

УДК 615.451

## РАЗРАБОТКА НОВОГО ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕГО ПРЕПАРАТА ТИМОФЕР

*Б.М. Холназаров<sup>1</sup>, Г.М. Бобиев<sup>2</sup>, Н.Д. Бунятян<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Таджикский национальный университет, г.Душанбе, Таджикистан

<sup>2</sup>Таджикский государственный педагогический университет им. С.Айни, г.Душанбе, Таджикистан

<sup>3</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, г. Москва

Приведены результаты разработки иммуномодулирующего препарата тимофер на основе координационных соединений дипептида изолейцил-триптофан с железом (II), включающие изучение координации дипептида изолейцил-триптофан с железом (II), изучение иммуностимулирующей активности координационных соединений, результаты доклинических и клинических исследований тимоцина. Методом pH-метрического титрования показано, что при взаимодействии цинка и дипептида изолейцил-триптофан в растворе образуются следующие комплексные формы:  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)]^{2+}$  ( $\beta = 1,00 \times 10^{34}$ ),  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)_2]^{2+}$  ( $\beta = 6,25 \times 10^{11}$ ),  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)\text{OH}]^+$  ( $\beta = 4,01 \times 10^{26}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)]^+$  ( $\beta = 8,10 \times 10^{18}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)_2]^+$  ( $\beta = 7,50 \times 10^{28}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)\text{OH}]^+$  ( $\beta = 1,03 \times 10^{29}$ ). Показано, что иммуностимулирующая активность координационных соединений в 2 раза превышает таковую исходного дипептида. Разработаны и стандартизированы субстанция, стандартный образец и лекарственная форма тимофера. Разработанный иммуномодулирующий препарат тимофер показал высокую терапевтическую эффективность при лечении больных железодефицитными анемиями, с гнойно-воспалительными процессами и травматическими повреждениями челюстно-лицевой области, с хроническими воспалительными заболеваниями органов гениталий (ЦМВ, ВПГ, хламидиоз, хронический эндометрит, хронический сальпингоофорит, уреаплазмоз), с хроническим бронхитом, хроническим обструктивным бронхитом, бронхиальной астмой, пневмонией, с хроническим гломерулонефритом, осложненным ХПН и анемией Брайта, с ревматологическими заболеваниями, гинекологических больных с анемиями средней и тяжелой степени тяжести, при хирургическом лечении больных с нагноительными заболеваниями легких, пороками сердца и хроническими перикардитами, оперированными в условиях искусственного кровообращения. Тимофер зарегистрирован в Таджикистане (рег.№ ЛС №002866).

**Ключевые слова:** иммуномодулирующий препарат, тимофер, координационные соединения, изолейцил-триптофан, железо.

## DEVELOPMENT OF A NEW IMMUNOMODULATING DRUG TIMOFER

*B.M. Kholnazarov<sup>1</sup>, G.M. Bobiev<sup>2</sup>, N.D. Bunyatyan<sup>3</sup>*

<sup>1</sup>Tajik National University, Dushanbe, Tajikistan

<sup>2</sup>Tajik State Pedagogical University named S.Ayni, Dushanbe, Tajikistan

<sup>3</sup>FGBI «Scientific Center for Expertise of Medical Products» Russian Ministry of Health, Moscow

Results of the development of an immunomodulating drug timofer based on coordination compounds isoleucyl-tryptophan dipeptide with iron (II), including the study of coordinate

isoleucyl-tryptophan dipeptide with iron (II), the study of the immunostimulatory activity of the coordination compounds, the results of the preclinical and clinical studies of timotsin are presented. Method of pH titration showed that the interaction of zinc and dipeptide isoleucyl-tryptophan formed in solution following complex forms:  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)]^{2+}$  ( $\beta = 1,00 \times 10^{34}$ ),  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)_2]^{2+}$  ( $\beta = 6,25 \times 10^{11}$ ),  $[\text{Fe}(\text{HL}^\pm)\text{OH}]^+$  ( $\beta = 4,01 \times 10^{26}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)]^+$  ( $\beta = 8,10 \times 10^{18}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)_2]^+$  ( $\beta = 7,50 \times 10^{28}$ ),  $[\text{Fe}(\text{L}^-)\text{OH}]^+$  ( $\beta = 1,03 \times 10^{29}$ ). It was shown that the immunostimulatory activity of the coordination compounds is 2 times higher than that starting dipeptide. The substance sample and standard formulation of timofer were developed and standardized. The developed immunomodulatory drug timofer showed a high therapeutic efficacy in the treatment of iron deficiency anemia patients with inflammatory processes and traumatic injuries of the maxillofacial region, with chronic inflammatory diseases of the the genitals (CMV, HSV, chlamydia, chronic endometritis, chronic salpingoopharitis, ureaplasmosis) with chronic bronchitis, chronic obstructive bronchitis, bronchial asthma, pneumonia, chronic glomerulonephritis, and chronic renal failure complicated by anemia Bright, withrheumatic diseases, gynecological patients with anemia of moderate and severe degrees of severity, at surgical treatment of patients with suppurative lung disease, heart disease and chronic pericarditis operated with cardiopulmonary bypass. Timofer is registered in Tajikistan (registration number of medical drug №002866).

