



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 140 292** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 47/48**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

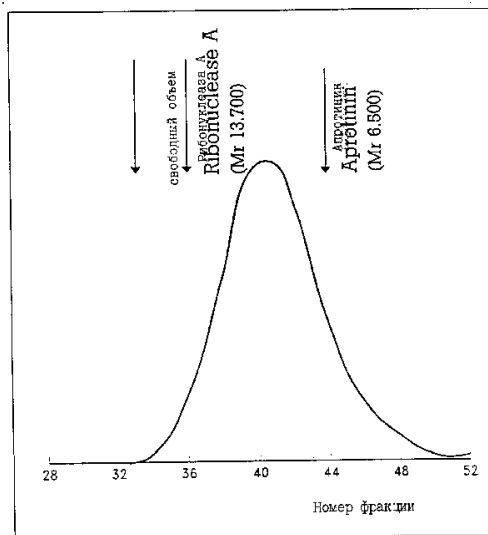
(21), (22) Заявка: 95105590/14, 24.05.1994
(30) Приоритет: 26.05.1993 IT M 193A001082
(46) Дата публикации: 27.10.1999
(56) Ссылки: J.Fiume et al - FEBS LETTERS, 1986, v.203, N 2, p.203 - 206. RU 94016158 A1, 27.09.95. WO 92/11368, 09.07.92.
(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 25.01.95
(86) Заявка PCT: EP 94/01702 (24.05.94)
(87) Публикация PCT: WO 94/27642 (08.12.94)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Союзпатент"

(71) Заявитель:
Лаборатори Балдаччи СПА (IT)
(72) Изобретатель: Луиджи Фиуме (IT), Коррадо Бузи (IT), Джиусеппина Ди Стефано (IT), Алессандро Маттиоли (IT), Массимо Балдаччи (IT)
(73) Патентообладатель:
Лаборатори Балдаччи СПА (IT)

(54) ГЕПАТОТРОПНЫЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ИХ НОСИТЕЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к способу получения гепатотропных конъюгатов, которые осуществляют доставку лекарственных веществ в печень и фармацевтической композиции, содержащей конъюгаты. Антивирусные лекарства, такие как ага-АМФ, ацикловир и т.п., конъюгированы с носителем, выбранным из полиаминокислот и, в частности с поли-L-лизинном или поли-L-орнитином, в которых большая часть аминогрупп, которые не замещены антивирусными лекарствами, замещена галактозными молекулами, используются при лечении гепатита. Конъюгат и фармацевтическая композиция, содержащая его, обеспечивают снижение токсичности и отсутствие образования антител при внутримышечном введении. 4 с. и 11 з.п.ф-лы, 6 ил., 3 табл.



Фиг.1

RU 2 140 292 C1

RU 2 140 292 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 140 292** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 47/48**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

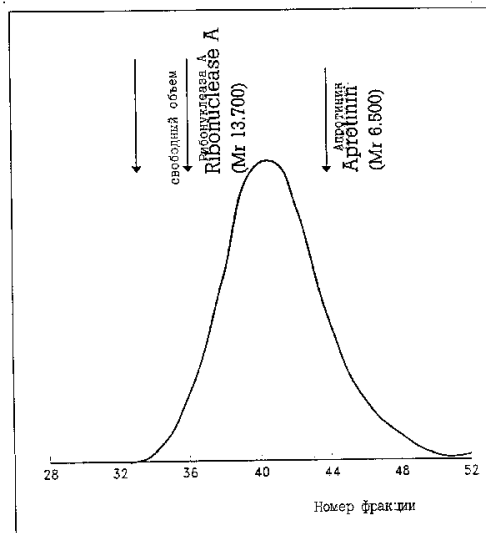
(21), (22) Application: 95105590/14, 24.05.1994
(30) Priority: 26.05.1993 IT M 193A001082
(46) Date of publication: 27.10.1999
(85) Commencement of national phase: 25.01.95
(86) PCT application:
EP 94/01702 (24.05.94)
(87) PCT publication:
WO 94/27642 (08.12.94)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul.B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Sojuzpatent"

(71) Applicant:
Laboratori Baldachchi SPA (IT)
(72) Inventor: Luidzhi Fiume (IT),
Korrado Buzi (IT), Dzhioseppina Di Stefano
(IT), Alessandro Mattioli (IT), Massimo
Baldachchi (IT)
(73) Proprietor:
Laboratori Baldachchi SPA (IT)

(54) HEPATOTROPIC CONJUGATES OF ANTIVIRAL DRUGS, THEIR CARRIERS, PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING ON SAID, METHOD OF CONJUGATE PREPARING

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmacy. SUBSTANCE: invention relates to a method of preparing hepatotropic conjugates that carry out the delivery of drugs in the liver and a pharmaceutical composition containing these conjugates. Antiviral drugs (for example, ara-AMP, aciclovir and others) are conjugated with a carrier taken among polyamino acids and, in part, with poly-L-lysine or poly-L-ornithine where the most part of amino-groups is not substituted with antiviral drugs but substituted with galactose molecules and these preparations are used for treatment of patients with hepatitis. EFFECT: decreased toxicity, absence of antibody formation after intramuscular administration. 15 cl, 3 tbl



Фиг.1

RU 2140292 C1

RU 2140292 C1

Данное изобретение касается соединений с антивирусной активностью и более конкретно конъюгированных соединений антивирусного лекарственного средства с носителями, имеющими гепатотропную активность.

В лечении инфекции, вызываемой вирусами, побочные действия антивирусных лекарственных средств можно уменьшить с применением химиотерапевтического лизосомотропного подхода /Balboni PG, Minia A, Grossi MP, Barbanti - Brodano G, Mattioli A, Fiume L., Activity of albumin conjugates of 5-fluorodeoxyuridine and cytosine arabinoside on poxviruses as a lysosomotropic approach to antiviral chemotherapy, Nature 1976; 264: 181-183/.

Этот подход состоит в конъюгировании лекарственного средства с макромолекулой, которая избирательно захватывается из инфицированных клеток и транспортируется из них в лизосомы.

Если, как и требуется, ферменты лизосом расщепляют связь между носителем и лекарственным средством, то лекарственное средство концентрируется в фармакологически активной форме внутри инфицированных клеток.

Хронический гепатит, вызываемый вирусом В /HBV/ и хронический гепатит, вызываемый вирусом С /HCV/, является подходящей мишенью для такого химиотерапевтического подхода, поскольку: (а) эти вирусы растут в основном в печеночных клетках, в гепатоцитах; (b) гепатоциты специфически вносят и транспортируют в лизосомы некоторые гликопротеины с остатком галактозы, которые, следовательно, могут функционировать в качестве гепатотропных векторов лекарственных средств; (с) конъюгаты - лекарственное средство/гликопротеины - могут легко входить в контакт с поверхностью гепатоцитов, т.к. печеночный синусоид не является барьером для белков.

Согласно этому подходу и для уменьшения нейротоксических побочных действий антивирусное лекарственное средство арабинозидаденинмонофосфат /ara-AMP/, активное против HBV /Jacyna MR, Thomas HC., Antiviral therapy: Hepatitis B. Brit Med Bull 1990; 46: 369-382/ было конъюгировано с азиалофетуином (AF) / Fiume L, Mattioli A, Busi C, Balboni PG, Barbanti - Brodano G, De Vries J, Altman R, Wieland Th., Selective inhibition of Ectromelia virus DNA synthesis in hepatocytes by adenine-9- β -D-arabinofuranoside (ara-A) и adenine- β -D-arabinofuranoside 5'-monophosphate (ara-AMP) conjugated to asialofetuin, FEBS Letters 1980; 116: 185-188/ и с лактозаминированным альбумином (L-SA) / (Fiume L, Busi C, Mattioli A, Balboni PG, Barbanti-Brodano G., Hepatocyte targeting of adenine-9- β -D-arabinofuranoside 5'-monophosphate (ara-AMP) coupled to lactosaminated albumin, FEBS Lett 1981; 129: 261-264; Fiume L, Bassi B, Busi C, Mattioli A, Spinosa G., Drugtargeting in antiviral chemotherapy./ A chemically stable conjugate of 9- β -D-arabinofuranosyladenine 5'-monophosphate with lactosaminated albumin accomplishes a selective delivery of the

drugto liver cells, Biochem Pharmacol 1986; 55: 967-972/. В мышцах оба этих носителя приводят к направлению лекарственного средства в печень.

L-SA имеет большое преимущество по сравнению с AF: фактически конъюгаты, приготовленные с гомологичным лактозаминированным альбумином /т.е. альбумином из того же вида/ при внутривенном введении не индуцируют образование антител /Fiume L, Mattioli A, Busi C, Spinosa G, Wieland Th., Conjugates of adenine-9- β -D-arabinofuranoside monophosphate (ara-AMP) with lactosaminated homologous albumin are not immunogenic in the mouse, Experientia 1982; 38: 1087-1089; Fiume L, Busi C, Preti P., Spinosa G. Conjugates of a a-AMP with lactosaminated albumin: a study on their immunogeneticitu in mouse and rat. Cancer Drug Delivery 1987; 4: 145-150/.

