

(19) **KG** (11) **313** (13) **C2**(51)⁷ **C07K 5/08, 5/10**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики

(21) 970144.1

(22) 01.10.1997

(31) 95102461

(32) 02.03.1995

(33) RU

(86) PCT/RU 96/00046 (28.02.1996)

(46) 01.02.2001, Бюл. №1

(73) Иммунотех Девелопментс Инк. (СА)

(75) Дейгин В.И., Коротков А.М. (RU)

(56) WO 89/06134, кл. A61K 37/02, 1989

(54) **Пептид и способ его получения**

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения биологически активных веществ, обладающих иммуннорегулирующими свойствами, и может найти применение в медицине, ветеринарии, а также в экспериментальной биохимии. Задачей изобретения является создание нового синтетического биологически активного пептида, обладающего иммуннорегулирующим свойством, формулы:

X-Glu-Trp-Y, где X - H или Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминокислотная кислота, ξ - аминокпроновая кислота; Y - Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминокислотная кислота, ξ - аминокпроновая кислота, -ОН, моно- или дизамещеный амид (C₁-C₃). Синтез пептида производится в растворе путем последовательного наращивания цепи с С-конца молекул, используя стратегию максимального блокирования функциональных групп, исходя из алкилового эфира аминокислоты с помощью метода активированных эфиров и метода смешанных ангидридов, используя третбутилоксикарбонидаминокислоты. 2 с.п. ф-лы, 2 табл., 3 пр.

Изобретение относится к медицине, а именно к способам получения биологически активных веществ, обладающих иммуннорегулирующими свойствами, и может найти применение в медицине, ветеринарии, а также в экспериментальной биохимии.

В практической медицине широко известны в качестве регуляторов иммунных процессов тимусные экстракты, в частности, тимозин фракция 5 (Goldstein A.L., Guna A., Latz M.M., Hardy H.A., White A.), тималин (СН, №659586). Эти экстракты состоят из

комплекса веществ полипептидной природы и получение их из природных источников ограничено сложностью производства, малым выходом активных веществ и значительной вариабельностью их физико-химических характеристик и биологических свойств. Кроме того, из-за присутствия в природных препаратах тимуса балластных компонентов при их использовании у больных иногда возникают побочные явления. Последнее обстоятельство явилось стимулом для создания синтетических пептидов. В настоящее время осуществлен синтез ряда пептидов, обладающих иммунорегуляторными свойствами: PCT WO 089/06134; EP №230052; US №5008246; US №5013723. Каждый из полученных синтетических пептидов с ограниченным комплексом необходимых свойств обладает высокой активностью, низкой токсичностью, отсутствием побочных эффектов, которые определяют их возможное применение в медицине.

Задачей изобретения является создание нового синтетического биологически активного пептида, обладающего иммунорегулирующим свойством, формулы X-Glu-Trp-Y, где X - H или Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминокислотная кислота, ξ - аминокислотная кислота; Y - Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминокислотная кислота, ξ - аминокислотная кислота, -OH, моно- или дизамещенный амид (C_1-C_3).

Задачей изобретения было также создание принципиально нового технологического процесса получения вещества пептидной природы, который позволил бы при минимальном количестве и простоте стадий получать с высоким выходом продукт вышеприведенной формулы.

Сущность нового способа состоит в синтезе пептида в растворе путем последовательного наращивания цепи с С-конца молекул, используя стратегию максимального блокирования функциональных групп, исходя из алкилового эфира аминокислоты с помощью метода активированных эфиров и метода смешанных ангидридов, используя третбутилоксикарбониламинокислоты.

Для ряда соединений нового пептида в таблице 1 приведены значения R_{f1} в системе (хлороформ-метанол - 32 % уксусная кислота = 60:45:20) и R_{f2} в системе (бутанол-пиридин-вода-уксусная кислота = 5:5:4:1).