**Key words:** immunomodulatory drug, timofer, coordination compounds, isoleucyl-tryptophan, iron.

Одной из самых интенсивно развивающихся областей фармацевтической химии является фармация пептидов. Если за 80-е и 90-е годы прошлого века в медицинскую практику было введено всего 5 и 10 пептидных препаратов, соответственно, то к началу 2000-х годов их уже было 60. В настоящее время уже около 140 пептидных препаратов находятся на различных стадиях клинических исследований и около 600 проходят доклинические исследования [14]. Это объясняется тем, что пептиды обладают громадным фармацевтическим потенциалом как активные субстанции для различных лекарственных форм в таких областях, как иммунология, онкология, эндокринология и ряде других [13].

В последние годы прочное место на фармацевтическом рынке заняли иммуномодулирующие препараты, наиболее известными из которых являются препараты на основе тимусных пептидов – тималин, тактивин, тимоген, иммунофан, тимодепрессин и ряд других препаратов [5]. Только три из них созданы на основе индивидуальных тимусных пептидов – тимоген, представляющий собой 0,01% раствор дипептида L-глутамил-L-триптофан, тимодепрессин, представляющий собой 0,01% раствор дипептида D-глутамил-D-триптофан, иммунофан, представляющий собой 0,005% раствор гексапептида аргинил- $\alpha$ -аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин.

В Таджикистане на основе координационных соединений дипептида изолейцил-триптофан с ионом цинка разработан иммуномодулирующий препарат тимоцин, иммуностимулирующая активность которого в 2-8 раз превышала таковую исходного дипептида изолейцил-триптофан [2]. Препарат тимоцин проявил высокую терапевтическую эффективность при лечении псориаза, нейродермита и гепатита С и в настоящее время зарегистрирован в Таджикистане (рег. ЛС №000085Т), Киргизии (КР № 7137) и Туркмении (рег. №006371) [1]. Комплексообразование дипептида изолейцил-триптофан с ионом железа (II) привело к такому же увеличению иммуностимулирующей активности [3]. Однако до настоящего времени препарата на основе координационных соединений железа с иммуноактивными пептидами разработано не было.

Целью данного сообщения являются результаты разработки препарата тимофер, представляющего собой водный раствор координационных соединений дипептида изолейцил-триптофан с железом (II).

На первом этапе методом рН-метрического титрования были определены константы устойчивости образующихся комплексных форм (таблица 1).

Таблица 1 - Константы устойчивости комплексных форм дипептида изолейцил-триптофан и железа (II)

Комплексная форма	Значение константы устойчивости
$[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})]^{2+}$	$1,00 \times 10^{34}$
$[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})_2]^{2+}$	$6,25 \times 10^{11}$
$[\text{Fe}(\text{HL}^{\pm})\text{OH}]^+$	$4,01 \times 10^{26}$
$[\text{Fe}(\text{L}^-)]^+$	$8,10 \times 10^{18}$
$[\text{Fe}(\text{L}^-)_2]^+$	$7,50 \times 10^{28}$
$[\text{Fe}(\text{L}^-)\text{OH}]^+$	$1,03 \times 10^{29}$

Иммунологическую активность полученных координационных соединений изучали *in vivo* по увеличению титра антител у животных, иммунизированных противотейлериозной вакциной. Результаты исследований показали, что координация с железом (II) приводила к двукратному увеличению иммуностимулирующей активности дипептида изолейцил-триптофан и появлению иммуностимулирующей активности *in vivo* у первоначально неактивного *in vitro* в тесте E-розеткообразования дипептида валил-триптофан [8].

