

Синтез трипептида Н–ProAla–Glu–ОН и изучение его токсикологических свойств

Н.Д. Бунятян^{1, 4}, Г.М. Бобизода², О.А. Попова¹, М.М. Саповский⁴,
М. Самиев², А.Б. Прокофьев^{1, 4}, И.П. Ремезова³, В.А. Евтеев¹

¹Научный центр экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ,
Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, д. 8;

²Таджикский государственный педагогический университет им. С. Айни,
Республика Таджикистан, 734003, Душанбе, ул. Рудаки, д. 121;

³Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал Волгоградского государственного медицинского университета,
Российская Федерация, 357532, Пятигорск, проспект Калинина, д. 11;

⁴Первый Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет),
Российская Федерация, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бунятян Наталья Дмитриевна – заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), главный аналитик Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ, доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: 8 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0936-5551*

Бобизода Гуломқодир Муккамал – профессор кафедры органической химии Таджикского государственного педагогического университета им. С. Айни, доктор биологических наук, доктор фармацевтических наук. Тел.: +9 (9288) 887-79-17. E-mail: bobievgm@rambler.ru. *ORCID: 0000-0002-0753-211X*

Попова Ольга Анатольевна – начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 2 испытательного центра экспертизы лекарственных средств Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ. Тел.: +7 (903) 788-85-56. E-mail: PopovaOA@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-2933-5632*

Саповский Михаил Михайлович – профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), доктор фармацевтических наук, профессор. Тел.: +7 (985) 762-68-74. E-mail: michael.sapovsky@mpbio.com. *ORCID: 0000-0003-2835-2748*

Самиев Машариф – доцент кафедры химии Таджикского государственного педагогического университета им. С. Айни, кандидат химических наук. Тел.: +9 (9291) 818-56-80. E-mail: samievmarsharif@mail.ru

Прокофьев Алексей Борисович – директор Центра клинической фармакологии НЦЭСМП, профессор кафедры фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Сеченовского Университета, доктор медицинских наук, профессор. Тел.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: prokofyev56@gmail.com. *ORCID: 0000-0001-7024-5546*

Ремезова Ирина Петровна – профессор кафедры токсикологической и аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института (филиал Волгоградского ГМУ), доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (8793) 39-10-87. E-mail: i.p.remezova@rmedpharm.ru. *ORCID: 0000-0003-3456-8553*

Евтеев Владимир Александрович – старший аналитик Центра клинической фармакологии Научного центра экспертизы средств медицинского применения МЗ РФ. Тел.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: pharmchemist@gmail.com. *ORCID: 0000-0002-6150-5796*

РЕЗЮМЕ

Введение. Биологическая активность пептидов зависит от аминокислотного состава, поэтому низкомолекулярные пептиды в последние годы занимают наиболее видное место среди большого числа лекарственных препаратов. Это можно объяснить тем, что аминокислоты не являются чужеродными для живого организма и не вызывают побочных реакций. Важными условиями синтеза пептидов являются выбор боковых блокирующих групп, которые легко снимаются, и аминокислотного состава. Было высказано предположение, что увеличение в структуре дипептида числа функциональных групп приведет к повышению иммунобиологической активности трипептида. Для удлинения цепи между пролином и глутаминовой кислотой в качестве «мостика» выбрали аминокислоту аланин.

Цель исследования – разработка наиболее оптимальной схемы синтеза трипептида с последовательностью аминокислот Н–Pro–Ala–Glu–ОН и изучение свойств синтезированного соединения.

Материал и методы. Для получения трипептида использовали метод смешанных ангидридов и активированных эфиров. Синтез состоял из трех стадий: получение защищенного дипептида Boc–Ala–Glu–(γ–Bzl)–ОН, его подготовка к синтезу трипептида и непосредственно синтез трипептида. Для идентификации синтезированного трипептида использовали ультрафиолетовую и инфракрасную

спектроскопию, высокоэффективную жидкостную хроматографию. Для синтезированного трипептида определяли острую и хроническую токсичность.

Результаты. Синтез трипептида осуществлен наращиванием пептидной цепи с C-конца. Аминогруппы аминокислот пролина и аланина защищали трет-бутилоксикарбонильной группой, которая лучше подходит для указанных аминокислот; γ -карбонильную группу глутаминовой кислоты – бензильной группой, которая легко удаляется гидрированием. Установлено, что синтезированный трипептид с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л является малотоксичным соединением.

