



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 960190

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 17.03.81 (21) 3264578/23-05

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет 04.09.79

Опубликовано 23.09.82. Бюллетень № 35

Дата опубликования описания 25.09.82.

(51) М. Кл.³

C 08 B 37/02

A 61 K 37/64

(53) УДК 547.458.
.8. (088.8)

(72) Авторы
изобретения

И. В. Березин, В. В. Меньшиков, Н. Ф. Казанская, П. И. Толстых,
Н. И. Ларионова, Н. В. Беляков, И. Ю. Сахаров, А. В. Григорян,
В. Г. Владимиров, В. И. Сергиенко и В. К. Гостищев

(71) Заявители

1-ый Московский ордена Ленина и ордена Трудового Красного
Знамени медицинский институт им. И. М. Сеченова и Московский
государственный ордена Ленина и ордена Трудового Красного
Знамени университет им. М. В. Ломоносова

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИВАЛЕНТНОГО ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА, ОБЛАДАЮЩЕГО АНТИКИНИНОГЕНАЗНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, в частности к способу получения вещества, обладающего антикининогеназным действием, и может найти применение в медицине.

Молекула поливалентного панкреатического ингибитора кининогеназ (ППИК), выделенная из поджелудочной и околоушной желез и легких крупного рогатого скота, состоит из 58 аминокислотных остатков. ППИК широко применяется в медицине в качестве лекарственного средства (гордокс) при лечении ряда заболеваний, сопровождающихся избыточным образованием биологически активных полипептидов - кининов [1].

Недостатком известного средства является кратковременное действие, связанное с быстрым выведением его из организма. Время полувыведения гордокса зависит от дозы и составляет 30-70 мин.

Целью изобретения является получение целевого продукта, обладающего длительной антикининогеназной активностью.

Поставленная цель достигается тем, что согласно способу получения поливалентного панкреатического ингибитора, обладающего антикининогеназным действием, включающему выделение ингибитора из организма крупного рогатого скота, 1 - 8 вес.ч. поливалентного панкреатического ингибитора дополнительно обрабатывают раствором смеси карбоксиметилдекстрана и 1-этил-3-(3'-диэтиламинопропил)карбодимида при их соотношении 2,5-10:5-10 при pH 4,7-7,6 и 20-25°C.

Следует отметить, что только использование карбоксиметилдекстрана приводит к пролонгированию действия ППИК, другие же полисахариды, такие как декстран и ДЭАЭ-декстран, приводят к получению продуктов, содержащих 0,2-1% белка в препарате с сохранением менее 10% ингибирующей активности, тогда как карбоксиметилдекстран приводит к продукту, содержащему 20-50% белка от веса препарата с полным сохранением кинематичес-

ких и равновесных констант в модельной реакции ассоциации с трипсином.

Структура нового производного ППИК индивидуального полимерного продукта, полученного химическим путем ацилированием карбоксиметилдекстраном, в присутствии карбодимида, подтверждена химическими и физико-химическими методами. Образование связи с носителем доказано измерением количества модифицированных аминокропш ППИК.

Реакция с тринитробензолсульфокислотой показывает, что при ацилировании КМ-декстраном вступают в реакцию две аминокропш белка. Выделенке препарата ППИК, связанного с карбоксиметилдекстраном, проводилось методом гелъ-хроматографии, в основе которого лежит разделение веществ с различными величинами молекулярных весов. Хроматографически выделенный пик высокомолекулярного вещества содержит белок, определенный известным методом Лоури, и полисахарид, определенный по цветной реакции Дюбуа.

Новое производное ППИК сохраняет биологическую активность — является ингибитором кининогеназ, но в отличие от исходного продукта — ППИК обладает пролонгированным действием, что подтверждено на модели острого панкреатита у собак данными по выживаемости и средней продолжительности жизни.

