

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. Сеченова
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Алексеев Алексей Анатольевич

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО
ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НОВЫХ ПЕПТИДНЫХ
ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

по специальностям:

14.04.01 – технология получения лекарств,

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Научные руководители

кандидат фармацевтических наук, доцент

Л.А. Павлова

доктор химических наук

В.Л. Королев

Москва 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	5
	ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1	Рецепторы тромбоцитов – потенциальная мишень агрегации тромбоцитов.....	15
1.1.1	Интегриновые рецепторы тромбоцитов.....	15
1.1.2	Интегриновые GP IIb/IIIa-рецепторы тромбоцитов.....	16
1.1.3	Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов.....	18
1.2	Доноры оксида азота.....	21
1.2.1	Оксид азота – универсальный биологический медиатор.....	21
1.2.2	Доноры оксида азота – ингибиторы агрегации тромбоцитов	23
1.2.3	Фуроксаны – экзогенные доноры оксида азота.....	25
1.3	Математическое моделирование.....	28
1.3.1	Докинг.....	28
1.3.2	Оценочные функции.....	30
1.3.3	Обработка результатов.....	31
1.4	Инъекционные лекарственные формы.....	32
1.4.1	Лиофилизат для приготовления раствора для инъекции.....	32
1.4.2	Лиофилизат наночастиц для приготовления эмульсии для инъекции.....	33
1.5	Лиофилизация.....	36
Глава 2	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	38
2.1	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	38
2.2	Использованные реагенты и материалы.....	38
2.3	Компьютерное моделирование антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов.....	39
2.4	Метод прогнозирования активностей фуроксанов.....	39
2.5	Методика синтеза пептидов.....	39
2.6	Методика очистки полученных соединений.....	41
2.7	Методика подтверждение строения полученных соединений	41
2.8	Методика определения антиагрегационной активности соединений <i>in vitro</i>	41
2.9	Методики определения степени включения гетеромерного пептида в наночастицы.....	43
Методики приготовления буферных растворов..... 43		

2.10	Оценка качества лиофилизатов.....	43
2.11	Статистическая обработка результатов.....	44
Глава 3	РАЗРАБОТКА СОЕДИНЕНИЙ – ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ.....	45
3.1	Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов.....	45
3.1.1	Молекулярное моделирование пентапептидов.....	45
3.1.2	Синтез пептидов с вероятной антиагрегационной активностью.....	47
3.1.3	Определение антиагрегационной активности синтезированных пептидов <i>in vitro</i>	48
3.2	Исследование возможности использования имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанов как ингибиторов агрегации тромбоцитов.....	49
3.3	Исследование возможности использования гетеромерных пептидов на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана в качестве антиагрегационных соединений.....	54
3.3.1	Компьютерное моделирование гетеромерных пептидов.....	54
3.3.2	Синтез гетеромерных пептидов с вероятной антиагрегационной активностью.....	56
3.3.3	Определение специфической активности гетеромерных пептидов <i>in vitro</i>	58
3.3.4	Исследование растворимости и химической стабильности гетеромерных пептидов.....	60
3.3.5	Подтверждение строения полученных соединений методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ¹ Н-спектроскопии (с привлечением двумерных методик ¹ Н/ ¹ Н-спектров COSY), элементного анализа	61
3.4	Заключение.....	73
Глава 4	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЪЕКЦИИ.....	75
4.1	Получение лиофилизата гетеромерного пептида.....	75
4.2	Подбор режима замораживания раствора гетеромерного пептида.....	77
4.3	Разработка режима лиофильной сушки гетеромерного пептида.....	81

4.4	Технология получения лиофилизированного порошка.....	86
4.5	Заключение.....	89
Глава 5	РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА НАНОЧАСТИЦ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ИНЬЕКЦИИ.....	91
5.1	Получение лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида	91
5.2	Выбор носителя и стабилизатора для образования первичной эмульсии гетеромерного пептида в наночастицах	92
5.3	Органический растворитель.....	92
5.4	Получение первичной эмульсии типа «вода/масло».....	93
5.5	Выбор стабилизатора для вторичной эмульсии.....	95
5.6	Получение вторичной эмульсии типа «вода/масло».....	96
5.7	Дополнительное диспергирование вторичной эмульсии гетеромерного пептида.....	97
5.8	Подбор режима лиофилизации раствора наночастиц гетеромерного пептида.....	98
5.9	Технология получения лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах.....	103
5.10	Заключение.....	109
Глава 6	ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗАТОВ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА.....	111
	Заключение.....	121
	ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	123
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	125
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	143

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	– аденоzin-5'-дифосфат
БН₄	– (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДМФА	– диметилформамид
МДР	– максимально допустимое разведение
МТВЕ	– метилтретбутиловый эфир
ОКС	– острый коронарный синдром
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
ПВП	– поливинилпирролидон
ПВС	– поливиниловый спирт
рГЦ	– растворимая гуанилатцилаза
СaМ	– кальмодулин-Сa ²⁺
ФАД	– флавинадениндинуклеотид
ФМН	– флавинмононуклеотид
ГФ	– Государственная фармакопея
ЛАЛ	– лизат амебоцитов краба <i>Limulus polyphemus</i>
МВ	– механические включения
ОФС	– общая фармакопейная статья
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс
DCC	– дициклогексилкарбодиимид
DCU	– N,N'-дициклогексилмочевина
DMAP	– 4-диметиламинопиридина
EDT	– этандитиол
Fur	– карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан
GP	– гликопротеиновый receptor
НОВт	– 1-гидроксибензотриазол

IC₅₀	– полумаксимальное ингибирирование
NO	– оксид азота
NOS	– NO-синтаза
PDB	– база данных белков
PEG	– полиэтиленгликоль
PGA	– полигликолид
PLA	– высокомолекулярный полимер
pH	– водородный показатель
TAN	– тианизол
TFA	– трифторуксусная кислота
TIPS	– триизопропилсилан

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной смертности населения в России [1, 2]. Доказано, что в основе сердечно-сосудистых заболеваний лежит атеротромбоз – процесс патологического тромбообразования, ведущий к инфаркту миокарда и инсульту [3-6]. Существуют различные методы профилактики и лечения процессов тромбообразования, включая создание новых эффективных антиагрегационных лекарственных средств, основанных, в том числе, на ингибировании процесса тромбоза. В образовании тромба значимую роль играют гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов. Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов являются мощными антитромбоцитарными препаратами [7, 8].

С другой стороны, известно также, что ингибирование процессов тромбообразования происходит под воздействием оксида азота [9]. Один из классов химических соединений, производные которых являются донорами оксида азота – фуроксаны [10, 11].

Одним из современных направлений создания инновационных лекарственных средств является разработка «гибридных» молекул, в которых в одну молекулярную систему включено несколько фармакофорных фрагментов. Например, в случае лекарственных средств с антиагрегационной активностью это могут быть такие фармакофоры, как антагонисты GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов пептидной природы и экзогенные доноры оксида азота на основе соединений фуроксанового ряда.

В настоящий момент на фармацевтическом рынке антиагрегационные препараты на основе пептидов представлены, как правило, в виде раствора для в/в введения. Однако, лекарственные препараты других фармакологических групп могут применяться как в виде лиофилизата, так и в виде суспензии наночастиц для пролонгирования действия лекарственного

вещества (например «Бусерелин», «Бусерелин-депо»). Таким образом, разработка и исследование новых лекарственных препаратов на основе пептидов с антиагрегационной активностью как для экстренного воздействия (лиофилизат для приготовления раствора для инъекции), так и с пролонгированным действием на основе наночастиц является актуальной.

Степень разработанности темы исследования

Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов представлены в клинической практике такими препаратами, как абциксимаб (РеоПро), барбурин, эптифибатид (интегрелин), тирофибан (агграстат), выпускаемыми различными фармацевтическими фирмами [12-14]. Однако, для обеспечения антиагрегационного действия требуются постоянное инфузионное введение указанных препаратов.

К настоящему времени доказана генерация азота тринитроглицерином и другими производными нитратов в результате энзиматической биотрансформации [11, 15]. Однако их существенным недостатком является возникновение толерантности при длительном применении препаратов этой группы [15, 16].

Поэтому разработка новых ингибиторов агрегации тромбоцитов обусловливает актуальность диссертационного исследования.

Цели и задачи исследования

Целью работы является получение и исследование новых антиагрегационных соединений на основе пептидных антагонистов GP IIb/IIIa рецепторов тромбоцитов и имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']difуроксана, выявление *in vitro* наиболее активного соединения, а также разработка технологии лиофилизирования этого соединения и создания наночастиц на его основе.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести компьютерное моделирование пептидных антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов и оценить возможность использования в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов производных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана;

2. Выполнить синтез пептидных и гетеромерных пептидных ингибиторов агрегации тромбоцитов на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана;

3. Установить строение синтезированных соединений с помощью физико-химических методов (спектроскопия ЯМР ^1H , масс-спектрометрия и элементный анализ);

4. Исследовать антиагрегационную активность *in vitro* синтезированных соединений и выбрать для дальнейшего изучения наиболее активное;

5. Разработать технологию получения наночастиц гетеромерного пептида с целью создания его пролонгированной формы;

6. Разработать технологию получения лиофилизата для инъекционного введения и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида;

7. Оценить качество полученного лиофилизата для инъекционного введения и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида и их стабильность.

Научная новизна результатов работы

Научно обоснован спектр соединений для прогнозирования антиагрегационных свойств с помощью математического моделирования. Компьютерное моделирование выполнено для 20 000 пептидов, 24 производных фуроксана и 48 000 гетеромерных пептидов, состоящих из двух фармакофорных групп: пептидной и фуроксановой.

Синтезировано 40 наиболее активных (согласно прогнозу) пептидов и гетеромерных пептидов, подтверждена их антиагрегационная активность. Разработаны стабильные лиофилизированные формы наиболее активного *in*

vitro гетеромерного пептида: лиофилизат гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизат гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления суспензии для инъекции. Определены показатели качества для их стандартизации. Экспериментально подтверждена стабильность лиофилизатов в течение 2 лет.

Приоритет проведенных исследований подчеркивается полученными патентами:

РФ №2550223 «Гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана, ингибирующие агрегацию тромбоцитов»;

РФ №2549355 «N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов»;

РФ №2544547 «N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан»;

РФ №2502739 «N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов».

Теоретическое значение результатов работы

Представленный в работе экспериментальный материал может служить теоретической базой для создания и исследования новых антиагрегационных лекарственных средств.

Практическая значимость работы

Получено 40 пептидных и гетеромерных пептидных антиагрегационных соединений. В эксперименте *in vitro* выявлено наиболее активное соединение, получены стабильные лиофилизаты данного соединения, в том числе в виде наночастиц.

В работу лаборатории биологически активных соединений НИИ фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России внедрены материалы исследования диссертационной работы (акт

внедрения) и лабораторный регламент на «Гетеромерный пептид, лиофилизат для приготовления раствора для инъекции 8 мг».

Методология и методы исследования

При выполнении работы были использованы методы органического синтеза, хроматографии, комплекс физико-химических, биологических методов, методы компьютерного моделирования степени связывания антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов, прогноза биологической активности фуроксанов, технологических испытаний, математические методы анализа и обработки результатов.

Публикации

По тематике диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 6 статей в рекомендованных ВАК изданиях, получено 4 патента РФ.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных в ходе работы результатов обеспечивали определенным набором физико-химических, биологических и технологических методов исследования.

Расчетный поиск потенциальных антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов проводили с использованием современных методов компьютерного моделирования с помощью программы «Алгокомб».

Прогноз биологической активности производных фуроксана выполняли с помощью программы PASS Professional 2010.1.

Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна. Строение синтезированных соединений подтверждали методами спектроскопии ЯМР ^1H (с привлечением методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), масс-спектрометрии и элементным анализом. Для исследования влияния различных технологических факторов на качество

лиофилизатов гетеромерного пептида использовали сертифицированное оборудование.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента. Обработка данных производилась с помощью программы Microsoft Excel XP. Статистически значимыми расценивались эффекты при $p < 0,05$.

Аппробация работы

Основные положения диссертации представлены на конференции «Новые химико-фармацевтические технологии» (Москва, 2012, 2014); Конкурсе научных инновационных работ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (диплом III степени) (Москва, 2012); Всероссийской медико-биологической научной конференции молодых ученых «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (XVI и XVII Всероссийская конференция «Человек и его здоровье») (Санкт-Петербург, 2013, 2014); III Всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2013); II Научно-практической конференции: «Актуальные проблемы фармацевтической технологии и фармации» (Москва, 2013), а также на межкафедральных и лабораторных конференциях на базе НИИ фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Личный вклад автора

Данные, представленные в автореферате и диссертации, получены при непосредственном участии автора как на этапах постановки задач и разработки подходов к их выполнению, так и при получении результатов при проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании публикаций. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формулам специальностей 14.04.01 – технология получения лекарств и 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, результаты проведенного исследования соответствуют областям исследования специальностей, конкретно пунктам 3, 4 паспорта «технологии получения лекарств» и 1, 4 паспорта «фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова МЗ РФ «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении лекарственных средств» (№ государственной регистрации 01201261653).

Основные положения, выносимые на защиту

- Структуры соединений для проведения компьютерного моделирования: пептидные антагонисты интегрин-рецепторов тромбоцитов и гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']difуроксана – донора оксида азота.

- Результаты изучения синтезированных соединений физико-химическими методами: масс-спектрометрией, ЯМР ^1H -спектроскопией и элементным анализом.

- Результаты исследования антиагрегационных свойств синтезированных пептидных и гетеромерных пептидных соединений *in vitro*.

- Технология получения наночастиц гетеромерного пептида.

- Технологии получения лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида для приготовления суспензии для инъекции.

- Результаты качественного и количественного анализа лиофилизатов гетеромерного пептида, изучения стабильности в процессе хранения.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 152 страницах, включает 35 рисунков и 30 таблиц. Список литературы содержит 144 источника.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Рецепторы тромбоцитов – потенциальная мишень агрегации тромбоцитов

1.1.1 Интегриновые рецепторы тромбоцитов

Тромбоциты, циркулирующие в крови, находятся в неактивном состоянии. Тромбообразование происходит при взаимодействии с поврежденной стенкой сосуда и является каскадным процессом, состоящим из трех основных стадий:

- 1) соприкосновение тромбоцитов с поврежденным эндотелием сосуда, который является тромбогенной поверхностью;
- 2) адгезия, последующая агрегация тромбоцитов и экспрессия интермедиантов, способствующих дальнейшей агрегации тромбоцитов;
- 3) запуск механизма образования фибрина из фибриногена под действием тромбина, что приводит к образованию тромба [17].

За процесс адгезии и агрегации тромбоцитов отвечают несколько рецепторов мембраны тромбоцитов, большинство из них принадлежит к семейству интегринов. Интегрины – трансмембранные гликопротеины, гетеродимерные поверхностные рецепторы, состоящие из двух субъединиц α (120-180 кДа) и β (90-110 кДа), характеризующиеся общностью протеиновых цепей, антигенных свойств и функции и имеющие различные изоформы [18, 19].

Известно 17 α и 8 β субъединиц, димеры которых образуют 22 различных комбинаций интегриновых рецепторов [20]. Интегрины находятся на поверхности практических всех типов клеток и участвуют в различных физиологических процессах.

На поверхности тромбоцитов были обнаружены гликопротеины, часть из которых специфична только для тромбоцитов (таблица 1).

Таблица 1 – Гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов, участвующие в их адгезии и агрегации

Рецептор	Лиганд	Эффект активации	Узнаваемая аминокислотная последовательность
Интегриновые рецепторы			
α_2/β_1 (GP Ia/IIa)	Коллаген	Адгезия	DGEA
α_5/β_1 (GP Ic/IIa)	Фибронектин	Адгезия	RGD
α_6/β_1	Ламинин	Адгезия	Короткая последовательность не определена
α_{IIb}/β_3 (GP IIb/IIIa)	Фибриноген, фибронектин, фактор Виллебранда, фибронектин	Агрегация	KQAGDV и RGD
α_v/β_3	Вибронектин, фибриноген, фибронектин, фактор Виллебранда	Адгезия	RGD
Неинтегриновые рецепторы			
GP Ib	фактор Виллебранда	Адгезия	Короткая последовательность не определена
GP IV	Тромбоспонин, коллаген	Адгезия	CSVTG

1.1.2 Интегриновые GP IIb/IIIa-рецепторы тромбоцитов

Показано, что конечным звеном в агрегации тромбоцитов является связывание фибриногена с активированными GP IIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов [18, 21, 22, 23]. Рецепторный комплекс гликопротеин IIb/IIIa (интегрин α_{IIb}/β_3) относится к семейству интегриновых рецепторов тромбоцитов и является наиболее многочисленным среди всех рецепторов тромбоцитов [8, 24, 25]. На поверхности тромбоцита, находящегося в спокойном состоянии, располагается около 40 000 – 80 000 рецепторов GP IIb/IIIa, так же примерно 20 000 – 40 000 рецепторных комплексов находится на мембранах α -гранул и кальциевой системы внутри тромбоцита [25]. При врожденном дефиците этого рецептора – тромбостении Гланцмана – нарушена или отсутствует агрегация тромбоцитов с большинством индукторов агрегации [23].

Изначально рецептор является неактивным, активация происходит в результате передачи сигнала от рецепторов адгезии, рецепторов, связанных с G-белком (рецепторы тромбина PAR-1 и PAR-4), и рецепторов АДФ (P_2Y_1 и P_2Y_{12}). В процессе Ca^{2+} -зависимой активации комплекс претерпевает ряд конформационных изменений, которые обеспечивают возможность связывания тромбоцита с фибриногеном [26, 27]. При активации GP IIb/IIIa рецепторы тромбоцитов изменяют свою конформацию с лиганд-нечувствительной до лиганд-восприимчивой, при которой возможно образование мостиков между соседними активированными тромбоцитами из молекул фибриногена [28, 29].

Гликопротеин IIb/IIIa является гетеромерным белком и поверхностным рецептором для фибриногена, фактора фон Виллебранда, фибронектина и вибронектина [18, 30, 31, 32]. Взаимодействие с этими белками, в первую очередь с фибриногеном, опосредует агрегацию тромбоцитов.

Гетеродимер IIb/IIIa представляет собой комплекс двух субъединиц. Субъединица GP-IIb состоит из ковалентно связанных дисульфидной связью тяжелой (116 кД) и легкой (22 кД) цепей (рисунок 1) [18, 32].



Рисунок 1 – Строение интегринового GP-IIb/IIIa-рецептора тромбоцитов (Newman et al., 1995)

Тяжелая цепь находится на поверхности тромбоцита, в то время как легкая является трансмембранным белком. Субъединица GP-IIIa представляет

собой гликозилированный полипептид из 762 аминокислот с массой 92 кД, который состоит из трех доменов – внеклеточного на N-конце, трансмембранный и цитоплазматического домена на C-конце [6, 33, 34].

Механизм действия GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов заключается в способности распознавать две аминокислотные последовательности. Первая аминокислотная последовательность представляет собой Arg-Gly-Asp (RGD) [35] и находится в вибронектине, фибронектине, факторе фон Виллебранда. Вторая аминокислотная последовательность обнаружена на карбоксильном конце γ -цепей фибриногена и представляется собой последовательность Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) [6, 36].

В дизайн новых антагонистов $\alpha_{IIb}\beta_3$ используют различные фрагменты, которые имитируют важные для связывания с интегрином аминокислотные остатки [37].

1.1.3 Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов

Ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов являются наиболее мощными антитромбоцитарными препаратами, используемые в кардиологии. Механизм действия препаратов этой группы заключается в блокирование конечного и ключевого этапа агрегации тромбоцитов – процесса образования мостиков между соседними активированными тромбоцитами из молекул фибриногена (рисунок 2) [7, 38, 39, 40].

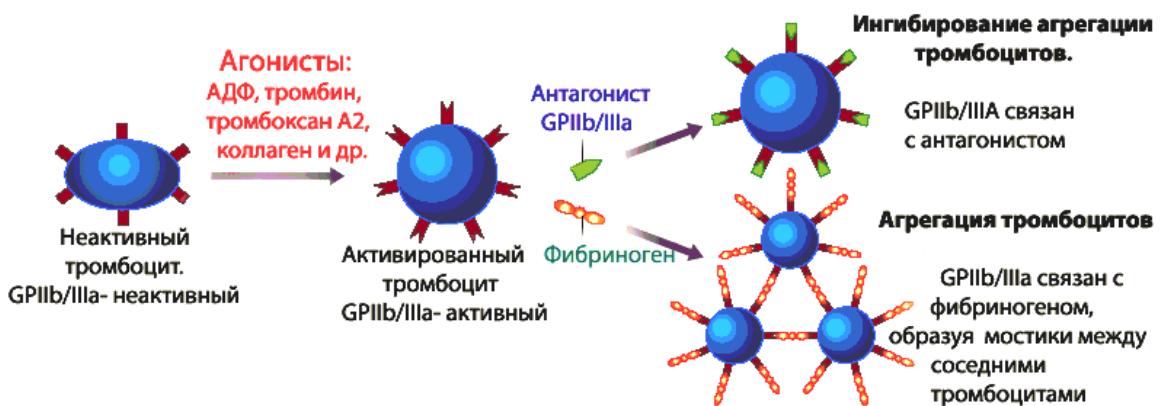


Рисунок 2 – Механизм ингибирования агрегации тромбоцитов антагонистами GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов (Bussel et al., 2000)

Использование столь мощных ингибиторов агрегации (антиагрегантов) направлено в первую очередь на предотвращение тромботических событий в условиях высокого риска их развития, например при проведении ангиопластики, или на подавление уже начавшегося тромбообразования, например при остром коронарном синдроме (ОКС).

Все разрешенные к клиническому применению антагонисты GP IIb/IIIa-рецепторов являются внутривенными препаратами и схемы их введения построены так, чтобы они оказывали свое действие приблизительно нескольких суток, т.е. в течение наиболее острого периода, когда после повреждения сосудистой стенки для предотвращения тромбоза требуется полное или почти полное подавление агрегации тромбоцитов [41, 42, 43].

В настоящий момент ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов представлены следующими группами препаратов [13, 14]: 1) моноклональными антителами (абциксимаб (РеоПро)); 2) RGD-пептидами, в составе которых присутствует последовательность Arg-Gly-Asp (барбурин); 3) KGD-пептидами с аминокислотной последовательностью Lys-Gly-Asp (эптифибатид (интегрелин)); 4) пептидомиметиками (тирофибан (агграстат) – непептидное производное тирозина).

Абциксимаб (РеоПро) (молекулярный вес примерно 50 000 Да) состоит из *Fab*-фрагментов химерного моноклонального антитела, состоящего из вариабельных участков мышиных моноклональных антител и константных участков иммуноглобулина человека [44], с помощью чего достигается уменьшение риска иммунных реакций при сохранении специфической активности. Вводят препарат внутривенно с последующей 12-24-часовой инфузией. Восстановление агрегации происходит через 48-72 ч с момента окончания введения препарата [45].

Монафрам, в свою очередь, состоит из *F(ab')*2-фрагментов анти-GP IIb/IIIa мышьного моноклонального антитела Фрамон (CRC64), созданного в Российском кардиологическом научно-производственном комплексе. Вводят препарат внутривенно с последующей инфузией для поддержания заданной

концентрации. Монафрам в отличие от абциксимаба селективно взаимодействует только с GP IIb/IIIa и не блокирует остальные интегриновые рецепторы.

Тирофибан (Аггратраст) представляет собой пептидомиметик на основе тирозина, который имитирует пространственную структуру аминокислотной последовательности Арг-Гли-Асп. Химическое название – N-(Бутилсульфонил)-4-[4-(пиперидил)бутокси]-L-фенилаланина гидрохлорида. Тирофибан вводят внутривенно с последующей инфузией. Как и эптифибатид, тирофибан селективно ингибирует активность GP IIb/IIIa [46].

Эптифибатид (Интегрилин) представляет собой синтетический циклический гептапептид на основе аминокислотной последовательности Лиз-Гли-Асп [7]. Препарат вводят внутривенно с последующей инфузией [47].

По сравнению с абциксимабом тирофибан и эптифибатид (молекулярный вес каждого менее 1000 Да) имеют больший период полураспада в крови. Период полураспада для эптифибатида – 2,5 часа [47], для тирофибана – 2 часа [46].

Абциксимаб и монафрам взаимодействуют с GP IIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов по неконкурентному механизму, в отличие от тирофибана и эптифибатида, тем самым обеспечивается продолжительная антиагрегационная активность после прекращения введения препарата.

Результаты клинических исследований абциксимаба: EPIC [48], EPILOG [49], CAPTURE [50], EPISTENT [51], TIMI, CADILLAC; тирофибана: RESTORE [52], PRISM и PRISM-PLUS [53, 54]; эптифибатида: IMPACT-II [55], PURSUIT [56], ESPRIT [57] – продемонстрировали их эффективность и безопасность применения.

Созданные в последние годы пептидомиметики ингибиторов GP IIb/IIIa (ксимелофибан, орбофибан, сибрафибан, лотрафибан) предполагались для перорального приема в целях длительной профилактики тромбозов [44].

К сожалению, после многочисленных исследований данных препаратов с участием более 40 000 пациентов не выявлены преимущества этих препаратов перед ацетилсалициловой кислотой [58, 59, 60].

Поэтому разработка новых пептидных ингибиторов агрегации тромбоцитов, несомненно, является актуальной, и имеет большое практическое значение.

Таким образом, наиболее перспективным направлением в развитии лекарственных веществ является создание пептидного ингибитора для внутривенного применения, по структуре и биологической активности подобного природному белку.

1.2 Доноры оксида азота

1.2.1 Оксид азота – универсальный биологический медиатор

На сегодняшний день подтверждено, что оксид азота (NO) является одним из главных универсальных биологических медиаторов, регулирующих функции клеточного и тканевого метаболизма [61, 62, 63].

Оксид азота участвует в регуляции сосудистого тонуса, иммунитета [62], нейронных коммуникациях и памяти [64, 65], снижает агрегацию тромбоцитов [9, 66], обеспечивает релаксацию гладких мышц [62], осуществляет антимикробную [67] и противоопухолевую защиту живого организма [68].

Биосинтез оксида азота в организме осуществляется главным образом за счет окисления азота иминогруппы гуанидинового фрагмента аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом L-цитруллина под действием ферментов NO-синтаз (NOS) (рисунок 3) [63, 69].

Фермент NO-синтаза представляет собой гомодимер, содержащий пять локусов связывания для 5 разных кофакторов. В качестве кофакторов на мономерную субъединицу NOS выступают (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин (BH_4), флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавинмононуклеотид (ФМН) и протопорфирина IX [70]. Каждая субъединица димера содержит по два

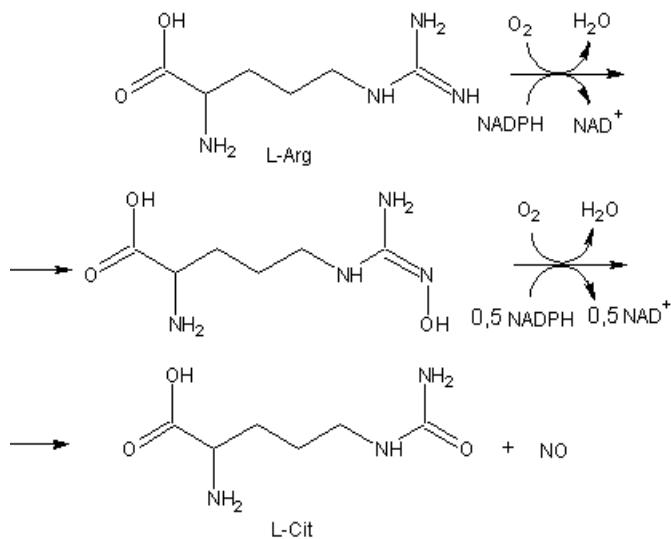


Рисунок 3 – Схема биосинтеза NO из L-аргинина (Palmer et al., 1998)

домена: С-терминальный редуктазный и N-терминальный оксигеназный, соединенные локусом для связывания кальмодулин-Са²⁺ (CaM), который отвечает за внутренний перенос электронов NO-синтазы. На редуктазном домене расположены флавины: ФАД (первичный акцептор электронов от НАДФН) и ФМН (переносчик электронов от ФАД на гем оксигеназного домена). Оксигеназный домен, в свою очередь, содержит участки для связывания гема, L-аргинина и ВН₄ (рисунок 4) [71].

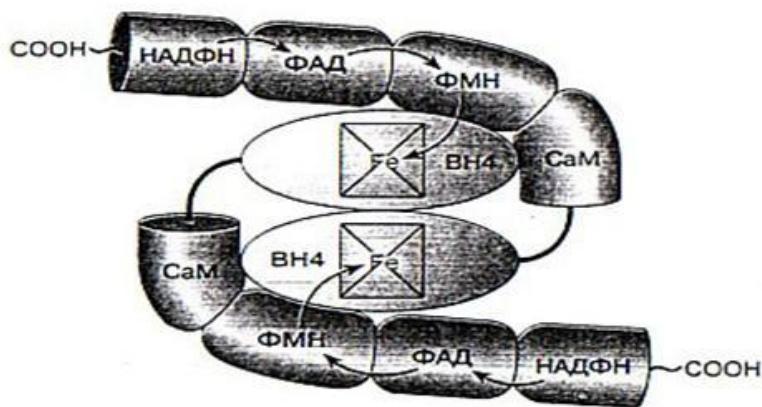


Рисунок 4 – Схематическое строение NO-синтазы

В процессе образования оксида азота ФМН переносит принявшие с НАДФН электроны с ФАД на гем оксигеназного домена, в результате чего

активируется молекула O_2 , необходимая для синтеза оксида азота во время окисления L-аргинина [72].

Количество синтезируемого оксида азота прямо пропорционально количеству внутриклеточного L-аргинина. Содержание L-аргинина в клетках повышают такие вещества, как интерферон- γ и интерлейкин-1 β . Эти соединения ускоряют поступление L-аргинина в клетку и повышают активность аргининсукцинатлиазы – фермента, катализирующего ресинтез L-аргинина из L-цитруллина [73].

В структурах гомоаргинина, аргиниласпарагина, метилового эфира аргинина, гуанидинотиолов также содержится иминогруппа, поэтому они могут выступать в качестве субстратов в биосинтезе оксида азота.

Помимо NO-синтазного пути рассматривается альтернативный источник продукции оксида азота в организме – нитрит-нитратный. Процесс проходит с участием фермента ксантинооксидазы [74].

Оксид азота в условия организма может, как депонироваться в клетках за счет связывания в стабильные соединения, так и оказывать паракринное или дистантное воздействие на клетки-мишени [75]. Депонируется оксид азота в составе динитрозильных комплексов железа с серосодержащими лигандами и S-нитротиолов (RS-NO) [76].

Недостаток в организме оксида азота может приводить к целому ряду патологических состояний, например, таких как сердечно-сосудистые, воспалительные, инфекционные заболевания, тромбозы, заболевания мочеполовой системы, мозговые повреждения и другие [77].

1.2.2 Доноры оксида азота – ингибиторы агрегации тромбоцитов

К настоящему времени доказана генерация азота тринитроглицерином и другими производными нитратов в результате энзиматической биотрансформации [15]. Однако их существенным недостатком является возникновение толерантности при длительном применении. Исследования *in vitro* показали, что органические нитраты быстро истощают сульфидные

группы, необходимые для трансформации органических нитратов в оксид азота [16].

В связи с этим проводится поиск новых соединений, способных к генерации оксида азота другими путями, например, тиолзависимо.

Известно, что некоторые производные 1,2,5-оксадиазол-2-оксида (фуроксана) являются перспективными донорами оксида азота и высокоэффективными активаторами растворимой гуанилатциклазы (гуанозин-5'-трифосфат-пирофосфатлиаза (циклизирующая)) [78]. В работе [79] исследовалось влияние соединений фуроксанового ряда при поступлении в организм на нитроксидергическую систему, которая принимает участие в регуляции деятельности сердечно-сосудистой и иммунной системах, мышц и других структурах организма. Отмечено, что введение физиологического донора оксида азота L-аргинина способствует повышению концентрации метаболитов оксида азота, в частности: нитратов и нитритов. 5,7-Бис(4-гидроксифениламино)-4,6-динитробензофуроксан (фениксан) оказывает стимулирующий эффект на систему оксида азота при внутрижелудочном введении в дозах 1 и 5 мг/кг, а 4-хлор-6,7-фуроксанобензофуразан (хлофузан) – в дозе 1 мг/кг. Другие производные фуроксана, такие как имидазобензодифуроксан, 2-этилимидазобензодифуроксан и N-[(этоксикарбонил)метил]имидаизобензодифуроксан генерировали нитриты в присутствие тиолов [80, 81].

Бензо[1,2-с:3,4-с':5,6-с'']трис[1,2,5]оксадиазол-1,4,7-триоксид (рисунок 5) также генерировал нитриты в присутствие тиолов [82].

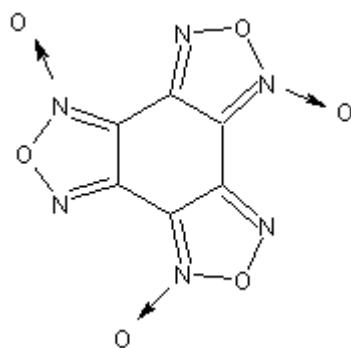


Рисунок 5 – Бензо[1,2-с:3,4-с':5,6-с'']трис[1,2,5]оксадиазол-1,4,7-триоксид

В тоже время, в сравнении со многими другими донорами оксида азота производные фуроксана медленно трансформируются и длительно действуют без развития нитратной толерантности.

В настоящее время фуроксаны рассматриваются как пролекарства, реализующие свою биологическую активность через рГЦ-цГМФ-путь [11]. Оксид азота нитрозирует гем-рГЦ с образованием нитрозил-гем-комплекса, в котором железо выведено из плоскости порфиринового кольца [83]. Вследствие чего структура нитрозил-гем-комплекса становится подобной структуре протопорфирина IX, который является активатором растворимой гуанилатцилазы. Гуанилатцилаза является ферментом, катализирующим биосинтез гуанозин-3',5'-циклофосфата (цГМФ) и ее активация приводит к трансформации ГТФ в цГМФ [84, 85] – вторичного мессенджера, выполняющего роль универсального регулятора внутриклеточного метаболизма [86]. Возрастание внутриклеточной концентрации данного вторичного мессенджера в гладкомышечных клетках сосуда вызывает активацию цГМФ-зависимых протеинкиназ, а также Са-АТФазу, что индуцирует дефосфорилирование молекулы миозина, а, следовательно, и дилатацию коронарных и других кровеносных сосудов (сосудов мозга, брюшной полости, периферических сосудов), снижение сосудистого тонуса и сопротивления, то есть приводит к расширению просвета кровеносного сосуда. Таким образом, оксид азота снижает давление крови, повышает кровоток и способствует восстановлению сосудистой функции.