Таким образом, координация с ионами металлов приводит к повышению иммуностимулирующей активности триптофансодержащих дипептидов и появлению ее у неактивного *in vitro* дипептида изолейцил-триптофан.

Для исследований были выбраны следующие составы тимофера:

**Состав 1 (тимофер - 0,0426%)**

Тимогар - 28,78 мг  
 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 25,17 мг (13,845 мг)  
 Вода для инъекций - до 100 мл

**Состав 2 (тимофер - 0,0148%)**

Тимогар - 10 мг  
 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 8,745 мг (4,781 мг)  
 Вода для инъекций - до 100 мл

**Состав 3 (тимофер - 0,0148%)**

Тимогар - 10 мг  
 $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  - 8,745 мг (4,781 мг)  
 $\text{NaCl}$  - 0,9 г.  
 Вода для инъекций - до 100 мл

Введение в состав препарата хлорида натрия было вызвано необходимостью создания необходимой изотоничности раствора.

Результаты фармакологических исследований не выявили различий в иммуностимулирующей активности составов 1 и 2, в связи с чем в качестве готовой лекарственной формы был использован состав №2 с эквимольным соотношением дипептида и железа в водном растворе с концентрацией действующего вещества 148 мкг/мл.

Затем была разработана субстанция тимофера, представляющая собой смесь рассчитанных количеств дипептида изолейцил-триптофан и сульфата железа.

На следующем этапе была разработана технологическая схема производства тимофера (рис. 1).