Заключение. Синтезирован новый малотоксичный трипептид с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH.

Ключевые слова: иммуноактивность, синтез пептидов, аминокислоты, пептидные биорегуляторы, пролин, аланин, острая и хроническая токсичность.

Для цитирования: Бунятян Н.Д., Бобизода Г.М., Попова О.А., Саповский М.М., Самиев М., Прокофьев А.Б., Ремезова И.П., Евтеев В.А. Синтез трипептида H-ProAla-Glu-OH и изучение его токсикологических свойств. Фармация, 2020; 69 (3): 11–17. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-02>

SYNTHESIS OF THE TRIPEPTIDE H-ProAla-Glu-OH AND AN INVESTIGATION OF ITS TOXICOLOGICAL PROPERTIES

N.D. Bunyatyan^{1,4}, G.M. Bobizoda², O.A. Popova¹, M.M. Sapovskiy⁴, M. Samiev², A.B. Prokofyev^{1,4}, I.P. Remezova³, V.A. Evteev¹

¹Research Center for Examination of Medical Products, Ministry of Health of the Russian Federation, 8, Petrovsky Boulevard, Moscow 127051, Russian Federation;

²S. Aini Tajik State Pedagogical University, 121, Rudaki St., Dushanbe 734003, Republic of Tajikistan;

³Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Branch, Volgograd State Medical University, 11, Kalinin Prospect, Pyatigorsk 357532, Russian Federation;

⁴I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8, build. 2, Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bunyatyan Natalya Dmitrievna – Head of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Sechenov University, chief analyst of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (916) 797-07-72. E-mail: ndbun@mail.ru. *ORCID: 0000-0003-0936-5551*

Bobizoda Gulomkodir Mukkamal – Professor of the Department of Organic Chemistry of the Tajik State Pedagogical University named after S. Aini, Doctor of Biological Sciences, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +9 (9288) 877-77-17. E-mail: bobievgm@rambler.ru. *ORCID: 0000-0002-0753-211X*

Popova Olga Anatolyevna – Head of the Laboratory of Chemical and Pharmaceutical Preparations №2 of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Tel.: +7 (903) 788-85-56. E-mail: PopovaOA@expmed.ru. *ORCID: 0000-0003-2933-5632*

Sapovskiy Mikhail Mikhailovich – Professor of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology of the Sechenov University, Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor. Tel.: +7 (985) 762-68-74. E-mail: michael.sapovskiy@mpbio.com. *ORCID: 0000-0003-2835-2748*

Samiev Masharif – Associate professor of the Department of chemistry of the TSPU named after S. Aini, PhD (chemical sciences). Tel.: +9 (9291) 818-56-80. E-mail: samievmasharif@mail.ru

Prokofyev Aleksey Borisovich – Director of the Center for Clinical Pharmacology of the SCEEMP, Professor of the Department of Pharmacology and Propaedeutics of Internal Diseases of the Sechenov University, Doctor of Medical Sciences, Professor. Tel.: +7 (965) 121-65-05. E-mail: prokofyev56@gmail.com. *ORCID: 0000-0001-7024-5546*

Remezova Irina Petrovna – Professor of the Department of Toxicological and Analytical Chemistry of the Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute (Volgograd State Medical University Branch), Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (8793) 39-10-87. E-mail: ipremezova@pmedpharm.ru. *ORCID: 0000-0003-3456-8553*

Evteev Vladimir Aleksandrovich – Senior Analyst of the Center for Clinical Pharmacology of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Tel.: +7 (906) 771-27-16. E-mail: evteevVA@expmed.ru. *ORCID: 0000-0002-6150-5796*

SUMMARY

Introduction. The biological activity of peptides depends on the amino acid composition; therefore, low-molecular-weight peptides have recently occupied the most prominent place among a large number of drugs. This is attributable to the fact that amino acids are not foreign to a living organism and that they do not cause adverse reactions. The important conditions for the synthesis of peptides are the choice of side blocking groups that are easily removable, as well as that of the amino acid composition. It has been suggested that an increased number of functional groups in the structure of a dipeptide will lead to the enhanced immunobiological activity of a tripeptide. The amino acid alanine has been chosen as a bridge to extend the chain between proline and glutamic acid.

