(19) **RU** (11) **2 205 002** (13) **C1**

(51) МПК[7] **A 61 K 31/185, A 61 P 43/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002118468/14 , 11.07.2002

(24) Дата начала действия патента: 11.07.2002

(46) Дата публикации: 27.05.2003

(56) Ссылки: US 5650389, 22.07.1997. RU 2124888 C1, 20.01.1999. RU 2105000 C1, 20.02.1998. WO 94/20123 A1, 15.09.1994. Реферат из АБД Medline: Heller A. The complement system: an old story or target of new therapeutic approaches? Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. 2000, Apr; 35(4):207-13.

(98) Адрес для переписки:
125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10, ГУ "МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского", патентный отдел

(71) Заявитель:
Государственное учреждение "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского"

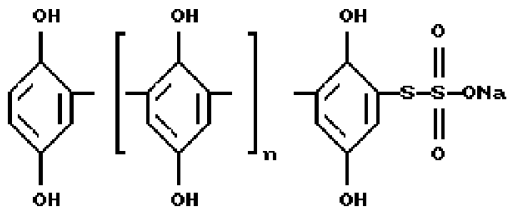
(72) Изобретатель: Шойбонов Б.Б., Онтобоев А.Н., Зинченко А.А., Алёшкин В.А.

(73) Патентообладатель:
Государственное учреждение "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского"

(54) ГИПОКСЕН - ИНГИБИТОР C1Q СУБКОМПОНЕНТА И C1 КОМПОНЕНТА СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Предложено средство для подавления C1q субкомпонента C1 компонента системы комплемента человека, представляющее собой гипоксен (олифен) и имеющее структурную формулу 1. Изобретение может быть использовано в клинике для терапии заболеваний, сопровождающихся патологической активацией классического пути системы комплемента человека, и расширяет арсенал средств указанного назначения. 6 табл.



<формула 1, где n 0–4>

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1

(19) **RU** (11) **2 205 002** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[7] **A 61 K 31/185, A 61 P 43/00**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2002118468/14 , 11.07.2002

(24) Effective date for property rights: 11.07.2002

(46) Date of publication: 27.05.2003

(98) Mail address:
125212, Moskva, ul. Admirala Makarova, 10, GU "MNIIEhM im. G.N. Gabrichevskogo", patentnyj otdel

(71) Applicant:
Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut ehpidemiologii i mikrobiologii im. G.N.Gabrichevskogo"

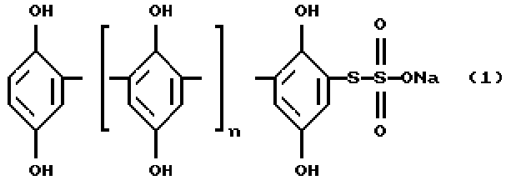
(72) Inventor: Shojbonov B.B., Ontoboev A.N., Zinchenko A.A., Aleshkin V.A.

(73) Proprietor:
Gosudarstvennoe uchrezhdenie "Moskovskij nauchno-issledovatel'skij institut ehpidemiologii i mikrobiologii im. G.N.Gabrichevskogo"

(54) HYPOXEN AS INHIBITOR OF C1Q SUBCOMPONENT AND C1 COMPONENT OF HUMAN COMPLEMENT SYSTEM

(57) Abstract:

FIELD: medicine. SUBSTANCE: it is suggested to apply preparation to suppress C1q subcomponent and C1 component of human complement system as hypoxen (olifen) of the following structural formula:



(1)

, where n = 0-4. The innovation could be applied for treating diseases accompanied by pathological activation of classic way of human complement system. EFFECT: increased number of preparations of mentioned indication. 6 tbl

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к медицинской иммунологии, и может быть использовано в клинике для терапии заболеваний, сопровождающихся патологической активацией классического пути системы комплемента человека.

Система комплемента (СК) состоит из более чем 30 сывороточных и мембранных белков. СК играет важную роль в поддержании нормального клеточного статуса организма. Являясь частью иммунной системы, комплемент участвует в поддержании иммунного статуса организма, в обеспечении иммунного ответа на внешнюю агрессию, в реакциях воспаления, клиренсе иммунных комплексов и т.д. Эти функции СК выполняются различными способами.

1. СК метит патогены и ускоряет поглощение чужеродных клеток фагоцитами или же вызывает лизис определенных патогенов как результат формирования мембраноатакующего комплекса.

2. СК продуцирует локальный воспалительный ответ против патогенов генерированием анафилатоксических пептидов.

