

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042949**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.06

(21) Номер заявки
202090767

(22) Дата подачи заявки
2018.05.04

(51) Int. Cl. **A61K 31/714** (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ОСНОВЕ ПОЛИМИКСИНА
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ СО СНИЖЕННОЙ
НЕФРОТОКСИЧНОСТЬЮ**

(43) **2020.08.03**

(86) **РСТ/RU2018/000290**

(87) **WO 2019/212377 2019.11.07**

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

(72) Изобретатель:
**Фарбер Борис Славинович (RU),
Мартынов Артур Викторович (UA),
Клейн Илья Рувимович (US)**

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

(56) US-A1-2016082073

TAKAHATA Y. et al. Synthesis, properties and
microbiological activity of hydrophobic derivatives of
vitamin B12. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo), 1995,
41(5), p. 515-526

WO-A1-2012070968

WO-A1-2004024761

HEMMINKI K. et al. Comparison of alkylation
rates and mutagenicity of directly acting industrial
and laboratory chemicals: epoxides, glycidyl ethers,
methylating and ethylating agents, halogenated
hydrocarbons, hydrazine derivatives, aldehydes,
thiuram and dithiocarbamate derivatives. Arch
Toxicol., 1980, 46(3-4), 277-285

(57) Изобретение относится к медицине и фармации и позволяет получить новые фармацевтические композиции на основе полимиксина для терапии тяжелых инфекционных заболеваний, не обладающих нефротоксическими свойствами в терапевтических дозах. Предлагается фармацевтическая композиция на основе полимиксина для лечения инфекционных заболеваний, включающая комбинацию витаминов с супрамолекулярным комбинаторным производным цианокобаламина, полученным одновременной ковалентной модификацией структуры цианокобаламина янтарным и уксусным ангидридами, где мольное соотношение компонентов составило 20:21:21. При этом в качестве витаминов композиция включает холекальциферол, или викасол, или аскорбиновую кислоту. Техническим результатом является получение новых комбинированных лекарственных форм на основе антибиотика полимиксина с низкой нефротоксичностью и высокой активностью.

B1

042949

**042949
B1**

Область техники

Изобретение относится к фармации и медицине, позволяет получить новые фармацевтические композиции на основе полимиксина со значительно сниженной нефротоксичностью и повышенной бактерицидной активностью.

Предшествующий уровень техники

Терминология

В биохимии и фармакологии лиганд - это химическое соединение, которое образует комплекс с той или иной биомолекулой (чаще всего белком) и производит вследствие такого связывания те или иные биохимические, физиологические или фармакологические эффекты. В случае связывания лиганда с белком лиганд обычно является малой сигнальной молекулой, связывающейся со специфическим участком связывания на белке-мишени (например, на рецепторе). Связывание лиганда с рецептором обычно происходит при помощи сил межмолекулярного взаимодействия, таких как ионные связи, водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса. Связывание или ассоциация лиганда с рецептором (так называемый "докинг" лиганда в специфическую "нишу" в рецепторе) обычно обратимы и кратковременны.

Связывание лиганда с рецепторным белком изменяет его конформационное состояние (трёхмерную пространственную конфигурацию). А это, в свою очередь, может приводить к изменению функционального состояния белка (например, к активации или инактивации рецептора или фермента, к диссоциации одной из субъединиц составного белка, или, наоборот, к обретению белком в результате связывания с лигандом способности присоединять другой специфический лиганд или другой белок, или к открытию сопряжённого с белком ионного канала, или к самофосфорилированию или иной самомодификации белка, или появлению возможностей для его фосфорилирования или иной модификации другим белком и т.д.). В понятие "лиганда" включаются и субстраты ферментов, и распознаваемые антителами антигены, и разнообразные агонисты, антагонисты и обратные агонисты, в том числе эндогенные, такие как нейромедиаторы, гормоны, цитокины и хемокины, и ингибиторы и активаторы тех или иных ферментов или регуляторных белков, и факторы транскрипции, и экзогенные, такие как лекарства, и т.д.

Сила связывания лиганда с белком-мишенью (например, рецептором) называется "сродством", или аффинностью, лиганда к белку-мишени (например, рецептору). Сила связывания лиганда с белком-мишенью определяется не только силой прямых взаимодействий лиганда с данным белком (например, рецептором), но и микроокружением белковой молекулы, в частности, присутствующими вокруг молекулами растворителя, которые могут играть доминантную роль в обеспечении адекватных межмолекулярных взаимодействий нековалентного характера между лигандом и белком-мишенью (вода, липиды клеточной мембраны) и белков-партнёров (в случае, например, олигомерных рецепторов или G-белок-связанных рецепторов). В частности, повышение сродства трансмембранных рецепторов к эндогенным агонистам в присутствии холестерина и сфинголипидов является причиной того, что эти рецепторы, как правило, размещаются в определённых местах клеточной мембраны, называемых липидными рафтами и обогащённых холестерином и сфинголипидами.

Степень сродства лиганда к рецептору (аффинность лиганда к рецептору). Взаимодействие большинства лигандов с их сайтами связывания может быть охарактеризовано в терминах степени сродства лиганда к рецептору (аффинности лиганда к рецептору). В целом, высокая степень сродства того или иного лиганда к данному конкретному подтипу рецепторов (высокая аффинность лиганда к этому подтипу рецепторов) является результатом более сильного межмолекулярного взаимодействия между рецептором и его лигандом, и наоборот - меньшая степень сродства лиганда к данному рецептору (меньшая аффинность к этому рецептору) является, как правило, следствием меньшей силы межмолекулярного взаимодействия между ними. Это также означает, что, в целом, высокоаффинное (т.е. с высоким сродством, иначе говоря, сильное) связывание лиганда с рецептором предполагает более продолжительное по времени пребывание лиганда на рецепторе (а значит, и больший процент занятости рецепторов при сравнительно низких дозах или концентрациях лиганда). Кроме того, высокая аффинность связывания лиганда с рецептором (высокое сродство лиганда к нему) часто имеет важные физиологические последствия, поскольку некоторая часть энергии связывания лиганда с рецептором (которая, естественно, выше при "высокоаффинном", с высоким сродством, связывании, как предполагающем большую силу межмолекулярного взаимодействия) может быть использована для изменения пространственной конфигурации рецептора, которая, в свою очередь, может привести к активации или, наоборот, деактивации рецептора и к открытию связанного с рецептором ионного канала или к изменению поведения (повышению или снижению активности) связанного с рецептором фермента или регуляторного белка. Таким образом, более аффинный (имеющий более высокое сродство к рецептору) лиганд с большей вероятностью окажется физиологически и фармакологически активным (т.е. проявляющим ту или иную степень внутренней агонистической активности, с каким бы знаком она ни была - агонистом или же обратным агонистом). Однако это не гарантировано - высокоаффинные "нейтральные антагонисты", а вернее, агенты, близкие к нейтральным антагонистам, т.е. имеющие очень малую по модулю внутреннюю агонистическую активность, близкую к нулю, но тем не менее проявляющие высокую или очень высокую степень сродства к рецептору, аффинности к нему - тоже существуют.

Два агониста со сходной степенью сродства к рецептору (сходной аффинностью).

Рецепторный лиганд, который может связываться с рецептором, изменять пространственную конфигурацию этого рецептора таким образом, что это приводит к его активации, и быть, как следствие этого способным вызывать тот или иной физиологический или биохимический ответ клетки (быть триггером такого ответа), называется агонистом по отношению к этому рецептору. Связывание агониста с рецептором может быть охарактеризовано как с точки зрения того, насколько велик максимальный физиологический ответ, который может быть получен при стимуляции максимально доступного количества рецепторов данным конкретным агонистом ("внутренняя агонистическая активность"), так и с точки зрения того, какая молярная концентрация данного агониста требуется для вызывания физиологического ответа той или иной силы ("кривая зависимости доза-эффект"), и с точки зрения того, какая молярная концентрация данного агониста требуется для того, чтобы вызвать физиологический ответ в 50% от максимально достижимого для данного агониста ("половинная максимальная эффективная концентрация", или EC_{50} , $ЭК_{50}$). Таким образом, определённая и измеренная величина EC_{50} как раз и является количественной характеристикой меры аффинности агониста к рецептору (меры его сродства к нему). Если же измерять концентрацию, которая требуется для получения 50% от "максимально достижимого физиологического ответа вообще", а не 50% от максимально достижимого для данного конкретного агониста (принимая за максимально достижимый, т.е. за 100% - максимальный эффект от эндогенного агониста), то получим значение EC_{50} , которое зависит как от значения аффинности агониста (степени его сродства к рецептору), так и от соотношения его внутренней агонистической активности к внутренней агонистической активности эндогенного агониста, принятой за 100%. Таким образом, определённая EC_{50} будет количественной мерой не одной только лишь аффинности, а молярной активности вещества (его "потентности"), которая есть функция и от аффинности (сродства к рецептору), и от внутренней агонистической активности ("рецепторной эффективности") данного лиганда.

Таким образом, высокоаффинное (с высоким сродством) связывание лиганда с рецептором означает, что относительно низкая концентрация лиганда требуется для обеспечения полной (максимально возможной для данной рецепторной системы) занятости участков связывания данного лиганда на рецепторах и вызывания максимально возможного для данного лиганда физиологического ответа (величина которого зависит от "внутренней агонистической активности" лиганда). То есть, чем ниже значение K_i , характеризующее аффинность связывания лиганда с рецептором, тем более вероятным является образование химической связи между молекулами лиганда и молекулами рецептора в результате случайного столкновения молекул при броуновском движении (так как между ними больше сила межмолекулярного взаимодействия). А большая сила межмолекулярного взаимодействия означает и большее среднее время удержания лиганда на рецепторе (большую продолжительность существования нековалентной химической связи). И наоборот, низкоаффинное связывание (с низким сродством к рецептору), т.е. высокое значение K_i , означает, что для достижения максимальной занятости всех доступных участков связывания и вызывания максимального физиологического ответа, возможного для данного конкретного агониста, требуются относительно высокие концентрации данного лиганда. Это также значит, что образование химической связи между данным лигандом и рецептором в результате случайного столкновения молекул при броуновском движении для менее аффинного агониста (имеющего меньшее сродство к рецептору) менее вероятно, поскольку между ними меньше сила межмолекулярного взаимодействия и оно менее специфично. А среднее время удержания лиганда на рецепторе у низкоаффинного (имеющего малое сродство к рецептору) меньше, он быстрее освобождает рецептор и быстрее диссоциирует из связи с ним. Более высокая концентрация для низкоаффинного лиганда необходима как раз потому, что она повышает вероятность "случайного столкновения" молекул низкоаффинного лиганда с рецептором и вероятность образования химической связи между ними.

Лиганды, которые связываются с рецепторами, однако не могут или почти не могут активировать рецептор (вернее делают это с пренебрежимо малой вероятностью) и соответственно сами по себе не могут вызывать и не вызывают физиологического ответа рецепторной системы, а лишь предотвращают связывание как агонистов, так и обратных агонистов и физиологический ответ на них, называются антагонистами. Связывание лиганда с рецептором часто характеризуют в терминах того, какая концентрация лиганда требуется для того, чтобы занять 50% от всех доступных участков связывания рецепторов - так называемая IC_{50} . Величина IC_{50} связана с константой диссоциации K_i , но отличается от неё. Она отличается также и от величины EC_{50} , поскольку занятие 50% доступных рецепторов вовсе необязательно приводит к продуцированию 50% от максимального физиологического ответа для данного агониста или 50% от максимального физиологического ответа "вообще" (IC_{50} может быть как больше, так и меньше EC_{50} , в зависимости от особенностей регуляции конкретной физиологической рецепторной системы - существуют как рецепторные системы, в которых занятие относительно малого количества рецепторов приводит большой физиологический эффект, так и, наоборот, системы, в которых для создания значительного физиологического эффекта нужно занять большой процент доступных рецепторов, причём зависимость величины физиологического эффекта от процента занятости рецепторов, так же как и от дозы агониста, вовсе не обязана быть линейной). Если оба лиганда присутствуют одновременно, то больший процент высокоаффинного (имеющего более высокое сродство к рецептору) лиганда будет связан с доступными сайтами связывания рецептора по сравнению с менее аффинным лигандом. Этот механизм объяс-

няет, в частности, то, почему оксид углерода (II) даже в низких концентрациях может конкурировать с кислородом за связывание с гемоглобином, являясь более высокоаффинным (имеющим большее сродство к гемоглобину) "агонистом" этого транспортного белка, и почему это часто приводит к отравлению угарным газом.

