



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **282**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

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

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

(21) 98000518

(22) 08.05.98

(46) 13.12.2000, Бюл. №4 (20)

(76) Бобиев Гуломкодир Муккамол-
вич (TJ)

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

2. TJ, патент, 227, С 07 К 5/062, А 61 К 38/05, 1999.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА "ТИМОЦИН"

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных. Целью изобретения является разработка способа получения препарата

2

для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма животных. Указанная цель достигается тем, что проводят конденсацию карбо-бензоксизолейцина и триптофана карбодиимидным методом с использованием: пентахлорфенола в качестве конденсирующего реагента дициклогексилкарбодиимида и нуклеофильной добавки 1-гидроксibenзотриазола, для защиты α -карбоксильной группы триптофана триэтиламина, деблокированием защищенного пептида каталитическим гидрированием над 10%-ным палладием на активированном угле, очисткой свободного дипептида экстракцией н-бутанолом и высокоэффективной жидкостной хроматографией, получении его координационного соединения с цинком путем взаимодействия дипептида и ацетата цинка в разбавленных водных растворах при pH 6,0 110-120°C в течение часа без доступа воздуха.

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

Известен (1) способ получения триптофансодержащих дипептидов формулы Х-триптофан, где Х-глутаминовая кислота, глутамин, лейцин, изолейцин и др. Способ заключается в проведении конденсации защищенных аминокислот методом активированных (1-гидроксibenзот-риазоловых) эфиров, деблокировании защищенного пептида, очистке свободного дипептида с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Недостатком данного способа является использование для очистки свободных пептидов высокоэффективной жидкостной хроматографии как метода, требующего специального оборудования.

Известен (2) способ получения иммуностимулирующего препарата ферунол, заключающийся в получении методом активированных эфиров дипептида валил-триптофан, получении его координационного соединения с ионом железа (II), 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 лиофилируют полученный свободный дипептид. Координационное соединение получают взаимодействием эквимольных количеств дипептида и сульфата железа (II) в разбавленных водных растворах при pH 6,0, 110-120°C в течение часа в темноте.

Недостатком данного способа является использование остатка триптофана с защищенной карбоксильной группой в результате чего для получения свободного дипептида необходимо проводить дополнительную стадию деблокирования карбоксильной группы. К недостаткам также можно отнести использование для получения координационного соединения дипептида валил-триптофан, неактивного в тесте Е-розеткообразования клетки, в результате чего получается препарат с относительно невысокой иммуностимулирующей активностью.

Прототипом заявляемого является способ получения иммуностимулирующего препарата тимофер (3), являющегося координационным соединением дипептида изолейцил-триптофан с ионом железа (II). Способ заключается в получении методом активированных эфиров дипептида изолейцил-триптофан, получении координационного соединения его с ионом железа (II), при-

готовлении водного раствора полученного координационного соединения. Синтез дипептида изолейцил-триптофан проводят конденсацией пентахлорфенилового эфира карбобензоксизолецина и метилового эфира триптофана. Деблокирование защищенного дипептида осуществляют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле и обработкой 1н. раствором гидроксида натрия. Очистку свободного дипептида осуществляют с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, затем лиофилируют. Координационные соединения получают взаимодействием эквимольных количеств разбавленных водных растворов дипептида и сульфата железа (II) при 110-120°C и pH 6,0.

Недостатком данного способа также является использование остатка триптофана с защищенной карбоксильной группой, что требует проведения дополнительной стадии деблокирования. К недостаткам также можно отнести использование для комплексообразования железа, как металла, непосредственно не участвующего в иммунологических реакциях организма, что приводит к получению препарата с несколько меньшей, чем у тимоцина, иммуностимулирующей активностью.

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

Указанная цель достигается тем, что проводят конденсацию карбобензоксизолецина и триптофана карбодиимидным методом с использованием: пентахлорфенола в качестве конденсирующего реагента дициклогексилкарбодиимида и нуклеофильной добавки -1-гидроксibenзот-риазола; для защиты α -карбоксильной группы триптофана триэтиламина. Полученный защищенный пептид деблокируют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле, свободный дипептид очищают предварительно экстракцией н-бутанолом, окончательно - высокоэффективной жидкостной хроматографией, лиофилируют, готовят его водный 0,02%-ный раствор к которому при pH 6,0 и 110-120°C добавляют эквимольное количество ацетата цинка, состав выдерживают в течение часа при 110-120°C без доступа воздуха и охлаждают до комнатной температуры.

Применение предлагаемого способа получения иммуностимулирующего препарата тимоцин позволяет:

1. Исключить стадии введения и снятия защитной группы с карбоксильной группы триптофана.
2. Провести синтез дипептида без выделения из реакционной смеси и дополнительной очистки промежуточных соединений.

