

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) ВУ (11) 23667

(13) С1

(46) 2022.04.30

(51) МПК

A 61K 31/05 (2006.01)

A 61K 31/11 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОР ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА

(21) Номер заявки: а 20200271

(22) 2020.09.28

(71) Заявитель: Учреждение образования "Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка" (ВУ)

(72) Авторы: Никандров Виталий Николаевич; Ильючик Ирина Анатольевна; Коваленко Виталий Николаевич; Жур Николай Владимирович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Учреждение образования "Белорусский государственный педагогический университет имени Максима Танка" (ВУ)

(56) EP 1676585 A1, 2006.

RU 2238950 C2, 2004.

RU 2144038 C1, 2000.

ПЕТИБСКАЯ В.С. Ингибиторы протеолитических ферментов. Известия вузов. Пищевая технология, 1999, № 5-6, с. 6-10.

(57)

Применение 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида в качестве ингибитора протеолитической активности пепсина.

Заявляемое изобретение относится к разделу биохимии, а именно к ингибиторам протеолиза.

Известен факт ингибирования аспартильной протеиназы пепсина (ЕС 3.4.23.1) альгинатами [1]. Ингибирование осуществляется путем внесения в реакционную систему, содержащую белковый субстрат - модифицированный янтарным ангидридом альбумин и протеиназу - пепсин свиньи, алиquotы ингибирующей добавки, в качестве которой используют водные растворы альгината натрия с молекулярной массой в диапазоне от 50000-380000 Да, а затем определяют уровень расщепления белкового субстрата.

Установлено, что при концентрации альгината 0,5 мг/мл достигается снижение активности пепсина на 37-70 % в зависимости от молекулярной массы альгината; при концентрации альгината 0,005 мг/мл максимальный ингибирующий эффект составляет 23 %.

Указанный способ ингибирования является прототипом по отношению к заявляемому.

Однако альгинаты не обеспечивают предсказуемое снижение протеолитической активности пепсина. Это связано с тем, что молекулярная масса альгината может варьироваться в широком диапазоне в зависимости от источника происхождения, а ингибирующее действие альгината, согласно прототипу, зависит от его молекулярной массы. Кроме того, неизвестно, насколько избирательно действие альгината на активность пепсина: из материалов прототипа не вытекает отсутствие действия альгинатов на активность других протеолитических энзимов [1].

Между тем изыскание селективных ингибиторов пепсина важно для разработки эффективных биоспецифических сорбентов [2, 3] и для разработки эффективных средств по-

давления аспартильной протеиназы вируса иммунодефицита человека, играющей важную роль в репродукцию этого вируса [4].

Задачей заявляемого изобретения является ингибирование активности пепсина при условии, что такое воздействие не оказывается на активность протеиназ другого типа, в частности сериновой протеиназы трипсина.

Поставленная задача достигается следующим образом. Предложен способ снижения протеолитической активности пепсина в реакционной системе путем внесения в нее в качестве игибирующей добавки низкомолекулярного фенольного соединения 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида.

Заявителем на основе проведенных испытаний было установлено, что 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид способен ингибировать протеолитическую активность пепсина. В то же время он не снижает активность протеиназы другого типа - трипсина. По мнению заявителей, ингибирующее действие 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида может быть связано с его влиянием на свободнорадикальные процессы, с которыми сопряжено явление протеолиза [5].

Указанные свойства 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида демонстрируются следующим примером.

Пример использования ингибитора.

Протеолитическая активность протеиназ определяют методом лизиса желатина в тонком слое агарового геля [6]. На приготовленную желатин-агаровую пластину (концентрация желатина - 10 г/л, агар-агара - 10 г/л) наносят 10 мкл раствора пепсина свиньи или трипсина быка в конечной концентрации 0,3 мг/мл (соответственно в 0,05 М трис-НСl рН 7,4 или 0,2 М ацетатном буфере рН 1,5) и добавляют к нему 10 мкл раствора 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида в этаноле в конечной концентрации 10^{-8} - 10^{-2} М. В контрольную пробу вносят аликвоту этанола. Пластины инкубируют при 37 °С в течение 20 ч. Затем обрабатывают 1 М трихлоруксусной кислотой для визуализации зон расщепления желатина и учитывают их площадь. Результаты исследования представлены в таблице.

Влияние 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида на расщепление желатина пепсином или трипсином (число параллельных экспериментов n = 8)

Концентрация 4-гидрокси-3-метоксибензальдегида, М	Контроль, без добавок	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}
Площадь зон лизиса, мм ² (пепсин)	212,06 ± 5,80	123,75 ± 1,80*	119,81 ± 3,82*	114,94 ± 5,91*	120,94 ± 3,76*	161,00 ± 4,65*	175,19 ± 6,49*	199,81 ± 4,49
Площадь зон лизиса, мм ² (трипсин)	829,81 ± 25,21	838,81 ± 22,45	866,81 ± 30,10	895,50 ± 12,75*	832,94 ± 44,06	896,75 ± 14,23*	857,44 ± 50,12	873,94 ± 55,97

Примечание: * - изменения статистически достоверны при $P \leq 0,05$.

Следовательно, в данной реакционной системе 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид подавляет активность пепсина на 17-46 % в зависимости от концентрации эффектора (максимальная концентрация его соответствует 1,52 мг/мл). Ингибирование активности в 24 % достигается уже при концентрации заявляемого соединения 0,0000152 мг/мл.

При этом 4-гидрокси-3-метоксибензальдегид не оказывает ингибиторное действие на активность трипсина, а в отдельных концентрациях повышает ее на 8 %.

BY 23667 C1 2022.04.30

Таким образом, достигаемый технический результат применения заявляемого ингибитора дает возможность снизить активность пепсина на 17-46 %, исключить ингибирование активности трипсина и, следовательно, получить научно корректный результат.

Источники информации:

1. EP 1 676 585 A1.
2. ТУРКОВА Я. Аффинная хроматография. Пер. с англ. Москва: Мир, 1980, с. 320-321.
3. Аффинная хроматография. Под ред. П. Дина, У. Джонсона, Ф. Мидла. Пер. с англ. Москва: Мир, 1988, с. 187-189.
4. ALTERMAN M. Design and Synthesis of HIV-1 Protease Inhibitors. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala, 2001, vol. 554, p. 70.
5. НИКАНДРОВ В.Н. и др. Нетривиальные проявления протеолиза на молекулярном и клеточном уровнях, их фундаментальное и прикладное значение. Новости медико-биологических наук, 2010, т. 2, № 3, с. 14-28.
6. НИКАНДРОВ В.Н. и др. Методы исследования протеолиза. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: Выш. шк., 2013, с. 132-157.