2007 Mar;51(1 Suppl):495-7.
38. Medvedeva MN, Petrov NA, Vasilenko SK, Simanovskaia VK, Golubev DB. The characteristics of the hemagglutinin from persistent variants of the influenza virus A/Victoria/35/72 (H3N2). *Vopr Virusol.* 1990 Sep-Oct;35(5):374-6.
39. Aronsson F, Robertson B, Ljunggren HG, Kristensson K. Invasion and persistence of the neuroadapted influenza virus A/WSN/33 in the mouse olfactory system. *Viral Immunol.* 2003;16(3):415-23.
40. Cox MM. Vaccines in development against avian influenza. *Minerva Med.* 2007 Apr;98(2):145-53.
41. Gronvall GK, Borio LL. Removing barriers to global pandemic influenza vaccination. *Biosecur Bioterror.* 2006;4(2):168-75.
42. Taubenberger JK, Morens DM, Fauci AS. The next influenza pandemic: can it be predicted? *JAMA.* 2007 May 9;297(18):2025-7.
43. Vardavas R, Breban R, Blower S. Can influenza epidemics be prevented by voluntary vaccination? *PLoS Comput Biol.* 2007 May 4;3(5):e85.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ синтеза лечебных и профилактических лекарственных препаратов, представляющих собой лиганды-ингибиторы, механизм действия которых базируется на ингибировании активности определенных биополимеров-мишеней, включающий химическую модификацию структуры биополимера-мишени, отличающийся тем, что в качестве лиганда-ингибитора выбирают тот же биополимер-мишень, нарезают на олигомерные фрагменты и фрагменты модифицируют путем замены заряда на противоположный с образованием супрамолекулярного ансамбля, который используют в качестве указанного препарата "лиганд-ингибитор".

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют белок.

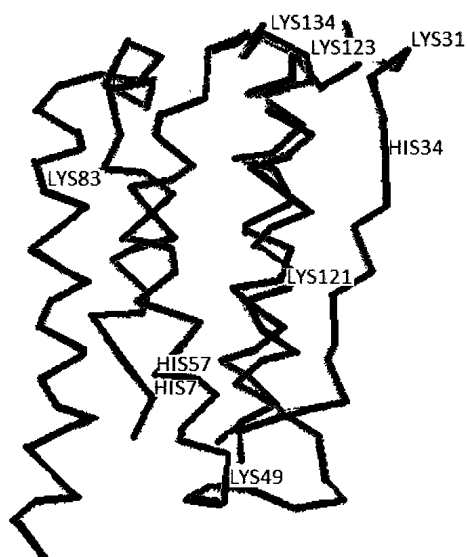
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют смесь белков.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют смесь белков молока.

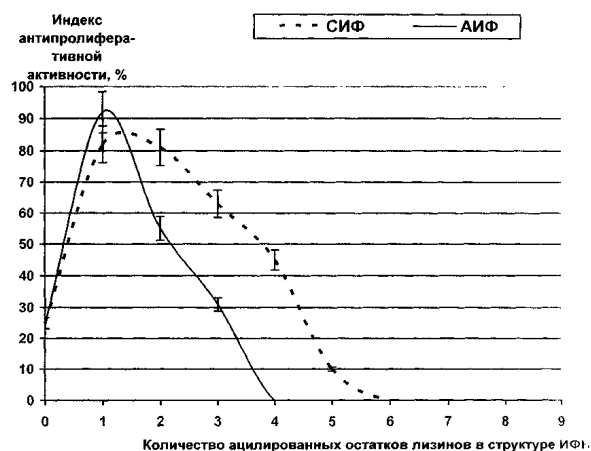
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют яичный белок.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют ДНК.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют РНК.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что как биополимер-мишень используют смесь ДНК, РНК и белков.
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что биополимер-мишень нарезают на фрагменты с помощью протеаз.
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что биополимер-мишень нарезают на фрагменты с помощью нуклеаз.
11. Способ по п.1, отличающийся тем, что биополимер-мишень нарезают на фрагменты с помощью синтетических нуклеаз.
12. Способ по п.1, отличающийся тем, что заменяют заряды олигомерных фрагментов биополимера-мишени на противоположный путем ацилирования.
13. Способ по п.9, отличающийся тем, что в качестве протеазы используют трипсин.
14. Способ по п.1, отличающийся тем, что замену заряда молекул фрагментов на противоположный осуществляют путем ацилирования.
15. Способ по п.1, отличающийся тем, что замену заряда молекул фрагментов на противоположный осуществляют путем алкилирования.
16. Способ по п.1, отличающийся тем, что ацилирование производят ангидридами карбоновых и поликарбоновых кислот.
17. Способ по п.1, отличающийся тем, что ацилирование производят галогенпроизводными карбоновых и поликарбоновых кислот.



