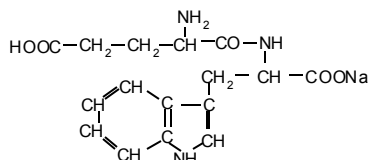


Винахід відноситься до нових хімічних речовин, що стосуються області біоорганічної хімії, а саме до сполуки, яка має формулу:



і проявляє імуностимулюючу дію, та способу її одержання.

Винахід може бути використаний у фармацевтичній промисловості для одержання лікувального препарату імуностимулюючої дії.

На цей час відомі імуностимулюючі препарати, які впливають на реакції клітинного гуморального імунітету і неспецифічну резистентність організму. Зокрема, відомий препарат "Тималін" (Машковский М.Ф. Лікарські засоби. - М.: Медицина, 1993. - Ч. 2. - С. 193), що являє собою імуноактивний пептид, який виділений з природного препарату тимуса методом рідинної хроматографії високого тиску.

Проте, згаданий препарат не має достатніх фармакологічних властивостей, а спосіб його одержання в потрібній мірі не задовольняє простоти і відносно низької вартості.

Найбільш близьким до об'єкту, за призначенням і структурними особливостями, є препарат "тимоген" - L-глутамілтриптофон (Тринус Ф.П. Фармакотерапевтичний довідник. – К.: Здоров'я. 1998. – С. 179).

Недоліком тимогену є його обмежена розчинність у воді та фізіологічному розчині, про що зазначено, наприклад, у ("Аналітичному паспорті на тимоген". Всесоюзний центр пептадних препаратів "Пептос", 1996).

Внаслідок обмеженої розчинності тимогену в ампулах лікарської форми для ін'єкцій (0,01%-ний розчин, ВФС42-1981-90) виникає випадання деякої кількості вільних кристалів, що впливає на засвоюваність препарату в організм та погіршує фармакологічні властивості препарату. Крім того, з цього виникає, що при збереженні ін'єкційної форми пре-парату відбувається знищення його біологічної активності.

Спосіб одержання тимогену характеризується багатостадійністю: одержання бензилового ефіру L-глутамілової кислоти; одержання бензилового ефіру карбобензоксиглутамілової кислоти; синтез дициклогексилкарбодііміду; синтез N-бензилоксікарбоніл-(γ-бензил)-глутаміа-триптофану; видалення N- і C-захисних груп; видалення і очищення глутаміл-триптофану.

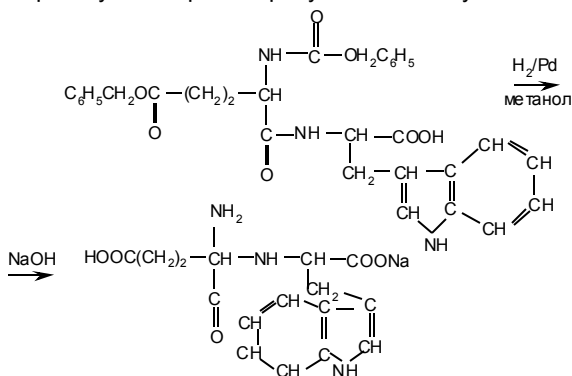
Внаслідок виконання всіх вищезазначених стадій вихід цільового продукту є низьким і складає 50%.

Пропонована сполука, її властивості і спосіб одержання в патентах і науковій літературі не описані.

Задачею цього винаходу є створення імуностимулюючого препарату на основі нової хімічної речовини, природа якої дозволяє покращити його фармакологічні властивості, а технологічні особливості його одержання спрямовані на збільшення виходу цільового продукту.

Задача, що поставлена, вирішується тим, що авторами цього винаходу запропонований спосіб одержання мононатрій глутаміл-триптофану, який полягає в тому, що згідно з винаходом, до N-карбобензокси-(γ -бензил)глутаміл-триптофану додають метанол до повного його розчинення, потім у одержаний розчин вносять, як каталізатор, 3-4% - ний паладій на вугіллі та через реакційну суміш пропускають водень до повного зникнення вихідного продукту, потім додають розчин їдкого натру при мольному співвідношенні N-карбо-бензокси-(γ -бензил)глутаміл-триптофан : каталізатор : їдкий натр, рівному 1:0.01:1, суміш нагрівають до 40-60°C, витримують до повного розчинення осаду, після чого з одержаної суміші відганяють метанол, відділяють каталізатор, а до фільтрату додають ізопропанол і при температурі 0-4°C витримують суміш до повного висадження цільового продукту, який піддають остаточному очищенню.

В основі одержання мононатрій глутаміл-трип-тофану лежать наступні хімічні реакції:



Авторами цього винаходу показано, що повнота реакції, і отже найбільший вихід продукту, будуть мати місце при стехіометричному співвідношенні реагуючих компонентів, а саме N-кар-бобензоксиг(γ-бензил)глутаміл-триптофану і їдкого натру, крім того для цих умов потрібні необхідні кількості каталізатора гїдрування - його мольна кількість співвідноситься з вищезгаданими компонентами, як 1:0.01:1.