Ингибирующий эффект оксида азота на агрегацию тромбоцитов также связан с его способностью активировать рГЦ. Инициация агрегации тромбоцитов способствует активации тромбоцитарной гуанилатцилазы, а накапливающийся цГМФ в тромбоцитах опосредует сигнал к ингибиции их адгезии и дезагрегации по механизму отрицательной обратной связи [87, 88].

1.2.3 Фуроксаны – экзогенные доноры оксида азота

Высвобождение оксида азота производными фуроксана является

тиолзависимым процессом [11]. Высвобождение оксида азота (рисунок 6) происходит за счет дезароматизации фуроксанового цикла в результате его атаки тиолят-анионом по положениям 3 и (или) 4 [89].

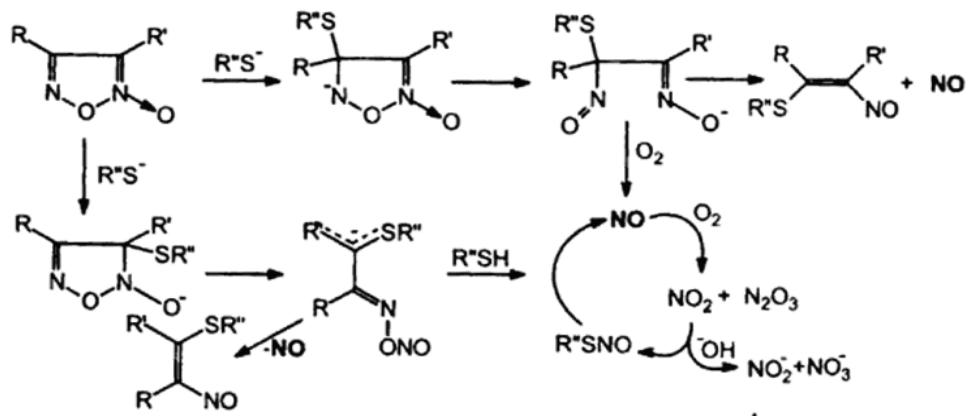


Рисунок 6 – Схема тиолзависимого высвобождения NO из фуроксана

Тиолзависимое высвобождение оксида азота подробно изучено на примере взаимодействия 4-фенил-3-фуроксанкарбонитрила с цистеином и тиофеном (рисунок 7) [90].

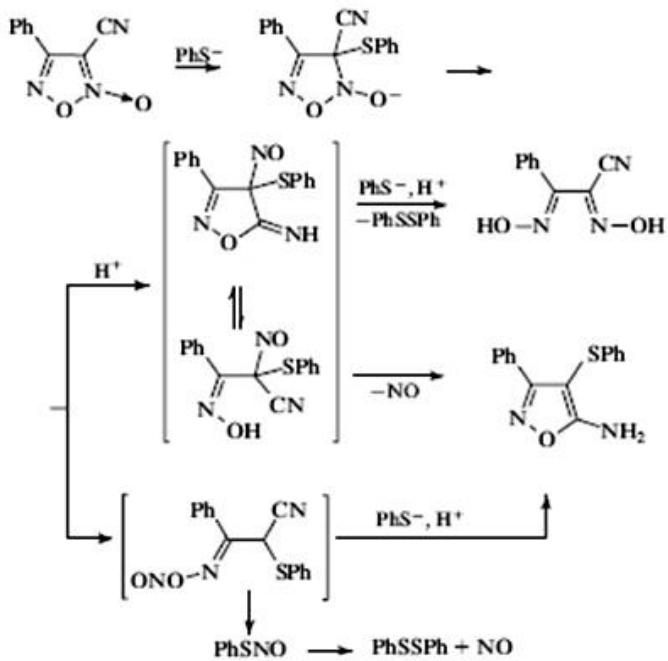


Рисунок 7 – Тиолзависимое высвобождение оксида азота из 4-фенил-3-фуроксанкарбонитрила

Другой пример тиолзависимого высвобождения оксида азота из фуроксанов подробно описан на примере взаимодействия 4,6-диметил-4Н-[1,2,5]-оскадиазоло[3,4-d]пиrimидин-5,7-дион-1-оксида с N-ацитилцистеамином, цистеином и глутатионом в качестве тиольных соединений (рисунок 8) [91].

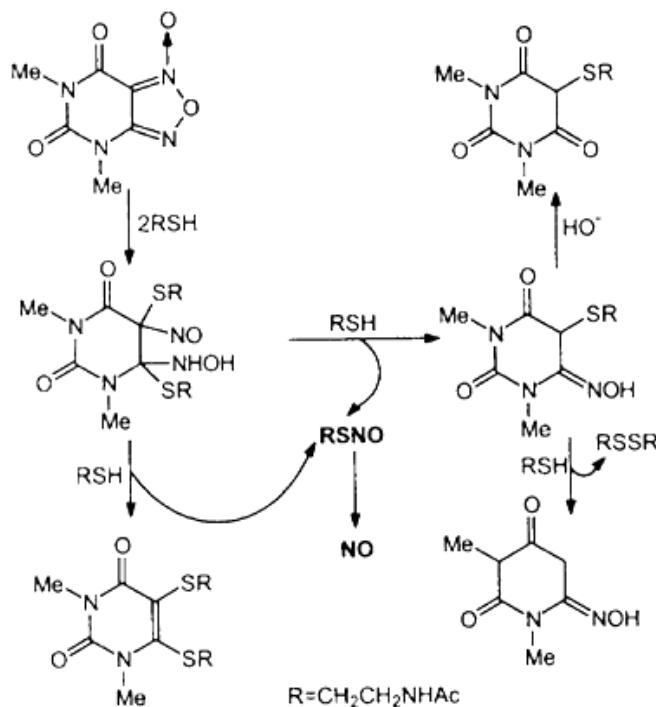


Рисунок 8 – Выделение оксида азота из 4,6-диметил-4Н-[1,2,5]-оскадиазоло[3,4-d]пиrimидин-5,7-дион-1-оксида под действием тиолов

Еще одним подтверждением тиолзависимого высвобождения оксида азота из фуроксанов представлено в [80, 81], где представлена его генерация из 1,2,5-оскадиазол-N-оксида в присутствии дитиотрейтоля.

Таким образом, открытие высокоактивного межклеточного медиатора – оксида азота, позволило прояснить вопросы в клеточной биологии.

Производные фуроксана, как эффективные доноры оксида азота показаны для лечения различных сердечно-сосудистых заболеваний: ишемии миокарда и острой сердечной недостаточности, могут применяться в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов и вазодилататоров [80, 81]. Создание новых генераторов оксида азота на основе производных фуроксана

является перспективным и целесообразным направлением поиска новых эффективных лекарственных средств.

1.3 Математическое моделирование

В современном процессе разработки лекарств широко используется компьютерное моделирование [5, 12]. В частности, если известна пространственная структура белка широко применяется компьютерное моделирование взаимодействия белка-мишени и лиганда – потенциального лекарства. Моделирование позволяет проводить поиск лигандов, образующих наиболее прочный комплекс с заданным белком, то есть являющихся более эффективными лигандами. В задаче виртуального скрининга требуется на основе расчетов отсортировать набор лигандов по прочности образования комплекса с заданным белком. Для этого необходимо эффективно решать задачу докинга – задачу поиска взаимного пространственного расположения лиганда и белка, обеспечивающего наиболее прочную связь между ними.

1.3.1 Докинг

Существует три категории методов построения моделей лиганд-белковых комплексов (докинга):

1. Жесткий докинг: белок и лиганд рассматриваются как жестко закрепленные объекты;
2. Полугибкий докинг: лиганд проявляет конформационную гибкость, а белок нет;
3. Гибкий докинг: в ходе исследования учитывается конформационная подвижность белка и лиганда.

Один из способов учета подвижности белка заключается в том, чтобы начать расчет с определенной трехмерной структуры, а затем позволять определенным подструктурам последовательно двигаться. Реализуется такой способ с помощью изучения библиотек ротамеров [92].

Другой подход подразумевает использование данных, полученных несколькими экспериментальными (методами рентгеноструктурного анализа или ЯМР) или расчетными (методами молекулярной динамики) методами. Данная стратегия использует обобщенное описание белка. Полученные похожие части структур объединяются, а непохожие рассматриваются как отдельные структуры [93].

Существует несколько видов алгоритма докинга. Алгоритмы подразделяются на детерминистические, которые дают полностью воспроизводимые результаты, и стохастические, которые включают случайный фактор, вследствие чего их результаты не могут быть полностью воспроизводимы. Ниже приведены основные алгоритмы докинга.

При использовании алгоритма постепенного конструирования лиганд не располагается в области связывания сразу как целая молекула, а разделяется на отдельные фрагменты и постепенно собирается в области активного центра [94].

Алгоритмы табу-поиска характеризуются использованием ограничений, позволяющих вести поиск в областях, трудно доступных иными методами. Эти ограничения имеют форму запретного списка, так называемого табу-списка, в котором содержатся уже полученные и исследованные решения [92].

Особым методом моделирования является моделирование отжига, при котором система охлаждается путем уменьшения температуры моделирования через определенные промежутки времени. Таким образом, система фиксируется в конформации, отвечающей ближайшему локальному минимуму [93].

При исследовании методом Монте-Карло конформационное пространство исследуется с помощью случайных движений. Новое состояние принимается, если его энергия ниже энергии предыдущего состояния.

Методы подгонки формы – это способы быстрого докинга, вычисляющие стерическую и электростатическую комплементарность заранее вычисленных конформаций лиганда и белковой мишени.

1.3.2 Оценочные функции

В виртуальном скрининге используются оценочные функции:

1. в процессе докинга они служат мерой качества подгонки расположения лиганда;
2. по окончанию докинга, они используются для ранжирования всех лигандов, для которых было найдено оптимальное решение задачи докинга.

Методы предсказания свободной энергии связывания различаются по своей точности и скорости. Оценочные функции можно разделить на три группы [95]:

1. эмпирические оценочные функции;
2. функции, основанные на силовых полях;
3. потенциалы средней силы.

Эмпирические оценочные функции используют различные зависимости, описывающие свойства, которые важны для связывания лигандов, для основного уравнения, предсказывающего энергию связывания белка и лиганда [94].

Силовые оценочные функции основываются на нековалентных членах классических силовых полей молекулярной механики.

При использовании оценочных функций, основанных на имеющихся данных, решающая роль отводится потенциалу средней силы. Данный потенциал кодирует структурную информацию, полученную из рентгеноструктурных данных для лиганд-белковых комплексов, в свободные энергии Гельмгольца взаимодействий пар атомов белка и лиганда.

Оценка определяется как сумма по всем межатомным взаимодействиям в комплексе.

1.3.3 Обработка результатов

Оценочные функции далеки от возможности количественно предсказывать свободные энергии связывания, поэтому необходимы продуманные стратегии обработки результатов для дальнейшей экспериментальной проверки. Большинство из них пытаются выявить ложноположительные результаты, увеличивая, таким образом, долю истинноположительных результатов.

Для отсечения лиганд-белковых комплексов с неудовлетворительной геометрией, применяются различные фильтры, которыми оценивают лиганд-белковые комплексы с точки зрения их стерического соответствия. Шталь и др. разработали серию фильтров [94], включающих долю объема лиганда, погруженную внутрь полости связывания, размер липофильных карманов на поверхности взаимодействия лиганда с белком, площадь доступной для растворителя поверхности лиганда, а также число близких контактов между атомами лиганда и белка, не связанными водородными связями.

Координаты, полученные с помощью докинга, по крайней мере, для наиболее интересных лиганд-белковых комплексов, можно далее изучать с помощью более сложных вычислительных методов с целью предсказания абсолютных значений свободной энергии связывания. Возможно применение более мощных оценочных методов, использующих молекулярную механику в сочетании с непрерывными моделями растворителя [95, 96] (например, MM-PBSA (Molecular Mechanics-Poisson-Boltzmann solvent accessible Surface Area) или MM-GBSA (Molecular Mechanics-Generalized Born Solvent Accessibility)) или даже квантовую механику [97, 98].

С целью сокращения числа виртуальных хитов, они группируются с учетом своего химического разнообразия. Проведение визуального анализа предсказанной структуры комплекса белка и хита позволяет убедиться в том, что лиганд размещен именно в активном центре.

Однако главная проблема заключается в том, что оценочная функция предсказывает верное решение в 40-50% случаев, что усложняет анализ

результатов докинга. Если доступны известные лиганды, то лучшим вариантом исследования будет испытание всевозможных комбинаций параметров докинга с последующим выбором для скрининга комбинации, которая лучше всего отделяет истинно активные соединения от неактивных.

1.4 Инъекционные лекарственные формы

1.4.1 Лиофилизат для приготовления раствора для инъекции

Инъекционные лекарственные формы – стерильные водные и неводные растворы, эмульсии, суспензии и сухие (в т.ч. лиофилизированные) препараты, предназначенные для парентерального введения и отпускаемые в специальных герметически закрытых сосудах. Сухие твердые вещества (порошки, пористые массы, таблетки) растворяют в стерильном растворителе непосредственно перед введением [99]. Инъекционные лекарственные формы предназначены для парентерального введения (подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутриартериально).

Лекарственные средства для парентерального применения – это стерильные препараты, предназначенные для введения путем инъекций, инфузий или имплантаций в организм человека или животного. К ним относятся растворы, эмульсии, суспензии, порошки и таблетки для получения растворов и имплантации, лиофилизированные препараты.

Парентеральный путь введения в организм лекарств имеет ряд преимуществ перед другими методами [100]:

1. быстрое действие и полная биологическая доступность лекарственного вещества;
2. точность и удобство дозирования;
3. возможность введения лекарственного вещества больному, находящемуся в бессознательном состоянии или, когда лекарство нельзя вводить через рот;
4. отсутствие влияния секретов ЖКТ и ферментов печени, что имеет место при внутреннем употреблении лекарств;

5. возможность создания больших запасов стерильных растворов, что облегчает и ускоряет их отпуск из аптек.

Наряду с преимуществами инъекционный путь введения имеет и некоторые недостатки:

1. при введении жидкостей через поврежденный покров кожи в кровь легко могут попасть патогенные микроорганизмы;

2. вместе с раствором для инъекций в организм может быть введен воздух, вызывающий эмболию сосудов или расстройство сердечной деятельности;

3. даже незначительные количества посторонних примесей могут оказывать вредное влияние на организм больного;

4. психоэмоциональный аспект, связанный с болезненностью инъекционного пути введения;

5. инъекции лекарств могут осуществляться только квалифицированными специалистами.

Парентеральное применение препаратов предполагает нарушение кожного покрова, что связано с возможным инфицированием патогенными микроорганизмами и введением механических включений. Поэтому стерильное производство по сравнению с другими отраслями промышленности имеет специфические особенности, которые диктуются требованиями к инъекционным лекарственным формам. Главные из них – отсутствие механических примесей, стерильность, стабильность, апирогенность, изотоничность, изоионичность, изогидричность (последние три требования, предъявляются к отдельным инъекционным растворам, что указывается в соответствующей нормативно-технической документации) [99].

1.4.2 Лиофилизат наночастиц для приготовления эмульсии для инъекции

Среди биосовместимых биодеградируемых сополимеров, широко используемых в нанофармацевтической области, особое внимание привлекают

алифатические эфиры молочной и гликолевой кислот (polylactic-co-glycolic acid – PLGA), которые могут использоваться для контролируемого высвобождения различных лекарственных веществ [101, 102].

PLGA являются важными веществами для производства систем наночастиц, вследствие своей хорошей тканевой совместимости и так как они являются нетоксичными. Сополимеры растворимы в органических растворителях (хлороформ, ацетон, этилацетат, дихлорметан, ацетон и этилацетат) и нерастворимы в воде; однако они могут захватывать воду и разбухать в разной степени в зависимости от их молекулярной массы и от их состава. Однако, PLGA обладают недостатком – они могут быть более гидрофобными относительно вещества, которое они несут. Данный недостаток может приводить к разложению несущих веществ, вследствие слабокислого окружения вокруг PLGA [103, 104].

Полилактидгликолиды получают путем ферментного брожения мальтозы или декстрозы, сусла зерна или картофеля или синтетическим путем [101, 104].

Существует две изомерные формы молочной кислоты: L- и D-изомерные формы. Также, существует ее рацемическая форма. Продукт, получаемый методом ферментации, содержит около 99,5% L-изомера и около 0,5% D-изомера [105, 106]. Молочная кислота, представляет собой бесцветные кристаллы и способна образовывать лактид, который при полимеризации образует высокомолекулярные полимеры (polylactide – PLA) [107, 108].

На основе двух полимеров: лактида и гликолида (PGA) возможно получение семейства сополимеров – PLGA [109, 110]. Сополимеры PLGA могут быть получены с разной структурой и с разными молекулярными массами. Полимер хорошо растворим в основных растворителях, особенно хорошо растворяется в тетрагидрофуране, хлорсодержащих растворителях и этилацетате. В воде PLGA разрушается с выделением молекул воды и углекислого газа в результате гидролиза эфирных связей [111, 112].

Включенные в PLGA вещества диффундируют за счет биодеградации полимерной матрицы [113-115].

Сополимеры PLGA различаются соотношением лактида и гликолида, за счет чего молекула PLGA имеет разные скорости биодеградации [107, 116].

На скорость биодеградации также влияют эффекты концевых групп (эфирная, карбоксильная или гидроксильная), молекулярная масса комплекса, геометрическая структура полученного продукта, килостность и температура окружающей среды [108, 117, 118].

Разрушение эфирной связи происходит вдоль оси под действием воды. Сначала образуются длинноцепочечные полимеры и водорастворимые малые фрагменты. Уменьшение молекулярной массы комплекса ведет к увеличению гидрофильности PLGA. [104, 119].

Таким образом, при дальнейшей биодеградации комплекса PLGA, лекарственное вещество высвобождается из полимерной матрицы неизмененным и способно оказывать целевой терапевтический эффект [103, 120].

Кроме физико-химических свойств существуют другие факторы: особенности материала (полимер, ЛВ, растворитель, стабилизатор, пеногаситель); параметры получения (количество полимера и ЛВ, вязкость среды, концентрация ПАВ); условия синтеза (температура, давление, частота вращения мешалки) [111, 114].

Наночастицы на основе PLGA получают различными способами [121]: метод эмульгирования (метод простой эмульсии и метод двойной эмульсии) и метод преципитации [114, 115, 121].

Оба метода получения комплексов наночастиц основаны на способности образовывать пленки на границе раздела фаз вода/растворитель [108, 117, 118].

Возможность направленного целевого транспорта лекарственных веществ в органы-мишени, способность контролировать времена деградации, практически отсутствие токсичности, возможность конструирования наночастиц с разным размером и пористостью делают перспективным

разработку систем целенаправленного доставки лекарственных веществ, основанных на комплексах PLGA [108, 120, 121, 117, 118].

1.5 Лиофилизация

Лиофилизация (сублимация) – один из эффективных путей повышения стабильности малоустойчивых и термолабильных лекарственных веществ [122]. При высушивании методом сублимации создаются условия, при которых вещества претерпевают минимальные химические превращения, тем самым уменьшается количество дестабилизирующих факторов и повышается стабильность препарата.

Лиофилизация основана на способности льда при определенных условиях возгоняться, минуя жидкую стадию. Лиофилизация позволяет повысить стабильность лекарственных препаратов [122, 123].

Для проведения лиофилизации необходимо соблюдение двух важных условий: наличие основной части влаги в лекарственном препарате в замороженном состоянии и поддержание разницы парциальных давлений паров воды и давления в окружающей среде.

Лиофилизация обладает рядом преимуществ: позволяет избавиться от воздействия высоких температур при сушки, используется при стерильном производстве, увеличивает стабильность и сроки годности лекарственных препаратов.

Процесс лиофилизации состоит из трех основных этапов: замораживание, первичная сушка и досушивание (удаление остаточной влаги) [124].

Замораживание

Различают режимы замораживания в зависимости от необходимой температуры замораживания, которая обуславливается эвтектической точкой раствора лекарственного препарата [122].

При выборе режима замораживания также необходимо определить соотношение продолжительности и скорости заморозки.

Конечными целями замораживания являются: сохранение формы лиофилизата, уменьшение пенообразования при использование пониженного давления и снижение воздействия реакций, зависящих от температуры.

Первичная сушка

Сублимационная первичная сушка – процесс, характеризующийся скоростью диффузии влаги из растворенного замороженного лекарственного препарата в окружающую среду, заключающийся в сублимации льда из замороженного лекарственного препарата [122-125]. Конечной целью первичной сублимационной сушки является удаление льда из замороженного лекарственного препарата с минимальным ущербом для его качества. Полученный после первичной сублимационной сушки препарат имеет пористую структуру.

Досушивание (удаление остаточной влаги)

Под досушиванием подразумевают удаление остаточной абсорбированной воды путем изменения давления в лиофилизационной камере камере [124].

Удаление пара из сухого продукта происходит за счет удаления вышедшего на поверхность твердого пористого вещества газа, когда пар распространяется за счет молекулярного расширения в соответствии с законами растворимости газов в твердых телах и зависит от разницы между напряжением пара связанный воды и частичным давлением пара в камере.

Конечной целью досушивания является уменьшение содержания влаги первично лиофилизированного лекарственного препарата для увеличения его стабильности.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Использованные реагенты и материалы

При проведении технологических, химико-фармацевтических и биологических исследований использовали вспомогательные вещества и реагенты, разрешенные к медицинскому применению и отвечающие требованиям действующих нормативных документов (общих и частных фармакопейных статей ГФ XI, ГФ XII изданий, ГОСТов, ТУ, ФСП).

В работе использованы аминокислоты, содержащие защитные группы, полимерная подложка и растворители производства «Applied Biosystems», США. Аденозин-5'-дифосфат (АДФ) (динатриевая соль), цитрат натрия трехзамещенный, поливиниловый спирт (ПВС) 87÷90 % hydrol. (average mol. wt 30,000 – 70,000), D-маннитол (D-маннит), поливинилпирролидон (ПВП) average mol. wt 40,000, поливиниловый спирт (ПВС), метилцеллюлоза (МЦ), диметилсульфоксид (ДМСО), дихлорметан, пепсин и панкреатин производства Sigma-Aldrich, США. Хлороформ (хч, стаб.), кислота хлористоводородная производства Химмед Синтез, РФ.

Сополимер молочной и гликолевой кислот PURASORB PDLG 5004. 50/50 DL-Lactide/Glycolide copolymer (molar ratio); inherrent viscosity 0.41 dL/g производства PURAC biochemicals, Нидерланды.

Воду очищенную получали на аквадистилляторе ДЭ-4 модель 737 (РФ). Для приготовления растворов использовали деионизованную воду (в/д), полученную на установке Milli-Q Water Purification Sistem (Millipore, США). Растворы соединений готовили непосредственно перед экспериментом. Из-за плохой растворимости в буферном растворе некоторые исследуемые соединения (производные фуроксана) сначала растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) с последующим разведением до требуемой концентрации. Контрольные пробы содержали то же количество ДМСО.

Буферные растворы, антикоагулянты, растворы солей хранили при 4°C.

2.2 Компьютерное моделирование антагонистов интегрин-рецепторов тромбоцитов

Моделирование взаимодействия белка интегрин α_{IIb}/β_3 с пептидными лигандами проводилось с помощью программного комплекса «Алгокомб» [126, 127], модифицированного для учета внутренних нековалентных взаимодействий лиганда и явного учета молекул воды в сайте связывания. Общепринятым источником используемой при расчётах информации о пространственной структуре белков является открытая база данных PDB (Protein Data Bank) [128].

2.3 Метод прогнозирования активностей фуроксанов

Для исследования антиагрегационной активности фуроксанов – доноров оксида азота выполняли прогноз биологических активностей производных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана с помощью программы PASS Professional 2010.1 (Prediction of Activity Spectra for Substances).

2.4 Методика синтеза пептидов

Синтез пептидов выполняли на твердой фазе в условиях автоматического пептидного синтезатора ABI 433A PeptideSynthesizer (Applied Biosystems, США), используя FastMoc 0.25-стратегию [129, 130].

Стратегия FastMoc 0.25 подразумевает последовательное присоединение остатков аминокислот к нерастворимой полимерной подложке. Базовая лабильная группа Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил – используется для защиты N-групп каждого аминокислотного остатка. Остатки, которые имеют потенциально реактивные боковые цепи, защищены кислотонеустойчивыми группами.

После удаления группы Fmoc пиперидином, следующая защищенная аминокислота добавляется, используя или реактив сцепления, или предварительно активированное производное аминокислоты.

В качестве активатора первой аминокислоты в Fmoc-стратегии в реакции присоединения ее к смоле выступает дициклогексилкарбодиимид (DCC). Реакция протекает в присутствии 4-диметиламинопиридина (DCC/DMAP), который играет роль катализатора процесса.

В качестве активатора второй и последующих аминокислот в Fmoc-стратегии выступает 1-гидроксибензотриазол в дициклогексилкарбодиимиде (HOBr/DCC). Реакция протекает с образованием активированной аминокислоты и N,N'-дициклогексилмочевины (DCU).

Все вышеперечисленные операции протекают в пептидном синтезаторе.

Для снятия пептида со смолы в вытяжном шкафу в полипропиленовой пробирке готовили смесь со следующим соотношением компонентов: тианизол (TAN) – 2,5%, триизопропилсилан (TIPS) – 2,5%, этандитиол (EDT) – 5%, трифторуксусная кислота (TFA) – 90%. Приготовленную смесь помещали на лед до остывания на 20-30 мин. Затем в холодную смесь для снятия пептида помещали пептид-смолу и перемешивали. Помещали пробирку с пептид-смоловой в полипропиленовую пробирку, закрывали и выдерживали на качалке в течение 4 часов.

Экстракцию пептида со смолы проводили на стеклянном фильтр-вороночке в вытяжном шкафу. Воронку предварительно ополаскивали дважды метилтретбутиловым эфиром (МТВЕ). По окончанию снятия сливали смесь со смоловой и пептидом на фильтр Шотта. Промывали пробирку, в которой шла реакция TFA, смыв сливали на фильтр. Фильтровали при небольшом вакууме до осушения смолы. Добавляли холодный МТВЕ, тщательно промывали смолу и фильтровали до осушения. Промывали пробирку, в которой находилась пептид-смола, трижды холодным МТВЕ и добавляли смыв к основному сливу. Тщательно перемешивали взвесь, оставляли не менее, чем на 1 час при –20°C.

Осадок отфильтровывали, сушили.

2.5 Методика очистки полученных соединений

Очистку пептида осуществляли с помощью высокоэффективного препаративного жидкостного хроматографа PuriFlash 450 (InterChim).

Условия ВЭЖХ: катридж Interchim PF-C18 (20g), 15 мкм. Детекторная ячейка: препаративная, скорость потока – 20,0 мл/мин, длина волны: диапазон 200 – 400 нм, диапазон детектирования: 2 AUFS, величина петли: 2 мл (объем инъекции 1,5 – 1,8 мл образца), элюент A: 5,0% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты в воде, элюент B: 0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Градиент: 10-90% B в течение 12 мин.

2.6 Методика подтверждение строения полученных соединений

Строение синтезированных соединений подтверждали методами ЯМР ^1H (в том числе с привлечением двумерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), хромато-масс-спектроскопии и элементным анализом.

Спектры ЯМР ^1H регистрировали на приборе Bruker Avance 600 mhz; химические сдвиги измеряли относительно сигнала растворителя (ДМСО-d₆, δ_{H} 2,5 м.д.). Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Waters MSD SQD – ESI с УФ- и масс-спектрометрическими детекторами: длина волны 220 нм, температура пробоотборника 15°C, температура термостата колонок 40°C. MSD – параметры: температура источника 130°C, температура газа 400°C, напряжение на капилляре 3kV; колонка Waters Acuity 1,7 μm 2,1 · 50 mm. Градиент от 5 до 100% B за 4 мин (A: 0,1% муравьиной кислоты в воде; B: 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле).

Элементный анализ соединений определяли на CHN-анализаторе Perkin Elmer 2400.

2.7 Методика определения антиагрегационной активности соединений *in vitro*

Оценку специфической активности антиагрегационного действия соединений проводили *in vitro* с использованием крови здоровых доноров на

базе Межклинической коагулометрической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Взятие крови проводили непосредственно перед исследованием, используя в качестве антикоагулянта цитрат натрия (3,8%). Соотношение антикоагулянта : кровь соответствовало 1:9.

Антиагрегационную активность полученного соединения изучали на богатой тромбоцитами плазме с использованием аденоzinинфосфата (АДФ) в качестве индуктора агрегации тромбоцитов.

Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь сразу после получения центрифугировали в течение 10 минут при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения безтромбоцитарной плазмы. Все процедуры проводили в полистирольной посуде, обладающей тромборезистентными свойствами. В течение всего периода исследования богатая и безтромбоцитарная плазма находились при комнатной температуре, а запись агрегации тромбоцитов осуществляли при 37°C. Для исследования специфической антиагрегационной активности руководствовались требованиями к доклиническим исследованиям фармакологических веществ данного класса, утвержденными Фармакологической службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития [131, 132].

Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна (Born, 1962) [133-135], основанного на изменении пропускания света (540 нм) через исследуемую плазму при ее постоянном перемешивании (1000 об/мин). В качестве образца сравнения использовали безтромбоцитарную плазму. Светопропускание через безтромбоцитарную плазму принимали за 100%, а светопропускание через богатую тромбоцитами плазму принимали за 0%. Концентрацию тромбоцитов доводили в богатой тромбоцитами плазме до $2,5 \cdot 10^{-8}$ клеток/мл с помощью разведения бедной тромбоцитами плазмой.

Для проведения исследования применяли двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов/счетчик 230ЛА-2 (НПФ «Биола»). Объем

пробы составлял 300 мкл. Время проведения измерения – 8 мин. В качестве индуктора использовали АДФ в концентрации 50 мкМ. Получаемые агрегограммы представляют собой зависимость степени агрегации от времени, прошедшего после добавления индуктора агрегации. Изучаемое соединение (в виде водного раствора, при необходимости, содержащего ДМСО до 0,2%) в разных концентрациях добавляли в пробу до внесения индуктора агрегации (АДФ) в трех независимых экспериментах.

2.8 Методики определения степени включения гетеромерного пептида в наночастицы

Суспензию наночастиц осаждали центрифугированием на центрифуге Beckman L8-60M (Beckman, США) при скорости 30 000 об/мин в течение 30 мин. Затем определяли концентрацию не включенного гетеромерного пептида в супернатанте с помощью хромато-масс-спектрометрического анализа. Степень включения гетеромерного пептида в наночастицы рассчитывали как отношение разности между исходной концентрацией гетеромерного пептида в реакционной смеси и концентрацией свободного гетеромерного пептида к исходной концентрации и выражали в процентах от исходной концентрации.

2.9 Методики приготовления буферных растворов

Буферные растворы готовили согласно общей фармакопейной статье «Буферные растворы» (ОФС 42-0072-07) ГФ XII часть 1 стр. 443. pH растворов измеряли с помощью pH-метр 3210 SET 2 с электродом sentix 41 (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Германия).

2.10 Оценка качества лиофилизатов

Качество лиофилизатов оценивали с помощью методик, описанных в фармакопейных статьях ГФ XII при определении растворимости в воде для инъекции (часть 1, стр. 92), цветности (часть 1, стр. 93), прозрачности

(часть 1, стр. 98), pH (часть 1, стр. 85), остаточного органического растворителя (часть 1, стр. 115), стерильности (часть 1, стр. 150), пирогенности (часть 1, стр. 125), бактериальных эндотоксинов (часть 1, стр. 128).

Для определения потери в массе при высушивании и средней массы использовали методики ГФ XI (часть 1, стр. 176, часть 2, стр. 140).

2.11 Статистическая обработка результатов

Результаты экспериментов обрабатывали статистически и представляли средними величинами из нескольких независимых экспериментов \pm стандартные отклонения. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента.

3 РАЗРАБОТКА СОЕДИНЕНИЙ – ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

3.1 Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов

3.1.1 Молекулярное моделирование пентапептидов

Моделирование взаимодействия белка интегрин α_{IIb}/β_3 с пептидными лигандами проводили с помощью программного комплекса «Алгокомб», модифицированного для учета внутренних нековалентных взаимодействий лиганда и явного учета молекул воды в сайте связывания. Общепринятым источником используемой при расчётах информации о пространственной структуре белков является открытая база данных PDB (Protein Data Bank).

Расчет оценки связывания [127] с белком проводили для пентапептидов вида «A-B-C-Asp-D», где «A», «B», «C», «D» – L-аминокислотные остатки, структуры которых варьировали в процессе моделирования; в качестве аминокислоты «C» – глицин или аланин. Наличие аспарагиновой кислоты (Asp) на четвертой позиции хорошо влияет на связывание с белком (согласно визуальному анализу нативного пептида в комплексе с белком), так как этот остаток может образовывать ионную связь с ионом магния в активном сайте белка интегрин. Таким образом, провели докинг для около 20 000 пептидов.

В базе данных PDB представлено 17 комплексов белка интегрин α_{IIb}/β_3 . Для докинга и расчета оценки связывания были выбраны структуры с идентификаторами 2vdp и 2vc2.

2vdp – Комплекс белка-мишени с октапептидом. Преимуществом комплекса для докинга пентапептидов является то, что в комплексе с белком уже находится пептид, то есть теоретически конформация активного сайта белка лучше соответствует связыванию с пептидами. При докинге явным образом учитывалось наличие двух молекул воды в активном сайте белка: молекулы, образующей водородную связь с С-концевым остатком нативного лиганда и молекулы воды, образующей водородную связь с кислородом третьего с С-конца остатка основной цепи нативного лиганда.

2vc2 – Комплекс с лигандом непептидной природы. Преимуществом этого комплекса при докинге пептидов является то, что размер лиганда в комплексе близок к размерам пептидов из пяти аминокислот (масса лиганда 522 дальтона). Поэтому можно предположить, что конформация активного сайта белка лучше подходит для взаимодействия с лигандами такого размера.

В обоих комплексах лиганды в активном сайте образуют ионную связь с ионом магния. Перебор конформаций лиганда при докинге начинался с правильно позиционированного фрагмента кислоты, образующей ионную связь с ионом магния.

Для всех рассматриваемых пептидов провели докинг и рассчитали оценку связывания с конформациями белка α ль/β₃, представленными в комплексах 2vdp и 2vc2. Для каждой конформации белка выбрали 60 веществ с наилучшими оценками связывания. Оценки связывания при докинге в комплекс 2vdp изменялись от 16,52 (лучшее вещество) до 13,89; при докинге в комплекс 2vc2 оценка связывания изменялась от 10,78 до 8,04. Результаты рассчитанных оценок связывания демонстрировали, что пептиды существенно лучше располагались в сайте комплекса 2vdp [136-138].

