



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **283**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

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

(12) **Описание изобретения** К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 98000530

(22) 23.10.98

(46) 13.12.2000, Бюл. №4 (20)

(76) Бобиев Гуломкодир Муккамоллович (TJ)

(56) 1. 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.

2. Авт. св-во СССР № 1287532.

3. Khavinson V.Kh., Morozov V.G., Sery S.V., Green L., Sinackevich N.V., Kozheshyakin A.L., Pharmaceutical tryptophen containing dipeptide compositions and of use thereof. PCT/WO/ 94/20063.

4. Бобиев Г.М. Синтез и структурно/функциональное исследование иммуноактивных пептидов ряда тимопоэтина, тимозина и бурсина: Автореф. дис.канд.хим.наук. - Душанбе, 1996. - 24с.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА "ТИМОГАР" И ЕГО СОСТАВ

(57) Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается

получения биологически активных препаратов для регуляции и стимуляции деятельности иммунной системы организма человека и животных. Целью изобретения является создание иммуностимулирующего препарата и разработка оптимального способа его получения. Указанная цель достигается тем, что в качестве препарата используется дипептид изолейцил-триптофан в виде водного раствора с концентрацией дипептида 100 мкг/мл. Дипептид получают методом активированных (пентафторфениловых) эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната и натриевой соли триптофана. Защищенный дипептид очищают обработкой бисульфатом натрия и колоночной хроматографией на силикагеле L-100/160, деблокируют каталитическим гидрированием в присутствии палладиевого катализатора. Свободный дипептид очищают экстракцией н-бутанолом и переосаждением из метанола эфиром, готовят его 0,01%-ный водный раствор.

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

Известен (1) тетрапептид с последовательностью треониллизил-пролил-аргинин, называемый тафцином и обладающий иммуностимулирующей активностью. Известен способ его получения, при котором применяется ступенчатое наращивание пептидной цепи методом активированных (N-оксисулфинимидных) эфиров, где в качестве N-защитной группы используют трет-бутилоксикарбонильную, E-аминогруппы лизина - карбобензоксид- и OH-группы треонина - бензильную группы, а очистку полученного пептида проводят ионообменной хроматографией в пиридиновом растворе.

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

Известен тетрапептид с последовательностью треонил-треонил-лизил-аспарагиновая кислота, обладающий иммуностимулирующим действием (2). Известен способ его получения, заключающийся в ступенчатом наращивании пептидной цепи методом активированных эфиров с использованием для присоединения остатка лизина п-нитрофенилового, треонина - пентахлорфенилового эфиров. В качестве N-защитной группы используется карбобензоксид- группа, E-аминогруппа лизина защищается трет-бутилоксикарбонильной группой, карбоксильные группы аспарагиновой кислоты защищены солеобразованием с гидроксидом натрия.

Недостатком данного пептида является многостадийность синтеза.

Прототипом заявляемого препарата служит композиция триптофансодержащих дипептидов формулы X-триптофан, где X-глутаминовая кислота, глутамин, лейцин и изолейцин в концентрации от 10 до 200 мкг/мл, оказывающая иммуномодулирующее действие (3). Известен (4) способ получения таких пептидов, включающий конденсацию защищенных аминокислот методом активированных (1-гидроксибензотриазоловых) эфиров, деблокирование защищенного дипептида, очистку свободного дипептида с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и лиофилизацию.

Недостатком прототипа, как лекарственного препарата является то, что в его состав входит четыре дипептида, а способа его получения - использование для очистки обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии как метода, требующего специального оборудования.

Целью изобретения является создание иммуностимулирующего препарата и разработка оптимального способа его получения.

Указанная цель достигается тем, что в качестве препарата используется дипептид изолейцил-триптофан в виде водного раствора с концентрацией дипептида 100 мкг/мл. Дипептид получают методом активированных (пентафторфениловых) эфиров, получаемых с помощью дипентафторфенилкарбоната взаимодействием пентафторфенилового эфира карбобензоксидизолейцина и натриевой соли триптофана. Полученный защищенный пептид очищают обработкой бисульфатом натрия и колоночной хроматографией на силикагеле L-100/160, деблокируют каталитическим гидрированием в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле. Свободный дипептид предварительно очищают экстракцией n-бутанолом, окончательно - переосаждением из метанола эфиром, готовят его 0,01%-ный водный раствор.

Применение иммуностимулирующего препарата тимогар позволяет повысить эффективность вакцинации крупного рогатого скота против тейлериоза за счет повышения уровня гуморального иммунного ответа.

