(19) **RU** (11) **2 107 692** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 07 K 5/065, A 61 K 38/08**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 95108559/04, 07.06.1995

(46) Дата публикации: 27.03.1998

(56) Ссылки: 1. SU, авторское свидетельство 1737798, кл. A 61 K 38/08, 1995. 2. CH, патент 659586, кл. C 07 K 5/08, 1986. 3. PCT, патент WO 089/06134, кл. A 61K 37/02, 1989. 4. EP, заявка 0230052, кл. C 07 K 7/00, 1987. 5. EP, заявка 0606931, кл. C 07 K 5/02, 1991. 6. US, патент 5021551, кл. A 61 K 37/02, 1991. 7. US, патент 5013723, кл. A 61 K 37/02, 1991.

(71) Заявитель:
Инженерный центр пептидных препаратов "Пептос"

(72) Изобретатель: **Дейгин В.И., Коротков А.М.**

(73) Патентообладатель:
Дейгин Владислав Исакович, Коротков Андрей Марксович

(54) ПЕПТИД И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

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 основу изобретения положена задача создания нового синтетического биологически активного пептида, обладающего иммунорегулирующим свойством, формулы X-A-D-Trp-Y, где A - D-Glu, iD-Glu; 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 - аминомасляная 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 или замещенный амид (C_1 - C_3), а 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. 2 табл.

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

(19) **RU** (11) **2 107 692** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 07 K 5/065, A 61 K 38/08**



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 95108559/04, 07.06.1995

(46) Date of publication: 27.03.1998

(71) Applicant:
Inzhenernyj tsentr peptidnykh preparatov "Peptos"

(72) Inventor: **Dejgin V.I.,**
Korotkov A.M.

(73) Proprietor:
Dejgin Vladislav Isakovich,
Korotkov Andrej Marksovich

(54) PEPTIDE AND METHOD FOR ITS PREPARATION

(57) Abstract:

FIELD: medicine; methods for producing biologically active substances with immunoregulatory action; may be used in medicine, veterinary practice and experimental biochemistry. SUBSTANCE: invention is directed to novel, synthetic, biologically active peptide with immunoregulatory action and having the formula: X-A-D-Trp-Y, where A is D-Glu, iD-Glu; X is H or Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ aminobutyric acid, ξ aminocapric acid; Y is 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 aminobutyric acid, ξ aminocapric acid, OH or substituted (C_1-C_3) amide. Invention is also directed to basically new process for producing substances of peptidic nature. EFFECT: simplified method for producing highly effective peptide with higher yield. 2 tbl

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

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.

Актуальность разработки новых безвредных иммунорегулирующих пептидов, способных остановить прогрессирующий рост таких заболеваний, как злокачественные новообразования, сепсис, хронические и вялотекущие инфекции, развивающиеся на фоне иммунодефицитных состояний, подтверждается большим количеством исследований, проведенных в этой области.

Наиболее распространенным способом выявления новых пептидов является выделение активных пептидных фракций из суммарных тканевых экстрактов, фракционирование и очистка вплоть до выделения индивидуального вещества и его идентификации (SU NN 1600047, 1638849 и 1737798). 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. , Whihe A.), тималин (CH, N 6595 86). Эти экстракты состоят из комплекса веществ полипептидной природы и получение их из природных источников ограничено сложностью производства, малым выходом активным 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 пептидных препаратов. В настоящее время осуществлен синтез ряда пептидов, обладающих иммунорегуляторными свойствами: PCT WO 089/06134, SU N 1541821, SU N 1518956, EP N 230052, EP N 406931, US N 5021551, US N 5013723. Каждый из полученных синтетических пептидов с ограниченным комплексом необходимых свойств обладает высокой активностью, низкой токсичностью, отсутствием побочным эффектов, которые определяют их возможное применение в медицине. В основу изобретения положена задача создания нового синтетического биологически активного пептида, обладающего иммунорегулирующим свойством, формулы:

X-A-D-Trp-Y,

где

A-D-Glu, iD-Glu

X-H или Gly, Ala, Ile, Leu, 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 или замещенный амид (C_1-C_3).

Целью 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, что является определяющим при производстве фармацевтического препарата.

Сущность нового способа состоит в синтезе глутамилсодержащих пептидов в растворе путем раскрытия внутреннего ангидрида трет.-бутилоксикарбонил глутаминовой (D или L) кислоты соответствующим производным D-Trp-Y с последующим хроматографическим разделением α- и γ- изомеров. Дальнейший синтез проводили путем наращивания пептидной цепи с помощью активированнных эфиров третбутилоксикарбониламинокислот.

Пример.