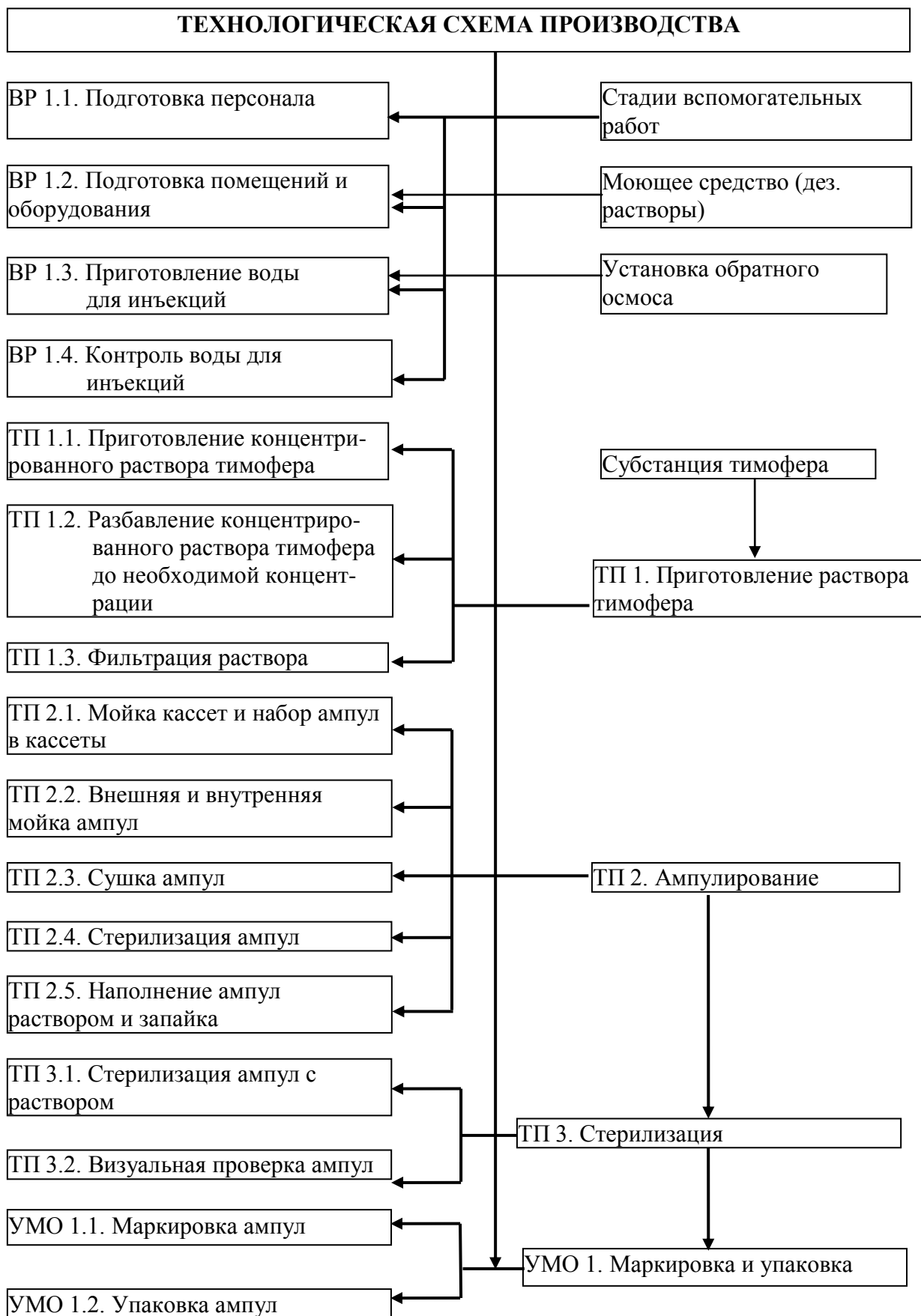


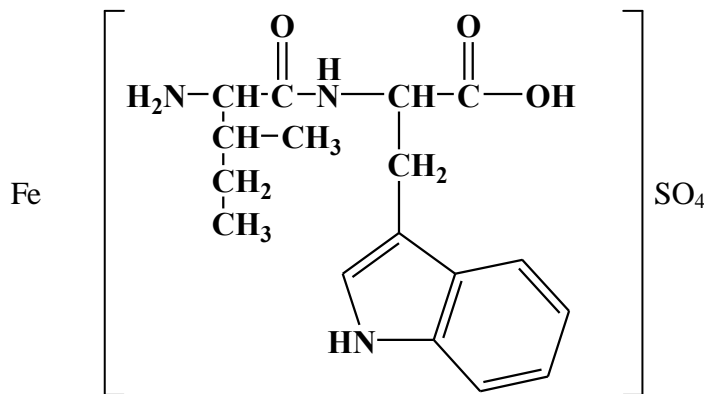
Рисунок 1 - Технологическая схема производства тимофера

Затем согласно ОСТ 64-02-003-2002 «Продукция медицинской промышленности. Технологические регламенты производства. Содержание, порядок разработки, согласования и утверждения» был разработан технологический регламент на производство тимофера. Разработка технологического регламента учитывала поступление на производство готовой субстанции тимофера.

Так как координационные соединения образуются при приготовлении тимофера и не выделяются в кристаллическом виде, для разработки стандартного образца тимофера изучили влияние комплексообразования на интенсивность поглощения дипептида при длине волны  $278 \pm 2$  нм, используемой для его количественного определения. Оказалось, что комплексообразование не оказывает заметного влияния на интенсивность поглощения дипептида.

Поэтому стандартный образец готовили смешиванием рассчитанных количеств дипептида изолейцил-триптофан и сульфата железа (II).

Поскольку при растворении в воде при  $60-70^\circ\text{C}$  этой смеси образуются координационные соединения, то формулу стандартного образца можно выразить следующим образом:



Следующим этапом явилась разработка методов стандартизации стандартного образца тимофера.

Подлинность тимофера устанавливали по наличию в препарате дипептида и иона железа. Так как в состав дипептида входит триптофан, то для установления подлинности тимофера использовали УФ-спектрофотометрию. Спектр поглощения тимофера (рис. 2) в области 220-350 нм имеет максимум при  $278 \pm 2$  нм и плечи при  $273-275 \pm 2$  нм и  $287-288 \pm 2$  нм. Поглощение в этой области характерно для триптофана и триптофансодержащих пептидов.