Структуры и оценки связывания пентапептидов при докинге в комплекс 2vdp представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Формулы и оценки связывания синтезированных пентапептидов при докинге в комплекс 2vdp

Шифр	Пептид	Оценка связывания
1	Phe-Ile-Ala-Asp-Thr	15,39
2	Lys-His-Ala-Asp-Asp	16,52
3	His-Ile-Gly-Asp-Asp	16,20
4	Arg-Val-Gly-Asp-Arg	15,94
5	Cys-His-Ala-Asp-Asp	15,92
6	Arg-Phe-Ala-Asp-Asp	15,81
7	Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg	15,64
8	Arg-Met-Ala-Asp-Asp	15,62
9	Arg-Phe-Gly-Asp-Asp	15,59
10	Met-His-Ala-Asp-Asp	15,58
11	Lys-Ile-Ala-Asp-Asp	15,47

Шифр	Пептид	Оценка связывания
12	Arg-Ser-Gly-Asp-Arg	15,42
13	Arg-Phe-Gly-Asp-Arg	15,39
14	Arg-Trp-Gly-Asp-Trp	16,19
15	Arg-Ile-Gly-Asp-Trp	15,89
16	Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp	15,46
17	Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp	15,36
18	Leu-His-Gly-Asp-Asp	15,29
19	Arg-His-Gly-Asp-Arg	15,24
20	Arg-Arg-Ala-Asp-Thr	15,00

Пентапептиды с большей оценкой связывания с комплексом белка интегрин α_{IIb}/β_3 теоретически должны проявлять лучшие антиагрегационные свойства.

3.1.2 Синтез пептидов с вероятной антиагрегационной активностью

Синтез 20 наиболее эффективных (по результатам компьютерного моделирования) пептидов осуществляли методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-стратегии. Схема синтеза пептидов представлена на рисунке 9.

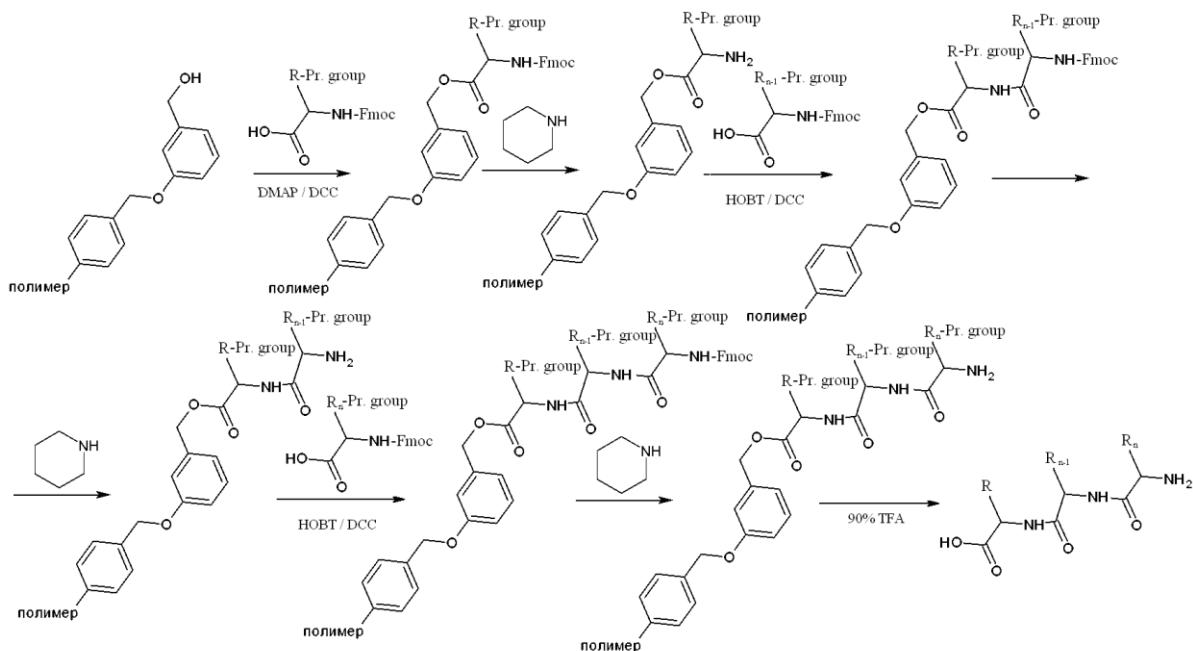


Рисунок 9 – Схема синтеза пептидов, где R = остатки аминокислот, Pr. group (protected group) = защитные группы аминокислот

Полученные в результате синтеза пептиды очищали с помощью высокоэффективного препаративного жидкостного хроматографа PuriFlash 450 (InterChim). Содержание основного вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор) на приборе Waters MSD SQD – ESI с УФ- и масс-спектрометрическими детекторами для всех пептидов составляло более 98%.

Строение синтезированных соединений подтверждено методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ^1H -спектроскопии (с привлечением двумерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), элементного анализа. Данные представлены в разделе 3.3.5

3.1.3 Определение антиагрегационной активности синтезированных пептидов *in vitro*

Оценку специфической активности антиагрегационного действия соединений проводили *in vitro* с использованием крови здоровых доноров на базе Межклинической коагулометрической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Антиагрегационная активность полученного соединения изучалась на богатой тромбоцитами плазме с использованием аденоzinидифосфата (АДФ) в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна (Born, 1962) [133-135] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов/счетчике 230LA-2 (НПФ «Биола»). Изучаемое соединение (в виде водного раствора, при необходимости, содержащего ДМСО до 0.2%) в разных концентрациях добавляли в пробу до внесения индуктора агрегации (АДФ) в трех независимых экспериментах.

Проведенная оценка специфической активности соединений свидетельствовала о способности полученных соединений уменьшать агрегацию тромбоцитов [136-138]. Структуры и результаты исследований пептидов *in vitro* на крови здоровых доноров представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Формулы синтезированных пептидов и результаты исследований антиагрегационных активностей *in vitro*

Шифр	Пептид	IC ₅₀ , мкМ
1	Phe-Ile-Ala-Asp-Thr	12,53±0,09
2	Lys-His-Ala-Asp-Asp	11,13±0,25
3	His-Ile-Gly-Asp-Asp	15,47±0,11
4	Arg-Val-Gly-Asp-Arg	17,60±0,16
5	Cys-His-Ala-Asp-Asp	55,20±0,33
6	Arg-Phe-Ala-Asp-Asp	28,23±0,35
7	Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg	14,50±0,17
8	Arg-Met-Ala-Asp-Asp	34,52±0,04
9	Arg-Phe-Gly-Asp-Asp	60,79±0,07
10	Met-His-Ala-Asp-Asp	58,39±0,11
11	Lys-Ile-Ala-Asp-Asp	14,68±0,13
12	Arg-Ser-Gly-Asp-Arg	41,95±0,08
13	Arg-Phe-Gly-Asp-Arg	26,15±0,09
14	Arg-Trp-Gly-Asp-Trp	70,33±0,09
15	Arg-Ile-Gly-Asp-Trp	50,10±0,08
16	Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp	32,56±0,09
17	Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp	42,59±0,14
18	Leu-His-Gly-Asp-Asp	79,53±0,07
19	Arg-His-Gly-Asp-Arg	57,37±0,11
20	Arg-Arg-Ala-Asp-Thr	68,28±0,09

Полученные результаты показывают наличие доз-зависимого ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крови здоровых доноров под действием новых пептидных ингибиторов GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов, что соответствует результатам компьютерного моделирования.

3.2 Исследование возможности использования имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с; 3,4-с']дифуроксанов как ингибиторов агрегации тромбоцитов

Известно также, что ингибирование процессов тромбообразования происходит под воздействием оксида азота (NO). [9, 10]. Один из классов химических соединений, производные которых являются донорами оксида азота, фуроксаны [11].

Имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаны (таблица 4) – гетероциклические соединения, в состав которых входят два фуроксановых цикла – потенциальных донора оксида азота.

Для исследования были рассмотрены различные имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаны. С использованием программы PASS Professional 2010.1 был выполнен прогноз биологической активности соединений подобного типа и установлена высокая вероятность проявления ими антиагрегационной активности.

Соединения 21 – 42 (таблица 4) были синтезированы на кафедре химии ГБОУ ВПО Марийского государственного университета и предоставлены для экспериментальной проверки антитромбоцитарной активности [142].

Для получения соединений, влияющих на генерацию азота различными способами, были синтезированы гетеромерные пептиды 43 и 44. Особенностью соединений 43, 44 является то, что имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанный фрагмент, входящий в их состав, относится к экзогенным донорам оксида азота, а аргинин и глутамин стимулируют эндогенную генерацию оксида азота. Гетеромерные пептиды 43, 44 (таблица 4) получали в условиях автоматического пептидного синтезатора с использованием Fmoc-стратегии (рисунок 10) [141, 143].

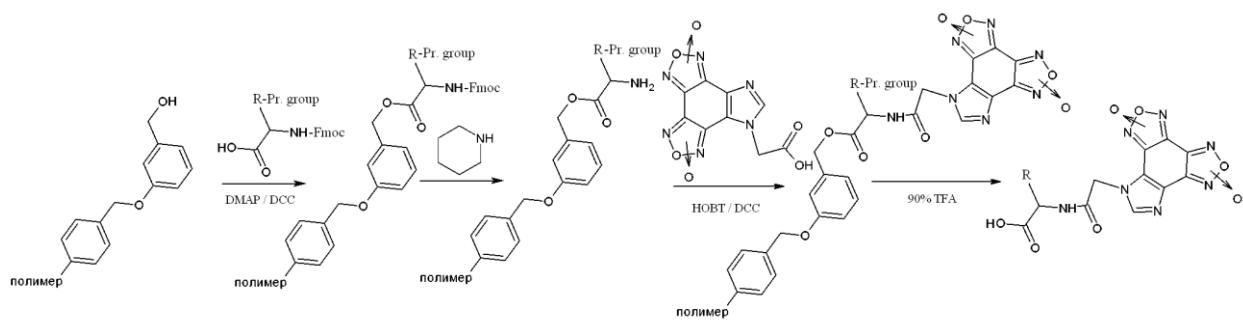


Рисунок 10 – Схема синтеза гетеромерных пептидов 43 (R = -CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, Pr. group (protected group) = Pbf) и 44 (R = -CH₂CH₂C(O)NH₂, Pr. group = Trt).

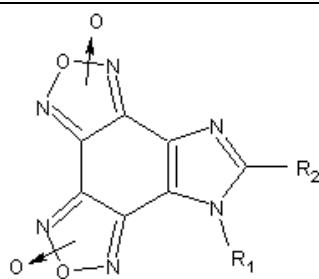
Оценку специфической активности антиагрегационного действия соединений проводили *in vitro* с использованием крови здоровых доноров на

базе Межклинической коагулометрической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Антиагрегационная активность полученного соединения изучалась на богатой тромбоцитами плазме с использованием аденоzinидифосфата (АДФ) в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна (Born, 1962) [103, 104, 105] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов/счетчике 230LA-2 (НПФ «Биола»). Изучаемое соединение (в виде водного раствора, при необходимости, содержащего ДМСО до 0,2%) в разных концентрациях добавляли в пробу до внесения индуктора агрегации (АДФ) в трех независимых экспериментах.

Экспериментальная проверка полностью подтвердила сделанный прогноз: соединения, представленные в таблице 4, обладают выраженным антиагрегационным эффектом *in vitro*.

Таблица 4 – Антиагрегационная активность имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с; 3,4-с']дифуроксанов (21 – 44) *in vitro*.

Шифр	R ₁	R ₂	IC ₅₀ , мкМ
21	H	H	1,05±0,08
22	H	CH ₃	0,41±0,01
23	H	C ₂ H ₅	1,81±0,01
24	H	C ₃ H ₇	0,61±0,01
25	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	0,42±0,03
26	H	C ₄ H ₉	1,12±0,03
27	CH ₃	H	0,71±0,01
28	C ₂ H ₅	H	0,81±0,02
29	C ₃ H ₇	H	0,62±0,02
30	C ₄ H ₉	H	1,41±0,03
31	C ₅ H ₁₁	H	0,72±0,01
32	C ₆ H ₁₃	H	1,81±0,01



Шифр	R ₁	R ₂	IC ₅₀ , мкМ
33	CH ₂ CH=CH ₂	H	1,21±0,01
34	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	H	0,11±0,01
35	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	CH ₃	0,30±0,01
36	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	0,71±0,02
37	CH ₂ C(O)OH	H	1,06±0,07
38	CH ₂ C(O)OH	CH ₃	2,42±0,09
39	CH ₂ C(O)OH	C ₂ H ₅	1,55±0,06
40	CH ₂ CN	H	0,41±0,01
41	H	NO ₂	1,81±0,01
42	H	CH ₂ OH	0,61±0,01
43	CH ₂ C(O)-Arg	H	0,42±0,03
44	CH ₂ C(O)-Gln	H	1,12±0,03

Результаты исследования антиагрегационной активности для гетеромерных пептидов 43 и 44 представлены в таблице 5, рисунке 11 и таблице 6, рисунке 12 соответственно. На рисунках представлены зависимости агрегации тромбоцитов от концентрации пептидов, с помощью данных таблиц и рисунков определяли IC₅₀.

Таблица 5 – Результаты исследования специфической антиагрегационной активности N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (43)

Концентрация N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (43), М	% агрегации в присутствии N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (43)
0	50,4
0,15·10 ⁻⁶	44,1
0,3·10 ⁻⁶	30,5
0,45·10 ⁻⁶	24,3
0,55·10 ⁻⁶	19,2

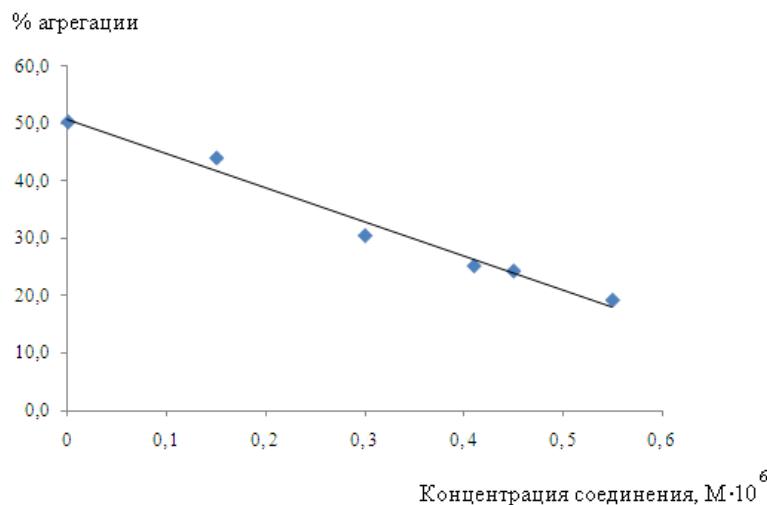


Рисунок 11 – Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации соединения 43

Таблица 6 – Результаты исследования специфической антиагрегационной активности N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (44)

Концентрация N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (44), М	% агрегации в присутствии N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана (44)
0	48,1
$0,1 \cdot 10^{-6}$	39,2
$0,2 \cdot 10^{-6}$	30,5
$0,3 \cdot 10^{-6}$	20,4
$0,4 \cdot 10^{-6}$	14,7
$0,5 \cdot 10^{-6}$	10,1

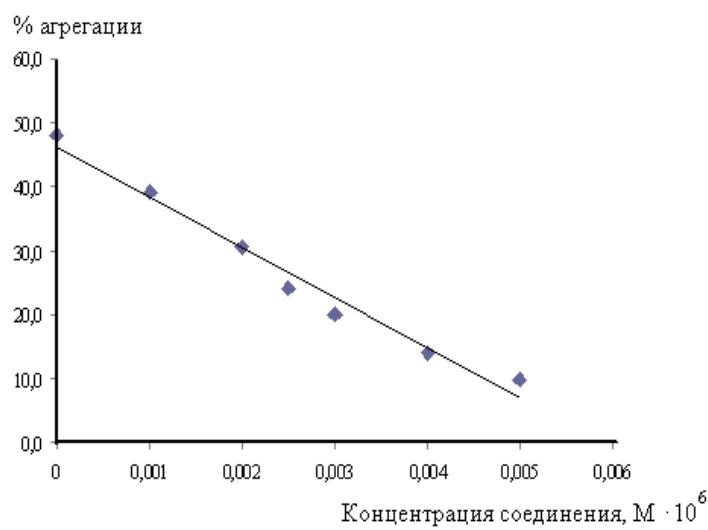


Рисунок 12 – Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации соединения 44

Таким образом, подтверждена возможность использования производных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана – доноров оксида азота, в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов, а соединение 43 проявило более выраженную антиагрегационную активность по сравнению с базовым имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаном (соединение 21). По результатам исследования антиагрегационная активность имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанов (IC_{50} 0,11 – 2,42) лучше антиагрегационной активности пептидов (1 – 20: IC_{50} 11,13 – 79,53). Поэтому имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксаны вероятно можно использовать в качестве фармакофра при создании «гибридных» антагрегационных соединений.

3.3 Исследование возможности использования гетеромерных пептидов на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана в качестве антиагрегационных соединений

3.3.1 Компьютерное моделирование гетеромерных пептидов

Для создания соединений, обладающих более выраженными антиагрегационными свойствами по сравнению с пептидами, были исследованы вещества с двумя различными механизмами воздействия на агрегацию тромбоцитов, состоящие из двух фармакофорных групп: пептидной – ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов и фуроксановой – доноры оксида азота.

С помощью программы «Алгокомб» выполнили компьютерное моделирование связывания гетеромерных пептидов с имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксановым фрагментом на N-конце с белком интегрин α_{IIb}/β_3 . Расчет оценки связывания с белком интегрин α_{IIb}/β_3 проводили для соединений вида «Fur-A-B-C-Asp-D», где «Fur» – карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан; «A», «B», «C», «D» – L-аминокислотные остатки, структура которых варьировали в процессе моделирования; в качестве аминокислоты «C» рассматривали

глицин или аланин. Всего было сгенерировано 48 000 молекул. Для докинга из базы данных PDB был выбран комплекс белка интегрин $\alpha_{II}\beta_3$ с идентификатором 2vdP.

Ранее мы проводили расчет оценки связывания и докинг пептидов, построенных из стандартных аминокислот, с таким же комплексом белка интегрин $\alpha_{II}\beta_3$. Докинг начинали с правильного расположения кислотного фрагмента гетеромерного пептида для учета наличия ионной связи лиганда с ионом магния в активном сайте. Так же в процессе докинга учитывали наличие двух молекул воды в активном сайте белка. Молекулы воды образуют водородные связи с C-концевым остатком и с кислородом третьего с C-конца остатка нативного лиганда.

В таблице 7 представлены оценки связывания для гетеромерных пептидов.

Таблица 7 – Оценки связывания для полученных соединений

Шифр	Пептид	Оценка связывания
45	<i>Fur-Phe-Ile-Ala-Asp-Thr</i>	13,51
46	<i>Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp</i>	17,30
47	<i>Fur-His-Ile-Gly-Asp-Asp</i>	13,30
48	<i>Fur-Arg-Val-Gly-Asp-Arg</i>	13,72
49	<i>Fur-Cys-His-Ala-Asp-Asp</i>	13,06
50	<i>Fur-Arg-Phe-Ala-Asp-Asp</i>	7,72
51	<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg</i>	8,11
52	<i>Fur-Arg-Met-Ala-Asp-Asp</i>	7,52
53	<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Asp</i>	8,89
54	<i>Fur-Met-His-Ala-Asp-Asp</i>	9,59
55	<i>Fur-Lys-Ile-Ala-Asp-Asp</i>	14,04
56	<i>Fur-Arg-Ser-Gly-Asp-Arg</i>	6,06
57	<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Arg</i>	7,99
58	<i>Fur-Arg-Trp-Gly-Asp-Trp</i>	10,83
59	<i>Fur-Arg-Ile-Gly-Asp-Trp</i>	13,95
60	<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp</i>	9,64
61	<i>Fur-Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp</i>	11,19
62	<i>Fur-Leu-His-Gly-Asp-Asp</i>	9,42
63	<i>Fur-Arg-His-Gly-Asp-Arg</i>	6,64
64	<i>Fur-Arg-Arg-Ala-Asp-Thr</i>	7,54

В результате наилучший из всех гетеромерных пептидов – *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (*Fur-KHADD*, 46) – получил оценку связывания 17,30, чуть выше, чем лучший пептид, построенный из стандартных аминокислот.

Замечено, что гетеромерные пептиды удачно размещаются в имеющейся на белке полости (несмотря на немного ухудшившуюся оценку связывания в целом). Из этого следует: имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']difуроксановый фрагмент, несмотря на сравнительно большой размер, не мешает связыванию гетеромерных пептидов с белком. Для примера на рисунке 13 представлено расположение гетеромерного пептида *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46) на белке интегрин α_{IIb}/β_3 .

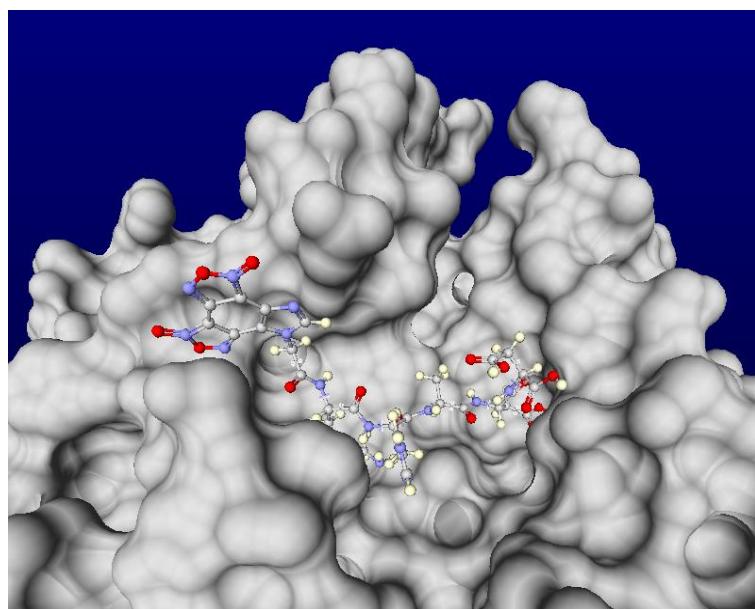


Рисунок 13 – Расположение модифицированного пептида *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46) на белка интегрин α_{IIb}/β_3

Имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']difуроксановый фрагмент удачно располагается в полости между остатками ser161-asp159 и ser225-ser226.

3.3.2 Синтез гетеромерных пептидов с вероятной антиагрегационной активностью

Расчетные соединения были получены с использованием Fmoc-стратегии. Общая схема синтеза гетеромерных пептидов представлена на рисунке 14.

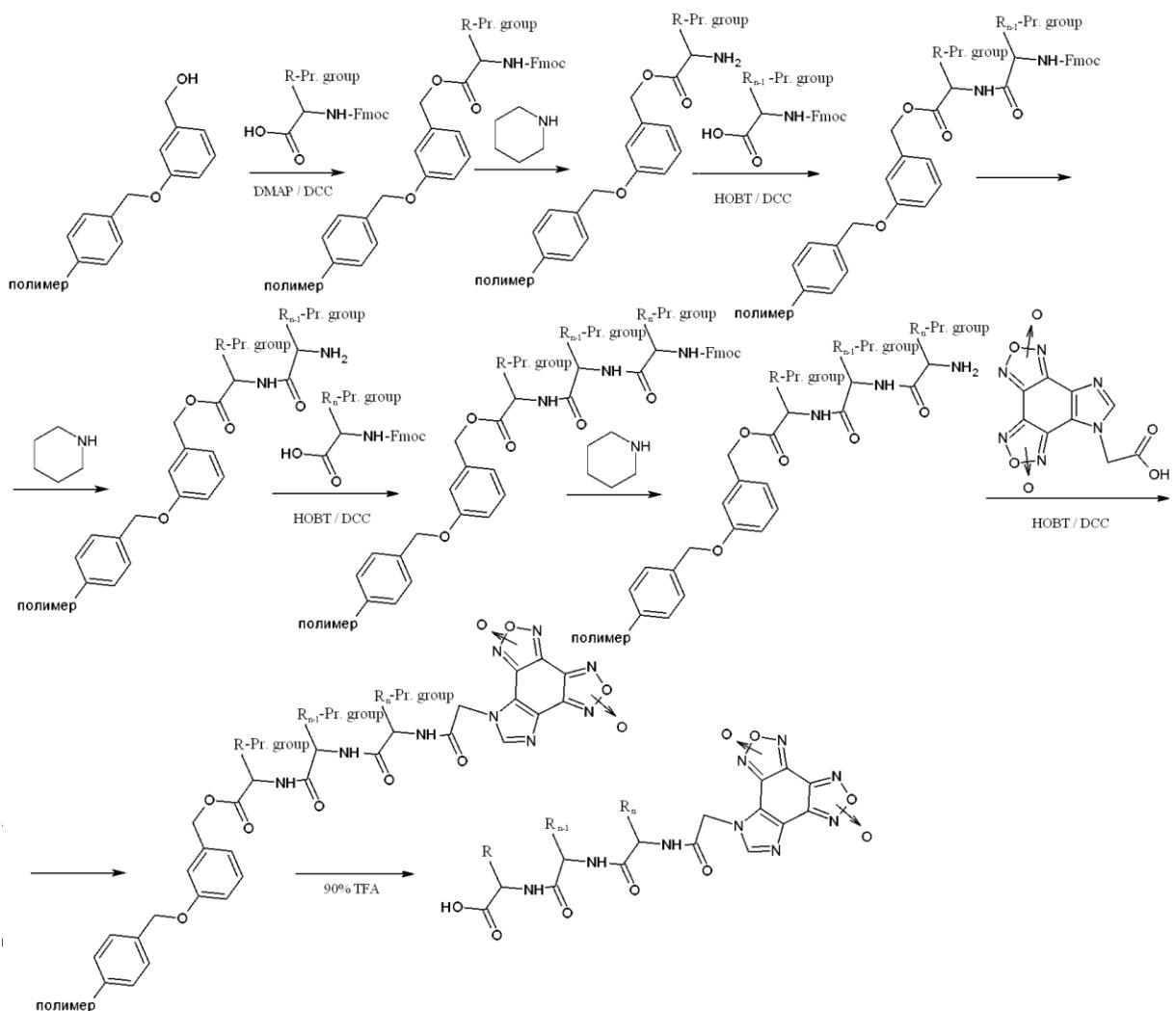


Рисунок 14 – Схема синтеза гетеромерных пептидов, где R = радикалы аминокислот, Pr. group (protected group) = защитные группы аминокислот

Полученные в результате синтеза гетеромерные пептиды очищали с помощью высокоэффективного препаративного жидкостного хроматографа PuriFlash 450 (InterChim).

Содержание основного вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор) на приборе Waters MSD SQD – ESI с УФ- и масс-спектрометрическими детекторами для всех гетеромерных пептидов составляло более 98%.

Строение синтезированных соединений подтверждено методами хромато-масс-спектрометрии, элементного анализа. Данные представлены в разделе 3.3.5

3.3.3 Определение специфической активности гетеромерных пептидов *in vitro*

Оценку специфической активности антиагрегационного действия соединений проводили *in vitro* с использованием крови здоровых доноров на базе Межклинической коагулометрической лаборатории Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Антиагрегационная активность полученных соединений изучалась на богатой тромбоцитами плазме с использованием аденоzinидифосфата (АДФ) в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна (Born, 1962) [133-135] на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов/счетчике 230LA-2 (НПФ «Биола»). Изучаемое соединение (в виде водного раствора, при необходимости, содержащего ДМСО до 0,2%) в разных концентрациях добавляли в пробу до внесения индуктора агрегации (АДФ) в трех независимых экспериментах.

Антиагрегационная активность смоделированных соединений *in vitro* (45 – 64: IC_{50} 1,52 – 3,35) намного превосходит антиагрегационную активность базовых пентапептидов (1 – 20: IC_{50} 11,13 – 79,53).

Проведенная оценка специфической активности соединений свидетельствует о способности полученных соединений уменьшать агрегацию тромбоцитов [144].

Структуры и результаты исследований смоделированных соединений *in vitro* на крови здоровых доноров представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Структуры и результаты исследований антиагрегационной активности смоделированных соединений 45 – 64 *in vitro*

Шифр	Пептид	Оценка связывания
45	<i>Fur-Phe-Ile-Ala-Asp-Thr</i>	1,74±0,01
46	<i>Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp</i>	1,52±0,01
47	<i>Fur-His-Ile-Gly-Asp-Asp</i>	2,83±0,02
48	<i>Fur-Arg-Val-Gly-Asp-Arg</i>	2,95±0,02
49	<i>Fur-Cys-His-Ala-Asp-Asp</i>	3,28±0,01

Шифр	Пептид	Оценка связывания
50	<i>Fur-Arg-Phe-Ala-Asp-Asp</i>	2,03±0,02
51	<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg</i>	1,78±0,01
52	<i>Fur-Arg-Met-Ala-Asp-Asp</i>	1,92±0,01
53	<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Asp</i>	2,41±0,01
54	<i>Fur-Met-His-Ala-Asp-Asp</i>	2,26±0,02
55	<i>Fur-Lys-Ile-Ala-Asp-Asp</i>	1,95±0,02
56	<i>Fur-Arg-Ser-Gly-Asp-Arg</i>	1,74±0,01
57	<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Arg</i>	2,13±0,02
58	<i>Fur-Arg-Trp-Gly-Asp-Trp</i>	2,65±0,02
59	<i>Fur-Arg-Ile-Gly-Asp-Trp</i>	3,35±0,03
60	<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp</i>	2,95±0,02
61	<i>Fur-Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp</i>	2,78±0,02
62	<i>Fur-Leu-His-Gly-Asp-Asp</i>	2,81±0,02
63	<i>Fur-Arg-His-Gly-Asp-Arg</i>	2,54±0,02
64	<i>Fur-Arg-Arg-Ala-Asp-Thr</i>	2,61±0,01

Выявлено, что наиболее активным ингибитором среди гетеромерных пептидов оказалось соединение *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46), что хорошо соответствует результатам прогноза выполненного математического моделирования.

На рисунке представлена зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации пептида, с помощью данных таблицы и рисунка определяли IC_{50} . Полумаксимальное ингибирование (IC_{50}) достигалось при концентрации *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46) равной 1,52±0,01 мкМ (таблица 9, рисунок 15).

Таблица 9 – Результаты исследования специфической антиагрегационной активности соединения *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46) *in vitro*

Концентрация <i>Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp</i> (46), М	% агрегации в присутствии <i>Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp</i> (46)
0	50,4
$0,005 \cdot 10^{-4}$	38,5
$0,01 \cdot 10^{-4}$	30,8
$0,02 \cdot 10^{-4}$	25,2
$0,03 \cdot 10^{-4}$	18,4

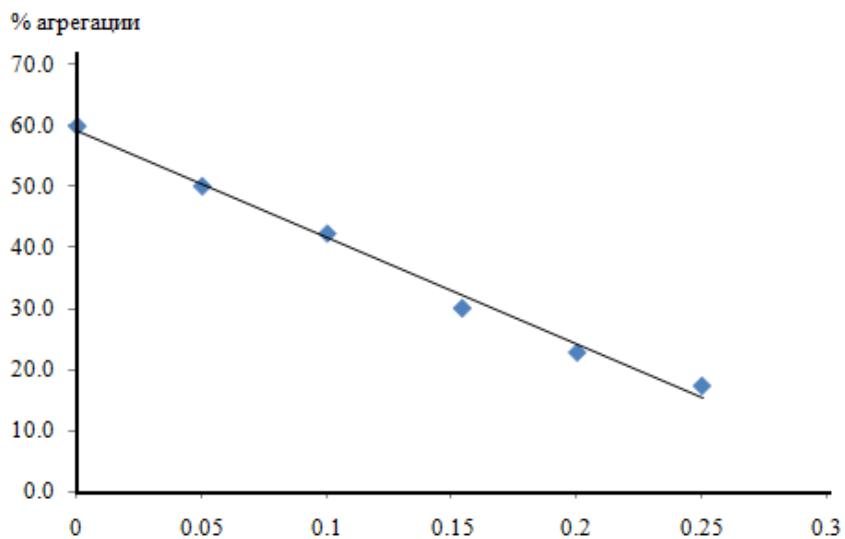


Рисунок 15 – Зависимость агрегации тромбоцитов от концентрации
Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp (46)

3.3.4 Исследование растворимости и химической стабильности гетеромерных пептидов

Растворимость гетеромерных пептидов в основных растворителях представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Растворимость пептидов в различных растворителях

Растворитель	Характеристика растворения
Вода очищенная 20°C	Мало растворимы 1 : 100 – 1 : 120
Вода очищенная 50°C	Растворимы 1 : 30 – 1 : 40
Вода очищенная 70°C	Растворимы 1 : 20 – 1 : 30
Спирт этиловый	Растворимы 1 : 20 – 1 : 35
Диметилформамид	Легко растворим 1:3-1:10
Эфир диэтиловый	Очень мало растворимы 1 : 1000 – 1 : 1100
Гексан	Очень мало растворимы 1 : 1150 – 1 : 1300
Хлороформ	Практически нерастворимы 1 : 10000
Дихлорметан	Практически нерастворимы 1 : 10000

Химическую стабильность указанных соединений проверяли в буферных растворах с различными значениями pH, соответствующими средам желудочно-кишечного тракта: желудочному соку и соку двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника (таблица 11).

Таблица 11 – Буферные растворы

Физиологическая среда организма	Буферный раствор
Желудочный сок	0,1 М раствор кислоты хлористоводородной с добавлением пепсина
Сок двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника	Фосфатный буферный раствор pH 6,8 с добавлением панкреатина
	Фосфатный буферный раствор pH 7,0 с добавлением панкреатина
	Фосфатный буферный раствор pH 7,2 с добавлением панкреатина
	Фосфатный буферный раствор pH 7,4 с добавлением панкреатина
	Боратный буферный раствор pH 7,5 с добавлением панкреатина
	Натрия цитрата буферный раствор pH 7,8 с добавлением панкреатина

Гетеромерные пептиды мало растворимы в воде, растворимы в этиловом спирте, легко растворимы в диметилформамиде, очень мало растворимы в эфире диэтиловом и гексане, практически нерастворимы в хлороформе и дихлорметане.

