(19) **RU** (11) **2 111 214** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 07 K 7/06, A 61 K 38/08, 38/10, 38/12**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 94041224/04, 28.05.1993

(30) Приоритет: 30.05.1992 EP 92109145.0

(46) Дата публикации: 20.05.1998

(56) Ссылки: EP, заявка, 0432400, кл. C 07 K 7/06, 1991. Sikiric P.et.al Exp.Clin. Gastroenterol. - 1991, I, N 1, с. 15 - 26. Шредер Э., Любке К. Пептиды. - М.: Мир, 1967, ч. I, с. 116.

(86) Заявка PCT:
EP 93/01352 (28.05.93)

(71) Заявитель:
**Предраг Сикирич[HR],
Мариян Петек[HR],
Свен Зайверт[HR],
Желько Грабаревич[HR],
Иво Роткович[HR]**

(72) Изобретатель: **Предраг Сикирич[HR], Мариян Петек[HR], Свен Зайверт[HR], Желько Грабаревич[HR], Иво Роткович[HR], Марко Дувняк[HR], Бранко Туркович[HR], Степан Мисе[HR], Эрнест Суханек[HR], Борис Мильднер[HR], Иван Удовичич[HR]**

(73) Патентообладатель:
**Предраг Сикирич[HR],
Мариян Петек[HR],
Свен Зайверт[HR],
Желько Грабаревич[HR],
Иво Роткович[HR]**

(71) Заявитель (прод.):
Марко Дувняк[HR], Бранко Туркович[HR], Степан Мисе[HR], Эрнест Суханек[HR], Борис Мильднер[HR], Иван Удовичич[HR]

(73) Патентообладатель (прод.):
Марко Дувняк[HR], Бранко Туркович[HR], Степан Мисе[HR], Эрнест Суханек[HR], Борис Мильднер[HR], Иван Удовичич[HR]

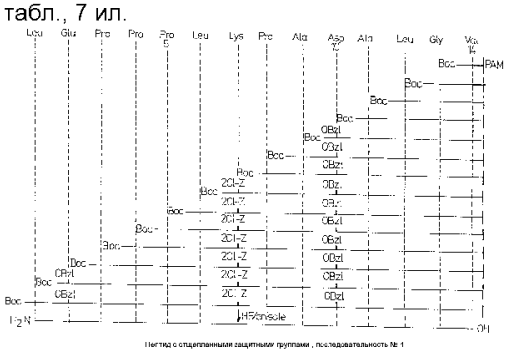
(54) ПЕПТИДЫ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ НА ИХ ОСНОВЕ

(57) Реферат:

Использование: в медицине, как обладающие органозащитной активностью. Сущность изобретения: пептиды, содержащие от 8 до 15 аминокислотных остатков общей формулы I

Xaa - Zaa - $(Pro)_3$ - Xaa - Yaa - Pro - Ala - Asp - Zaa - Ala - $(Xaa)_3$

где молекула может быть замкнута в цикл амидной связью между первым и последним аминокислотным остатком; Xaa = Ala, β -Ala, Leu, Ile, Gly, Val, Nle, Nva; Yaa = Arg, Lys, Orn, His; Zaa = Aad, Apm, Asp, Glu и по крайней мере один из остатков Xaa или Zaa отсутствует; фармацевтическая композиция для защиты от образования желудочно-кишечных язв различной этиологии, радиационных поражений и мальформаций, защиты при химических ожогах, отеках, травмах, костных переломах, вирусных инфекциях, депрессивных и шоковых состояниях, нарушениях допаминэргической этиологии, содержащая в качестве активного начала один или несколько пептидов формулы I, взятых в эффективном количестве, в смеси с фармацевтически приемлемым твердым или жидким носителем. 2 с. и 12 з.п. ф-лы, 2 табл., 7 ил.



Фиг.1

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

(19) **RU** (11) **2 111 214** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 07 K 7/06, A 61 K 38/08, 38/10, 38/12**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 94041224/04, 28.05.1993

(30) Priority: 30.05.1992 EP 92109145.0

(46) Date of publication: 20.05.1998

(86) PCT application:
EP 93/01352 (28.05.93)

(71) Applicant:
Predrag Sikirich[HR],
Marijan Petek[HR],
Sven Zajvert[HR],
Zhel'ko Grabarevich[HR],
Ivo Rotkvich[HR]

(72) Inventor: Predrag Sikirich[HR], Marijan Petek[HR], Sven Zajvert[HR], Zhel'ko Grabarevich[HR], Ivo Rotkvich[HR], Marko Duvnjak[HR], Branko Turkovich[HR], Stepan Mise[HR], Ehrnest Sukhanek[HR], Boris Mil'dner[HR], Ivan Udovichich[HR]

(73) Proprietor:
Predrag Sikirich[HR],
Marijan Petek[HR],
Sven Zajvert[HR],
Zhel'ko Grabarevich[HR],
Ivo Rotkvich[HR]

(71) Applicant (cont.):
Marko Duvnjak[HR], Branko Turkovich[HR], Stepan Mise[HR], Ehrnest Sukhanek[HR], Boris Mil'dner[HR], Ivan Udovichich[HR]

(73) Proprietor (cont.):
Marko Duvnjak[HR], Branko Turkovich[HR], Stepan Mise[HR], Ehrnest Sukhanek[HR], Boris Mil'dner[HR], Ivan Udovichich[HR]

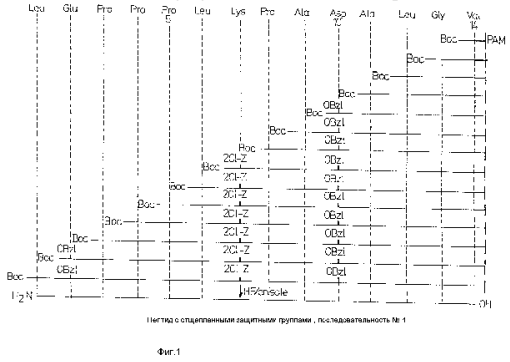
(54) PEPTIDES AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION BASED ON THEREOF

(57) Abstract:

FIELD: chemistry of peptides, medicine. SUBSTANCE: peptides containing from 8 to 15 amino acid residues of the general formula (I):

Xaa-Zaa-$$$-Xaa-Yaa-Pro-Ala-Asp-Zaa-Ala-$$$

where molecule can be fused to cycle by amide bond between the first and the last amino acid residue; Xaa = Ala, $$$-Ala, Leu, Ile, Gly, Val, Nle, Nva; Yaa = Arg, Lys, Orn, His; Zaa = Aad, Apm, Asp, Glu and at least one of residues Xaa or Zaa is absent. Pharmaceutical composition has one or some peptides of the formula (I) taken at effective amount in mixture with pharmaceutically solid or liquid carrier and can be used for prophylaxis of gastroenteric ulcer formation, radiation injure and malformation, protection at chemical burn, edema, trauma, bone fracture, viral infection, depressive and shock states, disorders of dopamine-ergic etiology. Peptides show organ-protective activity and can be used in medicine. EFFECT: enhanced effectiveness of peptides. 14 cl, 7 dwg



Фиг.1

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

Изобретение относится к новым пептидам, обладающим высокой биологической активностью того же типа, которая присуща известному природному соединению BPC, но имеющим более короткие аминокислотные цепи.

Биологически активный белок с органозащитной (organo-protective) активностью, который выделен из организма человека или животного и назван BPC (Body Protecting Compound - соединение, защищающее организм), раскрыт в Европейском патенте 0432400, а также в публикации P. Sikiric et al., Exp. Clin. Gastroenterol. , I, 15 - 26, 1991. Этот белок имеет высокую мол. м. - 40000±5000 Дальтон и только частично установленную структуру. Это соединение имеет очень широкий спектр биологической активности, защищая от язв, защищает печень, оказывает противовирусное и противоотечное действие, обладая общей противовоспалительной активностью, противоопухолевой активностью и другим действием. Их следует применять в терапии перечисленных заболеваний, а также в терапии заболеваний и расстройств нервной системы, нарушений допаминэргической (dopaminergic) этиологии, в хирургии, в стоматологии, для лечения фертильности и в ветеринарии. Но такой широкий спектр активности может быть, вероятно, следствием неопределенной структуры или даже недостаточной чистоты или однородности выделенного соединения BPC.

