



СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1348343** **A 1**

(51)4 С 07 К 7/06, А 61.К 37/02

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3772995/23-04

(22) 16.07.84

(46) 30.10.87. Бюл. № 40

(71) Всесоюзный кардиологический
научный центр АМН СССР

(72) Е.И. Чазов, В.Н. Смирнов,
В.А. Виноградов, М.И. Титов,
В.П. Пенин, А.К. Гергадзе,
Г.П. Титова, Ж.Д. Беспалова,
Б.Л. Пекелис, Н.К. Пермяков,
С.И. Емельянов и А.А. Джикия

(53) 547.964.4.07(088.8)

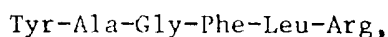
(56) Лаптев В.В. Лечение деструктив-
ного панкреатита 5-фторурацилом.-
Хирургия, 1981, № 1, с. 67-72.

(54) ГЕКСАПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИПАН-
КРЕОНЕКРОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(57) Гексапептид формулы Tyr-Ala-Gly-
-Phe-Leu-Arg, обладающий антипанкре-
онекротической активностью.

(19) **SU** (11) **1348343** **A 1**

Изобретение относится к новому биологически активному соединению - гексапептиду формулы



обладающему антипанкреонекротической активностью, которое может найти применение в медицине.

Цель изобретения - поиск в области химических соединений пептидной природы, проявляющих высокую антипанкреонекротическую активность и не вызывающих побочных реакций.

Карбобензокси-лейцил-аргинин (1).

К раствору 1,74 г (10,00 мМ) аргинина в 25 мл диметилформамида, добавляют 4,25 г (11,00 мМ) п-нитрофенилового эфира карбобензоксиглицина, смесь размешивают при комнатной температуре в течение суток. Диметилформамид упаривают, остаток растворяют в 5 мл метанола и добавляют 300 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре эфиром, сушат в вакуум-эксикаторе.

Получили 4,05 г (96%) продукта с т.пл. 126-130°C; $R_f = 0,46$ (н-бутанол : уксусная кислота : вода 4:1:5) (А); $R_f = 0,63$ (н-бутанол : пиридин : уксусная кислота : вода 10,5 : 6 : 1 : 7,5) (В); $R_f = 0,74$ (н-бутанол : уксусная кислота : вода 3 : 1:1) (В); $[\alpha]_D^{20} = -13^\circ$ (с 1, MeOH).

Карбобензокси-фенилаланил-лейцил-аргинин (2).

Через раствор 4,05 г (9,61 мМ) (1) в 35 мл трифторуксусной кислоты в течение 1 ч пропускают ток сухого бромистого водорода. Растворитель упаривают, к остатку добавляют 150 мл эфира, выпавший осадок отфильтровывают, растворяют в воде и обрабатывают ионообменной смолой Амберлит 1РА-410 (ОН⁻ форма) до отрицательной реакции на ионы брома. Смолу отфильтровывают, промывают на фильтре метанолом, водой, фильтрат упаривают, остаток воды удаляют азеотропной перестанкой с изопропиловым спиртом. Остаток растворяют в 25 мл диметилформамида, к раствору добавляют 4,44 г (10,58 мМ) п-нитрофенилового эфира карбобензокси-фенилаланина. Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение суток. Диметилформамид отгоняют, остаток растворяют в 5 мл метанола и добавляют 300 мл

эфира. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре эфиром, сушат в вакуум-эксикаторе.

5 Получают 4,43 г (81%) продукта с т.пл. 133-136°C; $[\alpha]_D^{20} = -19,3$ (с 1, MeOH); $R_f = 0,71$ (В); $R_f = 0,63$ (В); (этилацетат: пиридин : уксусная к-та : вода 45:20:6:11) (Г).

10 Карбобензокси-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин (3).

Продукт получают аналогично (2).

