РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2674032

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

Патентообладатель: ***федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО) (RU)***

Авторы: ***см. на обороте***

Заявка № **2018120809**
Приоритет изобретения **05 июня 2018 г.**
Дата государственной регистрации в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **04 декабря 2018 г.**
Срок действия исключительного права на изобретение истекает **05 июня 2038 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 674 032**(13) **C1**

(51) МПК
A61K 38/49 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
C12N 9/72 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/49 *(2006.01);* ***B82B 3/0095*** *(2006.01);* ***B82Y 30/00*** *(2006.01);* ***C12N 9/50*** *(2006.01);* ***C12N 9/96*** *(2006.01);* ***C12N 11/14*** *(2006.01)*

(21)(22) Заявка: **2018120809, 05.06.2018**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
05.06.2018

Дата регистрации:
04.12.2018

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **05.06.2018**

(45) Опубликовано: **04.12.2018** Бюл. № **34**

Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, Университет ИТМО, ОИС и НТИ

(72) Автор(ы):
Дроздов Андрей Сергеевич (RU),
Виноградов Владимир Валентинович (RU),
Фахардо Анна Фабиовна (RU),
Виноградов Василий Валентинович (RU),
Дуданов Иван Петрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 9597672 B2, 21.03.2017. RU 2015123155 A, 10.01.2017. KR 100862973 B1, 13.10.2008. US 5928958 A1, 27.07.1999. SU 1128601 A1, 15.07.1985.**

(54) Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал, и может быть использовано в медицине для топической терапии тромботических состояний конечностей. Способ включает получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита путем соосаждения водного раствора смеси хлоридов железа(II) и (III) при соотношении 1,5:1-2.2:1 25% водным раствором аммиака в диапазоне не менее 8 мольных эквивалентов до образования осадка из агрегированных наночастиц магнетита, который отделяют при помощи магнитного поля. Далее надосадочную жидкость декантируют, а осадок промывают деионизированной водой до нейтрального значения уровня pH промывных вод и добавляют деионизированную воду, затем подвергают УЗ-облучению, мощность, которого 1 Вт/см^3 и выше, в течение 75-120 минут. Полученный стабильный гидрозоль наночастиц магнетита инкубируют с водным раствором гепарина в соотношении 1:15 в течение 60 минут до формирования стабильного коллоидного раствора и осуществляют энтрапирование фермента урокиназы в соотношении 1:10 в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал в течение 60 минут. Технический результат заключается в получении эффективного и безопасного лекарственного средства. 11 ил., 1 табл.

RU 2674032 C1

RU 2674032 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 674 032**(13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 38/49 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
C12N 9/72 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC
A61K 38/49 *(2006.01);* ***B82B 3/0095*** *(2006.01);* ***B82Y 30/00*** *(2006.01);* ***C12N 9/50*** *(2006.01);* ***C12N 9/96*** *(2006.01);* ***C12N 11/14*** *(2006.01)*

(21)(22) Application: **2018120809, 05.06.2018**

(24) Effective date for property rights:
05.06.2018

Registration date:
04.12.2018

Priority:
(22) Date of filing: **05.06.2018**

(45) Date of publication: **04.12.2018** Bull. № **34**

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, Kronverkskij pr., 49, Universitet ITMO, OIS i NTI

(72) Inventor(s):
Drozdov Andrej Sergeevich (RU),
Vinogradov Vladimir Valentinovich (RU),
Fakhardo Anna Fabiovna (RU),
Vinogradov Vasilij Valentinovich (RU),
Dudanov Ivan Petrovich (RU)

(73) Proprietor(s):
federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Sankt-Peterburgskij natsionalnyj issledovatelskij universitet informatsionnykh tekhnologij, mekhaniki i optiki" (Universitet ITMO) (RU)

(54) METHOD FOR PRODUCING UROKINASE ENTRAPPED INTO A COLLOIDAL MAGNETIC CERAMIC NANOCOMPOSITE MATERIAL

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a method for producing urokinase entrapped into a colloidal magnetic ceramic nanocomposite material, and can be used in medicine for topical treatment of thrombotic states of extremities. Method includes obtaining a stable hydrosol of magnetite nanoparticles by co-precipitating an aqueous solution of a mixture of iron (II) and (III) chlorides at a ratio of 1.5:1–2.2:1 with a 25 % aqueous solution of ammonia in the range of at least 8 molar equivalents until precipitate is formed from aggregated magnetite nanoparticles, the precipitate is separated using a magnetic field. Supernatant is further decanted, and the precipitate is washed with deionized water until the pH value of the wash water is neutral and deionized water is added, then subjected to ultrasound irradiation, power of which is 1 W/cm^3 and higher, for 75–120 minutes. Obtained stable hydrosol of magnetite nanoparticles is incubated with an aqueous solution of heparin in a ratio of 1:15 for 60 minutes until a stable colloidal solution is formed and the enzyme urokinase is entrapped in the ratio of 1:10 into a colloidal magnetic ceramic nanocomposite material for 60 minutes.

EFFECT: technical result consists in obtaining an effective and safe medicament.

1 cl, 11 dwg, 1 tbl

RU 2674032 C1

RU 2674032 C1

Изобретение относится к области неорганической химии и биомедицины, а именно к способу получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал, и может быть использовано в медицине для топической терапии тромботических состояний конечностей (тромбоза).

Тромбоз относится к образованию тромба внутри сосудистой системы. Образование тромба является нормальным ответом на кровотечение и помогает поддерживать гемостаз. Тромбоз может привести к сниженному кровотоку в критических органах, таких как головной мозг (инсульт), легкие (эмболия легких) и миокард (инфаркт миокарда). Венозный тромбоз, который происходит в основном в глубоких венах ног, часто приводит к эмболии легких, когда часть тромба перемещается посредством циркуляции к легким. Атеротромбоз или тромбы, которые образуются в артериях, приводят к острому коронарному синдрому, ишемическому инсульту и ишемии конечностей. Образование тромбов включает несколько последовательных стадий, которые, как правило, начинаются после повреждения кожи или сосудистого повреждения. Циркулирующие тромбоциты в первую очередь прилипают к очагу поврежденных эндотелиальных клеток, и происходит серия событий, которая приводит к активации этих тромбоцитов. Активированные тромбоциты затем вовлекают дополнительные тромбоциты в очаг повреждения, где они агрегируют для образования пробки, до тех пор, пока не образуется стабильный сгусток. Неактивные факторы свертывания, которые всегда присутствуют и циркулируют в кровотоке, затем последовательно активируются в процессе, известном как система свертывания. Система свертывания, в конечном счете, приводит к образованию стабильного фибрин-содержащего тромба. Тромботические нарушения являются группой наследственных и приобретенных нарушений, которые вызывают аномальную активацию гемостатической системы, приводя к повышенному риску венозного и артериального тромбоза.

