

Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С.
ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», Москва

Химические аспекты создания Полиоксидония*

Полиоксидоний® — отечественный препарат с широким спектром фармакологического действия, не имеющий аналогов в мире. Препарат применяется как иммуномодулятор, детоксикант, иммуностимулирующий и пролонгирующий носитель фармакологически активных соединений. Полиоксидоний® (ПО) разрешен к применению с 1996 года, рег. номер 96/302/9, ФС 42-3906-00. Опыт применения ПО показал его высокую клиническую эффективность в комплексном лечении практически всех вторичных иммунодефицитных состояний, проявляющихся в хронических, рецидивирующих, вялотекущих инфекционно-воспалительных процессах: кожи и мягких тканей, глаз, бронхо-легочного аппарата, желудочно-кишечного и урогенитально тракта, а также в лечении острых бактериальных и вирусных инфекций.

Сообщение посвящено химическим аспектам создания Полиоксидония — сополимера N-оксида 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромидом с молекулярной массой 100 КД.

В настоящее время результаты работ в области иммунофармакологии позволяют с уверенностью говорить о возрастающей роли физиологически активных высокомолекулярных соединений, которые могут применяться, по крайней мере, в трех качествах, а именно:

- иммуномодуляторы;
- иммуноадьюванты для форсификации традиционных вакцин;
- иммуностимулирующие и стабилизирующие носители антигенов в структуре конъюгированных вакцин нового поколения.

Известно, что подавляющее большинство лекарств природного происхождения представлено полимерами. В то же время все известные синтетические лекарства являются низкомолекулярными соединениями. Несмотря на очевидные преимущества высокомолекулярных соединений перед низкомолекулярными соединениями, до сих пор не было создано синтетического высокомолекулярного регулятора иммунитета, удовлетворяющего требованиям фармакологии, медицины и технологии. Приведем основные из них.

Требования фармакологии:

- Выраженная фармакологическая активность
- Отсутствие побочных эффектов, низкая острая и хроническая токсичности
- Выведение из организма
- Устойчивость при хранении не менее 2-х лет

Физико-химические требования:

- Контролируемость синтеза
- Водорастворимость
- Монодисперсное или узкое молекулярно-массовое распределение
- Наличие реакционноспособных функциональных групп для носителя

Технологические требования:

- Технологичность процесса получения

- Доступность исходного сырья
- Экономическая целесообразность

Полиоксидоний® относится к классу водорастворимых производных гетероцепных алифатических полиаминов. Данный класс соединений не имеет аналогов в мире как по структуре, так и по свойствам. Наличие в основной цепи макромолекулы третичного атома азота открывает практически неограниченные возможности получения модификатов с широким спектром физико-химических, физиологических и фармакологических свойств. Варьирование химического строения гетероцепного полиамина, а также химического строения модифицирующих агентов и степени модификации полиамина позволяют регулировать в широких пределах указанные выше свойства.

Физико-химические и фармакологические свойства ПО во многом определяются N-оксидными группами, введенными в основную цепь макромолекулы, и величиной молекулярной массы. Как видно из химической формулы, в структуре ПО содержатся также карбоксильные группы, которые при физиологических значениях pH в растворе существуют в бетаиновой форме в виде внутренней соли с компенсированными противоположными и равными зарядами. Следует заметить, что образование подобных солей является характерной особенностью и природных соединений. При физиологических значениях pH ПО представляет собой практически нейтральное соединение.

Препарат получают путем трехстадийного химического синтеза, однако все стадии его получения связаны с понятиями «живая», природная.

Основные стадии синтеза полиоксидония

I — «живая катионная полимеризация» — уникальная система синтеза монодисперсных высокомолекулярных соединений с заранее заданными молекулярной массой и структурой

II — окисление третичного азота гетероцепного полиамина полиэтиленпиперазина с целью решения ключевой проблемы синтеза водорастворимого нетоксичного деструктирующего препарата, способного выводиться из организма после выполнения им своей полезной функции

III — введение «якорных» функциональных групп с целью придания ему свойств универсального носителя, в частности, вакцинных антигенов различной природы.

Первая стадия — «живая» катионная полимеризация шестичленного гетероцикла диазабицикло-(2,2,2)-октана. Пояснение терминов: термин «живая» обозначает безобрывный, без гибели активных центров процесс полимеризации, термин «катионная» — растущими активными центрами при полимеризации являются катионы.

С целью разработки количественных закономерностей синтеза гетероцепного полиамина поли-1,4-этиленпиперазина (ПЭП) проведено кинетическое исследование полимеризации гетероцикла диазабицикло-(2,2,2)-октана, определены все фундаментальные кинетические и термодинамические характеристики. Установлено, что реакция полимеризации представляет собой «живущий» безобрывный процесс и протекает по катионному механизму.