Мы открыли синтетические пептиды, содержащие в цепи только 8 - 15 аминокислотных остатков, с мол. м. 900 - 1600 Дальтон, которые обладают биологической активностью природного защищающего организм соединения BPC, но с увеличенной селективностью. Наши новые пептиды более экономичны при производстве и менее подвержены действию побочных реакций, поскольку они содержат меньше аминокислотных остатков, чем BPC.

В соответствии с одной из сторон изобретения предлагается класс синтетических пептидов, которые обнаруживают удивительно высокую биологическую активность, особенно в смысле защиты организма. В любом случае эти синтетические соединения с совершенно определенным строением имеют большое преимущество при сравнении с высокомолекулярным белком BPC, строение которого установлено только частично и которое возможно получать по сложному технологическому процессу из непостоянных природных источников.

Конкретнее, это изобретение относится к новому классу биологически высокоактивных пептидов, содержащих 8 - 15 аминокислотных остатков, которые изображаются следующей основной структурной формулой с использованием трехбуквенного кода аминокислот и цифр, стоящих под каждым аминокислотным остатком, обозначающих положение остатка в пептидной цепи:

```
XaaZaaProProProXaaYaaProAlaAspZaaAlaXaaXaaXaa,
 1          5              10              15
```

в которой один или большее число аминокислотных остатков являются замещенными. Заместители в Xaa, Yaa и Zaa, которые могут быть использованы, показаны ниже.

Заместитель - Остаток

Нейтральные алифатические аминокислоты: Ala, bAla, Leu, Ile, Gly, Val, Nle, Nva - Xaa

Основные аминокислоты: Lys, Arg, Orn, His - Yaa

Кислые аминокислоты: Glu, Asp, Aad, Apm - Zaa

Предпочтительными пептидами являются следующие:

Seq. Id. No: 1

```
LeuGluProProProGlyLysProAlaAspAspAlaLeuGlyVal
 1          5              10              15
```

Seq. Id. No: 2

```
GlyGluProProProGlyLysProAlaAspAspAlaGlyLeuVal
 1          5              10              15
```

Seq. Id. No: 3

```
LeuGluProProProLeuLysProAlaAspAspAlaLeuGlyVal
 1          5              10              15
```

В соответствии с еще одной стороной изобретения предлагаются аналогичные пептиды с концевыми амидными или карбоксигруппами у концевых С-атомов, имеющие вышеупомянутую структурную формулу, в которой отсутствуют по крайней мере один и самое большее - семь аминокислотных остатков с 1 по 15, и по крайней мере один из остальных аминокислотных остатков может быть замещен в соответствии с вышеприведенной схемой замещения.

Предпочтительными пептидами являются следующие:

Seq. Id. No: 4

```
LeuGluProProProLeuLysProAlaAspAlaLeuGlyVal
 1          5              10              14
```

Seq. Id. No: 5

```
GlyGluProProProGlyLysProAlaAspAleGlyLeuVal
 1          5              10              14
```

Seq. Id. No: 6

```
GluProProProLeuLysProAla
 1          5        8
```

Seq. Id. No: 7

```
AspProProProIleArgProAlaAsp
 1          5           9
```

Seq. Id. No: 8

```
GluProProProLeuLysProAlaAsp
 1          5           9
```

В соответствии с еще одним вариантом осуществления изобретения пептиды, имеющие описанные выше структурные формулы, в которых может быть пропущен по крайней мере один аминокислотный остаток и по крайней мере один из оставшихся аминокислотных остатков может быть замещен так, как указано выше, переводят в циклическую форму путем образования новой связи CO-NH между первым и последним аминокислотным остатком в молекуле. Предпочтительными пептидами являются следующие:

Seq. Id. No: 9

```
LeuGluProProProLeuLysProAlaAspAlaLeuGlyVal
  2          5              10          13
```

Seq. Id. No: 10

```
GlyGluProProProGlyArgProAlaAsp
  2          5           9
```

Заявители обнаружили, что при

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

применении вышеописанные пептиды показывают биологическую активность, равную или большую, чем активность основного белка BPC.

Проведены фармакологические исследования упомянутых пептидов на различных обычных моделях "in vitro" и "in vivo", и обнаружены фармакологические свойства, перечисленные далее.

Язва желудка, вызванная стрессом от неподвижности. В этих экспериментах используют белых крыс Wistar (самцов) (180 - 200 г). Всех животных фиксируют в положении лежа на спине в течение 48 ч при комнатной температуре. Немедленно после этого животных умерщвляют, и определяют размеры патологических изменений. Проводят обработку пептидами с последовательностями NN 4, 6 и 2 при дозировке 10 мкг или 10 нг на кг веса тела, i.p. или i.g., за 1 ч до причиняющей вред процедуры.

Как при i.g., так и при i.p. введении даже такие маленькие дозы как 10 нг/кг оказывают сильное защитное действие.

Гистаминная модель язвы. В этих экспериментах используют белых крыс Wistar (самок) (180 - 200 г). Вводят подкожно гидрохлорид гистамина (растворенный в дист. воде) при дозировке 400 мг/кг веса тела. Через 24 ч животных умерщвляют. Пептиды с последовательностью N 4 вводят при дозировке 1,0 мкг, 100 нг и 50 нг на кг веса тела, i.p. и i.g. (внутрибрюшинно и внутрижелудочно). Получают сильную и зависящую от дозы защиту. Одинаковая активность обнаружена и при i.p., и при внутрибрюшинном способе введения.

Индуцированный скипидаром щечный отек. Животные: самцы крыс Wistar (180 - 240 г), N = 10 в каждой группе. Скипидар вводят внутримышечно, 0,02 мл на крысу. Контрольный раствор: 0,9% физиологический, внутримышечно (0,02 мл на крысу, 2х). Пептиды с последовательностями NN 2 и 4 применяют при дозах 10 мкг и 10 нг/кг, i.p. и i.g. вводят за 1 ч перед введением скипидара. Щечный отек замеряют через 24 ч после индуцирования отека. Статистический анализ: Mann - Whitney. Исследованные пептиды эффективны при дозе 10 мкг/кг веса тела.

Хирургия: действие на резаные раны кожи. В этих экспериментах используют самцов белых крыс (10 для каждого эксперимента, вес тела 200 - 250 г). Крыс с ранами кожи держат каждую отдельно в отдельных клетках. На коже спины каждого животного под легкой эфирной анестезией размещают параллельно разрезы (3 см) на расстоянии 1,5 см от средней линии спины. Края одной раны затем сближают двумя хирургическими скобками, а другую оставляют необработанной. Сразу же после повреждения между ранами внутридермально вводят пептид с последовательностью N 4, растворенный в физиологическом растворе, при дозах 1,0 мкг и 1,0 нг/кг веса тела или физиологический раствор - в контрольной группе, при дозе 0,5 мл/кг.

Отчетливое заживляющее действие исследуемого пептида было очевидно на тех и других ранах - как на ранах, стянутых скобками, так и на ранах, оставшихся без хирургической обработки. Через 5 дней обработанная группа показывает меньшее число воспалительных клеток и существенно лучше развитые ретикулярные волокна, чем контрольная группа.