Аффинность связывания лиганда с рецептором (степень сродства лиганда к рецептору) чаще всего определяют с использованием метода вытеснения меченого радиоактивного лиганда (называемого "горячим лигандом") исследуемым лигандом (называемым "холодным", или "тестовым" лигандом). Эксперименты по гомологичному конкурентному связыванию лиганда с рецептором представляют собой эксперименты, в которых "горячий" (меченный радиоактивной меткой) и "холодный" (не помеченный) лиганд - это одно и то же химическое вещество, и они конкурируют между собой за доступные участки связывания с рецептором. Существуют также методы без использования радиоактивной метки, такие как поверхностный плазмонный резонанс, двойная поляризационная интерферометрия. Эти методы позволяют определить не только аффинность (степень сродства) агониста к рецептору, но и кинетику его ассоциации и диссоциации из связи с рецептором, а в случае двойной поляризационной интерферометрии - ещё и конфигурационные изменения рецептора, вызванные связыванием с ним агониста. В последнее время был разработан также метод микротермофореза. Этот метод позволяет определять аффинность связывания, не накладывая никаких ограничений на молекулярную массу лиганда.

Для анализа полученных данных о кинетике связывания лиганда с рецептором и об его аффинности используются методы статистической механики, в частности вычисление т. н. "конфигурационного интеграла".

Сродство к рецепторам (аффинность) и молярная активность ("потентность") лиганда.

Степень сродства лиганда к рецепторам, или так называемая "аффинность" лиганда к рецепторам сама по себе ещё не определяет молярную активность (общую "потентность") того или иного лиганда. Молярная активность (потентность) вещества является результатом сложного взаимодействия между его степенью сродства к рецепторам и его внутренней агонистической активностью (иначе говоря, его рецепторной эффективностью). Внутренняя агонистическая активность (рецепторная эффективность) - это количественная характеристика способности данного лиганда вызывать тот или иной биологический ответ после связывания с рецептором, и мера величины вызываемого им биологического ответа, в процентах от максимально возможного биологического ответа, за который принимается максимальная стимуляция эндогенным агонистом (100%). В зависимости от природы, характера, знака и величины по модулю вызываемого лигандом биологического ответа, он классифицируется либо как агонист или даже супер-агонист, либо как частичный агонист, либо как нейтральный антагонист, либо как обратный агонист.

Селективные и неселективные лиганды.

Селективные лиганды имеют тенденцию в клинически/физиологически релевантных концентрациях клинически/физиологически значимо связываться только с достаточно ограниченным набором подтипов рецепторов (необязательно все эти подтипы будут рецепторами к одному и тому же эндогенному лиганду). В то же время неселективные лиганды имеют тенденцию в релевантных концентрациях значимо связываться с достаточно широким набором подтипов рецепторов (часто - к разным эндогенным лигандам) и, тем самым, производить более широкий спектр клинических, биохимических и физиологических эффектов, как желательных, так и, нередко, нежелательных побочных эффектов. Селективность лиганда является понятием достаточно условным и относительным, поскольку существует очень мало истинно селективных лигандов, которые связываются только с одним подтипом рецепторов во всём диапазоне "разумных", клинически достижимых у человека концентраций, и ещё меньше лигандов, способных сохранять 100% селективность в тех концентрациях, которые можно создать в экспериментах на животных и тем более "в пробирке" (*in vitro*). Часто кажущаяся относительная селективность того или иного лиганда теряется при повышении дозы или концентрации (т.е. в более высоких концентрациях или дозах он начинает взаимодействовать и с другими подтипами рецепторов), и это имеет важное клиническое значение (так, высокие дозы селективного агониста опиоидных рецепторов бупренорфина способны значимо угнетать дыхание и вызывать эйфорию, так как селективность по сравнению с морфином утрачивается; аналогичным образом высокие дозы селективных β -адреноблокаторов способны вызывать бронхоспазм, так как утрачивается селективность к подтипу β_1 , а высокие дозы β_2 -адреностимуляторов помимо устранения бронхоспазма способны также вызывать тахикардию; высокие дозы атипичных антипсихотиков наподобие рисперидона и оланзапина способны вызывать экстрапирамидные побочные явления, подобно типичным антипсихотикам).

Мерой относительной селективности того или иного лиганда является величина соотношения его сродства (аффинности) к "желаемому", "основному" подтипу рецепторов (например, к D2, в случае антипсихотиков) и к ближайшему следующему по порядку величины показателю сродства (аффинности) подтипу рецепторов, т.е. значение соотношения $K_i(1)/K_i(2)$. Более высокоаффинные к "желаемому" типу рецепторов, более высокоактивные ("более высокопотентные") соединения часто, хотя и не всегда, являются также и более селективными, по крайней мере в малых концентрациях (применение которых,

опять-таки, становится возможным именно благодаря более высокой аффинности соединения по отношению к рецептору и большей активности соединения). Таким образом, важной задачей экспериментальной и клинической фармакологии является разработка новых, более высокоаффинных (обладающих более высоким сродством к рецептору) и более активных ("более высокопотентных") по отношению к тем или иным типам рецепторов соединений.

Бивалентные лиганды состоят из двух соединённых молекул, каждая из которых является лигандом для определённого подтипа рецепторов (одного и того же или разных), причём в силу особенностей пространственного строения обе части молекулы способны одновременно связываться с двумя частями "составного" гомо- или гетеродимерного рецепторного комплекса. Бивалентные лиганды используются в научных исследованиях с целью обнаружения и исследования рецепторных гомо- и гетеродимерных комплексов и изучения их свойств. Бивалентные лиганды обычно являются крупными молекулами и имеют тенденцию не обладать нужными для лекарств свойствами, такими как удобная фармакокинетика (приемлемая биодоступность, удобство клинического применения, приемлемый период полувыведения и т.д.), низкая аллергенность и приемлемая токсичность и уровень побочных эффектов, что делает их, как правило, непригодными или малопригодными для использования в клинической практике, за пределами исследовательских лабораторий.

Привилегированная структура - это структурная часть молекулы, радикал или химический элемент, который или которая статистически часто повторяется среди уже известных лекарств данного фармакологического класса, среди уже известных лигандов данного типа или подтипа рецепторов или известных ингибиторов данного фермента или среди некоего другого выделенного по неким общим признакам специфического подмножества уже известных биологически активных соединений. Эти статистически выделенные привилегированные элементы химической структуры могут в дальнейшем быть использованы в качестве основы для разработки новых биологически активных соединений или новых лекарств со сходными или, возможно, даже улучшенными по сравнению с исходными соединениями свойствами и даже для разработки целых библиотек таких соединений. Иногда такие структуры называют фармакофоры. Характерными примерами являются, например, трициклические структуры разного химического строения в составе молекул трициклических антидепрессантов или существование химически сходных целых подклассов антипсихотиков, таких как производные бутирофенона (галоперидол, спиперон, дроперидол и др.), производные индола (резерпин, карбидин и др.), производные фенотиазина (хлорпромазин, перфеназин и др.).

Ансамбль или супрамолекулярный ансамбль - термин из супрамолекулярной химии. Объекты супрамолекулярной химии - супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т.е. имеющих геометрическое и химическое соответствие фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке (Стид Дж. В., Этвуд Дж. Л. Супрамолекулярная химия. - М.: Академкнига, 2007). В связи с тем, что при синтезе из одной молекулы цианокобаламина при наличии двух модификаторов синтезируется 20 разных производных, между их молекулами обязательно образуются межмолекулярные ионные и водородные связи. Такие супрамолекулярные структуры обладают значительно более высокой биологической активностью, чем исходный витамин. В эксперименте была подтверждена более высокая аффинность такой структуры к почечному мегалину, чем немодифицированный цианокобаламин или отдельные замещенные производные. Авторами изобретения использована комбинаторная смесь производных цианокобаламина в виде супрамолекулярного ансамбля без разделения на отдельные компоненты.

Одновременная комбинаторная модификация двумя модификаторами - если в реакции комбинаторного синтеза используют полифункциональную молекулу - в данном случае цианокобаламин с тремя доступными для одновременной модификации группами, в реакцию сразу вводят два модифицирующих агента, например уксусный ангидрид и янтарный ангидрид. В результате реакции образуется смесь ацилированных производных в разных положениях - ацетил-сукцинил производных цианокобаламина.

Современный уровень техники

В результате поиска этиологического антигена при нефрите Хеймана, который представляет собой экспериментальную модель мембранной нефропатии, Kerjaschki D. и Farquhar M.G. в 1982 году идентифицировали мембранный клеточный белок gp330 (Kerjaschki D., Farquhar M.G., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79, 5557-5561). В 1994 году Saito A. с соавторами установили полную первичную структуру крысиного gp330 и назвали его мегалином, поскольку этот белок оказался самым крупным клонированным мембранным белком позвоночных (Saito A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729).

Сайт экспрессии мегалина.

Мегалин также известен под названиями гликопротеин 330 (gp330) и белок 2, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP-2). Это - гликопротеин с молекулярной массой приблизительно 600 кДа, который экспрессируется в эпителиальных клетках проксимальных канальцев почек, в других тканях и клетках, например в альвеолярных клетках II типа, в мужских семенниках, в эндометрии матки, в плаценте, в эпителии внутреннего уха, в почечном эпителии, в зародышевом вителлариуме и в невральная эктодерме (см. Christensen E.I, Willnow, T.E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236; Juhlin C., Klareskog L. et al., 1990, J. Biol. Chem. 265, 8275-8279; а также Zheng G., McCluskey R.T. et al.,

1994, J. Histochem. Cytochem. 42, 531-542). В почках мегалин действует как рецептор эндоцитоза, связанный с эндоцитозом реабсорбцией белков и т.п. в проксимальном канальце перед экскрецией с мочой. После этого белки реабсорбции и т.п. разрушаются лизосомами (см. Mausbach A.B., Christensen E.I., 1992, Handbook of Physiology: Renal Physiology, Windhager, editor, New York, Oxford University Press, 42-207).

Нуклеотидная последовательность мегалина.

Мегалин представляет собой гликопротеин, который чаще всего экспрессируется у млекопитающих животных на эпителиальной мембране проксимального канальца почек. Кодированная последовательность кДНК мегалина по составу нуклеотидов идентична последовательности кДНК мегалина человека с инвентарным номером гена U04441, раскрытой в работе Kogenberg, J.R. et al. (1994), или последовательности кДНК мегалина человека с инвентарным номером гена U33837, раскрытой в работе Hjaeln, G., et al. (1996) (см. Kogenberg J.R. et al., 1994, Genomics 22, 88-93 и Hjaln G. et al., 1996, Eur. J. Biochem. 239, 132-137). Кроме того, в работе Saito et al. (1994) был открыт крысиный мегалин, имеющий гомологию с мегалином человека, и его кодирующая последовательность к ДНК с инвентарным номером гена L34049 уже была раскрыта (см. Saito A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729).

Аминокислотная последовательность и белковая структура мегалина.

Мегалин представляет собой гигантский белок клеточной мембраны, состоящий из 4655 аминокислот (мегалин человека) и 4660 аминокислот (крысиный мегалин). Молекулярный вес, выведенный на основе аминокислотной последовательности, составляет приблизительно 520 кДа, но может превысить 600 кДа при включении сахарной цепи (см. Saito A. et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9725-9729). Мегалин принадлежит к генному семейству рецепторов LDL, гигантская внеклеточная область которого имеет четыре функциональных домена, причем эта внеклеточная область связана с тонкой внутриклеточной областью через единственную трансмембранную область. Мегалин представлен, главным образом, в покрытой клатрином ямке на почечном клубочке (у крыс) или на эпителиальной люминальной мембране (люминальная и базальная мембраны клеток гломерулярного эпителия) проксимального почечного канальца, альвеолярных клеток II типа, клеток придатка яичка, щитовидной железы, добавочных щитовидных желез, на мембране желточного мешка, во внутреннем ухе, в тонком кишечнике, на собственно сосудистой оболочке (chorioida) и ассоциирован с поступлением в клетки различных лигандов и их метаболитов (см. Farquhar M.G. et al., 1995, J. Am. Soc. Nephrol. 6, 35-47 и Christensen E.I. et al., 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). У мышей с нокаутом мегалина наблюдаются такие заболевания и расстройства, как низкомолекулярная протеинурия, нарушения костного метаболизма, дыхательная недостаточность, пороки развития головного мозга и другие (см. Willnow T.E. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 8460-8464). У нематод (*C. elegans*) также представлен гомолог мегалина, в отношении которого было высказано предположение о биологической важности (см. Yochem J. et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90, 4572-4576).

