



(51) МПК  
*C07K 14/78* (2006.01)  
*A61K 35/56* (2006.01)  
*A61P 7/02* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012135262/10, 15.08.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 15.08.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 15.08.2012

(45) Опубликовано: 20.03.2014 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: JP 2009235064 A, 15.10.2009. RU 2302250  
 C1, 10.07.2007. KR 10-2006-0125995 A,  
 07.12.2005. US 5074035, 24.12.1991. RU 2112527  
 C1, 10.06.1998. RU 2094999 C1, 10.11.1997. RU  
 2093166 C1, 20.10.1997.

Адрес для переписки:

690022, г. Владивосток, пр-кт 100 лет  
 Владивостоку, 159, ФГБУН Тихоокеанский  
 институт биорганической химии им. Г.Б.  
 Елякова Дальневосточного отделения РАН,  
 зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

Артюков Александр Алексеевич (RU),  
 Кофанова Нина Николаевна (RU),  
 Руцкова Татьяна Анатольевна (RU),  
 Купера Елена Владимировна (RU),  
 Маханьков Вячеслав Валентинович (RU),  
 Глазунов Валерий Петрович (RU),  
 Попов Александр Михайлович (RU),  
 Козловская Эмма Павловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение науки Тихоокеанский институт  
 биорганической химии им. Г.Б. Елякова  
 Дальневосточного отделения Российской  
 академии наук (ТИБОХ ДВО РАН) (RU)

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ, АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ, РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ, ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ, АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, СПОСОБНОСТЬЮ ИНГИБИРОВАТЬ КОЛЛАГЕНАЗУ И АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩИЙ ФЕРМЕНТ (АПФ), И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретения относятся к биотехнологии и могут быть использованы для получения биологически активных пептидов коллагена. Морскую звезду *Patiria pectinifera* обезвоживают 96% этиловым спиртом, затем деминерализируют 1-2 N раствором минеральной кислоты при соотношении сырье: минеральная кислота 1:(3-5) в течение 1-3 суток. Деминерализованное сырье отмывают от следов кислоты и водорастворимых примесей дистиллированной водой, после чего сырье гидролизуют раствором щелочи при соотношении сырье:раствор щелочи 1:(3-5) для удаления неколлагеновых белков и отмывают дистиллированной водой при температуре 2-4°C. Полученные коллагеновые остовы морской звезды гомогенизируют. Гомогенат

разбавляют дистиллированной водой, доводят pH суспензии до 8,0-8,5 раствором щелочи и гидролизуют 1% раствором коллагеназы при соотношении гомогенат-фермент (100-200):1 и температуре 30-40°C в течение 3-5 ч, pH 8,5-7,0. Инактивируют фермент при 80-90°C в течение 10-15 мин. Раствор гидролизата фильтруют для удаления негидролизованного коллагена, подвергают ультрафильтрации через мембранный фильтр 30 кДа для удаления деактивированного фермента, затем целевой продукт, обладающий противоопухолевой, антикоагулянтной, ранозаживляющей, противовоспалительной, антиоксидантной активностью, способностью ингибировать коллагеназу и ангиотензинпревращающий фермент (АПФ) и представляющий собой комплекс пептидов коллагена с

высокомолекулярным компонентом массой 22-23 кДа, концентрируют в вакууме и

лиофилизируют. 2 н.п. ф-лы, 7 табл., 6 ил., 2 пр.

RU 2 5 0 9 7 7 5 C 1

RU 2 5 0 9 7 7 5 C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 14/78* (2006.01)  
*A61K 35/56* (2006.01)  
*A61P 7/02* (2006.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012135262/10, 15.08.2012**

(24) Effective date for property rights:  
**15.08.2012**

Priority:

(22) Date of filing: **15.08.2012**

(45) Date of publication: **20.03.2014 Bull. 8**

Mail address:

**690022, g. Vladivostok, pr-kt 100 let  
Vladivostoku, 159, FGBUN Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova  
Dal'nevostochnogo otdelenija RAN, zav. patentnym  
otdelom N.I. Stadnichenko**

(72) Inventor(s):

**Artjukov Aleksandr Alekseevich (RU),  
Kofanova Nina Nikolaevna (RU),  
Rutskova Tat'jana Anatol'evna (RU),  
Kupera Elena Vladimirovna (RU),  
Makhan'kov Vjacheslav Valentinovich (RU),  
Glazunov Valerij Petrovich (RU),  
Popov Aleksandr Mikhajlovich (RU),  
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie nauki Tikhookeanskij institut  
bioorganicheskoj khimii im. G.B. Eljakova  
Dal'nevostochnogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (TIBOKh DVO RAN) (RU)**

