



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3772913/23-04

(22) 16.07.84

(46) 07.04.89. Бюл. № 13

(71) Всесоюзный кардиологический
научный центр АМН СССР

(72) Е.И.Чазов, В.Н.Смирнов,
В.А.Виноградов, В.М.Полонский,
В.А.Тищенко, М.И.Титов, Ж.Д.Беспа-
лова и Б.Л.Пекелис

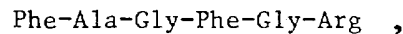
(53) 547.964.407 (088.8)

(56) Патент США 4366148,
кл. С 07 С 103/52, опублик. 1982.

Scott J. Physiological, pharma-
cological and pathological actions
of glucocorticoids on the digestive
system. - Clin. gastroenterol.

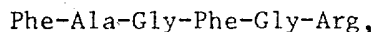
(54) ГЕКСАПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ ГЕПАТО-
ПРОТЕКТИВНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Гексапептид формулы



обладающий гепатопротективным дейст-
вием.

Изобретение относится к новому
биологически активному соединению -
гексапептиду:



обладающему гепатопротективным дейст-
вием, которое может найти применение
в медицине.

Цель изобретения - поиск в области
биологически активных соединений
пептидной природы, обладающих высо-
кой гепатопротективной активностью
и не имеющих побочных свойств.

Синтез предлагаемого гексапептида
проводят следующим образом.

Карбобензоксиглицил-аргинин (I).
К суспензии 1,58 г (9,07 ммоль) аргинина
в 25 мл диметилформамида до-
бавляют 3,30 г (9,98 мм) п-нитрофе-

нилового эфира карбобензоксиглицина.
Смесь размешивают при комнатной тем-
пературе в течение суток. Диметил-
формаимид отгоняют, остаток растворя-
ют в 5 мл метанола и добавляют 300 мл
эфира. Выпавший осадок отфильтровы-
вают, промывают на фильтре эфиром,
сушат в вакуум-эксикаторе.

Выход продукта 3,09 г (93%),
т.пл. 135-135,5°C.

$(\alpha)_D^{25} = +10,3$ (с 1, ДМФА).

$R_1^1 = 0,25$ (н-бутанол:уксусная кис-
лота:вода 3:1:1) - А.

$R_2^2 = 0,54$ (хлороформ:метанол:32%
уксусная кислота 60:45:20) - Б.

$R_3^3 = 0,33$ (этилацетат:пиридин:ук-
сусная кислота:вода 45:20:6:11) - В.

Карбобензоксифенилаланилглицил-
аргинин (II). Через раствор 3,09 г
(8,46 ммоль) продукта (I) 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 IRA-410 (ОН⁻-форма) до отрицательной реакции на ионы брома. Смолу отфильтровывают, промывают на фильтре метанолом, водой, фильтрат упаривают, остатки воды удаляют азеотропной перегонкой с изопропиловым спиртом. Остаток растворяют в 25 мл диметилформамида, к раствору добавляют 3,91 г (9,31 ммоль) п-нитрофенилового эфира карбобензоксифенилаланина. Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре в течение суток. Диметилформамид отгоняют, остаток растворяют в 5 мл метанола и продукт осаждают добавлением 300 мл эфира. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают на фильтре эфиром, сушат в вакуум-эксикаторе.

Выход 3,75 г (86%) продукта, т.пл. 133-134°C.

$(\alpha)_D^{25} = 17,2$ (с 1, ДМФА).

$R_{\frac{1}{2}}^1 = 0,30$ (А), $R_{\frac{1}{2}}^2 = 0,66$ (Б), $R_{\frac{1}{2}}^3 = 0,43$ (В).

Карбобензоксиглицил-фенилаланил-глицил-аргинин (III). Продукт получают аналогично продукту (II), исходя из 2,71 г (5,28 ммоль) (II) и 1,93 г (5,83 ммоль) п-нитрофенилового эфира карбобензоксиглицина.

Выход продукта 2,46 г (82%), т.пл. 142-144°C.

$(\alpha)_D^{25} = -17,3$ (с 1, ДМФА).

$R_{\frac{1}{2}}^1 = 0,57$ (Б), $R_{\frac{1}{2}}^2 = 0,35$ (В), $R_{\frac{1}{2}}^3 = 0,45$ (н-бутанол:муравьиная кислота:вода 15:3:1).