Для исследования химической стабильности гетеромерных пептидов были приготовлены буферные растворы с различными значениями pH, соответствующими физиологическим средам человеческого организма: желудочный сок (0,1 М раствор кислоты хлористоводородной) с добавлением пепсина (активностью не более 750 000 Ед на 1 л), сок двенадцатиперстной кишки и тонкого кишечника (буферные растворы с диапазоном pH 6,8 – 7,8) (допустимое отклонение значений pH±0,05) с добавлением панкреатина (активностью не более 1750 Ед протеазной активности на 1 л). Температуру среды растворения контролировали на протяжении всего исследования ($37\pm0,5^{\circ}\text{C}$). Перед использованием среда растворения была деаэрирована. Для этого среду растворения нагревали до температуры 41°C, осторожно перемешивали, сразу же фильтровали под вакуумом через фильтр «MF-Millipore» 0,22 мкм, энергично перемешивая. После фильтрования продолжали воздействие вакуумом в течение 5 мин.

Для исследования химической стабильности растворы гетеромерных пептидов анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии в течение 60 минут. Пробы отбирали в контрольных точках: 1, 2, 5, 10, 30, 60 мин. Анализ показал, что уже на первых минутах во всех буферных растворах происходит полное разрушение гетеромерных пептидов.

3.3.5 Подтверждение строения полученных соединений методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ^1H -спектроскопии (с привлечением двумерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), элементного анализа

Строение синтезированных соединений 1-20 подтверждали методами хромато-масс-спектрометрии, ЯМР ^1H -спектроскопии (в том числе с привлечением двумерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), элементного анализа. Содержание основного вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор) на приборе Waters MSD SQD – ESI с УФ- и масс-спектрометрическими детекторами для всех соединений составляло более 98%.

Внешний вид, содержание основного вещества, определенный молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$, данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа структур полученных соединений представлены в таблице 12 и 13.

Таблица 12 – Внешний вид и результаты исследования синтезированных соединений 1-20

№	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный молекулярный ион, $[\text{M}+\text{H}]^+$	Содержание вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор), %
1	$\text{NH}_2\text{-Phe}^1\text{-Ile}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Thr}^5\text{-COOH}$			
	565,6	Белые кристаллы	566,5	99,6
2	$\text{NH}_2\text{-Lys}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	584,6	Белые кристаллы	585,4	99,5
3	$\text{NH}_2\text{-His}^1\text{-Ile}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	555,6	Белые кристаллы	556,7	99,9
4	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Val}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$			
	601,7	Белые кристаллы	602,6	98,1
5	$\text{NH}_2\text{-Cys}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	559,6	Белые кристаллы	560,5	99,9

№	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный молекулярный ион, $[M+H]^+$	Содержание вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор), %
6	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	622,6	Белые кристаллы	623,7	99,9
7	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Tyr}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$			
	665,7	Белые кристаллы	666,8	99,9
8	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Met}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	606,7	Белые кристаллы	607,6	99,9
9	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	608,6	Белые кристаллы	609,5	98,9
10	$\text{NH}_2\text{-Met}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	587,6	Белые кристаллы	588,5	99,9
11	$\text{NH}_2\text{-Lys}^1\text{-Ile}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	560,6	Белые кристаллы	561,4	99,9
12	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Ser}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$			
	589,6	Белые кристаллы	590,3	99,0
13	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$			
	649,7	Белые кристаллы	650,9	98,0
14	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Trp}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$			
	718,8	Белые кристаллы	719,5	99,9
15	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Ile}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$			
	645,7	Белые кристаллы	646,6	99,0
16	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Tyr}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$			
	695,7	Белые кристаллы	696,5	99,9
17	$\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Leu}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	581,6	Белые кристаллы	582,8	99,9
18	$\text{NH}_2\text{-Leu}^1\text{-His}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$			
	555,5	Белые кристаллы	556,4	99,9
19	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-His}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$			
	639,6	Белые кристаллы	640,4	98,5
20	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Arg}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Thr}^5\text{-COOH}$			
	617,6	Белые кристаллы	618,5	99,5

Таблица 13 – Результаты исследования синтезированных соединений 1-20

№	Данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа			
	$\text{NH}_2\text{-Phe}^1\text{-Ile}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Thr}^5\text{-COOH}$			
1	Спектр ^1H -ЯМР: 0.81 (м, 3H, $\text{C}^{\text{e}}\text{H}_3$ Ile); 0.85 (м, 3H, $\text{C}^{\text{v}}\text{H}_3$ Ile); 1.23 (м, 3H, C^{β}H Ala); 1.35 (с, 3H, $\text{C}^{\text{v}}\text{H}_3$ Thr); 1.44 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Ile); 1.68 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ile); 2.75 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 3.18 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Phe); 4.24 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ile); 4.28 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ala); 4.40 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Thr); 4.53 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Phe); 4.60 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Thr); 4.71 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 7.18 (м, 1H, $\text{C}^{\text{e}}\text{H}$ Phe); 7.25 (м, 2H, $\text{C}^{\text{e}}\text{H}$, $\text{C}^{\text{v}}\text{H}$ Phe); 7.27 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Phe); 7.88 (м, 1H, NH Thr); 8.35 (м, 1H, NH Ile); 8.50 (м, 1H, NH Asp); 8.51 (м, 1H, NH Ala); 8.87 (с, 2H, NH_2 Phe).			

№	Данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа
	Найдено (%): C, 55.14; H, 6.82; N, 12.35. $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_9$. Вычислено (%): C, 55.21; H, 6.95; N, 12.38.
2	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Lys}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.20 (м, 3H, C^βH Ala); 1.37 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys); 1.63 (м, 2H, C^βH_2 Lys); 1.84 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys); 2.5 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.71 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 2.75 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys); 3.17 (м, 2H, C^βH_2 His); 3.49 (м, 1H, C^αH Lys); 4.25 (м, 1H, C^αH Ala); 4.65 (д, 1H, C^αH His, $J=6.45$); 4.72 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 7.20 (м, 1H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$ His); 7.50 (м, 1H, C^ηH His); 8.21 (м, 2H, NH_2 Lys); 8.39 (м, 1H, NH His); 8.55 (м, 1H, NH Asp₄); 8.56 (м, 1H, NH Ala); 8.70 (м, 1H, NH Asp₅).</p> <p>Найдено (%): C, 47.12; H, 6.01; N, 19.01. $\text{C}_{23}\text{H}_{63}\text{N}_8\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 47.26; H, 6.21; N, 19.17.</p>
3	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-His}^1\text{-Ile}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 0.83 (м, 3H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_3$ Ile); 0.87 (м, 3H, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ Ile); 1.48 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Ile); 1.74 (м, 1H, C^βH Ile); 2.69 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.67 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.12 (м, 2H, C^βH_2 His); 3.77 (м, 2H, CH_2 Gly); 4.19 (м, 1H, C^αH His); 4.21 (м, 1H, C^αH Ile); 4.63 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 7.28 (м, 1H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$ His); 7.52 (м, 1H, C^ηH His); 8.24 (м, 1H, NH Asp₄); 8.40 (м, 2H, NH_2 His); 8.49 (м, 1H, NH Ile); 8.55 (м, 1H, NH Gly); 8.70 (м, 1H, NH Asp₅).</p> <p>Найдено (%): C, 47.16; H, 5.51; N, 17.18. $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 47.56; H, 5.99; N, 17.65.</p>
4	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Val}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 0.73 (к, 6H, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ Val); 1.39 (м, 4H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg₅); 1.57 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₅); 1.70 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₅); 1.82 (м, 1H, C^βH Val); 2.65 (м, 2H, C^βH_2 Asp); 2.97 (м, 4H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg₅); 3.73 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.87 (т, 1H, C^αH Arg₁); 3.89 (д, 1H, C^αH Val); 4.15 (т, 1H, C^αH Arg₅); 4.51 (м, 1H, C^αH Asp); 8.30 (д, 2H, NH_2 Arg₁); 8.34 (д, 1H, NH Arg₅); 8.41 (д, 1H, NH Asp); 8.62 (т, 1H, NH Gly); 8.69 (д, 1H, NH Val).</p> <p>Найдено (%): C, 45.54; H, 7.14; N, 25.18. $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_8$. Вычислено (%): C, 45.91; H, 7.20; N, 25.61.</p>
5	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Cys}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.22 (м, 3H, C^βH Ala); 2.45 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.71 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 2.85 (м, 2H, C^βH_2 Cys); 3.15 (м, 2H, C^βH_2 His); 3.56 (м, 1H, C^αH Cys); 4.25 (м, 1H, C^αH Ala); 4.58 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 4.61 (д, 1H, C^αH His, $J=6.41$); 7.22 (м, 1H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$ His); 7.54 (м, 1H, C^ηH His); 8.27 (м, 1H, NH Ala); 8.38 (м, 1H, NH His); 8.50 (м, 1H, NH Asp₄); 8.71 (м, 1H, NH Asp₅).</p> <p>Найдено (%): C, 42.75; H, 5.02; N, 17.23. $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}$. Вычислено (%): C, 42.93; H, 5.22; N, 17.52.</p>
6	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.30 (м, 3H, C^βH Ala); 1.47 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg); 1.76 (м, 2H, C^βH Arg); 2.54 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.68 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.14 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg); 3.16 (м, 2H, C^βH_2 Phe); 4.20 (м, 1H, C^αH Arg); 4.25 (м, 1H, C^αH Ala); 4.51 (м, 1H, C^αH Phe); 4.63 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 7.20 (м, 1H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$ Phe); 7.23 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$, C^ηH Phe); 7.29 (м, 2H, C^δH, C^θH Phe); 7.88 (м, 1H, NH Arg); 8.12 (д, 2H, NH_2 Arg); 8.28 (м, 1H, NH Ala); 8.54 (м, 1H, NH Asp₄); 8.69 (м, 1H, NH Asp₅); 8.97 (с, 1H, NH Phe).</p> <p>Найдено (%): C, 49.85; H, 6.11; N, 17.64. $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 50.15; H,</p>

№	Данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа
	6.15; N, 18.00.
7	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Tyr}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.44 (м, 2H, C^βH Arg₁, C^βH Arg₅); 1.61 (м, 4H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg₅); 1.69 (м, 2H, C^βH_2 Arg₁, C^βH_2 Arg₅); 2.75 (м, 1H, C^βH_2 Tyr); 2.91 (м, 1H, C^βH_2 Tyr); 3.16 (т, 1H, C^αH Arg₁); 3.74 (д, 2H, C^βH_2 Asp); 3.85 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.87 (м, 4H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg₅); 4.16 (т, 1H, C^αH Arg₅); 4.24 (м, 1H, C^αH Asp); 4.51 (м, 1H, C^αH Tyr); 6.69 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$, C^ηH Tyr); 7.11 (д, 2H, NH_2 Arg₁); 7.18 (м, 2H, C^δH, C^θH Tyr); 8.34 (д, 1H, NH Arg₅); 8.53 (т, 1H, NH Gly); 8.61 (м, 1H, NH Tyr); 8.84 (д, 1H, NH Asp).</p> <p>Найдено (%): C, 48.28; H, 6.21; N, 23.04. $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_9$. Вычислено (%): C, 48.71; H, 6.51; N, 23.14.</p>
8	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Met}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.27 (м, 3H, C^βH Ala); 1.48 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg); 1.75 (м, 2H, C^βH Arg); 1.98 (м, 2H, C^βH_2 Met); 2.05 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Met); 2.48 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Met); 2.51 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.72 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.06 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg); 3.92 (м, 1H, C^αH Met); 4.17 (м, 1H, C^αH Arg); 4.25 (м, 1H, C^αH Ala); 4.63 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 7.91 (м, 1H, NH Arg); 8.11 (д, 2H, NH_2 Arg); 8.35 (м, 1H, NH Ala); 8.50 (м, 1H, NH Asp₄); 8.64 (д, 2H, NH_2 Met); 8.74 (м, 1H, NH Asp₅).</p> <p>Найдено (%): C, 43.14; H, 5.94; N, 18.11. $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_{10}\text{S}$. Вычислено (%): C, 43.56; H, 6.31; N, 18.47.</p>
9	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.50 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Arg); 1.73 (м, 2H, C^βH Arg); 2.52 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.74 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.04 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Arg); 3.07 (м, 2H, C^βH_2 Phe); 3.68 (м, 2H, CH_2 Gly); 4.15 (м, 1H, C^αH Arg); 4.49 (м, 1H, C^αH Phe); 4.57 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 8.10 (д, 2H, NH_2 Arg); 7.18 (м, 1H, C^ζH Phe); 7.26 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$, C^ηH Phe); 7.29 (м, 2H, C^δH, C^θH Phe); 7.93 (м, 1H, NH Arg); 8.52 (м, 1H, NH Asp₄); 8.64 (м, 1H, NH Gly); 8.70 (м, 1H, NH Asp₅); 8.98 (с, 1H, NH Phe).</p> <p>Найдено (%): C, 49.17; H, 5.50; N, 18.21. $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{N}_8\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 49.34; H, 5.96; N, 18.41.</p>
10	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Met}^1\text{-His}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.23 (м, 3H, C^βH Ala); 1.96 (м, 2H, C^βH_2 Met); 2.03 (м, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Met); 2.46 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Met); 2.49 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.63 (м, 2H, C^βH_2 His); 2.70 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.89 (м, 1H, C^αH Met); 4.26 (м, 1H, C^αH Ala); 4.53 (д, 1H, C^αH His, $J=6.42$); 4.61 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 7.19 (м, 1H, $\text{C}^\epsilon\text{H}$ His); 7.89 (м, 1H, NH His); 8.29 (м, 1H, NH Ala); 8.42 (м, 1H, C^ηH His); 8.52 (м, 1H, NH Asp₄); 8.73 (м, 1H, NH Asp₅).</p> <p>Найдено (%): C, 44.42; H, 5.21; N, 16.46. $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_{10}\text{S}$. Вычислено (%): C, 44.97; H, 5.66; N, 16.69.</p>
11	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Lys}^1\text{-Ile}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 0.68 (м, 3H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_3$ Ile); 0.74 (м, 3H, $\text{C}^\gamma\text{H}_3$ Ile); 1.24 (м, 3H, C^βH Ala); 1.28 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Ile); 1.54 (м, 2H, $\text{C}^\gamma\text{H}_2$ Lys); 1.65 (м, 1H, C^βH Ile); 1.83 (т, 2H, C^βH_2 Lys, $J=7.47$); 1.87 (м, 2H, $\text{C}^\delta\text{H}_2$ Lys); 2.21 (т, 2H, $\text{C}^\epsilon\text{H}_2$ Lys, $J=8.07$); 2.54 (м, 2H, C^βH_2 Asp₅); 2.73 (м, 2H, C^βH_2 Asp₄); 3.29 (т, 1H, C^αH Lys, $J=7.27$); 4.1 (м, 1H, C^αH Ile); 4.15 (м, 1H, C^αH Ala); 4.50 (м, 2H, C^αH Asp₄, C^αH Asp₅); 8.12 (м, 2H, NH_2 Lys); 8.50 (м, 1H, NH Asp₄); 8.35 (м, 1H, NH Ala); 8.45 (м, 1H, NH Ile); 8.70 (м, 1H, NH Asp₅).</p>

№	Данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа
	Найдено (%): C, 48.78; H, 7.01; N, 14.29. $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 49.28; H, 7.19; N, 14.99.
12	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Ser}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.65 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg₅); 1.48 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₅); 1.69 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₅); 2.70 (т, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Ser, $J=8.02$); 3.10 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg₁); 3.77 (д, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 3.89 (м, 4H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg₅); 3.87 (м, 2H, CH_2 Gly); 4.14 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg₅); 4.28 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 4.62 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ser); 7.05 (д, 2H, NH_2 Arg₁); 8.26 (д, 1H, Ser); 8.32 (д, 1H, NH Arg₅); 8.50 (т, 1H, NH Gly); 8.79 (д, 1H, NH Asp).</p> <p>Найдено (%): C, 42.16; H, 6.27; N, 25.84. $\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{N}_{11}\text{O}_9$. Вычислено (%): C, 42.78; H, 6.67; N, 26.13.</p>
13	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Phe}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.39 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg₅); 1.56 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg₅); 1.73 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₁, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg₅); 2.68 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 2.98 (м, 4H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg₁, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg₅); 3.04 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Phe); 3.78 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg₁); 3.83 (м, 2H, CH_2 Gly); 4.17 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg₅); 4.55 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Phe); 4.59 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 7.19 (м, 1H, C^{ζ}H Phe); 7.26 (м, 2H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$, C^{η}H Phe); 7.31 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Phe); 8.12 (м, 1H, NH Asp); 8.27 (с, 1H, NH Phe); 8.30 (д, 2H, NH_2 Arg₁); 8.34 (д, 1H, NH Arg₅); 8.57 (м, 1H, NH Gly).</p> <p>Найдено (%): C, 49.28; H, 6.15; N, 23.56. $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_8$. Вычислено (%): C, 49.91; H, 6.67; N, 23.71.</p>
14	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Trp}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.37 (м, 2H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg); 1.67 (м, 2H, C^{β}H Arg); 2.62 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Trp₂); 2.96 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg); 3.07 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Trp₅); 3.14 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 3.52 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.84 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg); 4.45 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 4.49 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp₂); 4.55 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp₅); 6.94 (м, 1H, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Trp₅); 7.03 (м, 1H, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Trp₂); 7.11 (м, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ Trp₂); 7.16 (м, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Trp); 7.26 (м, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ Trp₅); 7.37 (м, 1H, C^{η}H Trp₂); 7.46 (м, 1H, C^{η}H Trp₅); 7.49 (м, 1H, $\text{C}^{\kappa}\text{H}$ Trp₂); 7.68 (м, 1H, NH Arg); 7.71 (м, 1H, $\text{C}^{\kappa}\text{H}$ Trp₅); 7.73 (м, 1H, NH Gly); 7.87 (м, 1H, NH Trp₅); 8.12 (д, 2H, NH_2 Arg); 8.22 (м, 1H, NH Asp); 8.64 (м, 1H, NH Trp₂); 9.91 (м, 1H, $\text{NH}_{\text{ц}}$ Trp₅); 10.03 (м, 1H, $\text{NH}_{\text{ц}}$ Trp₂).</p> <p>Найдено (%): C, 56.26; H, 5.64; N, 19.09. $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{O}_8$. Вычислено (%): C, 56.82; H, 5.89; N, 19.49.</p>
15	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Ile}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 0.83 (м, 3H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}_3$ Ile); 0.88 (м, 3H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$ Ile); 1.09 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Ile); 1.51 (м, 2H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg); 1.67 (м, 2H, C^{β}H Arg); 1.72 (м, 1H, C^{β}H Ile); 3.08 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg); 3.14 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 3.15 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Trp); 3.72 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.88 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg); 4.25 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ile); 4.53 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp); 4.63 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 6.98 (м, 1H, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Trp); 7.11 (м, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Trp); 7.16 (м, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ Trp); 7.43 (м, 1H, C^{η}H Trp); 7.65 (м, 1H, $\text{C}^{\kappa}\text{H}$ Trp); 7.69 (м, 1H, NH Arg); 8.09 (м, 1H, NH Trp); 8.18 (д, 2H, NH_2 Arg); 8.22 (м, 1H, NH Asp); 8.29 (м, 1H, NH Gly); 8.45 (м, 1H, NH Ile); 10.86 (м, 1H, $\text{NH}_{\text{ц}}$ Trp).</p> <p>Найдено (%): C, 53.17; H, 6.28; N, 19.12. $\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_9\text{O}_8$. Вычислено (%): C, 53.94; H, 6.71; N, 19.52.</p>
16	<p style="text-align: center;">$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Tyr}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Trp}^5\text{-COOH}$</p> <p>Спектр ^1H-ЯМР: 1.48 (м, 2H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg); 1.69 (м, 2H, C^{β}H Arg); 2.67 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 2.70 (м, 1H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Tyr); 2.93 (м, 1H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Tyr); 3.06 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg); 3.16 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$</p>

№	Данные ЯМР ^1H -спектроскопии и элементного анализа
	Trp); 3.72 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.75 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg); 4.52 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Tyr); 4.41 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Trp); 4.64 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 6.65 (м, 2H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$, C^{η}H Tyr); 9.98 (м, 1H, $\text{NH}_{\text{щ}}$ Trp); 7.05 (м, 1H, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Trp); 7.08 (м, 2H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Tyr); 7.11 (м, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Trp); 7.16 (м, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ Trp); 7.33 (м, 1H, C^{η}H Trp); 7.51 (м, 1H, $\text{C}^{\kappa}\text{H}$ Trp); 7.72 (м, 1H, NH Arg); 8.12 (д, 2H, NH_2 Arg); 8.16 (м, 1H, NH Trp); 8.22 (м, 1H, NH Asp); 8.43 (м, 1H, NH Gly); 8.60 (м, 1H, NH Tyr). Найдено (%): C, 54.86; H, 5.42; N, 18.08. $\text{C}_{32}\text{H}_{41}\text{N}_9\text{O}_9$. Вычислено (%): C, 55.24; H, 5.94; N, 18.12.
17	$\text{NH}_2\text{-Tyr}^1\text{-Leu}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$ Спектр ^1H -ЯМР: 0.79 (м, 6H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$, $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu); 1.40 (м, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu); 1.46 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu); 2.52 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp ₅); 2.71 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp ₄); 3.01 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Tyr); 4.16 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Tyr); 4.27 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu); 3.82 (м, 2H, CH_2 Gly); 4.66 (м, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp ₄ , $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp ₅); 6.74 (м, 1H, C^{η}H Tyr); 6.86 (м, 1H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ Tyr); 7.04 (м, 1H, $\text{C}^{\theta}\text{H}$ Tyr); 7.16 (м, 1H, $\text{C}^{\delta}\text{H}$ Tyr); 8.57 (м, 1H, NH Asp ₄); 8.22 (т, 1H, NH Gly); 8.60 (м, 1H, NH Leu); 8.65 (м, 1H, NH Asp ₅); 8.85 (м, 2H, NH_2 Tyr). Найдено (%): C, 51.19; H, 5.86; N, 11.51. $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{11}$. Вычислено (%): C, 51.63; H, 6.07; N, 12.04.
18	$\text{NH}_2\text{-Leu}^1\text{-His}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Asp}^5\text{-COOH}$ Спектр ^1H -ЯМР: 0.81 (м, 6H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$, $\text{C}^{\delta}\text{H}_3$ Leu); 1.55 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Leu); 1.67 (м, 1H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}$ Leu); 2.51 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp ₅); 2.73 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp ₄); 3.19 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ His); 3.84 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.98 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Leu); 4.60 (м, 2H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp ₄ , $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp ₅); 4.64 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ His); 7.26 (м, 1H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ His); 8.44 (м, 1H, NH Gly); 8.50 (м, 1H, C^{η}H His); 8.58 (м, 1H, NH Asp ₄); 8.67 (м, 2H, NH_2 Leu); 8.72 (м, 1H, NH Asp ₅); 8.85 (м, 1H, NH His). Найдено (%): C, 47.12; H, 5.68; N, 17.21. $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_7\text{O}_{10}$. Вычислено (%): C, 47.56; H, 5.99; N, 17.65.
19	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-His}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-COOH}$ Спектр ^1H -ЯМР: 1.52 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg ₁ , $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg ₅); 1.69 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg ₁ , $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg ₅); 1.80 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg ₁ , $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg ₅); 2.78 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 3.08 (м, 4H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg ₁ , $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg ₅); 3.18 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ His); 3.87 (м, 2H, CH_2 Gly); 3.98 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg ₁); 4.28 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg ₅); 4.57 (д, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ His, $J=6.42$); 4.61 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 7.20 (м, 1H, $\text{C}^{\epsilon}\text{H}$ His); 8.32 (д, 2H, NH_2 Arg ₁); 8.34 (д, 1H, NH Arg ₅); 8.35 (д, 1H, NH Asp); 8.50 (м, 1H, C^{η}H His); 8.58 (т, 1H, NH Gly); 8.98 (м, 1H, NH His). Найдено (%): C, 44.74; H, 6.08; N, 28.14. $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_{13}\text{O}_8$. Вычислено (%): C, 45.06; H, 6.46; N, 28.47.
20	$\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Arg}^2\text{-Ala}^3\text{-Asp}^4\text{-Thr}^5\text{-COOH}$ Спектр ^1H -ЯМР: 1.19 (м, 3H, C^{β}H Ala); 1.32 (с, 3H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_3$ Thr); 1.37 (м, 4H, $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg ₁ , $\text{C}^{\gamma}\text{H}_2$ Arg ₂); 1.51 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg ₁ , $\text{C}^{\beta 1}\text{H}$ Arg ₂); 1.81 (м, 2H, $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg ₁ , $\text{C}^{\beta 2}\text{H}$ Arg ₂); 2.65 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Asp); 2.94 (м, 4H, $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg ₁ , $\text{C}^{\delta}\text{H}_2$ Arg ₂); 3.77 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg ₁); 4.16 (т, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Arg ₂); 4.28 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Ala); 4.41 (м, 2H, $\text{C}^{\beta}\text{H}_2$ Thr); 4.52 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Thr); 4.63 (м, 1H, $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ Asp); 7.89 (м, 1H, NH Thr); 8.14 (м, 1H, NH Asp); 8.31 (д, 2H, NH_2 Arg ₁); 8.35 (д, 1H, NH Arg ₂); 8.37 (м, 1H, NH Ala). Найдено (%): C, 44.18; H, 6.87; N, 24.46. $\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_9$. Вычислено (%): C, 44.72; H, 7.02; N, 24.94.

Фрагмент двумерного спектра ЯМР $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY, подтверждающий структуру соединения 4, представлен на рисунке 16.

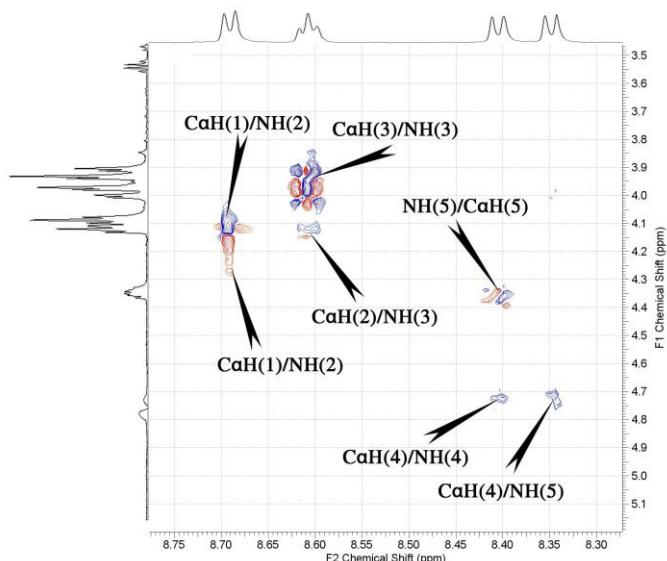
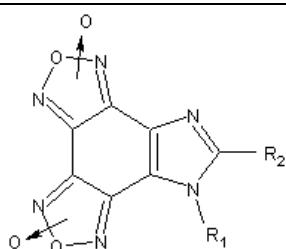


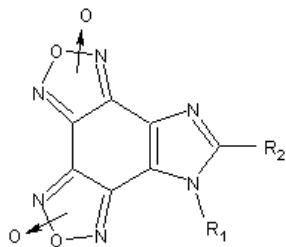
Рисунок 16 – Двумерный спектр ЯМР $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY для пептида $\text{NH}_2\text{-Arg}^1\text{-Val}^2\text{-Gly}^3\text{-Asp}^4\text{-Arg}^5\text{-OH}$ (4).

Для соединений 21 – 44 провели хромато-масс-спектроскопический анализ. Внешний вид, содержание основного вещества, определенный молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$ полученных соединений представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Внешний вид и данные хромато-масс-спектрометрии соединений 21-44

№	R ₁	R ₂	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный [M+H] ⁺	Сод. вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор), %	
21	H	H	262,1	Желтые кристаллы	263,2	99,8	





№	R ₁	R ₂	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный [M+H] ⁺	Сод. вещ-ва по ВЭЖХ (УФ-детектор), %
22	H	CH ₃	276,1	Желтые кристаллы	277,3	99,9
23	H	C ₂ H ₅	290,2	Желтые кристаллы	291,0	98,8
24	H	C ₃ H ₇	304,2	Желтые кристаллы	305,1	99,9
25	H	<i>i</i> -C ₃ H ₇	304,2	Желтые кристаллы	305,3	98,7
26	H	C ₄ H ₉	318,1	Желтые кристаллы	319,2	99,5
27	CH ₃	H	276,1	Желтые кристаллы	277,2	99,9
28	C ₂ H ₅	H	290,2	Желтые кристаллы	291,1	99,9
29	C ₃ H ₇	H	304,2	Желтые кристаллы	305,3	98,8
30	C ₄ H ₉	H	318,1	Желтые кристаллы	319,0	98,5
31	C ₅ H ₁₁	H	332,2	Желтые кристаллы	333,1	99,7
32	C ₆ H ₁₃	H	346,3	Желтые кристаллы	347,5	99,8
33	CH ₂ CH=CH ₂	H	302,2	Бело-желтые кристаллы	303,3	99,9
34	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	H	348,2	Бело-желтые кристаллы	349,4	99,1
35	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	CH ₃	362,2	Бело-желтые кристаллы	363,3	99,9
36	CH ₂ C(O)OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	376,3	Бело-желтые кристаллы	377,5	98,9
37	CH ₂ C(O)OH	H	320,1	Бело-желтые кристаллы	321,2	99,5
38	CH ₂ C(O)OH	CH ₃	334,2	Бело-желтые кристаллы	335,1	99,9
39	CH ₂ C(O)OH	C ₂ H ₅	348,2	Бело-желтые кристаллы	349,3	99,9
40	CH ₂ CN	H	301,1	Бело-желтые кристаллы	302,2	98,7
41	H	NO ₂	307,1	Бело-желтые кристаллы	308,2	99,9
42	H	CH ₂ OH	292,1	Бело-желтые кристаллы	293,3	98,9
43	CH ₂ C(O)-Arg	H	450,3	Белые кристаллы	451,5	99,9
44	CH ₂ C(O)-Gln	H	422,2	Белые кристаллы	423,1	99,4

Фуроксановое кольцо в молекуле производных бензофуроксана обладает способностью таутомеризоваться в свою вторую форму, содержащую *N*-оксидную группу на другой стороне цикла азота [80]. Эта изомеризация обратима и в растворах устанавливается равновесие между обоими

таутомерами. Для N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана теоретически возможно существование четырех таутомерных форм. Их существование в растворе DMSO-d⁶ при 36°C подтверждается методом спектроскопии ЯМР ¹H. Сигнал протона имидазольного цикла проявляется в виде четырех синглетов различной интенсивности, соответствующих различным таутомерным формам. Интегральное отношение интенсивности сигналов отвечает мольному соотношению таутомеров в смеси.

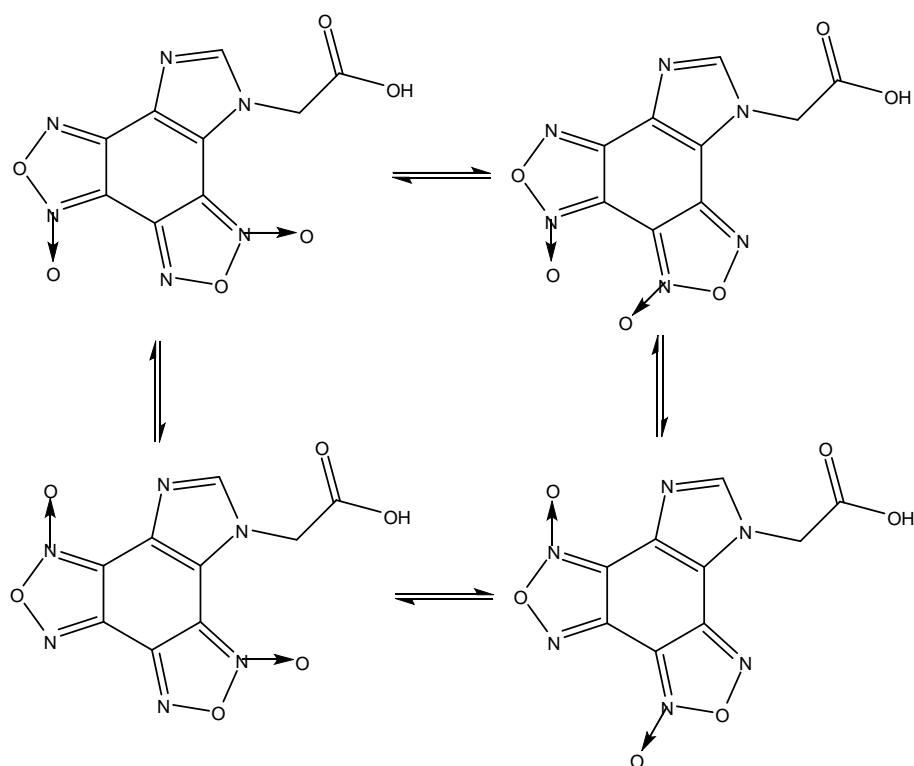


Рисунок 17 – Таутомерные формы N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана

Строение синтезированных соединений 45-64 подтверждали методами хромато-масс-спектроскопии и элементного анализа.