3. Предотвращает иммунную преципитацию, способствуя солюбилизации и клиренсу иммунных комплексов из циркуляции.

4. Регулирует уровень иммунного ответа.

5. Способствует элиминированию аутореактивных В-клеток из организма.

СК активируется тремя различными путями: классический путь активируется комплексами антиген-антитело, альтернативный и лектиновый пути активируются микробными поверхностями. Активация СК приводит к генерированию анафилатоксинов (С3а, С4а, С5а) и к формированию мембраноатакующего комплекса (A. Sahu and J.D.Lambris, Immunopharmacology, 2000. V.49. P. 133-148). В данном случае рассматривается активация СК только по классическому пути.

Активация СК по классическому пути осуществляется при специфическом связывании С1, первого компонента комплемента, на иммунных комплексах. В состав комплекса С1 входит субкомпонент C1q, узнающий специфический участок на молекуле иммуноглобулина и имеющий уникальную ультраструктуру, а также по две молекулы зимогенов протеиназ трипсинового типа Clr_2 и Cls_2, превращающихся в ферментативно активные формы после активации на иммунных комплексах. В результате активации Cl значительно возрастает лабильность комплекса (константа ассоциации активированного Cl на порядок меньше константы ассоциации зимогенной формы). С1-ингибитор (Cl-inh) быстро и необратимо связывается с активированными формами Clr и Cls. При диссоциации С1 под действием Cl-inh, Clq остается связанным с комплексом антиген-антитело и проявляет различные рецептор-опосредованные биологические функции, такие как усиление фагоцитоза, продукция супероксидов нейтрофилами, синтез иммуноглобулинов, хемотаксис, клеточная адгезия и регуляция функции тромбоцитов. Все клетки крови связывают Clq, рецепторы этой молекулы выявлены также на эндотелиальных и эпителиальных клетках, фибробластах и клетках гладкой мускулатуры (Cooper N.R. Adv. Immunol., 1985. V. 37. P. 151-216).

Активация СК может также вызывать нежелательные феномены, такие как воспаление, повреждение нормальной ткани, аутоиммунные заболевания. Аутоиммунные состояния связаны с иммунными комплексами, образованными против собственной ткани, которые связаны с биологически активными фрагментами комплемента, генерированными в результате активации СК по классическому пути. Нерегулируемая активация комплемента составляет сущность большого числа патологий, которые затрагивают иммунную, почечную, сердечно-сосудистую, нервную и другие системы организма. К патологическим состояниям, обусловленным острой нерегулируемой активацией СК, относятся инфаркт миокарда, гиперострое отторжение трансплантанта, сепсис, астма, множественная органная дисфункция, травма, геморрагический шок и т.д. При хронической активации наблюдаются следующие заболевания: пароксизмальная ночная гемоглобинурия, гломерулонефрит, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Альцгеймера, отторжение трансплантанта, множественный склероз (Volonakis J. E. , Frank M. M. The Human Complement System in Health and Disease. Marcel Dekker, New York, 1998. P. 455-490).

С этой точки зрения понятен интерес к веществам, влияющим на систему комплемента, особенно на классический путь активации. Актуальной проблемой является поиск и получение в индивидуальном состоянии ингибиторов системы комплемента, которые могут быть полезными при лечении патологических состояний, описанных выше. Ингибиторы могут стать либо основой лекарственных препаратов для фармакологического воздействия на организм, либо моделью для химического синтеза новых ингибиторов.

Наиболее близким техническим решением является применение фактора J в качестве ингибитора компонента С1 (Патент США 5268363, кл. C07K 3/28; A61K 37/02, 27.04.1992). Фактор J является белком с молекулярной массой 18400-22000 Да. Его действие на Clq подобно действию Clq-ингибитора. Однако фактор J действует только на С1 компонент и обладает недостаточно активным действием.

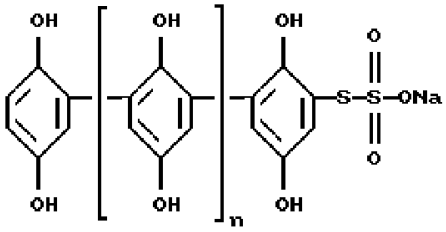
Задачей настоящего изобретения является расширение ассортимента ингибиторов комплемента человека, а также поиск наиболее эффективных ингибиторов, обладающих более широким спектром действия в отношении компонентов комплемента человека.