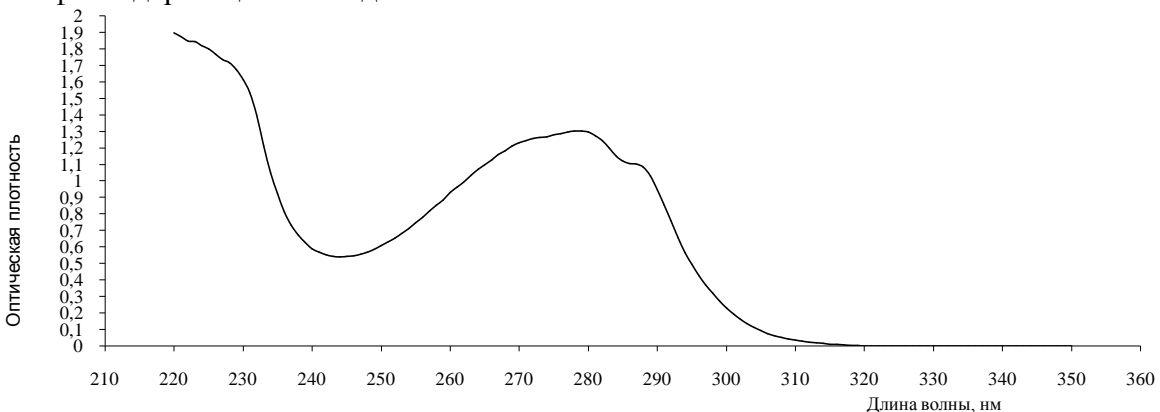


Рисунок 2 - УФ-спектр тимофера

Для установления наличия иона железа (II) использовали реакцию с раствором калия феррицианида.

Аналогично стандартному образцу была разработана субстанция тимофера. Спецификация субстанции тимофера приведена в таблице 3.

Затем была разработана фармакопейная статья на препарат тимофер. Спецификация лекарственной формы тимофера приведена в таблице 4.

Все методики количественного определения были валидированы в соответствии с существующими требованиями [11].

Таблица 2 - Спецификация стандартного образца тимофера

Показатель	Метод анализа	Норма
Описание	Визуальный	Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок без запаха
Растворимость	ГФ XII, ОФС 42-0049-07	Растворим в воде, очень мало растворим в спирте 95%, практически нерастворим в хлороформе
Потеря в массе при высушивании	Гравиметрически (ГФ XI, вып.1, с.176)	Потеря в массе не должна превышать 6,0%
Подлинность	Спектрофотометрия  Качественная реакция (ГФ XI, вып.1, стр.160)  Качественная реакция (ГФ XI, вып.1, стр.164)	А. Спектр поглощения имеет максимум при 278±2 нм и плечи при 273-275±2 и 287-288±2 нм Б. Должен давать реакцию на ион железа (II) с раствором калия феррицианида В. Должен давать реакцию на сульфат-ион с раствором хлорида бария
Прозрачность раствора	Визуально (ГФ XII, ОФС 42-0051-07)	Раствор стандартного образца должен быть прозрачным
Цветность раствора	Визуально (ГФ XII, ОФС 42-0050-07)	Раствор препарата, должен быть бесцветным
pH	Потенциометрия (ГФ XII, ОФС 42-0048-07)	От 4,5 до 6,8 для 0,0148%-ного раствора
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Содержание любой единичной примеси не более 0,9%, суммарное содержание примесей не более 2,0%
Удельный показатель поглощения	Спектрофотометрия	Должен быть в пределах 64,8-70,3

Таблица 3 - Спецификация субстанции тимофера

Показатель	Метод анализа	Норма
Описание	Визуальный	Белый или слегка желтоватый кристаллический порошок без запаха
Растворимость	ГФ XII, ОФС 42-0049-07	Растворим в воде, очень мало растворим в спирте 95%, практически нерастворим в хлороформе
Потеря в массе при высушивании	Гравиметрически (ГФ XI, вып.1, с.176)	Потеря в массе не должна превышать 6,0%
Подлинность	Спектрофотометрия  Качественная реакция	А. Спектр поглощения имеет максимум при 278±2 нм и плечи при 273-275±2 и 287-288±2 нм Б. Должен давать реакцию на ион железа