У лесного сурка с гепатитом, вызываемым WHV /Ponzetto A Fiume L, Forzani B, Song SY, Busi C, Mattioli A, Spinelli C, Marinelli M, Smedile A, Shialberge E, Bonio F, Gervasi GB, Rapicetta M, Verme G., Adenine arabinoside monophosphate and acyclovir monophosphate coupled to lactosaminated albumin reduce wooduck hepatitis virus viremia doses lower than do the unconjugated drugs, Hapatology 1991; 14: 16-24/ и у больных с хроническим HBV /Fiume L, Torrani Cerenzia MR, Bonino F, Busi C, Mattioli A, Brunetto MR, Chiaberge E, Verme G. Inhibition of hepatitis B virus replication by viadabine monophosphate conjugated with lactosaminated serum albumin, Lancet 1988; 2: 13-15. Torrani Cerenzia MR, Fiume L, Busi C, Mattioli A, Di Stefano G, Gervasi GB, Brunetto MR, Piantino P, Verme G, Bonino F. Inhibition of hepatitis B virus replication by adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated albumin. Efficacy, minimal effecti ve dose and plasma clearance of conjugate. J. Hepatol-1994; 20: 307-309/ ara-AMP, конъюгированный с L-SA, ингибировал репликацию вируса в дозах, в 2 раза меньших, чем дозы свободного лекарственного средства.

Конъюгат с L-sa должен вводиться внутривенно из-за большого объема, требуемого для инъекции, а также потому, что при введении его иными путями образуются антитела, что ведет к плохому соблюдению большим режима и схемы лечения при долгосрочной терапии.

Поэтому гепатотропный носитель ara-AMP и других антивирусных лекарственных средств, делающий возможным внутримышечное ведение соответствующих конъюгатов, представлял бы собой значительное усовершенствование с терапевтической точки зрения.

Известно также, что основная полиаминокислота, поли-L-лизин, с 1/3 аминокрупп, замещенных остатками галактозы, при внутривенном введении осуществляет направленную доставку в печень ara-AMP /Fiume L, Bassi B, Busi C, Mattioli A, Spinosa G, Faulstich H, Galactosylated poly (L-лизин) asa hepatotrope carrier of 9- β -D-arabinofuranoside 5'-monophosphate, FEBS hetters 1986; 203: 203-206/. Кроме того, поли-L-лизин, в котором все или

большая часть его ϵ -аминогрупп замещены, не вызывает образования антител даже при введении иными путями, чем внутривенная инъекция /Levine BB, studies on antigenicity. The effect of succinylation of ϵ -aminogroups on antigenicity of benzylpenicilloyl-poli-L-lysine conjugates in random and in strain 2 Guinea pig, Proc Soc Exptl Biol Med 1964; 116: 1127-1131; Sela M. Immunological studies with synthetic polypeptides, Adran Immunol, 1966; 5: 29-129/.

В настоящее время обнаружено, что если в поли-L-лизине большая часть ϵ -аминогрупп замещена галактозой и одним из антивирусных лекарственных средств, активных против вирусов гепатита, то можно получить на мышах три очень важных терапевтических эффекта:

(i) этот конъюгат теряет высокую токсичность поли-L-лизина, которая отличала прежние галактозилированные конъюгаты поли-L-лизин-ага-AMP /Fiume et al, FEBS Letters 1986, 203: 203-206/, в которых большая часть ϵ -аминогрупп оставалась незамещенной;

(ii) направленная доставка антивирусного лекарственного средства к печени осуществляется даже в том случае, если конъюгат вводится не внутривенно и, в частности, путем внутримышечной инъекции;

(iii) повторное введение конъюгата внутримышечной или внутривенной инъекцией не приводит к образованию антител.

Терапевтическое значение этого свойства будет очевидным, если иметь ввиду, что возможность направленной доставки в печень лекарственного средства при помощи внутримышечной инъекции не только участвует в использовании интересных особых свойств, уже упоминавшихся ранее в отношении лизосомотропного подхода /т.е. значительное уменьшение побочных действий, обусловленных токсичностью антивирусных лекарственных средств/, но также важна для того, чтобы сделать химиотерапию более удобной /комфортной/ для больного, поскольку химиотерапевтическое лечение в случае вирусного хронического гепатита является длительным.

В предпочтительном варианте в качестве основной полиаминокислоты выбирают поли-L-лизин или поли-L-орнитин, а в качестве лекарственных средств, известных как лекарства, обладающие активностью против вирусов гепатита, применяют ага-AMP, ацикловир, рибавирин, азидотимидин и т.п.

Данное изобретение касается поэтому применения в качестве носителя антивирусных лекарственных средств основной галактозилированной полиаминокислоты, характеризующейся тем, что большая часть аминогрупп замещена молекулами лекарственного средства и молекулами галактозы.

Высокая степень замещения исключает острую токсичность как основных полиаминокислот, так и конъюгатов поли-L-лизина, описанных в литературе ранее /Fiume et al. FEBS Letters 1986; 203: 203-206/, в которых менее 50% ϵ -аминогрупп были замещены лекарственным средством и галактизольными остатками.

Получение конъюгированных соединений

в соответствии с данным изобретением предусматривает двухступенчатую процедуру:

(a) конъюгирование основной полиаминокислоты с антивирусным лекарственным средством или с остатками галактозы и

(b) последующее конъюгирование полученного в стадии (a) конъюгата с остатками галактозы или остатками антивирусного лекарственного средства соответственно. В предварительном основном определении можно отметить, что эти две стадии конъюгирования могут быть переставлены местами.

Как правило, выбор последовательности стадий определяется молекулярной массой полиаминокислоты, в том смысле, что в случае низких молекулярных масс предпочтительно проводить сначала конъюгирование с лекарственным средством, а затем конъюгирование с галактозой.

В предпочтительном варианте способа, согласно данному изобретению, конъюгирование лекарственного средства проводят известным *per se* путем через имидазолат антивирусного лекарственного средства в его монофосфатной форме и при щелочном pH /Fiume L, Busi C, Di Stefano G, Mattioli A, Goupling of antiviral nucleoside analogs to lactosaminated human albumin by using the imidazolides of their phosphoric esters - *Analyt Biochem* 1993; 212: 407-411/.

Галактозные остатки предпочтительно конъюгируют /стадия b/ путем восстановительного лактозаминирования в присутствии цианоборгидрида натрия /Schwartz BA, Gray GR, Proteins containing reductively aminated disaccharides Synthesis and chemical characterization - *Arch Biochem Biophys* 1977; 181: 542-549/.

В качестве нелимитирующих примеров приведены примеры получения конъюгатов с использованием поли-L-лизина и поли-L-орнитина в качестве носителя и ага-AMP, ацикловира, рибавирина и азидотимидина в качестве антивирусных лекарственных средств. При этом должно быть понятно, что подобные способы пригодны для получения конъюгатов с другими известными антивирусными лекарственными средствами.

Были получены конъюгаты основных полиаминокислот как с низкой молекулярной массой, так и с высокой молекулярной массой.

1. Конъюгаты с низкой молекулярной массой

A. Конъюгат с поли-L-лизином

A.1. Получение

В коммерческой композиции /Sigma/ поли-L-лизина с молекулярной массой 1000-4000 Да и средней степени полимеризации 14 полимеров с молекулярной массой ниже 1800 удаляли гель-фильтрацией на P2 BiO Gel колонке, элюированной 0,2 M NH_4HCO_3 . Полимеры, полученные из колонки, после лиофилизации использовали для получения соединений, показанных в таблице 1.

Во всех конъюгатах галактозные остатки соединялись с ϵ -аминогруппами путем восстановительного лактозаминирования в присутствии цианоборгидрида натрия /Schwartz BA, Gray GR., *Arch. Biochem*

Biophys 1977; 181: 542-549/.

Соединение 1

Поли-L-лизин метили [H³] формальдегидом по способу Jentoft и Dearborn/Jentoft N, Dearborn DG., Protein labelling by reductive alkylation, Methods Enzymol 1983; 91: 570-579/. Реакционная смесь содержала 44 мкКи [H³] фольмальдегида/мл. [H³]поли-L-лизин выделяли гель-фильтрацией на P2 BiO Gel колонке с последующей лиофилизацией.

Соединение 2

Галактозу соединили с полилизином восстановительным лактозаминированием в присутствии цианоборгидрида натрия. 20 мг поли-L-лизина растворили в 2 мл буфера 0,1 М борная кислота/бура (pH 8,5) и добавили 80 мг L-лактозы, содержащей 50 мкКи [D-глюкозо-1-¹⁴C] лактозы /Amersham/ и 50 мг NaBH₃CN. Смесь инкубировали при 37°C в течение 48 часов и [¹⁴C]лат-поли-L-лизин выделяли в качестве соединения 1. Содержание лактозы измеряли по способу Dubois et al. /Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F, Colorimetric method for determination of sugar and related substances Anal Chem 1956; 28: 350-356/ и относили к сухому весу соединения.

Соединения 3 и 4

Ara-AMP конъюгировали при помощи его имидазолат /Fiume L, Busi C, Di Stefano G, Mattioli A., Analyt Biochem - 1993; 212: 407-411/.