(54) **AGENT, HAVING ANTITUMOUR, ANTICOAGULANT, WOUND-HEALING, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY, CAPACITY TO INHIBIT COLLAGENASE AND ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME, AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology and can be used to produce biologically active collagen peptides from marine hydrobionts. *Patiria pectinifera* starfish is dehydrated with 96% ethyl alcohol and then demineralised with 1-2 N solution of an inorganic acid with ratio of the raw material to inorganic acid of 1:(3-5) for 1-3 days. The demineralised raw material is washed from traces of acid and water-soluble impurities with distilled water, after which the material is hydrolysed with an alkali solution with ratio of raw material to the alkali solution of 1:(3-5) in order to remove non-collagen proteins and washed with distilled water at temperature of 2-4°C. The obtained starfish collagen shells are homogenised. The homogenate is diluted with distilled water; pH of the suspension is brought to a value equal to 8.0-8.5 with an alkali solution

and hydrolysed with 1% collagenase solution with ratio of homogenate to enzyme of (100-200):1 and temperature of 30-40°C for 3-5 hours, pH 8.5-7.0. The enzyme is inactivated at 80-90°C for 10-15 minutes. The hydrolysate solution is filtered to remove non-hydrolysed collagen, subjected to ultra-filtration through a 30 kD membrane filter to remove the inactivated enzyme; the end product, having antitumour, anticoagulant, wound-healing, anti-inflammatory, antioxidant activity, capacity to inhibit collagenase and angiotensin converting enzyme and which is a complex of collagen peptides with a high-molecular weight component weighing 22-23 kD, is concentrated in a vacuum and lyophilised.

EFFECT: obtaining a product, having antitumour, anticoagulant, wound-healing, anti-inflammatory and antioxidant activity.

2 cl, 7 tbl, 2 ex

Изобретение относится к фармакологическому, косметическому и пищевому производству и касается создания биологически активных средств и пищевых добавок из морских гидробионтов.

5 Морские гидробионты являются ценным источником биологически активных соединений. Особый интерес представляют группы биополимеров, составляющих структурную основу живых организмов, а именно коллагены и белки соединительных тканей. Известно, что морские беспозвоночные имеют в составе тканей белки, не уступающие по аминокислотному составу традиционным источникам питания, 10 являясь, таким образом, ценным пищевым ресурсом. Помимо этого пептиды морского происхождения проявляют целый ряд физиологических свойств, а именно оказывают антигипертензивное [Kim S.K., Wijesekara I. // J.Functional Foods. 2010. №2. P.1-9; Kim S.K., Mendis E. // Food Res. Int. 2006. V.39. P.383-393], антикоагулянтное [Kim S.K., Wijesekara I. // J.Functional Foods. 2010. №2. P.1-9; Hayes M., Carney B. // Food Chemistry. 15 2011. №129. P.235-244; RU 2302250 C1, 10.07.2007], антитромботическое действие [Wilson J., Hayes M., Carney B. // Food Chemistry. 2011. №129. P.235-244], а также проявляют антимикробную активность [Kim S.K., Wijesekara I. // J.Functional Foods. 2010. №2. P.1-9; Kim S.K., Mendis E. // Food Res. Int. 2006. V.39. P.383-393; Wilson J., Hayes M., Carney B. // Food Chemistry. 2011. №129. P.235-244; RU 404744 C2, 27.07.2010; RU 20 2396984 C2, 20.08.2010], противоопухолевую активность [Kim S.K., Wijesekara I. // J.Functional Foods. 2010. №2. P.1-9; RU 2161002 C1, 27.12.2000], антиоксидантную активность [Kim S.K., Wijesekara I. // J.Functional Foods. 2010. №2. P.1-9; Kim S.K., Mendis E. // Food Res. Int. 2006. V.39. P.383-393].

25 В связи с тем, что структура морских коллагенов подобна структуре теплокровных животных, они могут быть использованы в практической медицине для лечения поврежденной кожи и тканей [RU 2391399 C2, 10.06.2010, RU 2396084 C1, 10.08.2010], в офтальмологии [RU 2272599 C1, 27.03.2006], в косметологии [RU 2281082 C1, 10.08.2006]

30 Биоактивные пептиды морских гидробионтов являются потенциальным источником функциональных продуктов питания [Luo P., Ни С., Xia J., Ren С., Jiang X. // African Journal of Biotechnology. 2011. V.10(62). P.13610-13616; RU 2250047 C1, 20.04.2005; RU 2335951 C2, 20.10.2008; CN 1317268, 17.10.2001].

35 В последнее время большое внимание привлекают коллагены и пептиды из морских моллюсков, членистоногих, иглокожих, в том числе коллагеновые пептиды морских звезд.

Известен способ получения из морской звезды коллагена и его пептида путем 40 щелочной обработки сырья для удаления неколлагеновых материалов, последующего ферментативного гидролиза с использованием тартаровой или лимонной кислоты в качестве окислителя и кислой протеазы (1% пепсин) при температуре 5-10°C. Для получения пептида коллагена проводится повторный ферментолит нейтральной протеазой [KR 20060125995 A, 07.12.2006].

45 Известен способ получения пептида коллагена оболочки морской звезды путем замачивания сырья в разбавленном растворе щелочи, декальцинирования разбавленной соляной кислотой, экстракции раствором уксусной кислоты и кислой протеиназой (пепсазой), центрифугирования с последующей обработкой пептидного 50 раствора макропористой смолой и лиофильной сушкой [CN 1740199 A, 01.03.2006].

