



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **227**

(51) **6 C07K 5/062, A61K 38/05**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

(21) 98000511

(22) 24.04.98

(46) 30.08.1999, Бюл. № 2 (14)

(71) Малое предприятие “Занд” (TJ)

(72) Бобиев Г.М., Бобиев Х.А., Сатторов И.Т., Нораев Р., Исупов С.Д., (TJ)

(73) Малое предприятие “Занд” (TJ)

(56) 1. Халиков Ш.Х. Синтез и структурно-функциональное исследование пептидов и полипептидов регулярного строения. Дис. на соиск. уч. ст. док. хим. наук.- М., 1991.- 49 с.

2. Najjar V.A. Therapeutically useful polypeptides. - United States Patent office. 3.778.426. 11 Dec. 1973, Int. C 07 C 1/52, C 07 G 7/00, C 08 H 1/00. Appl. 16 Dec. 1970.

3. Бобиев Г.М. Синтез и структурно-функциональное исследование иммуноактивных пептидов ряда тимопоэтина, тимозина и бурсина. Автореф. дис. на соиск. уч. ст. кан. хим. наук.- Душанбе, 1996.- 24 с.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА “ФЕРУНОЛ”

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных, а также для лечения заболеваний, вызываемых недостатком железа в организме, характеризуется тем, что в его состав, кроме пептидов входят FeSO_4 и валин вместо глутаминовой кислоты.

Препарат “Ферунол” получают путем конденсации N-оксисукцинимидного эфира карбо-бензоксивалина и метилового эфира триптофана, деблокирования защищенного пептида первоначально каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного Pd/C катализатора и омылением с помощью NaOH, очистки свободного дипептида экстракцией н-бутанолом и с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, лиофилизации, приготовления водного раствора пептида, добавления к нему при pH-6,0 и температуре 110-120°C эквимольное количества соли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Состав выдерживают в течение 1 часа при температуре 110-120°C и охлаждают его до комнатной температуры.

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных, а также для заболевания, вызываемых недостатком железа в организме.

1. Известен (1) димер гексапептида $\text{H}-(\text{Cys-Pro-Pro-Glu-Leu})_2\text{-OH}$, представляющий собой димер фрагмента 226-231 из “шарнирной” области иммуноглобулинов и обладающий иммуностимулирующей активностью. Известен способ получения этого димера, заключающийся в его химическом синтезе. При последнем для блокирования α -карбоксильной группы лейцина и γ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты используют бензильную защиту, а SH-группу цистеина и ϵ -амингруппы лизина - карбобензоксизащиту, α -аминогрупп аминокислот -

трет-бутилоксикарбонильную защиту. В качестве конденсирующего реагента для соединения аминокислот между собой применяют дициклогексилкарбодиимид и метод активированных (п-нитро-фениловых) эфиров. Трет-бутилоксикарбо-нильная защитная группа с пептидов снимается действием HCl в этилацетате. Гексапептид получают наращиванием по одной аминокислоте с N-конца цепи. После удаления карбобензоксид- и бензильной защитных групп действием натрия в жидком аммиаке, восстановленный пептид обессоливают на сефадексе G-10, затем фракционируют на колонке с биогелем Р-2. При окислении SH-группы цистеина пептид переходит в димерную форму.

Димер данного гексапептида в дозе 5 мкг значительно увеличивает число антителообразующих клеток селезенки кролика и титр гемагглютининов против эритроцитов барана.

Недостатком данного димера пептида и способа его получения является то, что из-за наличия в составе вышеуказанного соединения серосодержащей аминокислоты цистеина вследствие отравления катализатора серой невозможно снимать защитные группы в мягких условиях каталитического гидрирования. В связи с этим используют действие натрия в жидком аммиаке (достаточно жесткие условия). Кроме того, условия проведения этой реакции являются взрывоопасными из-за использования металлического натрия. Для получения димера гексапептида необходимо провести 5 стадий конденсации аминокислот друг с другом и стадию окисления SH-группы цистеина. Кроме того, для очистки димера используют такие трудоемкие процессы, как обессоливание на сефадексе G-10 и фракционирование на биогеле Р-2, в связи с чем себестоимость данного димера гексапептида становится достаточно высокой.

2. Известен тетрапептид с последовательностью H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH, называемый тафцином и обладающий иммуностимулирующей активностью (2). Известен способ его получения, в котором применяется ступенчатое наращивание пептидной цепи методом активированных (N-оксисукцинимидных) эфиров, где в качестве N-защитной группы используют трет-бутилоксикарбонильную, ϵ -аминогруппы лизина - карбобензоксид- и OH-группы треонина - бензильную группы, а очистку полученного пептида проводят на "Aminex" в пиридиновом буфере.