15 Исходя из 4,43 г (7,79 мМ) (2) и 2,83 г (8,57 мМ) п-нитрофенилового эфира карбобензоксиглицина получают 4,14 г (85%) продукта с т.пл. 140 - 143°C; $[\alpha]_D^{20} = -14,8$ (с 1, MeOH); $R_f = 0,48$ (В); $R_f = 0,50$ (А); $R_f = 0,60$ (В).

20 Карбобензокси-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин (4).

Продукт получают аналогично (2).

25 Исходя из 0,63 г (1,01 мМ) (3) и 0,38 г (1,11 мМ) п-нитрофенилового эфира карбобензокси-D-аланина получают 0,56 г (79%) продукта с т.пл. 147 - 149°C.

30 $[\alpha]_D^{25} = -4,0$ (с 0,5, ДМФА); $R_f = 0,33$ (В); $R_f = 0,67$ (хлороформ : метанол : 32%-ная уксусная к-та 60 : 45:20) (D) $R_f = 0,35$ (Г).

Карбобензокси-о-бензил-тирозил-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин (5).

35 Продукт получают аналогично продукту (2). Исходя из 0,56 г (0,80 мМ) (4) и 0,43 г (0,88 мМ) п-нитрофенилового эфира карбобензокси-о-бензил-тирозина получают 0,64 г (84%) продукта с т.пл. 150-153°C; $[\alpha]_D^{25} = -8,1$ (с 1, ДМФА); $R_f = 0,41$ (В); $R_f = 0,52$ (Г); $R_f = 0,60$ (н-бутанол: пиридин : аммиак конц. : вода 20:12 : 3:15) (Е).

45 Тирозил-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин (6).

50 0,64 г (0,67 мМ) (5) растворяют в 20 мл уксусной кислоты с добавлением анизолы (30% от объема) и гидрируют в присутствии палладиевого катализатора. Катализатор отфильтровывают, промывают на фильтре уксусной кислоты, фильтрат упаривают, остаток пересаждают из метанола (5 мл), эфиром (150 мл), сушат в вакуум-эксикаторе. 55 Полученный продукт наносят на колонку (600x15) с Сефадексом δ РС-25 и фракционируют в градиенте пиридин-ацетатного буфера 0,05 м - 1,00 м.

Получают 0,34 г (65%) продукта с т.пл. 173-176°C; $[\alpha]_D^{25} = -19,1$ (с 0,33, H₂O); R_f = 0,55 (D), R_f = 0,54 (B); R_f = 0,41 (E).

Данные аминокислотного анализа: тирозин 1,18 (1), аланин 1,17 (1), глицил 1,15 (1), фенил-аланил 1,00 (1), лейцил 0,99 (1), аргинин 1,09 (1).

Индивидуальность полученного соединения подтверждена спектром ЯМР, а также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пептид элюировался одним пиком при 42,3% градиента на 14,9 минуте. (колонка 250 x 4,6 мм, Spherisorv BODS, 5 μ; подвижная фаза А: 0,05 М КН₂РO₄; рН 3,0; В: СН₃СN; grad 20 → 50% В за 20 мин; давление 1500 psi, скорость 1 мл/мин, детекция при 214 нм).

Проведены биологические испытания предлагаемого гексапептида.

Биологическая активность предлагаемого соединения была исследована в опытах на собаках на модели экспериментального острого панкреатита, вызванного введением желчи в вирсунгов проток.

Все эксперименты проводили в состоянии животных "натошак", что необходимо для синхронизации экзокринной деятельности поджелудочной железы.

Перед введением инфицированной желчи в вирсунгов проток забирали фоновые пробы крови, мочи и панкреатического сока для специальных энзимологических исследований. После введения желчи в вирсунгов проток эти же биологические пробы забирали ежедневно, до окончания эксперимента.

Для диагностики развивающегося панкреатита и оценки выраженности наступающих деструктивных изменений в экзокринной ткани и энзимной токсимии исследовали активность следующих панкреатических ферментов: α-амилазы по Каравею, липазы по Найтельсону, суммарной эстеразной активности по Траушольду и Верне, антитриптической активности по Пасхиной, трансамидиназы по Карелину.