Известен способ получения низкомолекулярных пептидов коллагена путем погружения измельченных звезд в дистиллированную воду, содержащую перекись водорода и гидроксид натрия, фильтрации, экстракции дистиллированной водой,

содержащей 0,5% лимонной и аскорбиновой кислот, обработки ультразвуком, декомпрессии и сублимации [KR 20110055126 A, 25.05.2011]. Получают наноконпозицию пептидов коллагена, обладающую антиоксидантным эффектом. Предложено использовать ее в качестве косметического средства против морщин.

5 В качестве прототипа выбран биологически активный пептид коллагена из морских звезд, являющийся супрессором повышения уровня глюкозы в крови [JP 2009235064 A, 15.10.2009]. Его получают путем последовательной обработки сырья щелочью, затем кислотой. Далее сырье обрабатывают нейтральной протеазой с получением  
10 гидролизата, из которого выделяют пептид коллагена морской звезды.

Морские звезды являются одним из наиболее распространенных гидробионтов класса иглокожих. Среди них хищная морская звезда - патирия гребешковая (*Patiria pectinifera*) - является главным врагом марикультурных огородов. В то же время этот непромысловый вид морских иглокожих может служить ценным источником белка.  
15 Содержание протеина в морских звездах составляет около 20% от сухого веса [Luo P., Hu C., Xia J, Ren C., Jiang X. // African Journal of Biotechnology. 2011. V.10(62). P.13610-13616].

В основу настоящего изобретения положена задача создания нового средства из  
20 морской звезды *Patiria pectinifera*, обладающего широким спектром биологической активности, и разработки способа его получения из этого гидробионта.

Задача решена разработкой способа получения средства, обладающего  
противоопухолевой, антикоагулянтной, ранозаживляющей, противовоспалительной,  
25 антиоксидантной активностью, способностью ингибировать коллагеназу и ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), заключающегося в том, что морскую звезду *Patiria pectinifera* обезвоживают 96% этиловым спиртом, затем деминерализируют 1-2 N раствором минеральной кислоты при соотношении сырье: минеральная кислота 1:(3-5) в течение 1-3 суток. Деминерализованное сырье  
30 отмывают от следов кислоты и водорастворимых примесей дистиллированной водой.

Затем сырье гидролизуют раствором щелочи при соотношении сырье:раствор щелочи 1:(3-5) для удаления неколлагеновых белков. Далее депротеинизированное сырье отмывают дистиллированной водой при температуре 2-4°C, затем полученные  
35 коллагеновые остовы морской звезды гомогенизируют, гомогенат разбавляют дистиллированной водой, доводят рН суспензии до 8,0-8,5 раствором щелочи и гидролизуют 1% раствором коллагеназы при соотношении гомогенат:фермент (100-200):1 и температуре 30-40°C в течение 3-5 ч, рН 8,5-7,0.

Затем фермент инактивируют при 80-90°C в течение 10-15 мин, раствор гидролизата  
40 фильтруют для удаления негидролизованного коллагена, подвергают ультрафильтрации через мембранный фильтр 30 кДа для удаления деактивированного фермента, далее целевой продукт концентрируют в вакууме и лиофилизируют.

В результате осуществления этого способа получают новое средство, обладающее  
45 противоопухолевой, антикоагулянтной, ранозаживляющей, противовоспалительной, антиоксидантной активностью, способностью ингибировать коллагеназу и ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), представляющее собой комплекс пептидов коллагена с высокомолекулярным компонентом 22-23 кДа, определенным при проведении электрофореза в полиакриламидном геле.

50 Экспериментально установлено, что полученное в результате осуществления заявленного способа средство обладает высокой биологической активностью, а именно:

1. Противоопухолевой (торможение роста опухоли (ТРО)>56%);

2. антикоагулянтной (активированное парциально тромбопластиновое время (АПТВ) увеличивается в 4 раза по сравнению с контролем);

3. противовоспалительной (замедление воспаления на 43% по сравнению с контролем);

4. антиоксидантной (снижение уровня продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) на 46%);

5. ранозаживляющей в составе мазевых композиций (ускорение заживления термического ожога на 7-й день на 163%);

6. ингибирующей протеолитические ферменты (АПФ на 60%, коллагеназа на 80%).

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в получении нового средства из морской звезды *Patiria pectinifera*, обладающего более широким спектром физиологически активных свойств по сравнению с прототипом. По ряду активностей наблюдается увеличение по сравнению с уровнем аналогичных активностей, проявляемых базовыми препаратами сравнения. Заявляемое средство может быть использовано в качестве субстанции при производстве лекарственных, парафармацевтических препаратов, а также косметических средств.

Изобретение обеспечивает также, с одной стороны, расширение сырьевой базы для получения биологически активных пептидов коллагена, а с другой стороны, решает проблему утилизации такого хищного иглокожего для марикультуры, каким является морская звезда *Patiria pectinifera*.

Заявляемый способ осуществляется следующим образом.