Скорость реакции ω подчиняется следующей зависимости:

$$\omega = K_p [M] \cdot [I]$$

где K_p — константа роста

$[M]$ — концентрация мономера диазабицикло-(2,2,2)-октана

$[I]$ — концентрация катализатора

В результате реакции образуется монодисперсный полимер, в котором все цепи одной длины, а его молекулярная масса M_n может быть задана простым соотношением

$$M_n = \frac{[M]}{[I]},$$

Кинетические и термодинамические характеристики процесса: константа роста K_p (195°C) = 0,125 л/моль мин, энергия активации E_a = 19,2 ккал/моль, энтропия полимеризации ΔS^\ddagger = -35 э.е., энтальпия — ΔH = 2,3 ккал/моль.

Открытый и разработанный метод «живой» катионной полимеризации позволяет, в отличие от всех без исключения способов получения синтетических полимеров, синтезировать монодисперсные соединения с заранее заданными молекулярной массой и структурой и количественным 100%-ным выходом. Следует отметить, что это пока единственная известная в мире система получения монодисперсных высокомолекулярных соединений. Все другие методы приводят к получению полимеров с широким набором фракций различной молекулярной массы. Известно, что в природе по безобрывному механизму осуществляется синтез монодисперсных соединений, например белков, но по другому пути и на генетическом уровне. Методы физики и химии позволяют достичь того же в обычном химическом реакторе.

Вторая стадия — окисление гетероцепного полиамина и получение водорастворимого N-оксида полиэтиленпиперазина.

Введение в организм высокомолекулярных соединений сопровождается накоплением их в органах и тканях и может вызвать ряд нежелательных побочных эффектов. Поэтому перспективы использования высокомолекулярных соединений в фармакологии неразрывно связаны с необходимостью создания препаратов, способных выводиться из организма. Возможны два решения этой ключевой проблемы. Во-первых, получение олигомерных соединений с узким молекулярно-массовым распределением и такой величиной молекулярной массы, при которой эти соединения могут полностью выводиться из организма. И, во-вторых, получение высокомолекулярных соединений, содержащих в основной цепи связи, способные гидролизироваться в условиях организма и обеспечивать распад на фрагменты, способные к выведению из организма.

Получение олигомерных соединений связано с серьезными проблемами их фракционирования. Попытки введения сложноэфирных, пептидных и других связей, способных к гидролизу в организме с контролируемой скоростью, натолкнулись на достаточно сложную химическую и особенно технологическую проблему. Поэтому

указанные пути получения искомым соединений представляю скорее научный, чем практический интерес.

Для решения этой сложной проблемы мы в очередной раз воспользовались патентом природы. Из литературы известно, что реакция окисления третичных аминов лежит в основе метаболизма азотистых соединений в живой и растительной природе. На путях биотрансформации третичных аминов в реакциях микросомального N-окисления участвуют ферментные системы печени: флаavin-содержащая монооксигеназа 3 печени человека (ФМОЗ), цитохром P-450 и др. Метаболизм лекарственных соединений, содержащих третичный атом азота (антидепрессанты, алкалоиды и др.), проходит также через стадию N-окисления. Поэтому проблему деструкции полиамина и его выведения из организма мы решали путем введения в основную цепь макромолекулы поли-1,4-этиленпиперазина N-оксидных групп по реакции окисления третичного азота.

Окисление полиамина поли-1,4-этиленпиперазина, содержащего азот в основной цепи, позволило решить следующие проблемы:

- водорастворимости
- резкого снижения токсичности (примерно в 10 раз)
- увеличение полярности и сорбционной способности
- деструкции на низкомолекулярные фракции
- выведения из организма

Большое внимание было уделено нами изучению кинетики и механизма процесса окисления поли-1,4-этиленпиперазина. Приведем некоторые кинетические и термодинамические характеристики процесса окисления поли-1,4-этиленпиперазина:

$K_p = 2,57 \cdot 10^{-2} \text{сек}^{-1}$, энергия активации $E_a = 7,3$ ккал/моль.

С химической точки зрения N-оксидные соединения отличаются от других соединений самой высокой полярностью (дипольный момент N-оксида полиэтиленпиперазина около 5Д, в то время как дипольный момент исходного полиамина 0,65Д). Этим обусловлена их уникальная способность сорбировать различные токсические соединения, в том числе, токсины, металлы и др., а затем выводить их из организма. Именно высокой адсорбционной способностью и полимерной природой обусловлены выраженные детоксикационные свойства этих соединений. Однако, сорбция на высокополярных соединениях, какими являются N-оксиды, не связана с образованием прочных макромолекулярных комплексов. Основную роль в них играют водородные связи и слабые электростатические, вместе с тем, прочность комплексов элементарных молекул будет зависеть от pH, при этом наиболее слабые комплексы образуются при физиологических pH.