Известны суперпарамагнитные наночастицы (US 5928958 A1), к которым прикрепляют органические вещества, имеющие сайты связывания для тканеспецифических соединений, диагностических или фармакологически активных веществ, в том числе урокиназы. В описанном техническом решении органическое вещество прикрепляют к магнитной матрице снаружи. Прикрепление производится с помощью стабилизирующих и связующих агентов, в роли которых выступают производные желатина и фосфорной кислоты. Наличие дополнительных компонентов снижает массовую долю магнитных частиц и ухудшает их магнитные свойства.

Известны нанокомпозиты (KR 100862973 B1), включающие магнитные наночастицы, фармацевтически активный ингредиент, поверхностно-активные вещества, анионоактивный полимерный слой, который окружает магнитные наночастицы и катионный полимерный слой, окружающий анионный полимерный слой. Данные нанокомпозиты так же используются для адресной доставки лекарственных средств и фармацевтически активных соединений, в качестве одного из которых указана урокиназа. Диаметр магнитного нанокомпозита составляет от 5 нм до 200 нм. Метод синтеза заключается в следующем: наночастицы магнетита получают высокотемпературным разложением прекуссоров в органических растворителях. Затем на поверхности наночастиц формируют полимерные покрытия на основе поли (гексодицилцианоацетата) методом микроэмульсии. В дальнейшем в полученные наноконтейнеры возможна загрузка лекарственных средств, в том числе урокиназы, путем нековалентного взаимодействия. Недостатками данного подхода являются наличие дополнительных компонентов, которое снижает массовую долю магнитных

частиц и ухудшает магнитные свойства. Поликатионная оболочка содержит соединения, потенциально обладающие токсическим действием, что также может служить существенным препятствием для использования в качестве потенциального лекарственного препарата.

Известен «Синтез магнитных наночастиц оксида железа» (US №9597672 B2). Наночастицы магнита синтезируют путем совместного соосаждения Fe2+ и Fe3+ в щелочных условиях в атмосфере азота при 25°C (M25) или 90°C (M90). Кислотный раствор (10 мл) солей железа (2,5 г FeCl2,4H2O и 5 г FeCl3, 6H2O) добавляют по каплям к NaOH (11 мл, 15 M) при постоянном перемешивании. Неокисляющие условия достигают путем барботирования всех растворов азотом в течение 15 минут до реакции. Для мгновенного осаждения Fe3O4 захватывают неодимовым магнитом, затем соединение промывают и нейтрализуют и затем хранят в дистиллированной воде до дальнейшего использования. Недостатком данного метода является низкая коллоидная стабильность получаемых наночастиц, в результате чего наблюдается их седиментация и агрегация в течение короткого промежутка времени, что требует введения дополнительных стадий диспергирования и фракционирования наночастиц непосредственно перед получением биокомпозитов.

Решается задача получения эффективного и безопасного лекарственного средства для топической терапии тромботических состояний конечностей.

Сущность заключается в том, что способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал включает получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита путем соосаждения водного раствора смеси хлоридов железа (II) и (III) при соотношении 1,5:1-2.2:1 25% водным раствором аммиака в диапазоне не менее 8 мольных эквивалентов до образования осадка из агрегированных наночастиц магнетита, который отделяют при помощи магнитного поля, после чего надосадочную жидкость декантируют, а осадок промывают деионизированной водой до нейтрального значения уровня pH промывных вод и добавляют денонсированную воду, затем подвергают УЗ-облучению мощность, которого 1 Вт/см^3 и выше в течение 75-120 минут, полученный стабильный гидрозоль наночастиц магнетита инкубируют с водным раствором гепарина в соотношении 1:15 в течение 60 минут до формирования стабильного коллоидного раствора, и осуществляют энтрапирование фермента урокиназы в соотношении 10:1 (коллоидный раствор : урокиназа) в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал в течение 60 минут.

Заявляемый способ создания магнитного керамического композита, с энтрапированной урокиназой, обладает эффективным действием, показанным в экспериментах на животных, а также позволяет получить безопасное лекарственное средство, что также показано в доклинических исследованиях (исследована острая, подострая токсичность, а также специфические виды токсичности).

Сущность предлагаемого способа поясняется фиг. 1 - фиг. 11.

На фиг. 1 показано получение тромболитического нанокомпозита методом энтрапирования (прямого захвата) урокиназы в стабильный гидрозоль наночастиц магнетита. Для этого на перовой стадии методом УЗ-ассистируемого синтеза получают стабильный гидрозоль наночастиц магнетита (1) при нейтральных значениях уровня pH и без посторонних примесей. После этого на поверхность наночастиц дополнительно наносят биосовместимое покрытие из кислого серосодержащего гликозаминогликана природного происхождения для увеличения биодоступности материала и увеличению его стабильности в условии организма, получая наночастицы магнетита с

модифицированной поверхностью (2), после чего производят контролируемую соконденсацию магнитных наночастиц с ферментом урокиназа, в результате чего происходит формирование нанопористой керамической матрицы, внутри которой находится фермент.

Схема синтеза урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал (3), включающая три основных этапа:

I. Получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита

II. Создание биосовместимого покрытия на поверхности наночастиц магнетита из кислого серосодержащего гликозаминогликана природного происхождения

III. Получение керамического нанокомпозитного материала путем энтрапирования урокиназы в матрицу из магнетита

I. Получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита.

Цель - разработка оптимальных условий синтеза промежуточного продукта (1) - стабильного гидрозоля наночастиц магнетита. Принципиальная схема синтеза приведена на фиг. 2. Водный раствор смеси хлоридов железа(II) и (III) соосаждали 25% водным раствором аммиака, при этом образовывался осадок из агрегированных наночастиц магнетита. Материал отделяют при помощи магнитного поля, надосадочную жидкость декантируют и промывают осадок деионизированной водой до нейтрального значения уровня pH промывных вод, после чего добавляют деионизированную воду и подвергают УЗ-облучению и получают стабильный гидрозоль.

$$FeCl_2 + 2FeCl_3 + 8NH_4OH \longrightarrow Fe_3O_4 + 8NH_4Cl + 4H_2O$$

Для оптимизации процесса получения исследовали влияние следующих параметров: (стехиометрическое соотношение реагентов, температура проведения реакции, время проведения реакции, растворитель, мощность ультразвукового излучения, время ультразвуковой обработки).