Морские звезды *P. pectinifera*, свежельовленные или дефростированные, помещают на сетчатые фильтры до полного стока морской воды, затем обезвоживают 96% этиловым спиртом. Спирт отправляют на переработку. Далее сырье деминерализуют 1-2 N раствором минеральной кислоты при соотношении сырье: минеральная кислота 1:(3-5) в течение 1-3 суток. Деминерализованное сырье отмывают от следов кислоты и водорастворимых примесей дистиллированной водой. Неколлагеновые белки отделяют щелочным протеолизом 0,1-0,5 N раствором щелочи при соотношении сырье:раствор щелочи 1:(3-5).

Затем депротеинизированное сырье отмывают от растворимых продуктов ферментолиза дистиллированной водой при температуре 2-4°C.

Полученные коллагеновые остовы морской звезды гомогенизируют, затем гомогенат разбавляют дистиллированной водой, доводят pH суспензии до 8,0-8,5 раствором щелочи и гидролизуют 1% раствором коллагеназы при 30-40°C в течение 3-5 ч при соотношении гомогенат:фермент (100-200):1. Начальное значение pH 8,5-7,8, конечное значение pH процесса 7,0. Регулирование pH производится 5 N раствором щелочи. Инактивирование фермента проводят нагреванием гидролизата до 80-90°C в течение 10-15 мин.

Затем раствор гидролизата фильтруют для удаления негидролизованного коллагена, подвергают ультрафильтрации через мембранный фильтр 30 кДа для удаления деактивированного фермента, затем целевой продукт (ПКЗ) концентрируют в вакууме и лиофилизируют. Выход целевого продукта составляет 7-10% от веса сырья (23-33% в пересчете на сухой вес).

Аббревиатура ПКЗ - комплекс пептидов коллагена морской звезды *P. Pectinifera*.

Для подтверждения белковой природы продукта проведен анализ образцов биологически активных пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera* методами ИК- и UV-VIS-спектрометрии.

ИК-спектры пептидов регистрировали на Фурье-ИК-спектрофотометре Equinox 55

(Bruker, Германия) в таблетках из KBr (~1 мг/700 мг) с разрешением 2 см<sup>-1</sup>.

На фиг.1 представлен ИК-спектр биологически активных пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera*. В ИК-спектре в области ниже 2000 см<sup>-1</sup> присутствуют полосы поглощения Амид I (около 1650 см<sup>-1</sup>), Амид II (около 1550 см<sup>-1</sup>) и Амид III (около 1230-1250 см<sup>-1</sup>), что свидетельствует о белковой природе исследуемых веществ. [Ю.Н.Чиргадзе. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. Наука, М., 1965, стр.134].

UV-VIS-спектры водных растворов пептидов коллагена морской звезды *P. Pectinifera* (~1 мг/мл) регистрировали в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см на спектрофотометре UV-1601-PC (Shimadzu, Япония).

На фиг.2 представлен UV-VIS-спектр водного раствора биологически активных пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera*. В UV-VIS-спектре присутствует полоса поглощения (около 275 нм), характерная для веществ белковой природы.

Комплекс биологически активные пептиды коллагена морской звезды *P. pectinifera* был проанализирован методом ядерно-магнитного резонанса на ядрах <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C на приборе «Bruker Avance III» (700 МГц). Фиг.3 - <sup>1</sup>H ЯМР-спектр, фиг.4 - <sup>13</sup>C ЯМР-спектр комплекса пептидов морской звезды *P. pectinifera*.

Определен аминокислотный состав целевого продукта. Из него следует, что полученные пептиды представляют собой фрагменты коллагена и значительно отличаются по аминокислотному составу от композиции пептидов рыб. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1			
Аминокислотный состав*			
№	Наименование аминокислоты	Пептиды морской звезды <i>Patigia pectinifera</i>	Композиция пептидов рыбы* <i>Theragra chalcogramma</i>
1	Аспаргиновая кислота	2.69	1.26
2	Треонин	1.33	0.93
3	Серии	1.48	0.75
4	Глутаминовая кислота	5.8	1.38
5	Гидроксипролин	3.32	-
6	Пролин	4.19	0.72
7	Глицин	8.62	0.87
8	Аланин	2.14	0.91
9	Цитрулин	-	-
10	Валин	1.2	0.95
11	Метионин	0.16	0.64
12	Цистин		0.15
13	Изолейцин	0.67	1.18
14	Лейцин	0.83	1.31
15	Тирозин	0.48	0.65
16	Фенилаланин	0.22	0.78
17	Лизин	0.97	1.84
18	Гистидин	0.22	0.42
19	Аргинин	3.71	1.19

\*получен по предлагаемому способу для проведения сравнения аминокислотного состава пептидов, полученных из морских гидробионтов.

Данные <sup>1</sup>H ЯМР-спектроскопии подтверждают, что ПКЗ не содержат триптофан (полное отсутствие сигналов в области протонов ароматических аминокислот) (фиг.3). Наличие фенилаланина (7.443-7.340 м.д.) и тирозина (7.211-6.899 м.д.) подтверждено

идентификацией сигналов их химических сдвигов.