Значение мегалина как причины нефрита.

Мегалин, главный этиологический антиген экспериментальной мембранной нефропатии (нефрита Хеймана), представляет собой эпителиальный фагоцитарный рецептор, биологическая и патологическая роль которого установлена. Для выяснения механизма развития мембранозной нефропатии человека уже давно используются животные модели, и крысиный нефрит Хеймана является моделью мембранной нефропатии. Анализ нефрита Хеймана продвинулся дальше, чем анализ любой другой модели. Saito A. et al. раскрыли результаты анализа патологического эпитопа и лигандсвязывающего домена нефрита Хеймана, а также продемонстрировали главную антигенную область мегалина и функциональный домен мегалина, дающие основной вклад в связывание лиганда (см. Kerjaschki D. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 11179-11183; Saito A., Farquhar M.G. et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93, 8601-8605; Yamazaki H., Farquhar M.G. et al., 1998, J. Am. Soc. Nephrol. 9, 1638-1644 и Orlando R.A., Farquhar M.G. et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 94, 2368-2373)

Различные лиганды мегалина.

Мегалин наиболее обильно экспрессируется *in vivo* на люминальной стороне эпителиальных клеток проксимальных канальцев почек. В почках человека экспрессия мегалина не наблюдается ни в каких других местах, кроме эпителиальных клеток проксимальных канальцев, включая клубочки. Мегалин инкорпорирует различные лиганды (например, низкомолекулярные белки или лекарства), которые фильтруются клубочками в клетки через эндоцитоз, мегалин транспортирует их в лизосомы, и они вновь появляются на клеточной поверхности посредством рециклинга (см. Farquhar M.G. et al., 1995, J. Am. Soc. Nephrol. 6, 35-47 и Christensen E.I. et al., 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). К тому же, мегалин связан с транцитозом с люминальной стороны на базальную сторону мембраны. Мегалин также связан с поглощением и метаболизмом связывающих белков, таких как витамины А, В₁₂ и D (см. Christensen E.I. et al., 2002, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 3, 256-266). Christensen и Willnow продемонстрировали, что мегалин опосредует реабсорбцию трех белков-носителей витаминов: белка, связывающего витамин D (DBP), белка, связывающего ретинол (RBP), и транскобаламина (TC), а также связанных с ними витаминов, т.е. (ОН) витамина 25D₃, витамина А (ретинола) и витамина В₁₂ (см. Christensen E.I., Willnow T.E., 1999, J. Am. Soc. Nephrol. 10, 2224-2236). Saito A. с соавторами продемонстрировали, что лептин, секретруемый адипоцитами, содержание которого повышено в крови больных с ожирением, инкорпорируется и мета-

болизируется эпителиальными клетками проксимальных канальцев, как лиганд мегалина (см. Saito A., Gejyo F. et al., 2004, *Endocrinology*. 145, 3935-3940). Адипоциты, т.е. накопленные висцеральные жиры, приводят к комбинированным патологическим состояниям, т.е. метаболическому синдрому. Лептин, который представляет собой адипоцитокин, секретлируемый адипоцитами, повышен в крови у больных с метаболическим синдромом. Исследователи полагают, что почка является органом, в котором с наибольшей вероятностью накапливается лептин, циркулирующий в крови, причем этот лептин играет нефропатическую роль (см. Tarzi R.M., Lord G.M. et al., 2004, *Am. J. Pathol.* 164, 385-390). Так называемый лептиновый рецептор также обнаруживается в области между проксимальным канальцем и собирательным канальцем, расположенным ниже области функционирования мегалина. Saito A. с соавторами провели эксперимент с эпителиальными клетками, извлеченными из желточного мешка зародыша крысы (клетки L2), в которых мегалин экспрессировался на высоком уровне, и обнаружили, что включение полученных из глюкозы конечных продуктов усиленного гликозилирования (AGE) с радиоизотопной меткой ^{125}I в клетки L2 можно в значительной степени подавить антителами против мегалина. Таким образом, они продемонстрировали, что мегалин связан с метаболическим путем такого включения (см. Saito A., Gejyo F. et al., 2003, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 1123-1131). Взаимодействие конечных продуктов усиленного гликозилирования (AGE) с гликозилированными и модифицированными белками в реакции Майяра было указано в качестве механизма развития диабетической нефропатии. Низкомолекулярный AGE, присутствующий в крови, фильтруется почечными клубочками, а реабсорбируется и метаболизируется эпителиальными клетками проксимальных канальцев. Если нефропатия прогрессирует далее, то клубочками также фильтруется высокомолекулярный AGE, который накапливается в эпителиальных клетках проксимальных канальцев и создает чрезмерную метаболическую нагрузку. Далее, Saito A. с соавторами также продемонстрировали, что мегалин связан с включением в клетки (дополнительно к глюкозе) AGE, полученного из метилглиоксаля, глицеринальдегида или гликолевого альдегида. К тому же, метаболический синдром часто осложняется гепатопатией, например жировым перерождением печени. Белки печеночного типа, связывающие жирные кислоты (L-FABP), обильно представленные в печени, у здоровых людей выбрасываются в кровь. При гепатопатии выброс L-FABP увеличивается, что приводит к повышению их уровня в крови. Saito A. с соавторами также продемонстрировали, что L-FABP в крови быстро фильтруются почечными клубочками и реабсорбируются эпителиальными клетками проксимальных канальцев через мегалин (см. Takeda T., Gejyo F., Saito A. et al., 2005, *Lab. Invest.* 85, 522-531).

Функциональный белок, взаимодействующий с мегалином.

Для того чтобы прояснить механизм транспортировки мегалина в клетках, был проведен поиск адапторных молекул, связывающихся с внутриклеточными доменами мегалина, в ходе которого были идентифицированы различные белки, например, Dab2, ANKRA, MAGI-1, GAIP, GIPC, Galphai3, MegBP и ARH (см. Oleinikov A.V. et al., 2000, *Biochem. J.* 347, 613-621; Rader K., Farquhar M.G. et al., 2000, *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 2167-2178; Patrie K.M., Margolis B. et al., 2001, *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 667-677; Lou X., Farquhar M.G. et al., 2002, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 918-927; Petersen H.H., Willnow T.E., 2003, *J. Cell. Sci.* 116, 453-461 и Takeda T., Farquhar M.G. et al., 2003, *Mol. Biol. Cell.* 14, 4984-4996). Через эти молекулы мегалин связан с эндоцитозом и трансцитозом, а также с относящейся к ним передачей сигналов. К тому же, мегалин функционирует конъюгативно (сопряженно) с рецептором клеточной мембраны, т.е. с кубилином в эпителиальных клетках проксимальных канальцев, благодаря чему он дополнительно вовлекается в процессы включения различных лигандов в клетки (см. Saito A. et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 9725-9729). Например, кубилин представляет собой рецептор, который непосредственно связывается с трансферрином, альбумином, эндогенным витамином B_{12} и т.п., а мегалин косвенно включается в их эндоцитоз. Известно также, что мегалин взаимодействует в эпителиальных клетках проксимальных канальцев с изоформой 3 обменника $\text{Na}^+-\text{H}^+(\text{NHE3})$ (см. Biemesderfer D. et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 17518-17524). NHE3 представляет собой антипортер, играющий важную роль в реабсорбции Na^+ , кроме того, NHE3 влияет на включение лигандов мегалином (см. Gryciw D.H. et al., 2004, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 372-379). Мегалин также может быть вовлечен в инактивацию и метаболизм NHE3. На ранней стадии диабетической нефропатии или нефропатии, связанной с метаболическим синдромом, клубочковая фильтрация становится избыточной. Усиленная реабсорбция Na^+ в проксимальных канальцах является, как было установлено, основной причиной (см. Vallon V. et al., 2003, *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 530-537), причем NHE3 в данном случае играет ключевую роль, а инактивация и метаболизация NHE3 мегалином, по-видимому, также играют определенную роль в этих процессах (см. Gryciw D.H. et al., 2004, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 372-379).

Важность функции мегалина, обнаруженная в экспериментах с использованием моделей уремии и моделей регенерации органов.

Как описано выше, мегалин вовлечен в поглощение различных низкомолекулярных белков эпителиальными клетками проксимальных почечных канальцев и в их метаболизм. Если патологическое состояние прогрессирует до стадии почечной недостаточности, то механизм метаболизма нарушается, вследствие чего низкомолекулярные белки накапливаются в крови и тканях как уремические белки. Типичным примером является β_2 -микроглобулин ($\beta_2\text{-m}$), который может вызывать диализный амилоидоз у

больных, длительно получающих диализ (см. Gejyo F., Schmid K. et al., 1985, Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 701-706). Вышеупомянутый AGE также считают причиной артериосклероза или органной недостаточности вследствие его накопления в крови у больных с почечной недостаточностью или длительным диализом, причем AGE рассматривается как белок уремического типа (Henle T., Miyata T., 2003, Adv. Ren. Replace Ther. 10, 321-331). Далее, лептин накапливается в крови больных, получающих диализ, поэтому считается, что он вовлечен в нарушение питания и расстройство иммунитета. Tabata Y. и Gejyo F. с соавторами раскрыли эффекты и эффективность моделей метаболизма уремического белка с использованием функций мегалина (см. Saito A., Tabata Y., Gejyo F. et al., 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032 и документ WO 02/091955). То есть клетки, экспрессирующие мегалин, трансплантируют *in vivo* как строительные белки, а низкомолекулярные белки, просачивающиеся наружу из периферических кровеносных сосудов (кровеносных сосудов новорожденных), встраиваются в клетки с помощью мегалина для последующей метаболизации. Клетки, экспрессирующие мегалин, которые используются для трансплантации (т.е. клетки L2, полученные из эпителия желточного мешка), инкорпорируют и метаболизуют β_2 -m при помощи мегалина (см. Saito A., Tabata Y., Gejyo F. et al., 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032). Состояние почечной недостаточности индуцировали удалением обеих почек у мыши *nude*, которой была проведена подкожная трансплантация клеток L2, после чего измерили инкорпорирование клеток в тканевую массу и в органы, куда были трансплантированы клетки с β_2 -m, меченные изотопом ^{125}I , посредством внутривентрикулярной инъекции. В результате было обнаружено, что клеточная масса, в которую были трансплантированы клетки L2, более интенсивно инкорпорировала β_2 -m, меченный изотопом ^{125}I , по сравнению с другими органами, и выведение β_2 -m, меченного ^{125}I , было значительно повышено в группе, в которой были трансплантированы клетки L2 по сравнению с контрольной группой, в которой трансплантация клеток L2 не проводилась (см. Saito A., Tabata Y., Gejyo F. et al., 2003, J. Am. Soc. Nephrol. 14, 2025-2032).

Полимиксин и мегалин (Lisnyak, Yu. V., 2015. Annals of Mechnicov Institute, (3), 8-24).

Интерес к полимиксинам, наблюдаемый в мире последнее время, вызван значительным распространением нозокомиальных инфекций, резистентных к широкому спектру современных антимикробных агентов, и отсутствием новых эффективных антибиотиков против грамотрицательных бактерий. По оценкам специалистов, отсутствие таких антимикробных агентов может привести к возвращению в доантибиотиковую эру. В то же время большинство грамотрицательных бактерий чувствительны к полимиксинам, и формирование резистентности к этим катионным липопептидам происходит медленно и наблюдается гораздо реже по сравнению с другими антибиотиками. В 70-х гг. 20-го столетия от полимиксинов отказались из-за случаев нефротоксичности и появления лекарств с меньшими побочными эффектами. Однако, когда применение β -лактамов, аминогликозидов или хинолонов против чрезвычайно полирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, включая *P. aeruginosa*, *A. baumannii* K. pneumoniae, становится не эффективным, полимиксин В и колистин остаются последним средством лечения этих инфекций.

