



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258288

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 07 K 7/06

(22) Přihlášeno 24 02 87

(21) PV 1218-87.P

(40) Zveřejněno 12 11 87

(45) Vydáno 14 04 89

(75)

Autor vynálezu

KRCHNÁK VIKTOR RNDr. CSc., MACH OTAKAR RNDr. CSc., PRAHA

(54) Peptid s vlastnostmi antigenních determinant a způsob jeho výroby

Řešení se týká peptidu s vlastnostmi
antigenních determinant obecného vzorce I

H-Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-
-Leu-X

(I),

kde X značí skupinu hydroxylovou nebo ami-
novou, a jeho konjugátu s nosiči typu bíl-
kovin nebo makromolekulárních polymerů,
zejména latexu, spheronu a polystyrenu.
Peptid byl připraven syntézou v pevné
fázi a bylo prokázáno, že jej lze použít
jako diagnostikum při detekci protilátek
proti viru způsobujícímu u lidí syndrom
získané imunodeficiencie (AIDS). Peptid
přichází dále v úvahu pro produkci mono-
determinantních protilátek.

Vynález se týká peptidů s vlastnostmi antigenních determinant obecného vzorce I



(I),

kde X značí skupinu hydroxylovou nebo aminovou, a jeho konjugátu s nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, zejména latexu, spheronu a polystyrenu a způsobu jejich výroby.

Látka podle vynálezu je nová a byly u ní prokázány vlastnosti antigenních determinant glykoproteinu gp 41, což je bílkovinný produkt genu env viru způsobujícího u lidí imunodeficienci (HIV). Může sloužit jako vhodné diagnostikum k detekci protilátek proti viru způsobujícímu syndrom získané imunodeficiencie (AIDS) nebo komplex chorob příbuzných AIDS (ARC). Dále je potenciálně též použitelná pro produkci monodeterminantních protilátek.

V současné době se diagnostikuje syndrom získané imunodeficiencie (AIDS) přítomností protilátek proti viru HIV v krevním séru. Stanovení je prováděno za pomoci tzv. ELISA testu, který je založen na interakci protilátek v séru s antigenem, tj. virem HIV (inaktivovaným detergentem), jímž jsou ELISA destičky potaženy. Virus je získáván poměrně složitým způsobem, nejdříve je produkován v tkáňové kultuře infikovanými buňkami a potom je virus izolován z tkáňového média a dále několikrát postupně purifikován, než je ho možné použít k potahování ELISA destiček. Jedná se o práci velice složitou a nákladnou, ale hlavně vysoce nebezpečnou, neboť se pracuje po celou dobu s vysoce infekčním materiálem. Destičky ELISA, i když jsou potaženy inaktivovaným virovým preparátem, je nutno považovat za potenciálně infekční materiál a podle toho je nutno s nimi zacházet. Na výše zmíněném postupu jsou založeny prakticky všechny laboratorní soupravy k vyšetření onemocnění AIDS, vyráběné předními světovými výrobci. Přitom test není zcela specifický, dává určité malé procento falešně pozitivních výsledků, způsobených i přes intenzivní purifikaci některými kontaminujícími složkami z tkáňové kultury. Proto je nutno u pozitivních případů provádět konfirmační testy, založené na jiném principu, a to buď imunofluorescenci, nebo tzv. metodou Western blot. V roce 1986 se očekává uvedení na trh prvních bezpečných diagnostických souprav, které místo celého viru HIV budou obsahovat jako antigen jen některé jeho strukturální bílkoviny, získané metodou genové manipulace v produkčním bakteriálním nebo eukaryotním systému. Tím by měla odpadnout nutnost konfirmačních testů, neboť by se používal jeden definovaný antigen a ne jejich směs, jak to je při použití celého viru. Tyto soupravy budou zřejmě vysoce specifické a umožní, vzhledem k genetické variabilitě viru, vedle lepší diagnostiky, zřejmě i stanovení prognózy onemocnění. Podobných výsledků by mělo být dosaženo i s použitím některých epitopů proteinů viru HIV, kde se zatím podobná souprava nevyrábí, ale je již na trhu sada monoklonálních protilátek proti oligopeptidům z vnitřní virové bílkoviny p24, a jsou očekávány v nejbližší době práce o imunogenních peptidech, syntetizovaných na základě analýzy primární sekvence obalových proteinů viru HIV.