Этот способ более эффективен, чем применение водорастворимых карбодиимидов, и не имеет химических побочных реакций, продуцируемых этими веществами.

Имидазолат ara-AMP получали по способу Lormann и Orgel/Lohrmann R, Orgel LE, Preferential formation of (2'-5')-linked internucleotide bonds in non-enzymatic reactions, Tetrahedron 1978; 34: 853-855/. Поли-L-лизин растворяли (50 мг/мл) в буфере 0,1 М NaHCO₃, Na₂CO₃ pH 9,5. После добавления имидазолат ara-AMP (75 мг/мл) pH доводили до pH 9,5 при помощи HCl и смесь инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Конъюгаты выделяли, как соединение 1; содержание ara-AMP определяли спектрофотометрически и относили к сухому весу конъюгатов, которые затем лактозаминировали (для соединения 4 применяли немеченную лактозу).

Соединение 5

Конъюгат поли-L-лизин/ара-AMP, полученный, как указано для соединений 3 и 4, метили [H³]формальдегидом (100 мКи/ммоль).

Реакционную смесь содержала 2800 мкКи ³H формальдегида на мл. Меченый конъюгат затем лактозаминировали, как описано выше. Этот конъюгат применяли в качестве антигена в определении антител по способу Minden и Farr /Minden P, Farr RS, The ammonium sulphate method to measure antigen-binding capacity, Weir DM ed., Handbook of Experimental Immunology, Blackwell, Oxford 1973; 15.1-15-21/.

Соединение 6

Конъюгирование тритированного ara-AMP в этом соединении проводили с применением 1-этил-3-(диметиламинопропил)карбодиимида

/ECD 1/, так как превращение ara-[³H]AMP в его имидазолат приводит почти к полной потере трития. Поли-L-лизин сначала лактозаминировали, как описано выше /соединение 2/, но с уменьшением периода реакции с 48 часов до 24 часов для замещения сахаром только 2/3 ε-аминогрупп.

После этого ara-[³H] AMP конъюгировали по описанному выше способу /Fiume L, Bassi B, Busi C, Mattioli A, Spinosa G, Faulstich H, FEBS Letters 1986; 203: 203-206/. При получении этого конъюгата первой стадией было лактозаминирование для уменьшения числа свободных ε-аминогрупп ко времени использования ECD 1, что позволяло полимеризовать молекулы поли-L-лизина при помощи этого соединения.

Соединение 7

[³H]ACVMP, примененный для получения этого конъюгата, получали при помощи фосфорилирования /Yoshikawa M, Kato T, Takenishi T., A novel method for phosphorylation of nucleosides to 5'-nucleotides, Tetrahedron Lett 1967; 50: 5065-5068/ [³H]AC /трициат в положении 2 боковой цепи/ (NEN). Конъюгат получали, как в случае соединений 3 и 4, с той разницей, что инкубирование поли-L-лизина [³H]ACVMP продолжали только 6 часов. Имидазолат [³H]ACVMP получали по описанному выше способу Лормана и Оргеля.

Конъюгированный продукт данного изобретения, полученный в предшествующих примерах, подвергали физико-химическим определениям и биологическим тестам с целью обнаружения экспериментального подтверждения терапевтических свойств этих соединений.

Следующие определения относятся к прилагаемым фиг. 1 - 6, в которых:

- Фиг. 1 изображает хроматографический график на BioGel P 10 Lat-поли-L-лизин-ара-AMP /соединение 4 таблицы 1/.

- Фиг. 2А-2С показывают распределение радиоактивности в печени /■/ , в селезенке /●/ , в кишечнике /○/ и в мозгу /□/ самок швейцарских /Swiss/ мышей (28-30 г), которым соединения данного изобретения /таблица 1/ и неконъюгированные соединения для сравнению вводили при помощи внутримышечной инъекции.

- Фиг. 3 изображает хроматографический график на BioGel P 2 экстрактов печени мышей, инъецированных соединением 3 таблицы 1.

А.2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ

а/ Средняя мол. масса соединения 4

Фиг. 1 изображает хроматографию Lat-поли-L-лизин-ара-AMP /соединение 4 таблицы 1/ на Bio Gel P 10 /1,6 x 92/ колонке, калиброванной декстраном синим 2000 /свободный объем/, рибонуклеазой /мол. масса 13700/ и апротинином /мол. масса 6500/.

25 мг конъюгата наносили на 1,6 x 92 см колонку, уравновешенную и элюированную 0,2 М NH₄HCO₃. Собирали фракции по 2 мл. Объемы элюции как конъюгата, так и маркеров /последние указаны стрелками/ определяли.

По способу Whitaker/Whitaker JR,

Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex, *Analy Chem* 1963; 35: 1950-1953/ было рассчитано, что средняя мол. масса конъюгата равна 9100, что соответствует носителю с 19 остатками лизина и средней мол. массе 2400.

o/ Распределение соединений в органах.

Как уже упоминалось, Фиг. 2A-2G показывают распределение радиоактивности в органах мышей после внутримышечной инъекции А. [³H]поли-L-лизина (24 мкг/г); В. [¹⁴C] а - поли-L-лизина (24 мкг/г); С. ara-[³H] АМР (5 мкг/г);

Д. [¹⁴C]Lat-поли-L-лизин-ара-АМР (24 мкг/г);

Е. Lat-поли-L-лизин-ара-[³H] АМР (28 мкг/г), что соответствует 5 мкг/г ara-[³H] АМР; Ф. [³H]АСVMP (4 мкг/г);

Г. Lat-поли-L-лизин-ара-[³H] АСVMP (50 мкг/г), что соответствует 4 мкг/г [³H]АСVMP). Все соединения инъектировали в объеме 10 мкл на 1 животное в мышцы задних ног при помощи микрошприца Hamilton на 25 мкл.

Был рассчитан вклад радиоактивности, даваемый плазмой, содержащейся в органах /Fiume L, Busi C, Mattioli A, Lactosaminated human serum albumin as hepatotropic drug carrier - Rafo of uptake by mouse liver, *FEBS Letters* 1982; 146: 42-46/. Эта часть радиоактивности вычиталась.

Каждый результат обозначает среднее из результатов, полученных для 2-3 животных.

Стандартная ошибка варьировалась от 0,1 до 2% от среднего.

Как показано, после введения [³H]поли-L-лизина /2A/, ara-[³H]АМР /2C/ и [³H] АСVMP /2F/ количества радиоактивности в печени, селезенке, кишечнике и мозгу практически эквивалентны. И напротив, после инъекции [¹⁴H]Lat-поли-L-лизина /2B/ и конъюгатов Lat-поли-L-лизина с ara-АМР и АСVMP, меченых в лактозе /2D/ или в лекарственных средствах /2E, 2G/, уровни радиоактивности в печени выше уровней радиоактивности других органов.

Проценты радиоактивности, измеренной на 1 г печени, после введения ara-[³H] АМР и [³H]АСVMP /2C, 2F/ были подобны процентам, рассчитанным после инъекции равной дозы этих лекарственных средств, конъюгированных с Lat-поли-L-лизином /2E, 2G/.

В почках уровни радиоактивности достигают тех же величин, что и в печени, через час после инъекции меченых конъюгатов /соединение 3 таблице 1/ или они в 1,5-2 раза выше /соединения 6 и 7/. В последующие точки времени уровни радиоактивности в почках равны или ниже, по сравнению с уровнями в печени. Высокие уровни радиоактивности в почках могут объясняться тем, что различные полипептиды, после гломерулярной фильтрации, включаются клетками проксимальных почечных канальцев /Maack Th, Johnson, V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D., *Renal filtration, transport and metabolism of low molecular weight proteins*, *Kidney Int* 1979; 16: 251-270/. Проникновение в почечные клетки не должно действовать на химиотерапевтический индекс конъюгатов Lat-поли-L-лизина с антивирусными лекарственными средствами.

В действительности, за исключением ацикловира, который имеет тенденцию к соединению в почечных канальцах /Balfour Hh, *Acyclovir and other chemotherapy for herpes group viral infection*, *Ann Rev Med* 1984; 35: 279-291/, антивирусные нуклеозиды не очень токсичны для клеток этого органа.

с/ Биологическая переработка соединения 3 в печени.

Разрушение связи между ara-АМР

и ε -аминогруппами галактозилированного поли-L-лизина внутри клеток печени было показано прежними исследованиями /Fiume L, Bassi B, Bongini A., *Conjugates of 9-β-arabinofuranosyladenine*

5'-monophosphate (ara-АМР) with lactosaminated albumin: characterization of the drug-carrier bonds, *Pharm Acta Helv* 1988; 63: 137-139/. Фиг. 3 показывает хроматографические профили на Bio Gel P 2 экстрактов печени мышей через 2 и 6 часов после внутримышечной инъекции [¹⁴C]Lat-поли-L-лизин-ара-АМР /24 мкг/г/.

Самки швейцарских мышей 28-30 г получили путем внутримышечной инъекции конъюгат (24 мкг/г в общем объеме 10 мкл).

После 3 β или 6 /□/ часов мышью убивали (каждый раз по два животных) и печени гомогенизировали с 4 объемами холодной воды; сразу же добавляли 5 объемов перхлорной кислоты и после центрифугирования супернатанты нейтрализовали при помощи КОН.