В контрольной группе экспериментов участвовали три собаки. Им создавали только экспериментальный панкреатит без лечения предлагаемым гексапептидом, острый опыт длился 6-8 ч,

после чего собаки забивались внутрисердечным введением гексенала.

Активность панкреатических ферментов в крови, моче и панкреатическом соке измерялась в процессе развития экспериментального панкреонекроза для диагностики развивающегося заболевания до начала его лечения. После развития панкреонекроза и начала введения препаратов эти измерения проводились только в сыворотке крови, так как при прогрессирующем панкреонекрозе имеет место уменьшение диуреза вплоть до полной анурии, а также резкое уменьшение количества панкреатического сока. Таким образом, сравнительное количественное влияние различных препаратов на ферментативную активность в условиях развившегося панкреонекроза возможно только в крови. Эти данные приведены в табл. 1-3.

Сравнение предлагаемого гексапептида с ближайшими структурными аналогами, такими как глюкагон, соматостатин или карбазаты пептидов, нецелесообразно, так как эти препараты значительно уступают по эффективности фторафуру и не нашли клинического применения при заболеваниях поджелудочной железы.

Как следует из приведенных в табл. 1 - 3 данных, предлагаемый препарат обладает существенными преимуществами перед фторафуrom и контрикалом по влиянию на показатели активности ферментов в сыворотке крови в условиях развившегося панкреонекроза. При введении предлагаемого соединения резко снижается активность липазы, суммарная эстеразная активность крови, отмечается трехкратное повышение антитриптической активности. Это свидетельствует об уменьшении выброса в кровь активных панкреатических ферментов с параллельным нарастанием уровня их ингибиторов. Снижение концентрации в крови фракции "средних молекул" свидетельствует о падении токсемии, снижении интоксикации. При введении фторафура эти показатели практически не изменяются в то время как инфузии контрикала не предотвращают продолжающееся нарастание активности липазы в эстераз, а также уровня средних молекул в крови.

Проведены морфологические исследования экзокринной ткани поджелудочной

железы при экспериментальном геморрагическом панкреонекрозе до введения предлагаемого гексапептида и после его введения.

После введения инфицированной желчи в вирусингов проток очаговый панкреонекроз с выраженным интератрициальным отеком развивается в ближайшие 30 мин.

Через 2 ч развивается диффузный геморрагический панкреонекроз. В основном это внутридольковые поражения поджелудочной железы. Характерным является геморрагическое пропитывание зон некроза, отек и кровоизлияния межацинарных пространств с выраженными нарушениями в системе микроциркуляторного русла - эритроциты, агрегация форменных элементов и микротромбозы капиллярного и венулярного звена.

Макроскопически через 4-6 ч после воспроизведения панкреатита поджелудочная железа животных выглядит диффузно отечной с единичными стеатонекрозами под капсулой и множественными меж- и внутридольковыми кровоизлияниями.

Гистологически рисунок долек нарушается за счет массивных дольковых и мозаичных внутридольковых некрозов.

В зонах некроза наблюдаются массивные меж-, внутриацинарные и мериваскулярные кровоизлияния, рисунок ацинусов полностью нарушается, лишь отдельные контуры их сохраняются за счет цельности базальных мембран. В просветах таких ацинусов можно различать фрагменты некротизованных клеток и единичные лейкоциты.

В пограничных с некрозом зонах существуют выраженные признаки дискомплексации ацинарных клеток (АК), внутриклеточные и клеточные некрозы без отграничения их от жизнеспособных участков цитоплазмы.

В зонах некроза полностью нарушается целостность клеточных мембран, органеллы АК представляются вакуолизированными мембранными структурами, ядра находятся в состоянии пикноза или лизиса с сохранением глыбок конденсированного хроматина среди клеточного детрита.

