



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **453**

(51) **МПК 8 C07K 7/06,
A61K 38/08**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

(21) 06000898
(22) 19.10.2006
(46) Бюл. 48 (4), 2007
(71) Общество с ограниченной ответственностью «Занд» (TJ)
(72) Бобиев Г.М. (TJ); Шахматов А.Н. (TJ); Касирова А.Н. (TJ)
(73) Общество с ограниченной ответственностью «Занд» (TJ)
(56) 1. US 4369137 A, (Orto Pharmaceutical Corporation), 18.01.1983.
2. В.Ф. Мартынов и др. «Иммуноактивные пептиды. Синтез активных фрагментов некоторых пептидных гормонов тимуса». Журнал общей химии, 1989, том 59 (121), вып. 10, стр. 2369-2377.

2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТИМОПЕНТИНА

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма.

Целью изобретения является способ получения тимопентина, приводящий к более высокому выходу конечного пептида.

Указанная цель достигается тем, что тимопентин синтезируют методом активированных (пентафторфениловых) эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната, путем ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с С-конца.

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма.

Известен [1] способ получения тимопентина, пентапептида с последовательностью аргинил-лизил-аспартил-валил-тирозин и представляющего собой фрагмент 32-36 молекулы тимопоэтина, заключающийся в проведении фрагментной конденсации по схеме 2+3. Для защиты α -аминогрупп используют карбобензоксигруппу, ϵ -аминогруппу лизина и гуанидиновую группу аргинина также блокируют карбобензоксигруппой; для защиты β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты применяют бензилоксигруппу, а тирозин вводят в виде метилового эфира со свободной фенольной ОН-группой. Защитные группы с С-концевого трипептида удаляют одновременно длительным действием бромистого водорода в уксусной кислоте с добавлением 10% воды и последующей обработкой ионообменной смолой Dowex-1 (в ОН-форме). Конденсацию фрагментов проводят с помощью комплекса F; защищенный пентапептид получают с выходом 40%. После удаления защитных групп каталитическим гидрогенолизом в присутствии палладия на активированном угле, продукты очищают хроматографией на Sephadex G-25 с применением градиента пиридинацетатного буфера и последующей лиофилизацией; выход лиофилизата 19%.

Недостатком данного способа является низкий выход конечного свободного пентапептида.

Известен [2] способ получения тимопентина ступенчатым наращиванием пептидной цепи карбодиимидным методом с использованием в качестве конденсирующего реагента дициклогексилкарбодиимида и в качестве нуклеофильной добавки 1-гидроксibenзотриазола. Наращивание пептидной цепи проводят с С-конца. Для защиты α -карбоксильной группы тирозина, β -карбоксильной группы аспарагиновой кислоты используют сложноэфирную бензильную группу, ϵ -аминогруппу лизина и α -аминогруппу аргинина защищают карбобензоксигруппой, гуанидиновую группу аргинина блокируют нитрогруппой. Для временной защиты α -аминогруппы валина, аспарагиновой кислоты, лизина используют трет-бутилоксикарбонильную группу, которую на промежуточных стадиях синтеза удаляют обработкой трифторуксусной кислотой. Выход защищенных пептидов на стадиях конденсации составлял 70-90%. Окончательное деблокирование защищенного пентапептида проводят обработкой фтористым водородом в присутствии смеси анизол-тиоанизол-о-крезол (1:1:1). Свободный пентапептид переводят в соответствующий ацетат с помощью ионообменной смолы Амберлит CG-4В (ацетатная форма) и очищают колоночной хроматографией на

сефадексе G-10. Выход свободного пентапептида составляет 93%.

К недостаткам данного способа можно отнести использование токсичного дициклогексилкарбодиимида, необходимость проведения трудоемкой операции многократного переосаждения для удаления дициклогексилмочевины, а также использование для деблокирования фтористого водорода, для чего необходимо специальное оборудование.