Поставленная задача достигается за счет использования в качестве ингибитора Clq и С1 компонентов комплемента человека препарата гипоксен.

Гипоксен - торговое название натриевой соли [(2,5-дигидроксифенилен)]-4-тиосульфокислоты. Синтетический препарат гипоксен разрешен к применению в медицине (Патент РФ 2105000 С1, 30.10.96. Регистрационный номер 99/398/2. ВФС 42-3507-99, ВФС 42-3508-99, ВФС 42-3541-99).

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1



где n=0-4.

Известно, что препарат улучшает утилизацию организмом циркулирующего в крови кислорода, повышает устойчивость организма к кислородной недостаточности, блокирует свободнорадикальные реакции, препятствует образованию токсических продуктов перекисного окисления липидов (В.С. Смирнов, М.К. Кузмич. "Гипоксен", С.-Пб.-М.: ФАРМиндекс, 2001, с. 18-91).

Техническим результатом заявленного изобретения является обнаружение высокоспецифичного ингибитора, который блокирует только классический путь активации системы комплемента, подавляет как функционирование компонента С1, так и связавшись с Clq ингибирует сборку Cl комплекса [$Clq(Clr_2Cls_2)$] с K_i=7 нг/мл ($8,9 \bullet 10^{-9}$ М).

Кроме того, использование данного вещества в качестве ингибитора комплемента имеет ряд достоинств, свойственных ему: обладает уникальной активностью как антиоксидант, активное вещество стабильно при хранении в защищенном от света месте при комнатной температуре в течение 3 лет, препарат безвреден (LD_{50}=1700 мг/кг веса при внутривенном введении белым мышам), не канцерогенен и не обладает эмбриотоксичностью, для введения эффективной дозы препарата в организм можно использовать любой подходящий способ применения, например пероральный, парентеральный, ректальный или наружный, препарат прошел многолетние испытания в клиниках при постгипоксических состояниях и зарекомендовал себя как высокоэффективное лечебно-профилактическое средство.

Все вышеизложенные достоинства значительно упрощают его применение в качестве ингибитора комплемента.

Нами впервые проведены исследования влияния гипоксена на систему комплемента человека, что до наших исследований не было известно.

Исследования проводили следующим образом.

Пример 1. Влияние гипоксена на классический путь активации системы комплемента.

Для исследования функциональной активности гипоксена в ингибировании активации комплемента in vitro были использованы гемолитические тесты.

Для классического пути бараньи эритроциты (10^9 кл/мл) в вероналовом солевом буфере, содержащем 0,5 мМ $MgCl_2$ и 0,15 мМ $CaCl_2$ (VBS^{2+}), были сенсибилизированы кроличьими анти-Форсмановскими антителами в течение 30 мин при 37°С. Клетки (ЕА) были затем отмыты буфером VBS^{2+} центрифугированием и ресуспендированы до $1,5 \bullet 10$ кл/мл.

Влияние на активность СК определяли по снижению гемолиза по классическому пути разбавленной сыворотки крови человека после ее преинкубации с 0,1-0,8 мкг гипоксена в течение 0 и 15 мин при 37°С в объеме 0,3 мл и внесения 200 мкл суспензии ЕА ($1,5 \bullet 10^8$ кл/мл) с последующей 30 мин инкубацией. После инкубации в каждую пробу добавляли по 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали и определяли степень гемолиза по величине A_{412} супернатанта. Контрольная проба не содержала гипоксена. Пониженный гемолиз в опытных пробах по сравнению с контрольной свидетельствовал о наличии воздействия на СК.

Проведенные исследования показали, что гипоксен дозозависимо ингибирует классический путь активации системы комплемента, причем преинкубация сыворотки с препаратом гипоксена в течение 15 мин при 37°С усиливает эффект (см. табл. 1).

Таким образом, препарат гипоксена обладает ингибирующим действием на систему комплемента. Усиление эффекта при преинкубации сыворотки с препаратом может свидетельствовать либо об активации комплемента, либо об инактивации одного из компонентов классического пути.

Пример 2. Влияние гипоксена на формирование комплекса ЕАС1.

Эксперименты были проведены следующим образом. 0,1-0,4 мкг препарата инкубировали 15 мин при 37°С с подобранной концентрацией R4 (сыворотка, истощенная по С4 компоненту, источник С1 комплекса) и суспензией ЕА (200 мкл) в общем объеме 500 мкл, доведенном VBS^{2+}. Реакцию останавливали добавлением 500 мкл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали 5 мин при 1500 g, декантировали и к осадку ЕАС1 добавляли 0,5 мл разведенного реагента R1 (сыворотка крови человека, истощенная по С1 компоненту). Тщательно перемешивали встряхиванием и инкубировали 30 мин при 37 °С. После инкубации определяли степень гемолиза при A_{412}, как описано выше.

