



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147029

(13) U

(51) МПК

A61K 38/04 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки:	u 2020 06227	(72) Винахідник(и):	Мартинів Артур Вікторович (UA)
(22) Дата подання заявки:	28.09.2020	(73) Володілець (володільці):	Мартинів Артур Вікторович,
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	08.04.2021		вул. Амосова, 1, кв. 18, м. Харків, 61171, Україна (UA)
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	07.04.2021, Бюл.№ 14		

**(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КАРБОКСИЛЬОВАНИХ ПЕПТИДІВ З ПРОТИВІРУСНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ**

**(57) Реферат:**

Спосіб отримання карбоксильованих пептидів з противірусними властивостями, у якому супрамолекулярну композицію на основі суми карбоксильованих олігопептидів синтезують шляхом ферментативного гідролізу білків або їх сумішей з утворенням суми олігопептидів та наступним їх ковалентним карбоксилуванням.

UA 147029 U

UA 147029 U

Корисна модель належить до ветеринарії та медицини, а конкретно до вірусології, та може бути використана при створенні ліків для лікування вірусних інфекцій тварин та людини.

Вірусні хвороби складають більш 90 % всієї зареєстрованої інфекційної патології. Але протівірусних засобів, які впроваджені у виробництво, дуже мало. Такі речовини часто мають токсичні властивості, невеликий спектр дії, до них швидко з'являється ефект звикання. Таким чином, розробка протівірусних засобів, які б не мали токсичних властивостей, були ефективними в лікуванні широкого спектра вірусних інфекцій, є актуальною задачею сучасної медицини. Зараз відомо дуже мало речовин, які б мали лікувальну дію на всіх етапах вірусної інфекції. Окрім інтерферонів та їх індукторів ще не відомо таких речовин, які б одночасно обіймали лікувальні та протівірусні властивості відносно широко розповсюджених вірусних захворювань - СНІДу, герпесу, грипу та ін. Найбільш відомим засобом для лікування грипу є ремантадин [1]. Це речовина, яка блокує тільки етап проникнення вірусу в клітину і ранню стадію специфічної репродукції, не діє на патогенез захворювання. Довготривале використання цього препарату неможливе, бо він має нейротропні ефекти та може викликати галюцинації, порушувати функції мозку завдяки гальмуванню проведенню імпульсу по нервовому волокну.

Серед інших речовин, ефективних у лікуванні грипу, відомий лейкоцитарний - інтерферон носоглотки. Цей білок синтезується в активованих лейкоцитах людини. Він має здатність викликати резистентність до грипу у клітин епітелію. Але його лікувальні властивості дуже незначні. Він малоефективний на 2-6-й день захворювання грипом та є профілактичним засобом. Рекомбінантні інтерферони мають велику вартість та часто призводять до алергічних реакцій. Окрім цього, з розвитком захворювання ефективність інтерферонотерапії зменшується, а резистентність вірусу до інтерферону збільшується.

Найближчим аналогом до запропонованої корисної моделі, є модифіковані білки та їх використання для контролю вірусних інфекцій [3]. Це оброблені різними ангідридами та ацилюючими засобами білки: альбуміни, лактоферин, трансферин, лактальбумін. Автори запатентували також механізм дії цих білків - гальмування вірусної адгезії. Сировиною для отримання препарату найближчого аналога були повноцінні високомолекулярні білки. Показана значна цитопротекторна дія цих білків в дослідах на культурах клітин. Речовини проявили активність відносно вірусів СНІДу (людини та мавпи), грипу, цитомегаловірусу, поліовірусу, вірусу лісу Селміки, вірусу Сендай, парагрипу, Коксаки вірусу. Автори показали, що ацильовані білки нетоксичні і можуть захищати культури клітин проти інфікування вірусами.