Группа полимиксиновых пептидов включает в себя несколько химически различных соединений (полимиксины А-Е, М, S и др.). В клинической практике используются лишь полимиксины В и Е (колистин). Полимиксин В (polymyxin, PmB) - это циклический липодекапептид (фиг. 1), содержащий шесть остатков α, γ -диаминобутановой кислоты (Dab): MOA-Dab1-Thr2-Dab3-cycle[Dab4-Dab5-D-Phe6-Leu7-Dab8-Dab9-Thr10]. Семь аминокислот полимиксина образуют макроцикл (cycle[Dab4-Dab5-D-Phe6-Leu7-Dab8-Dab9-Thr10]), а три аминокислоты (Dab1-Thr2-Dab3) составляют линейный участок, соединяющий макроцикл с концевым остатком метил-октаноиловой кислоты (MOA). Макроцикл образован дополнительной пептидной связью между Thr10 и γ -аминогруппой остатка Dab4. N-концевой остаток Dab1 полимиксина Na-ацилирован жирной кислотой, такой как 6-метилоктановая кислота (PmB1), 6-метилгексановая кислота (PmB2), октановая кислота (PmB3) и т.д. Единственным структурным отличием колистина (colistin, polymyxin E, PmE) от полимиксина В является аминокислота D-Leu в положении 6 вместо D-Phe в полимиксине В. Полимиксин В и колистин содержат пять свободных аминогрупп (в составе Dab) и соответственно пять положительных зарядов при физиологических условиях.

"Возвращение" полимиксинов в клиническую практику стимулировало дальнейшие углубленные исследования их токсичности. В последнее десятилетие токсичность полимиксина В и колистина была тщательно проверена современными методами (с учетом режимов правильного использования, химической чистоты и гомогенности препаратов) и оказалась не такой высокой, как считалось в прошлом. Тем не менее она все еще может значительно усложнять терапию, снижать ее эффективность и даже приводить к ее полному прекращению. Поэтому создание менее токсичных производных полимиксина остается очень актуальной задачей. В последнее десятилетие несколько исследовательских групп сосредоточили свои усилия на разработке менее токсичных производных полимиксина. В частности, Сакура Н. и др. создали производные полимиксина Ser2-Dap3-PmB(2-10), Dap3-PmB(3-10) и Ser3-PmB(3-10), острая токсичность которых (LD_{50}) примерно в 10 раз ниже, чем у полимиксина В1, а активность в отношении синегнойной палочки сохраняется примерно на уровне полимиксина В. Ваага М. и др. синтезировали менее нефротоксичные производные полимиксина NAB7061, NAB739 и NAB740, почечный клиренс которых

был, соответственно, в 28, 53 и 378 раз выше, чем у колистина, а аффинность к мембране щеточной полоски эпителия почки крысы была в 2-3 ниже, чем у гентамицина, и в 5-6 раз ниже, чем у полимиксина В1. Поиски нетоксичных производных полимиксина в целом ведутся эмпирически, без привлечения каких-либо молекулярных механизмов его нефротоксического действия и/или структурных моделей взаимодействия полимиксин-мишень. Предпосылкой направленного поиска таких производных является знание молекулярных механизмов нефротоксичности полимиксинов, основанное на детальном знании об особенностях межмолекулярных взаимодействий полимиксинов со своими мишенями нефротоксического действия.

Известно, что нефротоксический эффект полимиксинов обусловлен их аккумуляцией в клетках эпителия проксимальных канальцев почки, где они персистируют долгое время, вызывая повреждения почки: их аккумуляция в возрастающих количествах в лизосомах приводит к набуханию и в итоге - к разрыву последних и высвобождению полимиксинов в цитозоль, где их неспецифическое связывание вызывает острый тубулярный некроз. При этом главным фактором аккумуляции этих антибиотиков в почке считается их взаимодействие с мегалином (ранее его называли гликопротеином gp330), гигантским рецептором клеточной поверхности, который наиболее обильно представлен в апикальной мембране проксимальных канальцев почки. Таким образом, этот рецептор может представлять собой уникальную мишень для создания полимиксиновых антибиотиков с минимизированной нефротоксичностью. Ослабление связывания полимиксинов мегалином может стать новой превентивной мерой против полимиксин-индуцированной нефротоксичности.

Мегалин - это трансмембранный гликопротеин, играющий центральную роль в эндоцитозной функции клеток эпителия проксимальных канальцев почки; он также участвует и в сигнальной трансдукции в этих клетках. Мегалин локализуется в клатриновых кавеолах эпителия проксимальных канальцев почки и функционирует как эндоцитозный рецептор, связывающий очень широкий спектр веществ. Лиганды, связывающиеся с мегалином (их насчитывается более 30), представлены несколькими группами соединений: протеинами, включенными в липопротеиновый метаболизм; протеазами и протеазингибиторными комплексами; матриксными протеинами; внутриклеточными протеинами; факторами роста и другими группами (включая лактоферрин, риновирус, комплемент С3, гентамицин, полимиксин и др.). Мегалин является представителем семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (low density lipoprotein receptor (LDLR) gene family). LDLR семейство - это класс структурно гомологичных мембранных рецепторов, состоящих из модульных структур (доменов) и представленных у млекопитающих семью основными гликопротеинами: рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR); рецептор липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR); аполипопротеин-Е рецептор 2 (ApoER2 или LRP8); множественный фактор эпидермального роста (MEGF7); LDLR-связанный протеин 1 (LRP1); LDLR-связанный протеин 1b (LRP1b) и LDLR-связанный протеин 2 (LRP2) или мегалин (Megalin).

Мегалин - самый крупный представитель этого семейства, его масса составляет около 600 кДа. Аминокислотная последовательность мегалина крысы насчитывает 4460 аминокислот и содержит 25-аминокислотную N-концевую сигнальную пептидную последовательность, 4400-аминокислотный внешклеточный участок, 22-аминокислотный однопроходный трансмембранный домен и 213-аминокислотный C-концевой цитоплазматический хвост, аминокислотные последовательности мегалина человека и крысы сходны на 77%. Внешклеточный участок мегалина содержит структурные модули, характерные для всех членов LDLR-семейства, - обогащенные цистеином лигандсвязывающие повторы (в литературе их называют также комплемент-подобными повторами (или доменами) и обозначают CR (Complement-type Repeat), повторы фактора роста (EGF-повторы) и β -пропеллерные домены. Как показывают исследования по направленному мутагенезу, участками связывания большинства лигандов LDL-рецепторами являются лигандсвязывающие CR повтор. Внешклеточный участок LDLR (наименьшего представителя LDLR-семейства) содержит семь лигандсвязывающих повторов, которые образуют один кластер, тогда как внешклеточные участки LRP и мегалина содержат соответственно 31 и 36 лигандсвязывающих повторов, распределенных в четырех кластерах (кластеры I-IV). Каждый из CR доменов состоит примерно из 40 аминокислотных остатков. Первые данные о трехмерной организации CR повторов были получены N.L. Daly и др. с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР спектроскопии) для повтора CR1, а затем и CR2 из LDLR человека (PDB коды 1LDL и 1LDR, соответственно). Было выявлено, что эти модули содержат по три дисульфидные связи, а также - такие базовые элементы вторичной структуры белка, как β -шпильки и β -изгибы. Далее была определена кристаллическая структура CR5 домена из LDLR человека с разрешением 1,7 Å (PDB код 1AJJ), впервые показавшая, что модуль содержит ион Ca^{2+} , который октаэдрически координирован отрицательно заряженными остатками аспарагиновой (Asp) и глутаминовой (Glu) кислот и карбонильными группами остова, образующими карман вокруг иона кальция. Позже было показано, что ион Ca^{2+} необходим для правильного сворачивания полипептидной цепи и поддержки структурной целостности модуля. Структурные данные для мегалина в настоящее время довольно ограничены: известна лишь одна структура 12-го CR домена мегалина крысы и одна структура 10-го CR домена мегалина человека (а также его комплекса с гентамицином), определенные в растворе методом ЯМР. Однако известны структуры всех семи CR до-

менов LDLR и нескольких CR доменов LRP рецепторов, которые были получены как для отдельных модулей с помощью ЯМР спектроскопии или рентгеновской кристаллографии, так и для их пар. Все структуры этих CR доменов имеют один и тот же тип сворачивания полипептидной цепи: короткий антипараллельный β -лист, две петли, стабилизированные дисульфидными связями между цистеинами CysI-CysIII, CysIV-CysVI и связанные дисульфидным мостиком CysII-CysV. N-концевая петля дополнительно стабилизирована антипараллельным β -листом, а C-концевая петля дополнительно стабилизирована взаимодействиями остатков, скоординированных вокруг иона Ca^{2+} . Сходный характер сворачивания полипептидной цепи и сходная трехмерная организация CR доменов являются следствием гомологии их аминокислотных последовательностей, содержащих консервативные остатки аспарагиновой (D) и глутаминовой (E) кислот и консервативное расположение шести остатков цистеина (C). Преимущественными местами связывания многих важных лигандов представителями LDLR-семейства являются лигандсвязывающие повторы. Как показывает анализ имеющихся структурных данных о взаимодействии членов LDLR-семейства со своими катионными лигандами, участок узнавания на рецепторе является общим (универсальным) структурным мотивом и содержит координированные ионом Ca^{2+} три кислотных (не имеющих отрицательный заряд) остатка аспарагиновой кислоты (так называемый DXDXD мотив) и один гидрофобный остаток. Участком узнавания/связывания на лиганде являются положительно заряженные остатки лизина. Связывание осуществляется в основном за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными остатками лиганда и отрицательно заряженными остатками аспарагиновой кислоты, участвующих в координации иона Ca^{2+} . Это связывание лизина усиливается гидрофобным взаимодействием между ароматическим остатком CR модуля (триптофаном или фенилаланином) и алифатическим фрагментом лизина. Таким образом, ключевые характеристики участка связывания включают (1) координацию иона кальция, (2) солевые мостики и водородные связи между остатками аспарагиновой кислоты CR повтора и катионными остатками лиганда и (3) гидрофобные взаимодействия между ароматическим остатком лигандсвязывающего повтора и алифатическим участком лизина.

Участок связывания полимиксина на его молекулярной мишени, мегалине, пока экспериментально не установлен, отсутствуют также и какие-либо структурные модели взаимодействия полимиксина с мегалином на атомном уровне. Однако, известно, что полимиксин В (как и гентамицин) является эффективным конкурентным ингибитором связывания мегалином крысы протеина RAP (Receptor-Associated Protein, рецептор-связанный протеин). RAP - это шаперон, который связывается с представителями семейства LDL-рецепторов и действует как универсальный антагонист их преждевременного связывания со своими лигандами в эндоплазматическом ретикулуме (ведущего к их агрегации и деградации), обеспечивая нормальную экспрессию этих рецепторов на поверхности клетки для осуществления ими эндцитозной функции. Конкурентное ингибирование предполагает как структурное сходство ингибитора и субстрата (по крайней мере - структурное сходство их молекулярных фрагментов, которые взаимодействуют с рецептором), так и один и тот же участок связывания на рецепторе.

А структурные модели взаимодействия RAP протеина с LDL-рецепторами на атомном уровне известны. И в этих комплексах также положительно заряженные NH_3 -группы гентамицина взаимодействуют с тремя отрицательно заряженными остатками аспарагиновой кислоты домена CR10, т.е. со структурным DXDXD мотивом, обнаруженным и для других CR модулей. Таким образом, есть основания предполагать, что участком связывания полимиксинов также являются структурные DXDXD мотивы лигандсвязывающих CR доменов мегалина, и молекулярными фрагментами полимиксинов, которые взаимодействуют с рецептором, являются их катионные Dab группы (аналоги лизиновых остатков).