Недостатком тафцина и способа его получения является то, что для синтеза препарата необходимо провести три стадии конденсации, а также стадии введения и снятия защитных группировок с боковых функциональных групп треонина, лизина и аргинина. Кроме того, для очистки тафцина используют такой трудоемкий процесс, как ионообменная хроматография, в связи с чем себестоимость тетрапептида достаточно высокая.

3. Прототипом заявляемого вещества является дипептид с последовательностью H-Glu-Trp-OH, обладающий иммуностимулирующей активностью, а прототипом способа его получения - способ, включающий конденсацию защищенных аминокислот методом активированных эфиров, деблокирование защищенного дипептида, очистку полученного свободного пептида с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и лиофилизацию (3).

Недостатком указанного прототипа является то, что в состав вещества входит глутаминовая кислота, содержащая γ -карбок-сильную группу, вследствие чего возникает необходимость в получении производного глутаминовой кислоты с защищенными амино- и γ -карбоксильными группами, а также то, что не всегда достигает достаточно высокий выход вышеуказанного производного.

Целью настоящего изобретения является способ получения иммуностимулирующего препарата для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных, лечения заболеваний, вызванных недостатком железа в организме, а также разработка способа получения этого препарата.

Способ получения иммуностимулирующего препарата "Ферунол" заключается в проведении реакции по защите аминогруппы карбоксильного компонента, активации карбоксильной группы карбоксильного компонента, защите карбоксильной группы аминокислотного компонента, конденсации карбоксильного компонента с аминокислотным компонентом методом активированных эфиров,

снятие защитных групп с амино- и карбоксильной групп, очистке и лиофилизации полученного соединения. При конденсации используют в качестве карбоксильного компонента N-оксисукцинимидный эфир карбобензоксивалина и метиловый эфир триптофана. Полученный защищенный пептид деблокируют первоначально каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного Pd/C катализатора, затем омылением с помощью NaOH. Свободный дипептид очищают пред-варительно экстракцией н-бутанолом, окончательно с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, затем лиофилизируют, готовят его водный 0,0426%-ный раствор, к которому при pH=6,0 и температуре 110-120°C добавляют эквимольное количество соли FeSO₄·7H₂O. Состав выдерживают в течение 1 часа при температуре 110-120°C и охлаждают его до комнатной температуры.

Применение иммуностимулирующего железосодержащего препарата “Ферунол” позволяет лечить заболевания, вызванные не только нарушениями функционирования иммунной системы организма животных, но и недостатком железа в нем.

Применение предлагаемого способа получения иммуностимулирующего препарата “Ферунол” позволяет:

1. Исключить стадии введения и снятия дополнительной защитной группировки.
2. Снизить себестоимость препарата вследствие использования валина - более дешевого, чем глутаминовая кислота.

ПРИМЕРЫ:

1. 5,22 г (15 мМоль) N-оксисукцинимидного эфира карбобензоксивалина, 3,8 г (15 мМоль) хлоргидрата метилового эфира триптофана растворяют в диметилформамиде, добавляют 1,65 мл (15 мМоль) N-метилморфолина и перемешивают в течение 15 ч при комнатной температуре. Диметилформамид упаривают, полученное масло растворяют в этилацетате и последовательно промывают 2%-ным раствором серной кислоты, 5%-ным раствором бикарбоната натрия и водой до нейтральной реакции промывных вод. Этилацетатный слой сушат безводным сульфатом натрия, этилацетат упаривают. Полученный аморфный остаток перекристаллизовывают из эфира, затем переосаждают гексаном. Выход метилового эфира карбобензоксивалил-триптофана составляет 5,6 г (89%). Значение хроматографической подвижности R_f в системе пиридин-уксусная кислота-вода (80:24:44)=0,8; в системе хлороформ-метанол-уксусная кислота (32:2:1)=0,57, Тпл. - 115-118°C