Карбобензоксифенилаланил-глицил-фенилаланил-глицил-аргинин (IV). Продукт получают аналогично продукту (II). Исходя из 2,46 г (4,32 ммоль) продукта (III) и 1,64 г (4,75 ммоль) п-нитрофенилового эфира карбобензоксипаланина получают 2,13 г (77%) продукта (IV), т.пл. 148-149°C.

$(\alpha)_D^{22} = -20,8$ (с 1, ДМФА).

$R_{\frac{1}{2}}^1 = 0,64$ (Б), $R_{\frac{1}{2}}^2 = 0,38$ (В), $R_{\frac{1}{2}}^3 = 0,39$ (н-бутанол:пиридин:аммиак конц.:вода 20:12:3:15) - Г.

Карбобензоксифенилаланил-аланил-глицил-фенилаланил-глицил-аргинин (V). Продукт получают аналогично продукту (II). Исходя из 0,64 г

(0,99 ммоль) продукта (IV) и 0,46 г (1,1 ммоль) п-нитрофенилового эфира карбобензоксифенилаланина, получают 0,63 г (81%) продукта V, т.пл. = 150-153°C.

$(\alpha)_D^{22} = 3,5$ (с 1, MeOH).

$R_{\frac{1}{2}}^1 = 0,42$ (А), $R_{\frac{1}{2}}^2 = 0,70$ (Б), $R_{\frac{1}{2}}^3 = 0,39$ (В).

10 Фенилаланил-аланил-глицил-фенилаланил-глицил-аргинин (VI), 0,63 г (0,80 ммоль) продукта (V) растворяют в 10 мл метанола и гидрируют в присутствии палладиевого катализатора. Катализатор отфильтровывают, промывают на фильтре метанолом, упаривают, остаток пересаждают из 5 мл метанола эфиром (100 мл), сушат в вакуум-эксикаторе. Полученный продукт вносят в колонку (600x15) с Сефадексом SPC-25 и фракционируют в градиенте пиридин-ацетатного буфера 0,05 М - 1,00 М.

25 Выход продукта 0,34 г (65%), т.пл., 154-156°C.

$(\alpha)_D^{25} = +8,4$ (с 0,5, H₂O).

$R_{\frac{1}{2}}^1 = 0,58$ (Б), $R_{\frac{1}{2}}^2 = 0,32$ (Г), $R_{\frac{1}{2}}^3 = 0,44$ (н-бутанол:пиридин:уксусная кислота:вода 10,5:6:1:7,5).

30 Данные аминокислотного анализа: фенилаланин 2,13 (2), аланин 1,00 (1), глицин 1,97 (2), аргинин 0,93 (1).

35 Индивидуальность синтезированного гексапептида подтверждена спектром ЯМР и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пептид элюируют одним пиком при 39,3% градиента на 12,8 минуте. (Колонка 250x4,6 мм, Spherisor BODS, 5μ, подвижная фаза А; 0,05М КН₂РO₄, рН 3,0; В:СН₃СN; grad.20 → 50% В за 20 мин; давление 1500 psi, скорость 1 мм/мин; детекция при 214 мм).

45 Проведены биологические испытания предлагаемого гексапептида.

Изучение гепатопротективного действия гексапептида в сравнении с преднизолоном проведено на 48 мышасамцах линии balb C.

50 Развитие острого гепатита вызывают у мышей, подвергнутых 12 ч голоданию, с помощью D-галактозамина гидрохлорида, который вводят в/б, разведенного в 0,1 мл физиологического раствора концентрации 700 мг/кг. Контрольная группа животных получала в/б 0,1 мл физиологического раствора. Животным, получавшим D-галактоз-

амин, сразу же после его выделения инъецируют предлагаемый гексапептид (100 мкг/кг), преднизолон (5 мг/кг) или физиологический раствор (0,1 мл) п/к. Повторные инъекции исследуемых веществ производят через 6 ч. Каждая из групп состояла из 12 животных. Забой мышей производят методом декапитации, собирают кровь из шейных сосудов и в ее сыворотке определяют концентрации аланиновой трансаминазы (АЛТ) и глютаматдегидрогеназы (ГДГ).

Статистическую обработку полученных результатов проводят с помощью t -критерия Стьюдента. За достоверные принимали различия на уровне значимости 95% (при $P \leq 0,05$). Полученные результаты представлены в табл.1.

Как следует из табл.1, D-галактозамин вызывал достоверное повышение концентраций исследуемых ферментов (АЛТ в 1,5, а ГДГ более чем в 3 раза). Предлагаемый гексапептид практически полностью блокировал повышение концентрации АЛТ и в 2 раза понижал концентрацию ГДГ. При введении преднизолонa отмечена лишь незначительная тенденция к снижению концентраций ферментов.

