



ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 98000512

(22) 28.04.98

(46) 12.05.2000, Бюл.№1 (17)

(76) Бобиев Гуломкодир Муккамолович (TJ)

(56) Патент TJ 227, С 07 К 5/062, А 61 К 38/05, 1999.

1. Белокрылов Г.А., Сорочинская Е.И., Леонтьева Л.И. Тетрапептид, обладающий иммуностимулирующим действием. А.с. СССР №1287532.

2. Бобиев Г.М. Синтез и структурно-функциональное исследование иммуоактивных пептидов ряда тимопоэтина, тимозина и бурсина: Автореф. дис...канд.хим.наук.-Душанбе, 1996. - 24с.

3. Бобиев Г.М., Бобиев Х.А., Сатторов И.Т., Нораев Р.Х., Исупов С.Д. Способ получения иммуностимулирующего препарата ферунол. Патент Республики Таджикистан №227 TJ.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА "ТИМОФЕР"

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности. Целью изобретения является разработка способа получения железосодержащего препарата для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных. Указанная цель достигается тем, что проводят конденсацию пентахлорфенилового эфира карбобензоксиизолейцина и метилового эфира триптофана, деблокируют защищенный дипептид в присутствии палладиевого катализатора и обработкой 1 н. раствора NaOH, очисткой свободного дипептида экстракцией н-бутанолом, переосаждением из метанола эфиром, получают координационное соединение его с железом взаимодействием разбавленных водных растворов дипептида изолейцилтриптофан и $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

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

Известен /1/ тетрапептид с последовательностью треонил - треонил - лизил - аспарагиновая кислота, обладающий иммуностимулирующим действием. Способ его получения заключается в ступенчатом наращивании пептидной цепи методом активированных эфиров с использованием для присоединения остатка лизина *p*-нитрофенилового, треонина - пентахлорфенилового эфиров. В качестве *N*-защитной группы используют карбобензоксигруппу, *E*-аминогруппу лизина защищают трет-бутилоксикарбонильной группой, карбоксильные группы аспарагиновой кислоты защищают солеобразованием с гидроксидом натрия.

Недостатком данного способа получения иммуностимулирующего пептида является необходимость проведения трех стадий конденсации и стадий введения и снятия защитных групп с остатков треонина и лизина.

Известен /2/ способ получения триптофансодержащих дипептидов формулы X-триптофан, где X - глутаминовая кислота, глутамин, лейцин и изолейцин, обладающих иммуностимулирующей активностью. Способ заключается в проведении конденсации защищенных аминокислот методом активированных (1-гидроксibenзотриазоловых) эфиров, деблокировании защищенного пептида, очистке свободного дипептида с помощью обращения - фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Недостатком данного способа является использование высокоэффективной жидкостной хроматографии, как метода, требующего специального оборудования.

Прототипом заявляемого способа является метод получения иммуностимулирующего препарата ферунол /3/, заключающийся в получении методом активированных эфиров дипептида валил - триптофан, получении его координационного соединения с ионом железа, приготовлении 0,07%-ного водного раствора координационного соединения.

Дипептид валил-триптофан получают конденсацией *N*-оксисукцинимидного эфира карбобензоксивалина и метилового эфира триптофана. Деблокирование полученного защищенного дипептида осуществляют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле и обработкой 1 н. раствором гидроксида натрия с последующей очисткой с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и лиофилизацией. Координационное соединение получают взаимодействием дипептида и сульфата железа при pH=6,0, 110-120°C в течение часа в темноте.

Недостатком данного способа является использование для получения координационного соединения дипептида валил-триптофан, неактивного в тесте *E*-розеткообразования клетки, в результате чего получается препарат с невысокой иммуностимулирующей активностью.

Целью изобретения является разработка способа получения железосодержащего препарата для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных.

Указанная цель достигается тем, что проводят конденсацию пентахлорфенилового эфира карбобензоксизолеицина и метилового эфира триптофана, полученный защищенный дипептид деблокируют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле и обработкой 1 н. раствором NaOH, свободный дипептид предварительно очищают экстракцией *n*-бутанолом, а затем с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, затем лиофилизуют, готовят его 0,01%-ный водный раствор, к которому при pH=6,0 и температуре 110-120°C добавляют эквимолярное количество соли FeSO₄·7H₂O, выдерживают при этой температуре в течение часа без доступа воздуха и охлаждают его до комнатной температуры.