Пример 1. 200 мг КМ-декстрана (ст.з. 0,6; средний $M_r = 6 \cdot 10^4$) растворяют в 10 мл 0,1 М раствора хлористого натрия и добавляют 200 мг 1-этил-3(3'-диэтиламинопропил)карбодимида, рН реакционной смеси поддерживают 4,7 в течение 30 мин. Затем к реакционной смеси добавляют 100 мг ППИК, смесь инкубируют при рН 5,7 в течение 16-24 ч при 20°C. ППИК, связанный с КМ-декстраном, отделяют от нативного белка гелъ-хроматографией реакционной смеси на колонке с сефарозой 6В-С1 (25 × 400 мм), уравновешенной 0,1 М раствором хлористого натрия при рН 5,7. За хроматографическим разделением следят по изменению оптической плотности при 280 и 206 нм. Первый пик, соответствующий высокомолекулярному производному ППИК, обессоливают на колонке с сефадексом G-25 (25 × 600 мм), уравновешенном 5%-ным раствором уксусной кислоты. Обессоленный препарат лиофильно высушивают и определяют в нем содержание белка по методу Лоури и ингибирующую активность по отношению к трипсину. Полученное водо-

растворимое соединение ППИК с КМ-декстраном содержит 30% белка от сухого веса препарата и сохраняет 75% ингибирующей активности по отношению к трипсину.

Пример 2. 52 мг КМ-декстрана (ст.з. 0,6; средний $M_r = 6 \cdot 10^4$) растворяют в 10 мл 0,1 М раствора хлорида натрия и добавляют 200 мг 1-этил-3(3'-диэтиламинопропил)карбодимида, рН реакционной смеси поддерживают 5,7 в течение 30 мин. Затем к реакционной смеси добавляют 160 мг ППИК, смесь инкубируют при рН 5,7 в течение 16-24 ч при 25°C.

Выделение ППИК, связанного с КМ-декстраном, аналогично примеру 1. Полученное водорастворимое соединение ППИК с КМ-декстраном содержит 50% белка от сухого веса препарата и сохраняет 60% ингибирующей активности по отношению к трипсину.

Пример 3. 200 мг КМ-декстрана (ст.з. 0,6; средний $M_r = 6 \cdot 10^4$) растворяют в 10 мл раствора 0,1 М NaCl и добавляют 100 мг 1-этил-3(3'-диэтиламинопропил)карбодимида, рН реакционной смеси поддерживают 7,6 в течение 30 мин. Затем к реакционной смеси добавляют 20 мг ППИК, смесь инкубируют при рН 5,7 в течение 16-24 ч при 20°C. Выделение ППИК, связанного с КМ-декстраном, аналогично примеру 1. Полученное водорастворимое соединение ППИК с КМ-декстраном содержит 20% белка от сухого веса препарата и сохраняет 100% ингибирующей активности по отношению к трипсину.

Пример 4. Испытание антикиногенозной активности полученного соединения. Высокая биологическая активность и пролонгированность действия ППИК, связанного с КМ-декстраном, подтверждена данными о выживаемости и средней продолжительности жизни собак при экспериментальной форме острого панкреатита.

Острый панкреатит воспроизводился введением в главный панкреатический проток инкубационной смеси желчи с трипсином. Через 3 ч в вену задней конечности вводят предлагаемое вещество. В эксперименте выделено две контрольные группы животных: первую составили 11 собак, у которых лечение не проводилось; вторую — 11 собак, у которых острый панкреатит протекал на фоне применения поливалентно-

го ингибитора кининогеназ в виде лекарственного препарата - гордокса.

Результаты эксперимента представлены в таблице.

Вещество, применяемое при лечении животных	Доза вещества	Количество животных	Выжившие животные, %	Средняя продолжительность жизни погибших животных, дн.
-	-	11	0	1 - 2
Гордокс	5 000 кие/кг	11	63	7
ППИК, связанный с КМ-декстраном	5 000 кие/кг	10	80	14

Таким образом, предлагаемый способ позволяет получить препарат поливалентного панкреатического ингибитора кининогеназ, обладающий пролонгированным действием по сравнению с известным.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения поливалентного панкреатического ингибитора, обладающего антикининогеназным действием, включающий выделение ингибитора из организма крупного рогатого скота, отличаю-

щийся тем, что, с целью получения целевого продукта, обладающего длительной антикининогеназной активностью, 1 - 8 вес.ч. поливалентного панкреатического ингибитора дополнительно обрабатывают раствором смеси карбоксиметилдекстрана и 1-этил-3-(3'-диэтиламинопропил)карбодиимида при их соотношении 2,5-10 : 5-10 при pH 4,7 - 7,6 и 20-25°C.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Vogel R., Welle E. Kallikrein inhibitors. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, 1970 (прототип).

Составитель Т. Мартинская
Редактор О. Полсва Техред М. Тепер Корректор Н. Король

Заказ 7141/28 Тираж 514 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4