Количественная оценка содержания тирозина и фенилаланина, полученная методом интегрирования количества протонов, указывает на то, что тирозина в составе ПКЗ приблизительно в 2 раза больше, чем фенилаланина. Это хорошо согласуется с данными аминокислотного состава.

Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР ПКЗ демонстрирует наличие сигналов  $^{13}\text{C}$  пептидной связи, ароматических и алифатических аминокислот (фиг.4).

Молекулярно-весовое распределение пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera* определено методом гель-хроматографии на сефадексе Г-75.

На фиг.5 приведен профиль элюции суммарного комплекса пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera* на сефадексе Г-75.

(—■—) - Концентрация пептидов (поглощение при  $\lambda$  278 нм), объем фракции 3 мл;

(—○—) - Ингибирующая активность фракций пептидов *P. pectinifera* (%) по отношению к ангиотензинпревращающему ферменту.

Обнаружено, что белковая композиция представляет собой набор пептидов с различной молекулярной массой.

Молекулярную массу пептидов коллагена морской звезды *P. pectinifera* определяли методом SDS-электрофореза в 15% полиакриламидном геле [Laemmlı U.K. // Nature 1970, v.277, p.680-685].

Установлено, что среди крупных пептидов коллагена морской звезды присутствует компонент с молекулярной массой 22-23 кДа.

На фиг.6 представлен SDS-электрофорез ПКЗ:

1 - смесь рекомбинантных белков-свидетелей с молекулярным весом от 250 до 15 кДа (Gel Electrophoresis Markers Kit for Protein, «Sigma-Aldrich»);

2, 3 - ПКЗ (пептиды коллагена *P. pectinifera*).

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1.

Свежевыловленные морские звезды *P. pectinifera* в количестве 1,0 кг (260-270 штук) помещают на сетчатый фильтр до полного стока морской воды. Затем сырье заливают 1 л 96% этилового спирта для удаления тканевых и внутренних влагосодержащих жидкостей на 1 ч. Полученный спиртовой экстракт сливают и отправляют на переработку.

Затем проводят деминерализацию сырья 1,0 N раствором соляной кислоты при соотношении вес сырья к объему раствора кислоты 1:5 в течение суток.

Деминерализованное сырье отмывают от следов кислоты и водорастворимых примесей дистиллированной водой, затем гидролизуют 0,1 N раствором NaOH при соотношении вес сырья к объему раствора щелочи 1:5 в течение 3 дней. Полученное депротеинизированное сырье отмывают от растворимых продуктов ферментолиза дистиллированной водой при температуре 2-4°C.

Затем полученные коллагеновые остовы морских звезд измельчают на мясорубке и гомогенизируют. Гомогенат разбавляют дистиллированной водой при соотношении 1:3, перемешивают до получения однородной суспензии и помещают в реактор для ферментолиза. Доводят pH суспензии до 8,5, используя раствор NaOH. Затем в реактор добавляют 1% раствор коллагеназы при соотношении гомогенат:фермент 100:1.

Реакционную смесь интенсивно перемешивают. Процесс проводят при температуре 30°C в течение 5 ч. Контролируют процесс ферментолиза по изменению pH. Процесс завершают при pH 7,0. Инактивацию фермента проводят нагреванием гидролизата до 80°C в течение 15 мин. Продукт фильтруют в горячем виде через тканый фильтр

для удаления негидролизованного коллагена. Деактивированный фермент удаляют ультрафильтрацией гидролизата через мембранный фильтр 30 кДа.

Полученный продукт концентрируют в вакууме и лиофилизируют. Получают целевой продукт с выходом 101 г (10% от веса исходного сырья или 33% в пересчете на сухое сырье). Содержание пептидов в продукте 90%. Молекулярная масса полученного комплекса составляет порядка 22 кДа. Влага составляет 6%, примеси-4%.

Пример 2. Замороженное сырье - морские звезды *P. pectinifera* в количестве 10 кг дефростируют, затем заливают 15 л 96% этилового спирта на 3 ч. Полученный спиртовой экстракт сливают и отправляют на переработку.

Затем проводят деминерализацию сырья 2,0 N раствором фосфорной кислоты при соотношении вес сырья к объему раствора кислоты 1:3 в течение 3 суток.

Деминерализованное сырье отмывают от следов кислоты и водорастворимых примесей дистиллированной водой, затем гидролизуют 0,5 N раствором КОН при соотношении вес сырья к объему раствора щелочи 1:3 в течение 2 дней. Полученное депротеинизированное сырье отмывают от растворимых продуктов ферментолиза дистиллированной водой при температуре 2-4°C.

Затем полученные коллагеновые остовы морских звезд измельчают на мясорубке и гомогенизируют. Гомогенат разбавляют дистиллированной водой при соотношении 1:4, перемешивают до получения однородной суспензии и помещают в реактор для ферментолиза. Доводят рН суспензии до 8,0, используя раствор КОН. Затем в реактор добавляют 1% раствор коллагеназы при соотношении гомогенат:фермент 200:1.