Применение предлагаемого способа получения иммуностимулирующего перепарата тимофер позволяет получить перепарат, обладающий более высокой иммуностимулирующей активностью, вследствие использования дипептида изолейцил-триптофан, обладающего 100%-ной активностью в тесте *E* - розеткообразования клетки.

ПРИМЕР

7,6 г (15 ммоль) пентахлорфенилового эфира карбобензоксизолеицина, 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 раствор сушат безводным сульфатом натрия, этилацетат упаривают. Полученный аморфный остаток перекристаллизовывают из эфира, затем переосаждают гексаном. Выход метилового эфира карбобензоксизолеицил - триптофана составляет 6,07 г (87%).

2 г (4,3 ммоль) метилового эфира карбобензоксизолеицил-триптофана растворяют в смеси метанол - трифторэтанол - уксусная кислота и гидрируют в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле до полного снятия карбобензоксигруппы (контроль тонкослойной хроматографией). По окончании гидрирования катализа-

тор отфильтровывают, фильтрат упаривают. Полученный остаток растворяют в воде, pH доводят до 12,0 с помощью 1 н. 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 изолейцил-триптофан очищают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке, заполненной обращенно-фазовым силикагелем Силасорб С₁₈ в ацетат-аммонийном 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 изолейцил-триптофана составил 98%. Время выхода 15,31 мин. Значение хроматографической подвижности (R_f) в системе н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (30:20:6:24) равно 0,44, в системе уксусная кислота-вода-метанол-хлороформ (7:3:1:1) равно 0,71, $\alpha^{20} = -31,14^\circ$ (С1, MeOH).

0,01 г (0,0315 ммоль) свободного дипептида изолейцил-триптофан растворяют в реакционном сосуде в 200 мл стерильной дистиллированной воды, нагретой до 100°C К полученному раствору при pH 6,0 и постоянном перемешивании добавляют 0,008757 г FeSO₄·7H₂O. Реакционный сосуд герметично закрывают и нагревают до 110-120°C и выдерживают при этой температуре без доступа воздуха 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 и иммуностимулирующую актив-

ность. Острую токсичность тимофера проверяют на белых мышах, кроликах, овцах и телятах по сравнению с 0,9%-ным физиологическим раствором хлорида натрия. Препарат при внутримышечном введении в дозах 100, 20 и 15 мл/кг не вызывает у белых мышей, кроликов, овец и телят, соответственно, отрицательных изменений местного и общего характера. Хроническую токсичность препарата проверяют на белых мышах и кроликах. Препарат при внутримышечном введении в дозах 25 и 10 мл/кг в течение 10 дней не вызывает у белых мышей и кроликов, соответственно, признаков отравления. Иммуностимулирующую активность препарата проверяют по усилению антигенообразования у телят, иммунизированных живой противотейлериезной вакциной ВИЭВ в дозе 1 мл (0,1 млн живых клеток). Наличие и уровень противотейлерийных антител определяют реакцией длительного связывания комплемента (РДСК) и иммуноферментным анализом (ИФА). Введение тимофера в дозе 2 мл на 100 кг живого веса животного приводит к увеличению титра специфических антител в РДСК с 1:5-1:10 до 1:10-1:40 и в ИФА с 1:50-1:200 до 1:200-1:1600, т.е. в 4-8 раз. Ферунол (прототип) увеличивает титр антител в 2 раза. Препарат тимофер применяют в ветеринарной практике в виде 0,0426%-ного водного раствора:

- для стимуляции выработки антител при внутримышечном введении один раз в сутки в течение 3 дней в дозе 0,03 мл/кг при комплексном применении с различными вакцинами;

- для повышения эффективности лечения пневмоэнтерита телят при подкожном введении в дозе 0,02-0,03 мл/кг один раз в сутки в течение 5 дней при комплексном применении с химиотерапевтическими препаратами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения иммуностимулирующего препарата, включающий конденсацию активированного эфира N-защищенной аминокислоты и метилового эфира триптофана, деблокирование получаемого защищенного пептида, получение координационного соединения свободного дипептида взаимодействием с эквимольным количе-

ством соли FeSO₄·7H₂O в течение 1 часа при pH=6,0 и температуре 110-120°C без доступа воздуха, отличающийся тем, что при конденсации в качестве активированного эфира N-защищенной аминокислоты используют пентахлорфениловый эфир карбобензоксинзолейцина.