	(ГФ XI, вып.1, стр.160) Качественная реакция (ГФ XI, вып.1, стр.164)	(II) с раствором калия феррицианида В. Должен давать реакцию на сульфат-ион с раствором хлорида бария
Прозрачность раствора	Визуально (ГФ XII, ОФС 42-0051-07)	Раствор должен быть прозрачным
Цветность раствора	Визуально (ГФ XII, ОФС 42-0050-07)	Раствор должен быть бесцветным
pH	Потенциометрия (ГФ XII, ОФС 42-0048-07)	От 4,5 до 6,8 для 0,0148%-ного раствора
Посторонние примеси	ВЭЖХ	Содержание любой единичной примеси не более 0,9%, суммарное содержание примесей не более 2,0%
Пирогенность	ГФ XII (ОФС 42-0061-07). Тест-доза 1 мл/кг	Препарат должен быть апиrogenным
Микробиологическая чистота	ГФ XII (ОФС 42-0067-07)	В 1 г допускается наличие не более 100 аэробных бактерий и грибов суммарно, не допускается наличие энтеробактерий, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Количественное содержание: тимофера железа	УФ-спектрофотометрия УФ-спектрофотометрия	от 90 до 110% от 90 до 110%

Таблица 4 - Спецификация лекарственной формы тимофера

Показатель	Метод анализа	Норма
Описание	Визуальный	прозрачный бесцветный раствор
Подлинность	Спектрофотометрия  Качественная реакция (ГФ XI, вып.1, стр.160)	А. Спектр поглощения стандартного образца имеет максимум при 278±2 нм и плечи при 273-275±2 и 287-288±2 нм. Б. Должен давать реакцию на ион железа (II) с раствором калия феррицианида
Прозрачность	Визуально (ГФ XI, вып.1, стр.198)	Препарат должен быть прозрачным
Цветность	Визуально (ГФ XI, вып.1, стр.194)	Препарат должен быть бесцветным
Посторонние примеси	ТСХ	Должны появиться только два пятна с совпадающими R <sub>f</sub>
pH	Потенциометрия (ГФ XI, вып.1, стр.113-120)	От 4,5 до 6,8
Стерильность	ГФ XI, вып.2, стр.187-193	Препарат должен быть стерильным
Пирогенность	ГФ XII (ГФ XI, вып.2, стр.183-185). Тест-доза 1 мл/кг	Препарат должен быть апиrogenным
Токсичность	ГФ XI, вып.2, стр.182-183	Препарат должен быть нетоксичным
Количественное содержание: тимофера железа	УФ-спектрофотометрия УФ-спектрофотометрия	от 90 до 110% от 90 до 110%

Доклинические исследования показали, что тимофер является практически нетоксичным и обладает высокой иммуностимулирующей активностью [7].

Результаты клинических испытаний подтвердили высокую эффективность тимофера [4,6,9,10,12].

Терапевтические эффекты тимофера, выявленные при проведении клинических исследований, приведены в таблице 5.

Таблица 5 - Терапевтические эффекты тимофера

Применение тимофера	Терапевтические эффекты
При вакцинации	Иммуномодулирующее
При лечении больных железодефицитными анемиями	нивелирование анемического синдрома и диспепсических явлений снижение активности заболевания улучшение показателей крови, перекисного окисления липидов нормализация иммунологических показателей
При лечении гинекологических больных с анемиями средней и тяжелой степени тяжести различной этиологии	нормализация клинических и биохимических показателей крови (количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, сывороточного железа, цветной показатель, гематокрит)
При лечении больных с гнойно-воспалительными процессами и травматическими повреждениями челюстно-лицевой области	нормализация биохимических и иммунологических показателей более быстрая нормализация общего состояния больных и усиление костной регенерации более ранняя консолидация фрагментов перелома
При хирургическом лечении больных с нагноительными заболеваниями легких, пороками сердца и хроническими перикардитами, оперированными в условиях искусственного кровообращения	нормализация клинических (количество эритроцитов, лейкоцитов, гемоглобина, цветной показатель), биохимических (содержание общего белка сыворотки крови, активность АсАТ и АлАТ) показателей
При лечении больных с хроническими воспалительными заболеваниями органов гениталий, ЦМВ, ВПГ, хламидиоз, хронический эндометрит, хронический сальпингоофорит, уреоплазмоз)	нормализация биохимических и иммунологических показателей крови
При лечении больных хроническим бронхитом, хроническим обструктивным бронхитом, бронхиальной астмой, пневмонией	улучшение показателей крови (уменьшение СОЭ, содержания IgA, IgM, IgG), положительная рентгенологическая динамика, нормализация ритма, уменьшение или исчезновение перегрузки правых отделов сердца, улучшение функций внешнего дыхания
При лечении больных хроническим гломерулонефритом, осложненным ХПН и анемией Брайта	повышение уровня эритроцитов, гемоглобина крови нормализация показателей мочи более ускоренное развитие положительной клинической картины заболевания
При лечении больных ревматологическими заболеваниями	понижение СОЭ, нормализация содержания лейкоцитов



Таким образом, на основе координационных соединений дипептида изолейцил-триптофан с железом (II) разработан новый высокоэффективный иммуномодулирующий препарат тимофер.