Objective: to develop the most optimal scheme for the synthesis of a tripeptide with the amino acid sequence H-Pro-Ala-Glu-OH and to investigate the properties of the synthesized compound.

Material and methods. A method of mixed anhydrides and activated esters was used to prepare a tripeptide. The synthesis involved three steps: the formation of the protected dipeptide Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH, its preparation for the synthesis of a tripeptide, and per se the synthesis of the tripeptide. UV and IR spectroscopies and HPLC were employed to identify the synthesized tripeptide, the acute and chronic toxicities of which were determined.

Results. The tripeptide was synthesized through peptide elongation from the C-terminus. The amino groups of the amino acids proline and alanine were protected by a tert-butyloxycarbonyl group that is better suited for the above amino acids; the γ -carbonyl group of glutamic acid was protected by a benzyl group that is easily removed by hydrogenation. The synthesized tripeptide with the amino acid sequence H-Pro-Ala-Glu-OH at a concentration of $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L was found to be a low toxic compound.

Conclusion. A new low toxic tripeptide with the amino acid sequence H-Pro-Ala-Glu-OH was synthesized.

Key words: immunoactivity, peptide synthesis, amino acids, peptide bioregulators, proline, alanine, acute and chronic toxicity.

For reference: Bunyatyan N.D., Bobizoda G.M., Popova O.A., Sapovskiy M.M., Samiev M., Prokofyev A.B., Remezova I.P., Evteev V.A. Synthesis of the tripeptide H-ProAla-Glu-OH and the investigation of its toxicological properties. Farmatsiya, 2020; 69 (3): 11–17. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-02>

Введение

В последние годы низкомолекулярные пептиды занимают важное место среди лекарственных препаратов (вилон, тимоген, тимогар, тимоцин, тимофер и др.). Прежде всего это объясняется тем, что они не являются чужеродными для живого организма и практически не вызывают побочных реакций. Биологическая активность пептидов обуславливается их аминокислотным составом [1–4]. Важным условием синтеза пептидов является выбор боковых защитных групп и их селективное отщепление. Ранее опубликованные работы [5–6] указывают на повышенное внимание ученых к методу активированных эфиров с использованием *p*-нитрофенола (HONp) в качестве активатора карбоксильных групп аминокислот. С помощью таких эфиров был получен ряд пептидов с достаточно высоким выходом и чистотой [7–9].

Известный иммуноактивный дипептид тимоген в своей структуре содержит глутаминовую кислоту, в составе дипептидов тимоген и тимогар имеется остаток триптофана, содержащего индольную группу, имеющую в структуре пятичленный гетероцикл. Анализ этих данных позволил предположить, что для синтеза нового трипептида целесообразно использовать глутаминовую кислоту, а также аминокислоту пролин, которая содержит пятичленный гетероцикл. Для удлинения цепи между пролином и глутаминовой кислотой в качестве мостика можно выбрать аминокислоту аланин. Теоретически возможно предположить, что увеличение в структуре трипептида количества функциональных групп, приведет к повышению его иммунобиологической активности за счет реакций взаимодействия функциональных групп с рецепторами организма.

Целью наших исследований явилась разработка схемы синтеза трипептида с последовательностью аминокислот H-Pro-Ala-Glu-OH.

Материал и методы

Для получения трипептида использовали метод смешанных ангидридов и активированных эфиров. Методика синтеза трипептида H-Pro-Ala-Glu-OH включала три этапа. На первом этапе получали защищенный дипептид Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH. Для этого 3,21 г H-Glu-(γ -Bzl)-OH растворяли в 11,5 мл натрия гидроксида и добавляли 20 мл диоксана. Полученную смесь упаривали на роторном испарителе, к полученному маслянистому продукту добавляли 4,2 г Boc-Ala-ONp,

растворенного в 20 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 3 ч. Растворитель упаривали на роторном испарителе. Полученный после упаривания маслянистый продукт растворяли в 50 мл 0,5 н натрия гидрокарбоната и экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки отбрасывали, а водный слой подкисляли 1н серной кислотой до pH=2–3, снова экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Этилацетатный слой отделяли от водного и упаривали на роторном испарителе. Получали 3,7 г маслянистого продукта.