Морфологические изменения экзокринной ткани поджелудочной железы при экспериментальном геморрагическом панкреонекрозе после лечения

предлагаемым гексапептидом показали, что на ранних сроках лечения гексапептидом изменяется характер панкреонекроза, т.е. отсутствуют все морфологические признаки, характеризующие прогрессирование процесса, отсутствуют и острые сосудистые изменения такие как стазы, микротромбозы. Преобладает коагуляционный паренхимный некроз. Сохраняется кровоток в системе микроциркуляторного русла как в неповрежденной паренхиме, так и в зонах паренхимного некроза, что особенно важно для последующей регенерации и элиминации некротически измененных тканей. Сохраняются признаки нарушения дренажной функции секрета по протоковой системе, отсутствуют четкие признаки снижения секреторной активности неизмененной ацинарной паренхимы. Отсутствуют признаки расширения центроацинарных протоков и переполнения секретом протоков различных калибров. Подобные изменения указывают на сохранение нормальной дренажной функции протоковой системы и выброса секретизируемых ферментов в просвет двенадцатиперстной кишки.

Через сутки после лечения экспериментального панкреатита внутривенным введением гексапептида в поджелудочной железе сохраняется картина смешанного панкреонекроза.

Через сутки после лечения отмечается положительная динамика в морфологии геморрагического панкреонекроза. Отсутствуют признаки меж- и внутридолькового отека, воспаления интератрициции. Лишь в отдельных участках, в зонах единичных стеатонекрозов, имеются выраженный демаркационный воспалительный вал и воспалительная инфильтрация, распространяющаяся на прилежащие междольковые пространства. Имеют место и ареактивные стеатонекрозы.

Отсутствуют изменения в системе макро- и микрогемациркуляторного русла.

Сохраняются признаки мелкоочагового геморрагического панкреонекроза. Особенностью очагов некроза является четкое отграничение их от неповрежденной паренхимы. Отсутствие некротического детрита в мелких очагах поражения или сохранение его в крупномасштабных очагах повреждения с незначительной воспалительной инфильтрацией этих зон. В отдельных очагах

некроза выявляются свежие кровоизлияния.

Гистохимическое исследование поджелудочной железы выявило снижение секреторной активности, отсутствие дистрофических изменений вне поврежденной паренхиме, восстановление выделения секрета в протоковую систему с некоторым нарушением дренажной функции крупных протоков.

При лечении геморрагического панкреонекроза предлагаемым гексапептидом через 7 сут наблюдается полная организация очагов некроза в виде недифференцированных эпителиальных комплексов или с началом ацинарной дифференциации. Отсутствуют признаки меж- и внутридолькового склероза. Через 14 сут после начала лечения наступает полная регенерация ацинарной ткани с компенсаторной гиперфункцией ацинарных клеток без каких-либо признаков повреждения органа и воспаления, наблюдается выраженная тенденция к нормализации амилолитической, липолитической и протеолитической активности поджелудочной железы.

Изучение острой токсичности гексапептида было установлено, что его LD_{50} составляет 150 мг/кг, терапевтическая доза его 0,3 мг/кг, т.е. превышает летальную дозу в 500 раз. Предлагаемый гексапептид не изменяет клеточный состав крови, т.е. не угнетает процессы кроветворения и не вызывает патологических реакций со стороны иммунной системы.

Действие предлагаемого гексапептида сравнивают на той же модели острого панкреатита с действием широко используемых препаратов - фторафура и контрикала менее токсичных соединений (например, LD_{50} для фторафура 750 мг/кг). В то же время терапевтическая доза последнего 5 мг/кг (LD_{50} превышает терапевтическую дозу в 150 раз).

При использовании фторафура на ранних сроках лечения сохраняется большая воспалительная инфильтрация зон некрозаинтерстиция.