Действие на опытные ожоги. В этом эксперименте используют самцов белых крыс, линия Wistar (N = 10, вес тела 200 - 250 г). При легкой эфирной анестезии прижигают слизистую оболочку носа в течение 5 с. За 1 ч до нанесения травмы применяют пептид с последовательностью N 4 при дозе 10 мкг/кг веса тела, i.p. Контрольная группа: 5,0 мл/кг веса тела физиологического раствора, i. p. Проведенная процедура обычно дает значительное вздутие морды и постоянно становится смертельной для животных контрольной группы (но не для животных прошедших лечение) в течение девяти дней после нанесения ран. В противоположность контрольным животным у обработанных наблюдается только очень незначительная припухлость морды. Затем носовое нормальное дыхание оказывается только слегка нарушенным и спокойно восстанавливается.

Действие при лечении переломов. В этих экспериментах используют самцов белых крыс линии Wistar (270 - 300 г - вес тела). Под эфирным наркозом ломают руками левые большеберцовые кости в средней части. Иммобилизацию не проводят, и животным позволяют свободно передвигаться по клеткам. Животных умерщвляют на 5-ый, 8-ой, 12-ый и 30-ый день после нанесения травм.

Пептид с последовательностью N 4 дают при дозировке 10,0 мкг/кг веса тела, i. p. , за 1 ч до нанесения травмы и затем один раз в день (последнее введение - за 24 ч перед умерщвлением). Контрольной группе в то же время вводят эквиобъемное количество физиологического раствора (0,9%, 5,0 мл/кг веса тела, i. p.). Существенное увеличение скорости заживления отмечают у всех обработанных пептидом животных в каждом интервале, в котором проводят исследования. Примечательно, что все обработанные пептидом животные устойчиво показывают более слабую местную посттравматическую гематому, чем контрольные животные, и они восстанавливают свои поврежденные функции значительно быстрее.

Противовирусную активность исследуют на новорожденных - в возрасте 24 ч - мышах линии BALB-C обоего пола.

Используют вирусы ARBO - TBE (= клещевой энцефалит), Bhania денге 1, 2, 3, 4, Sinbis, West - Nile, Calovo, гепатита A, LCM (лимфатический хориоменингит) и герпеса типа I в виде суспензии вируса при разбавлении 10^{-2} (0,02 мл/мышь), полученной так, как обычно принято, и введенной i.c. или p.o. (гепатит A). С учетом различия в вирулентности дозы подбирают таким образом, чтобы можно было проводить сравнение LD_{100} в 0,02 мл инокулята, i.c. (или p. o. , гепатит A), при разбавлении 10^{-2}. В этом случае мы можем сравнивать ход заражения различными вирусами без учета возможной инокуляции вирусами различной концентрации.

Пептид с последовательностью N 4 используют при концентрации 20,0 мкг/мл в 0,9% физиологическом растворе и вводят только в виде одной дозы - 2,0 мкг/кг веса

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

тела - i.c. или i.p.:

a) за 2 ч до применения вируса (-2h),

b) одновременно с инфицированием (0).

Контрольная группа: такой же объем физиологического раствора i.c. или i. p. Результаты сведены в табл. 1.

Числа в табл. 1 указывают период (дни) до того времени, когда погибают мыши, инфицированные всеми вирусами, в группах, обработанных пептидом или физиологическим раствором (контрольные).

Антидепрессионная активность. Для обнаружения антидепрессионной активности проводят испытания forced swimming по Porsolt et al., Eur.J.Pharmacol. , 47, 379-391, 1978.

Для этого эксперимента берут самцов крыс Wistar (вес тела 180-240 г). Исследуемый пептид с последовательностью N 4 дают накануне испытания и в день испытания за один час до эксперимента (i.p.).

Контрольная группа: физиологический раствор, i.p.

Животных наблюдают в течение 5 мин. Измеряют время неподвижности (Ti).

Величина Ti в контрольной группе составляет около 150 с, в группе, обработанной пептидом, - только 60-70 с. Этот эффект является длительным: он еще присутствует через 16 дней.

Доза отклика: 10 мкг - 10 нг/кг: полный эффект; 10 пг/кг: эффект еще присутствует; 1 пг/кг: эффект исчезает.

Действие на модель болезни Паркинсона. Для исследований используют хорошо известные модели болезни Паркинсона (Karakola s. et al., Pharmacol. Toxicol., 67, 95-100, 1990): резерпиновую модель и MPTP-модель.

Используют самцов мышей NMRI-Hannover (для MPTP-модели) или обоих полов (для резерпиновой модели).

MPTP применяют при дозировке ... мг/кг веса тела, i.p., один раз в день в течение шести дней подряд, и затем в течение следующих четырех дней - при более высокой дозе 50 мг/кг. Исследуемый пептид с последовательностью N 4 вводят при дозировке 1,5 мкг и 15,0 нг/кг веса тела i.p., за 15 мин до каждого введения MPTP или через 15 мин после каждого введения MPTP.

Резерпин используют при дозировке 5 мг/кг веса тела, i.p. Испытуемый пептид применяют при дозе 10 мкг или 10 нг/кг веса тела, i.p., за 15 мин до введения резерпина или через 24 ч после введения резерпина, в той же дозе.

Контрольная группа: равный объем физиологического раствора, 5 мл/кг веса тела, i.p.

После предшествующей обработки пептидом наблюдают существенное сокращение гипокинезии, ригидности (каталепсии) и тремора.

В MPTP-модели предварительная обработка пептидом отчетливо уничтожает развитие каталепсии и уменьшает акинезию и появление тремора. Последующая обработка (через 15 мин) существенно предотвращает дальнейшее развитие MPTP-каталепсии и заметно уменьшает акинезию и тремор. Обычно высокая смертность (50%) отмечается после введения только одного MPTP и уменьшается у животных, обработанных пептидом как при предшествующей, так и при последующей обработке.

Действие введения пептида при геморрагическом шоке. Во всех экспериментах используют взрослых самок белых крыс линии Wistar (150-180 г).

Действие при геморрагическом шоке исследуют в двух сериях экспериментов:

a) Животным пускают кровь (1 мл за 3 мин, 2 мин пауза) до тех пор, пока не наступит смерть. Оценивают удаленный объем крови, приводящий к летальному исходу, у животных, обработанных пептидом с последовательностью N 4 (10,0 мкг или 10 нг/кг веса тела, i.p.) или физиологическим раствором (5,0 мл/кг веса тела, i.p.), обработка проводится за 15 мин до начала кровопускания. В группе, обработанной более высокой дозой пептида, постоянно отмечают более высокий объем кровопотери, приводящий к летальному исходу, по сравнению с контрольными величинами.

b). Уменьшают давление крови путем удаления определенного объема крови, и затем поддерживают его на уровне 30-35 мм рт.ст. в течение 5 мин.

Затем вводят пептид с последовательностью N 4 (10,0 мкг или 10,0 нг/кг веса тела) или физиологический раствор (контрольная группа, 3,0 мл/кг веса тела), i. v. В противоположность контрольным животным, у животных, обработанных пептидом, отмечают существенно возросшее и остающееся постоянным давление крови и полное отсутствие смертельных исходов.

Следовательно, оказывается, что исследуемый пептид является высокоэффективным для преодоления последствий потери крови.

Воздействие при смертельном облучении. В экспериментах используют мышей NMRI-Hannover, в возрасте 5-6 недель, обоих полов (вес тела 18-22 г). Синтетический пептид с последовательностью N 4 вводят при дозе 20 мкг/кг веса тела, i.p., за 1 ч до или после облучения. Контрольные животные в то же время получают эквиобъемное количество 0,9% физиологического раствора, i.p. (5,0 мл/кг). Естественно, для контроля за уровнем здоровья здоровых животных держат в обычных условиях, не подвергая их действию лекарства или облучения.

Облучение: Teatron 80 (Co 60, 2200 Ки). Мышей в клетках, не подвергшихся анестезии, 16 мышей в группе, облучают суперлетальной дозой 9 Gy на пространстве 20x20 см, на расстоянии 80 см, облучая все тело.

Смертельные случаи регистрируют дважды в день в течение 30 дней.

Все контрольные животные погибают через 7-12 дней ($LD_{100/12}$).