Реакционную смесь интенсивно перемешивают. Процесс проводят при температуре 40°C в течение 3 ч. Контролируют процесс ферментолиза по изменению рН. Процесс завершают при рН 7,0. Инактивацию фермента проводят нагреванием гидролизата до 90°C в течение 10 мин. Продукт фильтруют в горячем виде через тканый фильтр для удаления негидролизованного коллагена. Деактивированный фермент удаляют ультрафильтрацией гидролизата через мембранный фильтр 30 кДа.

Полученный продукт концентрируют в вакууме и лиофилизируют. Получают целевой продукт с выходом 0,71 кг (7,1% от веса исходного сырья или 23% в пересчете на сухое сырье). Содержание пептидов в продукте 80%. Молекулярная масса полученного комплекса составляет порядка 23 кДа. Влага составляет 10%, примеси-10%

#### **Исследование биологической активности заявляемого средства из морской звезды *Patiria pectinifera***

Противоопухолевая активность

Эксперименты выполняются на беспатогенных мышах линии CD-1 и СВА массой 20±2 г. Перевивку, поддержание штаммов и оценку полученных результатов осуществляют по методике, принятой в Российском онкологическом научном центре АМН РФ [Софьина З.П. и др. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. - М.: Медицина, 1980. - 296 с.]. В качестве положительного контроля используют известный противоопухолевый препарат «Циклофосфан» (ЦФ), «Биохимия» (Россия).

Противоопухолевый эффект оценивают по торможению роста опухоли (ТРО), % по сравнению с контролем по формуле:

$$ТРО(\%) = (1 - T/C) \times 100,$$

где Т и С - средние значения (в мг) веса опухоли в опытной и контрольной группах соответственно.

Значения ТРО более 25% рассматриваются как достоверный противоопухолевый

эффект. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2			
Противоопухолевая активность			
Наименование параметра	Ед. изм	Доза	Измеренное значение ТРО
ЦФ	%	20 мг/кг	40,0±14,55
ПКЗ	%	10 мг/кг	51,36±24,97
ПКЗ	%	5 мг/кг	56,75±17,65
ПКЗ+ЦФ	%	5/20 мг/кг	44,51±8,59

Как следует из таблицы, ПКЗ проявляет более высокую активность в значительно более низкой дозе по сравнению с циклофосфаном. Кроме того, имеет место эффект синергизма: увеличение активности ЦФ при совместном применении с ПКЗ.

#### Антикоагулянтная активность

Антикоагулянтную активность образцов ПКЗ в условиях *in vitro* оценивают по следующим показателям: определение протромбинового времени (ПВ) и активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ).

Определение проводят на автоматическом коагулометре Amelung (Германия) с механическим принципом определения. Для исследований используют стандартные наборы «Техпластин-тест» и «АЧТВ-тест» фирмы «Технология-стандарт» г. Барнаул.

Анализ проводят на человеческой бедной тромбоцитами плазме, стабилизированной 3,8% цитратом натрия в соотношении 9:1. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3					
Антикоагулянтная активность пептидов коллагена морской звезды <i>P. rectifera</i>					
Наименование параметра	Ед. изм.	Требования к параметру			Измеренное значение
		Доза	Номинальное значение	Предельное отклонение	
Антикоагулянтная активность, определение протромбинового времени (ПВ)					
ПВ Контроль	сек		11,0-15,0	0,05	15,1±0,1
ПВПКЗ	сек	1 мг/мл	15,0	0,05	15,87±0,12
ПВПКЗ	сек	1,5 мг/мл	15,0	0,05	16,87±0,15
ПВПКЗ	сек	2 мг/мл	15,0	0,05	18,9±0,79
Антикоагулянтная активность, определение активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ)					
АПТВ Контроль	сек	-	30-50	0,05	36,17±0,38
АПТВ ПКЗ	сек	0,1 мг/мл	35-50	0,05	44,63±0,95
АПТВ ПКЗ	сек	0,3 мг/мл	35-50	0,05	56,97±0,25
АПТВ ПКЗ	сек	0,7 мг/мл	35-50	0,05	68,93±0,05
АПТВ ПКЗ	сек	1 мг/мл	35-50	0,05	92,27±1,40
АПТВ ПКЗ	сек	1,5 мг/мл	35-50	0,05	128,1±1,01
АПТВ ПКЗ	сек	2 мг/мл	35-50	0,05	145,9±1,87
Гепарин	сек	0,4 мг/мл	35-50	0,05	205,0±1,48

Препарат сравнения - гепарин. Пределы колебания ПВ у здорового взрослого человека 11-15 сек. Пределы колебания АПТВ у здорового взрослого человека 30-50 сек.

В тесте определения АПТВ исследуемые образцы проявили достаточно сильное антикоагулянтное действие. Уже в дозе 0,1 и 0,3 мг/мл ПКЗ увеличил время образования сгустка в 1,5-2 раза. По-видимому, ПКЗ действует как антикоагулянт на внутренний путь активации свертывания крови. Их антикоагулянтное действие сравнимо с таковым известного антикоагулянта гепарина.

#### Противовоспалительная активность

Эксперименты выполняются на беспатогенных мышах линии СВА массой 20±2 г.