Систему оценивают по следующим параметрам: кристаллическая фаза получаемого материала, размер получаемых частиц, дзета-потенциал получаемых частиц, стабильность получаемых частиц, выход реакции, степень конверсии реагентов, образующиеся примеси.

При исследовании влияния стехиометрических соотношений компонентов меняли соотношение хлорид железа(II): хлорид железа(III) в диапазоне 1:1-3:1. Методами ИК-спектроскопии, рентгеновской порошковой дифракцией и рамановской спектрометрией выявлено, что при соотношениях компонентов менее 1.4:1 кристалическая фаза получаемого материала не соответствует маггемиту. Наночастицы с кристалической фазой магнетита получаются только при соотношении 1.5:1-2.2:1. Варьирование количества добавляемого водного аммиака в диапазоне 5-10 мольных эквивалентов показало, что добавление менее 7 мольных эквивалентов водного аммиака приводит к снижению степени конверсии до 85%, при добавлении 8 эквивалентов и выше происходит 100% конверсия исходных реагентов.

На фиг. 3 и фиг. 4 представлены рамановские спектры и РФА спектры полупродуктов (1), получаемые при различном соотношении компонентов.

Варьирование температуры в диапазоне 10°C-80°C выявило следующие закономерности: согласно методам рентгеновской порошковой дифракции, методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракцией света, сканирующей электронной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии увеличение температуры реакции приводит к увеличению скорости реакции и увеличению размера наночастиц. При температурах ниже 25°C получаются частицы меньше 10 нм, которые плохо поддаются дальнейшим манипуляциям и не пригодны для дальнейшей работы.

При температуре выше 25°С получаются частицы крупнее 10 нм, которые не могут быть переведены в стабильный гидрозоль магнетита.

На фиг. 5 представлен гидродинамический диаметр полупродуктов (1), полученный при различной температуре:

а) гидродинамический диаметр полупродукта (1), полученного при температуре менее 25°С;

б) гидродинамический диаметр полупродукта (1), полученного при температуре 25°С;

в) гидродинамический диаметр полупродукта (1), полученного при температуре 30°С.

Варьирование времени проведения реакции в диапазоне 1-10 минут выявило следующие закономерности: согласно методам рентгеновской порошковой дифракции, методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракцией света, сканирующей электронной микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии время реакции менее 5 минут приводит к уменьшению размеров частиц менее 10 нм, снижает дзета-потенциал получаемых частиц меньше 20 мВ и препятствует получению стабильного гидрозоля магнетита. Увеличение времени реакции более 10 минут приводит к росту размеров наночастиц и образованию стабильных агрегатов, которые не могут быть разрушены в дальнейшем методом УЗ-обработки, что снижает итоговый выход наночастиц.

Варьирование мощности УЗ-обработки в диапазоне 0,5-2 Вт/см^3 показало следующие закономерности: согласно методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракции света, методу электрокинетического рассеяния света и методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракции света применение УЗ-излучения с мощностью менее 1 Вт/см^3 увеличивает необходимое время облучения, и приводит к меньшей седиментационной стойкости. Дзета-потенциал частиц оказывается слишком мал и максимум достигает +25 мВ, что является слишком малым значением для обеспечения стабильности системы, что приводит к агрегации частиц и делает невозможным проведения дальнейших стадий синтеза. Применение УЗ-излучения мощностью 1 Вт/см^3 и выше приводит к росту дзета-потенциала до +33 мВ, что увеличивает седиментационную устойчивость полупродукта (1). Увеличение мощности излучения не приводит к улучшению параметров системы, таких как дзета-потенциал, и увеличивает издержки на производство.

Варьирование времени УЗ-обработки в диапазоне 15-135 мин показало следующие закономерности: согласно методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракцией света, методу электрокинетического рассеяния света и методу определения распределения частиц по размеру лазерной дифракцией света УЗ облучение способствует уменьшению гидродинамического диаметра наночастиц и увеличению дзета-потенциала. При времени УЗ обработки менее 75 минут значение дзета-потенциала не достигает порогового значения +30 мВ, что приводит к плохой седиментационной стойкости полупродукта и делает невозможным дальнейшие стадии синтеза. При облучении в течение 75 минут и более величина дзета потенциала становится больше порогового значения, при этом достигает максимального значения при времени обработки 120 минут. Дальнейшее облучение не приводит к изменению параметров системы.

На фиг. 6 представлена зависимость параметров полупродукта (1) от времени УЗ-обработки:

а) влияние длительности УЗ-обработки на гидродинамический диаметр наночастиц;

б) влияние длительности УЗ-обработки на дзета-потенциал наночастиц.

Таким образом, суммарный выход целевого продукта по этой схеме составляет более 95% (фиг. 2). Разработанная методика и физико-химические характеристики промежуточного соединения (1) представлены в Лабораторном регламенте получения лекарственного средства. Используя оптимизированные условия синтеза можно получать полупродукт стабильный гидрозоль магнетита в количестве 800 мл/сутки. Потери при этом составляют 5% или 0.8 г наночастиц в пересчете на сухое вещество. При производстве производится 4 л отходов 2 класса опасности (раствор аммиака)

II. Получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита, покрытых оболочкой гепарина.

Цель второго этапа синтеза - разработка препаративного метода получения промежуточного продукта - стабильного гидрозоля наночастиц магнетита, покрытых оболочкой гепарина (фиг. 7). Стабильный гидрозоль наночастиц магнетита инкубировали с водным раствором гепарина, что приводило к сорбции слоя гепарина на поверхности наночастиц магнетита.

Оптимизацию схемы синтеза проводили, варьируя соотношение компонентов и время протекания реакции.

Систему оценивали по следующим параметрам: размер получаемых частиц, дзета-потенциал получаемых частиц, стабильность получаемых частиц, выход реакции, степень конверсии реагентов, образующиеся примеси.

Варьирование стехиометрического соотношения компонентов проводили в диапазоне соотношений наночастицы магнетита : гепарин 100:1-1:1. Методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), определением распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света и методом электродинамического рассеяния света были выявлены следующие закономерности: увеличение количества гепарина в системе приводит к уменьшению дзета-потенциала системы и перезарядке поверхности наночастиц. При соотношении компонентов в диапазоне 100:1-3:1 происходит изменение дзета-потенциала от +33 мВ до -20 мВ и уменьшение седиментационной стабильности наночастиц, что выражается в росте гидродинамического диаметра. При соотношении компонентов 2:1 или 1:1 значение дзета-потенциала достигает значений -40 м, при этом гидродинамический диметр равняется 41 нм. Однако при соотношении компонентов 1:1 по данным ВЭЖХ наблюдается пик, соответствующий свободному гепарину, означающий, что гепарин в реакционной смеси находится в избытке. На фиг. 8 и фиг. 9 представлена зависимость параметров полупродукта (2) от соотношения компонентов.