Смертельные случаи не отмечаются в контрольной группе здоровых животных (не подвергшихся облучению).

В группах, обработанных пептидом через 1 ч после облучения, не наблюдают различий в результатах при сравнении с контрольными. Однако отмечают существенное возрастание случаев выживаемости при введении соединения за 1 ч до облучения. Может быть отмечено 70% увеличение LD_{100} относительно контрольных животных.

Влияние на индуцированную

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

мальформацию. Во всех экспериментах используют самок мышей NMRI-Hannover в возрасте два месяца, весом 25 г, но не подвергавшихся коитусу. Самок мышей в фазе течки спаривают с матерыми здоровыми самцами мышей. Мышей умерщвляют после 20-дневной беременности.

Витамин А при дозе 15700 U/кг веса тела вводят i.m. на 10 день беременности (0,05 мл/кг веса тела). Одновременно вводят пептид с последовательностью N 4 при дозе 10 мкг или 10 нг/кг веса тела, i.p.

Контрольная группа: физиологический раствор, 5,0 мл/кг веса тела, i.p.

Животные, не обработанные витамином А, но получившие в то же время i.p. физиологический раствор или пептид 4 в тех же дозах, служат в качестве контрольных здоровых животных.

Не замечено фальформации у здоровых (физиологический раствор) или обработанных пептидом групп животных.

Результаты, сведенные в табл. 2, показывают удивительно существенный и зависящий от дозы защитный эффект пептида против индуцированных витамином А мальформаций.

Острую токсичность синтетических пептидов определяют на самках мышей (вес $\approx$ 20 г). Для каждого эксперимента и для контроля берут по 6 животных.

Пептиды последовательностей NN 2, 3, 4 и 6 вводят в дозах 8, 25 и 50 мг/кг веса тела, i.v. Контрольную группу обрабатывают физиологическим раствором (0,9%, 5,0 мл/кг веса тела). Животных наблюдают на предмет появления признаков отравления в течение следующих 15 дней.

Для указанных доз не наблюдают признаков отравления или смертельных исходов. Наблюдают интересное явление существенно возросшей подвижности и живости в течение 2 ч после введения пептидов.

Из результатов фармакологического исследования следует, что эти пептиды обладают активностью в смысле защиты организма от воздействия стрессов и заболеваний, и общей нормализации органических функций.

Их применение также должно быть эффективным для профилактики и лечения некоторых заболеваний и расстройств у человека и животных. Конкретнее, эти соединения будут полезны при лечении: расстройств и заболеваний, вызванных стрессом, желудочно-кишечных язв различной этиологии, воспалений и отеков различной этиологии, травм, ожогов, костных переломов и вообще в хирургии, вирусных инфекций, шоковых состояний, болезни Паркинсона, для защиты от поражений излучения, для защиты от мальформаций.

Вообще, описанные пептиды также могут широко использоваться в различных фармацевтических композициях в сочетании с нетоксичным фармацевтическим носителем или разбавителем, таким как наполнитель, нетоксичный буфер или физиологический солевой раствор. Такие фармацевтические композиции могут применяться местно или системно и могут иметь любую подходящую форму, такую как жидкость, твердая композиция или полутвердая, раствор для инъекций, таблетки, мази, лосьоны, капсулы, препараты под язык и т.п.

При общем применении такие пептиды будут, вообще, вводиться в дозах 10^{-5} - 10^{-2} мг на кг веса тела. При местном применении они будут применяться в более высоких концентрациях, например 0,1-0,5%.

Очень удобным является отсутствие каких-либо признаков токсичности до доз 50 мг/кг веса тела, и также хорошая активность соединений при пероральном введении (внутрижелудочном).

Описанные здесь пептиды могут быть синтезированы при использовании постадийной конденсации защищенных аминокислот в гомогенной жидкой системе или предпочтительно при использовании твердофазных способов. Для получения циклических пептидов получают частично защищенные линейные пептиды нужной длины со сложной алкилэфирной группой у концевого С-атома, которую превращают в азидную, а затем осуществляют сочетание и отщепление защитной группы. По другому способу частично защищенный линейный пептид со свободными концевыми группами может быть замкнут в цикл с помощью дифенилфосфорилазида в очень разбавленном растворе.

Изобретение теперь будет описано с помощью примеров, однако не следует считать, что объем изобретения ограничивается ими.

Пример 1. Синтез пептида с использованием БОК-стратегии.

Синтез пептида выполняют, начиная со 100 мг полимера БОК-Val-PAM, из которой получают пептид с карбоксигруппой у концевого С-атома (PAM, закупленный у Applied Biosystems, замещение 0,56 мэк/г, представляет собой производное амино-ацил-4-(оксиметил)-фенилуксусной кислоты и аминополистирола). Аминокислоты с БОК-группами (БОК=трет-бутоксикарбонил-) конденсируют одну за другой на полимерной основе, используя диизопропилкарбодиимид (DIPC) в качестве конденсирующего реагента. На каждой стадии БОК-группу удаляют 50% раствором трифторуксусной кислоты (TFA) в дихлорметане. Аминогруппу затем депротонируют диизопропилэтиламином.

Конверсия на каждой стадии должна превышать 99,5%. Если этого не наблюдается, конденсацию повторяют. После завершения синтеза расщепление выполняют по методике со слабой HF (2 ч при 0°С). В качестве акцептора иона карбония используют анизол. Испаряют HF в токе азота. Затем получают сырой неочищенный пептид, выливая маслянистый остаток в сухой эфир.

Затем сырой пептид очищают ВЖХ с обращенной фазой, используя колонку 5х150 мм, наполненную силикагелем RP-18, при градиентном элюировании системой растворителей - 0,1% TFA в смеси воды с ацетонитрилом. Обнаружение:
УФ-поглощение при 225 нм.

Синтез пептида с последовательностью N 4 схематично изображен на фиг. 1.

Пример 2. Синтез пептида с использованием Fmoc-стратегии.

Для синтеза используют аминокислоты, обычным образом защищенные Fmoc-группой (Fmoc= 9-фторенилметилоксикарбонил-). Функциональные группы боковых цепей

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

защищают через образование сложных О-трет-бутилэфиров (Asp, Apm, Glu, Aad) и БОК-производных (Lys). Первую аминокислоту (Val) связывают с полимерным носителем - BHA-полимером (BHA=бензгидриламино-), используя диизопропилкарбодиимид в качестве реагента сочетания. На каждой стадии защитную Fmoc-группу удаляют пиперидином. Затем таким же способом вводят вторую и все последующие аминокислоты до тех пор, пока синтез не завершится. Расщепление осуществляют смесью TFA с TFMSA и анизолом в соотношении 2:17:52 (по объему).

Пептид затем очищают методом ВЖХ, как описано в примере 1.

Синтез пептида с последовательностью N 2 иллюстрируется фиг. 2.

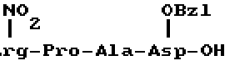
Пример 3. Синтез пептида с использованием Ddz-стратегии.

Все аминокислоты используют в такой форме, когда их α-амино-функциональнаягруппазащищена Ddz-группой(=α,α-диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил-). Боковые функциональные группы защищают Z-группой (=бензилоксикарбонил-) в случае лизина и О-трет-Bu-группой (сложный трет-бутилэфир) в случае аспарагиновой и глутаминовой кислот. Для связывания первой аминокислоты с защитной Ddz-группой через ее цезиевую соль используют носитель Merrifield (гель сшитого хлорметилированного полистирола) с объемной емкостью 1,4 ммоль/г. После конденсации с дициклогексилкарбодиимидом (DCC) защитную Ddz-группу на каждой стадии удаляют 5% TFA в дихлорметане с последующим промыванием и депротонированием 10% триэтиламином в дихлорметане. После депротонирования осуществляют следующую промежуточную стадию сочетания, используя тот же способ. Такие стадии сочетания повторяют до тех пор, пока не будет завершено построение пептидной последовательности.