Через два часа выдерживания на холоде перхлорат калия осаждали центрифугированием и супернатанты лиофилизировали.

Лиофилизированный материал перерастворяли в 2 мл Н₂О и после центрифугирования для осветления раствора 1 мл хроматографировали на Bio Gel P 2 (1,6 x 92) колонке и элюировали при помощи 0,2 М NH₄HCO₃.

Радиоактивность, присутствующая во фракциях, в которых элюировались молекулы, включенные в гель и имеющие размеры, большие, чем размеры молекул лактозы, показывает, что поли-L-лизин в печени распадался на фрагменты, хотя его /•/ -аминогруппы все еще были связаны с сахаром.

Символ ε₀ в рисунке относится к хроматографическому профилю экстракта гомогенизированной печени, полученной из двух необработанных мышей, к которому конъюгат (14 мкг/мл) добавляли непосредственно перед осаждением перхлорной кислотой.

d/ Получение антител в мышцах, обработанных соединением А.

12 самок швейцарских мышей (вес 28-30 г в начале теста) получали конъюгат N 4 (таблица 1), введенный в мышцы задней ноги 5 дней в неделю в течение 4 недель (одна дневная доза = 700 мкг/животное в 10 мкл 0,9% NaCl).

Кровоизвлечение проводили из заглазничного сосудистого сплетения при эфирной анестезии через неделю после последней инъекции.

Антитела измеряли в 50 мкл сыворотки в трех повторностях при помощи способа осаждения сульфатом аммония по Миндену и Фарру.

В качестве антигена применяли конъюгат 5 (таблица 1).

В присутствии 50 мкл сыворотки из 5 необработанных мышей количество распадов в минуту /dpm/ было 78 ± 11 (стандартная ошибка, SE). В присутствии 10 мкл сыворотки мышей, способной соединиться либо с aga-A (938 пикомоль α -A, вязанных 1 мл сыворотки), либо с α -AMP, конъюгированным с L-HSA [Fiume h, Bassi B, Busi C, Mattidi A, Wieland Th., A study on the pharmacolineties in mouse of adenine -9- β -D-arabin ofuranoside 5-monophosphate conjug ated with lactosaminated albumin, Experientia 1985; 41, 1326-1328/ количество распадов в минуту в осадке было 1599 ± 21 .

В присутствии сывороток из 12 мышей, обработанных конъюгатом Lat-поли-L-лизин- α -AMP, осажденные dpm были в диапазоне от 41 ± 5 (минимум) до 80 ± 6 (максимум).

Этот результат показал, что ни одна из обработанных мышей не образовала антитела, количество которых измеримо при помощи примененного способа, чувствительность которого была приблизительно 0,5 мкг IgG/мл сыворотки.

е/ Острая токсичность соединения 4

Конъюгат Lat-поли-L-лизин- α -AMP /N 4/, растворенный в 0,9% NaCl, вводили внутривенно 5-ти самкам швейцарских мышей или подкожно (5-ти животным) в виде одной инъекции 0,4 мл/животное и в дозе 1,3 мг/г.

Токсичность не была обнаружена.

Инъецированная доза была в 50 раз выше по сравнению с дозой, вводимой внутримышечной инъекцией в опытах по изучению распределения конъюгата в органах /фиг. 2/.

Было показано, что летальная доза LD₅₀ для самок мышей поли-L-лизина, примененного для получения этого конъюгата, инъецированного внутривенно в виде соли соляной кислоты, находилась в диапазоне 30-60 мкг/г.

fi. Растворимость соединения 4.

Большим с хроническим гепатитом В неконъюгированный α -AMP вводили в дозах 2,5 или 5 мг/кг при помощи двух инъекций в день.

Конъюгат Lat-поли-L-лизин- α -AMP /N 4/ легко растворяется в физиологическом растворе при концентрации 400 мг/мл.

Следовательно, доза 24 мг/кг, соответствующая 5 мг/кг α -AMP, может быть введена больному весом 70 кг в объеме меньшем 5 мл.

В. КОНЪЮГАТ С ПОЛИ-L-ОРНИТИНОМ

В.1. Получение

Соединение 8

Это соединение получали с применением поли-L-орнитина-HBr/Sigma/ с мол. массой 5300-7600. Поли-L-орнитин /25 мг/ метили [³H] формальдегидом (100 мКи/ммоль) /NEN/ согласно Jentoft и Dearbon/Methods Enzymol 1983, 91: 570-579/. Реакционная смесь содержала 98 мКи [³H] формальдегида/мл. [³H]поли-L-орнитин выделяли из реакционной смеси гельфильтрацией на Bio Gel P 2 колонке с элюцией при помощи 0,5 М NH₄HCO₃ и затем лиофилизировали. α -AMP-имидазолат соединяли с меченым полимером по способу, примененному для соединений 3 и 4.

Для последующего лактозаминирования 10 мг [³H] поли-L-орнитин- α -AMP растворяли в 1 мл 0,1 М бура/NaOH буфере, pH вместе с 80 мг L-лактозы и 50 мг NaBH₃Cl. Раствор инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Лактозаминированный конъюгат (Lat- [³H]поли-L-орнитин α -AMP) извлекали гель-фильтрацией на Bio Gel P2 колонке, элюированной при помощи 0,5 М NH₄HCO₃, и затем лиофилизировали 1 мг соединения (удельная активность 668 распадов в минуту /dpm/на мкг) содержал 134 мкг α -AMP (определено спектрофотометрически) и 604 мкг лактозы/измерено по Dubois et al. Anal Chem. 1956; 28: 350-356/. Приблизительно 90% ϵ -аминогрупп полимера были замещены: 17% лекарственным средством, 73% лактозой.

В2. Экспериментальные наблюдения

а/ - Распределение по органам соединения 8.

Фиг. 4 показывает распределение по органам радиоактивности в мышцах после внутримышечной инъекции конъюгата Lat-[³H]-поли-L-орнитин- α -AMP (36,5 мкг/г, что соответствует 5 мкг/г α -AMP). Экспериментальная процедура была такой же, как в подобных экспериментах с конъюгатами Lat-поли-L-лизина. Уровни радиоактивности в печени выше, чем в других органах. Величины радиоактивности в почках были в 3-4 раза выше, чем в селезенке, кишечнике и мозгу.

II. Конъюгаты с высокой молекулярной массой

У больных с вирусным гепатитом введение из организма макромолекул, имеющих на конце галактозил, гораздо медленнее, чем у мышей, крыс и здоровых людей, возможно, вследствие более медленного проникновения в гепатоциты /Marshall Js, Williams S, Jones P. Seru de sialylated glycoproteins in patients with hepatobiliary dysfunctions. J. Lab Clin Med 1978; 92: 30-37; Torrani Cerenzia MR et al. J. Hepatol 1994; 20: 307-309/. Вследствие этого у этих больных можно ожидать даже более высокое почечное выведение конъюгатов, полученных с полиаминокислотами низкой мол. массы, чем измерено у мышей.

Для преодоления этого недостатка мы получили конъюгаты с применением поли-L-лизина с высокой мол. массой. В этих конъюгатах также большая часть ϵ -аминогрупп поли-L-лизина была замещена молекулами лекарственного средства и галактозы.

Мы наблюдали, что:

1/ Конъюгаты с высокой мол. массой также специфически проникают в клетки печени после внутримышечного введения.

2/ Почечное выведение этих конъюгатов очень низко, и вследствие этого процент инъецированной дозы, входящей в гепатоциты, выше процента, измеренного после введения конъюгатов с низкой мол. масс.

3/ Конъюгаты с высокой мол. массой лишены высокой точности и после повторного внутримышечного и внутривенного введения не индуцируют образование антител.

4/ Благодаря их высокой растворимости (более 150 мг/мл) и высокой загрузки лекарственным средством фармакологически

активная доза может вводиться в малом объеме, хорошо совместимом с внутримышечным путем введения.

II. 1.Получение

Эти конъюгаты получали с применением поли-L-лизина-NH₂ с мол. массой 30-70000 и степенью полимеризации 145-335 (Sigma). Как и при получении конъюгатов поли-L-лизина с низкой мол. массой, лекарственные средства соединяли через имидазолат их фосфорных эфиров, а лактозу соединяли при помощи восстановительного аминирования в присутствии NaBH₃CN. Однако процедура была модифицирована: pH, температура, продолжительность времени реакции, а также концентрация имидазолатов увеличивалась на стадии конъюгирования лекарственного средства. Кроме того, лактозаминирование проводили перед соединением с лекарственным средством, т.к. при высоком pH поли-L-лизин высокой мол. массы осаждается, если часть ε-NH₂-групп не замещена галактозными остатками.