Как показали исследования Ваара М. и др., NAB-производные полимиксина, имеющие только три положительных заряда, расположенных в пределах макроцикла молекулы (заряженные остатки Dab5, Dab8 и Dab9), являются не только эффективными антибактериальными агентами, но и обладают существенно более низкой нефротоксичностью, чем исходный полимиксин, содержащий пять положительных зарядов (заряженные остатки Dab1, Dab3, Dab5, Dab8 и Dab9). При этом их почечный клиренс был в десятки и сотни раз выше, чем у колистина, а их аффинность к мембране щеточной полоски эпителия почки крысы в 5-6 раз ниже, чем у полимиксина В1, т.е. производные полимиксина с ослабленным взаимодействием с мишенью имели лучшие фармакокинетические показатели. Таким образом, уровень нефротоксичности полимиксина и его производных коррелирует с особенностями их молекулярного строения и, как следствие, с особенностями их межмолекулярных взаимодействий с мегалином. Новое производное полимиксина/колистина, которое не будет узнаваться мегалином, предположительно должно иметь существенно меньшую нефротоксичность. Каковы особенности межмолекулярных взаимодействий полимиксина с мегалином? Каковы структурные предпосылки различий во взаимодействии полимиксина и его NAB-производных с мегалином? Ответы на эти вопросы дадут продолжающиеся исследования структурно-функциональных отношений полимиксинов и их молекулярных мишеней нефротоксического действия. Недавно методами ЯМР спектроскопии и молекулярного моделирования (докинга) были определены структуры комплексов лигандсвязывающего домена CR10 мегалина человека с еще одним катионным антибиотиком, гентамицином, который также обладает побочным нефротоксическим действием. Мегалин является уникальной мишенью для создания полимиксиновых антибиотиков с минимизирован-

ной нефротоксичностью. Ослабление связывания полимиксинов мегалином может стать новой превентивной мерой против полимиксин-индуцированной нефротоксичности.

Известны ингибиторы нейротоксичности для аминогликозидных антибиотиков [US Patent 4526888]. К этим ингибиторам, которые патентуются в составе композиции с аминогликозидными антибиотиками, относятся полиаспарагиновая кислота и полиаспартаты в виде солей или амидов, а также полиглутаминовая кислота, полиглутаматы и их амиды. Данные соединения способны защищать почки от действия аминогликозидных антибиотиков через более высокую их тропность к почкам. Хотя данные полимеры и не ингибировали противомикробную активность аминогликозидных антибиотиков, имели ряд существенных недостатков - это полусинтетические полимеры - ксенобиотики с не до конца изученным механизмом метаболизма, полимерный характер данных соединений при инъекционном применении совместно с высокой тропностью к тканям почек позволяет кумулироваться данным соединениям в почках с образованием амилоидных бляшек, данные соединения являются новыми ксенобиотиками и они пока еще не разрешены к применению. Кроме того, в комбинации с полимиксином они ранее не применялись.

Известен способ подавления нефротоксичности полимиксина путем комбинации его применения с высокими дозами аскорбиновой кислоты (Sirijatuphat, R., Limmahakhun, S., Sirivatanauksorn, V., Nation, R.L., Li, J., & Thamlikitkul, V. (2015). Preliminary clinical study of the effect of ascorbic acid on colistin-associated nephrotoxicity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3224-3232.). Показана значительная протективная активность аскорбината натрия для инъекционного применения на фоне терапии полимиксином. Недостатком данного метода является отложенная токсичность полимиксина, связанная с отсутствием тропности (высокой аффинности) аскорбиновой кислоты к почечному мегалину. Механизм действия аскорбиновой кислоты не связан с ингибированием процесса взаимодействия полимиксина с мегалином, а связан с подавлением перекисного окисления липидов (ПОЛ) и освобождения свободных радикалов (СР) в почках. ПОЛ и СР являются основным следствием разрушения мегалина, включая каскад цепной реакции распада нефронов. При этом после прекращения действия аскорбиновой кислоты нефротоксичность полимиксина проявлялась через длительный промежуток времени после завершения лечения. Аналогичные ингибиторы ПОЛ и СР, такие как ретиноевая кислота (разные производные витамина А), витамин Е, мелатонин и др., хотя и защищают почки от немедленного действия полимиксина в процессе лечения, не способны защитить почки от отдаленного "кумулятивного" действия полимиксина (Yousef, J.M., Chen, G., Hill, P.A., Nation, R.L., & Li, J. (2011). Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9), 4044-4049.). Прекращение действия ингибиторов ПОЛ и СР тут же проявляет нефротоксические эффекты ранее связавшегося с мегалином полимиксина. Данных побочных эффектов лишены высокоаффинные лиганды мегалина, способные вообще предотвратить взаимодействие полимиксина с мегалином без негативного влияния на противомикробный эффект полимиксина.

Раскрытие изобретения

В основу изобретения поставлена задача разработать фармацевтическую композицию на основе полимиксина со сниженной нефротоксичностью для терапии инфекционных заболеваний. Поставленная задача решается путем получения фармацевтической композиции на основе полимиксина для лечения инфекционных заболеваний, включающую в качестве нефропротекторов комбинацию витаминов с супрамолекулярным комбинаторным производным цианокобаламина, полученным одновременной ковалентной модификацией структуры цианокобаламина янтарным и уксусным ангидридами, где мольное соотношение компонентов составило: 20:21:21. При этом в качестве витаминов композиция включает холекальциферол, или викасол, или аскорбиновую кислоту. Также композиция может быть выполнена в форме для парентерального применения: растворов для инъекций, лиофилизированного порошка для экстемпорального применения; в форме для перорального применения: таблеток, сиропов, капсул, растворов для перорального применения; в форме для трансдермального применения: пластырей, мазей, гелей, присыпок; в форме для ректального применения: суппозиториях, растворов для спринцевания; в форме для местного применения: повязок, пластырей, присыпок, гелей, порошков, а также включать фармацевтически допустимые консерванты, стабилизаторы и наполнители.

Фармацевтические композиции

Могут быть использованы различные способы получения патентуемой фармацевтической композиции (ПФК). ПФК можно давать перорально или можно вводить внутрисосудистой, подкожной, внутрибрюшинной инъекцией, в форме аэрозоля, глазным способом введения, в мочевого пузырь, местно и т.д. Например, способы ингаляционного введения хорошо известны в данной области техники. Доза терапевтической композиции будет варьировать в широких пределах в зависимости от конкретного вводимого антимикробного ПФК, природы заболевания, частоты введения, способа введения, клиренса используемого агента из организма хозяина и тому подобного. Начальная доза может быть более высокой с последующими более низкими поддерживающими дозами. Дозу можно вводить с частотой один раз в неделю или один раз в две недели или делить на меньшие дозы и вводить их один или несколько раз в сутки, два раза в неделю и так далее для поддержания эффективного уровня дозы. Во многих случаях для перорального введения будет необходима более высокая доза, чем для внутривенного введения ПФК могут быть включены во множество композиций для терапевтического введения. Более конкретно, ПФК по

настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции в сочетании с подходящими фармацевтически приемлемыми носителями или разбавителями и могут быть включены в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как капсулы, порошки, гранулы, мази, кремы, пены, растворы, суппозитории, инъекции, формы для ингаляционного применения, гели, микросферы, лосьоны и аэрозоли. Как таковое, введение соединений может быть осуществлено различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, ректальное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутрикожное, чрескожное, внутритрахеальное введение и т.д. ПФК по изобретению могут распределяться системно после введения или могут быть локализованы с использованием имплантата или другой композиции, удерживающей активную дозу в месте имплантации. ПФК по настоящему изобретению могут быть введены сами по себе, в комбинации друг с другом, или они могут быть использованы в комбинации с другими известными соединениями (например, фторхинолонами, карбопенемами и т.д.). В фармацевтических лекарственных формах нефропротекторы могут быть введены в форме их фармацевтически приемлемых солей.

Следующие способы и эксципиенты приведены лишь в качестве примеров и никоим образом не являются ограничивающими. Для препаратов для перорального введения соединения могут быть использованы сами по себе или в комбинации с подходящими добавками для изготовления таблеток, порошков, гранул или капсул, например с обычными добавками, такими как лактоза, маннит, кукурузный крахмал или картофельный крахмал; со связывающими агентами, такими как кристаллическая целлюлоза, производные целлюлозы, аравийская камедь, кукурузный крахмал или желатины; с разрыхлителями, такими как кукурузный крахмал, картофельный крахмал или карбоксиметилцеллюлоза натрия; со смазывающими агентами, такими как тальк или стеарат магния; и, если желательно, с разбавителями, буферными агентами, увлажняющими агентами, консервантами и корригентами.

ПФК могут быть включены в композиции для инъекций путем их растворения, суспендирования или эмульгирования в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие подобные масла, синтетические глицериды алифатических кислот, эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. ПФК могут быть использованы в аэрозольной композиции для ингаляционного введения.

Соединения по настоящему изобретению могут быть включены в приемлемые пропелленты под давлением, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и т.п. Кроме того, ПФК могут быть включены в суппозитории смешиванием с множеством основ, таких как эмульгирующие основы или водорастворимые основы. Соединения по настоящему изобретению могут быть введены ректально с использованием суппозитория. Суппозиторий может содержать наполнители, такие как масло какао, карбоваксы и полиэтиленгликоли, расплавляющиеся при температуре тела, но твердые при комнатной температуре. Могут быть изготовлены стандартные лекарственные формы для перорального или ректального введения, такие как сиропы, эликсиры и суспензии, где каждая единица дозы, например, чайная ложка, столовая ложка, таблетка или суппозиторий, содержит predetermined количество композиции, содержащей одно или более соединений по настоящему изобретению. Сходным образом, стандартные лекарственные формы для инъекции или внутривенного введения могут содержать соединение по настоящему изобретению в композиции в форме раствора в стерильной воде, нормальном физиологическом растворе или другом фармацевтически приемлемом носителе. Имплантаты для длительного высвобождения композиций хорошо известны в данной области техники. Имплантаты изготавливают в форме микросфер, пластинок и так далее с биodeградируемыми или не являющимися биodeградируемыми полимерами. Например, полимеры молочной и/или гликолевой кислот образуют деградируемый полимер, хорошо переносимый хозяином. Имплантат, содержащий ПФК по изобретению, располагают близко к очагу патологии, так чтобы локальная концентрация активного агента была повышенной по сравнению с остальными областями тела.

При использовании здесь термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, подходящим для использования в качестве однократных доз для субъектов людей и животных, при этом каждая единица содержит predetermined количество соединений по настоящему изобретению, которого, согласно вычислениям, достаточно для оказания желаемого эффекта, совместно с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Описания стандартных лекарственных форм по настоящему изобретению зависят от конкретного используемого соединения, и эффекта, который должен быть достигнут, и фармакодинамики используемого соединения у хозяина. Фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, адьюванты, носители или разбавители, общедоступны. Кроме того, общедоступны фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как агенты для регулирования pH и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, стабилизаторы, смачивающие агенты и т.п. Типичные дозы для системного введения варьируют от 0,1 мг до 1000 мг на 1 кг массы тела субъекта на одно введение. Типичная доза может представлять собой одну таблетку для приема от двух до шести раз в сутки или одну капсулу или таблетку с длительным высвобождением для приема один раз в сутки с пропорционально более высоким содержанием активного ингредиента. Эффект длительного высвобождения может быть обусловлен матрицами, из которых изго-

товлена капсула, растворяющимися при различных значениях pH, капсулами, обеспечивающими медленное высвобождение под воздействием осмотического давления или любым другим известным способом контролируемого высвобождения.

Специалистам в данной области техники будет ясно, что уровни доз могут варьировать в зависимости от конкретного соединения, тяжести симптомов и предрасположенности субъекта к побочным эффектам. Некоторые из конкретных соединений обладают большей активностью, чем другие. Предпочтительные дозы данного соединения могут быть легко определены специалистами в данной области техники множеством способов. Предпочтительным способом является измерение физиологической активности ПФК.