В заключение пептид отщепляют от полимерного носителя, используя смесь HBr с TFA и анизолом. После испарения летучей части только что отщепленный пептид осаждают из сухого эфира и сушат. Сырой пептид затем очищают методом ВЖХ, как описано в примере 1. Синтез пептида с последовательностью N 6 иллюстрируется фиг. 3.

Пример 4. Синтез циклического пептида.

Предварительно получают пептид в частично защищенной форме



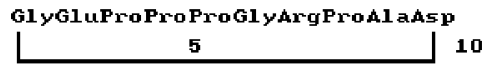
по способу, описанному в примерах 1 или 2.

Реакцию замыкания цикла проводят в 0,0005 молярном растворе этого пептида в диметилформамиде после добавления дифенилфосфорилазида и триэтиламина при 20°С в течение 12 ч.

Затем эту смесь гидрируют водородом, используя в качестве катализатора палладий-на-угле, при 25°С в течение 8 ч.

Растворитель осторожно испаряют, и сырой продукт очищают используя ВЖХ, как описано в примере 1.

Циклический пептид с последовательностью N 10



получают с выходом 10%.

Пример 5. Синтез линейных и циклических пептидов с использованием Ddz-стратегии.

Для получения линейных и циклических пептидов используют одну и ту же стратегию с защитными Ddz-группами. Боковые функциональные группы защищают Z-группой (лизин) и эфирными О-бензилгруппами - OBzl (глутаминовая и аспарагиновая кислоты).

Полимерным носителем является полимер HYCRAM^R (торговая марка ORPEGEN, Heidelberg, Германия), который представляет собой 4-бромкротонил-β-аланиламидометилполистирол. Первую аминокислоту (Ddz-валин) привязывают к носителю через ее цезиевую соль. Затем Ddz-группу удаляют, используя раствор трифторуксусной кислоты (5%) в дихлорметане, и аминогруппу депротонируют диизопропилэтиламином.

На следующей стадии к остатку валина на полимерной матрице присоединяют Ddz-глицин, используя диизопропилкарбодиимид (DIPC), в присутствии 1-гидроксибензотриазола.

Эти стадии повторяют до тех пор, пока не будет завершено формирование цепи. Синтезированный пептид в защищенной форме затем осторожно отщепляют от носителя HYCRAM^R тетракис (трифенилфосфино)-палладием (О), растворенным в безводном тетрагидрофуране в отсутствии кислорода. Добавку, подобную морфолину, используют в качестве акцептора для аллильных групп.

Полимерный носитель отфильтровывают и промывают тетрагидрофураном. Раствор пептида затем фильтруют через короткую колонку с силикагелем, чтобы удалить палладиевый катализатор.

Элюат, который содержит частично защищенный пептид 4а, после испарения растворителя сушат в вакууме.

Синтез линейного пептида с последовательностью N 4.

Частично защищенный пептид 4а растворяют в 2,2,2-трифторэтаноле и гидрируют водородом в присутствии палладия-на-угле (10%) при 30 °С. Катализатор отфильтровывают, и растворитель испаряют в вакууме. Сырой остаток затем очищают, используя метод ВЖХ, как описано в примере 1. После очистки получают пептид с последовательностью N 4. Продукт идентичен соединению, полученному в примере 1.

Синтез циклического пиптида с последовательностью N 9.

Частично защищенный пептид 4а растворяют в смеси диметилформамида и дихлорметана (1:1), чтобы получить 0,001 молярный раствор. Для циклизации добавляют DIPC и HOBt, и оставляют смесь стоять при 20 °С на 10 ч. Затем раствор концентрируют до небольшого объема, разбавляют 2,2,2-трифторэтанолом и очищают, пропуская через колонку, наполненную Sephadex LH-20. Собирают фракции, содержащие частично защищенный

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

циклический пептид 9а, и гидрируют, пропуская пузырьки водорода и энергично встряхивая, в присутствии палладия-на-угле (10%) как катализатора при 30°С в течение 8 ч.

Затем катализатор удаляют фильтрацией, и раствор сушат, испаряя растворитель в вакууме. Сырой пептид дополнительно очищают ВЖХ, используя способ, описанный в примере 1. Полученный чистый циклический пептид идентифицируют как пептид с последовательностью N 9.

Синтез на полимерном носителе HYCRAM R с использованием Ddz-стратегии и циклизация иллюстрируются фиг. 4 и 5. Все синтезированные пептиды проверяют на чистоту методом ВЖХ, используя колонку с силикагелем RP-18 (силанизированный октадецил), которую элюируют с градиентом смесью растворителей, состоящей из воды, ацетонитрила и трифторуксусной кислоты, обычным образом. Во всех случаях чистота превышает 95%.

Пептиды характеризуют аминокислотным анализом (значения совпадают с теоретическими в пределах 10%), анализом последовательности, молекулярным весом, который определяют масс-FAB-спектрометрией, УФ- и ИК-спектрами (фиг. 6 и 7).

На фиг. 6 - УФ-спектры пептидов с последовательностью N 4 и N 6 (вода, с = 1 мг/мл), на фиг. 7 - ИК-спектры пептидов с последовательностью N 4 и N 6 (KBr таблетки).

Хотя подробно описаны только некоторые варианты осуществления изобретения, специалистам будет ясно, что многие другие конкретные варианты могут быть осуществлены на практике, и могут быть сделаны многие изменения, все отвечающие сущности и объему изобретения и формуле изобретения.

Формула изобретения:

1. Пептиды, содержащие 8 - 15 аминокислотных остатков общей формулы I

```
Xaa-Zaa-Pro-Pro-Pro-Xaa-Yaa-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Zaa-Ala-Xaa-Xaa-Xaa,
      10                  15
```

где молекула может быть замкнута в цикл амидной связью между первым и последним аминокислотными остатками;

Xaa = Ala, β-Ala, Leu, Jle, Gly, Val, Nle, Nva;

Yaa = Arg, Lys, Orn, His;

Zaa = Aad, Apm, Asp, Glu

и в которой может отсутствовать по крайней мере один из остатков Xaa или Zaa.

2. Пептиды по п. 1 формулы I, где по меньшей мере 1 и самое большее 7 аминокислотных остатков с 1-го по 15-й отсутствуют.

3. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Leu-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Asp-Ala-Leu-Gly-Val.
      10                  15
```

4. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val.
      10                  15
```

5. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Leu-Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Asp-Ala-Gly-Leu-Val.
      10                  15
```

6. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Leu-Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Ala-Leu-Gly-Val.
      10              14
```

7. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Lys-Pro-
 1               5
-Ala-Asp-Ala-Gly-Leu-Val.
      10              14
```

8. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-Ala-Asp.
 1              5                  9
```

9. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-Ala.
 1              5              8
```

10. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-Ala-Asp.
 1              5                  9
```

11. Пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Asp-Pro-Pro-Pro-Jle-Arg-Pro-Ala-Asp.
 1              5                  9
```

12. Циклический пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Leu-Glu-Pro-Pro-Pro-Leu-Lys-Pro-Ala-Asp-Ala-Leu-Gly-Val.
  |_2          5                 10                  _|
```

13. Циклический пептид по п.1, представляющий собой последовательность формулы

```
Gly-Glu-Pro-Pro-Pro-Gly-Arg-Pro-Asp.
  |_2          5                  _|
```

14. Фармацевтическая композиция для защиты от образования желудочно-кишечных язв различной этиологии, радиационных поражений и мальформаций, защиты при химических ожогах, отеках, травмах, костных переломах, вирусных инфекциях, депрессивных и шоковых состояниях, нарушениях допаминэргической этиологии, содержащая в качестве активного начала один или несколько пептидов по любому из пп.1 - 12, взятых в эффективном количестве, в смеси с фармацевтически приемлемым твердым или жидким носителем.