Неспецифическое локальное воспаление индуцируют введением дельта-каррагинана (тип IV, Sigma). ПКЗ и препарат сравнения индометацин применяют в лечебной дозе 10 мг на 1 кг веса тела животного. Препараты вводят внутривентриально за 1 ч до индукции воспаления каррагинаном. Контрольной группе животных вводят физраствор.

Уровень замедления роста ткани гранулемы фиксируют через 5 ч после введения каррагинана и рассчитывают по уравнению:

$$\text{замедление воспаления (\%)} = \frac{T_c - T_v}{T_c} \times 100,$$

где  $T_c$  - вес ткани гранулемы в контрольной группе;

$T_v$  - вес ткани гранулемы в группе, получившей противовоспалительные препараты. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4				
Противовоспалительная активность				
Наименование препарата	Ед. изм.	Требования к параметру		Измеренное значение
		Номинальное значение	Предельное отклонение	
Определение противовоспалительной активности на каррагинановой модели				
Индометацин, 10 мг/кг	%	>25,0	0,05	52,0±4,06
ПКЗ, 10 мг/кг	%	>25,0	0,05	43,0±2,47

Пептиды коллагенов иглокожих проявляют высокую противовоспалительную активность, сравнимую с таковой лекарственного препарата индометацина.

Ранозаживляющая активность

Используют композицию ПКЗ на основе детского крема («Аванта», Россия) - КПКЗ 1% и КПКЗ 5%. Лечение ран проводят 4 раза в день. Курс лечения 11 дней. Измерение площадей поврежденных поверхностей и оценку состояния ран проводят индивидуально для каждого животного.

Ранозаживляющую активность (РА) рассчитывают в процентах по формуле:

$$РА(\%) = 100 - (S_1 \times 100 / S_2),$$

где  $S_1$  - конечная площадь раны,  $S_2$  - исходная площадь раны.

Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5						
Ранозаживляющая активность						
Наименование препарата	Ед. изм.	Требования к параметру		Измеренное значение		
		Номинальное значение	Предельное отклонение	Заживление термических ожогов, % (m±σ)		
				7 день	9 день	11 день
Метилурацил	%	>100,0	0,05	144,5±23,2	113,7±1,4	100,4±1,2
КПКЗ 1%	%	>100,0	0,05	163,2±10,1	123,43±2,1	101,7±1,2
КПКЗ 5%	%	>100,0	0,05	128,2±18,8	115,6±4,1	101,4±1,3

Применение кремовой ПКЗ композиции сокращает время заживления ран, особенно четко различие в ранозаживляющей активности проявляется на седьмой день после индукции термических ожогов (более 50%), при этом 1%-ный крем ПКЗ проявляет более высокую активность, чем 5%-ный крем. ПКЗ в составе кремовых препаратов (КПКЗ 1 и 5%) обладает выраженным ранозаживляющим действием и превосходит по действию лекарственный препарат метилурацил.

Антиоксидантная активность

Исследования проводят на мышах-самцах линии СВА массой 18-20 г с индуцированным аллоксановым диабетом.

Лечение проводят в течение 7 дней после индукции аллоксанового диабета. В качестве препарата сравнения используют глибенкламид.

После окончания эксперимента проводят заборы крови и определяют основные показатели изменений в липидном и углеводном обмене на биохимическом анализаторе («ROCHE», Швейцария). Изменения в углеводном обмене при индукции диабета определяют в глюкозотолерантном тесте с помощью глюкометра «Сателлит» (ООО «Элта», Россия) через 60 мин после перорального введения глюкозы в дозе 4 г/кг массы тела.

Выраженность свободнорадикальных процессов в крови определяют по содержанию в ней ТБК-реактивных продуктов. Расчет уровня ТБК-реактивных продуктов проводят по формуле:

$$C = \frac{\Delta E}{1,56 \times 10^5}, \text{ (ммоль/л)}$$

C - количество ТБК-реактивных продуктов в плазме крови;

$\Delta E$  - разница экстинкций опытной и холостой проб;

$1,56 \times 10^5$  (ммоль/л) - молярный коэффициент экстинкций. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6						
Антиоксидантная активность						
Наименование препарата	Измеренное значение, %					
	Глюкоза,	ГТТ*	Холестерин	Триглицериды	Билирубин	ТБК-РП**
Глибенкламид, 5 мг/кг	79,6±1,5	2,28±0,9	19,9±0,8	6,7±0,1	27,3±2,5	30,4±1,3
ПКЗ, 50 мг/кг	80,6±1,3	5,9±1,8	21,9±0,3	40,7±0,2	19,3±3,1	32,6±1,6
ПКЗ, 100 мг/кг	74,6±1,8	8,2±3,2	22,1±0,1	84,5±0,1	47,8±2,3	46,7±2,4

ГТТ\* - глюкозотолерантный тест;  
ТБК-РП\*\* - продукты, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой

Заявляемое средство проявляет хорошую антиоксидантную активность, его лечебное действие сравнимо с действием известного лекарственного препарата глибенкламида.