Прототипом заявляемого является способ получения тимопентина методом активированных эфиров путем ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с С-конца [3]. Для защиты α -аминогрупп и гуанидиновой группы аргинина используют карбобензоксигруппу, которую на промежуточных и конечной стадиях синтеза удаляют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле. ϵ -Аминогруппу лизина защищают трет-бутилоксикарбонильной группой, β -карбоксильную группу аспарагиновой кислоты защищают превращением в трет-бутиловый эфир; эти защитные группы с конечного защищенного пентапептида удаляют действием смеси трифторуксусная кислота-анизол-метилэтилсульфид (425:50:25). α -Карбоксильную группу тирозина защищают превращением в этиловый эфир, который снимают щелочным гидролизом 1 н раствором гидроксида натрия в течение суток на холоду. Выход защищенного дипептида Z-Val-Tyr-OEt составил 80%. Трипептида Z-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OEt - 90,2%, Z-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OEt - 79,8%, Z³-Arg-Lys(Boc)-Asp(OBu^t)-Val-Tyr-OEt - 55,1%. При использовании данного выбора защитных групп пептиды после удаления аминозащитной группы вводят в реакцию конденсации без выделения, что позволяет избежать дополнительных стадий очистки промежуточных пептидов и упростить очистку конечного свободного пептида, которую осуществляют с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Выход свободного пентапептида составляет 97%. Общий выход свободного пентапептида составляет 30,8%.

К недостаткам данного способа можно отнести относительно невысокий общий выход конечного свободного пентапептида и использование при его очистке высокоэффективной жидкостной хроматографии как метода, требующего специального оборудования.

Целью изобретения является способ получения тимопентина, приводящий к более высокому выходу конечного пептида.

Указанная цель достигается тем, что тимопентин синтезируют методом активированных (пентафторфениловых) эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната, путем ступенчатого наращивания пептидной цепи начиная с С-

Для защиты α -аминогрупп и гуанидиновой группы аргинина используют карбобензоксигруппу, которую на промежуточных стадиях и в конце синтеза удаляют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле, β -карбоксильную группу аспарагиновой кислоты защищают сложноэфирной трет-бутильной группой, ϵ -аминогруппу лизина защищают трет-бутилоксикарбонильной группой, которую в конце синтеза удаляют обработкой смесью трифторуксусная кислота-анизол-метилэтилсульфид (425:50%25). α -карбоксильную группу тирозина защищают сложноэфирной этильной группой, которую в конце синтеза удаляют щелочным гидролизом обработкой 1 н раствором гидроксида натрия в течение суток на холоде. Активированные пентафторфениловые эфиры соответствующих N-защищенных аминокислот получают с помощью дипентафторфенилкарбоната и в реакцию конденсации с аминокислотным компонентом вводят без выделения из реакционной смеси и дополнительной очистки. Образующиеся защищенные ди-, три- и тетрапептиды сразу после обычной обработки кислыми и основными реагентами подвергают каталитическому гидрированию для удаления карбобензоксигруппы и после упаривания растворителя вводят в реакцию конденсации с пентафторфениловым эфиром соответствующей N-защищенной аминокислоты. Контроль всех стадий проведения синтеза осуществляют тонкослойной хроматографией на пластинках «Silufol UV-254 (Чехия)» в следующих системах: А - хлороформ-метанол-32%-ная уксусная кислота (60:45:20), Б - хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота (9:3:1:0,3), В - н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (5:5:1:4), Г - н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (30:20:6:24). Окончательное деблокирование защищенного пентапептида осуществляют последовательным проведением каталитического гидрирования, обработки смесью трифторуксусная кислота-анизол-метилэтилсульфид и щелочного гидролиза. После окончательного деблокирования свободный пептид очищают на колонке с сефадексом G-25 в градиенте концентрации пиридин-ацетатного буфера. После лиофилизации общий выход свободного пентапептида составляет 39,8%.

Применение предлагаемого способа позволяет:

1. Увеличить выход тимопентина до 39,8% по сравнению с 30,8% в прототипе.

2. Исключить использование для очистки конечного пентапептида высоко-эффективной жидкостной хроматографии как метода, требующего специального оборудования.

ПРИМЕР

а) К 2,51 г (10 ммоль) карбобензоксигуанидина и 1,45 мл (10,5 ммоль) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляли 4,0 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната, перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Этилацетат упаривали, остаток растворяли в 20 мл диметилформамида, к полученному раствору добавляли 2,1 г (10

ммоль) этилового эфира тирозина. Реакционную смесь перемешивают в течение 1 часа при комнатной температуре. Диметилформамид упаривают, остаток растворяют в этилацетате. последовательно промывают 0,4 М раствором лимонной кислоты, водой, 0,5 н раствором бикарбоната натрия и сушат безводным сульфатом натрия. Этилацетат упаривают. R_f 0,91 (А), 0,48 (Б). Остаток растворяют в 20 мл метанола и гидрируют над 10%-ным Pd/C катализатором. Катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Остаток растворяют в 10 мл диметилформамида.