Найближчий аналог має ряд недоліків: він є суто профілактичним засобом (на клітини, що вже інфіковані вірусом такі білки впливу не мали) та не має лікувальних властивостей у інфікованих тварин. У зв'язку з тим, що найближчий аналог є високомолекулярним білком, він може бути використаний тільки парентерально.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб синтезу суміші хімічно модифікованих олігопептидів з протівірусними властивостями та з новим механізмом дії, використання яких дозволить значно збільшити ефективність лікування та скоротити терміни лікування вірусних захворювань, таких як грип, герпесвірусні інфекції, COVID-19.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання карбоксильованих пептидів з протівірусними властивостями, згідно з корисною моделлю, супрамолекулярну композицію на основі суми карбоксильованих олігопептидів синтезують шляхом ферментативного гідролізу білків або їх сумішей з утворенням суми олігопептидів та наступним їх ковалентним карбоксилуванням. Як білок - об'єкт для ферментативного гідролізу - використовують один з таких білків або всі одразу: овальбумін, людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, імуноглобулін G людини, імуноглобулін M людини, імуноглобулін M людини, лізоцим, казеїн, соєвий білок, молоко, яєчний білок. Як фермент для ферментативного гідролізу білків використовують один з таких ферментів або всі одразу: пепсин, трипсин, хімотрипсин, папаїн, протеїназа K, клострипаїн, тромбін, термолізін, еластаза. Як карбоксилуючий агент для проведення процесу ковалентної модифікації, а саме - карбоксилування отриманих олігопептидів використовують один або всі одразу модифікатори: оцтовий ангідрид, пропіоновий ангідрид, бутановий ангідрид, оцтово-пропіоновий ангідрид, оцтово-бутановий ангідрид, цис- і трансаконітовий ангідриди, бурштиновий ангідрид, малеїновий ангідрид, глутаровий ангідрид, фталевий ангідрид, лимонний ангідрид, ізолимонний ангідрид, ацетилхлорид, ацетилфторид, пропіонілхлорид, бутироїлхлорид, етоксіоксалілмонохлорид.

У запропонованому способі спочатку проводять ферментативний гідроліз білків, а потім проводять процес карбоксилування через ацилювання (алкилювання) отриманих пептидів та використовують отриману суму ацильованих олігопептидів для застосування у лікуванні вірусних інфекцій людей і тварин. Спорідненість пептидів один до одного (раніше вони були

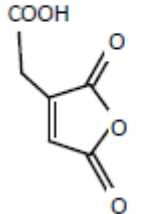
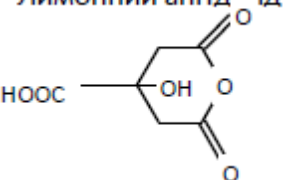
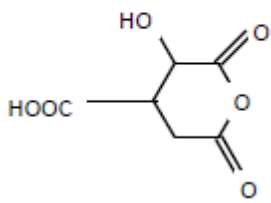
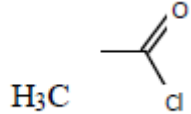
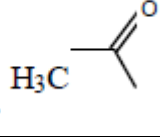
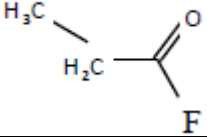
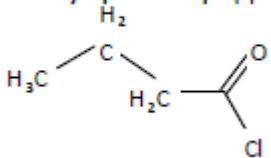
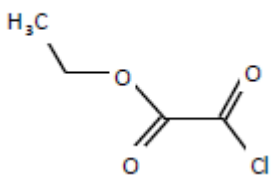
частиною одного білка) приводить до утворення химерних супрамолекулярних структур через взаємодію олігопептидів один з одним.

Синтезовані карбоксильовані олігопептиди здатні гальмувати активність гетеродимеру імпортинів клітини, які транспортують вірусні полінуклеотиди з цитоплазми до ядра через селективну взаємодію з сигнальними пептидами NLS (для вірусу COVID-19 це NLS 1-3). Відповідно, гальмування цих транспортних білків приводить до блокади вірусів, реплікація яких безпосередньо або опосередковано залежить від функцій ядра клітини. Окрім цього, препарат ефективний при пероральному застосуванні.

