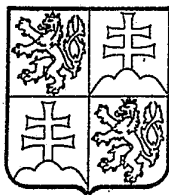


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 926

(21) PV 335-89.C
(22) Přihlášeno 18 01 89

(40) Zveřejněno 13 06 90
(45) Vydáno 16 12 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 7/08

(75) Autor vynálezu

SUCHÁNKOVÁ ALENA RNDr. CSc.,
HIRSCH IYAN RNDr. CSc.,
HAMŠÍKOVÁ EVA RNDr.,
KRCHNÁK VIKTOR RNDr. CSc.,
VÁGNER JOSEF ing.,
RITTER OTTO RNDr.,
VONKA VLADIMÍR MUDr, DrSc., PRAHA

(54)

Peptidy s vlastnostmi antigenní determinanty
bílkoviny viru HPV a způsob jejich výroby

(57)

Řešení se týká peptidů s vlastnostmi antigenní determinanty H-Met-Gly-Thr-Pro-Phe-Ser-Pro-Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Pro-Thr-Gly-Pro-Val-NH₂ a jejich konjugátů s biologicky inaktivními nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, zejména latexu, spheronu a polystyrenu nebo s aktivovanými membránami. Peptidy byly připraveny syntézou v pevné fázi a prokázalo se, že je lze použít jako diagnostikum při detekci protilátek proti lidským papilomavirům typu 6 a 11.

Vynález se týká peptidu s vlastnostmi antigenní determinanty obecného vzorce I

H-Met-Gly-Thr-Pro-Phe-Ser-Pro-Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Pro-Thr-Gly-Pro-Val-NH₂ (I)

a jeho konjugátu s nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, zejména latexu, spheronu a polystyrenu nebo aktivovanými membránami, a způsobu jejich výroby.

Látky podle vynálezu jsou nové a byly u nich prokázány vlastnosti antigenních determinant proteinu kodovaného L-2 oblastí genomů HPV-6 a HPV-11. Peptidy mohou sloužit jako vhodné diagnostikum pro průkaz protilátek u osob infikovaných těmito typy HPV.

K průkazu imunitních reakcí proti HPV byly v minulosti použity různé serologické techniky jako např. imunoagregační test (Almeida J. D., a P. Goffe, 1965, Lancet ii, 1205 až 1207) difuze v agarovém gelu (Cubie H. A., 1972, J. Hyg. 70, 677 až 690), fixace komplementu (Genver J. 1971, Acta Dermato-venereol 51, 365 až 373), radioimunostanovení (Hefton J. M., M. Eisinger 1977, J. Gen. Virol. 38, 179 až 182) a neutralizační test (Kienzler J. L. a spol. 1983, Br. J. Dermatol. 108, 665 až 672). Vzhledem k tomu, že HPV nelze kultivovat in vitro, že tedy není možné k přípravě antigenu použít klasické způsoby přípravy virových antigenů na tkáňových kulturách, jediným zdrojem antigenů byly až donedávka přirozené virové leze. Možnosti získat preparativní množství virových antigenů jsou však omezené. Některé leze vyvolané HPV, jako např. kondyloma accuminatum, obsahující jen velmi málo virových částí a v některých zhoubných nádorech spojuvaných s HPV jsou prokazatelné pouze virové nukleové kyseliny.

Uvedené nedostatky řeší způsob podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že používá k detekci protilátek vytvořených po infekci viry HPV 6 a HPV 11 syntetický peptid s vlastnostmi antigenní determinanty proteinu kodovaného L-2 oblastí genomu.

Látky podle vynálezu byly syntetizovány 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 jednotlivých aminokyselin se vystaví peptidický řetězec. Potom se získaný peptid acidolyticky odštěpí z polymerního nosiče a přečistí se.

Peptidy obecného vzorce I byly připraveny Merrifieldovou metodou syntézy peptidu v pevné fázi. Jako polymerní nosič byl použit polystyren síťovaný divinylbenzenem, s výhodou jedním procentem, s funkčními skupinami chlormetylovými nebo benzhydrylaminovými. N-alfa-aminoskupiny byly chráněny acidolabilní chránicí skupinou, s výhodou Boc skupinou, její odštěpování v jednotlivých fázích syntézy 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. Peptidy byly charakterizovány aminokyselinovou analýzou a jejich čistota byla ověřena chromatografickými a elektroforetickými metodami.

Aminokyselinová sekvence peptidu I byla odvozena z oblasti L-2 genomu HPV 6, který je homologní a HPV 11 a zároveň zahrnuje antigenní determinantu proteinu kodovaného genomem L-2. Peptidy mohou sloužit pro diagnostické účely, což bylo prokázáno autory vynálezu a pro produkci monodeterminantních protilátek.