б) К 3,23 г (10 ммоль) Z- Asp(OBu^t)-ОН и 1,45 мл (10,5 ммоль) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляли 4,0 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната и перемешивают 30 мин при комнатной температуре, этилацетат упаривают. Остаток растворяют в 10 мл диметилформамида и к полученному раствору прибавляют раствор, полученный по методике «а», перемешивают при комнатной температуре в течение часа. Далее реакционную смесь обрабатывают аналогично методике «а». R_f 0,85 (А), 0,71 (Б). Фильтрат, полученный после удаления катализатора, упаривают, остаток растворяют в 10 мл диметилформамида.

в) К 3,6 г (10 ммоль) Z- Lys(Boc)-ОН и 1,45 мл (10,5 ммоль) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляли 4,0 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната и перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин, этилацетат упаривают. Остаток растворяют в 10 мл диметилформамида и к полученному раствору прибавляют раствор, полученный по методике «б», перемешивают 1 час при комнатной температуре. Затем реакционную смесь обрабатывают аналогично методике «а». R_f 0,91 (А), 0,63 (Б). Остаток, полученный после упаривания этилацетата, растворяют в 20 мл метанола и гидрируют над 10%-ным палладием на активированном угле. Катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Полученный остаток растворяют в 10 мл диметилформамида.

г) К 5,76 г (10 ммоль) трикарбобензоксигуанидина, 1,45 мл (10,5 ммоль) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляли 4,0 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната, перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин, этилацетат упаривают. Остаток растворяют в 10 мл диметилформамида и добавляют раствор, полученный по методике «в», перемешивают при комнатной температуре в течение часа. Диметилформамид упаривают, остаток растворяют в 100 мл этилацетата и последовательно промывают 0,4 М раствором лимонной кислоты, водой, 0,5 н раствором бикарбоната натрия и снова водой до нейтральной реакции промывных вод. R_f 0,53 (А), 0,57 (Б). Этилацетат упаривают, остаток растворяют в этаноле, добавляют 20 мл 2 н раствора гидроксида натрия и оставляют смесь на холоду в течение суток. Затем смесь подкисляют уксусной кислотой, упаривают. Остаток растворяют в 20 мл смеси трифторуксусная кислота-анизол-метилэтилсульфид (425:50:25) и перемешивают в течение 40 мин при комнатной температуре. Растворитель упаривают, остаток

растворяют в метаноле и гидрируют над 10%-ным палладием на активированном угле в течение 3 часов. Катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Основной продукт очищают на колонке (2,0x50 см) с сефадексом G-25 в градиенте концентрации пиридин-ацетатного буфера. Выход 2.7 г (39,8%) аморфного продукта, R_f 0,28 (В), 0,79 (Г), $[\alpha]_D^{20} = -26,92^\circ$ (С 1, MeOH). Аминокислотный анализ: Arg 0,98, Lys 0,96, Asp 0,95, Val 1,0, Tyr 0,98.

Иммуностимулирующую активность синтезированного тимопентина определяли по увеличению титра противотейлерийных антител у телят, иммунизированных противотейлериезной вакциной. Для этого 5 телят 5-6-месячного возраста иммунизировали живой противотейлериезной вакциной ВИЭВ в дозе 1 мл (0,1 млн живых клеток) на голову. Через 3-5 дней с начала поствакци-

нальной реакции на введение вакцины (через 15-17 дней после иммунизации) опытным животным вводили тимопентин в виде водного раствора в дозе 200 мкг на 100 кг живого веса. Контролем служили 5 аналогичных иммунизированных телят, которым тимопентин не вводили. Через 35 дней после вакцинации у опытных и контрольных животных определяли в сыворотке крови наличие и уровень противотейлерийных антител реакцией длительного связывания комплемента (РДСК) и иммуноферментным анализом (ИФА). Результаты показали, что в крови опытных животных титр противотейлерийных антител составлял 1:5-1:40 в РДСК и 1:100-1:1600 в ИФА, титр антител в сыворотке контрольных животных составлял 1:5-1:20 в РДСК и 1:50-1:800 в ИФА, что говорит о высокой иммуностимулирующей активности тимопентина.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения тимопентина, заключающийся в ступенчатом наращивании пептидной цепи методом активированных эфиров начиная с С-конца, **отличающийся тем, что** в качестве активированных эфиров используют пентафторфе-

ниловые эфиры, полученные с помощью дипентафторфенилкарбоната, которые без выделения из реакционной смеси и дополнительной очистки вводят в реакцию конденсации с аминокислотным компонентом.