Варьирование времени проведения реакции проводили в диапазоне 10-90 минут. Контролируя процесс методами ВЭЖХ, определением распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света и методом электродиамического рассеяния света были выявлены следующие закономерности: увеличение времени реакции способствует более полному протеканию реакции и формированию стабильного коллоидного раствора. Во время протекания процесса гидродинамический диаметр частиц возрастает с 30 нм до 41 нм, дзета-потенциал изменяется с +33 мВ до -40 мВ, на хроматограмме исчезает пик, соответствующий гепарину. Оптимальным было найдено время 60 минут, после которого не происходит изменения параметров системы.

Таким образом, суммарный выход целевого полупродукта (2) по этой схеме составляет 100% (фиг. 7).

Используя оптимизированные условия проведения процесса можно получать полупродукт стабильный гидрозоль магнетита покрытый слоем гепарина в количестве

480 мл/сутки, что соответствует 9,6 гр/сутки, при этом не образуется побочных продуктов и отходов.

III. Получение урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

Цель третьего этапа синтеза - разработка препаративного метода получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал (3). Полученный на предыдущей стадии стабильный гидрозоль наночастиц магнетита, покрытых оболочкой гепарина (2) использовали для энтрапирования фермента урокиназы, получая целевой продукт урокиназу, энтрапированную в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал (3) (фиг. 10).

Оптимизацию схемы синтеза проводили, варьируя соотношение компонентов, время протекания реакции, способ конденсации.

Систему оценивали по следующим параметрам: размер получаемых частиц, дзета-потенциал получаемых частиц, стабильность получаемых частиц, выход реакции, степень конверсии реагентов, образующиеся примеси.

Варьирование соотношения компонентов в реакционной смеси полупродукт (2) : урокиназа проводили в диапазоне соотношений 20:1-1:1.

Оценка параметров системы методами ВЭЖХ, определением распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света, методом электродиамического рассеяния света и методами спектроскопии в УФ и видимой областях выявили следующие закономерности: увеличение относительного количества фермента в составе композитного материала приводит к увеличению активности композита, однако при соотношениях компонентов полупродукт (2) : урокиназа более 10:1 наблюдается рост количества несвязанного свободного фермента в реакционной смеси, что означает, что достигнут предел иммобилизации. При соотношении компонентов 10:1 наблюдается лишь незначительное количество примеси свободного фермента. На фиг. 11 представлена зависимость параметров полупродукта (2) от соотношения компонентов.

Варьирование времени протекания процесса проводили в диапазоне 30-120 минут. Контролируя процесс методами ВЭЖХ, определением распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света и методом электродинамического рассеяния света были выявлены следующие закономерности: увеличение времени реакции способствует более полному протеканию реакции и формированию стабильного коллоидного раствора продукта (3). При проведении реакции до 60 минут происходит уменьшение пика, соответствующего свободному ферменту, после периода 60 минут изменения вида хроматограммы не наблюдается.

Варьирование условий конденсации заключалось в подборе условий высушивания и режима лиофилизации. Для этого продукт (3) лиофилизировали, используя режимы, в которых варьировали изменение температуры полки лиофильной сушилки во времени (таблица 1).

Таблица 1 - Сравнение режимов лиофилизации

Температура, °С	скорость нагрева полки лиофильной сушилки (°С/ч)		
	№1 с быстрым замораживанием	№2 со средним замораживанием	№3 с медленным замораживанием
-50	Выдержка в течение 5 часов и давлении в камере 0,01 мБар		
От -50 до -10	5	3	2
от –10 до 0	5	3	2
от 0 до +20	5	3	2
+20	Выдержка в течение 4 часов и давлении в камере 0,01 мБар		

Результаты оценивали методами ВЭЖХ, определением распределения частиц по размеру методом лазерной дифракции света, оценивали растворимость в растворителе для инъекций, прозрачность 0,1% раствора. В результате проведенных исследований было установлено, что режимы №2, и №3 соответствуют нормам показателей качества, однако при лиофилизации режимом №1 происходило слишком быстрое размораживание продукта, что приводило к нарушению наноструктуры и потере активности композитного материала, и не соответствовало качеству на суспендируемость. В целях экономии затрат на электроэнергию целесообразно использовать режим №2 Таким образом, суммарный выход целевого соединения урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал составляет 99% (фиг. 10).

Эффективность, безопасность и фармакокинетика синтезированного лекарственного препарата.

Выявленная способность представленного образца магнетита растворять экспериментальные тромбы в крупных сосудах у лабораторных животных позволяет предположить возможность использования препарата для лечения тромбозов у человека. Препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) показал эффективность при тромболитической терапии, многократно превышающую таковую для препарата сравнения на двух видах животных.

По результатам проведенного исследования по полуколичественному определению содержания железа в образцах тканей после магнитной сепарации можно сделать вывод о том, что материал носителя в виде магнитных наночастиц после внутривенного введения препарата довольно быстро перераспределяется из кровяного русла в такие органы, как печень и селезенка. При этом абсолютные значения концентрации магнитных частиц (в пересчете на железо) в печени ниже, чем в селезенке. Однако, превышая по массе селезенку примерно в 50 раз печень становится основным органом, в котором магнитные наночастицы могут в течение некоторого времени сохраняться. По данным ряда исследований, выполненных на животных, общепринятым является мнение о том, что магнетит в виде наночастиц, поступая в печень, постепенно преобразуется в другие соединения железа, которые, как было показано в экспериментах с радиоактивно меченым материалом, могут сохраняться в организме довольно долго,

в том числе включаясь в состав гемопротеинов и других железосодержащих белков. По результатам нашего исследования было показано, что в течение семи суток после введения лекарственного препарата МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) его уровень содержания в биосредах снижается практически до фоновых значений.

Следует заметить, что оптимальным способом оценки содержания магнитных наночастиц в различных тканях является прижизненное измерение времени релаксации с использованием магнитного резонанса. Примененные в настоящем исследовании методы анализа содержания железа в биосредах после магнитной сепарации дают представление о распределении магнитных частиц по органам и тканям, но не позволяют дать строго количественную оценку содержанию наночастиц в тканях. Сложная пробоподготовка не может гарантировать отсутствие потерь части материала в процессе обработки и отмывки от гемопротеинов, присутствующих во всех тканях и органах. Поэтому к полученным в результате настоящего исследования результатам следует относиться как к характеристикам, позволяющим оценить распределение частиц в тканях, но не дающим строго количественного описания процесса.