Второй этап заключался в подготовке защищенного дипептида Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH к следующему этапу синтеза трипептида. Для этого необходимо было получить хлоргидрат защищенного дипептида Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH, чтобы далее запускать его в реакцию с третьей защищенной аминокислотой Boc-Pro-ONp. С этой целью 6,8 г Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH растворяли в этилацетате и добавляли 10 мл HCl в эфире. Полученную смесь оставляли на ночь в холодильнике, затем осаждали смесью гексана с эфиром (1:3). Выпавший в осадок продукт декантировали эфиром и сушили в вакууме. В результате получали маслянистый продукт.

На третьем этапе проводили непосредственно синтез искомого трипептида Boc-Pro-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH. Для этого защищенный дипептид Boc-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH запускали в реакцию с защищенной аминокислотой Boc-Pro-ONp: 7,5 г HCl: H-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH растворяли в 20 мл диоксана, добавляли 16,7 мл 1 н натрия гидроксида и 20 мл изопропилового спирта. Смесь упаривали на роторном испарителе. К полученному маслянистому продукту добавляли 3,3 г Boc-Pro-ONp, растворенного в 20 мл диоксана. Реакционную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение 6 дней. Затем смесь упаривали на роторном испарителе. Оставшийся маслянистый продукт растворяли в 50 мл воды и экстрагировали эфиром. Эфирные вытяжки отбрасывали, а водный слой подкисляли 1,0 н серной кислотой до pH=2–3 и снова экстрагировали этилацетатом. Этилацетатные вытяжки объединили, промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод. Затем растворитель удаляли на роторном испарителе. На данном этапе получали искомым защищенный трипептид Boc-Pro-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH в виде маслянистого продукта.

Высокий выход искомого трипептида при синтезе обеспечивали благодаря использованию метода смешанных эфиров. На промежуточных этапах синтеза трипептида применяли трет-бутилоксикарбонильную (t-Вос) защиту для аминогрупп аминокислот пролина и аланина, а также бензильную защиту для блокирования γ -карбонильной группы глутаминовой кислоты.

Ход реакций конденсации, индивидуальность и чистоту полученных соединений контролиро-

вали методом тонкослойной хроматографии на хроматографических пластинках Silufol UV-254 (Чехия) и Merck, Kieselgel-60 (Германия) в нескольких системах растворителей (табл. 1).

Изучение УФ-спектров, расчет удельных показателей поглощения аминокислот и полученных пептидов проводили согласно ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой области» ГФ РФ XIV изд.

Исследование токсичности полученного трипептида проводили на кроликах согласно методике, представленной в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [10]. Гематологические и биохимические исследования сыворотки крови проводились на 31-й и 90-й дни исследования. В крови животных определяли содержание гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов, моноцитов. В сыворотке крови определяли содержание общего белка, общего билирубина, холестерина и мочевины. Гематологические показатели определяли в цельной крови с антикоагулянтом на гематологическом анализаторе Picoscale (Венгрия). Содержание гемоглобина определяли цианметгемоглобиновым методом [11]. Мазки для лейкоцитарной формулы окрашивались по Романовскому–Гимзе с подсчетом не менее 100 клеток с использованием микроскопа Р-16 Биолам. Биохимические показатели крови определяли по общепринятым методикам [11].

Системы растворителей, используемые для контроля синтезированного трипептида

Таблица 1

Solvent systems used to control the synthesized tripeptide

Table 1

Система	Состав	Соотношение компонентов
А	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	18:2:1
Б	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	60:45:20
В	Этилацетат-бензол	3:2
Г	Хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота	9:3:1:0,3
Д	Хлороформ-метанол-уксусная кислота	32:2:1
Е	Н-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода	30:20:6:24