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

Таблица 1

Вирусная инфекция		Обработка							
		Физ. раствор				Синтетический фрагмент			
		-2h[x]		O[x]		-2h[x]		O[x]	
		i.p.	i.c.	i.p.	i.c.	i.p.	i.c.	i.p.	i.c.
TBE	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Bhania	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Dengue 1	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Dengue 2	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Dengue 3	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Dengue 4	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Sinbis	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
WestNile	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Calovo	a	5	5	5	5	n.d.	n.d.	15	15
Hepatitis	A+	5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
LCM		5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
Herpes typel		5	5	5	5	n.d.	n.d.	20	20
None (Healthy)		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - не определяется; животных наблюдают в течение 40 дней после применения вируса; смертельные случаи не отмечаются;
a - ARBO-вирусы;
+ - пероральное введение вируса;
[x] - животным вводят пептид за 2 ч до введения вируса (-2h) или одновременно с введением вируса (O)
$O_{v.s.}$ физиологический раствор P<0,001; 8 мышей в каждой группе.

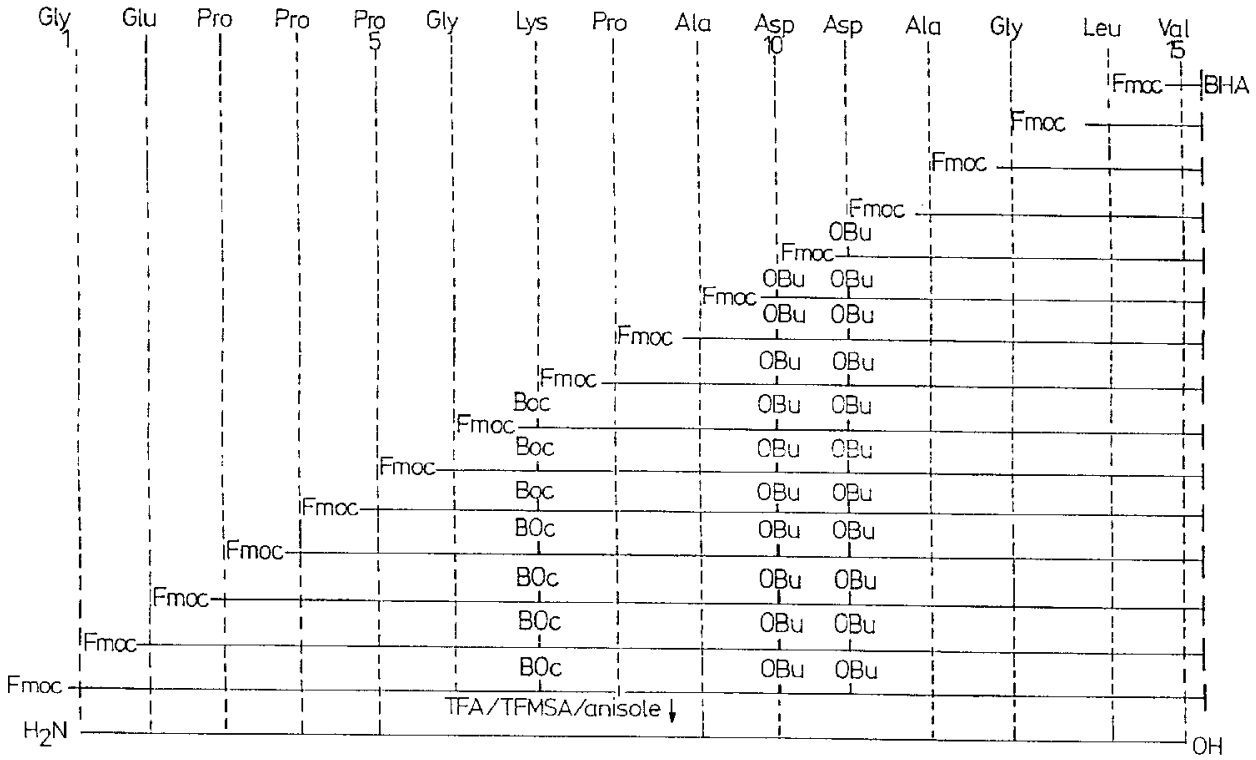
Таблица 2

Микроскопическое исследование

Обработка	Общее число зародышей	Число мальформированных зародышей
Контрольная группа /физиологический раствор/	55	0
Витамин А	54	36
Витамин А + пептид 4 10 нг/кг	36	13
Витамин А + пептид 4 10 мкг/кг	18	1