Základem diagnostické reakce je vytvoření komplexu syntetických peptidů podle vynálezu s protilátkami vytvořenými v organismu, který byl infikován virem HPV 6 nebo

HPV 11. Při praktickém použití lze s výhodou použít např. enzymoimunologický test (ELISA). Syntetický peptid byl konjugován s bílkovinným nosičem (např. BSA) pomocí glutaraldehydu a po navázání antigenu na mikrotitrační ELISA destičku, opláchnutí pufrům a vysycení neobsazených míst 1% roztokem BSA byla aplikována vyšetřovaná séra. Po inkubaci a promytí pufrům byla přidána prasečí protilátka proti lidskému IgG značená peroxidázou. Pokud byly ve vyšetřovaném séru protilátky proti zvolené antigenní determinantě viru HPV 6 či HPV 11, peroxidázou značená protilátka se navázala na komplex antigen-lidská protilátka. Množství navázaných protilátek je úměrné jejich koncentraci ve vyšetřovaném séru. Detekce peroxidázové aktivity se provádí oxidací o-fenylendiamiinu kyslíkem, který se uvolňuje z peroxidu přítomného v substrátovém roztoku. Hodnoty absorbancí u pozitivních vzorků se pohybovaly od O.D. 1,2 AV do 2,612 A.V. (74 vyšetřených vzorků), hodnoty pro negativní séra nepřevýšily 0,5 A.V. (250 stanovení).

Získané výsledky ukazují, že peptidy podle vynálezu je možno použít jako diagnostika k průkazu specifických protilátek a přicházejí v úvahu při produkci monodeterminantních protilátek.

Následující příklady provedení látky a způsob podle vynálezu pouze dokládají, ale nikterak neomezuji.

Příklad 1

Do průtokového reaktoru (vnitřní objem 1 ml) bylo umístěno 100 mg benzhydrylamínové kopoly (styren-1% divinylbenzen)ové pryskyřice (obsah aminoskupin 0,4 meg/g). Syntéza byla provedena na manuálně ovládaném syntetizátoru vlastní konstrukce, autorské osvědčení č. 262081, kontinuální průtokovou metodou, viz autorské osvědčení č. 255089. Jeden syntetický cyklus obsahoval tyto kroky: (1) štěpení Boc chránících skupin, 40% TFA v DCM, 30 min (3 min promývat, 27 min v klidu); (2) promývání, DCM, do slabě kyselého efluentu, (kontrolováno navlhčeným pH papírkem); (3) neutralizace, 5% N-ethyl-N, N-diisopropylamin v chloroformu, 3 min; (4) promývání, DMF, do neutrálního efluentu; (5) kondenzace: chráněná aminokyselina, 0,4 meg v DCM (nebo DCM : DMF, 4 : 1, je-li třeba), přidat HOBt, 0,4 meg v DMF, přidat DCC, 0,4 meg v DCM, 30 min při 20 °C, odfiltrovat N, N-dicyklohexylmočovinu, promýt DCM, odpařit DCM za sníženého tlaku (t 25 °C), naředit DMF, zfiltrovat, promýt DMF, doplnit DMF na koncentraci 0,2M, nastříknout do průtokového reaktoru, ponechat reagovat do neutrální reakce na ninhydrin; (6) promývání, DCM, 5 min. Průtok během promývacích cyklů byl cca 20 až 30 ml/min, přetlak inertního plynu 20 až 50 kPa. Syntéza byla ukončena odštěpením Boc chránící skupiny z poslední kondenzované aminokyseliny (krok (1)) a peptidyl-pryskyřice byla promyta DCM a metanolem a vysušena proudem dusíku. Surový peptid byl získán po štěpení peptidyl-pryskyřice kapalným fluorovodíkem. Po odstranění HF byl produkt a pryskyřice suspendovány v etylacetátu, zfiltrovány, promyty etylacetátem a produkt extrahován do 20% kyseliny octové a lyofilizován. Výtěžek 49,5 mg. Surový peptid byl čištěn na koloně (2,6 x 13 cm) obsahující jako stacionární fázi silikagel potažený hydrofóbními uhlíkatými řetězci, mobilní fáze 50 % metanolu, 50 % vody obsahující 0,1 % TFA. Frakce obsahující homogenní produkt byly spojeny a lyofilizovány. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena při analytické HPCL (Rt 3,3 min, mobilní fáze 60 % MeOH, 40 % vody obsahující 0,1% TFA), chromatografií na tenké vrstvě (Rf 0,21 v soustavě n-butanol : kyselina octová : voda - 4 : 1 : 1) a elektroforézou na papíru při pH 2,5. Výtěžek 18,2 mg H-Met-Gly-Thr-Pro-Phe-Ser-Pro-Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Pro-Thr-Gly-Pro-Val-NH₂.