Что касается фармакокинетики самого фермента урокиназы, то по результатам выполненного исследования можно сказать, что определение активности фермента урокиназы после непродолжительного контакта с биосредами, содержащими белковые ингибиторы сериновых протеиназ (серпины) практически невозможно. Это связано с тем, что ингибиторный потенциал крови и других тканей, где присутствуют эндогенные ингибиторы протеаз, достаточен для того, чтобы полностью ингибировать активность урокиназы в отношении специфического хромогенного субстрата. Это, однако, не исключает того, что фермент, энтрапированный в магнитные наночастицы, может сохранять активность в отношении своих белковых субстратов.

Проведенные экспериментальные исследования показали, что при остром введении экспериментальным животным (мышам, крысам, кроликам) препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) можно охарактеризовать как малотоксичное средство. Острая токсичность при внутривенном введении мышам самцам и самкам составляет ЛД50=4333000 (2861000÷6561000) МЕ/кг, ЛД16=42293000 МЕ/кг, ЛД84=5379000 МЕ/кг. Острая токсичность при внутривенном введении крысам самцам и самкам составляет ЛД50= 2533000 МЕ/кг (1335000÷4806000) МЕ/кг, ЛД16=901000 МЕ/кг, ЛД84=4165000 МЕ/кг.

Таким образом, терапевтическая доза препарата для крыс (534 МЕ/кг) составляет 0,02% от его средней токсической дозы, что свидетельствует о большой широте терапевтического действия испытуемого лекарственного средства.

После многократного (в течение 14 дней) ежедневного внутривенного введения препарата крысам обоего пола во всем исследованном диапазоне доз не наблюдались изменения в общем состоянии, не проявлялись признаки выраженного токсического действия лекарственного средства.

При этом, признаками токсического действия препарата можно считать повышение ректальной температуры крыс в опытных группах на 14 день внутривенного введения препарата в 5-ти и 10-ти кратной терапевтической дозе, как у самцов, так и у самок. Установлено достоверное повышение активности аминотрансфераз АсАТ, АлАТ после введения испытуемого препарата в 10-ти кратной терапевтической дозе в течение 14-ти дней, как у самцов, так и у самок, а также наблюдалась отчетливая тенденция к понижению показателей гематокрита.

Препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный

керамический нанокомпозитный материал) также вызывал повышение общей антиоксидантной активности плазмы крови в группах животных, получавших 10-кратную терапевтическую дозу исследуемого препарата. Этот феномен можно объяснить компенсаторным ростом антиоксидантного потенциала в ответ на наличие железа в структуре нанокомпозитного носителя, являющегося естественным активатором свободно - радикальных окислительных процессов.

Однако, эти изменения носили обратимый характер и через 60 дней после отмены препарата показатели не отличались от контрольных.

После многократного (в течение 14 дней) ежедневного внутривенного введения препарата кроликам не наблюдались изменения в общем состоянии, не проявлялись признаки выраженного токсического действия лекарственного средства во всем изученном диапазоне доз.

Признаками токсического действия препарата можно считать повышение активности аминотрансфераз АсАТ, АлАТ после введения испытуемого препарата в 10-ти кратной терапевтической дозе в течение 14 дней, как у самцов, так и у самок. Кроме того, наблюдалась отчетливая тенденция к понижению показателей гематокрита.

Как и в экспериментах на крысах установлено достоверно значимое ($p \leq 0,05$) повышение общей антиоксидантной активности плазмы крови в группах животных, получавших 10-кратную терапевтическую дозу исследуемого препарата. Этот феномен можно объяснить компенсаторным ростом антиоксидантного потенциала в ответ на наличие железа в структуре нанокомпозитного носителя, являющегося естественным активатором свободно - радикальных окислительных процессов.

Отмеченные изменения носили обратимый характер и через 60 дней после отмены препарата не отличались от контрольных показателей.

Патоморфологическое исследование органов подопытных животных (крыс и кроликов) показало, что «подострое» в течение 14 суток внутривенное введение кроликам препарата МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) во всем изученном диапазоне доз не вызывает заметных структурных изменений, нарушений гистологического строения внутренних органов и развития воспалительных и дистрофических процессов.

При изучении местно-раздражающего действия было установлено, что многократное внутривенное введение препарата МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) не вызывает местно-раздражающего действия.

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) можно охарактеризовать как малотоксичное средство с большой широтой терапевтического действия. Признаки токсического действия не носят выраженного характера, проявляются при введении больших доз препарата и носят транзиторный характер.

Для оценки аллергизирующих, в том числе анафилактогенных свойств препарата МТК15-Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) использовали различные экспериментальные модели аллергии, воспроизведенные на экспериментальных животных различных видов (морские свинки, крысы, мыши). Анафилактогенные свойства урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал оценивали на модели системной анафилаксии у морских свинок; сенсибилизирующие свойства препарата оценивали при моделировании активной кожной анафилаксии у мышей и при постановке

конъюнктивальной пробы у крыс. Тестирование препарата МТК15-Г проводили с использованием 2-х диапазонов доз: терапевтической дозы и 10-ти кратной терапевтической дозы. Препарат считали потенциальным аллергеном, если число сенсибилизированных животных в группе составляло свыше 50%. Если число сенсибилизированных животных в группе по одному из испытанных тестов составляло менее 50%, то наблюдаемые эффекты расценивали как проявление индивидуальной реакции на препарат. Адекватность и чувствительность выбранных экспериментальных моделей аллергии подтверждали постановкой позитивного контроля, проведенного с использованием известных аллергенов.

Анализ результатов проведенного экспериментального исследования аллергизирующих, в том числе анафилактогенных свойств препарата МТК15-Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) показал, что при применении препарата возможно развитие аллергических реакций немедленного типа в качестве индивидуальной реакции. Отмечено, что в тесте активной кожной анафилаксии у мышей как при использовании тестируемого препарата в дозах 1 ТД и 10 ТД - частота аллергических реакций составила 10%. В связи с тем, что число выявленных реакций при постановке данного теста составило менее 50%, их можно рассматривать в качестве проявлений индивидуальной чувствительности. В реакциях системной анафилаксии у морских свинок и при постановке конъюнктивальной пробы у крыс аллергизирующих свойств у урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал обнаружено не было.

Оценка иммунотоксичности препарата МТК15-Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) включала суммарную оценку состояния гуморального иммунитета (реакция гемагглютинации; определение содержания антителообразующих клеток (АОК) при иммунизации эритроцитами барана), реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей, суммарную оценку состояния клеточной естественной резистентности (фагоцитоз, хемотаксис), лизосомально-катионный тест (ЛКТ - тест), тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ - тест).