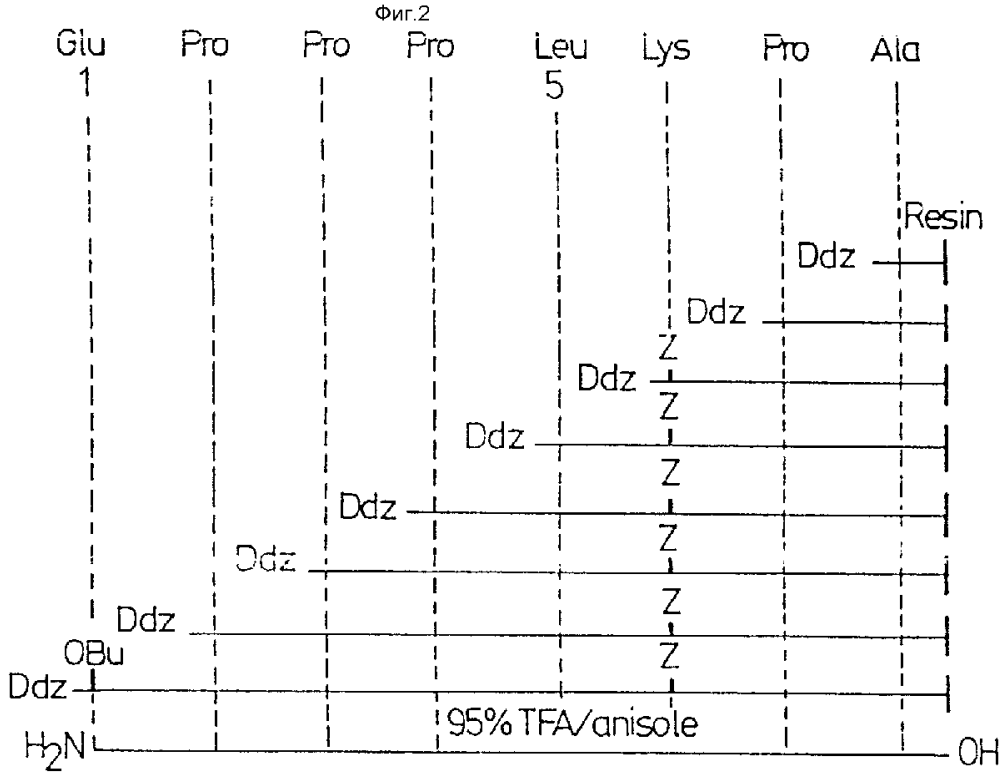
RU 2111214 C1

RU 2111214 C1



Пептид с последовательностью № 2 с отщепленными защитными группами

Фиг.2

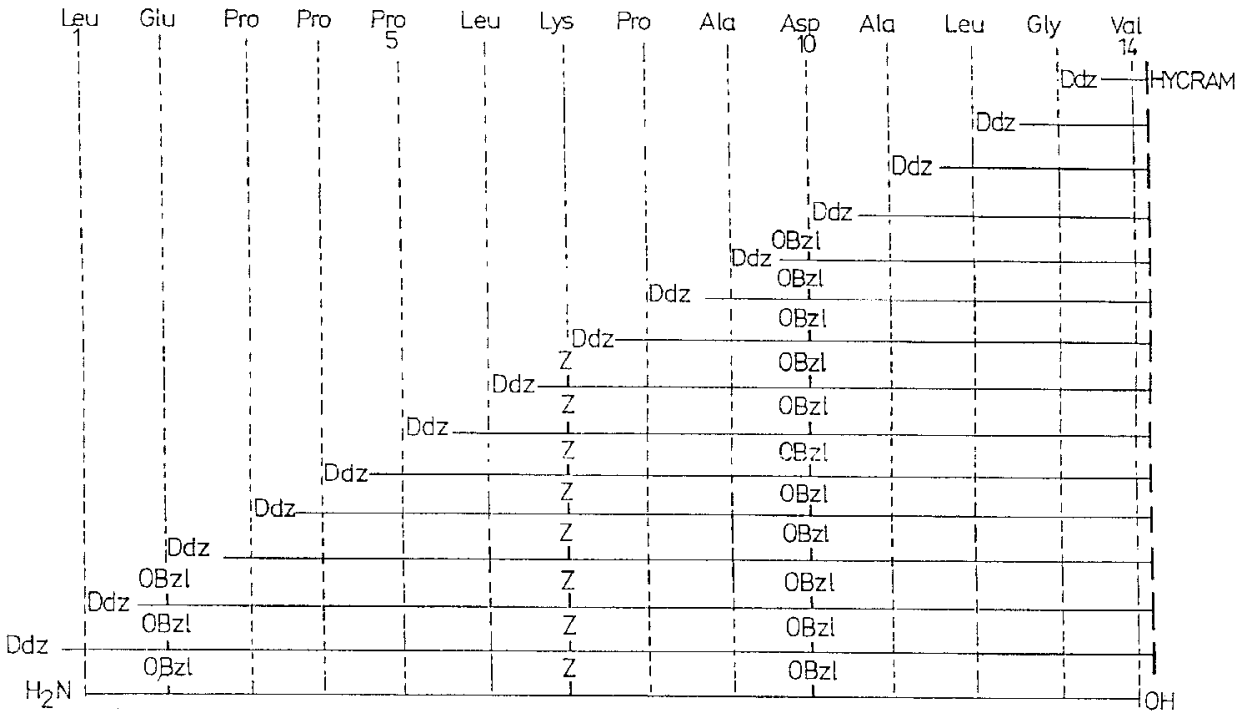


Пептид с последовательностью № 2 с отщепленными защитными группами

Фиг.3

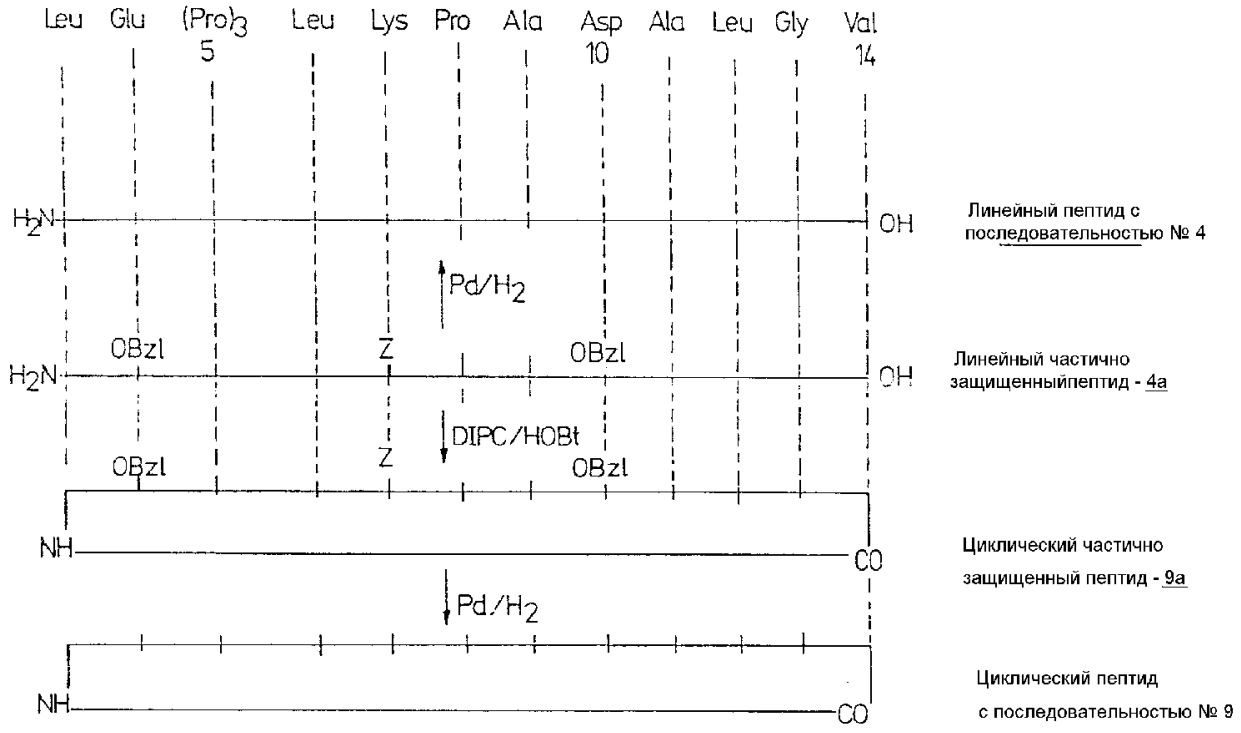
RU 2111214 C1

RU 2111214 C1



Частично защищенный пептид с последовательностью № 4а

Фиг.4



Линейный пептид с последовательностью № 4

Линейный частично защищенныйпептид - 4а

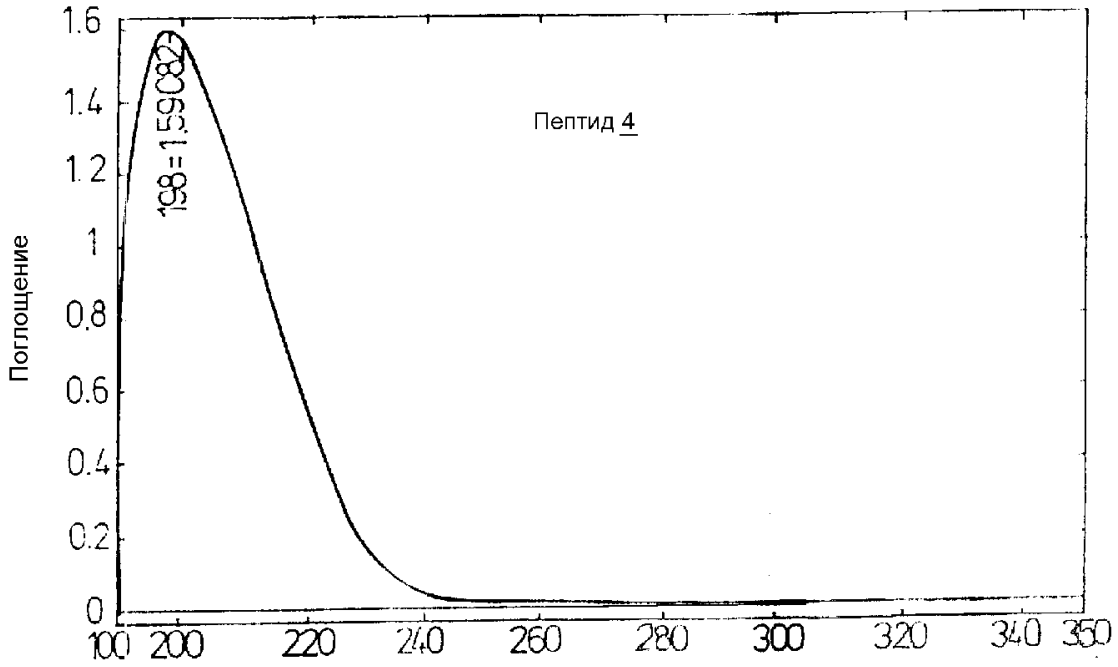
Циклический частично защищенный пептид - 9а