Измеренную величину (степень лизиса y) использовали для расчета значения Z, которое определяется по формуле

$Z = \ln[(H-R)/H-X)]$, где H, R и X - величины оптической плотности при A_{412} гемолитической системы при полном лизисе, в контроле (без титруемого компонента) и в опытной пробе соответственно.

Результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что гипоксен оказывает дозозависимое ингибирующее действие на формирование комплекса ЕАС1 (см. табл. 2).

Константу ингибирования K_i рассчитывали по линейному уравнению $1/Z_i=[I]/(Z_o \bullet K_i)+1/Z_o$, строя график зависимости $1/Z_i$ от [I]. При этом точка пересечения графика с осью абсцисс соответствует значению $K_i=1,1 \pm 0,1$ мкг/мл ($1,5 \bullet 10^{-5}$М).

Пример 3. Связывание гипоксена с комплексом ЕАС1.

Исследования действия гипоксена после образования комплекса ЕАС1 проводили следующим образом. Комплекс ЕАС1,

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1

приготовленный инкубацией ЕА с реагентом R4 (сыворотка, истощенная по С4 компоненту, источник Cl комплекса), отмывали центрифугированием, ресуспендировали в буфере VBS^{2+} и концентрацию комплекса EAC1 доводили до $1,5 \cdot 10^8$ кл/мл. 200 мкл EAC1 инкубировали с разными концентрациями гипоксена (0,1-0,4 мкг) в течение 15 мин при 37°С в общем объеме 0,5 мл, доведенном буфером VBS^{2+}. После инкубации комплекс отмывали центрифугированием, декантировали и осадок ресуспендировали в гемолитической системе, содержащей реагент R1. Гипоксен в зависимости от концентрации подавлял функционирование Cl в комплексе EAC1 (см. табл. 3).

Была определена $K_i=6,75 \cdot 10^{-7}$ М (как описано выше).

Таким образом, антикомплементарное действие гипоксена обусловлено взаимодействием с С1 комплексом, причем после образования комплекса EAC1 эффект ингибирования выше, чем на стадии формирования комплекса.

Пример 4. Определение обратимости связывания гипоксена с EAC1.

Комплекс EAC1 с ограниченным числом эффективных молекул С1 готовили, как описано в примере 3. 200 мкл суспензии комплекса EAC1 инкубировали с 0,1-0,4 мкг гипоксена в объеме 500 мкл в течение 15 мин при 37°С. После инкубации с эффектором добавляли 500 мкл буфера VBS^{2+}, комплекс отделяли центрифугированием и определяли остаточную активность С1 комплекса на ЕА в гемолитической системе с реагентом R1 после 30 мин инкубации. Степень лизиса клеток определяли, как описано выше. Контроль не содержал препарата гипоксен. Результаты эксперимента показали дозозависимое ингибирование активности С1, предполагая необратимое связывание гипоксена с комплексом С1, связанным с ЕА (см. табл. 4).

Константу ингибирования K_i рассчитывали по линейному уравнению $1/Z_i=[I]/(Z_o \cdot K_i)+1/Z_o$, строя график зависимости $1/Z_i$ от [I]. При этом точка пересечения графика с осью абсцисс соответствует значению K_i=7 нг/мл ($8,9 \cdot 10^{-9}$ М).

Таким образом, проведенные исследования обратимости связывания гипоксена с комплексом EAC1 свидетельствуют о высокой аффинности и практически необратимом характере взаимодействия.

Ингибирование активности EAC1 может быть обусловлено либо прямой инактивацией, либо диссоциацией С1 в результате взаимодействия гипоксена с субкомпонентами комплекса.

Пример 5. Влияние гипоксена на активность субкомпонента Clq.

Эксперименты проводили следующим образом. 0,1-0,4 мкг гипоксена предварительно инкубировали 15 мин при 37 °С с подобранной концентрацией очищенного функционально активного субкомпонента Clq первого компонента комплемента человека С1 и после инкубации собирали гемолитическую систему, добавляя 200 мкл суспензии ЕА ($1,5 \cdot 10^8$ кл/мл) и 20 мкл реагента Rlq (сыворотка, дефицитная по субкомпоненту Clq). Общий объем гемолитической системы доводили до 0,5 мл буфером VBS^{2+}. После инкубации 30 мин при 37°С реакцию останавливали добавлением 2,5 мл холодного раствора 0,15 М NaCl, центрифугировали 5 мин при 1500 g и степень гемолиза определяли, как описано выше.