2. 2 г (4,4 мМоль) метилового эфира карбобензоксивалилтриптофана растворяют в смеси этанол-трифторэтанол-уксусная кислота и гидрируют в присутствии 10%-ного Pd/C катализатора до полного снятия карбобензоксигруппы (контроль тонкослойной хроматографией). По окончании гидрирования катализатор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Полученный остаток растворяют в воде, pH доводят до 12,0 с помощью 1н раствора NaOH и перемешивают при комнатной температуре до удаления сложноэфирной метильной группы. Затем pH реакционной смеси доводят до 7,5 с помощью концентрированной соляной кислоты и пептид экстрагируют н-бутанолом. Бутанол упаривают. Свободный валил-триптофан очищают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке, заполненной обращенно-фазовым силикагелем Силасорб С₁₈ в ацетатаммонийном буфере (pH=6,8) при градиенте ацетонитрила от 10 до 30% при скорости потока 14 мл/мин. Собирают фракции, содержащие основной продукт. После лиофилизации выход свободного валил-триптофана составил 1,12 г (93,2%). Время выхода - 6,25 мин. Значение хроматографической подвижности R_f в системе н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (30:20:6:24) = 0,69, в системе уксусная кислота-вода-метанол-хлороформ (7:3:1:1) = 0,75, $[\alpha]_D^{20} = -27,12^0$ (с 1, MeOH).

3. 0,0426 г ($1,133 \cdot 10^{-4}$ Моль) свободного дипептида валил-триптофан растворяют в реакционном сосуде в 100 мл стерильной дистиллированной воды, нагретой до 100°C. К полученному раствору при pH=6,0 и постоянном перемешивании добавляют $314,9 \cdot 10^{-4}$ г FeSO₄·7H₂O. Реакционный сосуд герметично закрывают и нагревают до 110-120°C и выдерживают при этой температуре в течение часа, затем охлаждают до комнатной температуры. Получают препарат желто-коричневого цвета, слегка мутноватый, при длительном хранении которого образуется осадок.

После стерилизации препарат проверяют на токсичность, иммуностимулирующую активность и влияние на естественную резистентность организма животных.

Токсичность препарата проверяют на кроликах. Его вводят внутримышечно в дозе 7 мл на кг живой массы тела. У животных не отмечается никаких изменений местного и общего характера. Иммуностимулирующие свойства препарата проверяют на 20 телятах, привитых противотейлорной вакциной в дозе 1 мл по интенсивности образования противотейлерийных антител. Контролем служат 10 иммунизированных телят, которые “Ферунол” не получают.

Препарат “Ферунол” вводят подкожно в область средней трети шеи в дозе 1 мл в течение 3-5 дней с начала реакции на введение противотейлорной вакцины.

Наличие и уровень антител в сыворотке крови определяют при постановке РДСК (реакция длительного связывания комплемента) и проведении ИФА (иммуноферментный анализ) на 35-й день после прививки и на 18-й день после введения “Ферунола”. Титр антител в сыворотке крови составляет 1:5-1:40 в РДСК и 1:100-1:1600 в ИФА, у не получивших “Ферунол”, соответственно, 1:5-1:20 и 1:50-1:800.

Влияние “Ферунола” на естественную резистентность организма изучают на поросятах 3-5-дневного возраста. Препарат вводят внутримышечно в дозе 70 мкг на кг массы тела один раз в сутки в течение 7 дней. Прирост массы тела опытных поросят на 7-10%, сохранность - на 12% больше, чем у контрольной группы.

Препарат “Ферунол” применяют в ветеринарной практике в виде 0,0426%-ного водного раствора:

- для стимуляции выработки антител в дозе 1 мл на 100 кг живой массы подкожно в область средней трети шеи или внутримышечно в область крупа в течение 3-5 дней;
- для предотвращения заражения молодняка животных возбудителями желудочно-кишечных заболеваний в дозе 1 мл на 100 кг живой массы тела в течение 7 дней один раз в сутки, начиная с 3-5-дневного возраста.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения иммуностимулирующего препарата, включающий проведение реакции по защите амино- группы аминокислот, активацию карбоксильной группы карбоксильного компонента, защиту карбоксильной группы амино- компонента, конденсацию карбоксильного компонента с амино- компонентом методом активированных эфиров, снятие защитной группы амино- группы и карбоксильной группы, очистку и лиофилизацию полученного соединения, **отличающийся тем, что** при конденсации в качестве карбоксильного компонента используют N-оксисукцинимидный эфир карбобензоксивалина, а полученный лиофилизированный продукт растворяют в воде и добавляют эквимолярное количество соли $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, выдерживают реакционную смесь в течение до 1 часа при $\text{pH}=6$ и $T^0=110-120^\circ\text{C}$ без доступа воздуха, охлаждают ее до комнатной температуры и получают иммуностимулирующий препарат.