Соединение 9

Восстановительное

лактозаминирование ε-NH₂-групп проводили растворением 200 мг поли-L-лизина в 20 мл 0,4 М К-фосфатного буфера с pH 7 вместе с 800 мг -лактозы и 500 мг NaBH₃CN. После инкубирования при 37 °С в течение 24 ч pH повышали до 8 с помощью 5 М КОН и раствор оставляли при 37 °С еще на 6 ч. Lat-поли-L-лизин диафильтровали с 0,9% NaCl и концентрировали до 100 мг/мл. Лактозу измеряли способом фенол-серная кислота 1956; 28: 350-356/ с применением галактозы в качестве стандарта; полилизин определяли путем измерения азота по Кьельдалю. 2 мл раствора Lat-поли-L-лизина (= 200 мг) разбавляли 2 мл 1М Na-карбонатным буфером, pH 11. 800 мг имидазолатов ara-AMP, синтезированного по Лорману и Оргелю /Tetrahedron, 1978; 34: 853-855/, растворяли и pH доводили до 11 5 М NaOH.

После инкубирования при 50 °С в течение 96 ч конъюгат диафильтровали с 0,9% NaCl. Химические характеристики комплекса получали спектрофотометрическим определением связанного лекарственного средства и измерением лактозы. Вклад ara-AMP при проведении колориметрического анализа вычитали. Содержание поли-L-лизина конъюгата рассчитывали из количества лактозы по известному отношению лактоза/поли-L-лизин, определенному перед связыванием лекарственного средства (см. выше). Это было возможно, поскольку связь между сахаром и ε-NH₂-группами лизина не разрывалась во время конъюгирования лекарственного средства, как было проверено экспериментально. Конъюгат концентрировали в солевом растворе (0,9% NaCl) до 150 мг/мл и лиофилизировали после замораживания приблизительно до -80 °С. Концентрацию конъюгата рассчитывали, не принимая во внимание противоионы.

Перед применением конъюгат Lat-поли-L-лизин-ara-AMP разбавляли водой при концентрации 150 мг/мл. Он легко растворялся при условии, что замораживание было быстрым. При необходимости конъюгат разбавляли 0,9% NaCl.

Соединение 10

Перед соединением с ara-AMP Lat-поли-L-лизин метили [³H]формальдегидом /NEN/ согласно Jentoft и Dearbon/Methods Enzymol 1983; 91: 570-579/. Реакционная смесь содержала 78 мкКи [³H]формальдегида/мл. После диафильтрования с 0,9% NaCl Lat-[³H]поли-L-лизин конъюгировали с a-AMP, как описано выше.

Соединение 11

Рибаварин (RIBV)

(1- β -D-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксамид) сначала фосфорилировали (RIBVMP) согласно /Allen LB, Boswell KH, Khwaja TA, Meyer RB, Sidwell RW, Witkowski JT. Synthesis and antiviral activity of some phosphates of the broad-spectrum antiviral nucleoside

1 β-D-Ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide /Ribavarin/. J. Med Chim 1978; 21: 742-746/.

Затем соль пиридиния этого фосфорилированного производного превращали в имидазолат /Lormann and Orgel Tetrahedron 1978; 853-855/, который соединяли с Lat-[³H] поли-L-лизином, как описано для конъюгата с ara-AMP. В этом конъюгате количество соединенного RIBVMP измеряли по органическому фосфату согласно /Ames BN, Assay of inorganic phosphate. Total phosphate and phosphatases. Methods Enzymol 1966; 8: 115-118/.

Вследствие сильных помех, вызываемых RIBV при колориметрическом определении сахара, невозможно было измерить лактозу, как описано для Lat-поли-L-лизин-ara-AMP, и потому определяли содержание Lat[³H]поли-L-лизина конъюгата подсчетом радиоактивности.

Соединение 12

3'-азидо-3-[2-¹⁴C] деокситимидин ([¹⁴C] AT) (Moravek) фосфорилировали согласно Yoshikawa et al./Tetrahedron Lett 1967; 50: 5065-5068/.

Соль пиридиния фосфорилированного производного превращали в имидазолат и затем соединяли с Lat-поли-L-лизином. Соединение проводили, как описано для соединения 9, но в реакционной среде отношение количества имидазолатов лекарственного средства к количеству полимера было 2,7 вместо 4. Химическую характеристику этого конъюгата выполняли, как описано для соединения 9.

Соединение 13

Этот конъюгат получали, как соединение 9, но лактозаминирование поли-L-лизина прерывали после первых 24 ч. Кроме того, отношение количества имидазолатов ara-AMN к количеству полимера было 4,6 вместо 4. 30% ε-аминогрупп этого полимера были замещены галактозильными остатками и 64% были замещены ara-AMP.

11.2. Экспериментальные наблюдения.

a/ - Средние мол. массы соединения 9.

Их определяли при помощи проникающей хроматографии с применением оборудования HPLC (ЖХВР) (Waters) с двумя соединенными колонками Protein-Pak (125 и 300 SW). Соединения 9 (80 мкг) растворяли в 20 мкл подвижной фазы (125 mM Na₂SO₄ + 2 mM NaH₂PO₄ • H₂O, доводили до pH 6,0 0,1N NaOH, фильтровали и дегазировали) и хроматографировали при следующих условиях. Скорость потока: 0,9 мл/мин; детектирование: УФ при 260 нм, 0,1 единиц

поглощения на всю шкалу (AUFS). Колонки калибровали апротинином (M_r 6500), РНКазо (M_r 13700), HSA (человеческий сывороточный альбумин) /M_r 69000/ и IgG (M_r 158000). Среднемассовую молекулярную массу и среднечисловую молекулярную массу определяли с применением GPC 745/745B Waters Software. Они были равны 140339 и 72419 соответственно. Гель-проникающая хроматография соединения 9 показана на фиг. 5.

b/ - Распределение соединений по органам.

Применяли экспериментальную процедуру, описанную для подобных экспериментов с конъюгатами низкой мол. массы. Результаты представлены на фиг. 6.

Конъюгаты aga-AMP и RIBVMP были радиоактивны в носителе, в то время как конъюгат AZTMP был меченым в молекуле лекарственного средства.

После внутримышечного введения конъюгатов, меченых в носителе (фиг. 6, А, С), радиоактивность была высокой в печени и низкой в селезенке, кишечнике и почках. Проценты инъецированной радиоактивности (dpm), извлеченной в почках, были в 10-20 раз ниже, чем измеренные после внутримышечного введения комплексов, полученных с поли-L-лизинном низкой мол. массы. Поскольку почечное накопление белков является следствием их гломерулярной фильтрации /Maack TH, Johnson V, Kau ST, Figuereido J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular weight proteins: A review. Kidney Int 1979; 16: 251-270/, данный результат показывает, что, как и ожидалось, только малые количества конъюгатов высокой мол. массы проходили через почечные клубочки, по меньшей мере после внутримышечного введения (см. ниже).

У мышей, инъецированных внутримышечно конъюгатом

Lat-поли-L-лизин-[¹⁴C] AZTMP, уровень радиоактивности в печени был в 2,5-6 раз выше, чем в почках, селезенке и кишечнике (фиг. 6, 1). Различие между количеством радиоактивности в печени и в других органах было менее заметным, чем у животных, которым вводили конъюгаты, меченые в носителе (фиг. 6, А, С). Этот результат, возможно, обусловлен частичным выделением лекарственного средства (и (или) его метаболитов/ из клеток печени в кровотоки после внутриклеточного расщепления связи между лекарственным средством и носителем. Подобное выделение лекарственного средства из клеток печени в кровотоки наблюдали после введения других гепатотропных конъюгатов

лекарство/носитель /Fiume L, Busi C, Corzani S, Di Stefano G, Gervasi GB, Mattioli A. Organ distribution of a conjugate of adenine arabinoside with monophosphatidylated lactosaminated albumin in the rat. J. Hepatol 1994, in press; Fiume L, Mattioli A, Balboni A, Tognon M, Barbanti-Bradano G, De Vries J and Wiel and Th. Enhanced inhibition of virus DNA synthesis by hepatocytes by trifluorothymidine coupled to asialofetuin. FEBS Lett 1979; 103: 47-51/.

При внутримышечной инъекции свободного [¹⁴C]AZTMP мышам радиоактивность одинаково распределялась

в печени, селезенке и кишечнике с более высокими величинами в почках (фиг. 6, Е). Скорость накопления и снижения радиоактивности после введения свободного или связанного [¹⁴C]AZTMP была различной. После инъекции свободного лекарственного средства радиоактивность накапливалась в тканях в течение первых 15 минут и затем быстро снижалась; после инъекции конъюгированного лекарственного средства радиоактивность в печени увеличивалась до 4-5 ч. При 1-2 ч количества радиоактивности в печени были выше в животных, инъецированных конъюгированным [¹⁴C] А TMP при дозе 2 мкг/г, чем в животных, которым вводили 5 мкг/г свободного лекарственного средства.

У мышей, инъецированных внутривенно Lat-[³H]поли-L-лизин-aga-AMP (фиг. 6, В), конъюгат быстро накапливался в печени; у этих животных радиоактивность в почках была выше, чем у тех, которые получили тот же самый конъюгат внутримышечно (фиг. 6, А). Это можно объяснить с учетом того, что:

/i/ часть молекул конъюгата имела мол. массу более низкую, чем мол. масса HSA (человеческого сывороточного альбумина) /фиг. 5/;

/ii/ существует прямая зависимость между концентрацией плазмы и гломерулярной фильтрацией малых белков /Maack TH at Kidney Int 1979; 16: 251-270/;

/iii/ концентрация конъюгата в плазме, которая постоянно низка (менее 0,9 мкг/мл) после внутримышечного введения, достигает высоких величин после внутривенной инъекции (104 мкг/мл при 3 мин).

c/ - Эксперименты по толерантности к лекарственному средству и иммуногенности.