Для карбоксилування (ацилювання/алкилювання) можуть бути використані такі білки: овальбумін (ОА), людський сироватковий альбумін (ЛСА), бичачий сироватковий альбумін (БСА), суміш молочних білків (СМБ), кролячий сироватковий альбумін (КСА), лізоцим (ЛЦ), лактоальбумін (ЛА), казеїн (КЗ), соєвий білок (СБ), молоко (МО) та яєчний білок (ЯБ) та їх суміш.

Для ферментативного гідролізу можуть бути використані пепсин, трипсин, хімотрипсин, папаїн, протеїназа К, клострипаїн, тромбін, термолізін, еластаза.

Як карбоксилуючі агенти в синтезі можуть бути використані:

<b>Цис- і трансаконітовий ангідриди</b> 	<b>Лимонний ангідрид</b> 	<b>Ізолимонний ангідрид</b> 
<b>Ацетилхлорид</b> 	<b>Ацетилфторид</b> 	<b>Пропіонілхлорид</b> 
<b>Бутіроїлхлорид</b> 	<b>Етоксиксалилмонохлорид</b> 	

В експерименті була підтверджена ефективність препарату при грипі, герпесі, на моделях *in vivo* та *in ovo*, що описані нижче.

Приклад 1. Спосіб отримання суміші ацильованих пептидів (АП) з антивірусними властивостями, що здатні до самоорганізації на імпортинах (препарат отримав назву Альбувір).

В асептичних умовах 500 мг овальбуміну розчиняють в 50 мл дистильованої води, доводять рН до 8,0 1М розчином гідроксиду натрію, додають 5 мг папаїну, залишають розчин на 3-45 годин, спостерігається гідроліз овальбуміну з утворенням суміші пептидів. До цієї суміші додають 501-2000 мг аконітового ангідриду, перемішують при температурі 16-65 °C 20 хвилин. Суміш пропускають через мембранні фільтри з метою стерилізації та розливають у скляні флакони.

Приклад 2. Підтвердження механізму дії АП. Універсальним білком, який транспортує вірусний полінуклеотид (РНК чи ДНК) до ядра клітини, є гетеродимер -  $\alpha$ - $\beta$ -імпортинів [8]. Основний транспортний компонент цієї системи - імпорт має консервативну сигнальну послідовність амінокислот, яку впізнають білки ядерної пори та відкривають її для проходження комплексу нуклеопротейдотранспортний білок. Ця послідовність відома, її структура та функції підтверджені [6].

Отримана сума кислих ацильованих олігопептидів (АП) блокує саме цю сигнальну послідовність.

Для підтвердження механізму дії АП ми використовували ДНК вірусу простого герпесу 1 типу штам Л-2. ДНК виділяли за відомою методикою [5]. Кон'югацію ДНК з частинками

колоїдного золота проводили за методом [6]. Отриманий комплекс вводили до ліпосом за методом [7]. Докладно експеримент був описаний з вірусом SV40 мавпи в [8].

Такі ліпосоми зливалися з мембранами клітин з культури курячих фібробластів. Максимальне значення інфекційного титру складало 5,0-5,5 lg LD50/0,03 мл. Використовували кролів обох статей вагою 2,5 кг. Для створення моделі ОГ очі кролям промивали фізіологічним розчином і обезболювали дикаїном, закапуючи його у кон'юнктиву. ВПГ-1 у інфекційній дозі (6-7 крапель) наносили на скарифіковану рогівку. Контроль склали дві групи тварин: інфіковані тварини, яким вводили 0,9 % розчин натрію хлориду та група тварин, яким вводили препарат найближчого аналога. Інтенсивність клінічної симптоматики ОГ кроликів оцінювали за 4-бальною системою для кожного симптому, який потім сумували. Оцінку ефективності хіміопрепаратів проводили з врахуванням різниці у виразності симптоматики (СІВС в балах) у досліді і контролі. СІВС у контролі (неліковані тварини) приймали за 100 %. Препарат вводили через 48 годин після інфікування в дозі 0,01 г препарату на кроля 3 рази на добу перорально в розчині на дистильованій воді. Аналогічно, але парентерально (у вушну вену) вводили препарат найближчого аналога та 0,9 % розчин натрію хлориду. У 90 % кролів контрольної групи виразність лише кон'юнктивіту становила 3-4 бали. Тривалість симптоматики - в середньому становила 21 день. Максимального розвитку вона досягала на 48 день (СІВС рівні 8-10 балам)