При более поздних сроках лечения масштабы некроза экзокринной ткани уменьшаются, но сохраняется массивная воспалительная инфильтрация интерстиция, отмечается появление множественных очагов жирового панкреонекроза с лейкоцитарным валом (процесс идет по типу микроабсцедирования) и развитие начальных явлений склероза интерстиция. Через 7 сут после начала лечения развивается выраженный фиброз поджелудочной железы с разобщением долек на фрагменты. Регенерация поджелудочной железы неполноценная, имеет место развитие недифференцированной эпителиальной ткани.

При лечении экспериментального острого панкреатита контрикалом на ранних сроках лечения наблюдается прогрессирование геморрагического некроза с геморрагической имбибцией интерстиция и зон некроза. Контрикал уменьшает нарушения внутриорганной микрогемолимфоциркуляции, в отдельных опытах снимает сосудистые тромбозы, однако животные погибают через 8-10 ч от начала опыта вследствие прогрессирующего некроза экзокринной паренхимы и энзимной токсемии.

Таким образом, предлагаемый гексапептид при остром панкреатите эффективно угнетает синтез панкреатических ферментов, улучшает внутриорганное крово- и лимфообращение, ограничивает площадь некротических изменений экзокринной паренхимы и при повторных парентеральных введениях приводит к полной регенерации поджелудочной железы без остаточных признаков некроза и воспалительных явлений.

Изменение ферментной активности и кининов в сыворотке крови при экспериментальном геморрагическом панкреонекрозе после внутривенного введения контрикала в дозе 10000 АТрЕ в час (3 собаки)

Показатель	Показатели при развившемся панкреонекрозе	Показатели после введения контрикала, через ч	
		4	6
Активность альфаамилазы, мг/ч мл	152,0±18,2	144,2±16,0	158,0±15,3
Активность липазы, ед.	0,62±0,04	2,04±0,06	2,26±0,81
Суммарная эстеразная активность, мкМ/мл	0,64±0,03	0,72±0,08	0,78±0,09
Антитриптическая активность, ИЕ	22,0±0,2	20,2±0,8	18,0±2,6
Средние молекулы в условных единицах оптической плотности	0,325±0,018	0,444±0,030	0,428±0,052

Т а б л и ц а 2

Изменение ферментной активности и кининов в сыворотке крови при экспериментальном геморрагическом панкреонекрозе после внутривенного введения фторафура в дозе 5 мг/кг (3 собаки)

Показатель	Показатели при развившемся панкреонекрозе	Показатели после введения фторафура, через ч	
		4	6
Активность альфаамилазы, мг/ч мл	158,0±18,2	152,2±24,1	153,3±17,1
Активность липазы, ед.	0,62±0,012	0,48±0,02	0,54±0,08
Суммарная эстеразная активность, мкМ/мл	0,58±0,07	0,56±0,02	0,58±0,04
Антитриптическая активность, ИЕ	22,2±1,4	20,1±1,2	20,1±1,2
Средние молекулы в условных единицах оптической плотности	0,365±0,032	0,402±0,026	0,396±0,073

Изменение ферментной активности и кининов в сыворотке крови при экспериментальном геморрагическом панкреонекрозе после внутривенного введения предлагаемого гексапептида в дозе 0,3 мг/кг (7 собак)

Показатель	Показатели при развившемся панкреонекрозе	Показатели после введения предлагаемого гексапептида, через ч	
		4	6
Активность альфаамилазы мг/ч·мл	178,0±28,2	246,2±26,7	258,2±33,2
Активность липазы, ед	1,15±0,08	0,25±0,02	0,40±0,05
Суммарная эстеразная активность, мкМ/мл	0,76±0,05	0,16±0,08	0,20±0,09
Антитриптическая активность, ИЕ	26,5±1,3	78,0±3,1	72,0±2,5
Средние молекулы в условных единицах оптической плотности	0,432±0,096	0,250±0,032	0,286±0,058

Редактор Н. Киштулинец Составитель И. Волкова
 Техред М. Ходанич Корректор М. Максимышин

Заказ 5163/24 Тираж 347 Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4