Проведенные исследования показали, что препарат МТК15-Г не влиял на титры гемагглютининов в реакции гемагглютинации, не вызывал угнетения Т-зависимого антителообразования в АОК тесте. Исследуемый препарат не угнетал хемотаксис нейтрофилов и фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у крыс. Препарат МТК15-Г не менял значения среднего цитохимического коэффициента в лизосомально-катионном тесте и не оказывал существенного влияния на кислородзависимую биоцидность фагоцитов морских свинок в тесте восстановления нитросинего тетразолия.

Таким образом, результаты экспериментального исследования свидетельствуют о том, что препарат МТК15-Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) не обладает иммунотоксическими свойствами.

Препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) был протестирован на генотоксичность в цитогенетическом тесте по учету хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей и в тесте учета генных мутаций на индикаторных штаммах Salmonella typhimurium для исключения генетических последствий при его применении. Также была исследована способность препарата вызывать повреждения ДНК (тест ДНК-комет). Было продемонстрировано, что препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) в дозах 1 ТД (1000

МЕ/кг) и 10 ТД (10000 МЕ/кг) не вызывает увеличение числа хромосомных аномалий у мышей и не вызывает повреждения ДНК, в дозах 0,044-22 мкл стокового раствора на чашку не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса.

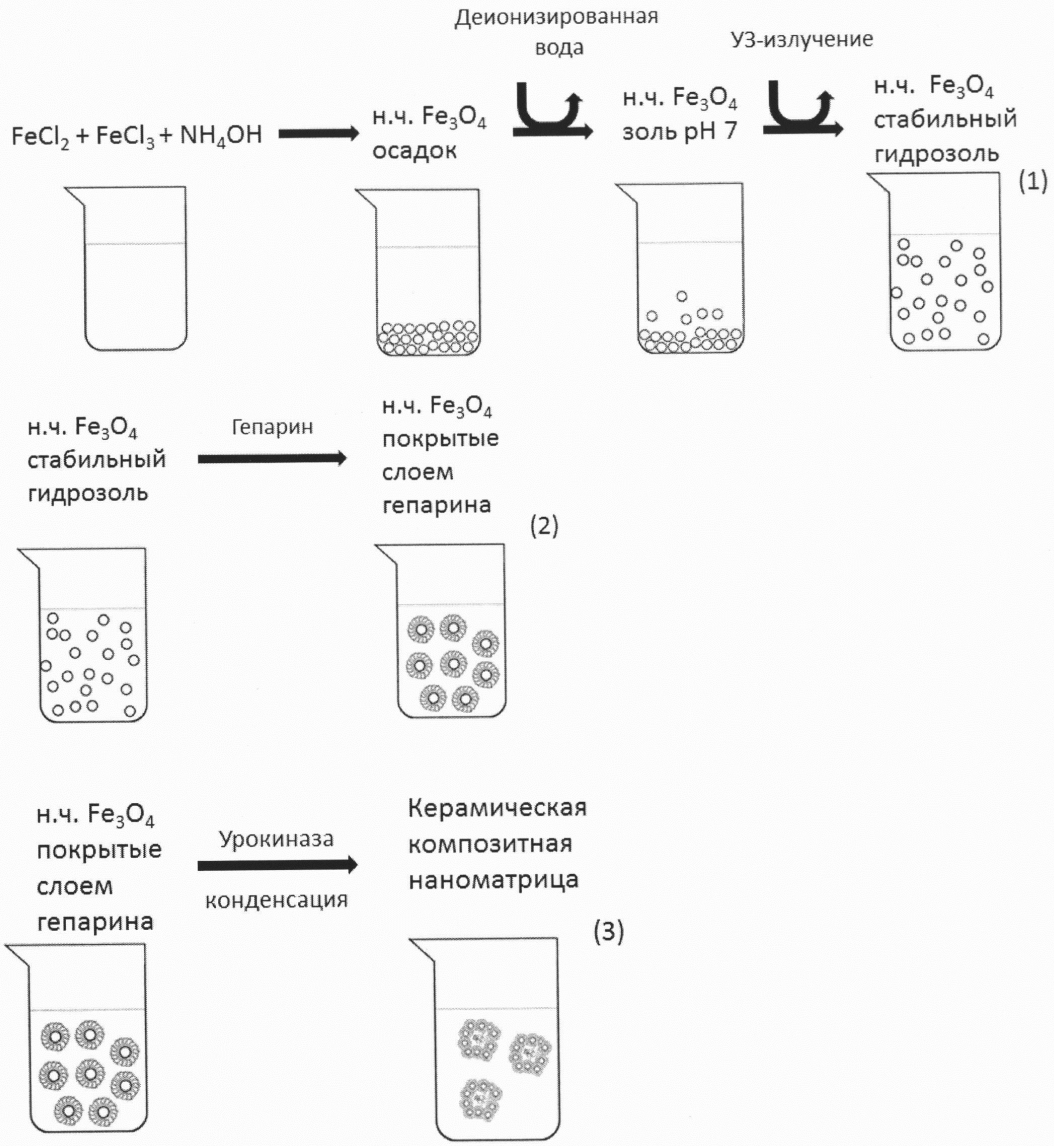
Таким образом, полученный предлагаемым способом препарат МТК-15Г (урокиназа, энтрапированная в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал) может эффективно и безопасно применяться в качестве лекарственного средства для топической терапии тромботических состояний конечностей.

(57) Формула изобретения

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал, включающий получение стабильного гидрозоля наночастиц магнетита путем соосаждения водного раствора смеси хлоридов железа(II) и (III) при соотношении 1,5:1-2.2:1 25% водным раствором аммиака в диапазоне не менее 8 мольных эквивалентов до образования осадка из агрегированных наночастиц магнетита, который отделяют при помощи магнитного поля, после чего надосадочную жидкость декантируют, а осадок промывают деионизированной водой до нейтрального значения уровня pH промывных вод и добавляют деионизированную воду, затем подвергают УЗ-облучению, мощность которого 1 Вт/см^3 и выше, в течение 75-120 минут, полученный стабильный гидрозоль наночастиц магнетита инкубируют с водным раствором гепарина в соотношении 1:15 в течение 60 минут до формирования стабильного коллоидного раствора и осуществляют энтрапирование фермента урокиназы в соотношении 1:10 в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал в течение 60 минут.