ЯМР ¹H-спектроскопию для соединений 45-64 не проводили в связи со сложностью распознавания спектров, содержащих различные таутомерные формы N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана. Внешний вид, содержание основного вещества, определенный молекулярный ион [M+H]⁺ полученных соединений представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Внешний вид и результаты исследования синтезированных соединений 45-64

№	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный молекулярный ион, $[M+H]^+$	Содержание вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор), %
<i>Fur-Phe-Ile-Ala-Asp-Thr-COOH</i>				
45	Найдено (%): C, 48.71; H, 4.58; N, 17.14. $C_{35}H_{43}N_{11}O_{15}$. Вычислено (%): C, 49.01; H, 5.05; N, 17.96.	839,6	Белые кристаллы	840,8
<i>Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp-COOH</i>				
46	Найдено (%): C, 43.06; H, 4.17; N, 21.98. $C_{32}H_{40}N_{14}O_{16}$. Вычислено (%): C, 43.84; H, 4.60; N, 22.37.	858,6	Белые кристаллы	859,5
<i>Fur-His-Ile-Gly-Asp-Asp-COOH</i>				
47	Найдено (%): C, 43.15; H, 4.26; N, 21.18. $C_{31}H_{37}N_{13}O_{16}$. Вычислено (%): C, 43.92; H, 4.40; N, 21.48.	829,6	Белые кристаллы	830,4
<i>Fur-Arg-Val-Gly-Asp-Arg-COOH</i>				
48	Найдено (%): C, 42.74; H, 5.21; N, 26.30. $C_{32}H_{47}N_{17}O_{14}$. Вычислено (%): C, 43.00; H, 5.30; N, 26.64.	875,7	Белые кристаллы	876,8
<i>Fur-Cys-His-Ala-Asp-Asp-COOH</i>				
49	Найдено (%): C, 40.46; H, 3.24; N, 21.15. $C_{29}H_{33}N_{13}O_{16}S$. Вычислено (%): C, 40.90; H, 3.91; N, 21.38.	833,6	Белые кристаллы	834,5
<i>Fur-Arg-Phe-Ala-Asp-Asp-COOH</i>				
50	Найдено (%): C, 45.40; H, 4.17; N, 21.10. $C_{35}H_{42}N_{14}O_{16}$. Вычислено (%): C, 45.95; H, 4.63; N, 21.44.	896,6	Белые кристаллы	897,7
<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg-COOH</i>				
51	Найдено (%): C, 45.13; H, 4.64; N, 24.25. $C_{36}H_{47}N_{17}O_{15}$. Вычислено (%): C, 45.14; H, 4.95; N, 24.86.	939,7	Белые кристаллы	940,9
<i>Fur-Arg-Met-Ala-Asp-Asp-COOH</i>				
52	Найдено (%): C, 41.16; H, 4.54; N, 21.23. $C_{31}H_{42}N_{14}O_{16}S$. Вычислено (%): C, 41.42; H, 4.71; N, 21.82.	880,7	Белые кристаллы	881,5
<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Asp-COOH</i>				
53	Найдено (%): C, 45.11; H, 4.13; N, 21.27. $C_{34}H_{40}N_{14}O_{16}$. Вычислено (%): C, 45.34; H, 4.48; N, 21.77.	882,6	Белые кристаллы	883,4
<i>Fur-Met-His-Ala-Asp-Asp-COOH</i>				
54	Найдено (%): C, 42.10; H, 3.92; N, 20.21. $C_{31}H_{37}N_{13}O_{16}S$. Вычислено (%): C, 42.32; H, 4.24; N, 20.70.	861,6	Белые кристаллы	862,8

№	Молекулярная масса	Внешний вид	Экспериментально полученный молекулярный ион, $[M+H]^+$	Содержание вещества по ВЭЖХ (УФ-детектор), %
55	<i>Fur-Lys-Ile-Ala-Asp-Asp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 44.87; H, 5.04; N, 19.26. $C_{32}H_{44}N_{12}O_{16}$. Вычислено (%): C, 45.07; H, 5.20; N, 19.71.			
	834,6	Белые кристаллы	835,7	99,1
56	<i>Fur-Arg-Ser-Gly-Asp-Arg-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 40.21; H, 4.14; N, 26.78. $C_{30}H_{43}N_{17}O_{15}$. Вычислено (%): C, 40.86; H, 4.92; N, 27.00.			
	863,6	Белые кристаллы	864,9	98,7
57	<i>Fur-Arg-Phe-Gly-Asp-Arg-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 45.18; H, 4.93; N, 25.09. $C_{36}H_{47}N_{17}O_{14}$. Вычислено (%): C, 45.91; H, 5.03; N, 25.28.			
	923,7	Белые кристаллы	924,5	99,9
58	<i>Fur-Arg-Trp-Gly-Asp-Trp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 50.64; H, 4.15; N, 22.02. $C_{43}H_{46}N_{16}O_{14}$. Вычислено (%): C, 51.09; H, 4.59; N, 22.17.			
	992,8	Белые кристаллы	993,6	98,9
59	<i>Fur-Arg-Ile-Gly-Asp-Trp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 48.21; H, 4.87; N, 22.28. $C_{38}H_{47}N_{15}O_{14}$. Вычислено (%): C, 48.66; H, 5.05; N, 22.40.			
	919,7	Белые кристаллы	920,5	99,5
60	<i>Fur-Arg-Tyr-Gly-Asp-Trp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 49.26; H, 4.15; N, 21.05. $C_{41}H_{45}N_{15}O_{15}$. Вычислено (%): C, 49.85; H, 4.59; N, 21.27.			
	969,7	Белые кристаллы	970,6	98,7
61	<i>Fur-Tyr-Leu-Gly-Asp-Asp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 46.29; H, 4.14; N, 17.13. $C_{34}H_{39}N_{11}O_{17}$. Вычислено (%): C, 46.74; H, 4.50; N, 17.63.			
	855,6	Белые кристаллы	856,5	99,9
62	<i>Fur-Leu-His-Gly-Asp-Asp-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 43.61; H, 4.27; N, 21.13. $C_{31}H_{37}N_{13}O_{16}$. Вычислено (%): C, 43.92; H, 4.40; N, 21.48.			
	829,5	Белые кристаллы	830,7	98,9
63	<i>Fur-Arg-His-Gly-Asp-Arg-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 42.35; H, 4.29; N, 28.17. $C_{33}H_{45}N_{19}O_{14}$. Вычислено (%): C, 42.53; H, 4.87; N, 28.56.			
	913,6	Белые кристаллы	914,8	99,8
64	<i>Fur-Arg-Arg-Ala-Asp-Thr-COOH</i>			
	Найдено (%): C, 42.01; H, 4.99; N, 25.87. $C_{32}H_{47}N_{17}O_{15}$. Вычислено (%): C, 42.24; H, 5.21; N, 26.17.			
	891,6	Белые кристаллы	892,4	99,5

3.4 Заключение

В результате проведено моделирование взаимодействия белка интегрин α_{IIb}/β_3 с пентапептидами с помощью программного комплекса «Алгокомб», синтезировано 20 наиболее эффективных (по результатам компьютерного моделирования) пентапептидов методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-стратегии, проведено исследование антиагрегационной активности полученных соединений и показано наличие доз-зависимого ингибирования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крови здоровых доноров. С использованием программы PASS Professional 2010.1 выполнен прогноз биологической активности имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксанов – доноров оксида азота, и установлена высокая вероятность проявления ими антиагрегационной активности. Проведено исследование антиагрегационной активности производных имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана и подтверждена возможность их использования в качестве ингибиторов агрегации тромбоцитов.

Для создания соединений, обладающих более выраженными антиагрегационными свойствами, с двумя различными механизмами воздействия на агрегацию тромбоцитов были исследованы соединения, состоящие из двух фармакофор: пептидной – ингибиторы GP IIb/IIIa-рецепторов тромбоцитов и фуроксановой – доноры оксида азота. С помощью программы «Алгокомб» было выполнено компьютерное моделирование связывания гетеромерных пептидов с имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксановым фрагментом на N-конце с белком интегрин α_{IIb}/β_3 . Расчетные соединения были получены с использованием Fmoc-стратегии.

Выявлено, что наиболее активным ингибитором среди гетеромерных пептидов оказалось соединение *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (46).

Гетеромерные пептиды мало растворимы в воде, растворимы в этиловом спирте, легко растворимы в диметилформамиде, очень мало растворимы в эфире диэтиловом и гексане, практически нерастворимы в хлороформе и дихлорметане. Исследование химической стабильности

соединений показало, что гетеромерные пептиды не стабильны в буферных растворах с различными значениями рН, соответствующими физиологическим средам человеческого организма.

На основании проведенных исследований выявили, что наиболее оптимальными свойствами обладает гетеромерный пептид на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана и пептида – *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* и присвоили шифр *ИБДФ-П-46*, который выбрали для разработки лекарственной формы.

4 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ РАСТВОРА ДЛЯ ИНЬЕКЦИИ

4.1 Получение лиофилизата гетеромерного пептида

В связи с низкой стабильностью в буферных растворах, соответствующим среди желудочно-кишечного тракта, был выбран парентеральный путь введения *ИБДФ-П-46*. Обоснование дозы действующего вещества, проводили по литературным данным по аналогии с веществом такой же фармакологической группы: эптифибатид (интегрелин) [7, 47] и на основании собственных исследований *in vitro*. Для интегрелина (IC_{50} 0,16 мкМ), доза лекарственного вещества составляет 0,75 мг/мл. Учитывая разницу в IC_{50} для *ИБДФ-П-46*, была выбрана доза в 8 мг/мл.

Принимая во внимание, что гетеромерный пептид мало растворим в воде и его доза мала, была исследована возможность использования при разработке технологии лиофилизирования различных вспомогательных веществ, выполняющих функции структурообразователей и стабилизаторов.

Для подбора оптимального состава лиофилизата гетеромерного пептида, удовлетворяющего показателям качества, были приготовлены составы (по 5 образцов в каждой) с различным содержанием вспомогательных веществ, традиционно используемых в технологии лиофилизации соединений белковой природы и аминокислот: поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон (ПВП), D-маннитол в концентрациях 15, 20, 30 мг/мл (таблица 16).

Таблица 16 – Составы и показатели качества лиофилизата гетеромерного пептида

№	Состав на 1 ампулу, г	Внешний вид	Прозрачность, растворимость	цветность, Качественное содержание действующего вещества, мг
1	<i>ИБДФ-П-46</i> 0,008	Порошок	Непрозрачный раствор, раствор	8,01±0,32

№	Состав на 1 ампулу, г	Внешний вид	Прозрачность, цветность, растворимость	Количественное содержание действующего вещества, мг
	ПВС 0,015	белого цвета	содержит нерастворившиеся частицы после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин	
2	ИБДФ-П-46 0,008 ПВС 0,020	Порошок белого цвета	Непрозрачный раствор, раствор содержит нерастворившиеся частицы после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин	7,99±0,21
3	ИБДФ-П-46 0,008 ПВС 0,030	Порошок белого цвета	Непрозрачный раствор, раствор содержит нерастворившиеся частицы после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин	8,02±0,22
4	ИБДФ-П-46 0,008 ПВП 0,015	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	7,98±0,21
5	ИБДФ-П-46 0,008 ПВП 0,020	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	7,99±0,11
6	ИБДФ-П-46 0,008 ПВП 0,030	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	8,01±0,31
7	ИБДФ-П-46 0,008 D-маннитол 0,015	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	8,02±0,22
8	ИБДФ-П-46 0,008 D-маннитол 0,020	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	7,97±0,12
9	ИБДФ-П-46 0,008 D-маннитол 0,030	Порошок белого цвета	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	8,01±0,31

Смесь гетеромерного пептида и вспомогательного вещества в нужных количествах растворяли в воде при 20°C перемешиванием с помощью магнитной мешалки IKA RST basic (IKA, Германия) (500 об/мин в течение 35 мин).

В результате проведенных исследований составы № 1-3 с поливиниловым спиртом представляли собой непрозрачные растворы, содержащие нерастворившиеся частицы после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин, поэтому данным составам не удовлетворяют показателям прозрачность, цветность, растворимость (инъекционные лекарственные формы согласно ОФС «Инъекционные лекарственные формы» (ГФ XI, часть 2, стр. 140) должны быть прозрачными по сравнению с водой для инъекций).

В результате исследований оптимальными составами на 1 ампулу явились составы № 4-9.

4.2 Подбор режима замораживания раствора гетеромерного пептида

Для получения стабильной формы – раствор пептида лиофилизировали. Использование метода лиофилизации для стабилизации раствора пептида в процессе хранения было обусловлено крайней чувствительностью препарата к повышенным температурам (термолабильность). Для определения оптимальных условий лиофилизации необходимо было определить режимы замораживания (быстрое или медленное) и лиофилизации раствора гетеромерного пептида.

Для исследования влияния режима замораживания растворы гетеромерного пептида составов № 4-9 разливали по 1 мл в стеклянные ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай) и замораживали на полке до -50°C, используя следующие технологические приемы, варьируя скорость заморозки гетеромерного пептида:

1. Медленное замораживание (рисунок 1) – препарат загружали на полки лиофильной сушилки при температуре +20÷22°C, охлаждали полки до

$-22\div25^{\circ}\text{C}$ за 1 час и выдерживали 1,5 ч. Далее полки охлаждали от -25°C до $-33\div35^{\circ}\text{C}$ за 1 час и выдерживали еще 1,5 ч, затем понижали температуру полок от -35°C до $-42\div45^{\circ}\text{C}$ за 1 час и выдерживали 1,5 ч, дальнее понижали температуру до $-48\div50^{\circ}\text{C}$ за 1 час и выдерживали в течение 5 ч при данной температуре;

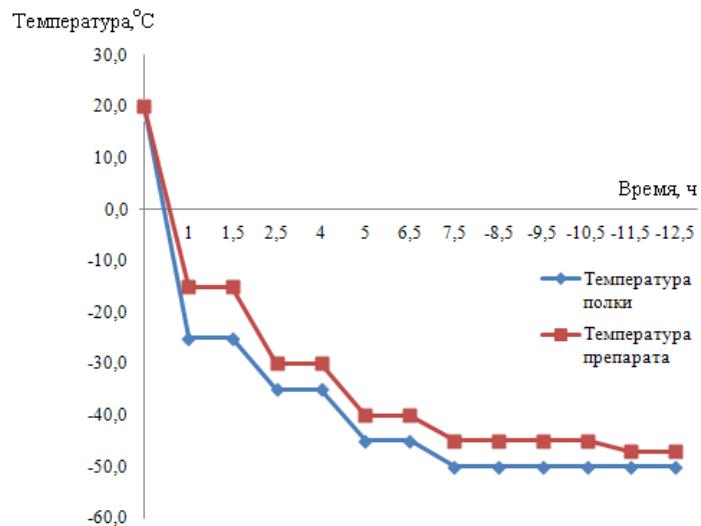


Рисунок 18 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида при режиме медленного замораживания

2. Быстрое замораживание (рисунок 2) – препарат загружали на полки лиофильной сушилки при температуре $+20\div22^{\circ}\text{C}$, охлаждали полки за 1-1,5 час до $-22\div25^{\circ}\text{C}$, за 1 час до $-31\div35^{\circ}\text{C}$, за 1 час до $-40\div45^{\circ}\text{C}$, и за 1 час до $-48\div50^{\circ}\text{C}$, после чего выдерживали данную температуру в течение 5 ч.

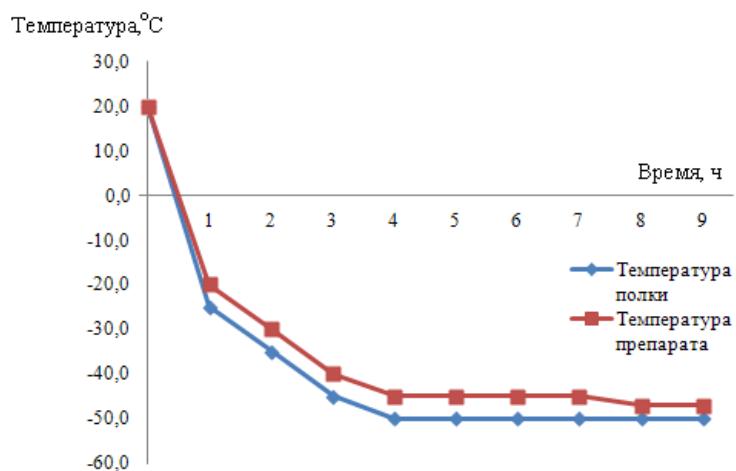


Рисунок 19 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида при режиме быстрого замораживания

Скорость заморозки может влиять на качество полученного лиофилизата, поэтому для каждого режима замораживания использовали 5 серий препаратов по 5 образцов в каждой серии. Замороженные растворы гетеромерного пептида лиофилизировали. Условия лиофилизации: полки лиофильной сушилки выдерживали при -50°C и давлении в камере 0,01 мБар в течение 5 часов, далее их нагревали от -50°C до -10°C со скоростью $8^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Далее полки нагревали от -10°C до 0°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, а от 0°C до $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. После достижения препаратом температуры $+20^{\circ}\text{C}$ (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4ч. Лиофилизация продолжалась 25ч. По окончанию процесса лиофилизации оценивали влияние режима замораживания по следующим показателям оценки качества: внешний вид, потеря в массе при высушивании, растворимость в растворителе для инъекций, прозрачность раствора, pH, количественное содержание.

Для исследования влияния вспомогательных веществ на качество готовой лекарственной формы, полученные лиофилизаты гетеромерных пептидов, анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии. Анализ показал, что в составах № 4-6, содержащих в качестве вспомогательного вещества поливинилпирролидон, содержание пептида менее 90%, что является неудовлетворительным по показателю качества количественное содержание. Посторонняя химическая примесь представляла собой фрагменты гетеромерного пептида.

Внешний вид лиофилизатов № 7-9 гетеромерного пептида с использованием в качестве криопротектора D-маннитол, представлял собой массу белого цвета при обоих режимов замораживания.

Потерю в массе при высушивании определяли согласно требованиям ГФ XI, вып.1, стр.176. Точную навеску препарата сушили в вакуум-сушильном шкафу над P_2O_5 при комнатной температуре и остаточном давлении 5 мм.рт.ст. до постоянной массы. Потеря в массе во всех образцах не превышала 3%.

По показателю цветности растворов они также являлись бесцветными растворами. Значения pH для раствора лиофилизата медленного замораживания – $6,8 \pm 0,2$, быстрого – $6,7 \pm 0,3$. Количественное содержание пептида: $0,0079 \pm 0,0001$ и $0,0080 \pm 0,0001$ г/амп соответственно (таблица 17).

Таблица 17 – Показатели качества лиофилизатов составов № 7-9, полученных разными режимами замораживания

Показатели	Режим замораживания		Методы анализа
	Медленный	Быстрый	
Внешний вид	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Визуально
Остаточная влажность	$0,08 \pm 0,01\%$	$0,09 \pm 0,01\%$	Весовой
Растворимость и время растворения в растворителе для инъекций (вода для инъекций)	После добавления воды для инъекций и интенсивного встряхивания в течение 3 мин получали прозрачный раствор	После добавления воды для инъекций и интенсивного встряхивания в течение 3 мин получали прозрачный раствор	ОФС 42-0049-07 ГФ XII, часть 1, с. 92
Прозрачность раствора	Прозрачный раствор	Прозрачный раствор	ОФС 42-0051-07 ГФ XII, часть 1, стр. 98
Цветность	Бесцветный раствор	Бесцветный раствор	ОФС 42-0050-07 ГФ XII, часть 1, стр. 93
pH	$6,8 \pm 0,2$	$6,7 \pm 0,3$	ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)
Количественное содержание	$0,0079 \pm 0,0001$ г/амп	$0,0080 \pm 0,0001$ г/амп	ВЭЖХ

Полученные данные пяти независимых экспериментов для каждого состава каждого режима замораживания продемонстрировали, что в качестве вспомогательного вещества целесообразно использование в качестве криопротектора D-маннитол, растворы содержащих в качестве вспомогательного вещества ПВП содержали 80-90% пептида, что является неудовлетворительным по показателю качества количественное содержание. Лиофилизаты гетеромерного пептида с использованием в качестве криопротектора D-маннитол с концентрациями (0,015; 0,020; 0,030 г на 1

ампулу) соответствовали предъявляемым показателям качества, а так как концентрация D-маннитола не оказывала влияния на качество полученного лиофилизата гетеромерного пептида, поэтому была выбрана концентрация D-маннитол 0,015 мг.

Режим замораживания не повлиял на качество лиофилизатов составов № 7-9, таким образом, для лиофилизации пептида можно использовать как быстрый, так и медленный режим замораживания.

Поскольку режим замораживания не влияет на качество конечного продукта, как наиболее технологичный метод целесообразно использовать метод быстрого замораживания раствора гетеромерного пептида.

4.3 Разработка режима лиофильной сушки гетеромерного пептида

Для исследования влияния режимов лиофилизации раствор гетеромерного пептида разливали по 1 мл в стеклянные ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай) и замораживали на полке до -50°C , используя режим быстрого замораживания.

Для каждого режима замораживания использовали по 5 серий препаратов по 5 образцов в каждой серии. После этого проводили лиофилизацию, используя режимы, в которых варьировали изменение температуры полки лиофильной сушилки во времени.

Режим №1. Полки лиофильной сушилки выдерживали при -50°C и давлении в камере 0,01 мБар в течение 5 часов, далее их нагревали от -50°C до -10°C со скоростью $8^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Далее полки нагревали от -10°C до 0°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, а от 0°C до $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. После достижения препаратом температуры $+20^{\circ}\text{C}$ (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Лиофилизация продолжалась 25 ч (рисунок 20).

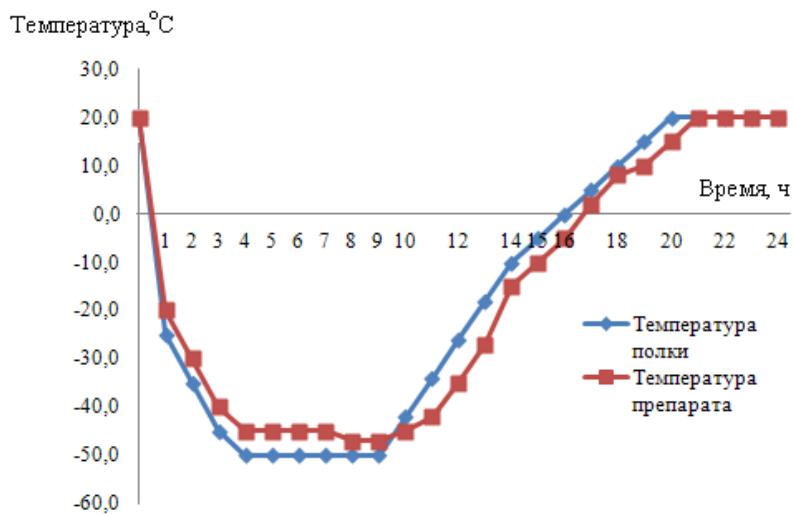


Рисунок 20 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида

Режим №2. Полки лиофильной сушилки выдерживали при -50°C и давлении в камере 0,01 мБар в течение 5 часов, далее их нагревали -50°C до -10°C со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. Далее полки нагревали от -10°C до 0°C со скоростью $2^{\circ}\text{C}/\text{ч}$, а от 0°C до $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $4^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. После достижения препаратом температуры $+20^{\circ}\text{C}$ (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Лиофилизация продолжалась 29 ч (рисунок 21).

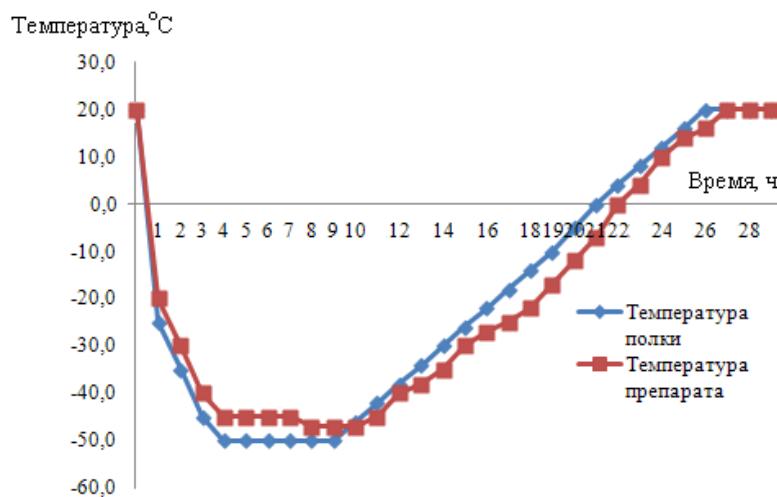


Рисунок 21 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида

Режим №3. Полки лиофильной сушилки выдерживали при -50°C и давлении в камере 0,01 мБар в течение 5 часов, далее их нагревали от -50°C до 0°C со скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. От 0°C до $+20^{\circ}\text{C}$ полки нагревали со скоростью

3 °C/ч. После достижения препаратом температуры +20°C (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Лиофилизация продолжалась 29 ч (рисунок 22).

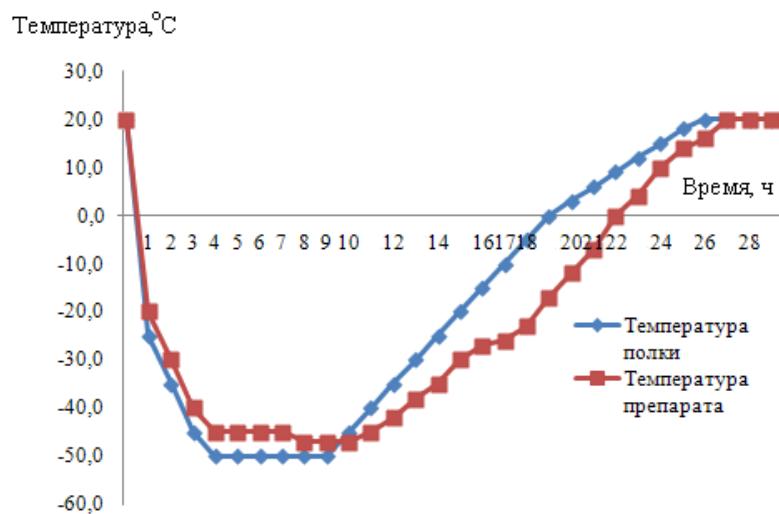


Рисунок 22 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида

Режим №4. Полки лиофильной сушилки выдерживали при -50°C и давлении в камере 0,01 мБар в течение 5 часов, далее их нагревали от -50°C до 0°C со скоростью 4°C/ч. От 0°C до +20°C полки нагревали со скоростью 2°C/ч. После достижения препаратом температуры +20°C (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Лиофилизация продолжалась 35 ч (рисунок 23).

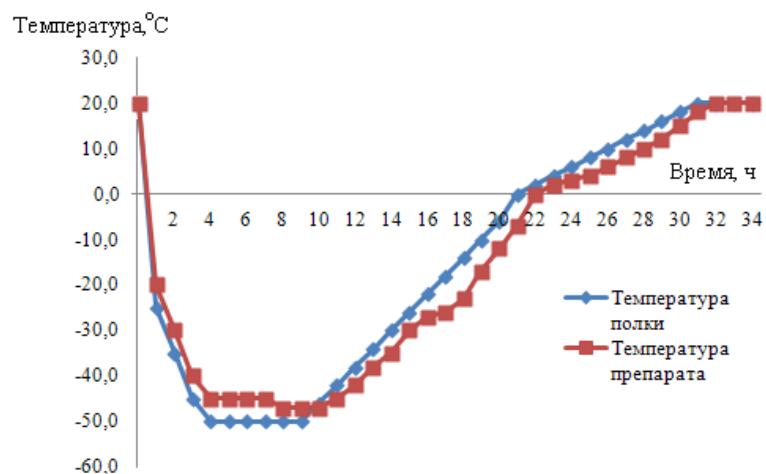


Рисунок 23 – Температура полок и раствора гетеромерного пептида

Сравнение режимов лиофилизации представлено в таблице 18.

Таблица 18 – Сравнение режимов лиофилизации гетеромерного пептида

Температура, °C	Режим лиофилизации гетеромерного пептида и скорость нагрева полки лиофильной сушилки (°C/ч)			
	№1	№2	№3	№4
–50	Выдержка в течение 5 часов при давлении 0,01 мБар			
от –50 до –10	8	4	5	4
от –10 до 0	4	5		
от 0 до +20	5	4	3	2
+20	Выдержка в течение 4 часов при давлении 0,01 мБар			

По окончанию лиофильной сушки вакуум в лиофильной камере гасили стерильным воздухом, пропущенным через фильтр «MF-Millipore» с размером пор 0,22 мкм. Ампулы с лиофилизатом гетеромерного пептида доставали с полки и запаивали с помощью лабораторной установки для запайки ампул: высокоточного ручного запаивателя ампул HS1 (Cozzoli, США).

Влияние режима лиофилизации оценивали по следующим показателям качества инъекционной лекарственной формы: внешний вид, растворимость в растворителе для инъекций, прозрачность раствора, pH, потеря в массе при высушивании, количественное содержание.

В результате проведенных исследований показатели качества образцов №1, 2 и 4 соответствуют нормам для инъекционных лекарственных форм, количественное содержание гетеромерного пептида значительно не изменилось. Так как при использовании метода №3 растворимость в растворителе для инъекций и прозрачность раствора не соответствовали требованиям нормативно-технической документации по соответствующим показателям, его применение в дальнейшем было признано нецелесообразным. Возможно, причина в достаточно быстрой скорости перехода от температуры –50°C до 0°C, что могло привести к изменению кристаллической структуры лиофилизата гетеромерного пептида.

Таблица 18 – Показатели качества лиофилизатов, полученных разными режимами лиофилизации

Показатели	Режим лиофилизации				Методы анализа
	№1	№2	№3	№4	
Внешний вид	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Визуально
Растворимость в растворителе для инъекций (вода для инъекций)	После добавления воды для инъекций и интенсивного встряхивания в течение 3 мин получали прозрачный раствор	После добавления воды для инъекций и интенсивного встряхивания в течение 3 мин получали прозрачный раствор	Непрозрачный раствор, раствор содержит нерастворившиеся частицы после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 10 мин	После добавления воды для инъекций и интенсивного встряхивания в течение 3 мин получали прозрачный раствор	ОФС 42-0049-07 ГФ XII, часть 1, с. 92
Прозрачность раствора	Прозрачный раствор	Прозрачный раствор	Непрозрачный раствор	Прозрачный раствор	ОФС 42-0051-07 ГФ XII, часть 1, стр. 98
Цветность	Бесцветный раствор	Бесцветный раствор	Непрозрачный раствор	Бесцветный раствор	ОФС 42-0050-07 ГФ XII, часть 1, стр. 93
pH	6,8±0,2	6,7±0,3	6,8±0,01	7,0±0,02	ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)
Потеря в массе при высушивании	2,5±0,1%	2,6±0,1%	2,5±0,1%	2,4±0,1%	ГФ XI, часть 1, с. 176
Количественное содержание	0,0079±0,0001 г/амп	0,0080±0,0001 г/амп	0,0081±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	ВЭЖХ

Учитывая полученные результаты, а также высокие энергозатраты, сопровождающие технологический процесс, в целях экономии электроэнергии, режим №1 был признан наиболее целесообразным для лиофилизации гетеромерного пептида.

По окончанию лиофилизации для подтверждения активности гетеромерного пептида проводили оценку антиагрегационной способности лиофилизата гетеромерного пептида.

Оценку проводили *in vitro* с использованием турбидиметрического метода Борна с использованием аденоzinидифосфата в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. В результате исследований выявлено, что лиофилизат гетеромерного пептида обладает выраженными антиагрегационными свойствами.

4.4 Технология получения лиофилизированного порошка

Технологическая схема производства лиофилизированного порошка в ампулах представлена на рисунке 24.

Приготовление раствора пептида с концентрацией 8 мг/мл. В стеклянной колбе вместимостью 10 мл взвешивали 24 мг *ИБДФ-П-46* и 45 мг Д-маннитола. Добавляли 3 мл воды очищенной и перемешивали на магнитной мешалке IKA RST basic (IKA, Германия) при 500 об./мин в течение 35 мин. Данный раствор использовали для получения 3-х образцов продукта.

Стерильная фильтрация раствора пептида. Полученный раствор пептида фильтровали через мембранные фильтры «MF-Millipore» 0,22 мкм подключая систему к вакууму водоструйного насоса.

Перед фильтрованием проводили проверку целостности фильтра по «пузырьковому» тесту: фильтр считается пригодным к использованию, если при достижении максимального давления через слой жидкости не проходят пузырьки газа. Фильтрат собирали в стерильный сборник.

После стерилизующей фильтрации растворы проверяли на стерильность методом прямого посева (ОФС 42-0066-07ГФ XII, часть 1, стр. 150). Проведенные исследования показали отсутствие роста тест-микроорганизмов: *B. subtilis* ATCC 6633 – для тиогликолевой среды; *C. albicans* NCTC 885-653 – для соево-казеинового бульона или жидкой среды Сабуро, что демонстрировал стерильность приготовленного раствора пептида.

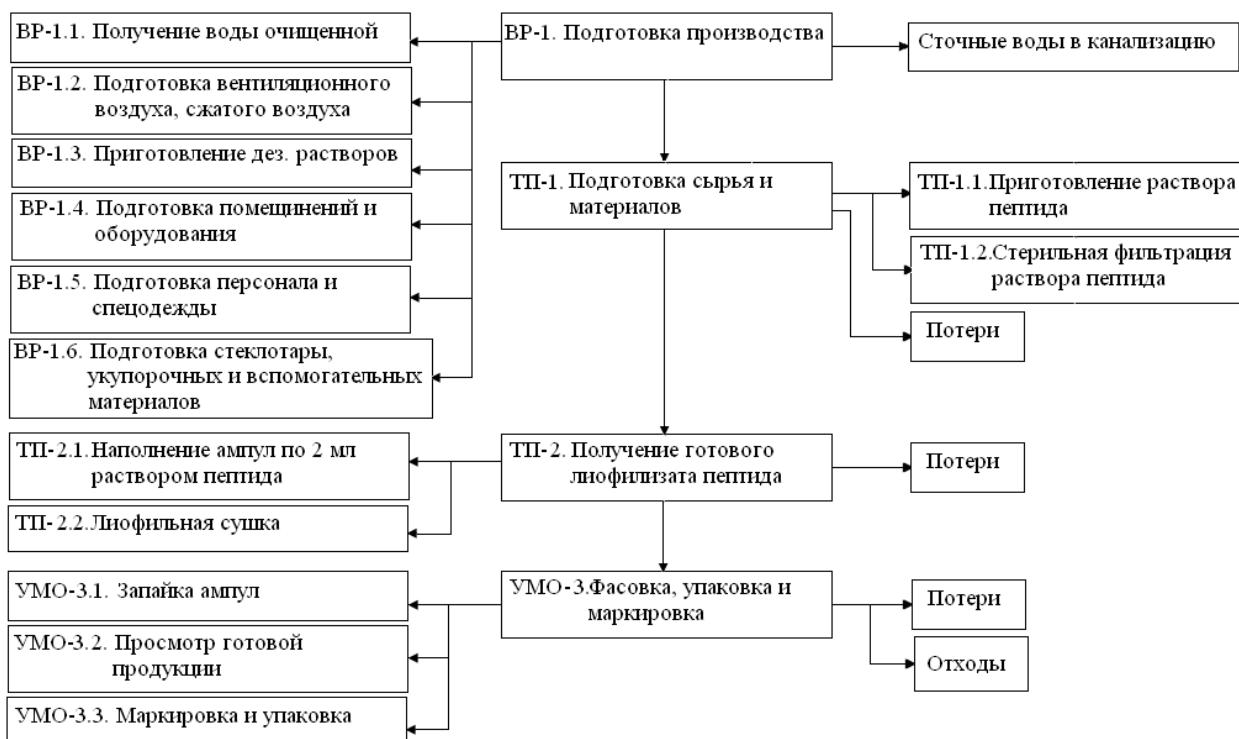


Рисунок 24 – Технологическая схема производства лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции 3 мг

Наполнение ампул раствором пептида. Для фасовки раствора пептида использовали ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай). Ампулы, поступившие из материальной комнаты, предварительно просматривали и отбраковывали по видимым невооруженным глазом дефектам (наличие трещин, инородных включений, загрязнений на внутренней и наружной поверхностях) и по геометрическим размерам.