Предлагаемый гексапептид изучен в экспериментальной модели острого поражения печени у крыс самцов линии Вистар (78 особей), вызываемого с помощью четыреххлористого углерода. Крысам после 12 ч голодания вводят CCl_4 концентрации 1 мл/кг, разведенный в оливковом масле, в/б. После введения CCl_4 крысам инъецируют гексапептид в 4 различных дозах (10, 30, 100 и 300 мкг/кг). Повторно гексапептид вводят через 6, 24 и 30 ч. Контрольная группа животных вместо гексапептида получает физиологический раствор (0,2 мл). Все группы животных состоят из 13 крыс. В крови исследованы концентрации АЛТ и ГДГ.

Полученные результаты представлены в табл.2.

Как следует из табл.2, CCl_4 вызывает достоверное повышение концентрации ГДГ. Повышение АЛТ не является статистически значимым в силу малого количества наблюдений. Гексапептид снижает оба показателя независимо от

дозы. Особенно выражено снижается более специфичный печеночный энзим ГДГ.

5 Предлагаемый гексапептид, кроме того, независимо от дозы блокирует летальность крыс при использовании четыреххлористого углерода.

10 Полученные результаты представлены в табл.3.

15 Как следует из табл.3, если четыреххлористый углерод вызывает гибель 77% (10 из 13) животных, то при введении предлагаемого гексапептида в дозах 100 и 300 мкг/кг летальность вообще отсутствует.

20 Статистическую обработку при поражении печени, вызванном четыреххлористым углеродом, в отношении показателей энзимов проводят с помощью t -критерия Стьюдента, а в отношении летальности - с помощью критерия X^2 Пирсона.

25 Во всех экспериментах с применением предлагаемого гексапептида не отмечалось изменений со стороны клеточного состава крови, основных гемодинамических показателей. При изучении острой токсичности гексапептида LD_{50} составляет 120 мг/кг.

30 Таким образом, в использованных экспериментальных моделях острого поражения печени предлагаемый гексапептид достоверно снижает в крови концентрации ГДГ и АЛТ, повышение которых характерно для патологического процесса, развивающегося в печени. Это свидетельствует о наличии у гексапептида гепатопротективных свойств.

35 Преднизолон, использованный в обычно применяемой в клинике парэнтеральной дозе, не оказывал выраженного влияния на концентрации ферментов. Сопоставление предлагаемого гексапептида с соматостатином показывает, что гексапептид превосходит последний по эффективности - летальность 0% по сравнению с 20% у соматостатина, максимально эффективная доза в 15 раз меньше (100 мкг/кг - для гексапептида, 1,5 мг/кг - для соматостатина).

50 Наиболее распространенный, применяемый при лечении заболеваний печени, препарат - преднизолон применяют в дозе, в 50 раз превосходящей дозу предлагаемого гексапептида.

Т а б л и ц а 1

Группа жи- вотных	АЛТ, ед	ГДГ, ед
Контроль	113,6±5,5	32,5±3,8
D-Галак- тозамин+	170,8±10,1*	121,6±16,0*
+физиоло- гический раствор		
D-Галактоз- амин+пред- лагаемый гексапеп- тид	115,4±5,2**	62,8±4,9**
D-Галак- тозамин+		
+предни- золон	115,2±14,3	104,5±10,1

* Различие между 1 и 2 группами дос-
товерно.

** Различие между 2 и 3 группами дос-
товерно.

Т а б л и ц а 2

Группа животных	АЛТ, ед	ГДГ, ед
Виварный контроль	64,6±3,3	17,2±0,6
ССl ₄	4349,3±2285,1	5619,7±1201,7*
ССl ₄ + предлагаемый гексапептид (10 мкг/кг)	4141,5±1094,8	1962,0±494,7
ССl ₄ + описываемый гексапептид (30 мкг/кг)	3037,8±580,8	1487,3±301,5**
ССl ₄ + описываемый гексапептид (100 мкг/кг)	2339,6±333,4	874,3±118,3**
ССl ₄ + описываемый гексапептид (300 мкг/кг)	2110,1±374,5	603,3±118,0**

* Различие с 1 группой достоверно.

** Различие со 2 группой достоверно.

Т а б л и ц а 3

Показатели	Доза гексапептида, мкг/кг				
	0	10	30	100	300
Количество крыс выживших к 48 ч	3	6	9	13	13
Летальность, %	77	54	30*	0*	0*

* Различие с группой 0 достоверно.