1

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

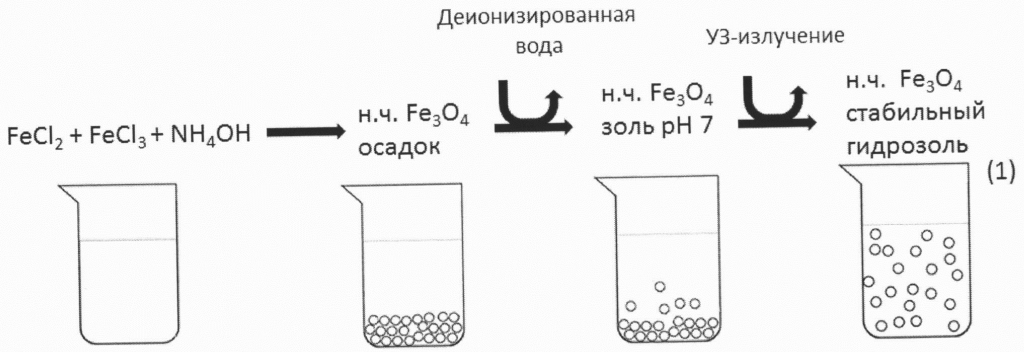


ФИГ.1

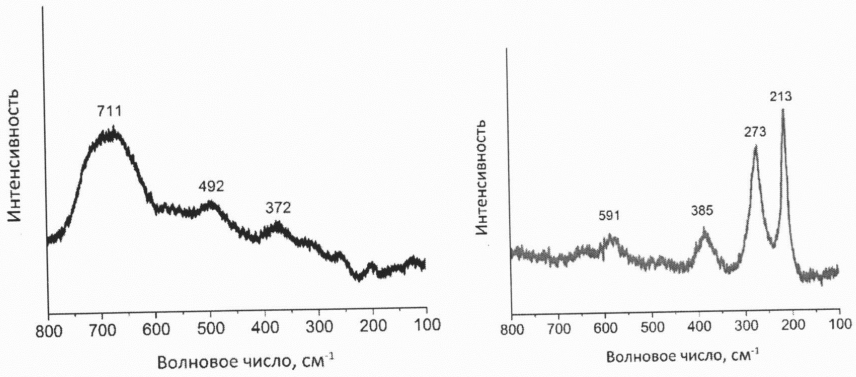
1

2

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал



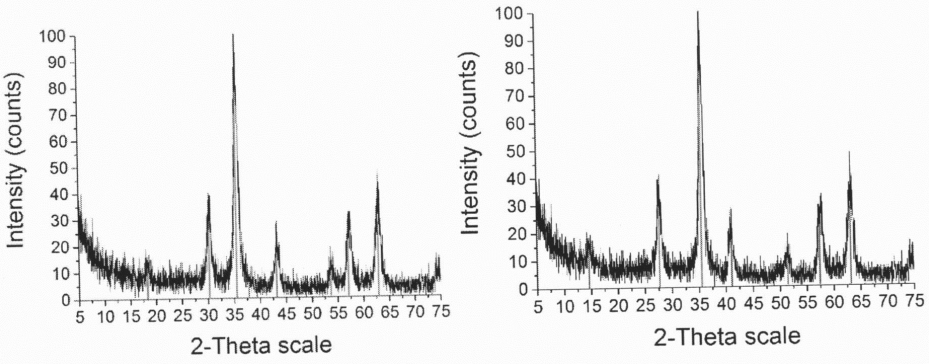
ФИГ. 2



а б

ФИГ. 3

3

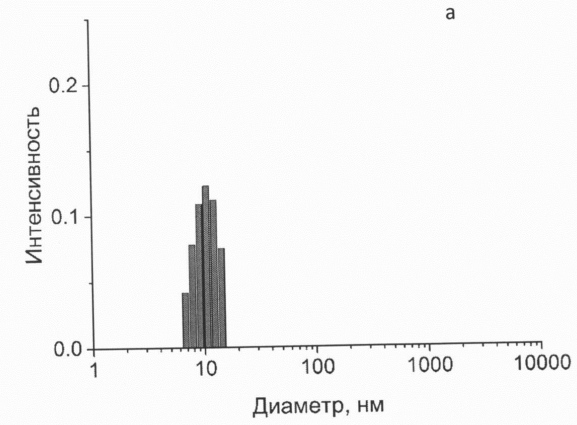

Intensity (counts)
2-Theta scale
Intensity (counts)
2-Theta scale

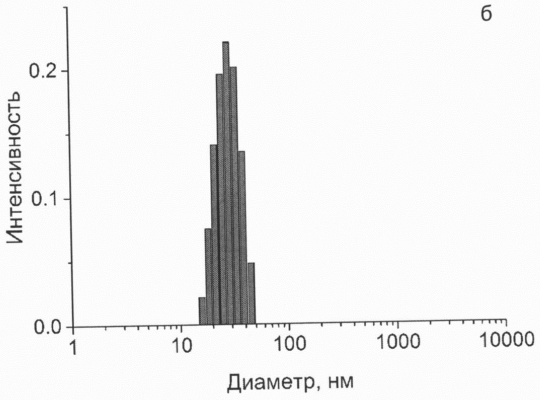
а б

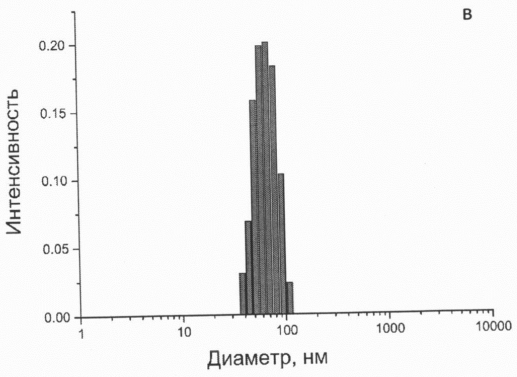
ФИГ. 4

4

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал



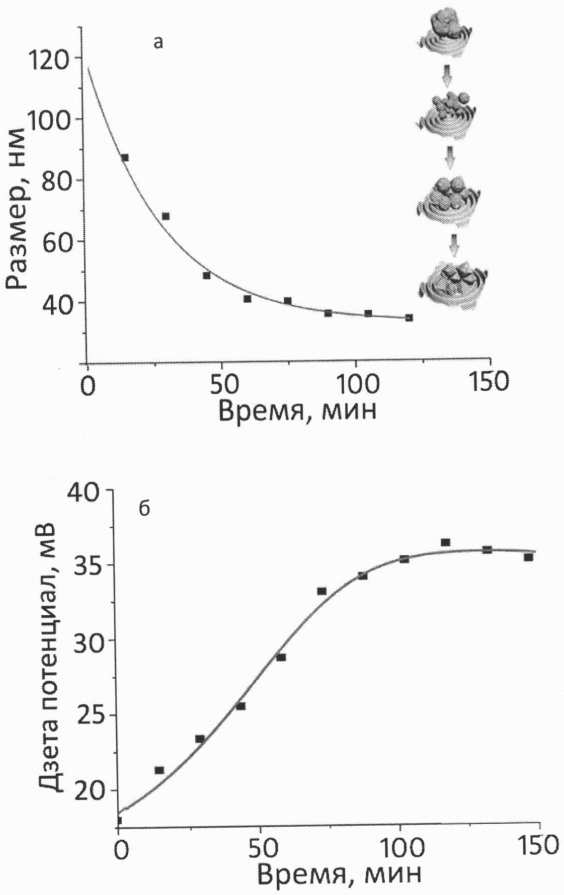




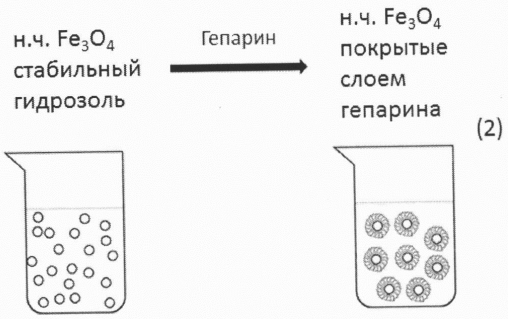
ФИГ 5.

5

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

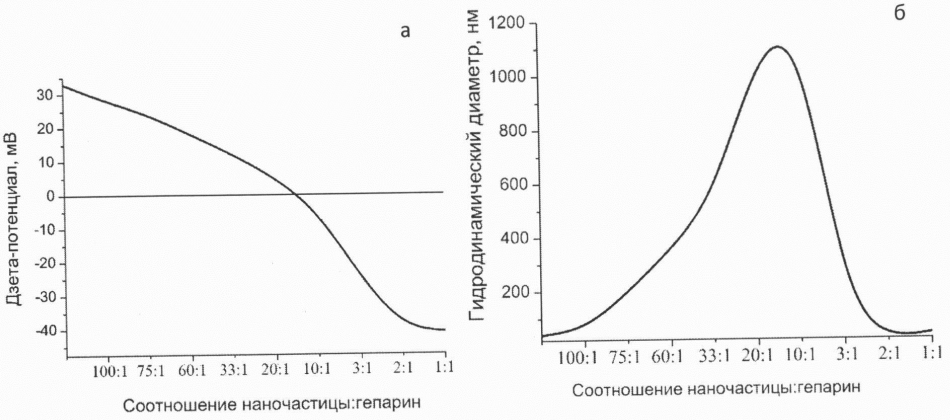


ФИГ. 6

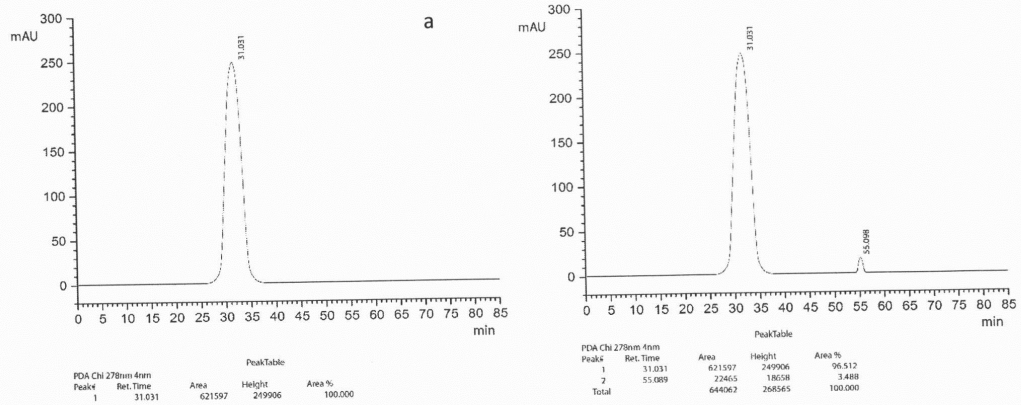


ФИГ. 7

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал

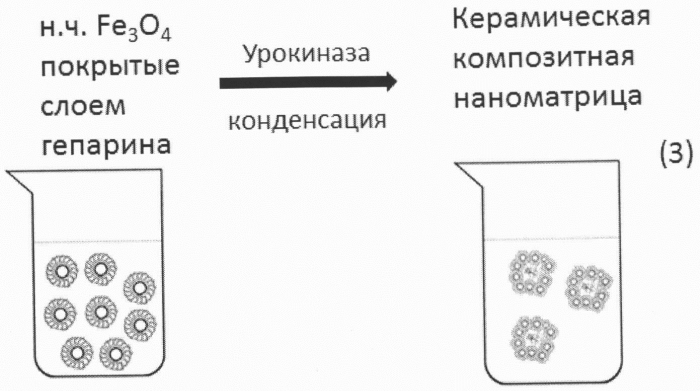


ФИГ. 8

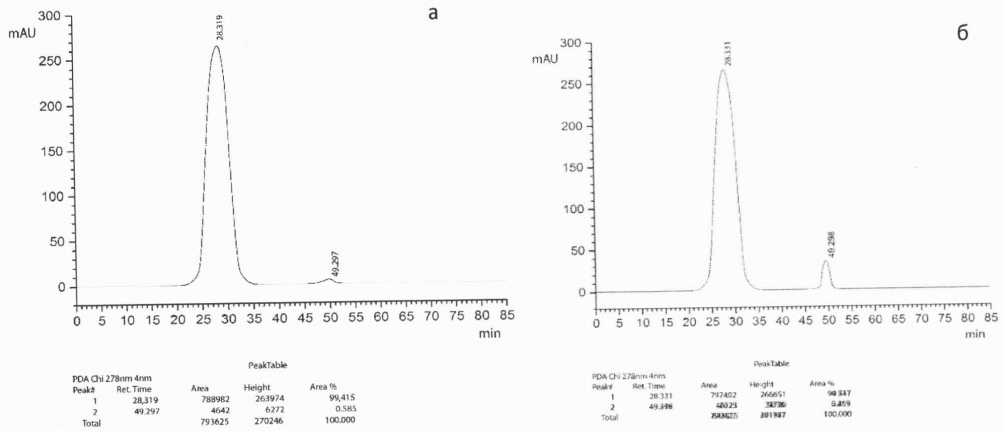


ФИГ. 9

Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокомпозитный материал



ФИГ. 10



ФИГ. 11