Отбракованные ампулы собирали в контейнер для твёрдых отходов. Кондиционные ампулы мыли в горячей водопроводной воде с применением

0,5 % моющего средства «Сульфанол». Тщательно ополаскивали водой очищенной не менее 5 раз и передавали в сушку.

Внутри ампулы мыли ультразвуковым методом с помощью ультразвуковой ванны Jeken PS-30 (Jeken, Китай) (температура воды: 60°C, заполнение ампул на 2/3 их объема, двукратное озвучивание: 20 и 10 с). Чистые ампулы упаковывали в металлические корзины. Ставили в сухожаровой шкаф с вентилятором. Задавали параметры сушки: температура (120±10)°C, время 20 мин.

Для стерилизации ампул их помещали в суховоздушный стерилизатор и в течение часа выдерживали при температуре 180°C. После окончания производственного процесса, выгружали корзины, просматривали и отвозили на участок фасовки производственного помещения. Контроль чистоты подготовленной тары осуществляли микробиологически по 5-ти сериям.

Предложенный режим обработки ампул обеспечивал отсутствие патогенных микроорганизмов при анализе.

Раствор пептида с концентрацией 8 мг/мл фасовали по 1 мл с помощью стерильного дозатора.

Лиофилизация. Гетеромерный пептид загружали на полки лиофильной сушки при температуре +20÷22°C, охлаждали полки за 1-1,5 час до -22÷25°C, за 3 часа до -31÷35°C, за 4,5 часа до -40÷45°C, и за 5,5 часов до -48÷50°C, после чего выдерживали данную температуру в течение 5 чи давлении в камере 0,01 мБар, далее их нагревали -50°C до -10°C со скоростью 8°C/ч. Далее полки нагревали от -10°C до 0°C со скоростью 4°C/ч, а от 0°C до +20°C со скоростью 5°C/ч. После достижения препаратом температуры +20°C (давление в камере 0,01 мБар) его выдерживали при этой температуре в течение 4 ч. Лиофилизация продолжалась 25 ч.

Анализ подтверждал отсутствие посторонних химических примесей. Высушенный лиофильно гетеромерный пептид представлял собой массу белого цвета.

Температурный режим лиофилизации представлен на рисунке 25.

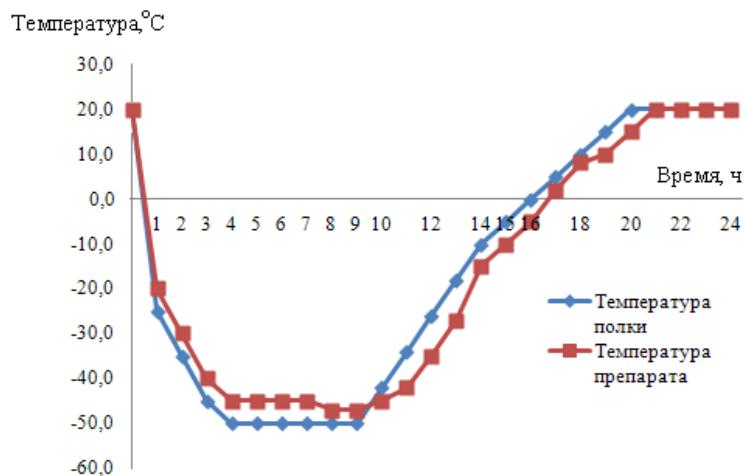


Рисунок 25 – Температурный режим лиофилизации гетеромерного пептида.

Фасовка, упаковка и маркировка готового продукта. После окончания процесса сушки ампулы с лиофилизатом доставали с полки и запаивали. Проверяли на весах массу лиофилизата, которая должна быть в пределах $0,023 \pm 0,001$ г (ИБДФ-П-46 и D-маннитол). Затем маркировали и помещали в картонные коробки и ставили на хранение при -20°C в холодильник.

Полученный лиофилизат гетеромерного пептида для парентерального применения оценивали по основным показателям качества, предъявляемым к инъекционным лекарственным формам.

4.5 Заключение

Исследовано влияние вспомогательных веществ ПВС (составы № 1-3), ПВП (составы № 4-6), D-маннитол (составы № 7-9) на качество готово лекарственного препарата. Составы с ПВС (составы № 1-3) имели неудовлетворительные показатели прозрачность, цветность, растворимость; составы в ПВП (составы № 4-6) после лиофилизации содержали гетеромерного пептида 80-90%, что является неудовлетворительным по показателю качества количественное содержание. Полученные данные продемонстрировали, что в качестве вспомогательного вещества

целесообразно использование в качестве криопротектора D-маннитол (составы № 7-9). Концентрация D-маннитола не оказывала влияния на качество полученного лиофилизата гетеромерного пептида, поэтому была выбрана концентрация D-маннитол 0,015 мг (состав № 7).

Исследование влияния режима замораживания продемонстрировало, что режим замораживания не влияет на качество конечного продукта, в целях экономии затрат на электроэнергию целесообразно использовать метод быстрого замораживания раствора гетеромерного пептида. Проведенные исследования влияния режима лиофилизации показали, что целесообразно использовать режим №1.

Разработана технология получения лиофилизированного гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции, включающая в себя: приготовление раствора пептида, стерильную фильтрацию раствора пептида, наполнение ампул раствором пептида, лиофилизацию, фасовку, упаковку и маркировку готового продукта.

5 РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИОФИЛИЗАТА НАНОЧАСТИЦ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ИНЬЕКЦИИ

5.1 Получение лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида

Для пролонгирования фармакологического эффекта в настоящее время используется, среди иных, такой технологический прием, как включение биологически активного соединения в наночастицы. Кроме пролонгирования, этот технологический прием позволяет изменить фармакокинетический профиль соединения за счет изменения профиля терминального участка кривой. Для соединений пептидной природы, и, в частности, пептида антиагрегационного действия, этот факт является очень важным, позволяя избежать резких колебаний вещества в крови.

Учитывая растворимость *ИБДФ-П-46*, в качестве метода создания наночастиц был выбран метод двойного эмульгирования, используемый для лабильных соединений, при котором обеспечивается диффузия органического растворителя в водную фазу.

Водный раствор пептида эмульгируют с органическим раствором полимера для образования эмульсии типа «вода/масло». Первичную эмульсию приливают к внешней водной фазе со стабилизатором и гомогенизируют. Для повышения устойчивости проводят дополнительную гомогенизацию двойной эмульсии. Полученную эмульсию типа «вода/масло/вода» переливают в емкость с водным раствором криопротектора (D-маннитола) и перемешивают. Органический растворитель упаривают и полученные наночастицы гетеромерного пептида лиофилизируют.

На основании данных, представленных в Главе 4, для разработки технологии получения лекарственного препарата выбрали дозу 8 мг.

Для получения лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида в процессе разработки технологии варьировали стабилизаторы эмульсии, концентрации

носителя и стабилизаторов, природу органического растворителя, режимы перемешивания, условия диспергирования и режим лиофилизации.

5.2 Выбор носителя и стабилизатора для образования первичной эмульсии гетеромерного пептида в наночастицах

При разработке технологии включения *ИБДФ-П-46* в состав наночастиц принимались во внимание физико-химические свойства пептида и требования к носителю: отсутствие токсичности, его биодеградируемость. Поэтому для создания наночастиц был выбран сополимер молочной и гликолевой кислот (PLGA 50/50).

Для получения первичной эмульсии с удовлетворительным содержанием гетеромерного пептида в наночастицах исследовали различные концентрации сополимера молочной и гликолевой кислот 50/50 (PLGA 50/50). Исследование проводили в диапазоне соотношения гетеромерного пептида к PLGA 50/50 от 1:0,25 до 1:6 (таблица 19).

Для каждой концентрации PLGA 50/50 готовили 5 серий препаратов по 6 образцов в каждой серии.

Таблица 19 – Результаты исследования оптимального соотношения гетеромерного пептида и PLGA 50/50

Соотношение	1:0,25	1:0,5	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
Степень включения, %	4,1±0,2	4,3±0,1	5,5±0,2	6,1±0,2	8,5±0,3	25,0±0,2	9,5±0,2	9,2±0,1

В результате проведенных исследований оптимальным соотношением *ИБДФ-П-46* : PLGA 50/50 было признано соотношение 1: 4, так как при таком соотношении наблюдалось наибольшее включение гетеромерного пептида в наночастицы, как это видно из данных таблицы 19.

5.3 Органический растворитель

Для исследования влияния органического растворителя рассмотрели

следующие вещества: хлороформ, дихлорметан, дихлорэтан. Определяли оптимальный растворитель по показателям токсичности и температуре кипения (таблица 20).

Таблица 20 – Характеристики растворителей

	Хлороформ	Дихлорметан	Дихлорэтан
Химическая формула	CHCl_3	CH_2Cl_2	$\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}_2$
Температура кипения, °C	61,2	40,0	84,0
Токсичность	Высокая	Низкая	Высокая

Учитывая низкую токсичность и наиболее низкую температуру кипения, как следствие хорошую летучесть, выбрали в качестве растворителя дихлорметан, как наиболее технологичный растворитель для создания наночастиц гетеромерного пептида.

5.4 Получение первичной эмульсии типа «вода/масло»

Для приготовления первичной эмульсии типа «вода/масло» использовали разные режимы перемешивания для достижения поставленных целей. Для каждого режима готовили 5 серий препаратов по 6 образцов в каждой серии. В режимах варьировали скорость и дискретность перемешивания погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия).

Режим №1. К 9,6 мл раствора полимера PLGA 50/50 в дихлорметане (концентрация 0,10 мг/мл) постепенно добавляли (1 мл в 15 сек) 7,20 мл водного раствора ИБДФ-П-46 (концентрация 0,029 мг/мл) при постоянном перемешивании (250 об./мин). Продолжали перемешивание непрозрачной смеси при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадкой) S25N – 10G при 24 тыс. об./мин в течение 4 минут. Температура смеси не должна превышать 25°C.

Готовность эмульсии определяли по образованию пенистой массы белого цвета и под микроскопом. Процесс приготовления занял 25 минут.

Режим №2. К 9,6 мл раствора полимера PLGA 50/50 в дихлорметане (концентрация 0,10 мг/мл) постепенно добавляли (1 мл в 15 сек) 7,20 мл водного раствора *ИБДФ-П-46* (концентрация 0,029 мг/мл) при постоянном перемешивании (250 об./мин). Продолжали перемешивание непрозрачной смеси при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадкой) S25N – 10G при 24 тыс. об./мин. Температура смеси не должна превышать 25°C. Для образования эмульсии типа «вода/масло» и разрушения эмульсии обратного типа, проводили дискретное перемешивание в режиме: 3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв.

Готовность эмульсии определяли по образованию пенистой массы белого цвета и под микроскопом. Процесс приготовления занял 20 минут.

Режим №3. К 9,6 мл раствора полимера PLGA 50/50 в дихлорметане (концентрация 0,10 мг/мл) постепенно добавляли (1 мл в 15 сек) 7,20 мл водного раствора *ИБДФ-П-46* (концентрация 0,029 мг/мл) при постоянном перемешивании (500 об./мин). Продолжали перемешивание непрозрачной смеси при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадкой) S25N – 10G при 24 тыс. об./мин. Температура смеси не должна превышать 25°C. Для образования эмульсии типа «вода/масло» и разрушения эмульсии обратного типа, проводили дискретное перемешивание в режиме: 3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв.

Готовность эмульсии определяли по образованию пенистой массы белого цвета и под микроскопом. Процесс приготовления занял 12 минут.

Сравнение режимов получения эмульсии типа «вода/масло» представлены в таблице 21.

Таблица 21. Режимы получения эмульсии типа «вода/масло»

	Режим №1	Режим №2	Режим №3
Скорость перемешивания магнитной мешалки, об/мин	250	250	500
Дискретность перемешивания погружного гомогенизатора	Перемешивание в течение 4 мин	3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв	3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв
Время приготовления	25 мин ± 10 сек	20 мин ± 10 сек	12 мин ± 10 сек

Наиболее технологичным признан режим №3, так как время получения однородной эмульсии наименьшее, а размер наблюдаемых частиц в среднем составляло $250 \pm 3,7$ нм.

5.5 Выбор стабилизатора для вторичной эмульсии

Для получения вторичной эмульсии гетеромерного пептида изучали возможность использования различных стабилизаторов устойчивости наночастиц гетеромерного пептида. Для стабилизации эмульсии рассматривали такие соединения, как поливиниловый спирт (ПВС), метилцеллюлозу (МЦ), поливинилпирролидон (ПВП) в различных концентрациях и оценивали устойчивость образовавшейся эмульсии (таблица 22). Для каждой концентрации вспомогательных веществ готовили 5 серий препаратов по 6 образцов в каждой серии.

Таблица 22 – Результаты исследования влияния стабилизаторов на устойчивость эмульсии

	Стабилизатор								
	ПВП			ПВС			МЦ		
	1:1	1:3	1:5	1:1	1:3	1:5	1:1	1:3	1:5
Соотношение ИБДФ-П-46 : стабилизатор									
Устойчивость эмульсии*	–	–	–	+-	+	+	–	–	–

* «+» - эмульсия устойчива в течение 20 минут,

«+-» - эмульсия устойчива, однако через 5 минут происходит ее разрушение,

«–» - эмульсия не устойчива.

В результате было выявлено, что оптимальным является использование ПВС при соотношениях 1:3 и 1:5, размер частиц эмульсии при этом не превышал $300\pm2,5$ нм. В дальнейших экспериментах было использовано соотношение 1:3.

5.6 Получение вторичной эмульсии типа «вода/масло»

Для приготовления вторичной эмульсии типа «вода/масло/вода» использовали разные режимы перемешивания для достижения поставленных целей. Для каждого режима готовили 5 серий препаратов по 6 образцов в каждой серии. В режимах варьировали скорость и дискретность перемешивания погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия).

Режим №1. К 144,0 мл 0,5% водного раствора ПВС добавляли по каплям 16,8 мл первичной эмульсии при перемешивании (350 об./мин) на магнитной мешалке в течение 3 мин. Перемешивание непрозрачной смеси продолжали в течение 20 мин. Далее при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадки) S25N – 25G получали вторичную эмульсию типа «вода/масло/вода» (2-е эмульгирование) при комнатной температуре при 24 тыс. об./мин 3 раза по 30 сек с 2 перерывами по 30 сек. В результате получали эмульсию белого цвета.

Режим №2. К 144,0 мл 0,5% водного раствора ПВС добавляли по каплям 16,8 мл первичной эмульсии при перемешивании (700 об./мин) на магнитной мешалке в течение 3 мин. Перемешивание непрозрачной смеси продолжали в течение 14 мин. Далее при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадки) S25N – 25G получали вторичную эмульсию типа «вода/масло/вода» (2-е эмульгирование) при комнатной

температуре при 24 тыс. об./мин 3 раза по 30 сек с 2 перерывами по 30 сек. В результате получали эмульсию белого цвета.

Режим №3. К 144,0 мл 0,5% водного раствора ПВС добавляли по каплям 16,8 мл первичной эмульсии при перемешивании (1000 об./мин) на магнитной мешалке в течение 3 мин. Перемешивание непрозрачной смеси продолжали в течение 14 мин. Далее при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадки) S25N – 25G получали вторичную эмульсию типа «вода/масло/вода» (2-е эмульгирование) при комнатной температуре при 24 тыс. об./мин 3 раза по 30 сек с 2 перерывами по 30 сек. В результате получали эмульсию белого цвета.

Сравнение режимов получения эмульсии типа «вода/масло/вода» представлены в таблице 23.

Таблица 23. Режимы получения эмульсии типа «вода/масло/вода»

	Режим №1	Режим №2	Режим №3
Скорость перемешивания магнитной мешалки, об/мин	350	700	1000
Время перемешивания на магнитной мешалке	20 мин ± 10 сек	14 мин ± 10 сек	14 мин ± 10 сек

Время получения эмульсии режимами №2 и 3 одинаковое, поэтому был выбран режим №2 как наиболее технологичный. Получали эмульсию, в состав которой входили частицы размеров: от 350 до 2010 нм.

5.7 Дополнительное диспергирование вторичной эмульсии гетеромерного пептида

Для повышения устойчивости эмульсии проводили дополнительную гомогенизацию ультразвуком (УЗ-гомогенизатор Bandelin Sonopuls HD 3100 (Bandelin) с рабочей частотой 20 кГц) в течение 10 минут.

Дополнительная гомогенизация за счет уменьшения размера крупных частиц позволила повысить однородность эмульсии и, как следствие, устойчивость эмульсии возросла до 20 минут.

Далее дихлорметан упаривали на роторном испарителе IKA RV-10 (IKA) при 40°C. Вторичную эмульсию фильтровали через стеклянный фильтр 40 мкм. Фильтрат собирали в круглодонную колбу на 250 мл с водным раствором 3,20 мл D-маннитола (концентрация 0,15 мг/мл) и перемешивали в течение 15 мин.

5.8 Подбор режима лиофилизации раствора наночастиц гетеромерного пептида

Для получения стабильной лекарственной формы раствор наночастиц пептида лиофилизировали. Для определения оптимальных условий лиофилизации подбирали режим лиофилизации раствора гетеромерного пептида в наночастицах.

Для исследования выбрали следующий состав наночастиц гетеромерного пептида: *ИБДФ-П-46* – 10,0%, PLGA 50/50 – 40,0%, ПВС – 30,0%, D-маннитол – 20,0%. В процессе оптимизации лиофилизации использовали несколько режимов, в которых варьировали скорости изменения температуры полки лиофильной сушилки.

Для каждого режима готовили 5 серий препаратов по 5 образцов в каждой серии.

Режим №1. Полученную смесь гетеромерного пептида в наночастицах дозировали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай).

Полученный препарат загружали на полки лиофильной сушилки при температуре +20°C и охлаждали до –50°C. После достижения препаратом температуры –50°C его выдерживали его при данной температуре в течение 5 ч и давлении в камере 0,01 мБар. Затем нагревали от –50°C до +20°C со

скоростью $5^{\circ}\text{C}/\text{ч}$. После достижения температуры $+20^{\circ}\text{C}$ препарат выдерживали при этой температуре в течение 4 ч.

Общее время сушки составило 24 ч.

По окончанию сушки проверяли полноту лиофилизации с помощью осторожного постукивания рукой по колбе – лиофилизат должен опадать на дно коблы со стенок (рисунок 26).

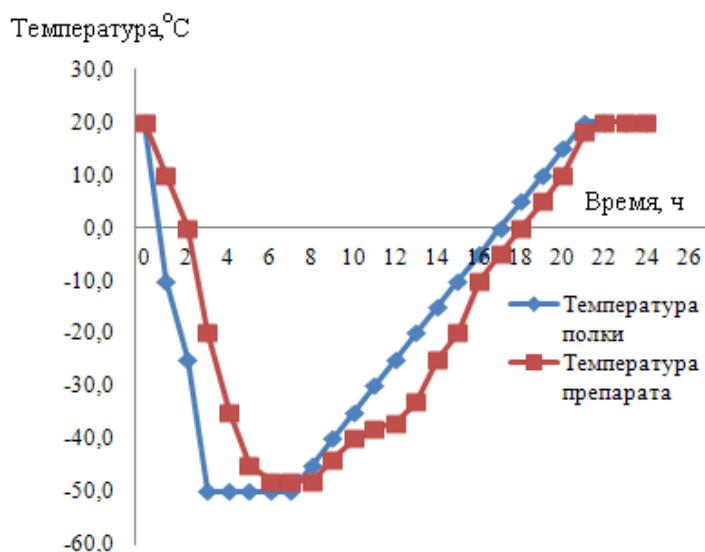


Рисунок 26 – Температура полок и раствора наночастиц гетеромерного пептида

Режим №2. Полученную смесь гетеромерного пептида в наночастицах дозировали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай).

Полученный препарат загружали на полки лиофильной сушки при температуре $+20^{\circ}\text{C}$ и охлаждали до -50°C . Далее производили ступенчатую разморозку препарата: нагревали полки до температуры -10°C со скоростью $+5^{\circ}\text{C}/\text{час}$; от -10°C до 0°C со скоростью $+4^{\circ}\text{C}/\text{час}$; нагрев полок до комнатной температуры $+20^{\circ}\text{C}$ со скоростью $+3^{\circ}\text{C}/\text{час}$. После достижения температуры $+20^{\circ}\text{C}$ препарат выдерживали при этой температуре в течение 4 ч.

Общее время сушки составило 27 ч.

По окончанию сушки проверяли полноту лиофилизации с помощью

осторожного постукивания рукой по колбе – лиофилизат должен опадать на дно коблы со стенок (рисунок 27).

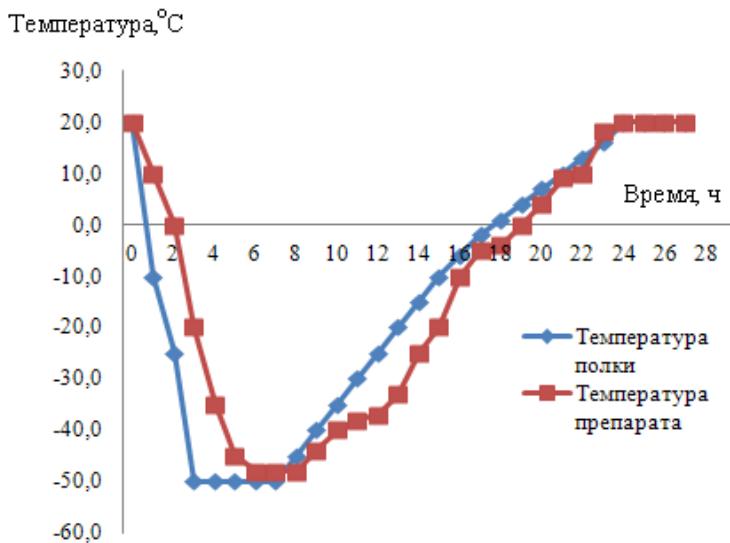


Рисунок 27 – Температура полок и раствора наночастиц гетеромерного пептида

Режим №3. Полученную смесь гетеромерного пептида в наночастицах дозировали по 1 мл в ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай).

Полученный препарат загружали на полки лиофильной сушки при температуре +20°C и охлаждали ступенчато: от +20°C до -10°C за 1,5 часа; затем до -10°C до -30°C за 2 часа; от -30°C до -50°C за 2 часа. После достижения температуры замораживания -50°C, препарат выдерживали при этой температуре в течение 5 часов. Далее производили ступенчатую разморозку препарата: нагревали полки до температуры -10°C со скоростью +5°C/час; от -10°C до 0°C со скоростью +4°C/час; нагрев полок до комнатной температуры +20°C со скоростью +3°C/час. После достижения температуры +20°C препарат выдерживали при этой температуре в течение 4 ч.

Лиофилизация продолжалась 30 ч.

По окончанию сушки проверяли полноту лиофилизации с помощью осторожного постукивания рукой по колбе – лиофилизат должен опадать на дно коблы со стенок (рисунок 28).

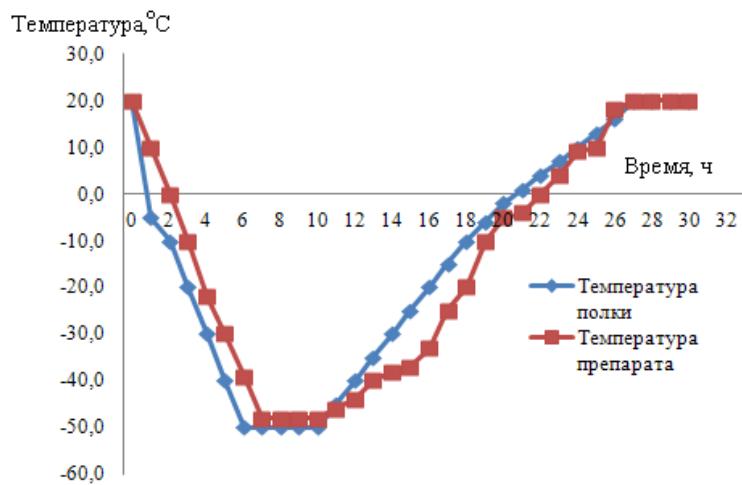


Рисунок 28 – Температура полок и раствора наночастиц гетеромерного пептида

Сравнение режимов лиофилизации представлено в таблице 24.

Таблица 24 – Сравнение режимов лиофилизации

Температура, °C	Режим лиофилизации гетеромерного пептида в наночастицах и скорость нагрева полки лиофильной сушилки (°C/ч)		
	№1	№2	№3
Замораживание	Быстрое	Быстрое	Медленное
-50	Выдержка в течение 5 часов при давлении 0,01 мБар		
от -50 до -10	5	5	5
от -10 до 0		4	4
от 0 до +20		3	3
+20	Выдержка в течение 4 часов при давлении 0,01 мБар		

По окончанию лиофильной сушки вакуум в лиофильной камере гасили стерильным воздухом, пропущенным через фильтр «MF-Millipore» 0,22 мкм. Ампулы с лиофилизатом гетеромерного пептида в наночастицах доставали с полки и запаивали.

По окончанию процесса лиофилизации оценивали влияние режима заморозки и лиофильной сушки по следующим показателям оценки качества: внешний вид, pH, потеря в массе при высушивании, размеры частиц, сусpenдируемость, количественное содержание.

Для каждого метода лиофилизации использовали серию из пяти ампул. Данные качественного анализа представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Показатели качества лиофилизатов, полученных разными режимами заморозки и лиофилизации

Показатели	Режим лиофилизации			Методы анализа
	№1	№2	№3	
Внешний вид	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Визуально
pH	6,9±0,2	6,7±0,3	7,0±0,01	ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)
Определение размеров частиц (диаметр), нм	304,5±4,0	305,2±3,5	302,1±4,2	Метод динамического светорассеяния
Суспендируемость	Удовл., устойчивость супензии в течение 10 мин.	Удовл., устойчивость супензии в течение 10 мин.	Неудовл., супензия разрушается в процессе лиофилизации.	Визуально
Потеря в массе при высушивании	2,5±0,1%	2,6±0,1%	2,5±0,1%	ГФ XI, часть 1, с. 176
Количественное содержание	0,0079±0,0001 г/амп	0,0081±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	ВЭЖХ

В результате проведенных исследований режимы № 1, 2 соответствуют нормам показателей качества, количественное содержание гетеромерного пептида в наночастицах значительно не изменилось. При температурных режимах №3 наблюдалось разделение фаз, поэтому этот метод не соответствует по показателю качества суспендируемость.

Получение наночастиц подтверждали с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.). Размеры частиц: 304,5±4,20 нм.

В результате исследований целесообразно использовать режим №1 для лиофилизации гетеромерного пептида. По окончанию лиофилизации для

подтверждения активности гетеромерного пептида проводили оценку антиагрегационной способности. Оценку проводили *in vitro* с использованием турбидиметрического метода Борна с использованием аденоzinидифосфата в качестве индуктора агрегации тромбоцитов. В результате исследований выявлено, что лиофилизат гетеромерного пептида обладает выраженными антиагрегационными свойствами.

5.9 Технология получения лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах

Лиофилизат наночастиц получали в асептических условиях в стерильных боксах. Технологическая схема производства лиофилизата наночастиц *ИБДФ-П-46* представлена на рисунке 29.

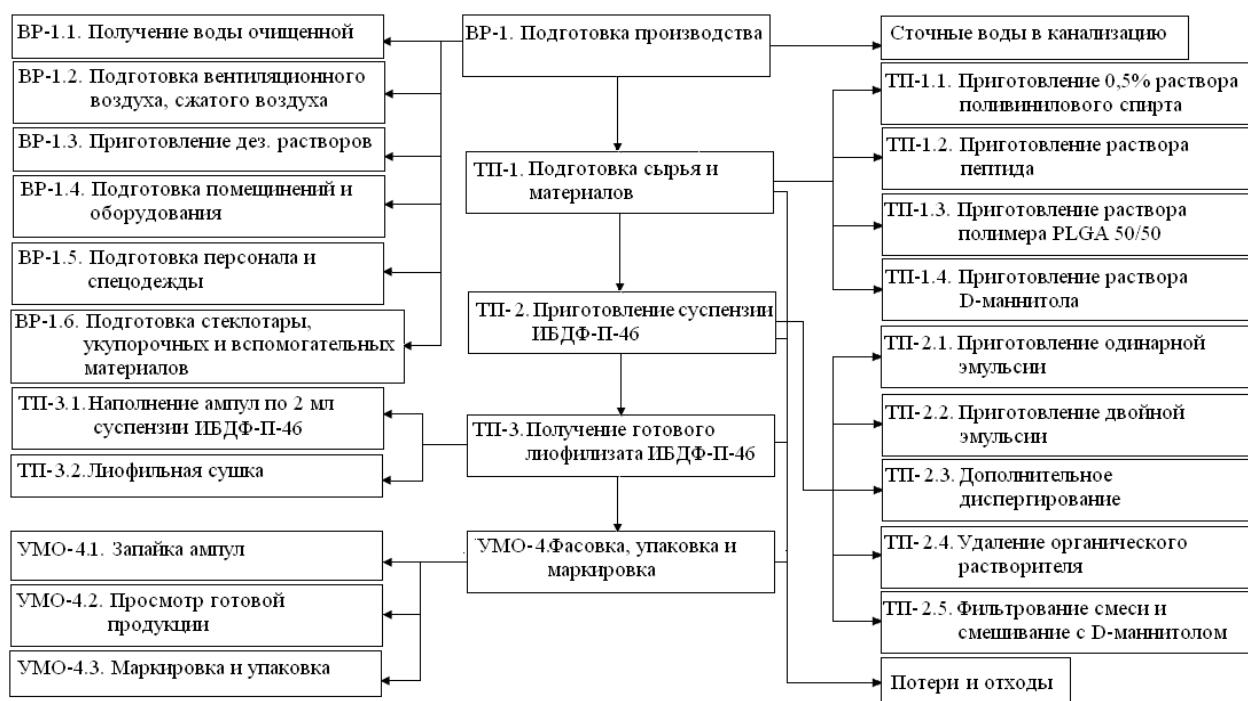


Рисунок 29 – Технологическая схема производства лиофилизата *ИБДФ-П-46* в наночастицах

Приготовление гетеромерного пептида в наночастицах.

Приготовление 0,5% раствора поливинилового спирта. В стеклянном бюксе на аналитических весах взвешивали 0,72 г

поливинилового спирта (ПВС) и помещали его в коническую колбу вместимостью 500 мл. С помощью мерного цилиндра на 100 мл добавляли 144 мл воды очищенной. Колбу закрепляли на лабораторном штативе с помощью лапки, соединяли с обратным водяным холодильником термометром через двурогий форштосс. Обогрев и перемешивание раствора до 70°C вели с помощью магнитной мешалки IKA RST basic (IKA, Германия). Контроль температуры раствора осуществляли с помощью термометра. Перемешивание с нагревом проводят до полного растворения осадка через 50 мин. Затем нагрев рабочей поверхности мешалки отключали и продолжали перемешивание, охлаждая раствор ПВС до 25°C. Испарение воды при нагреве (от 0,6 до 1 г) компенсируют добавлением воды очищенной с помощью дозатора.

Полученный раствор используется для получения 30-ти серий продукта.

Приготовление раствора пептида. В стеклянной колбе вместимостью 1 мл взвешивали 0,240 г *ИБДФ-П-46*. Добавляли 7,2 мл воды очищенной и перемешивали на магнитной мешалке IKA RST basic (IKA, Германия) при 500 об./мин в течение 30 мин при температуре 50°C до получения прозрачного раствора.

Приготовление раствора полимера PLGA 50/50. В стеклянную колбу, вместимостью 50 мл помещали предварительно взвешенный PLGA 50/50 в количестве 0,96 г. Добавляли 9,6 мл дихлорметана и перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин.

Получали прозрачный, слегка окрашенный раствор.

Приготовление раствора D-маннитола. В стеклянном бюксе на аналитических весах взвешивали 0,480 г D-маннитола и помещали его в коническую колбу вместимостью 10 мл. С помощью мерного цилиндра на

10 мл добавляли 3,20 мл воды очищенной. Колбу закрепляли на лабораторном штативе с помощью лапки. Перемешивание раствора вели с помощью магнитной мешалки IKA RST basic (IKA, Германия).

Приготовление первичной эмульсии типа «вода/масло» (первое эмульгирование). К 9,6 мл раствора полимера PLGA 50/50 (концентрация 0,10 мг/мл) в дихлорметане постепенно добавляли (1 мл в 15 сек) 7,2 мл водного раствора ИБДФ-П-46 (концентрация 0,029 мг/мл) при постоянном перемешивании на магнитной мешалке IKA RST basic (IKA, Германия) (500 об./мин). Продолжали перемешивание непрозрачной смеси при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадки) S25N – 10G при 24 тыс. об./мин. Температура смеси не должна превышать 25°C.

Для образования эмульсии типа «вода/масло» и разрушения эмульсии обратного типа, проводили дискретное перемешивание в режиме: 3 раза по 30 сек – перемешивание, 2 раза по 30 сек – перерыв.

Готовность эмульсии определяли по образованию пенистой массы белого цвета и под микроскопом. Процесс приготовления занял 12 минут.

Приготовление вторичной эмульсии типа «вода/масло/вода» (второе эмульгирование). К 144,0 мл 0,5% водного раствора ПВС добавляли по каплям 16,8 мл первичной эмульсии при перемешивании (700 об./мин) на магнитной мешалке в течение 3 мин. Перемешивание непрозрачной смеси продолжали в течение 14 мин. Далее при помощи погружного гомогенизатора IKA Ultra-Turrax T-25 basic (IKA, Германия), оснащенного диспергирующим элементом (насадки) S25N – 25G получали вторичную эмульсию типа «вода/масло/вода» (2-е эмульгирование) при комнатной температуре при 24 тыс. об./мин 3 раза по 30 сек с 2 перерывами по 30 сек. Образовывалась пенистая масса белого цвета, которую сразу использовали далее на следующей стадии.

Дополнительное диспергирование. Дополнительное ультразвуковое воздействие на полученную вторичную эмульсию проводили с помощью ультразвукового гомогенизатора BandelinSonopulsHD 3100 (Bandelin, Германия) с рабочей частотой 20 кГц в течение 10 мин. Зонд опускали на расстояние 0,5 см от дна пластикового реакционного сосуда, который помещали в баню с ледяной водой (смесью воды и льда).

