



(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. (CA)

(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 иммунорегулирующими свойствами, и может найти применение в медицине, ветеринарии, а также в экспериментальной биохимии. 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, Tug, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминомаслянная кислота, ξ - аминокапроновая кислота; Y - Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tug, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ - аминомаслянная кислота, ξ - аминокапроновая кислота, -OH, моно- или дизамещенный амид (C₁-C₃). Синтез пептида производится в растворе путем последовательного наращивания цепи с C-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 иммунорегулирующими 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 (CH, №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 - аминомаслянная кислота, ξ - аминокапроновая 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 - аминомаслянная кислота, ξ - аминокапроновая 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 C-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 Boc-Ile-OPFP.

Смесь 46.0 г (0.2 моля) Boc-Ile-OH и 40.5 г (0.22 моля) пентафторфенола в 100 мл этилацетата, охлаждали до -5 °C 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 Boc-Ile-Glu-Trp-OH

19.8 г (0.05 моль) Boc-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 Boc-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 трифтормуксусной 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-N₄-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 мм имеет максимум 280±2 мм, плечо 287±2 мм.

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 внутрибрюшинном введении 1000-кратной дозы пептид не оказывал острого токсичного 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 третбутилоксикарбониламиноциклотой, затем последовательно наращивают пептидную цепь методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов, последовательно присоединяют третбутилоксикарбониламиноциклоту 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
Ответственный за выпуск

Усубакунова З.К.
Арипов С.К.