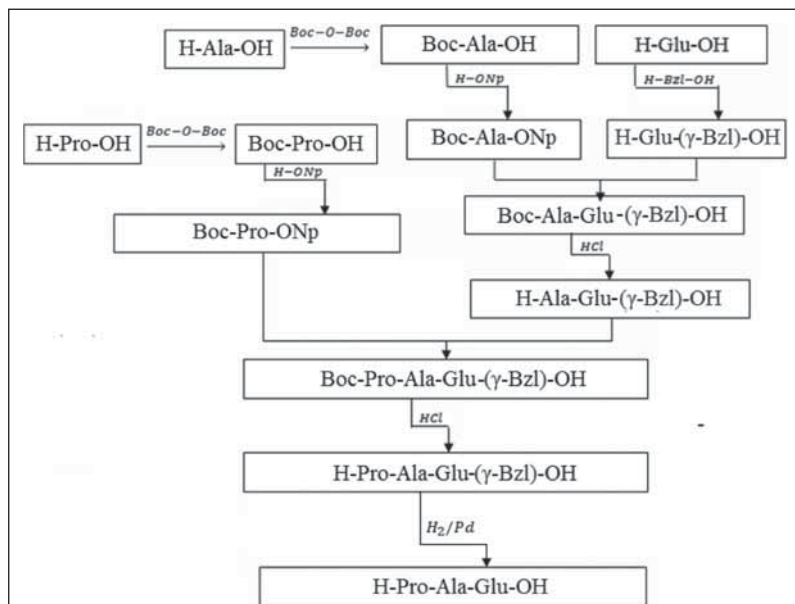


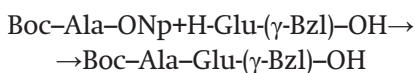
Рис. 1. Схема синтеза свободного трипептида H-Pro-Ala-Glu-OH
Fig. 1. The scheme for synthesis of the free tripeptide H-Pro-Ala-Glu-OH

Результаты и обсуждение

Синтез трипептида осуществлен наращиванием пептидной цепи с С-конца (рис. 1). Чистота всех полученных продуктов контролировалась с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ).

На первой стадии взаимодействием трет-бутилоксикарбонила на аланин был получен трет-бутилоксикарбонил аланин (Вос-Ala-OH). Затем при действии HONp на трет-третбутилоксикарбонилаланин методом смешанных ангидридов синтезировали п-нитрофениловый эфир

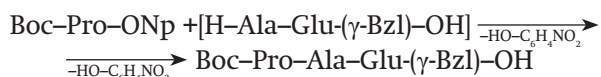
трет-бутилоксикарбонилаланин (Вос-Ala-ONp). Получение трет-бутилоксикарбонилаланил- γ -бензилового эфира глутаминовой кислоты было осуществлено методом активированных эфиров [12] по схеме:



Выход защищенного дипептида Вос-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH составил 68,4% (3,7г); Rf=0,65 (система А); Rf=0,69 (система Б); Rf=0,53 (система Д).

Далее был синтезирован трет-бутилоксикарбонилпролин. Защита его карбоксильной группы с одновременной активацией была осуществлена действием пара-нитрофенола в присутствии изобутилхлорформиата – таким образом получили активированный эфир трет-бутилоксикарбонилпролина – Вос-Pro-ONp. Выход 81,1%; Rf=0,4 (система Б).

Синтез защищенного трипептида Вос-Pro-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH проводили по схеме:



Выход трипептида по этой схеме составлял 35,8%, (1,79 г). Rf=0,82 (система А); Rf=0,95 (система Б); Rf=0,88 (система Е).

Идентификацию полученных пептидов проводили по величине удельного показателя поглощения. Для этого измеряли спектры аминокислот и полученных пептидов. Спектр трипептида H-Pro-Ala-Glu-OH (рис. 2) характеризуется наличием одного максимума в области 254 ± 2 . Аналогично измеряли спектры поглощения аминокислот и полученных пептидов. Затем рассчитывали их удельный показатель поглощения (табл. 2).

В ИК-спектрах обнаружены полосы поглощения 730 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям монозамещенного бензольного кольца; $1040, 1090, 1210 \text{ см}^{-1}$ – колебания СО в COOR; $1320, 1370 \text{ см}^{-1}$ -валентные колебания С-N в СО-NH (амид III); 1480 см^{-1} -валентные колебания С=O в бензольном кольце; 1570 см^{-1} -деформационные колебания NH в СО-NH (амид I); $1630, 1710 \text{ см}^{-1}, 2910 \text{ см}^{-1}$ -деформационные колебания СН- и СН₂-групп. Таким образом, метод ИК-спектроскопии

подтверждает структуру полученных веществ и может использоваться для их идентификации.

Свободный трипептид H-Pro-Ala-Glu-OH был получен гидрированием защищенного трипептида Вос-Pro-Ala-Glu-(γ -Bzl)-OH на палладиевом катализаторе с последующим удалением Вос-группы действием 0,01 н раствора соляной кислоты в этилацетате. Полноту удаления защитных групп контролировали при помощи ТСХ.