3. Получить препарат с более высокой, чем у прототипа, иммуностимулирующей активностью.

Приме. 2,65 г (10 ммоль) карбобензоксизолейцина растворяют в 25 мл диметилформамида, охлаждают до $-5-0^{\circ}\text{C}$, добавляют 2,06 г (10 ммоль) дициклогексилкарбодимида 2931 г (11 ммоль) пентахлорфенола и 1,265 г (11 ммоль) 1-гидроксibenзотриазола, перемешивают 1 ч при $-5-0^{\circ}\text{C}$. Добавляют 2,04 г (10 ммоль) триптофана и 1,2 мл (10 ммоль) триэтиламина, перемешивают при комнатной температуре в течение 16 часов. Диметилформамид упаривают, остаток растворяют в 200 мл этилацетата, промывают 2%-ной серной кислотой и водой до нейтральной реакции промывных вод. Степень чистоты контролируют тонкослойной хроматографией. Значение хроматографической подвижности карбобензоксизолейцил-триптофана (R_f) в системе хлороформ-метанол-32%-ная уксусная кислота (60:45:20) равно 0,81, в системе хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота (90:30:10:3) равно 0,65. Этилацетатный раствор сушат безводным сульфатом натрия. Этилацетат упаривают. Остаток растворяют в 200 мл метанола, гидрируют над 10%-ным палладием на активированном угле. Через 4 часа катализатор отфильтровывают, растворитель упаривают в вакууме. Остаток растворяют в смеси н-бутанол-вода, водный слой отделяют, н-бутанол упаривают. Остаток после упаривания растворяют в 0,05 М ацетатаммонийном буфере (pH 6,8) и очищают с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке 1,6 x 25 см, заполненной обращенно-фазовым силикагелем Силасорб С₁₈ при градиенте ацетонитрила от 10 до 30% при скорости потока 14 мл/мин и детектировании при длине волны 220 нм. Собирают фракции, содержащие основной продукт, лиофилизуют. После лиофилизации выход свободного изолейцил-триптофана составляет 98%. 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-хлоро-форм (7:3:1:1) равно 0,71, $[\alpha]_D^{20} = -31,14^{\circ}$ (С 1, MeOH).

0,0317 г (0,1 ммоль) свободного дипептида изолейцил-триптофан растворяют в реакционном сосуде в 40 мл стерильной дистиллированной воды, нагретой до 100°C . К полученному раствору при pH 6,0 и постоянном перемешивании

добавляют 0,0173 г (0,1 ммоль) ацетата цинка. Реакционный сосуд герметично закрывают и нагревают до $110-120^{\circ}\text{C}$ и выдерживают при этой температуре в течение часа без доступа воздуха, затем охлаждают до комнатной температуры. Получают препарат в виде бесцветного прозрачного раствора.

После стерилизации препарат проверяют на токсичность и иммуностимулирующую активность.

Острую токсичность тимодина проверяют на белых мышках, 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 мышках и кроликах. Препарат при внутримышечном введении в дозах 25 и 10 мл/кг в течение 10 дней не вызывает у животных признаков отравления.

Иммуностимулирующую активность препарата проверяют по усилению антителообразования при вакцинации крупного рогатого скота ассоциированной гидроокисьюалюминиевой формолвакциной против рота-коронавирусных энтеритов и колибактериоза против каждого вакцинного антигена. Наличие и уровень антител к ротавирусу определяют иммуоферментным анализом, к коронавирусу - реакцией торможения гемагглютинации и к эшерихии коли - реакцией агглютинации. Введение тимодина в дозе 0,03 мл/кг в виде 0,02%-ного водного раствора один раз в сутки в течение 3 дней должно увеличить титр специфических антител к рота-, коронавирусу и эшерихии коли на 47, 44 и 100%, соответственно. Для прототипа (иммуностимулирующего препарата тимодина) эти показатели составляют, соответственно, 47,41 и 100%.

Препарат тимодин применяют в ветеринарной практике в виде 0,02%-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 пневмоэнтеритов 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-защитенной аминокислоты и триэтиламиниевой соли триптофана, деблокирование получаемого защищенного пептида, получение координационного соединения свободного дипептида взаимодействием с эквивалентным количеством соли в течение 1 часа при pH=6,0 и температуре $110-120^{\circ}\text{C}$ без доступа воздуха, отличающийся тем, что в качестве активированного эфира N-защитенной аминокислоты используют пентахлорфениловый эфир карбобензоксизолейцина, а в качестве соли - ацетат цинка.