Эксперименты проводили с применением соединения 9. Конъюгат, введенный внутривенно (i. v.) 5 мышам в дозе 1,5 г/кг, не вызвал какого-либо признака страдания. 1,5 г Lat-поли-L-лизин-aga-AMP содержали 480 мг лекарственного средства (см. таблицу 2), дозу в 300 раз более высокую, чем доза, при которой aga-AMP, конъюгированный с L-HSA, ингибирует рост вируса у инфицированных НВ больных. У мышей LD₅₀ поли-L-лизина, примененного для получения конъюгата, при внутривенном введении в виде соли HCl была между 15 и 30 мг/кг. Для выяснения, может ли Lat-поли-L-лизин-aga-AMP, растворенный в солевом растворе в концентрации 150 мг/мл, разрушать ткани в месте введения, проводили эксперимент по первичному раздражению глаз у 6 кроликов путем помещения 0,1 мл этого раствора в конъюнктивный мешочек. Ни у одного животного не наблюдали изменений в глазах.

Полутонкие срезы печени из мышей и крыс, которые получили Lat-поли-L-лизин-aga-AMP, введенный по различным схемам (см. таблицу 3), наблюдали под световым микроскопом, ни в одном из этих животных не обнаружили изменений ни в паренхимных, ни в синусоидальных печеночных клетках. Накопление во вторичных лизосомах неполностью расщепленных молекул (дисахаридов, пептидов), которые не могут проходить через мембрану лизосом, приводит к быстрому набуханию этих органелл, которые в световом микроскопе выглядят как

цитоплазматические вакуоли. Такие вакуоли наблюдали в печеночных клетках мышей и крыс через 24 ч после одного введения L-HSA-ara-AMP при дозах в 5-10 раз более высоких, чем дозы, которые активны в инфицированных HBV больших /Fiume L, Betts CM, Busi C, Corzani S, Derenzini M, Di Stefano G, Mattioli A. The pathogenesis of vacuoles produced in rat and mouse liver cell by a conjugate of adenine arabinoside monophosphate with lactosaminat albumin. J. Hepatol 1992; 15: 314-322/. Отсутствие вакуолей в печеночных клетках мышей и крыс после введения высоких доз Lat-поли-L-лизин-ара-AMP дало косвенное доказательство быстрого расщепления этого конъюгата до продуктов, способных проходить через мембрану лизосом.

Для исследования иммуногенности Lat-поли-L-лизин-ара-AMP 24 мыши получали конъюгат 5 дней в неделю в течение 4 последовательных недель (одна дневная доза - 200 мкг/животное). Двенадцать мышей инъецировали внутримышечно и двенадцать внутривенно. Через неделю после последней инъекции проводили кровозвличение и антитела против конъюгата измеряли, как описано для конъюгатов низкой мол. массы. Ни одно из животных не образовывало антител в количествах, детектируемых в нашем анализе (чувствительность приблизительно 0,5 мкг IgG/мл сыворотки).

Из предшествующих экспериментальных данных можно считать наиболее вероятно доказанным, что конъюгаты антивирусных нуклеозидов с галактозилированным поли-L-лизином, в которых большая часть ϵ -аминогрупп гомополимера замещена галактозными остатками и лекарственными средствами, при внутримышечной инъекции осуществляют доставку лекарственных средств в печень без образования антител.

Конъюгаты не обладают сильной токсичностью поли-L-лизина, применяемого для их приготовления. По сравнению с конъюгатами с лактозаминированным альбумином, которые нужно вводить внутривенным инъецированием, поскольку при ином введении они иммуногенны, конъюгаты, полученные с использованием галактозилированного поли-L-лизина, потенциально способны, при инфекции печеночными вирусами, улучшить соблюдение больными режима и схемы лечения с длительным введением антивирусного состава.

Как уже упоминалось, все вышесказанное касается конъюгатов, в которых носителем был поли-L-лизин или поли-L-орнитин экспериментально проверенные физико-химические свойства и биологическое поведение делают приемлемым идентичное использование в качестве носителей других полиаминокислот.

Поэтому подобные другие конъюгаты попадают в сферу действия данного изобретения так же, как применение таких полиаминокислот в качестве носителей для приготовления гепатотропных конъюгатов с антивирусными соединениями, введение которых иным путем было бы серьезно затруднено неблагоприятными побочными явлениями, вызываемыми высокой

токсичностью для других органов, иных чем печень.

Животных убивали через 24 часа после последней инъекции. Пробы печени фиксировали и полутонкие срезы окрашивали, как описано в /Fiume L., Betts M. C., Busi C., Corzani S., Derenzini M., Di Stefano G., Mattioli A., J. Hepatol 1992; 15: 314-322/.

Формула изобретения:

1. Конъюгат основной полиаминокислоты с остатками галактозы и остатками антивирусного лекарственного средства, отличающийся тем, что большинство аминогрупп указанной основной полиаминокислоты замещено остатками галактозы и остатками антивирусного лекарственного средства.

2. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере 12% указанных аминогрупп замещены остатками антивирусного лекарственного средства.

3. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере 31% указанных аминогрупп замещены остатками галактозы.

4. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере 71% указанных аминогрупп замещены остатками антивирусного лекарственного средства и остатками галактозы.

5. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что указанные остатки галактозы присоединены к указанным аминогруппам посредством восстановительного лактозаминирования.

6. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что указанным остатком галактозы является лактоза.

7. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что указанную основную аминокислоту выбирают из поли-L-лизина и поли-L-орнитина.

8. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что указанное антивирусное лекарственное средство выбирают из аденин- β -арабинозида (ара-AMP), ацикловира, рибавирина и азидотимидина.

9. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что является Lat-поли-L-лизин-ара-AMP.

10. Конъюгат по п.1, отличающийся тем, что является Lat-поли-L-лизин-ара-ACVMP.

11. Конъюгат по любому из пп.1 - 10, отличающийся тем, что он обладает гепатотропной активностью.

12. Фармацевтическая композиция против гепатита, отличающаяся тем, что она содержит в качестве активного материала по меньшей мере один из конъюгатов по пп.1 - 10.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что она находится в форме, удобной для парентерального или внутримышечного введения.

14. Способ получения конъюгата по пп.1 - 10, в котором основную полиаминокислоту конъюгируют с антивирусными лекарственными средствами и остатками галактозы, отличающийся тем, что конъюгацию остатков галактозы проводят посредством восстановительного лактозаминирования с цианборгидридом.

15. Способ получения конъюгата по п.14, отличающийся тем, что конъюгацию проводят в буферной среде при щелочном значении pH.

Т а б л и ц а 1

Характеристики конъюгатов поли-L-лизина с низкой молекулярной массой

Соединения	мкг лактозы мг соединения	мкг лекарства мг соединения	Группы, замещ. % - H ₂		Удельная активность (расп./мин. × 10 ³ на мг)
			лактоз.	лекарст.	
1) [³ H]-поли-L-лизин	0	0	0	0	1200
2) [¹⁴ C]-поли-L-лизин	721	0	92	0	860
3) [¹⁴ C]-поли-L-лизин	540	206	72	23	500
4) Lat-поли-L-лизин-ага-AMP	493	240	66	33	0
5) Lat[³ H]-поли-L-лизин-ага-AMP	573	147	72	20	36000
6) Lat-поли-L-лизин-ага-[³ H]AMP	613	176	73	22	7500
7) Lat-поли-L-лизин-[³ H]ACVMP	638	81	80	12	440

Т а б л и ц а 2

Характеристики конъюгатов поли-L-лизина с высокой молекулярной массой

Соединения	Лактоза (мкг) Соединение (мг)	Лекарство (мкг) Соединение (мг)	% E - NH ₂ групп, замещенных:		орт/мкг
			лактозой	лекарством	
9) Lat-поли-L-лизин-ага-AMP	385	330	48	43	0
10) Lat-[³ H]поли-L-лизин-ага-AMP	352	312	44	41	2910
11) Lat-[³ H]поли-L-лизин-RIBVMP	396	299	46	39	2504
12) Lat-поли-L-лизин-[¹⁴ C]-AZTMP	371	219	45	26	466
13) Lat-поли-L-лизин-ага-AMP	210	440	31	64	0