Критеріями оцінки лікувального ефекту препаратів були: а) зменшення виразності клінічної симптоматики; б) скорочення тривалості захворювання; в) запобігання летального менінгоенцефаліту. Дані про ефективність досліджуваних препаратів представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

## Ефект лікування хворих кролів АП

Назва препарату	Кількість тварин	Тривалість захворювання (дні)	СІВС (бали)
АП	7	7,5±2,5*	36,3±4,8
Контрольний препарат найближчого аналога	7	25,5±2,5*	100 2 ±
Нелікований контроль	5	26±2,5**	109,2±2,2

\* P <0,001 \*\* P<0,01

Гетеродимер  $\alpha$ - $\beta$ - імпоринів переносив колоїдні частки з полінуклеотидом до ядерних пор. Якщо клітини інкубували з АП, що патентуються, то накопичення часток колоїдного золота на ядерних порах не спостерігалось. Всі частки рівномірно розподілялися по цитоплазмі клітин. В цьому випадку цитопатичної дії вірусу не спостерігалось. Таким чином, спроектована та синтезовані олігопептиди гальмує постачання вірусної ДНК в клітинне ядро, що і необхідно було підтвердити.

Приклад 3. Підтвердження лікувальної дії АП на білих мишах з герпетичним енцефалітом.

20 білих мишей Balb-C інфікували внутрішньочеревно летальною дозою 0,01 мл 7,0 lg ВПГ1 штам Л2. Через 2 доби у більшості тварин з'явилися ознаки енцефаліту: порушення рухової активності, зменшення споживання їжі, судоми. Лікування починали на другу добу після інфікування. АП використовували перорально в дозі 10 мг/кг ваги тварин два рази на добу 5 діб. Як контроль використовували інфікованих тварин (20 голів), яким давали 0,9 % розчин натрію хлориду (вводився перорально в тому ж об'ємі). Основним критерієм ефективності препарату був відсоток тварин в основній групі, що вижили на 17 добу, проти контролю. В дослідній групі тварин, яким давали препарат, загинуло тільки 2 тварини з 20 (10 %), тоді як в контрольній групі загинуло 18 з 20 тварин (90 %). На другий день після початку лікування АП симптоми герпетичного енцефаліту зникали. Таким чином, препарат мав чіткий терапевтичний ефект у лікуванні герпетичного енцефаліту у мишей.

Приклад 4. Лікувальна дія препарату на моделі герпетичного офтальмогерпесу (ОГ) у кролів.

Найбільш зручними для відтворення ОГ і оцінки ефективності хіміопрепаратів є моделі герпетичного кератиту і кератокон'юнктивіту у кролів [9]. ВПГ-1 штам Л2 використовували у вигляді культуральної рідини зараженої культури клітин Нер-2. Як видно з таблиці 1, застосування препарату, який одержують за запропонованим способом, призводило до зниження в 2 рази виразності клінічних проявів хвороби у порівнянні з інфікованими, але нелікованими тваринами. При його застосуванні спостерігалось не тільки зниження

інтенсивності симптоматики, тривалості захворювання в 3 рази, а і відсутність загибелі тварин. СІВС у групі, де використовувався препарат був вдвічі меншим за СІВС у групі контролю. Тоді як речовина найближчого аналога, використана в тій же дозі парентерально (внутрішньовенно в вушну вену) не впливала на терміни життя та тривалість захворювання.