Таблица 1

Пептид	R_{f1}	R_{f2}
Abu-Glu-Trp-OH	0.40	0.56
Aca-Glu-Trp-OH	0.41	0.57
Ala-Glu-Trp-NH ₂	0.40	0.51
Arg-Glu-Trp-OH	0.26	0.48
D-Ala-Glu-Trp-OH	0.37	0.55
D-Ile-Glu-Trp-D-Phe	0.71	0.77
D-Ile-Glu-Trp-OH	0.39	0.54
D-Leu-Glu-Trp-NH ₂	0.35	0.56
D-Leu-Glu-Trp-OH	0.37	0.57
D-NVal-Glu-Trp-OH	0.38	0.56
D-Phe-Glu-Trp-Ala	0.69	0.76
D-Pro-Glu-Trp-OH	0.58	0.72
D-Trp-Glu-Trp-OH	0.47	0.56
D-Tyr-Glu-Trp-OH	0.45	0.57

Продолжение таблицы 1

D-Val-Glu-Trp-NH ₂	0.43	0.53
Gly-Glu-Trp-Gly	0.44	0.49
Gly-Glu-Trp-OH	0.42	0.56
H-Glu-Trp-Abu	0.49	0.54
H-Glu-Trp-Aca	0.51	0.56
H-Glu-Trp-Arg	0.28	0.40
H-Glu-Trp-D-Ala	0.61	0.70
H-Glu-Trp-D-Ile	0.63	0.71
H-Glu-Trp-D-Leu	0.64	0.72
H-Glu-Trp-D-NVal	0.65	0.69
H-Glu-Trp-D-Pro	0.66	0.69
H-Glu-Trp-D-Trp	0.63	0.66
H-Glu-Trp-D-Tyr	0.61	0.66
H-Glu-Trp-D-Val	0.65	0.71
H-Glu-Trp-Ile	0.64	0.68
H-Glu-Trp-Gly	0.54	0.58
H-Glu-Trp-NH ₂	0.42	0.55
H-Glu-Trp-N ₂ H ₃	0.32	0.41
H-Glu-Trp-Nval	0.67	0.71
H-Glu-Trp-Trp	0.64	0.67
H-Glu-Trp-Tyr	0.62	0.66
H-Glu-Trp-Val	0.66	0.71
His-Glu-Trp-OH	0.31	0.58
Ile-Glu-Trp-Phe	0.71	0.78
Ile-Glu-Trp-OH	0.38	0.54
Ile-Glu-Trp-Phe	0.72	0.78
Ile-Glu-Trp-Pro	0.68	0.81
Leu-Glu-Trp-OH	0.39	0.56
Lys-Glu-Trp-OH	0.30	0.51
Lys-Glu-Trp-Tyr	0.32	0.50
NVal-Glu-Trp-OH	0.37	0.55
Phe-Glu-Trp-NH ₂	0.53	0.62
Pro-Glu-Trp-Leu	0.67	0.75
Pro-Glu-Trp-OH	0.59	0.72
Trp-Glu-Trp-OH	0.48	0.59
Tyr-Glu-Trp-OH	0.46	0.58
Val-Glu-Trp-Ala	0.61	0.71
Val-Glu-Trp-NH ₂	0.38	0.52
Val-Glu-Trp-OH	0.36	0.51
Val-Glu-Trp-Tyr	0.59	0.61

Пептид изобретенной формулы, полученный в результате описанного способа, представляет собой белый порошок, который растворим в воде, малорастворим в спирте и практически нерастворим в хлороформе.

Изобретение иллюстрируется примером, в котором описан способ получения пептида формулы H-Ile-Glu-Trp-OH.

1. Получение Вос-Ile-OPFP.

Смесь 46.0 г (0.2 моля) Вос-Ile-OH и 40.5 г (0.22 моля) пентафторфенола в 100 мл этилацетата, охлаждали до -5 °С и добавляли 45.3 г (0.22 моля) NN-дициклогексилкарбоди-имида. Реакционную смесь перемешивали 3 ч при комнатной

температуре, дициклогексилмочевину отфильтровывали, растворители упаривали в вакууме, остаток кристаллизовали в смеси этилацетат-гексан. Выпавший осадок отфильтровывали. Выход: 71.3 г (90 %).