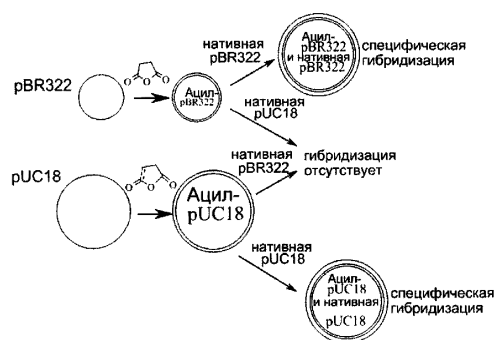
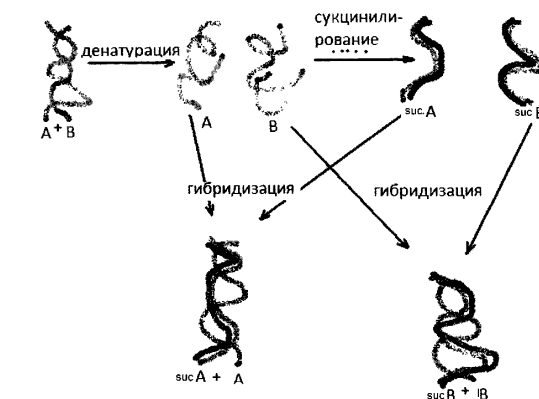
Фиг. 1



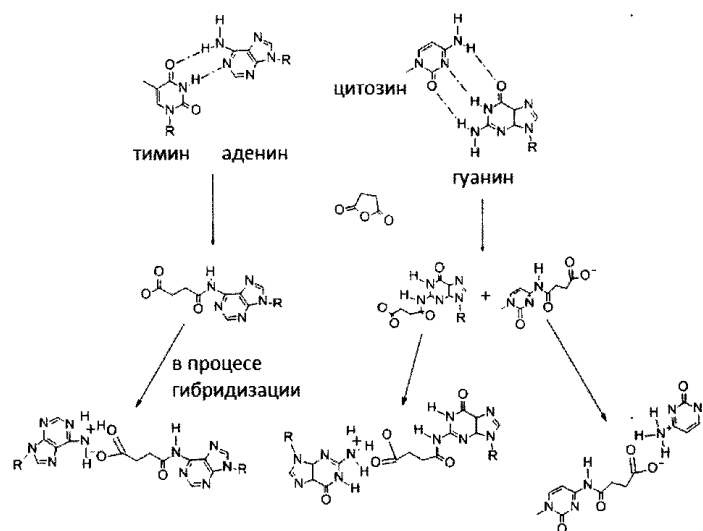
Фиг. 2



Фиг. 3



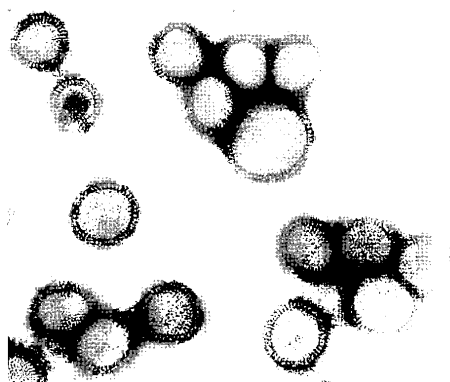
Фиг. 4



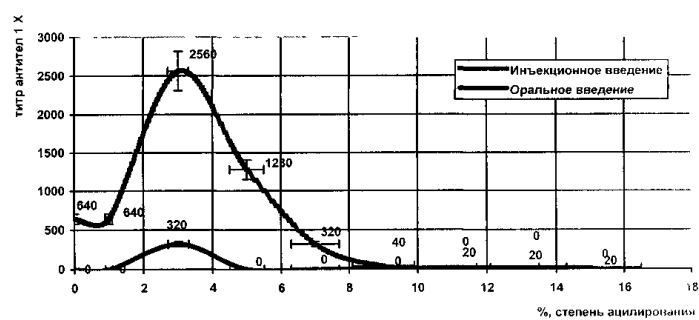
Фиг. 5



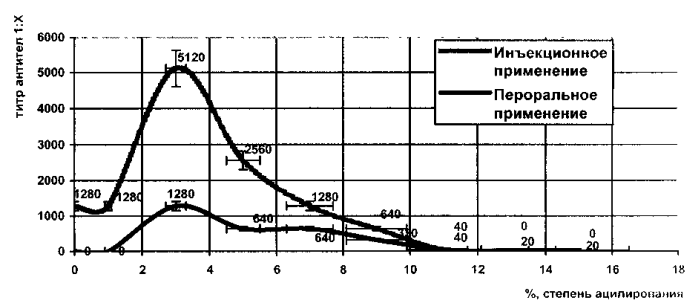
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