Существенным и важным для решения задачи выведения ПО из организма было изучение процесса деструкции в модельных физиологических условиях. Экспериментальное изучение процесса термической деструкции позволило установить механизм и описать процесс деструкции, определить кинетические и термодинамические характеристики процесса деструкции: константа скорости деструкции $K_d = 7,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л·с; константа иницирования $K_i = 1,82 \cdot 10^{-4}$ сек⁻¹; энергия активации $E_a = 21$ ккал/моль.

Важным этапом дальнейших исследований проблемы выведения явился переход от модельных экспериментов к изучению фармакокинетики меченого полиоксидония в условиях организма.

Проведено экспериментальное изучение у крыс фармакокинетики препаратов, меченых радиоактивной меткой: субстанции ПО, инъекционной и ректальной лекарственных форм при внутривенном, внутримышечном и ректальном способах введения. С этой целью были разработаны методы получения меченого ¹⁴C- и ³H-полиоксидония.

В опытах *in vitro* изучена степень связывания ³H-полиоксидония с белками плазмы и форменными элементами крови. Показано, что в крови на белках адсорбируется около 90 %, с форменными элементами связывается 7,5–10% препарата.

В опытах на крысах при внутривенном введении установлено, что ³H-полиоксидоний характеризуется высокой скоростью распределения в организме: константа скорости перехода из крови в ткань равна $1,18 \pm 0,12$. Период полураспределения ³H-ПО в организме — $0,42 \pm 0,05$ часа (25 мин). Период полуэлиминации полиоксидония — $25,4 \pm 1,47$ часа, константа скорости элиминации составила $0,53 \pm 0,02$. Среднее время удержания препарата в организме (MRT) — 29,5 часа. Клиренс — 0,2 л/час. Кажущийся объем распределения 0,37 л/кг свидетельствует о том, что полиоксидоний распределяется в основном во внеклеточной жидкости организма.

Показано, что Полиоксидоний для инъекций при внутримышечном введении в дозе 20 мг/кг быстро всасывается в системный кровоток и достигает максимальной концентрации 17,5 мкг/кг через 40 минут. Период полураспределения (α — фаза) — около 0,5 часа, период полуэлиминации (β — фаза) — 36 часов, клиренс равен 0,17 л/(час/кг), кажущийся объем распределения — 0,43 л/кг, среднее время удержания препарата в организме — 38,7 часов. Установлено быстрое распределение полиоксидония по органам и тканям. Показана значительная гетерогенность в распределении ¹⁴C — полиоксидония в 27 изученных органах и тканях у самцов и самок крыс.

Максимальное количество препарата при однократном подкожном введении фиксируется через час у крыс — самок в почках, печени, гипофизе, щитовидной железе, лимфатических узлах, селезенке и тимусе. Повышенной сорбционной способностью к полиоксидонию (K_r выше 1) обладают: печень, почки, сердце, легкие, гипофиз, спинной мозг, надпочечники, щитовидная железа, селезенка, яичники, поджелудочная железа, брыжеечный лимфоузел, паховый лимфоузел, желудок, тонкий кишечник, кожа.

Полиоксидоний обладает высокой биодоступностью при разных путях введения, проникает через гематоэнцефалический и гематофтальмический барьеры. Установлено отсутствие тканевой кумуляции препарата. Препарат выводится из организма преимущественно почками в две фазы. В течение первых суток с мочой покидает организм около 45% от введенной метки, с фекалиями не более 3 %.

При однократном подкожном введении обнаружено пролонгированное всасывание ¹⁴C — ПО из места введения.

Следует подчеркнуть, что данные модельных экспериментов и фармакокинетические данные достаточно хорошо согласуются между собой.

Третья стадия — введение якорных функциональных групп, благодаря которым полиоксидоний становится не только иммуно-

дулятором, но и носителем вакцинных антигенов и лекарственных средств. В результате длительных поисков был создан универсальный с точки зрения химической реакционной способности носитель, способный ковалентно связываться как с белковыми, так и полисахаридными молекулами. На одном носителе стало возможным создание вакцин как на основе белковых антигенов (гриппозная вакцина Гриппол и другие вакцины), стабилизированных ферментов (Лонгидаза), так и полисахаридных антигенов (брюшнотифозная и бруцеллезная вакцины).

Существенным и важным отличием нашей работы в этой области является применение в качестве носителя полимера, обладающего выраженной собственной физиологической активностью. Это позволяет говорить о новой технологии создания безбалластных комплексных фармакологически активных соединений.