H-D-Glu-D-Trp-OH и H-iD-Glu-D-Trp-OH

1. Получение Boc-D-Glu-OH

14,7 (0,1 моль) H-D-Glu-OH растворяли 200 мм дистилированной воды, одномолярным раствором KOH доводили pH до 10,2 и при интенсивном перемешивании добавляли раствор 33,0 г (0,3 моль) BOC_2O в диоксане. Следили за величиной pH на pH-стате. После окончания реакции смесь помещали в делительную воронку, экстрагировали из щелочной среды 3 х 150 мм этилацетатом, водную фазу медленно подкисляли 0,2% раствором серной кислоты до pH 3,0 и экстрагировали Boc-D-Glu-OH в органическую фазу (3 х 200 мм). Органический слой промывали 3 х 200 мм насыщенным раствором Na_2SO_4 до нейтральной среды, сушили над Na_2SO_4. Упаривали в вакууме до маслообразного состояния. Выход: 16,7 г (68%).

Получение смеси Boc-D-Glu-D-Trp-OH и Boc-iD-Glu-D-Trp-OH

16,7 г (0,068 моль) Boc-D-Glu-OH растворяли в 200 мл диметилформамида, охлаждали до 0° и при перемешивании добавляли раствор 20,6 г (0,1 моль) N, N'-дициклогексилкарбодиимида в 100 мл диметилформамида. Смесь перемешивали 4 часа при 4°C и осталяли 8 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, осадок промывали 2 х 50 мм диметилформамидом, фильтрат упаривали в вакууме до 1/2 объема и добавляли при охлаждении до 4°C и интенсивном перемешивании 24,3 (0,1 моль) H-D-Trp-OK. Раствор оставляли постепенно нагреваться до комнатной температуры. Об окончании реакции судили по ТСХ в системе (хлороформ: этилацетат: метанол 6:3:1) до исчезновения пятна внутреннего ангидрида Boc-D-Glu кислоты. Остатки дициклогексилмочевины отфильтровывали, диметилформ-амид упаривали в вакууме. К маслообразному остатку добавляли 200 мм этилацетата и 200 мл 0,2% раствора серной кислоты. Органический слой отделяли, промывали до нейтральной среды насыщенным раствором Na_2SO_4 сушили над Na_2SO_4, этилацетатный раствор упаривали в вакууме. Полученный маслообразный осадок представлял собой смесь Boc-D-Glu-D-Trp-OH и Boc-iD-Glu-D-Trp-OH. Общий выход масла составил 25,4 г (70%).

3. Получение H-D-Glu-D-Trp-OH и H-iD-Glu-D-Trp-OH

25,4 г (0,048 моль) смеси растворяли в 200 мл муравьиной кислоты, перемешивали при 40°C в течение 1 ч и упаривали в вакууме

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

до маслообразного состояния. Разделение и очистку пептидов проводили с помощью ионообменной хроматографии на колонке с Сефадексом в градиенте 0,01-0,2 М пиридинацентатного буфера. Выход: 5,7 г (35%) H-D-Glu-D-Trp-OH и 5,7 г (35%) H-iD-Glu-D-Trp-OH.

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

Первичная структура: H-D-Glu-D-Trp-OH и H-iD-Glu-D-Trp-OH

Брутто формула: $C_{16}H_{20}N_3O_5$

Молекулярный вес: 334,35

Внешний вид: Белый с желтоватым оттенком или серый порошок.

Растворитель: Легко растворим в воде, умеренно в спирте, практически нерастворим в хлороформе.

У. Ф. - спектр в области 250-300 нм имеет максимум 280 $\pm$ 2 мм, плечо 287 $\pm$ 2 нм.

Для ряда аналогов соединений пептида в табл. 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).

Биологическая активность нового пептида изучалась на мышах линии Balb/c. Клетки селезенки мышей суспендировали в среде RPMI 1640 с 2 мм глутамина и 5% инактивированной фатальной сыворотки и вносили в плоскодонные планшеты в количестве 100 мкл, соответственно, 200.000 клеток на лунку. Исследуемый препарат вносили в начале культивирования. В качестве митогена использовали конканавалин А в конечной концентрации 2 мкг на лунку. Планшеты инкубировали при 37 °С и 5% CO_2 в течение 48 ч. Пролиферацию клеток оценивали по включению 3Н-тимидина, вносимого за 24 ч до окончания культивирования в дозе 5 мкг/мл, с помощью сцинтилляционного с-счетчика и выражали в количестве распадов в минуту (CPM). Полученные результаты суммированы в табл.2.

Установлено, что новый пептид обладает способностью ингибировать пролиферацию селезеночных клеток.

С целью изучения безопасности пептида проводили изучение его острой токсичности. Изучение острой токсичности проводили 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 ЛД50. Таким образом новый биологически активный пептид не является токсичным.

Формула изобретения:

1.Пептид формулы

X - A - D - Trp - Y,

где A - D-Glu, iD-Glu;

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 -аминомасляная 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 -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота, -OH или замещенный C_1-C_3-амид.

2. Способ получения пептида формулы

X - A - D - Trp - Y,

где A - D-Glu, id-Glu;

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 -аминомасляная 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 -аминомасляная кислота, ξ -аминокапроновая кислота, -OH или замещенный C_1 - C_3-амид,

отличающийся тем, что синтез пептида проводят в растворе путем раскрытия внутреннего ангидрида третбутилоксикарбонил D- или LD-глутаминовой кислоты К-солью D-Trp-Y, затем наращивают пептидную цепь методом активированных эфиров и методом смешанных ангидридов с предварительным отщеплением третбутилоксикарбонильной группы путем обработки муравьиной кислотой и хроматографическим разделением α - и γ -изомеров.