Удаление органического растворителя. Пенистую реакционную массу перегружали в круглодонную колбу на 250 мл. Упаривали в вакууме дихлорметан с помощью роторного испарителя IKA RV10 (IKA, Германия) и стеклянного водоструйного насоса. Режим упаривания: 30 мин при комнатной температуре; 15 мин при 25°C в бане; затем температуру в бане поднимали до 40°C и заканчивали процесс через 10 мин при лёгком запотевании каплеотбойного переходника.

Фильтрование реакционной смеси и смещивание с D-маннитолом. Полученный после упаривания органического растворителя белый непрозрачный коллоидный раствор фильтровали самотёком через стеклянный фильтр (пористость 40 мкм), вставленный в прямой алонж. Фильтрат собирали в стеклянный реактор вместимостью 250 мл с раствором D-маннитола. При необходимости увеличения скорости фильтрования систему подключали к вакууму водоструйного насоса.

Получение готового гетеромерного пептида в наночастицах.

Наполнение ампул. Для фасовки гетеромерного пептида использовали ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай). Ампулы, поступившие из материальной комнаты, предварительно просматривали и отбраковывали по видимым невооружённым глазом дефектам (наличие трещин, инородных включений, загрязнений на внутренней и наружной поверхностях) и по геометрическим размерам.

Отбракованные ампулы собирали в контейнер для твёрдых отходов. Кондиционные ампулы мыли в горячей водопроводной воде с применением 0,5 % моющего средства «Сульфганол». Тщательно ополаскивали водой очищенной не менее 5 раз и передавали в сушку. Внутри ампулы мыли ультразвуковым методом с помощью ультразвуковой ванны Jeken PS-30 (Jeken, Китай) (температура воды: 60°C, заполнение ампул на 2/3 их объема, двукратное озвучивание: 20 и 10 с). Чистые ампулы упаковывали в металлические корзины. Ставили в сухожаровой шкаф с вентилятором. Задавали параметры сушки: температура (120±10)°C, время 20 мин. Для стерилизации ампул их помещали в суховоздушный стерилизатор и в течение часа выдерживали при температуре 180°C. После окончания производственного процесса выгружали корзины, просматривали и отвозили на участок фасовки производственного помещения.

Контроль чистоты подготовленной тары осуществляли микробиологически по 5-ти сериям. Предложенный режим обработки ампул обеспечивал соответствие требованиям к упаковке для стерильных лекарственных форм.

Реакционную смесь (коллоидный раствор и D-маннитол) фасовали в ампулы с помощью стерильного дозатора.

Получение лиофилизата. После розлива смеси гетеромерного пептида в наночастицах в ампулы объемом 2 мл (класс стекла: НС-1) производства Maotian Industry (Китай) препарат загружали на полки лиофильной сушки при температуре +20°C и охлаждали до -50°C. После достижения препаратом температуры -50°C его выдерживали его при данной температуре в течение 5 ч и давлении в камере 0,01 мБар. Затем нагревали от -50°C до +20°C со скоростью 5°C/ч. После достижения температуры +20°C препарат выдерживали при этой температуре в течение 4 ч.

Общее время сушки составило 24 ч (рисунок 30).

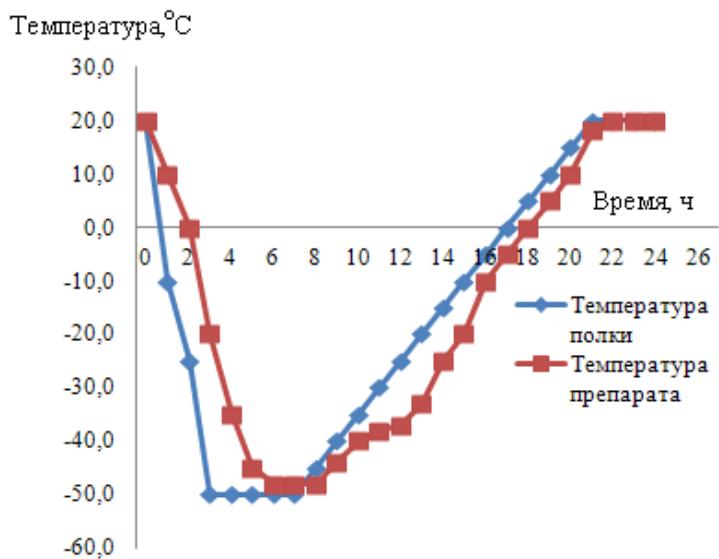


Рисунок 30 – Температура полок и раствора наночастиц гетеромерного пептида

По окончанию сушки проверяли полноту лиофилизации с помощью осторожного постукивания рукой по колбе – лиофилизат должен опадать на дно коблы со стенок. Содержание действующего вещества проверяли с помощью хромато-масс-спектрометрии на контрольных точках: 30 мин, 1 час, 5, 15 и 24 часов. Анализ подтвердил отсутствие посторонних химических примесей. Высушенный лиофильно гетеромерный пептид представлял собой массу белого цвета.

Фасовка, упаковка и маркировка готового продукта. После окончания процесса сушки ампулы с лиофилизатом доставали с полки и запаивали с помощью лабораторной установки для запайки ампул: высокоточного ручного запаивателя ампул HS1 (Cozzoli, США). Проверяли на весах массу лиофилизата, которая должна быть в пределах $0,08 \pm 0,001$ г (ИБДФ-П-46, полимер PLGA 50/50, ПВС и D-маннитол). Затем маркировали и помещали в картонные коробки и ставили на хранение при -20°C в холодильник. Состав, условия получения и свойства полимерных композиций ИБДФ-П-46 представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Состав, условия получения и свойства полимерных композиций *ИБДФ-П-46*

Расчётное содержание компонента, масс. %				Органический растворитель	Гомогенизатор	Выход продукта, г	Средние диаметры основных фракций, нм
<i>ИБДФ-П-46</i>	PLGA 50/50	ПВС	D-маннитол				
10,0	40,0	30,0	20,0	Дихлорметан	Погружной ультразвуковой	0,08	304,5±4,20

*Примечание - Данные по размерам частиц получены на субмикронном лазерном спектрометре Coulter N4MD фирмы Coulter Electronics.

Полученный лиофилизат гетеромерного пептида в наночастицах для парентерального применения оценивали по основным показателям качества, предъявляемым к инъекционным лекарственным формам.

5.10 Заключение

Для получения первичной эмульсии с удовлетворительным содержанием гетеромерного пептида в наночастицах исследовали различные концентрации сополимера молочной и гликолевой кислот 50/50 (PLGA 50/50). Оптимальным соотношением *ИБДФ-П-46* : PLGA 50/50 было признано соотношение 1 : 4.

Для получения вторичной эмульсии гетеромерного пептида рассматривали использование различных вспомогательных веществ: ПВС, МЦ, ПВП в различных концентрациях и оценивали устойчивость образовавшейся первичной эмульсии. Для создания первичной эмульсии оптимальным оказался ПВС в соотношение *ИБДФ-П-46* : ПВС – 1 : 3.

В качестве растворителя выбрали дихлорметан, как наиболее технологичный растворитель для создания наночастиц гетеромерного пептида.

Для приготовления одинарной эмульсии типа «вода/масло» наиболее технологичным оказался режим №3 и для двойной эмульсии типа «вода/масло/вода» режим №2.

Для повышения устойчивости суспензии проводили дополнительную гомогенизацию двойной эмульсии с помощью ультразвука, что позволило повысить устойчивость вторичной эмульсии до 20 минут.

Для получения стабильной лекарственной формы эмульсию наночастиц пептида лиофилизировали. В результате проведенных исследований определен оптимальный режим лиофилизации (режим №1).

Разработана технология получения лиофилизированного гетеромерного пептида в наночастицах и лиофилизированного гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления суспензии для инъекции.

6 ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЛИОФИЛИЗАТОВ ГЕТЕРОМЕРНОГО ПЕПТИДА

Изучение физико-химических свойств. Внешний вид – все образцы представляли собой массы белого цвета. Средняя масса для лиофилизата *ИБДФ-П-46* – $0,023 \pm 0,002$ г/амп, для лиофилизата наночастиц *ИБДФ-П-46* – $0,08 \pm 0,005$ г/амп. Отклонения от средней массы не превышали $\pm 10\%$.

Прозрачность, цветность и растворимость лиофилизата *ИБДФ-П-46*. При добавлении к содержимому ампулы воды для инъекций и встряхивании в течение 3 мин образовывался прозрачный раствор. По показателю цветности раствор был бесцветным. При растворении лиофилизата в воде для инъекций значение pH составляло от 6,5 до 7,0.

Определение размеров наночастиц. Для определения размеров наночастиц использовали анализатор частиц Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.), а также субмикронный лазерный спектрометр Coulter N4MD (Coulter Electronics). Принцип их работы основан на методе динамического светорассеяния. Графические данные по распределению размеров наночастиц *ИБДФ-П-46* приведены и на рисунке 31. Основные численные данные результатов измерений приведены в таблице 27.

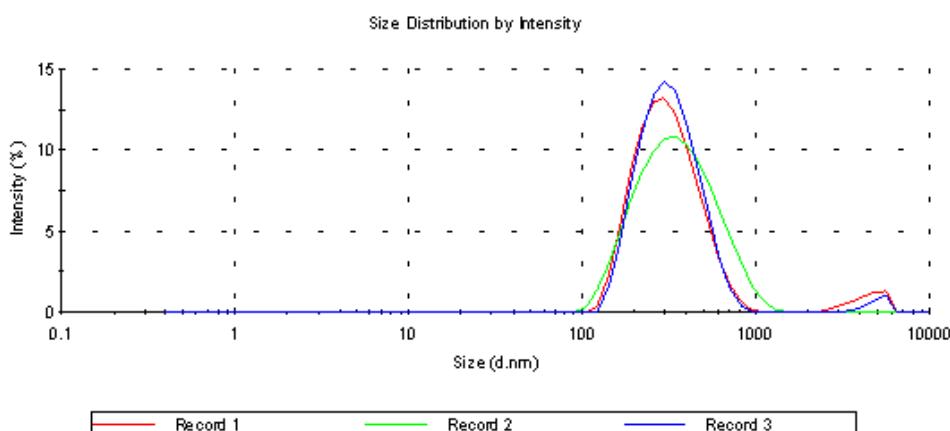


Рисунок 31 – Распределение размеров наночастиц *ИБДФ-П-46* по интенсивности светорассеяния

Таблица 27 – Основные численные данные размеров наночастиц
ИБДФ-П-46

Образец	Основные численные данные анализа*								
	T, °C	Диаметр частиц, нм	Индекс полидисперсности	d ¹ , нм	d ² , нм	d ³ , нм	S ¹ , %	S ² , %	S ³ , %
1	25	301,7±1,4	0,212±0,02	325,2 ±2,3	4462 ±12,4	0	95,4 ±1,1	4,6 ±0,1	0
2	25	306,4±2,1	0,181±0,01	384,5 ±1,7	0	0	100 ±1,5	0	0
3	25	305,5±1,7	0,2±0,01	331,4 ±2,1	5005 ±17,3	0	97,8 ±1,2	2,2 ±0,1	0

* Т – температура образца при анализе;

d¹ – среднее значение диаметра для основного пика при максимуме интенсивности светорассеяния;

d² – среднее значение диаметра для 2-го по величине пика при максимуме интенсивности светорассеяния;

d³ – среднее значение диаметра для 3-го по величине пика при максимуме интенсивности светорассеяния;

S¹ – площадь под кривой основного пика;

S² – площадь под кривой 2-го по величине пика;

S³ – площадь под кривой 3-го по величине пика.

Суспенцируемость. К лиофилизату наночастиц добавляли 1 мл воды и визуально наблюдали образование однородной супензии. Супензия устойчива не менее 20 мин.

Подлинность. Подлинность лиофилизатов гетеромерного пептида подтверждали методом ВЭЖХ. Для соединения *ИБДФ-П-46* представлены: хроматограмма (рис. 32 и 33) и масс-спектр (рис. 34).

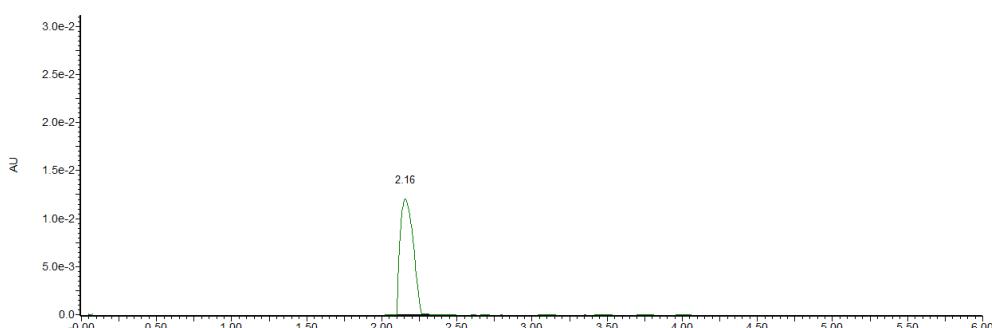


Рисунок 32 – Хроматограмма: спектрофотометрический детектор

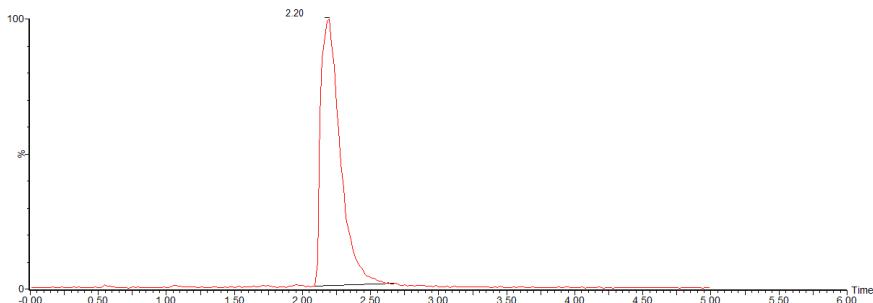


Рисунок 33 – Хроматограмма: масс-спектрометрический детектор

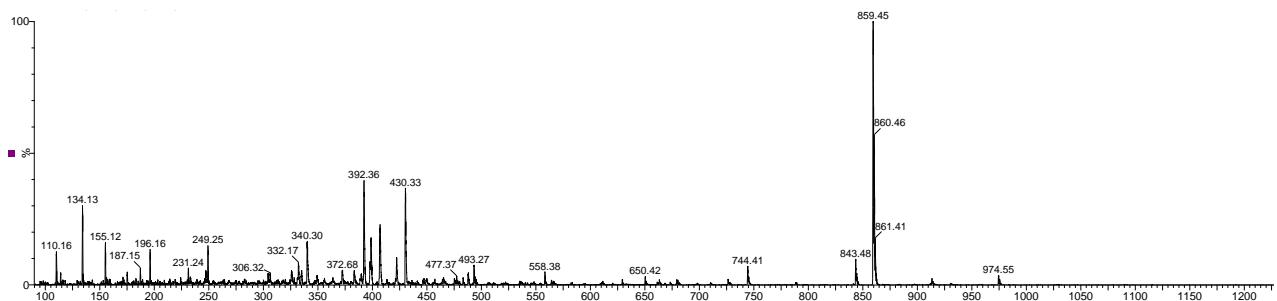


Рисунок 34 – Масс-спектр $[M + H]^+$ 859.45 ($t_R=2.20$ мин)

Количественное определение ИБДФ-П-46. Количественное содержание гетеромерного пептида Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp (ИБДФ-П-46) определяли методом градуировочного графика, используя хромато-масс-спектрометрический анализ. Количественное содержание гетеромерного пептида в наночастицах определяли в надосадочной жидкости. Пробоподготовку осуществляли следующим образом: к содержимому ампулы добавляли 2 мл диметилформамида (ДМФ) и переносили в мерную колбу на 10 мл, объем доводили до метки и проводили интенсивное перемешивание на магнитной мешалке. После этого отбирали 1 мл смеси, разбавляли в три раза раствором вода : ДМФ (2 : 3) и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 3 мин.

Количественное содержание гетеромерного пептида в лиофилизатах: 0,0079 – 0,0081 г/амп.

Определение содержания посторонних (химических) примесей. Определение проводили методом ВЭЖХ. Для того чтобы исключить влияние вспомогательного вещества D-маннитола на результаты анализа, раствор

D-маннитола проанализировали отдельно. Хроматограмма раствора D-маннитола представлена на рисунке 35.

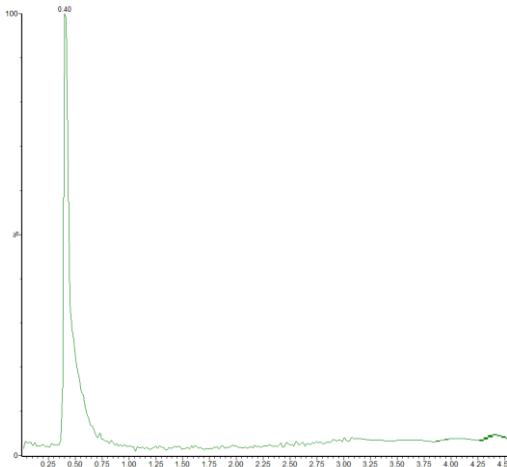


Рисунок 35 – Хроматограмма раствора D-маннитола

На хроматограммах протонированный молекулярный ион D-маннитола не проявлялся, а депротонированный регистрировался в мертвом объеме (время удерживания 0,40 мин), тем самым D-маннитол не мешал анализу гетеромерного пептида (время удерживания 2,20 мин). При анализе установили отсутствие химических примесей (фрагментов пептида).

Определение остаточного органического растворителя. В процессе получения наночастиц гетеромерного пептида использовали дихлорметан, относящийся ко 2 классу (негенотоксичный) растворителей. Исследование проводили на хроматографе Кристалл 2000 М (Хроматэк) с капиллярной колонкой фирмы НР-FFAP 50м × 0,32мм, используя дозатор равновесного пара. Время удерживания (дозатор равновесного пара, нагретый до 80°C; температура испарителя 160°C; детектора 200°C; газ-носитель – азот; время испарения 16,0мин) составило 5,4 мин. Содержание дихлорметана не превышало 600 ppm (пределно допустимое содержание).

Потери в массе при высушивании. Показатель определяли сушкой лиофилизатов в вакуум-сушильном шкафу над P_2O_5 при комнатной

температуре и остаточном давлении 5 мм рт.ст. до постоянной массы. Потеря в массе не превышала 3,0%.

Механические включения. Механические включения определяли согласно РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств». В данных препаратах отсутствовали механические включения.

Стерильность, пирогенность, бактериальные эндотоксины. Стерильность определяли методом прямого посева (ОФС 42-0066-07 ГФ XII, часть 1, стр. 150). Проведенные исследования показали отсутствие роста тест-микроорганизмов: *B. subtilis* ATCC 6633 – для тиогликолевой среды; *C. albicans* NCTC 885-653 – для соево-казеинового бульона или жидкой среды Сабуро, что демонстрирует стерильность лекарственной формы. Для определения пирогенности лекарственной формы использовали ОФС 42-0061-07 ГФ XII, часть 1, стр. 125. После проведенных испытаний лекарственная форма апирогенна. Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) (ОФС 42-0062-07 ГФ XII, часть 1, стр. 128). Лиофилизат не содержит бактериальных эндотоксинов. 10 серий полученных лиофилизатов стерильны, апирогенны; бактериальных эндотоксинов обнаружено не было.

Изучение стабильности и установление сроков годности лиофилизатов. Лиофилизаты гетеромерного пептида выдерживали хранение в ампулах объемом 2 мл производства Maotian Industry (Китай) в естественных условиях в течение двух лет. Показатели качества оценивали каждые 6 месяцев. На основании полученных данных установили предварительный срок годности – 2 года (таблица 28, 29). Изучение стабильности препарата в процессе хранения с целью определения срока его годности продолжается.

Таблица 28 – Показатели качества лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции

Показатели	Срок хранения, мес					Методы анализа
	0	6	12	18	24	
Внешний вид	Масса белого цвета	Визуально				
Растворимость и время растворения в растворителе для инъекций (вода для инъекций)	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	ОФС 42-0049-07 ГФ XII, часть 1, с. 92
Подлинность	Хроматограмма соответствует раствору стандартного образца	ВЭЖХ				
Средняя масса и отклонение от средней массы	$0,022 \pm 0,002$ г/амп $\pm 10\%$	$0,023 \pm 0,002$ г/амп $\pm 10\%$	$0,024 \pm 0,002$ г/амп $\pm 10\%$	$0,023 \pm 0,002$ г/амп $\pm 10\%$	$0,024 \pm 0,002$ г/амп $\pm 10\%$	ГФ XI, часть 2, стр. 140
Содержание вещества, %	$34,7 \pm 0,5$	$33,9 \pm 0,5$	$34,5 \pm 0,5$	$34,2 \pm 0,5$	$34,8 \pm 0,5$	ВЭЖХ
Прозрачность раствора	Прозрачный раствор	ОФС 42-0051-07 ГФ XII, часть 1, стр. 98				
Цветность	Бесцветный раствор	ОФС 42-0050-07 ГФ XII, часть 1, стр. 93				
pH	$6,5 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,1$	$6,7 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)

Показатели	Срок хранения, мес					Методы анализа
	0	6	12	18	24	
Количественное содержание	0,0080±0,0001 г/амп	0,0080±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	ВЭЖХ
Посторонние примеси	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	ВЭЖХ
Потеря массы при высушивании	Не более 3%	Не более 3%	Не более 3%	Не более 3%	Не более 3%	ГФ XI, часть 1, стр. 176
Механические включения	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств»
Стерильность	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	ОФС 42-0066-07 ГФ XII, часть 1, стр. 150
Пирогенность	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	ОФС 42-0061-07 ГФ XII, часть 1, стр. 125
Бактериальные эндотоксины	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	ОФС 42-0062-07 ГФ XII, часть 1, стр. 128
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре -20 °C.					

Таблица 29 – Показатели качества лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления эмульсии для инъекции

Показатели	Срок хранения, мес					Срок хранения, мес
	0	6	12	18	24	
Внешний вид	Масса белого цвета	Визуально				
Подлинность	Хроматограмма соответствует раствору стандартного образца	ВЭЖХ				
Средняя масса и отклонение от средней массы	0,09 г/амп ±10%	0,089 г/амп ±10%	0,089 г/амп ±10%	0,09 г/амп ±10%	0,088 г/амп ±10%	ГФ XI, часть 2, стр. 140
Определение размеров частиц (диаметр), нм	304,5±4,00	301,1±3,00	303,5±3,50	302,4±4,00	304,6±4,10	Метод динамического светорассеяния
Суспендируемость	Удовл., уст. суспензии в течение 20 мин.	Визуально				
pH	6,7±0,1	6,6±0,1	6,9±0,1	6,7±0,1	6,8±0,1	ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)
Количественное содержание	0,0080±0,0001 г/амп	0,0080±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	0,0079±0,0001 г/амп	0,0080±0,0001 г/амп	ВЭЖХ
Посторонние примеси	Не обнаружено	ВЭЖХ				
Потеря массы при высушивании	Не более 3%	ГФ XI, часть 1, стр. 176				

Показатели	Срок хранения, мес					Срок хранения, мес
	0	6	12	18	24	
Остаточный органический растворитель	Не более 600 ppm	Не более 600 ppm	Не более 600 ppm	Не более 600 ppm	Не более 600 ppm	ГФ XII, часть 1, стр. 115
Механические включения	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено	РД 42-501-98
Стерильность	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	Препарат стерилен	ОФС 42-0066-07 ГФ XII, часть 1, стр. 150
Пирогенность	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	Препарат апирогенен	ОФС 42-0061-07 ГФ XII, часть 1, стр. 125
Бактериальные эндотоксины	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов	ОФС 42-0062-07 ГФ XII, часть 1, стр. 128
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре -20 °C.					

В результате проведенных исследований разработаны предварительные показатели качества для лиофилизатов гетеромерного пептида *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (*ИБДФ-П-46*) (таблице 30).

Таблица 30 – Показатели качества лиофилизатов гетеромерного пептида *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp* (*ИБДФ-П-46*)

Показатели	Полученные данные		Методы анализа
	Лиофилизат <i>ИБДФ-П-46</i>	Лиофилизат наночастиц <i>ИБДФ-П-46</i>	
Внешний вид	Масса белого цвета	Масса белого цвета	Визуально
Растворимость и время растворения в растворителе для инъекций (вода для инъекций)	Прозрачный раствор после интенсивного встряхивания с водой для инъекций в течение 3 мин	—	ОФС 42-0049-07 ГФ XII, часть 1, с. 92
Подлинность	Хроматограмма соответствует раствору стандартного образца		ВЭЖХ
Средняя масса и отклонение от средней массы	0,023±0,002 г/амп ±10%	0,08±0,005 г/амп ±10%	ОФС 42-0129-09 ГФ XI, часть 2, стр. 140
Прозрачность раствора	Прозрачный раствор	—	ОФС 42-0051-07 ГФ XII, часть 1, стр. 98
Цветность	Бесцветный раствор	—	ОФС 42-0050-07 ГФ XII, часть 1, стр. 93
pH	6,5 – 7,0		ОФС 42-0048-07 ГФ XII, часть 1, стр. 85 (потенциометрически)
Посторонние примеси	Не обнаружено		ВЭЖХ
Количественное содержание	0,0079 – 0,0081 г/амп		ВЭЖХ
Определение размеров частиц (диаметр), нм	—	304,5±4,20	Метод динамического светорассеяния
Суспендируемость	—	Удовл., устойчивость сuspензии в течение 20 мин.	Визуально
Потеря массы при	Не более 3%		ГФ XI, часть 1, стр. 176

Показатели	Полученные данные		Методы анализа
	Лиофилизат <i>ИБДФ-П-46</i>	Лиофилизат наночастиц <i>ИБДФ-П-46</i>	
высушивании			
Остаточный органический растворитель	—	Не более 600 ppm	ГФ XII, часть 1, стр. 115
Механические включения	Не обнаружено		РД 42-501-98 «Инструкция по контролю на механические включения инъекционных лекарственных средств»
Стерильность	Препарат стерileн		ОФС 42-0066-07 ГФ XII, часть 1, стр. 150
Пирогенность	Препарат апирогенен		ОФС 42-0061-07 ГФ XII, часть 1, стр. 125
Бактериальные эндотоксины	Препарат не содержит бактериальных эндотоксинов		ОФС 42-0062-07 ГФ XII, часть 1, стр. 128
Хранение	В сухом защищенном от света месте при температуре -20 °C.		
Срок годности	2 года		

Заключение

В результате приведенных исследований разработаны технологии получения: лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции, лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах и лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления суспензии для инъекции.

Исследованы показатели качества для лиофилизатов гетеромерного пептида: физико-химических свойства, растворимость и время растворения в растворителе для инъекций, определение размеров наночастиц *ИБДФ-П-46*, суспендируемость лиофилизата *ИБДФ-П-46* в наночастицах, количественное определение гетеромерного пептида, определение содержания посторонних примесей, потери в массе при высушивании, механические включения, стерильность, пирогенность, бактериальные эндотоксины.

Изучена стабильность лиофилизованных форм гетеромерного пептида в естественных условиях в течение 2 лет и установлены предварительные сроки годности (2 года).

Разработаны предварительные показатели качества для лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизата гетеромерного пептида в наночастицах для приготовления суспензии для инъекции.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. С применением программы «Алгокомб» и PASS Professional 2010.1 впервые выполнено компьютерное моделирование ингибиторов агрегации тромбоцитов: 20 000 пептидов, 24 производных фуроксана и 48 000 гетеромерных пептидов.

2. С использованием автоматизированного пептидного синтезатора ABI 433 PeptideSynthesizer по Fmoc-стратегии синтезированы 40 наиболее активных (согласно компьютерному моделированию) пептидов и гетеромерных пептидов.

3. Строение синтезированных пептидов подтверждено с помощью методов спектроскопии ЯМР ^1H (с привлечением двумерных методик $^1\text{H}/^1\text{H}$ -спектров COSY), масс-спектрометрии и элементного анализа; гетеромерных пептидов с помощью масс-спектрометрии и элементного анализа.

4. Турбидиметрическим методом Борна подтверждена антиагрегационная активность синтезированных соединений *in vitro* и выявлен наиболее активный гетеромерный пептид – *Fur-Lys-His-Ala-Asp-Asp*.

5. Разработана технология получения наночастиц гетеромерного пептида методом двойного эмульгирования с диффузией органического растворителя в водную фазу.

6. Разработаны технология получения лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления раствора для инъекции и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида для приготовления суспензии для инъекции.

7. Определены показатели качества для стандартизации лиофилизата гетеромерного пептида и лиофилизата наночастиц гетеромерного пептида. Установлено сохранение показателей качества в течение 2 лет на серии лиофилизатов гетеромерного пептида.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: World Health Organization. – 2011. – P. 164
2. Ощепкова, Е.В. Организация медицинской помощи больным с острым коронарным синдромом без подъема сегмента ST в региональных сосудистых центрах и первичных сосудистых отделениях в 2009-2012 гг. (по данным регистра ОКС) / Е.В. Ощепкова, В.А. Дмитриев, В.И. Гриднев, П.Я. Довгалевский // Терапевтический архив. – 2013. – №12. – С. 4-8
3. Белушкина, Н.Н. Синтез пептидов RGD-класса, обладающих антиагрегационной активностью / Н.Н. Белушкина, О.Г. Дегтярева, А.А. Махлай и др. // Молекулярная медицина. – 2011. – №1. – С. 40-43
4. Белушкина, Н.Н. Рецепторы тромбоцитов – мишень для антиагрегационной терапии / Н.Н. Белушкина, О.Г. Дегтярева, А.А. Махлай и др. // Молекулярная медицина. – 2011. – №3. – С. 10-16
5. Хёльтье, Х.-Д. Молекулярное моделирование: теория и практика / Хёльтье, Х.-Д. и др. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 318 с.
6. Newman, P.J. Inherited disorders of platelets / P.J. Newman, M. Poncz // New York Journal. – 1995. – Vol. 3. – P. 3335-3367
7. Bussel, J.B. Platelets: new understanding of platelet glycoproteins and their role in disease / J.B. Bussel, T.J. Kunicki, A.D. Michelson // Hematology. – 2000. – P. 222–240
8. Ruoslahti, E. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins / E. Ruoslahti, M.D. Pierschbacher // Science. – 1987. – Vol. 238. – P. 491-521
9. Radomski, M.W. Endogenous Nitric-Oxide Inhibits Human-Platelet Adhesion to Vascular Endothelium / M.W. Radomski, R.M.J. Palmer, S. Moncada // Lancet. – 1987. – Vol. 2. – P. 1057-1072

10. Dassy, C. Pathophysiological Roles of Nitric Oxide: In the Heart and the Coronary Vasculature / C. Dassy, O. Ferron // Current Medical Chemistry – Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. – 2004. – Vol. 3. – P. 207-216
11. Feelisch, M. Thiol-mediated generation of nitric oxide accounts for vasodilator action of furoxan / M. Feelisch, M.K. Schonafinger, E. Noack. // Biochem. Pharmacol. – 1992. – V.44, Vol.6.– P. 1149-1157
12. Walters, W. P. Virtual screening – an overview / W.P. Walters, M.T. Stahl, M. A. Murcko // Drug Discovery Today. – 1998. – Vol. 3. – P. 160-178
13. Lefkovits, J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine / J. Lefkovits, E.F. Plow, E.J. Topol // New England Journal of Medicine. – 1995. – Vol. 332. – P. 1553-1559
14. Литвинов, Р.И. Современные ингибиторы функции тромбоцитов. Казанский медицинский журнал / Р.И. Литвинов. – 2004. – Том 85. – №2. – С. 125-134
15. Машковский, М.Д. Лекарственные средства / М.Д. Машковский // Харьков. – 1997. – Т.1. – С. 385
16. Thatcher, G.R.J. Nitrates and no release: contemporary aspects in biological and medicinal chemistry / G.R.J. Thatcher, A.C. Niculescu, B.M. Bennett, V. Toader // Free Radical Biology and Medicine. – 2004. – Vol. 37. – С. 1122
17. Латфуллин, И.А. Антитромботическая терапия ишемической болезни сердца: от быстродействующих антиагрегантов к статинам и оксиду азота / И.А. Латфуллин, А.А. Подольская // Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии. – 2006. – №3. – С. 37-45
18. Hynes, R.O. Integrins: a family of cell surface receptors / R.O. Hynes // Cell. – 1987. – Vol. 48. – P. 549-554

19. Smyth, S.S. Regulation of vascular integrins / S.S. Smyth, C.C. Joneckis, L.V. Parise // – Blood. – 1993. – Vol. 81. – P. 2827-2843
20. Camper, L. Isolation, cloning, and sequence of integrin subunit α 10, a β 1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes / L. Camper, U. Hellman, E. Lundren-Akerlund // The Journal of Biological Chemistry. – 1998. – Vol. 273. – P. 20383-20389
21. Ruggeri, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions / Z.M. Ruggeri // Journal of Thrombosis Haemostasis. – 2003. – Vol. 1. – P. 1335-1342
22. Wiviott, S.D. Antiplatelet therapy in ischemic heart disease / S.D. Wiviott // Wiley-Blackwell. – 2009. – P. 98-124
23. Ginsberg, M.H. Cytoadhesins, integrins, and platelets / M.H. Ginsberg, J.C. Loftus, E.F. Plow // Journal of Thrombosis Haemostasis. – 1988. – Vol. 59. – P. 1-6
24. Tomiyama, Y. The Arg-Gly-Asp (RGD) recognition site of platelet glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets is accessible to high-affinity macromolecules / Y. Tomiyama, T. Tsubakio, R.S. Piotrowicz, Y. Kurata, J.C. Loftus, T.J. Kunicki // Blood. – 1992. – Vol. 79. – P. 2303-2312
25. Plow, E.F. Immunologic relationship between platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa and cell surface molecules expressed by a variety of cells / E.F. Plow, J.C. Loftus, E.G. Levin, D.S. Fair, D. Dixon, J. Forsyth // Proceeding of the National Academy of Sciences of USA. – 1986. – Vol. 83. – P. 6002-6042
26. Benaett, J.S. The platelet-fibrinogen interaction / J.S. Benaett, J.N. George, A.T. Nurden, D.R. Phillips // Platelet Membrane Glycoproteins. – 1985. – P. 193-226
27. Andrews, R.K. Platelet physiology and thrombosis / R.K. Andrews, M.C. Berndt. – Thrombosis Research. – 2004. – Vol. 114. – P. 447-453

28. Shah, H.D. Glycoprotein IIb/IIIa receptor and its inhibition: a platelet-directed therapeutic strategy / H.D. Shah, R.K. Goyal // Indian Journal of Pharmacology. – 2004. – Vol. 36. – P. 133-139
29. Madan, M. Glycoprotein IIb/IIIa integrin blockade / M. Madan, S.D. Berkowitz, J.E. Tcheng. – Circulation. – 1998. – Vol. 98. – P. 2629-2635
30. Phillips, D.R. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex / D.R. Phillips, I.F. Charo, L.V. Parise, L.A. Fitzgerald // Blood. – 1988. – Vol. 71. – P. 331
31. Gralnick, H. Fibrinogen completes with von Willebrand factor binding to the glycoprotein IIb-IIIa complex when platelets are stimulated with thrombin / H. Gralnick, S. Willians, B. Coller // Blood. – 1984. – Vol. 64. – P. 797-800
32. Киричук, В.Ф. Показатели сосудисто-тромбоцитарного механизма гемостаза и ближайший прогноз нестабильной стенокардии / В.Ф. Киричук, Ю.Г. Шварц // Кардиология. – 1998. – №5. – С. 14-17
33. Weisel, J.W. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy / J.W. Weisel, C. Nagaswami, G. Vilaire, J.S. Bennett // The Journal of Biological Chemistry. – 1992. – Vol. 267. – P. 16637-16643
34. Poncz, M. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb: homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors / M. Poncz, R. Eisman, R. Heidenreich, S.M. Silver, G. Vilaire, S. Surrey // The Journal of Biological Chemistry. – 1987. – Vol. 262. – P. 8476-8482
35. Pierschbacher, M.D. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule / M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti // Nature. – 1984. – Vol. 309. – P. 30-53

36. Farrell, D.H. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation / D.H. Farrell, P. Thiagarajan, D.W. Chung, E.W. Davie // Proceeding of the National Academy of Sciences of USA. – 1992. – Vol. 89. – P. 10729-10732
37. Andronati, S.A. Peptidomimetics – antagonists fibrinogen receptors: molecular design, structures, properties and therapeutic applications / S.A. Andronati, T.L. Karaseva, A.A. Krysko // Current Medicinal Chemistry. – 2004. – Vol. 11. – P. 1183-1211
38. Warwick, S.N. A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation / S.N. Warwick, W. Erik, J.T-L. Francisco, T. Elham, M. Arnan, F. Jia, C. Josie, F. Andreas // Nature Medicine. – 2009. – Vol. 15. – P. 665-673
39. Shah, H.D. Glycoprotein IIb/IIIa receptor and its inhibition: a platelet-directed therapeutic strategy / H.D. Shah, R.K. Goyal. // Indian Journal of Pharmacology. – 2004. – Vol. 36. – Issue 3. – P. 133-139
40. Clark, E.A. Integrins and signal transduction pathways: The road taken / E.A. Clark, J.S. Brugge // Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 233-239
41. Coller, B.S. Anti-GPIIb/IIIa drugs: Current strategies and future directions / B.S. Coller // Journal of Thrombosis and Haemostasis. – 2001. – Vol. 86. – P. 427-443
42. Quinn, M.J. Integrin αIIbb3 and its antagonism / M.J. Quinn, T.V. Byzova, J. Qin // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. – 2003. – Vol. 23. – P. 388-396
43. Agah, R. αIIbb3 (GP IIb-IIIa) antagonists / R. Agah, E.F. Plow, E.J. Topol // Platelets. – 2007. – P. 1145-1164
44. Бокарев, И.Н. Противотромбоцитарная терапия в клинической практике. Методические рекомендации / И.Н. Бокарев. – М.: Ньюдиамед, – 2007 – 34 с.