Всі інші температурні та часові параметри способу обумовлені вимогами найбільшої розчинності реакційних компонентів і найбільшого виходу цільового продукту.

Крім того, пропоновані умови способу передбачають нейтралізацію тільки однієї карбоксильної групи, яка має більш високу кислотність і визначає повну розчинність сполуки, що необхідно для створення лікарської форми.

Винахід пояснюється прикладом конкретного виконання.

Приклад.

У плоскодонну колбу з високим горлом ємністю 1,5 л завантажують 136 г (0,244 г.моль) N-кар-бобензоксиг- (γ-бензил)глутаміл-триптофану і додають метанол до повного розчинення осаду (~ 800 мг). Потім завантажують суспензію 5 г каталізатору (3-5% паладій на вуглі), 1,19 (0,002 г-ат.) Pd. Колбу наділяють барботером для подавання водню і виходом під витяжку і встановлюють на магнітну мішалку.

При перемішуванні при кімнатній температурі через барботер пропускають струм водню на протязі 15-20 годин. В процесі відновлення випадає слабозрозумний осад вільного глутаміл-триптофану.

Закінчення відновлення визначають відбором проб для тонкошарової хроматографії у системі бутанол-оцтова кислота-вода 4:1:1 на пластинках "Сілуфол".

Гідрування припиняють при повній відсутності вихідної речовини з Rf-0,9 і присутності плями вільного глутаміл-триптофану з Rf-0,52 і глутамінової кислоти з Rf-0,9.

При перемішуванні до колби додають розчин 10 г (0,25 г-мол) їдкого натру в 250 мл води, нагрівають до 40-60°C. При цьому весь осад розчиняється.

Потім переливають реакційну суміш у клуглодонну колбу на 2 л і відганяють ~300 мл метанолу, додають 150 мл води, нагрівають до слабкого кипіння і відфільтровують каталізатор. З фільтрату відганяють ще ~400-450 мл розчинника на роторному випарнику при 40°C. До залишку поступово при перемішуванні додають 1 л ізопропанолу. Роз-чин охолоджують і залишають в холодильнику при температурі -2°C на ніч.

Осад, який випав, відфільтровують, промивають 20-30 мл холодної води, 2-30 мл холодного ізопропанолу. Осад піддають тонкошарової хроматографії в тій же системі. При цьому присутні дві плями: з Rf=0,5 (глутаміл-триптофан) і з Rf=0,2 (глутамінова кислота). Для очистки від глутамінової кислоти осад розчиняють у 300 мл гарячої води, додають 1 л ізопропанолу і залишають у холодильнику (0-2°C) на ніч.

Осад відфільтровують, на фільтрі промивають аналогічно, віджимають і сушать на повітрі. Одержують 70,4 г (74%) мононатрій глутаміл-триптофану. За тонкошаровою хроматографією присутня тільки одна пляма з Rf=0,5. Осад сушать у вакуум-ексикаторі при 30-40°C до постійної маси. Одержаний білий аморфний порошок піддають аналізу. Для доказу складу одержаного продукту був зроблений його якісний і кількісний аналіз.

Знайдено, мас. %: C 54,08; 54,10; H 5,21, 5,23;

N 11,78; 11,90; Na 6,32; 6,28.

Вираховано, мас. %: C 54,05; H 5,10;

N 11,88; Na 6,47.

Згідно з даними, що були одержані, хімічна сполука, відповідає формулі: $C_{16}H_{18}N_3O_5Na$. Молекулярна маса дорівнює 355,57.

Крім того була зроблена ідентифікація одержаної речовини методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) при наступних умовах: елюент А (0,05%-на оцтова кислота у воді), елюент В (ацетонітрил). Готують 15%-ний за об'ємом розчин В в А. Колонка заповнена оберненофазним носієм Separon Sux18, розмір часток 5 мк. Витрати елюенту - 0,4 мл/хв., детектування на довжині хвилі 280 нм. За таких умов час витримання речовини, складає 17,5 хв., що є її індивідуальною характеристикою.

Коефіцієнт молярної екстинції мононатрій глутаміл-триптофану складає $1=5500 \text{ л.моль}^{-1}\text{см}^{-1}$, а його розчинність у воді - 7%.

Для визначення структури даної сполуки, був знятий ультрафіолетовий спектр в зоні від 250 до 300 нм, який має максимум поглинання $(280 \pm 2) \text{ нм}$ і перегин $(286 \pm 2) \text{ нм}$.

Структура мононатрій глутаміл-триптофану підтверджена методом протонного магнітного резонансу (ПМР) в диметилсульфоксиді (ДМСО-Д6).