В результате проведенных исследований получены данные, которые свидетельствуют о связывании субкомпонента Clq с гипоксеном с $K_i=1,66 \cdot 10^8$ М (см. табл. 5).

Таким образом, исследования влияния гипоксена на субкомпонент Clq свидетельствуют о прямой инактивации узнающей субъединицы С1 комплекса.

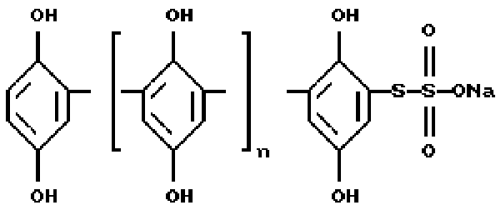
Пример 6. Определение связывания гипоксена с комплексом EAClq. Для определения взаимодействия гипоксена с Clq, связанным с ЕА, комплекс EAClq был предварительно инкубирован с различными количествами гипоксена в диапазоне доз между 0,05 и 0,4 мкг/мл в течение 20 мин при 37°С. После инкубации комплекс отмывали центрифугированием, ресуспендировали в гемолитической системе с реагентом Rlq. Эти эксперименты показали дозозависимое ингибирование активности Clq, предполагая связывание гипоксена с Clq, связанным с ЕА (см. табл.6).

Препарат гипоксен взаимодействует с иммобилизованным субкомпонентом Clq на ЕА и тем самым ингибирует формирование комплекса С1 с $K_i=7,65 \cdot 10^{-8}$ М.

Таким образом, из приведенных выше примеров следует, что ингибирующее действие гипоксена на С1 компонент системы комплемента обусловлено связыванием с субкомпонентом Clq в растворе, которое приводит к диссоциации С1 комплекса, а связывание гипоксена с иммобилизованным Clq предотвращает формирование комплекса С1.

Формула изобретения:

Применение гипоксена, имеющего общую формулу:



где n = 0 - 4,

в качестве специфического ингибитора Clq субкомпонента и Cl компонента классического пути системы комплемента человека.

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1

Таблица 1

Влияние гипоксена на классический путь активации системы комплемента

Условия опыта		Активность КПК с преинкубацией, %	
Комплемент	Гипоксен, мкг/мл	0 мин +ЕА	15 мин +ЕА
сыворотка	0	100	100
сыворотка	0,8	96	81
сыворотка	1,0	83	64
сыворотка	1,2	9	6
сыворотка	1,4	0	0

Таблица 2

Ингибирование гипоксеном формирования комплекса ЕАС1

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Количество С1 на ЕА, %
ЕА + С1	0	100
ЕА + С1	Г 0,2	81
ЕА + С1	0,4	76
ЕА + С1	0,6	64
ЕА + С1	0,8	44

Таблица 3

Связывание гипоксена с ЕАС1 и ингибирование активности компонента С1

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Количество С1 на ЕА,%
ЕАС1	0	100
ЕАС1	0,2	31
ЕАС1	0,4	15
ЕАС1	0,6	8
ЕАС1	0,8	4

Таблица 4

Связывание гипоксена с ЕАС1 и ингибирование активности С1 компонента

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Гемолитическая активность ЕАС1, %
ЕАС1	0	100
ЕАС1	0,2	5
ЕАС1	0,4	1
ЕАС1	0,6	0,7
ЕАС1	0,8	0,4

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1

Таблица 5

Ингибирование субкомпонента C1q препаратом гипоксен

Состав системы	[Гипоксен],мкг/мл	Активность C1q, %
C1q	0	100
C1q	0,05	34
C1q	0,1	16
C1q	0,15	7
C1q	0,2	5
C1q	0,3	3
C1q	0,4	0

Таблица 6

Связывание гипоксена с EAC1q и ингибирование активности субкомпонента C1q

Состав системы	[Гипоксен], мкг/мл	Гемолитическая активность EAC1q, %
EAC1q	0	100
EAC1q	0,05	60
EAC1q	0,1	29
EAC1q	0,2	20
EAC1q	0,3	11
EAC1q	0,4	0

RU 2205002 C1

RU 2205002 C1