Příklad 2

K roztoku 26 mg (0,37 μ M) BSA ve 2,6 ml fyziologického roztoku bylo přidáno 6,3 mg (3,7 μ M - 10ti nás. molární přebytek) peptidu v 1,3 ml fyziologického roztoku. Ke směsi bylo za intenzivního míchání při laboratorní teplotě pomalu přikapáno 0,39

ml 1% roztoku glutaraldehydu a směs byla ponechána při laboratorní teplotě v temnu 16 hodin. Potom byl roztok přenesen do dializačního střeva a dialyzován 4 hodiny proti 0.5 M roztoku etanolaminu pH 7.2 a přes noc proti fyziologickému roztoku s 0.05% azidem sodným. V roztoku konjugátu byla stanovena koncentrace bílkovin a po rozplnění byl uložen při -20°C .

Příklad 3

Polystyrenová mikrotitrační destička byla inkubována s 100 μl roztoku konjugátu syntetického peptidu s BSA v uhličitanovém pufru (0.015 M Na_2CO_3 , 0.03 M NaHCO_3 , 0.003 M NaN_3 , pH = 9.6) 16 h při 37°C (koncentrace antigenu 0.0625 μg /jamku). Vysycení volných míst v jamce bylo provedeno inkubací se 100 μl 1% roztoku kravského sérového albuminu v uhličitanovém pufru 1 h při 20°C . Jamky byly vypláchnuty fosfátovým puftrem (0.034 M NaCl , 0.002 M KCl , 0.001 M KH_2PO_4 , 0.006 M Na_2HPO_4 , 2 H_2O , pH = 7.2) s přidavkem 0.1% neionogenního detergentu (Tritonu X-100). Potom bylo do jamek aplikováno 100 μl vyšetřovaného séra ředěného fosfátovým puftrem pH = 7.2, s 0.1% přidavkem neiontového detergentu (Triton X-100) a obohaceném 10 % bovinního sera (BS). Po inkubaci (20°C , 60 min) a opláchnutí fosfátovým puftrem pH 7.2 s 0.1% detergentem bylo do jamek přidáno 100 μl roztoku peroxidázou značené prasečí protilátky proti lidskému imunoglobulinu G ve fosfátovém pufru pH = 7.2, s 0.1% neiontového detergentu (Triton X-100) a obohaceném 10 % BS. Po inkubaci (20°C , 60 min) a promytí 5krát fosfátovým puftrem, 1krát citrátovým puftrem byla provedena detekce peroxidázové aktivity přidáním 100 μl 0.04% roztoku α -fenylendiaminu v citrátovém pufru (0.066 M Na_2HPO_4 · 2 H_2O a 0.034 M roztoku kyseliny citronové o pH = 5.0) a obohaceném 0.006 % H_2O_2 . Reakce byla ukončena přidáním 100 μl 2 M kyseliny sírové a zbarvení vyhodnocené kvantitativně při 492 nm. Peptidu s vlastnostmi antigenních determinant proteinu kodovaného L-2 oblastí genomu HPV-6 a 11 bylo použito k otestování více než 400 lidských sér. Zatímco méně než 15 % sér od zdravých jedinců vykazovalo přítomnost specifických protilátek, většina sér (52 %) od pacientů s condyloma accuminatum (onemocnění způsobené papillomaviry typu 6 a 11) s antigenem specificky reagovalo. Příprava syntetického peptidu podle vynálezu umožňuje zavedení typově specifického serologického testu nezbytného při studiu úlohy papillomavirů v patogeneze lidských onemocnění.

Vysvětlivky ke zkratkám použitým v textu:

HPV	lidský papillomavirus
ELISA	enzymoimunologický test
BSA	bovinní sérum albumin
O.D.	optická densita
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TFA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormetan
MeOH	metanol
TEMSA	kyselina trigluormetansulfonová
HOBt	N-hydroxybenzotriazol
TEA	triethylamin
Boc	t-butyloxykarbonyl
Tos	p-toluensulfonyl
Bzl	benzyl
For	formyl

DCC	N, N'- dicyklohexylkarbodiimid
HF	fluorovodík
Ala	alanin
Gly	glycin
Leu	leucin
Met	methionin
Pro	prolin
Phe	fenyalanin
Ser	serin
Thr	threonin
Val	valin

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Peptidy s vlastnostmi antigenní determinanty bílkoviny viru HPV vzorce I

H-Met-Gly-Thr-Pro-Phe-Ser-Pro-Val-Thr-Pro-Ala-Leu-Pro-Thr-Gly-Pro-Val-NH₂ (I)

a jejich konjugátů s biologicky inaktivními nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, zejména latexu, spheronu a polystyrenu nebo s aktivovanými membránami.

2. Způsob výroby peptidů vzorce I podle bodu 1, vyznačující se tím; že se na polymerní nosič polystyrenového typu s chlormetylovými nebo benzhydrylaminovými skupinami zakotví karboxyterminální aminokyselina a postupnou kondenzací se vystaví peptidický řetězec, načež se získaný peptid acidolyticky odštěpí z polymerního nosiče, přečistí se a naváže se na makromolekulární bílkovinný nosič, s výhodou bovinní sérový albumin, pomocí glutaraldehydu nebo rozpustného karbodiimidu.