В одержаних спектрах є наступні хімічні зсуви протонів: NH $\delta=7,94 \text{ м.д.}$; протони груп СН бензольного кільця $\delta=7,52 \text{ м.д. (Д)}$, $\delta=7,27 \text{ м.д. (Д)}$, $\delta=7,0 \text{ м.д. (Т)}$ і $\delta=6,91 \text{ м.д. (Т)}$; протони груп СН індольного кільця $\delta=7,08 \text{ м.д.}$ і $\delta=4,18 \text{ м.д.}$; групи CH_2 $\delta=3,21 \text{ м.д. (Т)}$, $\delta=1,766 \text{ м.д. (Т)}$, групи СН $\delta=2,22 \text{ м.д.}$ Протони групи NH пептидної зшивки $\delta=10,7 \text{ м.д.}$

Таким чином, одержані дані підтвердили будову продукту мононатрій глутаміл-триптофана.

Визначено, що рКа карбоксильної групи триптафанового фрагменту складає 2,5, а карбоксильної групи глутамінового фрагменту - 4, при додаванні 1 молю їдкого натру до 1 молю глутамілтриптофану виникає нейтралізація гідроксила трипто-фана.

Авторами цього винаходу була доведена імуностимулююча дія сполуки.

Методика визначення біологічної активності базується на здатності низькомолекулярних гормонів вилочкової залози: стимулювати активність Т-лімфоцитів і відновлювати кількість лейкоцитів периферичної крові.

Зміну активності Т-лімфоцитів вивчали в розеткоутворенні лімфоцитів з еритроцитами барана (Шляхов Э.Н., Андриеш Л.П. Иммунология. - Кишенев, Штинда, 1985. - С. 278).

З гепаринизованої крові здорового донора виділяли лімфоцити в градієнті густини фікола - 1,078. Клітини відмивали у середовищі 199 та інкубували сполукою, з різними концентраціями з розрахунку 0,1, 1,0, 10, 50 мкг на 1 млн клітин в об'ємі 0,5 мл середовища на протязі 0,5 години, відмивали після інкубації. До клітинного осаду додавали 0,5 мл середовища і 0,2 мл еритроцитів барана (0,01 - млн. клітин/мл), відмитих і розведених середовищем.

Після 60 хв. інкубації в термостаті при 37°C до суспензії додавали глутаровий альдегід і залишали на ніч у холодильнику. Осад обережно наносили на скло, мазок фіксували метанолом і підраховували процент розеткоутворення клітин до загального числа лімфоцитів.

Введення мононатрій глутамід-триптофану в інкубаційне середовище стимулювало розеткоутворення в діапазоні доз 0,1-10,0 мкг. Активність препарату визначають за різницею між контролем (спонтанне розеткоутворення без додавання препарату) і його додаванням в різних концентраціях.

За таких умов введення тимогену в інкубаційне середовище стимулювало розеткоутворювальну функцію лімфоцитів (23,6% в контролі, 25,6, 44,5, 54,6, 62,5% при додаванні, відповідно, 0,1, 1,0, 10, 50 мкг препарату на 1 млн клітин).

Таким чином, введення тимогену в інкубаційне середовище стимулює F-розеткоутворення ~ на 25% в порівнянні з контролем.

Сполуку, застосовують у дорослих і дітей як імуномодулятор при станах і захворюваннях, які супроводжуються пригніченням імунітету.

Порошок мононатрій глутамід-триптофану розчиняють в ізотонічному розчині хлориду натрію і випускають у вигляді стерильного розчину в ампулах і тюрбик - капельницах по 1 мл (з вмістом препарату по 100 мкг в ампулі або тюрбик – крапель-ниці).

Застосовують внутрішньом'язово або інтронозально в наступних дозах: для дорослих по 50-100 мкг (300-1000 мкг на курс лікування).

Термін лікування 3-10 днів в залежності від вираженості імунодефіциту.

3 профілактичною метою його застосовують також внутрішньом'язово і інтронозально щоденно: дорослим по 50-100 мкг, дітям по 10-50 мкг (2-10 крапель) на протязі 3-5 днів.

Одержано наступні результати.

Скорочуються терміни лікування наступних захворювань: псевдотуберкульоз на 21%; ГРВУ на 46,5%; паранозальні синуси на 55,6%; пухлини щелепно - лицьової області на 20-30%; гострі запалювальні захворювання жіночих статевих органів на 16,5%; кардіохірургічні хворі у післяопераційному періоді на 14-17%.

Сукупність вказаних дій і режимів у сполученні з вибраними авторами реакційними продуктами, що використовуються у даному способі, дозволяє максимально покращити фармакологічні властивості імуностимулюючої речовини, і в першу чергу, збільшити терміни зберігання, при цьому зберегти на необхідному рівні її біологічну активність і збільшити вихід цільового продукту до 74%.