Ингибирующее действие на протеолитические ферменты, в том числе металлопротеиназы

Ингибирование активности коллагеназы

Способ основан на гидролизе коллагена I типа коллагеназой до аминокислот с последующим их определением. За единицу коллагенолитической активности принимают такое количество фермента, которое при взаимодействии с коллагеном I типа в течение 30 мин при pH 7,5 и температуре (37±0,1)°C увеличивает оптическую плотность раствора на 1,0 в мин при длине волны 570 нм.

Коллагенолитическую активность препарата коллагеназы (КА) в единицах на миллиграмм вычисляют по формуле:

$$КА = D \times V / 0,1 \times C$$

$$КА_1 = D \times V / 0,1 \times C \times C_1$$

где D - значение оптической плотности раствора;

V - объем пробы коллагеназы;

C - концентрация коллагеназы;

C<sub>1</sub> - концентрация образца;

0,1 - коэффициент пересчета на количество коллагенолитических единиц.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое

значение активностей, полученных при анализе двух параллельных навесок ферментного препарата.

Ингибирующую активность вычисляют по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = (1 - \text{КА}_1 / \text{КА}) \times 100$$

Результаты представлены в таблице 7.

Исследование ингибирующей активности показало наличие высокого дозозависимого ингибирующего действия ПКЗ (80%).

Ингибирование ангиотензинпревращающего фермента

Оценку ингибирующей активности ПКЗ по отношению к ангиотензинпревращающему ферменту (АПФ) проводили по методу Cushman D.W., Cheung H.S. [Cushman D.W., Cheung H.S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotension I-converting enzyme of rabbit lung // Biochem. Pharmacol. 1971. V.20. P.1637-1648].

Ингибирующую активность исследуемых пептидов выражают как процентное соотношение количества гиппуровой кислоты в контроле и исследуемых образцах

$$A(\%) = \text{СК}_{\text{Гип}} \times 100\% / \text{СПКЗ}_{\text{Гип}}$$

где: СК<sub>Гип</sub> - количество гиппуровой кислоты в контрольном образце;

СПКЗ<sub>Гип</sub> - количество гиппуровой кислоты в исследуемом образце;

A-АПФ - ингибирующая активность ПКЗ.

Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7					
Ингибирующая активность					
№	Наименование параметра	Ед. изм.	Требования к параметру		Измеренное значение, % ингибирования
			Номинальное значение	Предельное отклонение	
1	Ингибирование активности коллагеназы:	%	>10 относительно контроля	5,0	43,0±1,23 57,0±1,27 80,0±1,35
	100 мкг				
	200 мкг				
	300 мкг				
2	Антигипертензивная активность - ингибирующая активность в отношении ангиотензин-1-превращающего фермента (АПФ):	%	>10 относительно контроля	5,0	20,0±1,38 30,0±1,27 60,0±1,41
	100 мкг				
	200 мкг				
	300 мкг				

На фиг.5 приведена ингибирующая активность фракций ПКЗ, полученных методом гель-хроматографии на сефадексе Г-75, по отношению к ангиотензинпревращающему ферменту (—○—) .

Установлено, что фракции ПКЗ обладают достаточно высокой активностью по отношению к АПФ.

#### Формула изобретения

1. Способ получения средства, обладающего противоопухолевой, антикоагулянтной, ранозаживляющей, противовоспалительной, антиоксидантной активностью, способностью ингибировать коллагеназу и ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), заключающийся в том, что морскую звезду *Patiria pectinifera* обезвоживают 96% этиловым спиртом, затем деминерализуют 1-2 N раствором минеральной кислоты при соотношении сырье:минеральная кислота 1:(3-5) в течение 1-3 суток, деминерализованное сырье отмывают от следов кислоты и

водорастворимых примесей дистиллированной водой, далее сырье гидролизуют раствором щелочи при соотношении сырье:раствор щелочи 1:(3-5) для удаления неколлагеновых белков, затем депротеинизированное сырье отмывают дистиллированной водой при температуре 2-4°C, полученные коллагеновые остовы морской звезды гомогенизируют, гомогенат разбавляют дистиллированной водой, доводят рН суспензии до 8,0-8,5 раствором щелочи и гидролизуют 1% раствором коллагеназы при соотношении гомогенат-фермент (100-200):1 и температуре 30-40°C в течение 3-5 ч, рН 8,5-7,0, затем фермент инактивируют при 80-90°C в течение 10-15 мин, далее раствор гидролизата фильтруют для удаления негидролизованного коллагена, подвергают ультрафильтрации через мембранный фильтр 30 кДа для удаления деактивированного фермента, затем целевой продукт, представляющий собой комплекс пептидов коллагена с высокомолекулярным компонентом массой 22-23 кДа, концентрируют в вакууме и лиофилизируют.

2. Средство, обладающее противоопухолевой, антикоагулянтной, ранозаживляющей, противовоспалительной, антиоксидантной активностью, способностью ингибировать коллагеназу и ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), характеризующееся тем, что оно получено способом по п.1 и представляет собой комплекс пептидов коллагена с высокомолекулярным компонентом 22-23 кДа, определенным при проведении электрофореза в полиакриламидном геле.

25

30

35

40

45

50