Один из интересующих способов представляет собой применение липосом в качестве наполнителя для доставки. Липосомы сливаются с клетками целевой области и обеспечивают доставку содержимого липосом внутрь клеток. Контакт липосом с клетками поддерживают в течение времени, достаточного для слияния, с использованием различных способов поддержания контакта, таких как выделение, связывающие агенты и тому подобное. В одном аспекте изобретения липосомы разработаны для получения аэрозоля для легочного введения. Липосомы могут быть изготовлены с очищенными белками или пептидами, опосредующими слияние мембран, такими как вирус Сендай или вирус гриппа и так далее. Липиды могут представлять собой любую полезную комбинацию известных липидов, образующих липосомы, включая катионные или цвиттерионные липиды, такие как фосфатидилхолин. Остальные липиды будут обычно нейтральными или кислыми липидами, такими как холестерин, фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и тому подобное. Для получения липосом может быть использован способ, описанный Kato et al. (1991), J. Biol. Chem. 266:3361. Кратко, липиды и композицию для включения в липосомы, содержащую пептиды, смешивают в подходящей водной среде, подходящим образом в солевой среде, где общее содержание твердых веществ будет находиться в диапазоне приблизительно 110 мас.%. После интенсивного перемешивания в течение коротких периодов времени, приблизительно 5-60 с, пробирку помещают в теплую водяную баню приблизительно при 25-40°C и этот цикл повторяют приблизительно 5-10 раз. Затем композицию обрабатывают ультразвуком на протяжении подходящего периода времени, обычно приблизительно 1-10 с, и, возможно, дополнительно перемешивают на вихревой мешалке. Затем объем увеличивают добавлением водной среды, обычно увеличивая объем в приблизительно 1-2 раза, с последующим взбалтыванием и охлаждением. Способ позволяет включать в липосомы как полимиксин, так и патентуемые нефропротекторы.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схема химического синтеза супрамолекулярного производного комбинаторно модифицированного цианокобаламина.

Фиг. 2. ВЭЖХ (Милихром А-02) цианокобаламина (I), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 3. ВЭЖХ (Милихром А-02) комбинаторного супрамолекулярного производного цианокобаламина (IVd), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 4. ВЭЖХ (Милихром А-02) триацетил-цианокобаламина (IVb), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5 до 100%).

Фиг. 5. ВЭЖХ (Милихром А-02) трисуццинил-цианокобаламина (IVc), градиент раствор А: 0,5 М перхлорат лития/0,1 М хлорная кислота, раствор Б: ацетонитрил (Б от 5% до 100%).

Фиг. 6. Прямое подавление накопления колистина с цианокобаламином (IVd) и холекальциферолом из композиции Полифро.

Варианты осуществления изобретения

Приведенные ниже примеры не ограничивают возможность использования других методов получения композиции по данному изобретению и приведены только для целей пояснения реализации формулы изобретения.

Пример 1. Синтез супрамолекулярного комбинаторного производного цианокобаламина (СКПЦ).

В 10 мл диоксана растворяют 20 мМ цианокобаламина (I), добавляют 21 мМ янтарного ангидрида (III) и 21 мМ уксусного ангидрида, раствор перемешивают и греют с обратным холодильником 20 мин. Раствор переливают в ампулы и лиофилизируют для удаления растворителя и уксусной кислоты. Супрамолекулярное комбинаторное производное (IVd) или СКПЦ используют для получения фармацевтических композиций, изучения структуры, определения биологической активности. На фиг. 1 приведена схема синтеза комбинаторных производных кверцетина.

Одна исходная молекула цианокобаламина содержит три доступные для модификации гидроксильные группы, включая одну фосфатную.

Расчеты количества молей модификаторов ведут согласно формул комбинаторики: $m=4 \times (3 \times 2^{n-2} - 1)$; $k=n \times (2^n - 1)$, где m - количество разных производных молекул в комбинаторной смеси и количество молей цианокобаламина для реакции; n - количество доступных для модификации гидроксильных групп, включая одну фосфатную в структуре цианокобаламина ($n=3$); k - количество молей каждого модификатора.

Таким образом, имея только одну исходную молекулу кверцетина и два модификатора после комбинаторного синтеза получаем 20 комбинаторных производных с разной степенью замещения, разного положения заместителей и разных перестановок остатков модификаторов не просто в виде смеси, а в виде трудно разделяемой супрамолекулярной структуры.

Модификаторы - янтарный ангидрид либо уксусный ангидрид можно вводить как одновременно, так и последовательно либо сперва ввести янтарный ангидрид, прогреть смесь с обратным холодильником 20 мин, а затем ввести уксусный ангидрид и также прогреть смесь еще 20 мин. Аналогично в этой реакции в качестве одного из модификаторов вместо янтарного ангидрида можно использовать малеиновый ангидрид, аконитовый ангидрид, глутаровый, фталевый ангидрид и уксусный ангидрид, этиловый эфир муравьиной кислоты, монохлороуксусную кислоту, пропиолактон, этиленоксид и другие низкомолекулярные алкилирующие вещества (метилхлорид, этилхлорид, пропилахлорид). Для целей изучения биологической активности синтезированных веществ получали разные производные с разным соотношением модификаторов (табл. 1).

Для HPLC использовали микроколоночный хроматограф Милихром А-02 в градиенте ацетонитрил (5-100%)/0,1 М хлорная кислота + 0,5 М перхлорат лития. Комбинаторное производное СКПЦ (IVd) на хроматограмме (фиг. 3) давало один четкий уширенный пик и не разделялось на компоненты, хотя время удержания практически не отличалось от чистого цианокобаламина, тогда как его полностью замещенные производные имели разные объемы удержания (фиг. 4, 5). Это свидетельствовало о том, что между разными комбинаторными производными (в данном случае их 20) образовывались сложные супрамолекулярные структуры, не разделяемые хроматографически. Аналогично себя ведет данное комбинаторное производное (СКПЦ) (IVd) и при разделении в тонком слое (ацетонитрил:вода) и дает только одну полосу, которая не совпадает ни с одним из полученных производных.

В табл. 1 приведен результат скрининга производных цианокобаламина с разным соотношением модификаторов в качестве субстрата почечного мегалина (на примере мегалина гомогената почек крыс). Известно, что исходный цианокобаламин является субстратом/лигандом почечного мегалина с умеренной степенью взаимодействия и средним индексом афинности к мегалину по поглощению (ИА=52%). Тест проводили микрометодом в пробирках Эппендорфа по способности производных цианокобаламина связываться с мегалином: после центрифугирования связанное производное вместе с мегалином оставалось в осадке, а процент оставшегося непрореагировавшего производного цианокобаламина в надосадочной жидкости определяли с использованием ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Милихром А-02. Относительная концентрация в % по отношению к исходной указана в табл. 1.

Таблица 1

Способность мегалина связывать разные производные цианокобаламина СКПЦ

№ п/п	Мольные соотношения реагентов*			% связанного производного
	m	k1	k2	
1.	20	84***	84***	5
2.	-//-	42	42	12
3.	-//-	21	21	98
4.	-//-	17	17	71
5.	-//-	13	13	71
6.	-//-	9	9	70
7.	-//-	5	5	67
8.	-//-	3	3	58
9.	-//-	2	2	57
10.	-//-	1	1	57
11.	-//-	0	0	52
12.	-//-	42	0	56
13.	-//-	21	0	67
14.	-//-	17	0	71
15.	-//-	13	0	66
16.	-//-	9	0	62
17.	-//-	5	0	57
18.	-//-	3	0	58
19.	-//-	2	0	57

20.	-//-	1	0	56
21.	-//-	0	1	57
22.	-//-	0	2	55
23.	-//-	0	3	57
24.	-//-	0	5	50
25.	-//-	0	9	59
26.	-//-	0	13	37
27.	-//-	0	17	27
28.	-//-	0	21	15
29.	-//-	0	42	10
30.	-//-	0	84***	6
31.	-//-	84***	0	7
32.	-//-	42	1	11
33.	-//-	21	2	23
34.	-//-	17	3	46
35.	-//-	13	5	57
36.	-//-	9	9	59
37.	-//-	5	13	55
38.	-//-	3	17	34
39.	-//-	2	21	21
40.	-//-	1	42	11

* m - количество молей цианокобаламина в реакции комбинаторного синтеза;

k1 - количество молей янтарного ангидрида в реакции;

k2 - количество молей уксусного ангидрида в реакции;

*** максимальное мольное соотношение, при котором замещаются все группы в цианокобаламине, превышение этого соотношения приводит к тому, что в реакционной среде остаются непрореагировавшие модификаторы - янтарный ангидрид и уксусный ангидрид.

Как видно из табл. 1, только при рассчитанном соотношении компонентов, когда образуется максимальное количество разных производных цианокобаламина, образуется биологически активная и эффективная супрамолекулярная структура (производное 3 или СКПЦ или IVd на фиг. 1), которая почти полностью (98%) связывается с почечным мегалином. Другие производные либо не отличались от немодифицированного цианокобаламина (52%) по способности связываться с мегалином, либо были значительно менее активными. Это свидетельствует, что при оптимальном соотношении модификаторов при образовании в растворе всех возможных производных (21 вариация производных цианокобаламина с разными перестановками и размещениями в заместителях) образуется более сложная надмолекулярная "квазиживая" структура с другими свойствами и большей фармакологической активностью.

На фиг. 2 приведена хроматограмма исходного цианокобаламина (I), комбинаторного модифицированного двумя ангидридами (IVd) (фиг. 5). На фиг. 3, 4 показаны ВЭЖХ - хроматограммы двух производных: полностью сукцинированного (IVc) и полностью ацетиленного цианокобаламина (IVb) соответственно в качестве контрольных образцов (№ 30 и 31 в табл.1). Как видно из графиков, объем удержания комбинаторного производного практически не отличается от исходного цианокобаламина, но отличается от полностью модифицированных производных. Кроме того, при той же концентрации цианокобаламина площадь пика и ширина его основания больше, что свидетельствует о том, что это именно производные цианокобаламина и что их несколько. Отличия между объемом удержания (I), (IVb) и (IVc) свидетельствуют о завершении реакции полного сукцинирования и ацетилирования в структуре цианокобаламина соответственно, а также о том, что все эти производные внутри комплекса (IVd) образуют сложную надмолекулярную структуру.

Полностью сукцинированный и полностью ацетиленный цианокобаламины поглощались мегалином только на 6 и 7% соответственно. Таким образом, производное IVd, полученное в соответствии с комбинаторными расчетами, это принципиально новая супрамолекулярная структура, обладающая значительно отличающимися свойствами как от немодифицированного цианокобаламина (№ 11 в табл. 1), так и от полностью модифицированных производных (№ 30 и 31 в табл. 1). Данную структуру невозможно разделить с применением градиентной ВЭЖХ, а УФ-спектры всех производных практически совпадают, хотя время удержания отличается. Это указывает на образование новых структур с ковалентной связью на основе цианокобаламина, и при этом эти структуры друг с другом образуют сложную супра-

молекулярную структуру, аналогичную комплексам циклодекстринов.

Пример 2. Получение фармацевтических композиций на основе полимиксина с нефропротекторами.

Поставленная задача достигается тем, что фармацевтическая композиция с антимикробной активностью содержит антибиотик полимиксин, содержит цианокобаламин, СКПЦ и холекальциферол, блокирующие его нефротоксическое действие, а также целевые добавки, способствующие формированию лекарственных форм. Согласно изобретению, СКПЦ, основной действующий агент вводится в количестве 0,5-20%, как солюбилизатор используют поливинилпирролидон, поверхностно-активное вещество лаурилсульфат натрия, основные компоненты фармацевтической композиции, при определенной технологической операции вследствие механохимического взаимодействия образуют комплекс с изученными фармацевтическими и фармакологическими свойствами. При этом в фармацевтической композиции СКПЦ и холекальциферол содержится в количестве от 2 до 7%. Вместо холекальциферола может быть использован другой нефропротектор: викасол, пантотеновая кислота, никотинамид аденин динуклеотид. При этом СКПЦ в композиции может содержаться в количестве от 10 до 40%. Вещества предварительно растворяются в этаноле вместе с лецитином или ТВИН-80, а этанол отгоняется при нагревании или под вакуумом. Кроме того, как целевые добавки выбраны солюбилизатор поливинилпирролидон в количестве 10-50% и поверхностно-активный агент лаурилсульфат натрия в количестве 0,25-10%. При этом наполнители содержат, как минимум, один связующий агент, один разрыхлитель и один смазывающий агент. При этом как связующий агент выбрана микрокристаллическая целлюлоза в общем количестве 10-20%. При этом в качестве разрыхлителя выбрана кроскармеллозы натриевая соль в общем количестве 1-15%. При этом как смазывающий агент выбран стеарат магния в общем количестве 0,25-5%. Кроме того, фармацевтическая композиция выполнена в лекарственных формах таблеток, покрытых полимерной пленкой или капсул.