### Библиографический список

1. Бобиев Г.М. Результаты клинических испытаний нового иммуномодулирующего препарата тимоцин // Вакцинология-2008. Совершенствование иммунобиологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней: тезисы Всерос. науч.-практ. конф. - М., 2008.- С.25.
2. Бобиев Г.М. Способ получения иммуностимулирующего препарата тимоцин // Патент Республики Таджикистан № ТЖ 282, приоритет 08.05.1998.
3. Бобиев Г.М., Исупов С.Д., Гиесов А.Ш. и др. Влияние ионов металлов на иммуностимулирующую активность дипептидов // Проблемы современной химической науки: материалы юбил. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию химического факультета и 65-летию д.х.н., профессора Якубова Х.М. Душанбе, 1999.-С.26-27.
4. Мирзоев М.Ш., Холназаров Б.М., Шакиров М.Н. и др. Состояние иммунной системы у больных гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2011. Т.54, № 5. С.397-401.
5. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Пептидные тимомиметики. СПб.: Наука, 2000. 158 с.
6. Наботов М.Ш., Холназаров Б.М., Бобиев Г.М. Влияние тимофера на клинико-иммунологические показатели у больных в послеоперационный период // Вестник педагогического университета. 2011. №5. С.66-70.
7. Холназаров Б.М. Токсические свойства лекарственной формы тимофера // Известия АН РТ. Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук.-2011.-№ 1(142).-С.98-100.
8. Холназаров Б.М., Бобиев Г.М., Шахматов А.Н. и др. Влияние комплексообразования с ионом железа (II) на иммунологическую активность триптофансодержащих дипептидов // Проблемы современной координационной химии: материалы респуб. науч. конф., посвящ. 60-летию член-корреспондента АН РТ доктора хим. наук, профессора Аминджанова Азимджона Алимовича 13-14 января 2011 г. Душанбе, 2011. С.146-148.
9. Холназаров Б.М., Бунятян Н.Д., Шахматов А.Н. и др. Эффективность применения тимофера в медицине // Вестник педагогического университета. 2011. №5. С.58-61.
10. Холназаров Б.М., Гулмуродов Т.Г., Бобиев Г.М. и др. Экспериментальная и клиническая эффективность тимофера // Здравоохранение Таджикистана. 2011. №3. С.48-52.
11. Холназаров Б.М., Наботов М.Ш., Шахматов А.Н. и др. Валидация спектрофотометрического метода определения количественного содержания тимофера // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. 2013. Т.56, № 1. С.54-59.
12. Холназаров Б.М., Наботов М., Шахматов А.Н. и др. Влияние тимофера на иммунологические показатели крови при лечении гинекологических заболеваний // Доклады АН РТ. 2011. Т.54, № 8. С.682-685.
13. Nestor J.J., The medicinal chemistry of peptides // Curr. Med. Chem. – 2009 - Vol. 16, No. 33. – P. 4399-4418.
14. Pechon P., Tartar A., Dunn M.K. Development trends for peptide therapeutics. A comprehensive quantitative analysis of peptide therapeutics in clinical development // Peptide Therapeutics Foundation, 2010. Online at [www.peptidetherapeutics.org](http://www.peptidetherapeutics.org).

\*\*\*

*Холназаров Баходур Махмадназарович – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармации фармацевтического и медицинского факультета Таджикского национального университета. Область научных интересов: разработка новых лекарственных препаратов*

*Бунятян Наталья Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, профессор, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Область научных интересов: проблема создания новых лекарственных препаратов с антиоксидантной направленностью действия. E-mail: ndbun@mail.ru*

*Бобиев Гуломкодир Муккамоллович – кандидат химических наук, доктор биологических наук, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры органической и биологической химии Таджикского государственного педагогического университета им. С. Айни. Область научных интересов: синтез пептидов, разработка лекарственных препаратов на основе низкомолекулярных иммуноактивных пептидов и их координационных соединений с биологически активными металлами. E-mail: bobievgt@rambler.ru*