Что такое стабилизация белковой молекулы на полимерном носителе? С точки зрения результата — это значительно более высокая устойчивость к денатурирующим и ингибирующим воздействиям. С точки зрения термодинамики — это значительное снижение энтропийного фактора белковой молекулы, т.е. снижение конформационной подвижности белковой глобулы. С точки зрения технологии получения - необходимо многоточечное связывание с целью жесткой фиксации глобулы белка. Следует особо отметить высокую жесткость полимерной цепи полиоксидония. Именно это свойство полимерной цепи полиоксидония позволило резко повысить стабильность белковых молекул, антигенов, ферментов. При этом достигается многоточечное связывание и высокий выход конъюгата. Нагляднее всего эффект стабилизации белков можно продемонстрировать на примере иммобилизации на полиоксидонии широко применяемого в медицине фермента гиалуронидазы (лидазы). Центральное место при создании терапевтических ферментных препаратов занимает проблема стабилизации фермента при сохранении его активности. Ковалентное связывание с полиоксидонием повышает устойчивость фермента к денатурирующим и ингибирующим воздействиям организма в сотни раз и позволяет получить на основе конъюгата высокоэффективный инъекционный препарат Лонгидаза для лечения заболеваний соединительной ткани. Аналогичные эффекты мы наблюдали при конъюгации с полиоксидонием протективных оболочечных белковых антигенов вируса гриппа - гемагглютинина и нейраминидазы.

Следующий шаг в разработке полиоксидония - оптимизация характеристик препарата на основе изучения взаимозависимости физико-химических и биологических свойств. Наиболее важной характеристикой высокомолекулярных соединений является их молекулярная масса. Эта зависимость носит критический характер, при этом олигомеры ПО не обладают иммуностимулирующей активностью. Из литературы известно, что константа кооперативного связывания макромолекул, как функция молекулярной массы, носит также критический характер. Одним из основных свойств высокомолекулярных соединений является способность к многоточечному кооперативному взаимодействию с другими комплементарными макромолекулами или к многоточечной кооперативной адсорбции на химически комплементарных поверхностях. В связи с этим, уместно обсуждать роль кооперативной

сорбции полиоксидония на клеточных мембранах в механизме стимулирующего действия препарата.

Нами показана зависимость токсичности от содержания N-оксидных групп. Установлено, что токсичность четко зависит от степени окисления и падает с увеличением степени окисления. Скорость деструкции, как было указано выше, также зависит от степени окисления и возрастает с ее увеличением. На основе установленных зависимостей была оптимизирована степень окисления полиоксидония. По классификации токсичности полиоксидоний относится к 5 классу, т.е. практически нетоксичным соединениям. При парентеральном введении мышам LD50 1417 мг/кг, а максимальная суточная терапевтическая доза составляет 0,15 мг/кг. Приведенные данные свидетельствуют об огромной широте терапевтического индекса полиоксидония — 10000. Высокую степень безопасности полиоксидония подтверждают и результаты доклинического изучения. Полиоксидоний в дозе, в 50 раз превышающей терапевтическую, не проявляет пирогенных, раздражающих, токсических, аллергенных, мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных и канцерогенных свойств.

Изучение взаимозависимости физико-химических, токсических и иммуностимулирующих свойств полиоксидония позволило нам оптимизировать состав препарата, стандартизовать все параметры контроля и разработать полный комплект нормативно-технической документации.

Завершающим этапом наших исследований была разработка технологии получения полиоксидония. В связи с этим следует подчеркнуть, что фундаментальные исследования кинетики и термодинамики всех процессов синтеза полиоксидония имеют не только научное, но и важнейшее прикладное значение при разработке технологии получения препарата. Именно на основе количественных характеристик процессов была разработана технология получения полиоксидония в строго контролируемых условиях.

Нельзя переоценить значение кинетических количественных характеристик процессов синтеза для разработки технологии получения Полиоксидония с высоким выходом, заданными характеристиками и контролируемой структурой. В принципе, разработанная нами технология позволяет получать полиоксидоний в любых требуемых количествах и гарантированного качества. Природа выдала патент, мы его воспроизвели путем направленного химического синтеза. Вечная дискуссия о преимуществах природных или синтетических препаратов в этом случае переносится в совершенно другую плоскость — полной контролируемости и воспроизводимости физико-химических и фармакологических свойств препарата и всего технологического процесса. Необходимо помнить и об экономических сторонах создания препарата — доступность сырья, себестоимость производства, конечная цена препарата и т.д.

Таким образом, мы получили синтетическим путем индивидуальное высокомолекулярное водорастворимое, нетоксичное, вполне биогенное соединение, и три года широкого применения полиоксидония в медицине позволяют с уверенностью утверждать, что полиоксидоний является высокоэффективным и безопасным препаратом.