Látka podle vynálezu byla syntetizována způsobem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na polymerní nosič polystyrenového typu s chlormetylovými nebo benzhydrylaminovými skupinami zakotví karboxyterminální aminokyselina a postupnou kondenzací se vystaví peptidický řetězec. Poté se získaný peptid acidolyticky odštěpí z polymerního nosiče a přečistí se.

Peptid obecného vzorce I byl připraven Merrifieldovou metodou syntézy peptidů v pevné fázi. Jako polymerní nosič byl použit polystyren síťovaný divinylnbenzenem, s výhodou jedním procentem, s funkčními skupinami chlormetylovými nebo benzhydrylaminovými. N-alfa-aminoskupiny byly chráněny acidolabilní chránicí skupinou, s výhodou Boc skupinou, její odštěpování bylo prováděno acidolyticky, s výhodou směsí TFA a DCM nebo nasyceným roztokem chlorovodíku v DCM. Postranní funkční skupiny vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Kondenzace chráněných aminokyselin byly prováděny vhodně aktivovanými deriváty, s výhodou symetrickými anhydridy nebo HOBt estery. Po ukončení syntézy byl peptid z pryskyřice odštěpen a současně byly odstraněny chránicí skupiny vícefunkčních aminokyselin acidolyticky, s výhodou působením kapalného HF nebo TFMSA ve směsi s TFA a thioanisolem. Surový produkt

byl čištěn buď pomocí sloupcové chromatografie na nosičích používaných v chemii peptidů, s výhodou silikagelu, potaženém hydrofobními uhlíkatými řetězci, nebo nosičů fungujících jako molekulární síta. Peptid byl charakterizován aminokyselinovou analýzou a jeho čistota byla ověřena chromatografickými a elektroforetickými metodami.

Aminokyselinová sekvence peptidu obecného vzorce I byla odvozena z aminokyselinové sekvence glykoproteinu gp 41 viru způsobujícího u lidí imunodeficienci (HIV) tak, aby zahrnovala antigenní determinanty zmíněného glykoproteinu. Peptid může sloužit pro diagnostické účely, což bylo prokázáno autory vynálezu a pro produkci monodeterminantních protilátek.

Základem diagnostické reakce je interakce syntetického peptidu podle vynálezu s protilátkami vytvořenými v organismu, který byl infikován virem. Syntetický peptid obecného vzorce I je určen pro detekci protilátek produkovaných infikovanými jedinci proti virálnímu glykoproteinu gp 41, viru způsobujícímu u lidí imunodeficienci (HIV). Při praktickém použití lze s výhodou použít např. enzymoimunologický test (ELISA), který byl autory vynálezu proveden tak, jak již bylo popsáno v čs. AO č. 256 960. Reakce s peptidem vykazovala v průběhu tytéž hodnoty absorpance jako antigen připravený z viru HIV. Reakce s kontrolním negativním sérem se pohybovala na úrovni pozadí a v hodnotách absorpance nepřevýšila hranici 0,1. Pozitivní séra vykazovala absorpanci 5x až 10x vyšší, přičemž bylo dosaženo ojediněle i hodnot ještě vyšších (1,75).

Peptid podle vynálezu je možno dále použít pro produkci monodeterminantních protilátek proti glykoproteinu gp 41, směřovaných proti antigenní determinantě, kterou zahrnuje peptid, kterým byla imunizace prováděna. Autoři vynálezu prováděli imunizaci pokusných zvířat, s výhodou králíků, peptidem obecného vzorce I, s výhodou polymerizovaným glutaraldehydem nebo metodou aktivních esterů nebo po navázání na vhodnou bílkovinu, s výhodou kravský serumalbumin, thyreoglobulin nebo hemocyanin z keyhole limpetů, za použití kondenzačního činidla, s výhodou glutaraldehydu, karbodiimidu, bifunkčních činidel nebo pomocí aktivních esterů. Jako imunoadjuvans použili Freundovo kompletní adjuvans nebo muramyl-dipeptid.