Поставленная задача достигается также тем, что в способе получения фармацевтической композиции с антимикробной активностью согласно изобретению, предварительно полимиксин с нефропротекторами и целевые добавки смешивают, компактируют, размалывают, полученную смесь смешивают с фармацевтически приемлемыми наполнителями, проводят сухую или влажную грануляцию смеси, после того гранулятом наполняют твердые желатиновые капсулы или прессуют и таблетки покрывают полимерной пленкой. Согласно изобретению, разработанный способ получения фармацевтической композиции позволяет получать лекарственные формы с комплексной фармацевтической композицией в виде таблеток, покрытых оболочкой, или капсулы, 10 содержащей в своем составе компоненты в таких количественных пределах, в %:

полимиксин: 5-25,

СКПЦ/холекальциферол: 10-40,

наполнители: до 100.

Три активных вещества новой фармацевтической композиции сочетались в нем с учетом знаний об их фармакологических и лечебных свойствах, полученных при применении монопрепаратов на основе их субстанций. Подобранные целевые добавки, в силу своих физико-химических свойств, способствуют солюбилизации активных субстанций и их достаточно высокому растворению в водной физиологической среде желудочно-кишечного тракта. Сочетание в одной лекарственной форме трех активных веществ с различными физико-химическими свойствами является довольно сложной задачей для фармации. Решение поставленной задачи в техническом плане осуществлялось последовательной разработкой технологии изготовления фармацевтической композиции и в соответствии с фармакопейными методами ее исследования. Прежде всего, фармацевтическая разработка фармацевтической композиции начиналась с оценки физико-химических свойств полимиксина, СКПЦ и холекальциферола, в первую очередь ориентируясь на их способность эмульгироваться в водных средах с тем, чтобы эти активные вещества имели максимальную биодоступность при пероральном применении лекарственного средства в физиологических условиях желудка субстанций возможно только с применением вспомогательных веществ со свойствами. Достичь высокой растворимости удалось, используя солюбилизаторы и поверхностно-активные вещества. Такими модуляторами растворимости является поливинилпирролидон (повидон, ГТВП) и лаурилсульфат натрия (ЛСН), ТВИН-80 и лецитин, количественные величины их введения в фармацевтическую композицию были определены в ходе фармацевтической разработки состава, ориентируясь на профили растворимости образцов, выполняя тест "Растворимость". Исследуя кинетику растворения образцов фармацевтической композиции как гранулята для капсул, так и для таблеток, при переменных массовых величинах ПВГТ, ЛСН, ТВИН-80 и лецитина было установлено оптимальное их соотношение с полимиксином.

Таблица 2

Состав и соотношение ингредиентов в одной капсуле или ядре таблетки фармацевтической композиции Полифро

№ п/п	Наименование ингредиента	в мг	в %
1	2	4	5
1	Липосомы с холекальциферолом (ЛХ)	40,00	20,00
2	Поливинилпирролидон К-25	40,00	20,00
3	Полимиксин	25,00	12,50
4	Целлюлоза микрокристаллическая	80,00	40,00
5	ТВИН-80	10,00	5,00
6	СКПЦ	3,00	1,50
6	Магния стеарат	2,00	1,00
Содержание капсулы или ядра таблетки:		200,00	100,00

Для обеспечения физико-химической стабильности комплекса весовое соотношение между ЛХ и ПВП должно находиться в пределах 1:1-1:3. Следует отметить, что эти массовые величины ПВП также достаточны для повышения растворимости субстанции полимиксина вследствие образования соответствующего комплексного соединения. Применяемые повидоны по своим молекулярным массам отличаются следующим образом: К90-1000000; К25-30000; С17-10000. Учитывая характеристики кинетики растворения комплекса кверцетина с ПВП, было подобрано достаточное количество ЛСН - поверхностно-активного вещества, способствующее быстрому и равномерному смачиванию поверхности комплексного гранулята. Это также отражалось на ускорении растворения комплекса в начальные периоды времени и, таким образом, могло создавать оптимальные условия для всасывания стенками желудка растворимой формы полимиксина. При значительной гидрофобности поверхности кристаллов ДН эти выбранные вспомогательные вещества - ПВП и ЛСН также способствовали растворимости этой субстанции, а тем самым могли повышать биодоступность этого НПВП. Положительное влияние на растворимость липосом и полимиксина также оказывает подобранное количество ПВП и ЛСН, о чем свидетельствуют профили растворимости.

Все образцы фармацевтической композиции, начиная с комплекса активных веществ - полимиксина и липосом с холекальциферолом с ПВП и ЛСН, получали в условиях последовательных технологических операций путем сухой или влажной грануляции ингредиентов комплекса и вспомогательных веществ. Приготовленные гранулы применялись для наполнения капсул или их таблетировали и исследовали растворимость этих лекарственных форм в соответствии с фармакопейным тестом "Растворение". Характеристики растворимости Полифро в фармацевтической композиции свидетельствовали о значительно более высокой растворимости этих активных ингредиентов по сравнению с растворимостью индивидуальных субстанций. В ходе фармацевтической разработки был изготовлен образец фармацевтической композиции, определенного состава (см. табл. 2), названный авторами "Полифро" и нашедший применение в исследованиях фармакологических свойств.

Фармацевтическая композиция приведенного состава, получаемая в соответствии с технологией сухого гранулирования, включает смешивание активных веществ с наполнителями, компактирование или брикетирование смеси, помол, смешивание помола с наполнителями и гранулирование, прессование гранулята в таблетки или наполнение ими твердых желатиновых капсул. Технология влажной грануляции отличается стадией гранулирования смеси, где вместо компактора или прессы используется оборудование для влажной грануляции и сушилка, такие как смеситель-гранулятор с мешалками типа Rota P или гранулятор-сушилка псевдокипящего слоя типа Hurling.

Приводим конкретные примеры осуществления изобретения. Нижеследующие примеры иллюстрируют основные аспекты данного изобретения, но не должны рассматриваться как имеющие ограничительное значение. Получение всех образцов гранул комплекса активных веществ - полимиксина, СКПЦ и холекальциферола в липосомах с ПВП осуществлялось в условиях технологических операций грануляции сухим или мокрым способом, применяя сухое прессование (компактирование) смеси активных ингредиентов, с последующим размолотом брикетированного материала. Влажную грануляцию выполняли в гранулятор-сушилках в вакууме или теплым проточным воздухом в устройствах с псевдокипящим слоем. Полученными гранулами наполняли капсулы или их таблетировали, исследуя растворимость этих лекарственных форм по тесту "Растворение". Характеристики растворимости системы полимиксин/СКПЦ/липосомальный холекальциферол в фармацевтической композиции свидетельствовали о значительно более высокой растворимости комплекса активных ингредиентов по сравнению с растворимо-

стью индивидуальных субстанций. Таким образом, в ходе фармацевтической разработки был изготовлен образец фармацевтической композиции, названный авторами изобретения "Полифро", который нашел, как препарат определенного состава, применение в исследованиях токсико-фармакологических свойств.

Таблица 3

Состав и соотношение ингредиентов на одну капсулу или
таблетку фармацевтической композиции Полифро

№ п/п	Наименование ингредиентов	мг	%
1	2	3	4
1	*Липосомы с холекальциферолом (ЛХ)	40,00	20,00
2	*Поливинилпирролидон К-25	40,00	20,00
3	*Полимиксин	25,00	12,50
4	Целлюлоза микрокристаллическая	80,00	40,00
5	*ТВИН-80	10,00	5,00
6	*СКПЦ	3,00	1,50
7	Магния стеарат	2,00	1,00
8.	Содержимое капсулы или ядра таблетки	200,00	100,00

* Указанные соединения вместе с фосфатным буфером в указанных % соотношениях использовались для создания жидкой инъекционной формы для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

Фармацевтическая композиция приведенного состава (табл. 3), полученная по технологии сухой грануляции, включает смешивание активных веществ с наполнителями, компактирование или брикетированием смеси, помол и смешивание ее с наполнителями и в конце гранулят прессуют в таблетки или наполняют им твердые желатиновые капсулы. Технология влажной грануляции отличается стадией гранулирования смеси, где вместо компактора или пресса используется оборудование для влажной грануляции и сушки, такое как гранулятор-смеситель с мешалками 25 типа Rota P или гранулятор-сушилка типа Nuttling с псевдокипящим слоем. Нижеследующие примеры осуществления изобретения иллюстрируют аспекты данного изобретения, но они не должны рассматриваться как имеющие ограничительное значение.

Пример 3. Получение липосомальной суспензионной формы холекальциферола для дальнейшего получения гранулята, таблеточной массы и таблетированных форм с полимиксином и СКПЦ.

В 80-200 мл 60% этанола растворяют 2-20 г полимиксина, 1-3 г холекальциферола, 1-7 г СКПЦ и 20-50 г фосфатидилхолина, затем этанол отгоняют под вакуумом, в полученную смесь добавляют 50 мл дистиллированной воды и обрабатывают ультразвуком при 44 кГц 15-50 мин, полученную суспензию липосом высушивают в лиофильной сушке, а полученный порошок используют, как показано в предыдущих примерах, для получения таблетированных форм, инъекционных форм. Размер липосомальных наночастиц при ультразвуковом эмульгировании составляет 120-300 нм. Если вместо лецитина использовать сухое молоко, размер частиц составит 500-1000 нм.

Доклиническое изучение фармацевтической композиции осуществлялось с применением образца Полифро в тестах исследования с целью установления в полном объеме токсико-фармакологических свойств будущего препарата, который может стать перспективным лекарственным средством.

Пример 4. Ингибирование накопления полимиксина в почках.

В этом опыте определяли накопление колистина в почках крыс после введения Полифро внутривенно (колистин, СКПЦ и липосомальный холекальциферол). Концентрации колистина (КС), СКПЦ (ЦК)/холекальциферола (ХКФ) использовали исходя из предварительного моделирования (количество сайтов связывания в одной молекуле, умноженное на их количество в одной молекуле мегалина, молекулярную массу мегалина и приблизительное количество мегалина в одной почке и вес почки). В результате получилось необходимое количество СКПЦ около 2 мг/кг веса. Для КС была выбрана субтоксическая доза (исходя из инструкции). Это эксперимент по "вытеснению" полимиксина из почек синергетической комбинацией ЦК/ХКФ. В результате около половины полимиксина было вытеснено из почек ЦК/ХКФ. Все компоненты КС, ЦК/ХКФ определяли в осадке почечного гомогената и надосадочной жидкости методом HPLC. На наш взгляд, ЦК один из лучших кандидатов в нефропротекторы, уже сейчас позволяющий значительно сократить токсичность полимиксина в клиниках. На фиг. 1 показано накопление колистина (А) и концентрация (В) колистина в мегалине почек у мышей. После 45 мин внутривенной инъекции смеси Полифро в пересчете на СКПЦ (2 мг/кг) и колистина (0,5 мг/кг) или физ. раствора в контроле собирали мочу крыс через 180 мин. Содержание колистина в почках (А) и его концентрацию в пересчете на вес почек (мкг/г) (В) показаны на фиг. 1. Каждая колонка показывает среднее значение (SD) четырех измерений при $P < 0,05$ (против контроля). Как видно из фиг. 6, накопление колистина в тканях почки как

в абсолютном выражении, так и в относительном в пересчете на вес почек уменьшается более чем в два раза благодаря более высокой аффинности к мегалину у СКПЦ и холекальциферола. Все данные статистически достоверны, и отличия между группами и контролями являются существенными.

В табл. 4 представлены результаты подавления накопления колистина в тканях почек для других фармацевтических композиций с колистином.

Таблица 4

Накопление полимиксина в присутствии нефропротекторов в тканях почек

№ п/п	Состав композиции	Накопление колистина в почках мкг	Концентрация колистина в почках, пересчет на ткани почек в мкг/г
1	Контроль (колистин)	20,5±2,5	8,25±2,25
2	Полифро	7,25±1,25*	2,25±1,25*
3	Колистин/Пантотеновая кислота/НАД	6,25±1,25*	2,50±1,25*
4	Колистин/СКПЦ /викасол	7,25±2,25*	2,25±1,25*
5	Колистин/Холекальциферол/викасол	9,50±2,50*	4,50±1,50*
6	Колистин/СКПЦ / пантотеновая кислота	8,50±1,50*	3,50±1,50*
7	Колистин/Пантотеновая кислота/ викасол	6,25±1,25*	2,50±0,50*
8	Колистин/СКПЦ /НАД	7,25±1,25*	2,25±1,25*
9	Колистин/Викасол/НАД	8,50±1,50*	3,50±1,50*
10	Колистин/Холекальциферол/НАД	4,50±1,50*	2,00±0,50*
11	Колистин/Холекальциферол/пантотеновая кислота	7,25±1,25*	2,25±1,25*

* P<0,05.