2. Получение Вос-Ile-Glu-Trp-OH

19.8 г (0.05 моль) Вос-Ile-OPFP растворяли в 100 мл диметилформамида и при перемешивании добавляли раствор 20 г (0.06 моль) Glu-Trp и 5.0 г (0.06 моль) NaHCO₃ в воде. Раствор перемешивали в течение 20 ч при комнатной температуре, затем упаривали растворители в вакууме. К остатку добавляли 200 мл этилацетата и 200 мл 2 % раствора серной кислоты, перемешивали. Органический слой промывали раствором серной кислоты (2 x 100 мл), насыщенным раствором NaCl до pH = 7, сушили над безводным сульфатом натрия, растворитель отгоняли в вакууме. Остаток кристаллизовали в системе этилацетат-гексан, осадок отфильтровывали и сушили в вакууме. Выход 20.5 г (75 %).

3. Получение H-Ile-Glu-Trp-OH

20.5 г Вос-Ile-Glu-Trp-OH растворяли в 150 мл муравьиной кислоты, перемешивали 3.5 ч при t = 45° и растворитель упаривали в вакууме. К остатку добавляли 200 мл воды и упаривали в вакууме еще раз. Остаток заливали смесью 300 мл изопропанола, 200 мл эфира и выдерживали 10 ч. Осадок фильтровали и сушили в вакууме. Выход: 15.3 г (75 %).

Очистку пептида проводили с помощью обращенно-фазной хроматографии в системе ацетонитрил - 0.1 % раствор трифторуксусной кислоты. Выход 13 г (85 %).

В результате изучения физико-химических свойств пептида были получены следующие его характеристики:

Первичная структура - H-Ile-Glu-Trp-OH.

Брутто формула - C₂₄-H₃₀-H₄-O₄.

Молекулярный вес - 446.5 Da.

Внешний вид - белый с желтоватым оттенком или серый порошок.

Растворимость - растворим в воде, практически нерастворим в хлороформе.

УФ-спектр в области 250-300 нм имеет максимум 280±2 нм, плечо 287±2 нм.

Биологическая активность нового пептида изучалась на морских свинках с помощью общепринятого теста Е-розеткообразования. В таблице 2 приведены сравнительные данные воздействия препаратов тимуса и изобретенного пептида на процесс Е-розеткообразования лимфоцитов морских свинок после обработки их трипсином.

Таблица 2

Количество Е-РОК (%)

Препарат	Фон, интактные животные	После обработки трипсином	После обработки трипсином и препаратом в концентрации мг/мл*						
			10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
тималин	66.5	36.1	57.0	40.1	37.0	35.3	37.4	36.5	34.7
тимозин фракция 5	66.5	36.1	60.3	35.4	33.4	39.5	39.1	33.7	35.8
Ile-Glu-Trp	66.5	36.1	61.4	63.9	64.8	60.2	37.5	40.0	34.3

* Каждая концентрация исследовалась на пяти животных. Достоверным считается увеличение Е-РОК по сравнению с контролем на 50 %, т.е. до 55 % и выше.

Установлено, что in vitro изобретенный пептид активнее известных препаратов в 10³ раза.

С целью изучения безопасности пептида проводили изучение его острой токсичности в соответствии с Методическими рекомендациями Фармакологического комитета РФ "Требования к доклиническому изучению общетоксичного действия новых фармакологических веществ". - М., 1985.

Результаты исследований показали, что при внутривенном введении 1000-кратной дозы пептид не оказывал острого токсического действия и при этих дозах оказалось невозможным достигнуть их LD₅₀.

Пептид, обладающий биологической активностью может найти широкое применение в медицине и ветеринарии.

Формула изобретения

1. Пептид формулы 1



где X выбирают из группы, включающей H, Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота, и Y является Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота, OH, моно- или дизамещенный амид(C₁-C₃).

2. Способ получения пептида формулы 1



где X выбирают из группы, включающей H, Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота и Y является Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота, OH, моно- или дизамещенный амид(C₁-C₃), отличающийся тем, что вводят во взаимодействие в растворе алкиловый эфир аминокислоты с третбутилоксикарбониламинокислотой, затем последовательно наращивают пептидную цепь методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов, последовательно присоединяют третбутилоксикарбониламинокислоту с предварительным отщеплением на каждой стадии третбутилоксикарбонильной группы путем обработки реакционной смеси муравьиной кислотой и, с последующей очисткой промежуточных продуктов кристаллизацией, получают продукт формулы X-Glu-Trp-Y, который очищают обращенно-фазной хроматографией.

Составитель описания

Усубакунова З.К.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел. (312) 68 08 19, 68 16 41, факс (312) 68 17 03