Чистоту полученного трипептида устанавливали с помощью метода ВЭЖХ. Условия хроматографирования: колонка μ Бондапак С18 (или аналогичная) 4 мм \times 30 см, размер частиц 5 мкм;

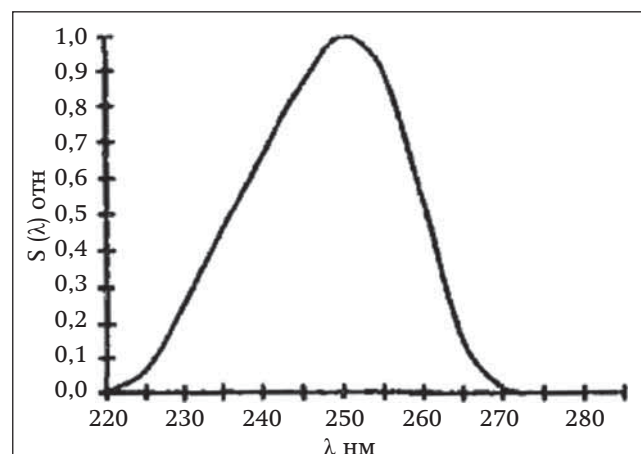


Рис. 2. УФ-спектр трипептида H-Pro-Ala-Glu-OH
Fig. 2. The UV spectrum of the tripeptide H-Pro-Ala-Glu-OH

Таблица 2

Показатели удельного поглощения для ароматических и гетероциклических аминокислот и некоторых содержащих их пептидов

Table 2

Specific absorption indices for aromatic and heterocyclic amino acids and some of their peptides

Соединение	Максимум светопоглощения, нм	$A \frac{1 \text{ см}}{1\%}$
Триптофан	278 ± 2	254,90
Изолейцил-триптофана	278 ± 2	100,00
Гамма-глутамил-триптофан	279 ± 2	142,00
Тирозин	275 ± 2	74,03
Аспарагинил-тирозин	275 ± 2	45,90
Пролин	254 ± 2	254,00
Пролил-аланил-глутаминовая кислота	254 ± 2	152,00

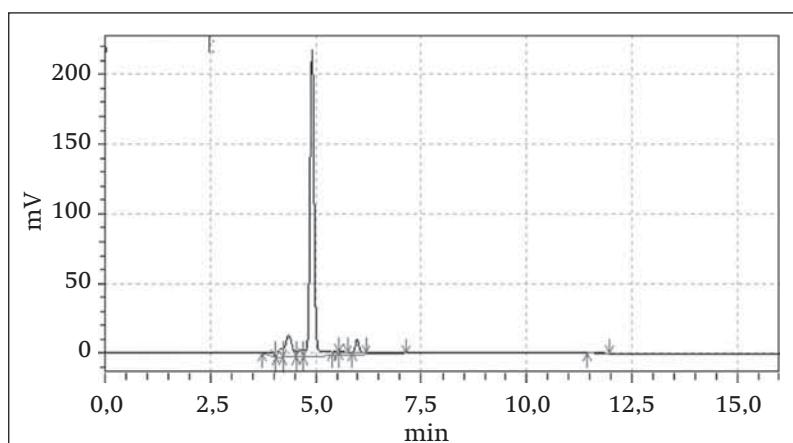


Рис. 3. Хроматограмма трипептида Н-Pro-Ala-Glu-OH
Fig. 3. Chromatogram of the tripeptide H-Pro-Ala-Glu-OH

подвижная фаза метанол-вода 50:50, скорость потока 2,0 мл/мин, детектор спектрофотометрический, длина волны 254 нм, время элюирования 30 мин. На хроматограмме (рис. 3) наблюдается один основной пик вещества и два минорных пика. Время удерживания трипептида составляет 5 мин.