Применение предлагаемого способа получения иммуностимулирующего препарата тимогар позволяет:

1. Провести синтез дипептида без выделения из реакционной смеси и дополнительной очистки промежуточных соединений.
2. Исключить использование для очистки свободного дипептида обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Пример

К 2,65 г (1 ммоль) карбобензоксидизолейцина и 1,45 мл (10,5 ммоль) триэтиламина в 20 мл этилацетата добавляют 4,0 г (10,5 ммоль) дипентафторфенилкарбоната и перемешивают при комнатной температуре в течение 30 мин. Этилацетат упаривают, остаток растворяют в 20 мл диметилформамида и к полученному раствору добавляют 2,26 г (10 ммоль) натриевой соли триптофана, перемешивают при комнатной температуре в течение 3 часов. Диметилформамид упаривают, остаток растворяют в смеси 40 мл этилацетата и 40 мл 3%-ного раствора бисульфата натрия, содержащего 1,2 г (10 ммоль) соли, перемешивают 5 мин., водный слой отделяют. Этилацетатный слой промывают 20 мл (3 x 6,5 мл) 0,3%-ного раствора бисульфата натрия (5%-ный избыток соли по пептиду). Этилацетатный раствор пептида сушат безводным сульфатом натрия, этилацетат упаривают. Окончательную очистку защищенного пептида осуществляют колоночной хроматографией на силикагеле L-100/160. Колонку (2,0 x 50 см) элюируют вначале хлороформом, затем смесью этилацетат-бензол (3:2). Собирают фракции по 5 мл. Каждую фракцию на наличие основного продукта

контролируют тонкослойной хроматографией. Фракции, содержащие основной продукт, объединяют, упаривают. Значение хроматографической подвижности (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. Остаток растворяют в 50 мл метанола и гидрируют в течение 4 ч в присутствии 10%-ного палладия на активированном угле. По окончании гидрирования катализатор отфильтровывают. Фильтрат упаривают. Остаток растворяют в смеси н-бутанол-вода, водный слой отделяют, н-бутанол упаривают. Остаток после упаривания растворяют в метаноле и осаждают эфиром. Осадок отфильтровывают, промывают эфиром, сушат под вакуумом. Выход свободного дипептида составляет 82,2%. 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, $[\alpha]_D^{20} = -31,14^\circ$ (С 1, MeOH).

Токсичность тимогара определяют на белых мышах. Пяти белым мышам вводят по 0,5 мл 0,4%-ного водного раствора тимогара (2 мг иммуноактивного пептида). Терапевтическая доза тимогара составляет 1 мл 0,01%-ного раствора на 100 кг живого веса животного. (100 мкг иммуноактивного пептида на 100 кг). Так как средний вес белых мышей составляет 20 г, то терапевтическая доза препарата для одной мыши составляет 0,0002 мл (0,02 мкг). Следовательно однократная терапевтическая доза препарата при определении токсичности увеличена в 100000 раз. За животными

устанавливают клиническое наблюдение в течение 8 дней. Контролем служат животные, не получавшие тимогар. У опытных и контрольных животных не было отмечено отклонений от физиологической нормы.

Иммуностимулирующую активность тимогара (дипептида изолейцил-триптофан) изучают по усилению антителообразования у телят иммунизированных противотейлериезной вакциной. Для этого пять опытных и пять контрольных телят иммунизируют живой противотейлериезной вакциной ВИЭВ в дозе 1 мл (0,1 млн живых клеток) на голову. Через 3-5 дней с начала поствакцинальной реакции на введение вакцины (через 15-17 дней после иммунизации) опытным животным вводили тимогар (дипептид изолейцил-триптофан) в дозе 1 мл 0,01%-ного водного раствора (100 мкг дипептида) на 100 кг живого веса животного. Через 35 дней после вакцинации у опытных и контрольных животных определяют в сыворотке крови наличие и уровень противотейлерийных антител реакцией длительного связывания компонента (РДСК) и иммуноферментным анализом (ИФА).

В сыворотке крови опытных телят титр противотейлерийных антител в РДСК составлял 1:5-1:40 и в ИФА - 1:100-1:1600. В сыворотке крови контрольных животных титр противотейлерийных антител составлял 1:5-1:20 и в ИФА - 1:50-1:800.

Таким образом, тимогар (дипептид изолейцил-триптофан) вызывает двукратное увеличение титра противотейлерийных антител у животных, иммунизированных противотейлериезной вакциной, что свидетельствует о наличии у препарата иммуностимулирующей активности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения иммуностимулирующего препарата, включающий конденсацию активированного эфира N-защищенной аминокислоты и натриевой соли триптофана, деблокирование получаемого защищенного пептида, отличающийся тем, что в качестве активированного эфира N-

защищенной аминокислоты используют пентафторфениловый эфир карбобензоксизолейцина.

2. Состав иммуностимулирующего препарата, полученного способом по п.1, отличающийся тем, что содержит 0,1 мг/мл водного раствора дипептида изолейцилтриптофана.