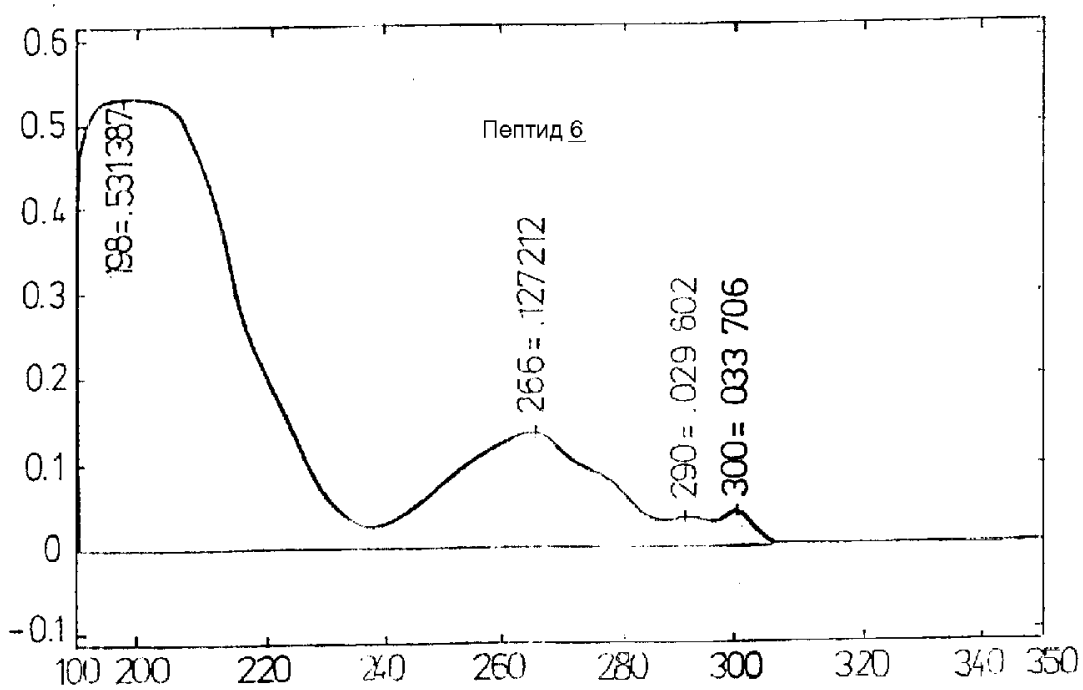
Циклический пептид с последовательностью № 9

Фиг.5

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1

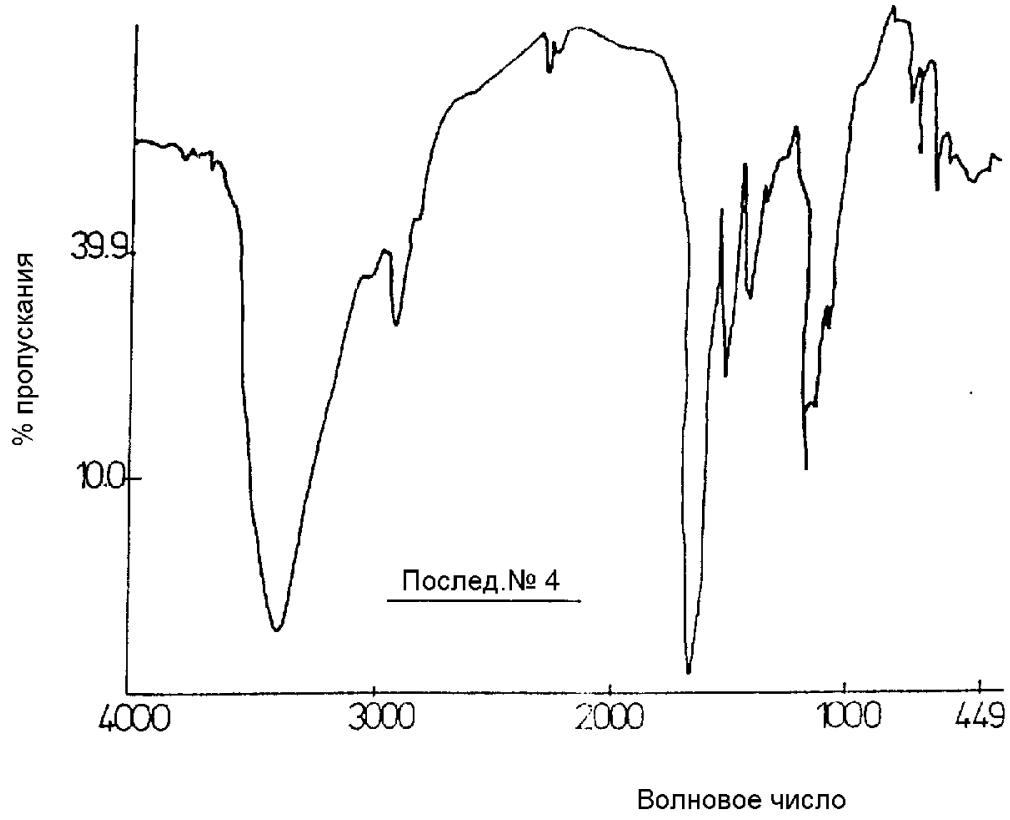


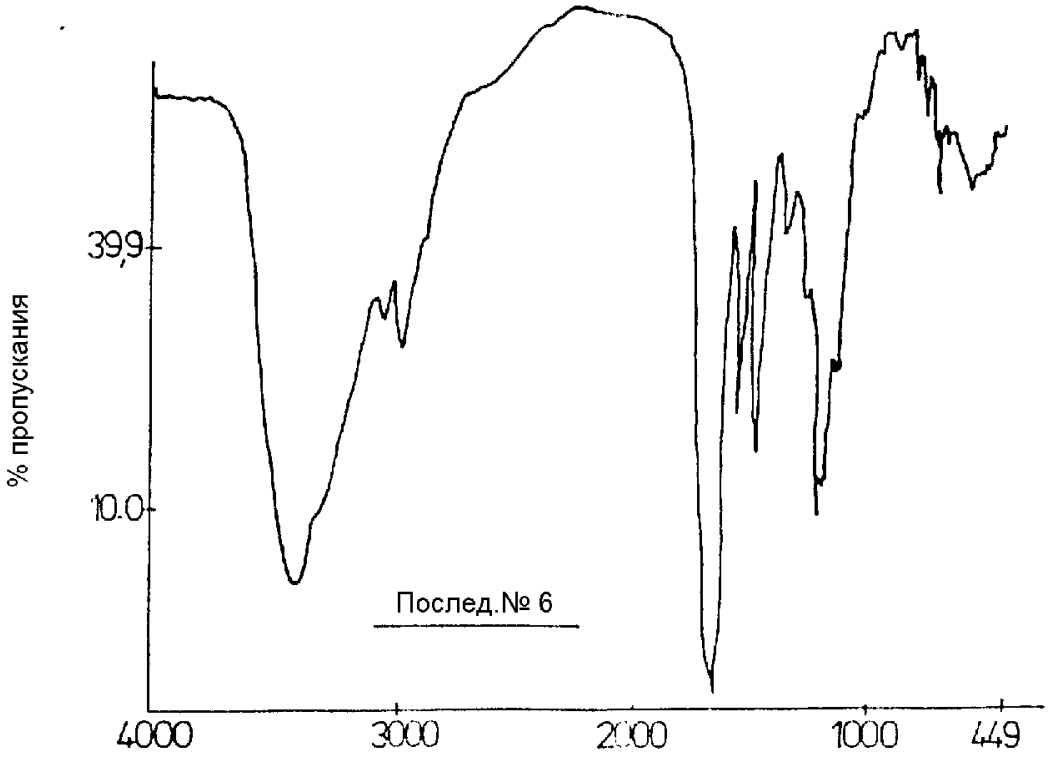


Фиг.6

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1





Фиг.7

RU 2111214 C1

RU 2111214 C1