Изучение острой токсичности проводили на кроликах массой тела 2–4 кг, животных разделяли на 4 группы по 4 кролика в каждой. Для определения использовали водный раствор трипептида Н-Pro-Ala-Glu-OH в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Кроликам 1-й группы внутримышечно вводили трипептид по 2 мг/кг, 2-й – по 2,8 мг/кг, 3-й – по 4,0 мг/кг. Кроликам контрольной 4-й группы внутримышечно вводили по 15 мг/кг физиологического раствора. Трипептид и физиологический раствор вводили один раз в сутки в течение 30 дней. Наблюдение за животными осуществлялось ежедневно с первого дня введения трипептида в течение 90 дней. Учитывалось внешнее поведение животных, отношение к корму, подвижность, состояние шерстного покрова и слизистых оболочек.

Наблюдение за животными в течение 90 дней эксперимента не выявило отличий между животными контрольной и опытных групп. В течение всего эксперимента экспериментальные животные оставались живыми, температура тела находилась в пределах физиологической нормы, масса тела кроликов равномерно увеличивалась, однако это увеличение не было статистически значимым. Статистически значимых различий, связанных с полом животных, не выявлено. Увеличение дозы трипептида с последовательностью аминокислот Н-Pro-Ala-Glu-OH в группах живот-

ных также не оказывало влияния на динамику массы тела животных. Эксперименты на кроликах подтвердили полученные данные о том, что многократное (в течение 120 дней) ежедневное внутримышечное введение трипептида в дозах 4 и 40 мкг/кг эквивалентно 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового переноса доз не приводит к изменениям в общем состоянии животных и не оказывает токсического действия на организм.

Хроническую токсичность трипептида также изучали на кроликах. Препарат вводили 1 раз в сутки в течение 30 дней в дозах 8, 40 и 80 мкг/кг, соответствующих 5- и 10-кратной терапевтической дозе с учетом дозы тимогена для человека и межвидового переноса доз (Freireich E.J. et al., 1966), после чего наблюдали за животными в течение 60 дней. Общий период наблюдения составлял 90 дней. Синтезированный трипептид не оказывал отрицательного воздействия на показатели общего состояния животных, динамику массы тела, клинические и биохимические показатели крови, что свидетельствовало об отсутствии у трипептида общетоксических свойств.

Полученные результаты исследования острой и хронической токсичности синтезированного соединения свидетельствовали о том, что трипептид с последовательностью аминокислот Н-Pro-Ala-Glu-OH в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л является малотоксичным соединением и соответствует 5-му классу токсичности [10, 11, 14, 15].

Заключение

В ходе экспериментальных исследований был синтезирован новый малотоксичный трипептид с последовательностью аминокислот Н-Pro-Ala-Glu-OH. Разработанная схема синтеза данного трипептида является оптимальной, поскольку она позволяет получить субстрат, дающий хороший выход продуктов реакции на всех трех этапах синтеза.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимоиметики. СПб.: Наука, 2000; 158.
2. Бунятян Н.Д., Холназаров Б.М., Бобизода Г.М. и др. Синтез и некоторые фармакологические свойства иммуноактивного лизинсодержащего тетрапептида. Химико-фармацевтический журнал. 2018; 7: 22–5.
3. Шабаетва Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). СПб.: Наука, 2003; 222.
4. Козихонов А.У., Джулаев У.Н., Раджабов У.Р. и др. Исследование процессов образования координационных соединений цинка (II) с аминокислотами. Доклады академии наук Республики Таджикистан. 2015; 58 (7): 608–14.
5. Миразоров К.И., Бобизода Г.М., Юлдошев Х. Применение пентафторфениловых эфиров при синтезе дипептида и сравнение биологических свойств. Известия Академии наук Республики Таджикистан. 2018; 1 (200): 42–5.
6. Бунятян Н.Д., Бобиев Г.М. Исследование координации иммуноактивных пептидов с ионами металлов как основы для разработки инновационных лекарственных препаратов. Фармация и фармакология. 2014; 2: 66–75.
7. Холназаров Б.М., Бунятян Н.Д., Бобиев Г.М. и др. Синтез потенциально иммуноактивных лизинсодержащих пептидов. Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2013; 56 (6): 476–9.
8. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Химический синтез пептидов. Л.: Наукова думка, 1992; 360.
9. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Охманович К.А. и др. Получение H-Phe-D-Trp-Lys(-Boc)-Thr-OMe – тетрапептидного фрагмента синтеза аналогов соматостатина. Российский биотерапевтический журнал. 2011; 10 (4): 43–5.
10. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 944.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. (под ред. Р.У. Хабриева). М.: Медицина, 2005; 832.
12. Бобиев Г.М. Синтез тимопентина и его аналогов методом активированных эфиров. Вестник педагогического университета (Душанбе), 1997; 6: 12–7.
13. Бобиев Г.М., Бунятян Н.Д., Холназаров Б.М. Разработка условий хроматографического определения дипептида изолейцил-триптофана и его координационных соединений. Фармация. 2009; 7: 17–8.
14. Холназаров Б.М., Бунятян Н.Д., Олефир Ю.В. и др. Токсические и иммуномодулирующие свойства координационного соединения дипептида изолейцил-триптофан с ионами железа (II). Химико-фармацевтический журнал. 2017; 6: 26–8.
15. Сагитова М.Г., Камалиев А.Р., Асрутдинова Р.А., Джавадов Э.Д. Определение острой токсичности препаратов. Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, 2013; 25 (3): 298–302.