Т а б л и ц а 3

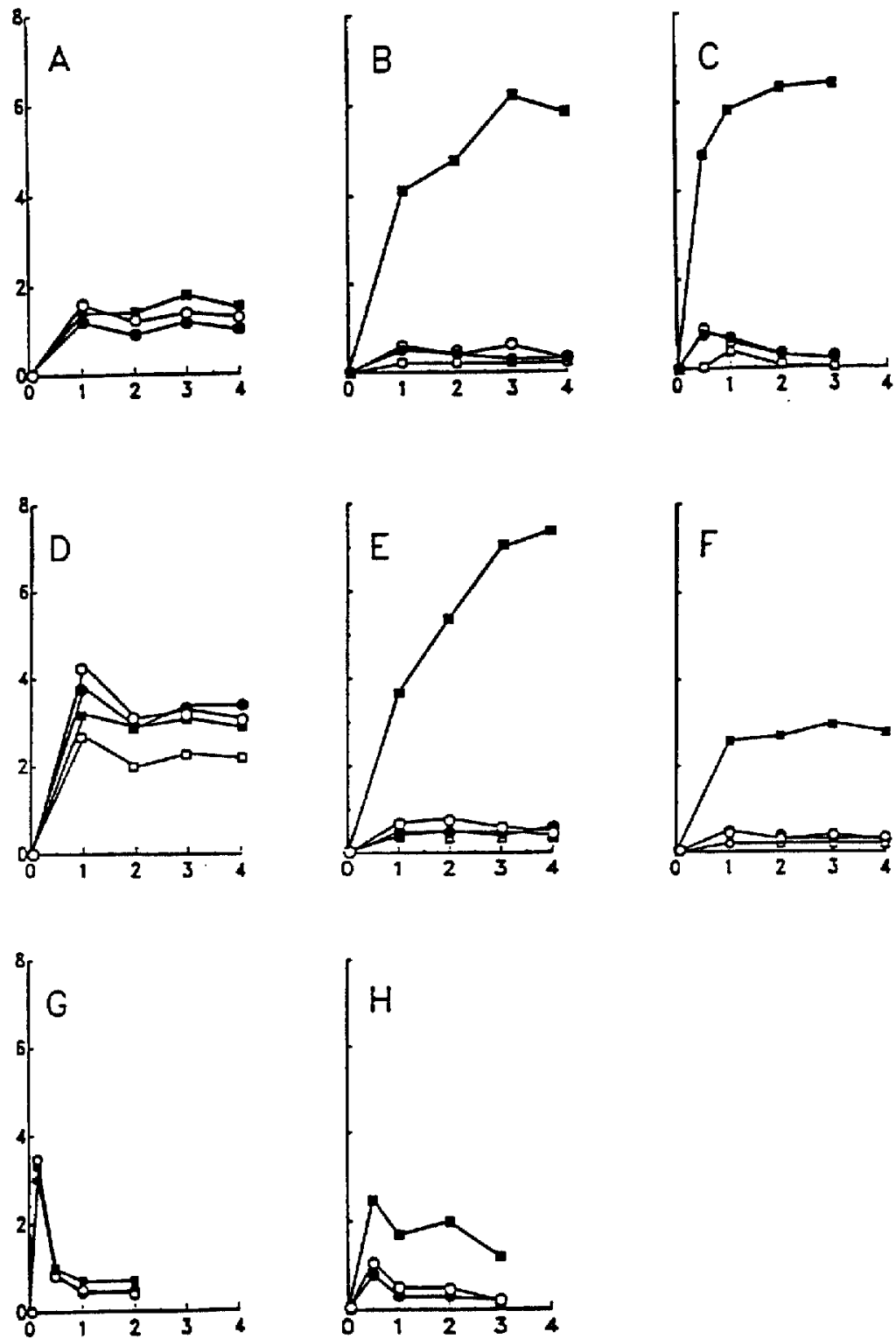
Схема введения L at-поли-L-лизин-ага-АМР мышам и крысам
для микроскопического исследования клеток печени

Животное	Дневная доза (мкг/г)	Путь инъекции	Дни введения
Мыши	6	i.v. внутримышечн.	20
- " -	30	i.v. внутривенное	1
- " -	60	i.v. нутривенное	1
Крысы	6	i.v. внутримышечн.	7
- " -	30	i.v. внутримышечн.	7
- " -	60	i.v. нутривенное	1