45. Jordan, R.E. Preclinical development of c7E3: a mouse/human chimeric monoclonal antibody fragment that inhibits platelet function by blockade of GP IIb/IIIa receptors with observations on the immunogenicity of c7E3 in humans / R.E. Jordan, C.L. Wagner, M.A. Mascelli, G. Treacy, M.A. Nedelman, H.F. Weissman, B.S. Coller // Adhesion Receptors As Therapeutic Targets. – 1996. – P. 281-305
46. Kereiakes, D.J. Randomized, double-blind study of tirofiban (MK-383) platelet IIb-IIIa blockade in high risk patients undergoing coronary angioplasty / D.J. Kereiakes, N.S. Kleiman, J. Ambrose, M. Cohen, S. Rodriguez, T. Palabrica, H.C. Herrmann, J.M. Sutton, W.D. Weaver, D.B. McKee, V. Fitzpatrick, F.L. Sax // Journal of the American College of Cardiology. – 1996. – Vol. 27. – P. 536-542
47. Tcheng, J.E. Multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of the platelet integrin glycoprotein IIb/IIIa blocker integrilin in elective coronary intervention / J.E. Tcheng, R.A. Harrington, K. Kottke-Marchant, N.S. Kleiman, S.G. Ellis, D.J. Kereiakes, M.J. Mick, F.I. Navetta, J.E. Smith // Circulation. – 1995. – Vol. – 91. – P. 2151-2157
48. Ryan, T.J. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty: a report of the American College of Cardiology/ T.J. Ryan, D.P. Faxon, R.M. Gunnar // American Heart Association task force on assessment of diagnostic and therapeutic cardiovascular procedures. – Circulation. – 1998. – Vol. 278. – P. 486-502
49. EPILOG investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization / EPILOG investigators // New England Journal of Medicine. – 1997. – Vol. 336. – P. 1689-1696
50. Bednar, B. Fibrinogen receptor antagonist-induced thrombocytopenia in chimpanzee and rhesus monkey associated with preexisting drug-dependent antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa / B.

Bednar, J.J. Cook, M.A. Holahan, M.E. Cunningham, P.A. Jumes, R.A. Bednar // Blood. – 1999. – Vol. 94. – P. 587-599

51. EPISTENT Investigators. Randomized placebo-controlled and balloon-angioplasty controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade / EPISTENT Investigators // Lancet. – 1998. – Vol. 352. – P. 87-92

52. The RESTORE investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty / The RESTORE investigators // Circulation. – 1997. – Vol. 96. – 1445-1453

53. The PRISM investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina / The PRISM investigators // New England Journal of Medicine. – 1998. – Vol. 338. – P. 1498-1505

54. The PRISM-PLUS investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction / The PRISM-PLUS investigators // New England Journal of Medicine. – 1998. – Vol. 338. – P. 1488-1497

55. The IMPACT-II investigators. Randomized placebo-controlled trial of the effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II / The IMPACT-II investigators // Lancet. – 1997. – Vol. 349. –P. 1422-1448

56. Harrington, R.A. Design and methodology of the PURSUIT trial: evaluating Eptifibatide for acute ischemic coronary syndromes / R.A. Harrington // American Journal of Cardiology. – 1997. – Vol. 80. – P.34-38

57. O’Shea, J.C. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade With Eptifibatide in Coronary Stent Intervention / J.C. O’Shea, G.E. Hafley, S. Greenberg et al. // JAMA. – 2001. – Vol. 285. – P. 2468-2473

58. Cannon, C.P. Elevated white cell count in acute coronary syndromes: relationship to variants in inflammatory and thrombotic genes / C.P. Cannon, C.P. McCabe, R.G. Wilcox et al. // Circulation. – 2000. – Vol. 102. – P. 149-156
59. O'Neill, W.W. Long-Term Treatment with a Platelet Glycoprotein-Receptor Antagonist after Percutaneous Coronary Revascularization / W.W. O'Neill, P. Serruys, M. Knudtson et al. // The New England Journal of Medicine. – 2000. – Vol. 342. – P. 1316-1324
60. Theroux, P. Platelet membrane receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonism in unstable angina: the Canadian Lamifiban study / P. Theroux, S. Kouz, L. Roy Et al. // Circulation. – 1996. – Vol. 94. – P. 899-905
61. Marletta, M.A. Unraveling the biological significance of nitric oxide / M.A. Marletta, M.A. Tayeh, J.M. Hevel // Biofactors. – 1990. – Vol. 2. P. 219-225
62. Palmer, R.M.J. Nitric-Oxide Release Accounts for the Biological-Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor / R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada // Nature. – 1987. – Vol. 327. – P. 21-52
63. Moncada, S. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication / S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs // Biochemical Pharmacology. – 1989. – Vol. 38. – P. 1709-1715
64. Kang, Y.C. Regulation of programmed cell death in neuronal cells by nitric oxide / Y.C. Kang, P.K. Kim, B.M. Choi, H.T. Chung, K.S. Ha, Y.G. Kwon, Y.M. Kim // In vivo. – 2004. – Vol. 18. – P. 367-376
65. Garthwaite, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission / J. Garthwaite // European Journal of Neuroscience. – 2008. – Vol. 27. – P. 2783-2802
66. Radomski, M.W. The Anti-Aggregating Properties of Vascular Endothelium - Interactions between Prostacyclin and Nitric-Oxide / M.W.

Radomski, R.M.J. Palmer, S. Moncada // British Journal Pharmacology. – 1987. – Vol. 92. – P. 639-651

67. Moncada, S. Nitric-Oxide – Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology / S. Moncada, R.M.J. Palmer, E.A. Higgs // Pharmacology Review. – 1991. – Vol. 43. – P. 109

68. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарственных средств: монография / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.:Вузовская книга, 2004. – 360 с.

69. Palmer, R.M.J. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine / R.M.J. Palmer, D.S. Ashton, S. Moncada // Nature. – 1998. – Vol. 333. – P. 664-666

70. Граник, В.Г. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) / В.Г. Граник, С.Ю. Рябова, Н.Б Григорьев // Успехи химии. – 1997. – №66 (8). – С. 792-807

71. Горрен, А.К.Ф. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота / А.К.Ф. Горрен, Б. Майер // Биохимия. – 1998. – №63. – С. 870-880

72. Серая, И.П. Современные представления о биологической роли оксида азота / И.П. Серая, Я.Р. Нарциссов // Межрегиональный институт цитохимии. – 2002. – С.104-120

73. Jonathan, S.S. Biochemistry of Nitric Oxide and Its Redox-Activated Forms / J.S. Stamler, D.J. Singel, J. Loscalzo // Science. – 1992. – Vol. 258. – P. 1898-1902

74. Naseem, K.M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases / K.M. Naseem // Molecular Aspects of Medicine. – 2005. – Vol. 26. – P. 33-65

75. Lundberg, J.O. NO generation from nitrite and its role in vascular control / J.O. Lundberg, E. Weitzberg // Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology. – 2005. – Vol. 25. P. 915-922

76. Степанов, Ю.М. Аргинин в медицинской практике / Ю.М. Степанов, И.Н. Кононов., А.И. Журбина // Журнал Украины. – 2004. – Т. 10. – С. 340-352
77. Граник, В.Г. Экзогенные доноры оксида азота в ряду С-нитросоединений / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев // Успехи химии. – 2011. – №80. – С. 182-198
78. Ferioli, R. A new class of furoxan derivatives as NO donors: mechanism of action and biological activity / R. Ferioli, G.C. Folco et al. // British Journal of Pharmacology. – 1995. – Vol.114. – Р. 816-820
79. Каримова, Р.Г. Полезный приспособительный результат деятельности нитроксидергической системы под влиянием фуроксанов / Р.Г. Каримова, Т.В. Гарипов // Известия Самарской государственной сельскохозяйственной академии. – 2011. – №1. – С. 42-46
80. Королев, В.Л. Имидазобензодифуроксаны – новая конденсированная гетероциклическая система / В.Л. Королев, В.В. Топоров и др. // Тезисы докладов XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Казань. – 2003. – С. 359
81. Постников, А.Б. Имидазобензодифуроксаны – новый класс NO-генерирующих соединений, активирующих растворимую гуанилатцилазу, обладающих гипотензивным действием и ингибирующих агрегацию тромбоцитов / А.Б. Постников, В.П. Ившин и др. // Тезисы докладов III Съезда биохимического общества. – Санкт-Петербург. – 2002. – С. 205
82. Алексеев, А.А. N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов. А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова, Н.Н. Белушкина // Патент RU 2502739.
83. Snyder, S. H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters / S. H. Snyder // Science. – 1992. – Vol. 257. Р. 494-496

84. Traylor, T.G. Nitric oxide-triggered heme-mediated hydrolysis: A possible model for biological reactions of NO / T.G.Traylor, A.F. Duprat, V.S. Sharma // Journal of the American Chemical Society. – 1993. – Vol. 115. – P. 810-811
85. Hobbs, A.J. The L-arginine-nitric oxide pathway / A.J. Hobbs, S. Moncada, E.A. Higgs // New England Journal of Medicine. – 1993. – Vol. 329. – P. 2002-2012
86. Murad, F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: The NO-cGMP signal – transduction system / F. Murad // Advances in Pharmacology. – 1994. – Vol. 26. – P. 19-33
87. Северина, И.С. Растворимая форма гуанилатцилазы в молекулярном механизме физиологических эффектов окиси азота и в регуляции процесса агрегации тромбоцитов / И.С. Северина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1995. – №3. – С. 230-235
88. Северина, И.С. Роль растворимой гуанилатцилазы в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота / И.С. Северина // Биохимия. – 1998. – №63. – С. 794-801
89. Szekeres, M. Effect of a new nitric oxide donor on the biomechanical performance of the isolated ischaemic rat heart / M. Szekeres, L. Dezsi, E. Monos, T. Metsa-Ketela // Acta Physiologica. – 1997. –Vol. 161. – P. 55
90. Medana, C. Furoxans as nitric oxide donors. 4-phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiolmediated nitric oxide release and biological evaluation / C. Medana, G. Ermondi et. al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 1994. – Vol. 37. – P. 4412-4416
91. Sako, M. Facile synthesis and NO-generating property of 4H-1,2,5.Oxadiazolo[3,4-d]pyrimidine-5,7-dione 1-oxides / M. Sako, S. Oda, S. Ohara, K. Hirota, Y. Maki // The Journal of Organic Chemistry. – 1998. – Vol. 63. – P. 6947-6951.

92. Leach, A. R. Exploring the conformational space of protein side chains using dead-end elimination and the algorithm / A.R. Leach, A.P. Lemon // Proteins. – 1998. – Vol. 33. – P. 227-239
93. Claussen, H. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations / H. Claussen, C. Huning, M. Rarey, T. Tengauer // Journal of Molecular Biology. – 2001. – Vol. 308. – P. 377-395
94. Stahl, M. Development of filter functions for protein-ligand docking / M. Stahl, H.J. Bohm // Journal of Molecular Graphics and Modelling. – 1998. – Vol. 16. – P. 121-132
95. Lyne, P.D. Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring / P.D. Lyne, M.L. Lamb, J.C. Saeh // Journal of Medicinal Chemistry. – 2006. – Vol. 49. – P. 4805-4808
96. Kuhn, B. Validation and use of the MM-PBSA approach for drug discovery / B. Kuhn, P. Gerber, T. Schulz-Gasch, M. Stahl // Journal of Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 48. – P. 4040-4048
97. Khandelwal, A. A combination of docking, QM/MM methods, and MD simulation for binding affinity estimation of metalloprotein ligands / A. Khandelwal, V. Lukacova, D. Comez et al. // Journal of Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 48. – P. 5437-5447
98. Ferrara, P. New scoring functions for virtual screening from molecular dynamics simulations with a quantum-refined force-field (QRFF-MD). Application to cyclin-dependent kinase 2 / P. Ferrara, A. Curioni, E. Vangrevelinghe et al. // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2006. – Vol. 46. – P. 254-263
99. Чуешов, В.И. Промышленная технология лекарств / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др. // НФАУ. – 2002. – С. 110-716

100. Иванова, Л.А. Технология лекарственных форм / Л.А. Иванова. – М.: Медицина, 1991. – 544 с.
101. Park, T.G. Degradation of Poly(lactic-co-glycolide acid) microspheres: effect of copolymer composition / T.G. Park // Biomaterils. – 1995. – Vol. 16. – P.1123-1130.
102. Verger, M. Preparation and characterization of nanoparticles containing an antihypertensive agents / M. Verger, L. Fluckiger, Y.I. Kim et. al. // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmacology. – 1998. – Vol. 46. – P.137-143
103. Гусев, А.И. Наноматериалы, наноструктуры, нанотехнологии / Гусев А.И. – М.: Физматлит, 2007. – 416 с.
104. Елисеев, А.А. Функциональные наноматериалы / А.А. Елисеев, А.В. Лукашин. – М.: Физматлит, 2010. – 456 с.
105. Astete, C.E. Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles / C.E. Astete, C.M. Sabliov // Journal of Biomaterials Science. – 2006. – Vol. 17. P. 247–289.
106. Jovanoviæ, N. Distinct effects of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying / N. Jovanoviæ, A. Bouchard, G.W. Hofland, et al. // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – Vol. 27. – P. 336-345
107. Kazakova, V.V. From a hyperbranched polyethoxysiloxane toward molecular forms of silica: a polymer-based approach to the monitoring of silica properties / V.V. Kazakova, A.N. Ozerin, A.M. Muzaferov // Silicones and silicone- modified materials. –2000. – №71. – P. 503-515
108. Mobley, W.C. Phase transition temperature reduction and glass transformation in dehydroprotected lyophilized liposomes / W. C. Mobley, H. Schreier // Journal of Controlled Release. – 1994. – Vol. 31. – P. 73-87
109. Madden, T.D. Protection of large unilamellar vesicles by trehalose during dehydration: retention of vesicle contents / T.D. Madden,

M.B. Bally, M.J. Hope, et al. // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1985. – Vol. 817. – P. 67-74

110. Vincourt, V. Freeze-drying of ATP entrapped in cationic, low lipid liposomes / V. Vincourt, L. Nguyen, J-C. Chaumeil, G. Dumortier // *Cryobiology.* – 2010. – Vol. 60. – P. 262-270

111. Komatsu, H. Effects of the acyl chain composition of phosphatidylcholines on the stability of freeze-dried small liposomes in the presence of maltose / H. Komatsu, H. Saito, S. Okada, et al. // *Chemistry and Physics of Lipids.* – 2001. – Vol. 113. – P. 29-39

112. Crowe, J.H. Factors affecting the stability of dry liposomes / J.H. Crowe, L.M. Crowe // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1988 – Vol. 939. – P. 327-334

113. Sun, W.Q. Stability of dry liposomes in sugar glasses/ W.Q. Sun, A.C. Leopold, L.M. Crowe, J.H. Crowe // *Biophysical Journal.* – 1996 – Vol. 70. – P. 1769-1776

114. Nagase, H. Effect of water on lamellar structure of DPPC/sugar systems / H. Nagase, H. Ueda, M. Nakagaki // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 1997. – Vol. 1328. – P. 197-206

115. Hays, L.M. Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions / L.M. Hays, J.H. Crowe, W. Wolkers, S. Rudenko // *Cryobiol.* – 2001. – Vol. 42. – P. 88-102

116. Ponomarenko, S.A. Star-shaped oligothiophenes for solution-processible organic electronics: Flexible aliphatic spacers / S.A. Ponomarenko, E.A. Tatarinova et al. // *Approach Chemical Materials.* – 2006. – Vol. 18. – P. 4101-4108

117. Ohvo-Rekila, H. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P. Leppimaki, J.P. Slotte // *Progress in Lipid Research* – 2002. – Vol. 41. – P. 66-97

118. Barenholz, Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to «rafts» / Y. Barenholz // Progress in lipid research. – 2002. – № 41. – P. 1–5
119. Ohtake, S. Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose / S. Ohtake, C. Schebor, S. P. Palecek, J.J. de Pablo // Biochimica et Biophysica Acta. – 2005. – Vol. 1713. – P. 57-64
120. Сумм, Б.Д. Области и методы коллоидной химии вnanoхимии / Б.Д. Сумм, Н.И. Иванова // Успехи химии. – 2000. – № 11. – С. 995-1008
121. Tjong S.C. Structural and mechanical properties of polymer nanocomposites / S.C. Tjong // Materials Science. – 2006. – №53. – P. 73-197
122. Kamath, L. Practical Technologies for Lyophilization / L. Kamath // Genetic Engineering and Biotechnology News. – 2006. – Vol. 26. – P. 1-4.
123. Patapoff, T. W. The Importance of Freezing on Lyophilization Cycle Development / T.W. Patapoff, D.E. Overcashier // Biological Pharmacology. – 2002. – P. 16-21.
124. Barresi, A.A. In-line control of the lyophilization process. A gentle PAT approach using software sensors / A.A. Barresi, S.A. Velardi, R. Pisano R. et al. // International journal of refrigeration. – 2009. – Vol. 32. – P. 1003-1014.
125. Нежута, А.А. Разработка научно-обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А.А. Нежута // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 59-67
126. Muryshev, A. A novel scoring function for molecular docking / A. Muryshev, D. Tarasov, A. Butygin et al. // Journal Of Computer-Aided Molecular Design. – 2003. – Vol. 17. P. 597-605

127. Ramensky, V. A novel approach to local similarity of protein binding sites substantially improves computational drug design results / V. Ramensky, A. Sobol, N. Zaitseva et al. // Proteins. – 2007. – Vol. 69. – P. 349-357

128. RCSB Protein Data Bank (PDB). Электронная база данных расшифрованных трехмерных структур белковых комплексов PDB [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.rcsb.org/pdb.html>

129. ABI 433A Peptide Synthesizer. – User Guide. – 2004. – Vol. 1. – P. 34-524

130. ABI 433A Peptide Synthesizer. – User Guide. – 2004. – Vol. 2. – P. 10-427

131. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических препаратов / Р.У. Хабриев // 2005. – С. 827

132. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов // Москва: Гриф и К. – 2012. – 944 с.

133. Born, G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal / G.V. Born // Nature. –1962. – Vol. 194. – P.927-929.

134. Born, G.V. The aggregation of blood platelets / G.V. Born, M.J. Cross // The Journal of Physiology. – 1963. – Vol. 168. P. 178-195

135. Born, G.V. Antiplatelet drugs / G.V. Born, C. Patrono // British Journal of Pharmacology. – 2006. – Vol. 147. – P. 241-251

136. Алексеев, А.А. Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // Ученый записки. Электронный научный журнал Курского государственного университета. – 2013. – Т.2, №3(27). – С. 32-37

137. Алексеев, А.А. Молекулярное моделирование, синтез и оценка биологической активности новых антагонистов GPIb/IIIa рецепторов тромбоцитов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // Молекулярная медицина. – 2013. – №5. С. 61-63
138. Алексеев, А.А. Синтез антитромботических пептидов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // Вопросы медицинской, биологической и фармацевтической химии. – 2014. – № 6. – С. 22-25
139. Алексеев, А.А. Пептидные ингибиторы агрегации тромбоцитов: математическое моделирование, синтез и оценка специфической активности новых соединений в условиях *in vitro* / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова // Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т.32, №11. – С. 96-100
140. Голубев, Л.Г. Сушка в химико-фармацевтической промышленности / Л.Г. Голубев, Б.С. Санин, Е.Р. Валашек. – М.: Медицина, 1978. – 350 с.
141. Патент №2502739 РФ, МПК C07D 498/14, A61K 31/4245, A61P 7/02. N-карб(глутаминил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова, Н.Н. Белушкина. – №2012146266/04; заявл. 31.10.2012; опубл. 27.12.2013. – 7 с.: ил.
142. Патент №2544547 РФ, МПК C07D 498/14. N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан / В.Л. Королев, В.В. Топоров, В.М. Даниленко, В.П. Ившин, А.А. Алексеев, Л.А. Павлова. – №2014105524/04; заявл. 17.02.2014; опубл. 20.03.2015. – 4 с.: ил.

143. Патент №2549355 РФ, МПК C07D 498/14, A61K 31/4245, A61P 7/02. N-карб(аргинил)оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксан, ингибирующий агрегацию тромбоцитов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, Е.А. Батуев, Л.А. Павлова, Н.Н. Белушкина – №2014105523/04; заявл. 17.02.2014; опубл. 27.04.2015. – 7 с.: ил.

144. Патент №2550223 РФ, МПК C07K 7/06, C07D 498/14, A61K 38/08, 31/4245, A61P 7/02. Гетеромерные пептиды на основе имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана, ингибирующие агрегацию тромбоцитов / А.А. Алексеев, М.И. Брылев, В.Л. Королев, Д.С. Лоторев, А.Ю. Лизунов, Л.А. Павлова, Н.Н. Белушкина. – №2014116844/04; заявл. 28.04.2014; опубл. 10.05.2015. – 9 с.: ил.

Приложение 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2550223

**ГЕТЕРОМЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ИМИДАЗО[4,5-
e]БЕНЗО[1,2-с;3,4-с']ДИФУРОКСАНА, ИНГИБИРУЮЩИЕ
АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): см. на обороте

Заявка № 20141116844

Приоритет изобретения 28 апреля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10 апреля 2015 г.

Срок действия патента истекает 28 апреля 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) RU (11) 2 550 223 (13) C1

(51) МПК
C07K 7/06 (2006.01)
C07D 498/14 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014116844/04, 28.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
28.04.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.04.2014

(45) Опубликовано: 10.05.2015 Бюл. № 13

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2502739 C1, 27.12.2013 . RU
2002134671 A, 27.06.2004 . RU 2139932 C1,
20.10.1999 . US 7145016 B1, 05.12.2006

Адрес для переписки:

119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 2, ГБОУ
ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, отдел
инновационной деятельности, интеллектуальной
собственности

(72) Автор(ы):

Алексеев Алексей Анатольевич (RU),
 Брылев Максим Игоревич (RU),
 Королев Вячеслав Леонидович (RU),
 Лоторев Дмитрий Сергеевич (RU),
 Лизунов Антон Юрьевич (RU),
 Павлова Людмила Анатольевна (RU),
 Белушкина Наталья Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

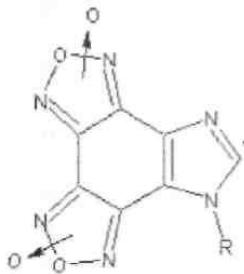
Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)

(54) ГЕТЕРОМЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ НА ОСНОВЕ ИМИДАЗО[4,5-*e*]БЕНЗО[1,2-*c*;3,4-*c*']ДИФУРОКСАНА, ИНГИБИРУЮЩИЕ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

(57) Реферат:

Предложены гетеромерные пептиды на основе
имидаzo[4,5-*e*]бензо[1,2-*c*;3,4-*c*']дифуроксана,
ингибирующие агрегацию тромбоцитов:

где R=Phe-Ile-Ala-Asp-Thr; Arg-Tyr-Gly-Asp-Arg;
 Lys-Ile-Ala-Asp-Asp; His-Ile-Gly-Asp-Asp. 1 ил., 2
 табл., 4 пр.



R U 2 5 5 0 2 2 3 C 1

R U 2 5 5 0 2 2 3 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2549355

**Н-КАРБ(АРГИНИЛ)ОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-
e]БЕНЗО[1,2-с;3,4-с']ДИФУРОКСАН, ИНГИБИРУЮЩИЙ
АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): см. на обороте

Заявка № 2014105523

Приоритет изобретения 17 февраля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 30 марта 2015 г.

Срок действия патента истекает 17 февраля 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 549 355⁽¹³⁾ C1

(51) МПК
C07D 498/14 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014105523/04, 17.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.02.2014

(45) Опубликовано: 27.04.2015 Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2002134671 A, 27.06.2004. RU
2139932 C1, 20.10.1999. US 7838023 B2,
23.11.2010. WO 2009/076265 A1, 18.06.2009

Адрес для переписки:

119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 2, ГБОУ
ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, отдел
инновационной деятельности, интеллектуальной
собственности

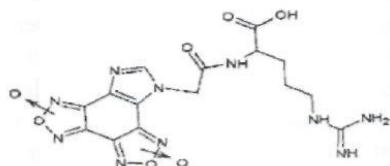
(72) Автор(ы):

Алексеев Алексей Анатольевич (RU),
Брылев Максим Игоревич (RU),
Королев Вячеслав Леонидович (RU),
Лоторев Дмитрий Сергеевич (RU),
Батуев Евгений Андреевич (RU),
Павлова Людмила Анатольевна (RU),
Белушкина Наталья Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)(54) N-КАРБ(АРГИНИЛ)ОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-е]БЕНЗО[1,2-с;3,4-с']ДИФУРОКСАН,
ИНГИБИРУЮЩИЙ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к N-карб(аргинил)
оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']
дифуроксану формулыТехнический результат - N-карб(аргинил)
оксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']
дифуроксан, ингибирующий агрегацию
тромбоцитов. 1 ил., 1 табл.

RU 2 549 355 C1

RU 2 549 355 C1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2544547

N-КАРБОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-е]БЕНЗО[1,2-с;3,4-с']ДИФУРОКСАН

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)*

Автор(ы): см. на обороте

Заявка № 2014105524

Приоритет изобретения 17 февраля 2014 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11 февраля 2015 г.

Срок действия патента истекает 17 февраля 2034 г.

Врио руководителя Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) 2 544 547⁽¹³⁾ C1(51) МПК
C07D 498/14 (2006.01)ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014105524/04, 17.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.02.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.02.2014

(45) Опубликовано: 20.03.2015 Бюл. № 8

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Топоров В.В. и др. "Исследование поведения имидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,3-с']-дифуроксанов в реакциях нитрования, алкилирования и кислотного гидролиза" XVIII МЕНДЕЛЕЕВСКИЙ СЪЕЗД ПО ОБЩЕЙ И ПРИКЛАДНОЙ ХИМИИ, Москва 23-28 сентября 2007г., Тезисы докладов, т.1, Пленарные доклады, Достижения и перспективы химической науки, 2007. Королёв В.Л. и др. (см. прод.)

Адрес для переписки:

119991, Москва, Трубецкая ул., 8, стр. 2, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, отдел инновационной деятельности, интеллектуальной собственности

(72) Автор(ы):

Королев Вячеслав Леонидович (RU),
Топоров Владислав Владимирович (RU),
Даниленко Виталий Михайлович (RU),
Ившин Виктор Павлович (RU),
Алексеев Алексей Анатольевич (RU),
Павлова Людмила Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздрава России) (RU)

R U 2 5 4 4 5 4 7 C 1

(54) N-КАРБОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-е]БЕНЗО[1,2-с;3,4-с']ДИФУРОКСАН

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']дифуроксана гидролизом N-карбоксиметилимидазо[4,5-е]бензо[1,2-с;3,4-с']

дифуроксана 10%-ным водным раствором соляной кислоты. Технический результат: повышение выхода целевого продукта. 1 пр.

(56) (продолжение):

"Имидазобензодифуроксаны - новая конденсированная гетероциклическая система" XVII МЕНДЕЛЕЕВСКИЙ СЪЕЗД ПО ОБЩЕЙ И ПРИКЛАДНОЙ ХИМИИ, г. Казань, 21-26 сентября 2003 г., Пленарные доклады, Достижения и перспективы химической науки, 2003. RU 2002134671 A, 27.06.2004. RU 2502739 C1, 27.12.2013. US 20060106051 A1, 18.05.2006

R U 2 5 4 4 5 4 7 C 1

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2502739

**Н-КАРБ(ГЛУТАМИНИЛ)ОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-
Е]БЕНЗО[1,2-С;3,4-С']ДИФУРОКСАН, ИНГИБИРУЮЩИЙ
АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**

Патентообладатель(ли): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России) (RU)*

Автор(ы): см. на обороте

Заявка № 2012146266

Приоритет изобретения 31 октября 2012 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27 декабря 2013 г.

Срок действия патента истекает 31 октября 2032 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) RU (11) 2 502 739 (13) C9

(51) МПК
C07D 498/14 (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

RU 2 502 739 C9

(21)(22) Заявка: 2012146266/04, 31.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.10.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.10.2012

(45) Опубликовано: 27.12.2013

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции № 1 (W1 C1)(48) Коррекция опубликована:
20.02.2014 Бюл. № 05(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2002134671 A, 27.06.2004. RU 2139932
C1, 20.10.1998. US 7838023 B2, 23.11.2010.Адрес для переписки:
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр.2,
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.
Сеченова, отдел инновационной
деятельности и интеллектуальной
собственности

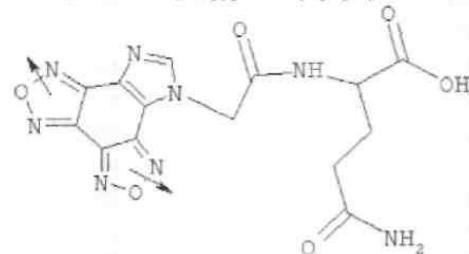
(72) Автор(ы):

Алексеев Алексей Анатольевич (RU),
Брылев Максим Игоревич (RU),
Королев Вячеслав Леонидович (RU),
Лоторев Дмитрий Сергеевич (RU),
Батуев Евгений Андреевич (RU),
Павлова Людмила Анатольевна (RU),
Белушкина Наталья Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования Первый
Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения и
социального развития Российской
Федерации (ГБОУ ВПО Первый МГМУ им.
И.М. Сеченова Минздравсоцразвития
России) (RU)(54) N-КАРБ(ГЛУТАМИНИЛ)ОКСИМЕТИЛИМИДАЗО[4,5-Е]БЕНЗО[1,2-С;3,4-С']
ДИФУРОКСАН, ИНГИБИРУЮЩИЙ АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к N-
карб(глутаминил)оксиметилимидаzo[4,5-е]
бензо[1,2-с; 3,4-с']дифуроксану формулыТехнический результат: получено новое
соединение, которое может найти применение в
медицине в качестве лекарственного препарата,
ингибирующего агрегацию тромбоцитов. 1
ил., 1 табл.

Приложение 2

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной деятельности
ГБОУ ВПО Первый Московский
государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова

Минздрава России
В.Н. Николаенко
«___» 2015 г.

АКТ

внедрения в научно-исследовательскую деятельность
лаборатории биологически активных соединений НИИ фармации
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России
результатов диссертационного исследования
Алексеева Алексея Анатольевича
на тему «Разработка и исследование лекарственного препарата на основе
новых пептидных ингибиторов агрегации тромбоцитов»

Мы, нижеподписавшиеся, д.ф.н., доцент, зам. Директора по научной работе Н.В. Пятигорская, к.ф.н., Ученый секретарь НИИ фармации О.И. Терёшкина, удостоверяем факт внедрения результатов научной работы Алексеева Алексея Анатольевича в научно-исследовательскую деятельность лаборатории биологически активных соединений НИИ фармации ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Материалы исследования используются в технологическом процессе получения готовых лекарственных форм пептида с антиагрегационной активностью.

Зам. Директора НИИ фармации
по научной работе

Ученый секретарь НИИ фармации

Пятигорская
Н.В. Пятигорская

Терёшкина
О.И. Терёшкина

Приложение 3

Для служебного пользования. Экз. №1

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной деятельности
ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова
В.Н. Николенко
2015 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство лиофилизата гетеромерного пептида для приготовления
раствора для инъекции 8 мг

Срок действия регламента до «___» 20 ___ г.
(дата)

Москва, 2015г