5      Приклад 5. Дослідження протигрипозних властивостей АП на моделі in ovo

В досліді використовували штам вірусу грипу-А/Гонконг/95(Н3N2). Всього в досліді використовували 60 штук 9-11 добових курячих ембріонів. Використовували по 20 ембріонів на кожний дослід: культуральну рідину (0,1 мл) з титром вірусу 7 Іg вводили до амніотичної порожнини ембріонів, інкубували 1 добу при 35 °С. До амніотичної порожнини 20 інфікованих ембріонів вводили по 0,2 мл (з перерахунку 0,003 г препарату на кг ваги) засобу, що патентується, іще 20 ембріонам вводили по 0,3 мл препарату найближчого аналога та 20 ембріонам вводили по 0,2 мл 0,9 % розчину натрію хлориду. Через 3 доби ембріони анатомували та ставили реакцію гемаглютинації на скельці з 1 % суспензією еритроцитів курей. Як матеріал в реакції гемаглютинації використовували алантоїсну та амніотичну рідину. Порівнювали середній геометричний титр гемаглютиніни вірусу в алантоїсній рідині контрольних ембріонів та ембріонів, в які було введено препарат з розрахунком індексу ефективності (ІЕ) [10] (таб. 2).

Таблиця 2

Протигрипозна дія АОП на моделі in ovo

Препарат	Титр вірусу * (Іg)		Неінфіковані ембріони
	Середній геометричний титр в Іg ЕД <sub>50</sub>	Індекс ефективності (ІЕ), %	
АП	1,5±0,2	80	0
Речовина найближчого аналога	7,2±1,2	44	0
0,9 % розчин натрію хлориду	7,5±1,0	-	0

20      \*при P<0,001

Як видно з таблиці 2, АП на 6 Іg зменшує концентрацію вірусу грипу, тоді як речовина найближчого аналога не має протигрипозних властивостей. В амніотичній рідині, куди вводили розчин препарату, зовсім не було вірусу. Можливо він, потрапивши до цитоплазми клітини, потім руйнується під впливом протеаз та нуклеаз. Це свідчить про інший механізм дії АП проти контрольної речовини найближчого аналога. Останній як інгібітор адгезії вірусу здатний тільки захищати клітини від інфікування вірусами, а не блокували реплікацію вірусу в інфікованих клітинах.

30      Дослідження протівірусної дії препарату АП (Альбувір) на цитопатичні віруси (вірус везикулярного стоматиту, коронавірусу (собачий вакцинний штам), вірус простого герпесу 1 типу).

35      Приклад 6. Протівірусну активність щодо цієї групи вірусів визначали в культурі зазначених вище клітин. Реакцію проводили наступним чином: 0,2 мл відповідного вірусу в робочій дозі (100 TCD<sub>50</sub> / 0,2 мл) додавали в обсязі 0,2 мл в 2-денну відмиту культуру клітин. Додавали 0,8 мл підтримуючого середовища. Коли в культурі з'явився ЦПД, препарат АП вводили в різних дозах. Як контроль те ж саме було зроблено з тест-вірусами без препарату. Клітини інкубували при 37 °С в термостаті. Досвід зафіксований на 3,5,7 діб. Зниження титру вірусу під впливом досліджуваного препарату на 2 Іg і більше порівняно з контролем оцінювали як прояв протівірусної активності. Результати дослідження протівірусної активності препарату АП

40      представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Дослідження протівірусної дії препарату АП по відношенню до вірусів: везикулярного стоматиту, коронавірусу, вірусу простого герпесу 1 типу).

Препарат	Вірус	МЕК, mg/ml	Максимальне падіння титру вірусу, lg ТСА 50/ml
АП	VSV	0,05	3,9
	CV	0,05	2,9
	HSV1	0,05	4,9

Як видно з таблиці 3, АП має протівірусну активність і здатність пригнічувати репродукцію всіх вивчених нами вірусів в концентрації 0,05 мг/л з МЕК = 50 мкг/мл. СІІ препарату становить 1000. Крім цього, АП був активний проти всіх вивчених вірусів, в той час як жоден з препаратів порівняння не показав такої активності. Таким чином, дія препарату, одержаного за запропонованим способом, не пов'язана з конкретними характеристиками вірусу або культури клітин, а впливає на механізми, загальні для всіх клітин.