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

Таблица 1

Пептид	R_{f1}	R_{f2}
Abu-D-Glu-D-Trp-OH	0.32	0.53
Abu-iD-Glu-D-Trp-OH	0.29	0.49
Aca-D-Glu-D-Trp-OH	0.31	0.52
Aca-iD-Glu-D-Trp-OH	0.28	0.49
Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0.34	0.61
Ala-iD-Glu-D-Trp-OH	0.32	0.55
D-Ala-D-Glu-D-Trp-D-Ala	0.22	0.41
D-Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0.26	0.51
D-Ala-iD-Glu-D-Trp-D-Ala	0.25	0.50
D-Ala-iD-Glu-D-Trp-OH	0.25	0.51
D-Ile-D-Glu-D-Trp-D-Leu	0.35	0.53
D-Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0.36	0.54
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Leu	0.34	0.53
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0.27	0.52
D-Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0.36	0.53
D-Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0.35	0.52
D-NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0.33	0.51
D-NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0.32	0.51
D-Phe-D-Glu-D-Trp-Ala	0.37	0.56
D-Phe-iD-Glu-D-Trp-Ala	0.36	0.55
D-Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0.38	0.58
D-Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0.37	0.58
D-Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0.41	0.59
D-Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0.40	0.59
D-Tyr-D-Glu-D-Trp-D-Tyr	0.39	0.58
D-Tyr-iD-Glu-D-Trp-D-Tyr	0.38	0.58
D-Val-D-Glu-D-Trp-OH	0.34	0.51
D-Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0.33	0.50
Gly-D-Glu-D-Trp-NVal	0.29	0.51
Gly-D-Glu-D-Trp-OH	0.30	0.54
Gly-iD-Glu-D-Trp-NVal	0.32	0.53
Gly-iD-Glu-D-Trp-OH	0.29	0.53
H-D-Glu-D-Trp-Abu	0.33	0.52
H-D-Glu-D-Trp-Aca	0.30	0.53
H-D-Glu-D-Trp-D-Ile	0.35	0.58

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

Продолжение таблицы 1

Пептид	R_{f1}	R_{f2}
H-D-Glu-D-Trp-D-Pro	0.37	0.61
H-D-Glu-D-Trp-Gly	0.29	0.54
H-D-Glu-D-Trp-Ile	0.36	0.58
H-D-Glu-D-Trp-Leu	0.36	0.59
H-D-Glu-D-Trp-Lys	0.28	0.47
H-D-Glu-D-Trp-OH	0.36	0.56
H-D-Glu-D-Trp-Phe	0.39	0.61
H-D-Glu-D-Trp-Pro	0.38	0.59
H-D-Glu-D-Trp-Tyr	0.37	0.58
H-D-Glu-D-Trp-Val	0.38	0.61
H-iD-Glu-D-Trp-Abu	0.34	0.51
H-iD-Glu-D-Trp-Aca	0.33	0.50
H-iD-Glu-D-Trp-D-Ile	0.34	0.55
H-iD-Glu-D-Trp-D-Pro	0.36	0.58
H-iD-Glu-D-Trp-Gly	0.28	0.52
H-iD-Glu-D-Trp-Ile	0.34	0.57
H-iD-Glu-D-Trp-Leu	0.35	0.58
H-iD-Glu-D-Trp-Lys	0.27	0.45
H-iD-Glu-D-Trp-OH	0.30	0.52
H-iD-Glu-D-Trp-Phe	0.38	0.61
H-iD-Glu-D-Trp-Pro	0.37	0.60
H-iD-Glu-D-Trp-Tyr	0.35	0.58
H-iD-Glu-D-Trp-Val	0.36	0.60
Ile-D-Glu-D-Trp-D-Phe	0.42	0.68
Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0.38	0.56
Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Phe	0.40	0.67
Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0.37	0.55
Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0.35	0.62
Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0.27	0.57
NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0.35	0.61
NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0.34	0.60
Phe-D-Glu-D-Trp-OH	0.41	0.63
Phe-iD-Glu-D-Trp-OH	0.40	0.62
Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0.43	0.63
Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0.42	0.62
Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0.45	0.68
Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0.44	0.67
Tyr-D-Glu-D-Trp-OH	0.42	0.64
Tyr-iD-Glu-D-Trp-OH	0.41	0.63
Val-D-Glu-D-Trp-D-Val	0.46	0.68
Val-D-Glu-D-Trp-OH	0.33	0.50
Val-iD-Glu-D-Trp-D-Val	0.44	0.66
Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0.34	0.52

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1

Таблица 2

Пролиферация селезеночных клеток мышей

Препарат	CPMI*			
	Доза препарата (мкг/мл)			
	1	5	10	20
iD-Glu-D-Trp	68594	63428	20043	13222
Cyclosporin A	67649	2698	574	569
Control	61467			

* - среднее из трех определений

RU 2107692 C1

RU 2107692 C1