Získané výsledky ukazují, že peptid podle vynálezu je možno použít jako diagnostika a přichází v úvahu při produkci monodeterminantních protilátek.

Následující příklad provedení látku a způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale nikterak neomezuji.

P ř í k l a d

Do reakční nádoby syntetizátoru peptidů bylo umístěno 2,0 g benzhydrylaminové pryskyřice síťované 1% divinylbenzenem. Syntéza zahrnovala 11 cyklů, sestávajících z následujících kroků: (1) štěpení chránicích skupin, TFA:DCM (1:1), 1x5 min, 1x30 min; (2) promývání, DCM, 6x1 min; (3) promývání, 2-propanol, 2x1 min; (4) promývání, DCM, 2x1 min; (5) neutralizace, TEA:DCM (1:9), 1x1 min, 1x3 min; (6) promývání, DCM, 6x1 min; (7) kondenzace pomocí předem připravených symetrických anhydridů (3násobný přebytek), do negativní reakce na aminoskupiny; (8) promývání, DCM, 3x1 min. V jednotlivých cyklech byly kondenzovány následující chráněné aminokyseliny: Boc-Leu, Boc-Arg(Tos), kondenzace smícháním Boc-Arg(Tos) a DCC v reakční nádobce, Boc-Ile, Boc-Ser (Bzl), Boc-Arg(Tos), kondenzace jako u předchozího Arg, Boc-Asp(OBzl), Boc-Arg(Tos), kondenzace jako u předchozího Arg, Boc-Asp(OBzl), Boc-Arg(Tos), kondenzace jako u předchozího Arg, Boc-Glu(OBzl) a Boc-Gly. První syntetický cyklus začínal krokem č. (4). Po ukončené syntéze bylo získáno 4,85 g peptidylpryskyřice. Peptid byl z peptidylpryskyřice (0,5 g) odštěpen a současně byly odstraněny chránicí skupiny pomocí kapalného HF metodou "low-high". Po odstranění HF byly produkt a pryskyřice odfiltrovány, promyty etylacetátem a produkt extrahován do 20% kyseliny octové, lyofilizován a čištěn na koloně (1x100 cm) obsahující jako stacionární fázi polyakrylamidový gel, mobilní fáze 1N kyselina octová, průtok 7 ml/hod. Frakce obsahující homogenní produkt byly spojeny a lyofilizovány. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota

produktu byla potvrzena při analytické HPLC (R_t 7,9 min, mobilní fáze 40 % MeOH, 60 % vody obsahující 0,1 % TPA), chromatografií na tenké vrstvě (R_f 0,35 v soustavě n-butanol: kyselina octová: voda - 4:1:1) a při elektroforéze na papíře při pH 2,5.

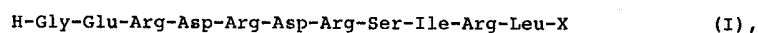
Výtěžek: 74 mg H-Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-NH₂

Vysvětlivky ke zkratkám použitým v textu:

HIV	virus způsobující u lidí imunodeficienci
ARC	komplex chorob příbuzných AIDS
AIDS	syndrom získané imunodeficiency
ELISA	enzymoimunologický test
HPLC	vysokodúčinná kapalinová chromatografie
TFA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormetan
TFMSA	kyselina trifluormetansulfonová
HOBt	N-hydroxybenztriazol
TEA	triethylamin
Boc	t-butyloxykarbonyl
Tos	p-toluensulfonyl
Bzl	benzyl
CDD	N,N'-dicyklohexylkarbodiimid
HF	fluorovodík
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Ser	serin

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Peptid s vlastnostmi antigenních determinant obecného vzorce I,



kde X značí skupinu hydroxylovou nebo aminovou a jeho konjugát s nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, zejména latexu, spheronu a polystyrenu.

2. Způsob výroby peptidů obecného vzorce I podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na polymerní nosič polystyrenového typu s chlormethylovými nebo benzhydrylaminovými skupinami zakotví karboxyterminální aminokyselina a postupnou kondenzací se vystaví peptidický řetězec, načež se získaný peptid acidolyticky odštěpí z polymerního nosiče a přečistí.