REFERENCES

1. Morozov V.G., Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Peptide thiomimetics. Sankt-Peterburg: Nauka; 2000; 158 (in Russian).

2. Bunyatyan N.D., Kholnazarov B.M., Bobizoda G.M. et al. Synthesis and some Pharmacological Properties of an Immunoactive Lysine-Containing Tetrapeptide. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2018; 7: 22–5 (in Russian).
3. Shabaeva L.K., Khavinson V.Kh., Ryadnova I.Yu. Peptide self-regulation of living systems (facts and hypotheses). Sankt-Peterburg: Nauka, 2003; 222 (in Russian).
4. Kozikhonov A.U., Dzhulaev U.N., Radjabov U.R. et al. Investigation of the formation of coordination compounds of zinc (II) with amino acids. Dokladi akademii nauk Respubliki Tadjzhikistan. 2015; 58 (7): 608–14 (in Russian).
5. Mirazorov K.I., Bobizoda G.M., Yuldoshev Kh. Use of pentafluorophenyl ethers in the synthesis of dipeptide and comparison of biological properties. Izvestiya akademii nauk Respubliki Tadjzhikistan. 2018; 1 (200): 42–5 (in Russian).
6. Bunyatyan N.D., Bobiev G.M. A study of the coordination of immunoactive peptides with metal ions as the basis for the development of innovative drugs. Farmatsiya i farmakologiya. 2014; 2: 66–75 (in Russian).
7. Kholnazarov B.M., Bunyatyan N.D., Bobiev G.M. et al. Synthesis of potentially immunoactive lysine-containing peptides. Dokladi akademii nauk Respubliki Tadjzhikistan. 2013; 56 (6): 476–9 (in Russian).
8. Gershkovich A.A., Kibirev V.K. Chemical synthesis of peptides. L.: Naukova dumka, 1992; 360 (in Russian).
9. Balaev A.N., Osipov V.N., Okhmanovich K.A. et al. Obtaining H-Phe-D-Trp-Lys(-Boc)-Thr-OMe – a tetrapeptide fragment of the synthesis of somatostatin analogues. Rossiiskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2011; 10 (4): 43–5 (in Russian).
10. Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N. et al. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif & K, 2012; 944 (in Russian).
11. Guidance on the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances (by ed. R.U. Khabriev). M.: Meditsina, 2005; 832 (in Russian).
12. Bobiev G.M. Synthesis of thymopentin and its analogues by the method of activated esters. Vestnik pedagogicheskogo universiteta (Dushanbe). 1997; 6: 12–7 (in Russian).
13. Bobiev G.M., Bunyatyan N.D., Kholnazarov B.M. Development of the conditions for the chromatographic determination of the isoleucyl tryptophan dipeptide and its coordination compounds. Farmatsiya. 2009; 7: 17–8 (in Russian).
14. Kholnazarov B.M., Bunyatyan N.D., Olefir Yu.V. et al. Toxic and immunomodulating properties of the complex of the isoleucyl-tryptophan dipeptide with iron (II) ions. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2017; 6: 26–8 (in Russian).
15. Sagitova M.G., Kamaliev A.R., Asrutdinova R.A., Javadov E.D. Determination of acute toxicity of drugs. Uchenie zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsini im. N.E. Bauman. 2013; 25 (3): 298–302 (in Russian).

Поступила 10 октября 2019г.

Received 10 October 2019

Принята к публикации 31 января 2020 г.

Accepted 31 January 2020