Как видно из табл. 4, все комбинации высокоаффинных лигандов мегалина успешно препятствуют накоплению полимиксина в мегалине почек. Отличия с контролем без нефропротекторов статистически значимы.

Пример 2. Предотвращение нефропротекторами из Полифро деструкции почечной ткани.

Степень деструкции тканей почек определяли по концентрации в моче ацетил-β-глюкозаминидазы (N-acetyl-beta-d-glucosaminidase) (NAG) и нейтрофильного желатиназа-ассоциированного липокалина (neutrophil gelatinase-associated lipocalin) (NGAL) (табл. 5).

У тех же крыс, получавших чистый колистин и Полифро, были изучены параметры мочи, показывающие степень разрушения почек (дозы 0,5/15 мг/кг полимиксин/СКПЦ в Полифро в виде внутривенной инъекции 1 раз в день 10 дней). Концентрации NGAL и NAG в моче определяли с применением ELISA-текст систем на ридере StatFax303+. В табл. 4 приведены сравнительные данные влияния свободного колистина и фармацевтической композиции Полифро на степень деструкции тканей почек.

Таблица 5

Влияние колистина и комбинированной фармацевтической композиции Полифро на степень деструкции почек

Показатель	Значение для опытной группы:	
	Полифро (n = 13)	Колистин (n = 15)
Экскреция NGAL с мочой (мкг/ч)	577*±18	775±33
Экскреция NAG с мочой (мкг/ч)	331*±10	2578±95

* P<0,05; отличия между контрольной и опытной группами статистически значимы.

Как видно из табл. 5, отличия в концентрациях NGAL и NAG между группами, где применяли чистый колистин и Полифро были статистически значимыми, т.е. СКПЦ/липосомальный холекальциферол эффективно защищает почки от действия негативного действия колистина.

В табл. 6 приведены аналогичные данные для других фармацевтических композиций с полимиксином.

Таблица 6

Накопление полимиксина в присутствии нефропротекторов в тканях почек

№ п/п	Состав композиции	Экскреция NGAL с мочой (мкг/ч) (n = 15)	Экскреция NAG с мочой (мкг/ч) (n = 15)
1	Контроль (колистин)	775±33	2578±95
2	Контроль (физ.раствор)	380*±25	300*±15
2	Полифро	577*±18	331*±10
3	Колистин/Пантотеновая кислота/НАД	610*±20	314*±8
4	Колистин/СКПЦ /викасол	558*±19	370*±12
5	Колистин/Холекальциферол/викасол	549*±18	394*±18
6	Колистин/СКПЦ / пантотеновая кислота	570*±16	390*±17
7	Колистин/Пантотеновая кислота/ викасол	526*±21	502*±22
8	Колистин/СКПЦ /НАД	598*±19	418*±21
9	Колистин/Викасол/НАД	510*±22	405*±15
10	Колистин/Холекальциферол/НАД	583*±25	518*±22
11	Колистин/Холекальциферол/пантотеновая кислота	580*±24	505*±19

* P<0,05.

Как видно из табл. 6, отличия в группах животных, принимающих только колистин и композиции колистина с разными нефропротекторами, статистически значимо отличаются. Для ацетилглюкозаминидазы этот показатель отличается в 8 раз по сравнению с контролем колистина. Таким образом, все патентуемые варианты фармацевтических композиций полимиксина с нефропротекторами даже при использовании субтоксической дозы полимиксина снижали нефротоксичность полимиксина фактически до нормы.

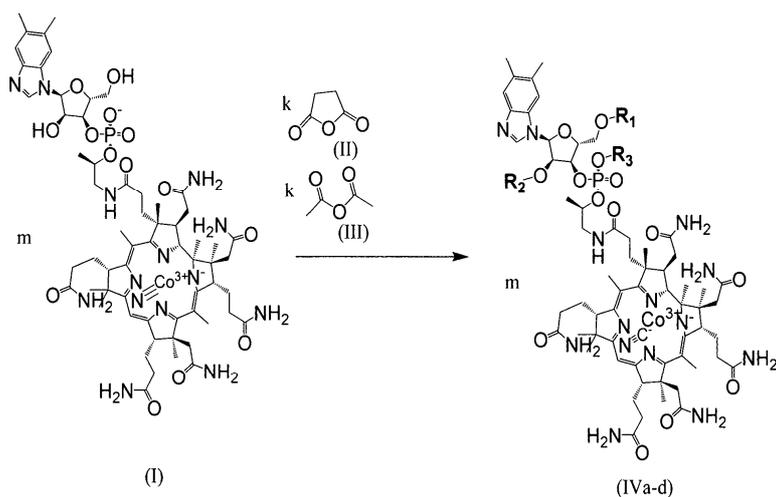
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция на основе полимиксина для лечения инфекционных заболеваний, включающая в качестве нефропротекторов комбинацию витаминов с супрамолекулярным комбинаторным производным цианокобаламина, полученным одновременной ковалентной модификацией структуры цианокобаламина янтарным и уксусным ангидридами, где мольное соотношение компонентов составило 20:21:21.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что в качестве витаминов также включает холекальциферол.

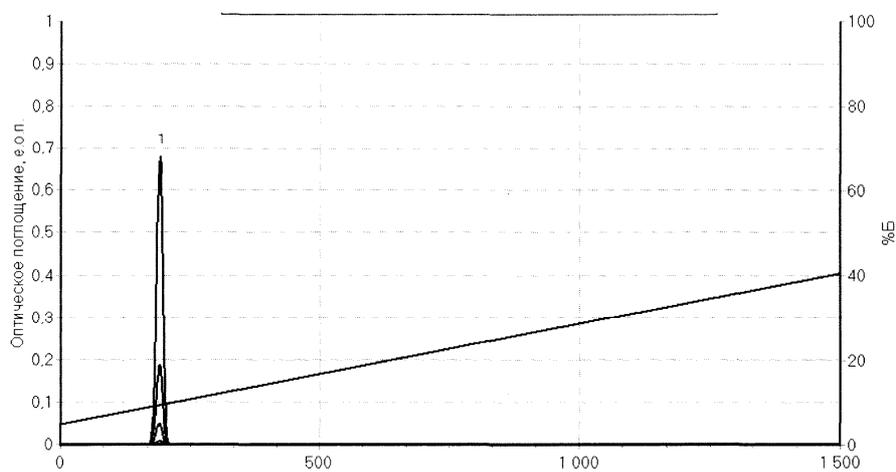
3. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что в качестве витаминов также включает викасол.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, отличающаяся тем, что в качестве витаминов также включает аскорбиновую кислоту.

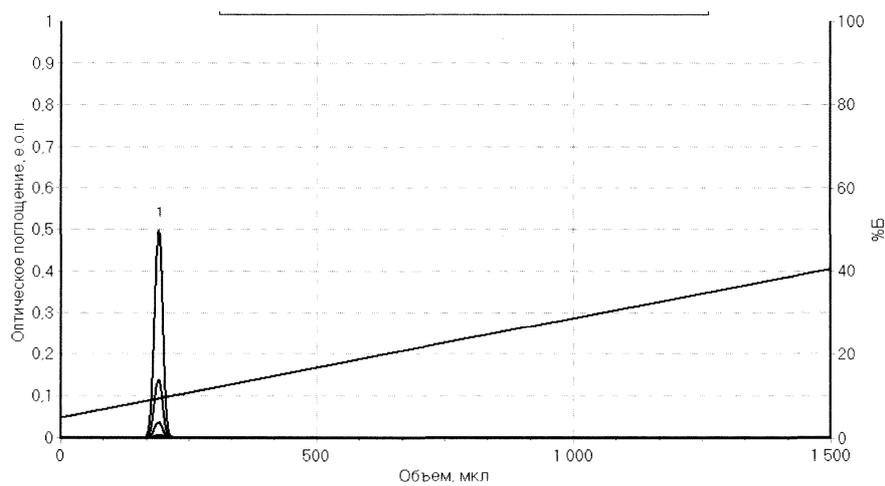


$R_1-R_3 = (a) \text{H}, (b) -\text{COCH}_3, (c) -\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{COOH}; (d) \text{Combinatorial sum } a+b+c$

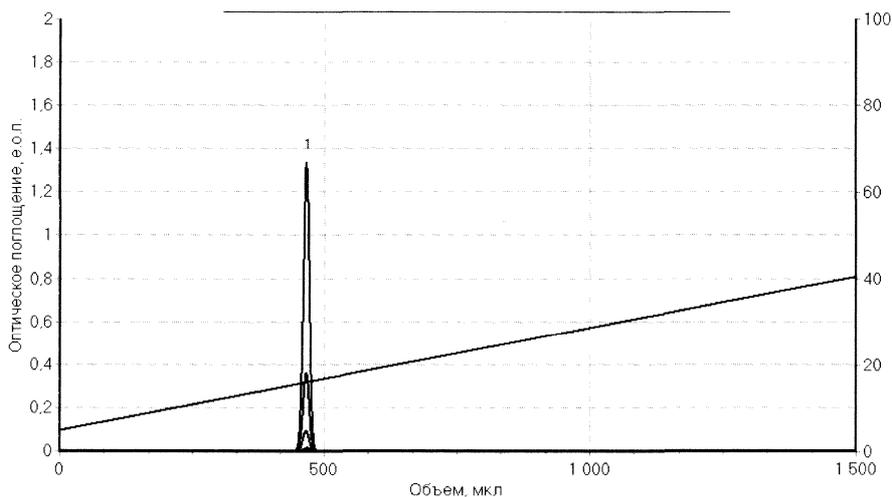
Фиг. 1



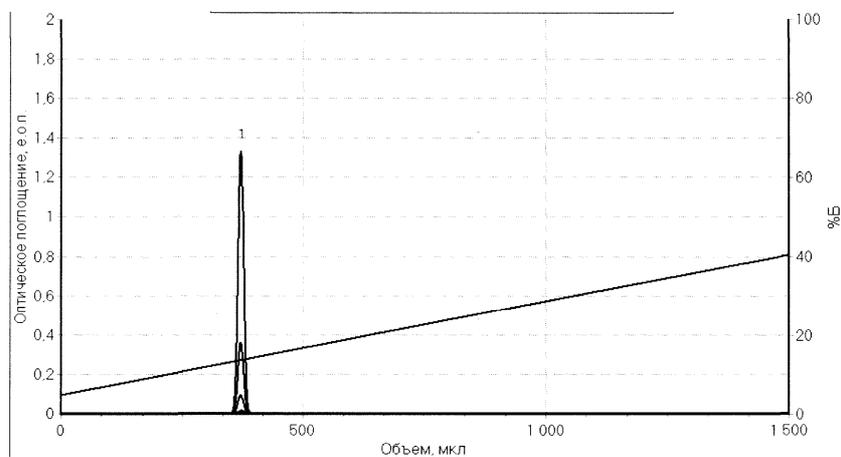
Фиг. 2



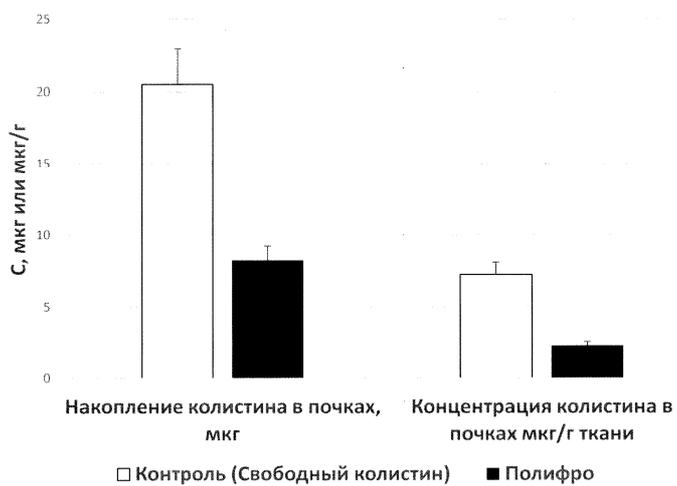
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6