RU 2140292 C1

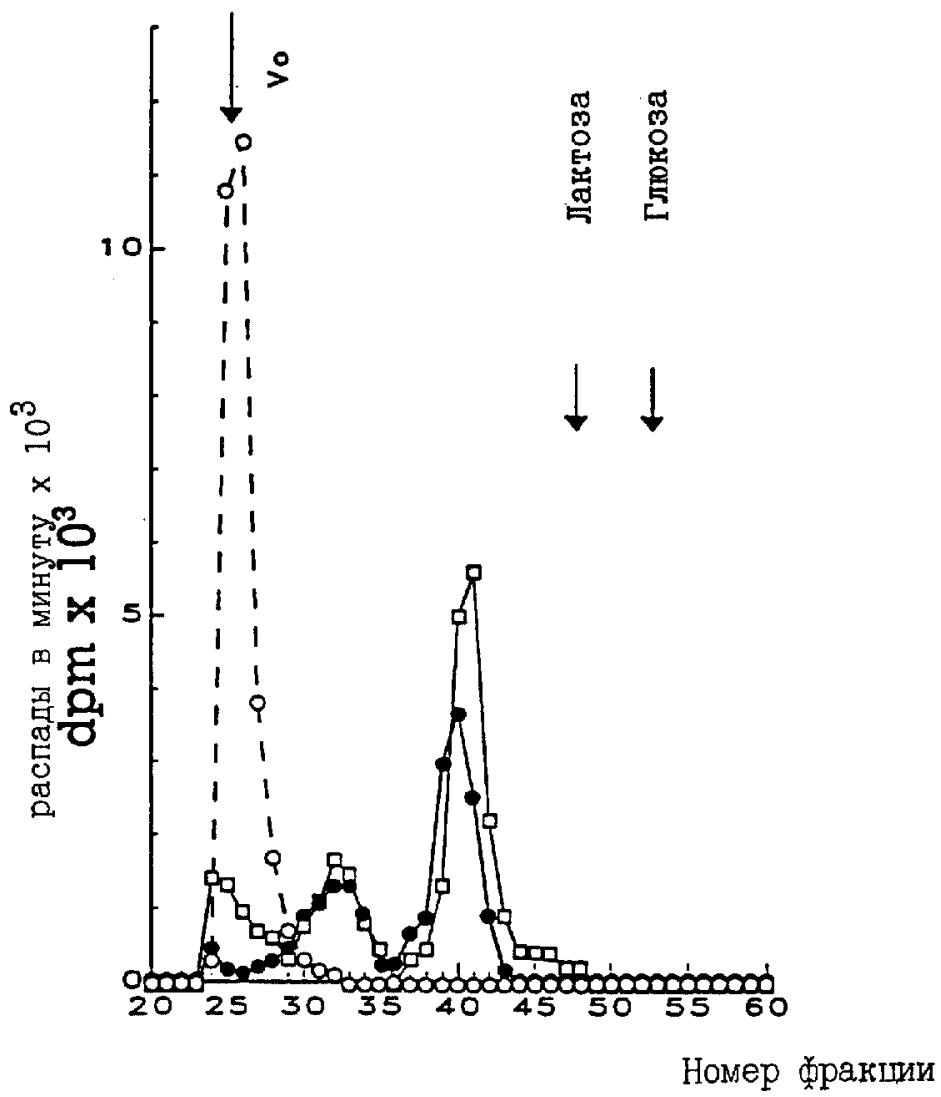
RU ?140292 C1

% инъцированных распадов в минуту на г органа
 % of injected dpm/g organ

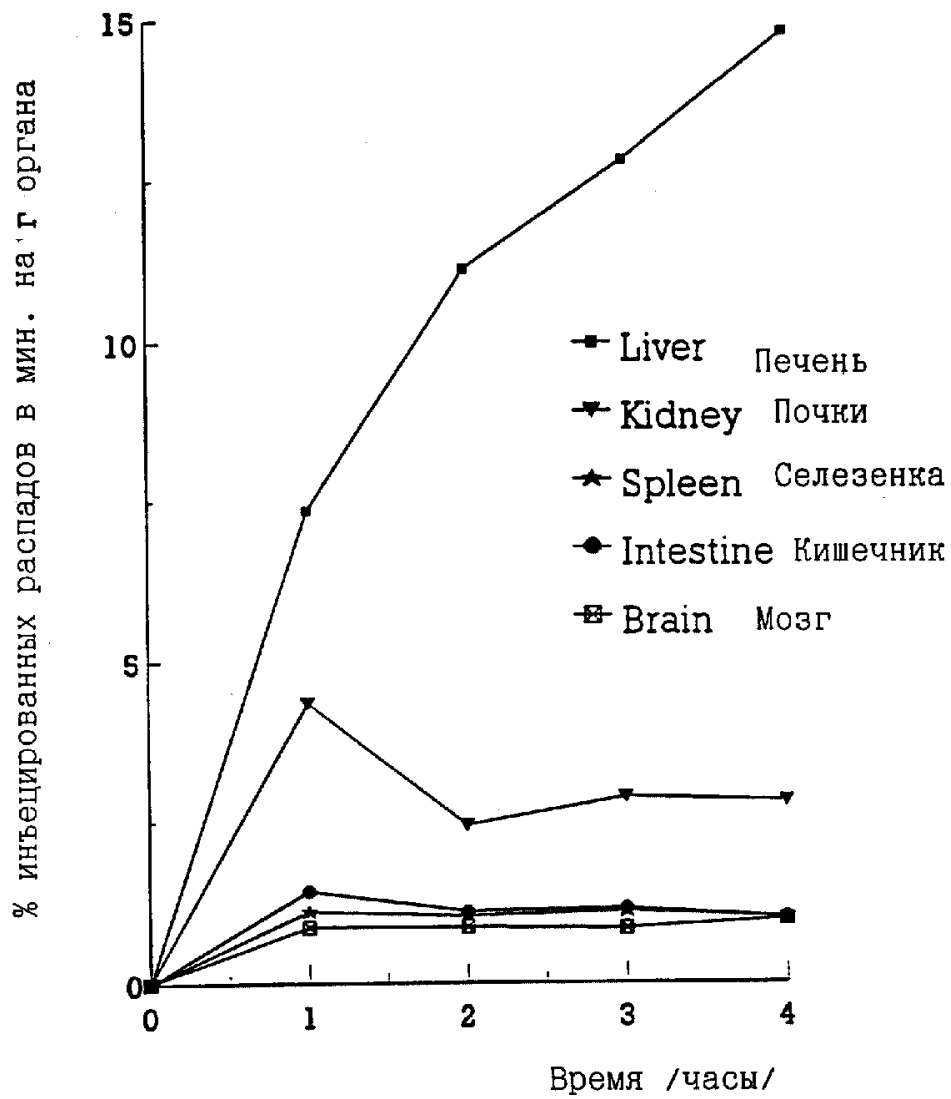


Время /часы/

Фиг.2



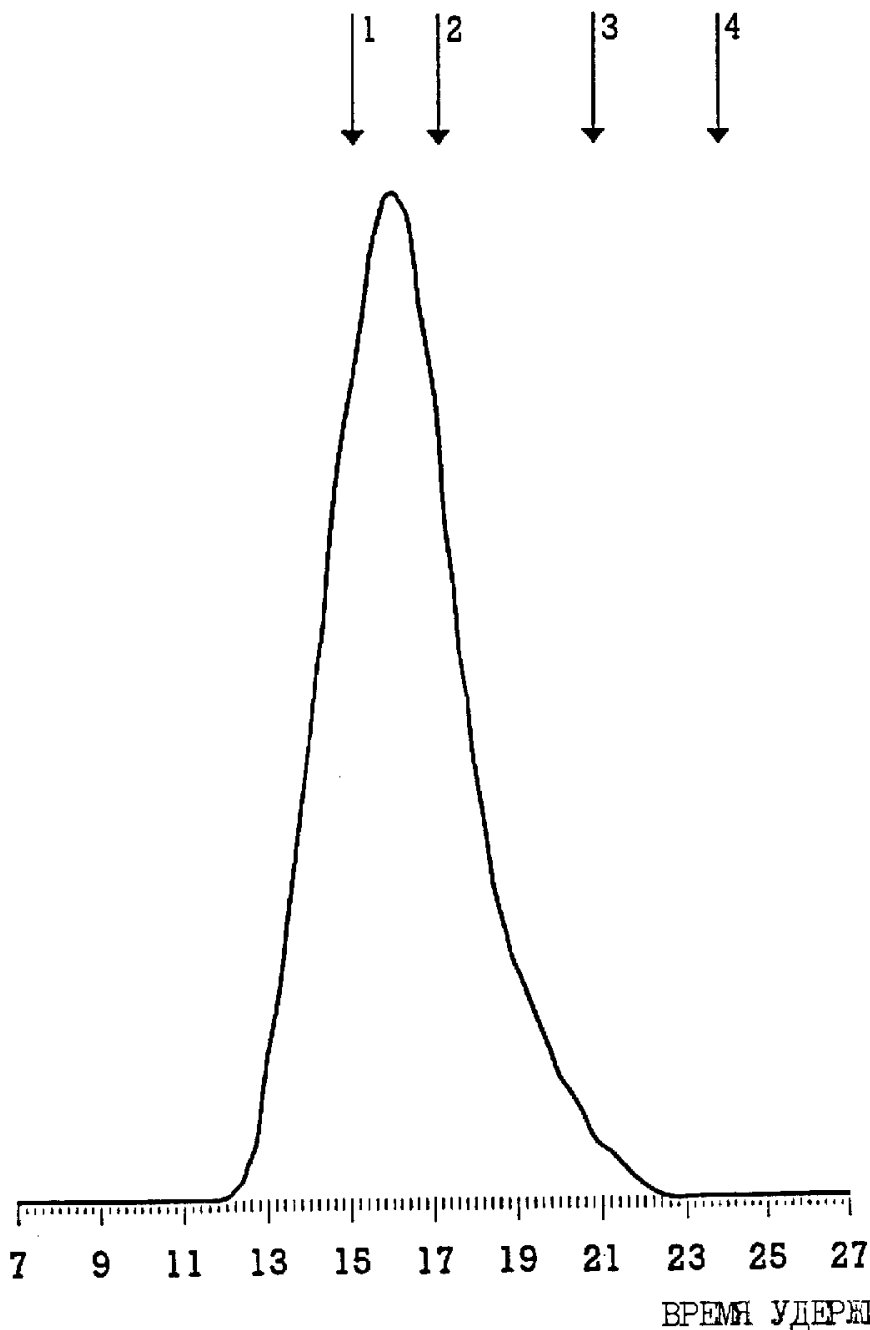
Фиг.3



Фиг.4

RU 2140292 C1

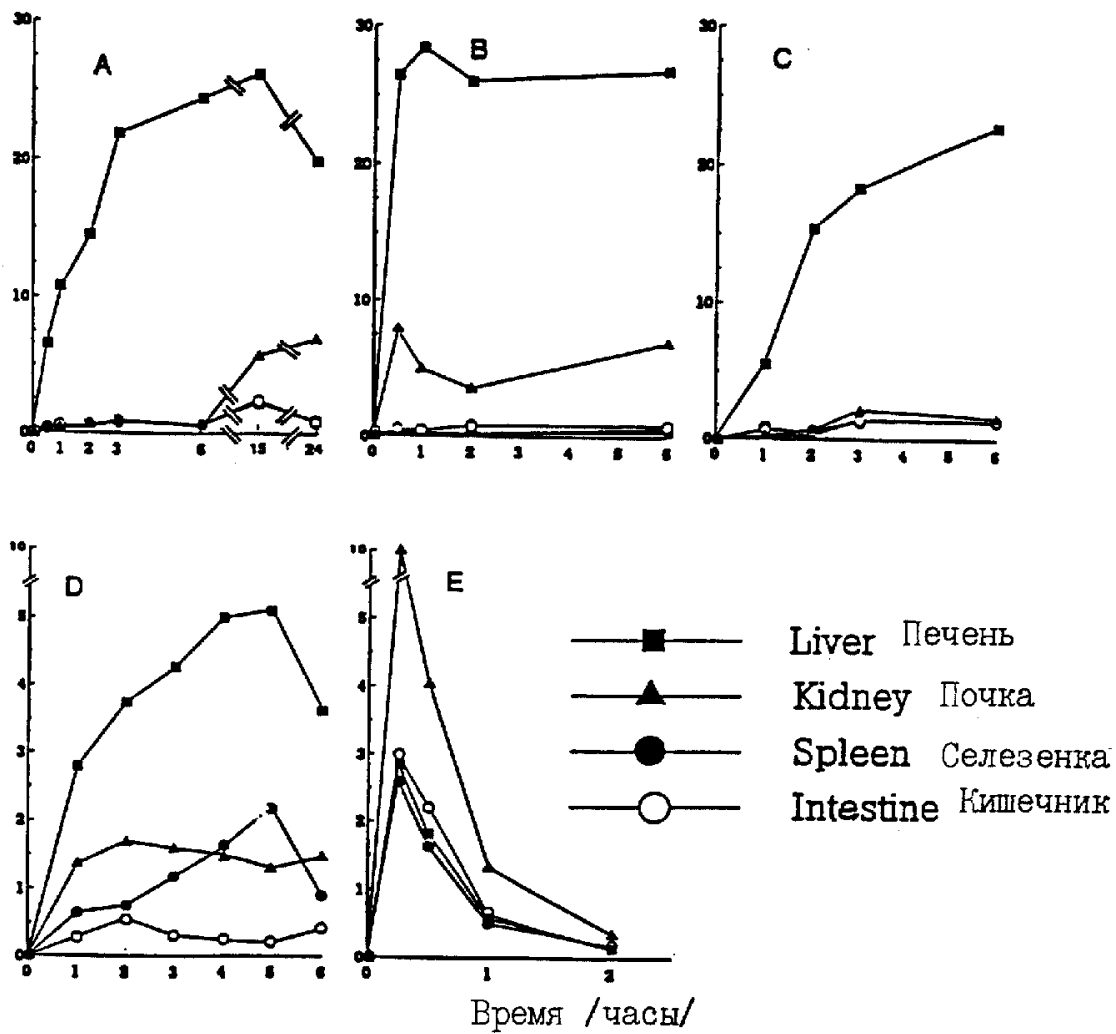
RU 2140292 C1



Стрелки 1, 2, 3 и 4 указывают время удерживания бычьего I_gG , человеческого сывороточного альбумина (HSA), РНКазы и апротина, соответственно.

Фиг.5

% инъекционных распадов в мин. на г органа



Фиг. 6