Джерела інформації:

1. Мальчиков И.А., Слободянюк А.В. Использование противогриппозной вакцины и ремантадина для защиты от гриппа в промышленности // ЖМЭИ. - 1990. - № 10. - С. 79-84.

2. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии.- М.: Медицина, 1995.

3. Robert Walter Jansen, Dirk Klaas Fokke Meijer, Grietje Molema, Erik Desire Alice De Clercq, Rudi Wilfried Jan Pauwels, Dominique Schols Modified proteins and their use for controlling viral infection // A61K 3804; A61K 3816, US Patent № 5869457, Reg. 9.02.1999. Appl. Sep 4, 1997.

4. Carriere M., Escriou V., Savarin A., Scherman D. Coupling of importin beta binding peptide on plasmid DNA: transfection efficiency is increased by modification of lipoplex's physico-chemical properties.// BMC Biotechnology. - 2003. - Vol. 3. - P. 14.

5. Harper F, Florentin Y, Puvion E. Localization of T-antigen on simian virus 40 minichromosomes by immunoelectron microscopy// EMBO J. - 1984. - Jun. - 3 (6). - P. 1235-1241.

6. Feldherr C, Kallenbach E, Schultz N. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. // J.Cell.Biol... - 1984. - Vol. 99. - P. 2216-2222.

7. Дикий И.Л., Чуешов В.И., Стрельников Л.С. и др. // Методические рекомендации: "Технологические основы получения и перспективы клинического применения липосом". - Харьков, 1989. - 40 с.

8. Lanford R.E., Butel J.S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen// Cell. - 1984. - Vol. 37. - P. 801-813.

9. Perez Martin C, Vilas P., Perez Prieto S., Martin A. Antiviral activity of a D-glucosamine derivative against herpetic ulcers (HSV type 2) in rabbit cornea.// Acta Ophthalmol. - 1989. - Vol.67. - № 1. - P. 55-60.

10. Методичні рекомендації "Вивчення антивірусної дії потенційних лікарських засобів", К., 2000.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб отримання карбоксильованих пептидів з протівірусними властивостями, який **відрізняється** тим, що супрамолекулярну композицію на основі суми карбоксильованих олігопептидів синтезують шляхом ферментативного гідролізу білків або їх сумішей з утворенням суми олігопептидів та наступним їх ковалентним карбоксилуванням.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як білок - об'єкт для ферментативного гідролізу - використовують один з таких білків або всі одразу: овальбумін, людський сироватковий альбумін, бичачий сироватковий альбумін, імуноглобулін G людини, імуноглобулін M людини, імуноглобулін M людини, лізоцим, казеїн, соєвий білок, молоко, яєчний білок.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як фермент для ферментативного гідролізу білків використовують один з таких ферментів або всі одразу: пепсин, трипсин, хімотрипсин, папаїн, протеїназа K, клострипаїн, тромбін, термолізін, еластаза.

4. Спосіб п. 1, який **відрізняється** тим, що як карбоксилуючий агент для проведення процесу ковалентної модифікації, а саме - карбоксилування отриманих олігопептидів використовують один або всі одразу модифікатори: оцтовий ангідрид, пропіоновий ангідрид, бутановий ангідрид, оцтово-пропіоновий ангідрид, оцтово-бутановий ангідрид, цис- і трансаконітовий ангідриди,

бурштиновий ангідрид, малеїновий ангідрид, глутаровий ангідрид, фталевий ангідрид, лимонний ангідрид, ізолимонний ангідрид, ацетилхлорид, ацетилфторид, пропіонілхлорид, бутироїлхлорид, етоксіоксалілмонохлорид.