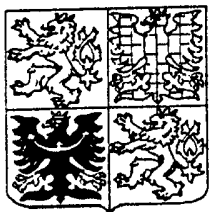


ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(12)

(22) 07.12.94
(32) 08.12.93
(31) 93/307657
(33) JP
(40) 16.10.96

(21) 1623-96

(13) A3

6(51)

C 07 K 14/785

A 61 K 38/17

(71) TOKYO TANABE COMPANY LIMITED, Tokyo, JP;

(72) Takei Tsunetomo, Tokyo, JP;
Ohtsubo Eiji, Tokyo, JP;
Ohkawa Hiroshi, Tokyo, JP;

(54) Syntetické peptidy, způsob jejich výroby a
farmaceutický prostředek s jejich obsahem

(57) Syntetické peptidy, obsahující následující specifickou sekvenci Xaa-Pro-Val-Xbb-Xcc-Lys-Arg-W (kde Xaa je buď chybějící nebo představuje Cys či Ser, Xbb představuje His nebo Asn, Xcc představuje Leu nebo Ile a W představuje hydrofobní peptidovou část), meziprodukt pro výrobu peptidu, způsob výroby peptidu, plicní povrchově aktivní látka, obsahující peptid a směs lipidů a farmaceutický prostředek vůči syndromu nedostatečnosti respiračního systému s obsahem povrchově aktivní látky jako aktivní složky. Peptidy jsou snadno izolovatelné a vhodné pro výrobu ve velkém objemu. Vzhledem ke snadné rozpustnosti v methanolu a podobných rozpouštědlech mohou být snadno smíseny se směsí lipidů a hodí se pro přípravu plicní povrchově aktivní látky. Plicní povrchově aktivní látka je dobře suspendovatelná a má vysokou povrchovou aktivitu, proto se hodí jako farmaceutický prostředek vůči syndromu nedostatečnosti respiračního systému.

č.j.	57792
došlo	08. VIII 96
UŘAD PRŮMYŠLOVÉHO VLASTNICTVÍ	
Příl.	

Syntetické peptidy, způsob jejich výroby a farmaceutický prostředek s jejich obsahem

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká nových syntetických peptidů. Přesněji uvedeno, týká se syntetických peptidů, které při smísení se směsí lipidů vykazují účinnou povrchovou aktivitu. Vynález se dále týká meziprojektu pro výrobu takových syntetických peptidů, způsobu výroby takových syntetických peptidů, plicní povrchově aktivní látky s obsahem peptidu a směsi lipidů a léčebného prostředku vůči syndromu nedostatečnosti respiračního systému, který uvedenou plicní povrchově aktivní látku obsahuje jako aktivní složku.

Dosavadní stav techniky

Syndrom nedostatečnosti respiračního systému je onemocnění, při němž je snížena povrchová aktivita alveolárního povrchu nepřítomností plicní povrchově aktivní látky. To vede ke kolapsu alveol (plicních sklípků), který má za následek vážné respirační poruchy. Tento syndrom se často vyskytuje u nezralých novorozenců a vykazuje vysokou míru úmrtnosti. Je známo, že plicní povrchově aktivní prostředky jsou vysoce účinné vůči novorozeneckému syndromu nedostatečnosti respiračního systému.

Dospělí jsou rovněž postihováni hypoxémií (nedostatkem kyslíku v krvi), způsobenou různými příčinami a je známo mnoho případů, kdy jsou na rentgenových fotografiích hrudi vidět u obou plic difusní stíny (připomínající krupičkovité usazeniny) a respirační selhání nastává i přes řízené dýchání pomocí respirátoru. Ueda se spoluautory (v knize Hiromoto Yasudy "Biosurfactants, Chapter 3: Medical Practices Using Surfactants, Section 1: Clinical Applications of Surfactants, V.

"Aspiration Pneumonia and Surfactants", str. 184, 1990, Science Forum, Co. Ltd.) popsal dva případy pneumonie (zánětu plic) u dospělých (tj. případ (1) respirační pneumonie po vdechnutí oxidů dusíku a (2) opakující se respirační pneumonii, zapříčiněnou mozkovým nádorem, působící hypoxémií a vedoucí ke zhoršení celkového stavu a respiračnímu selhání), u nichž došlo k významnému zlepšení a lidé byli zachráněni injekcí plicní povrchově aktivní látky do dýchacího traktu. Pooperační respirační selhání může nastat po operacích srdce, neboť během operace je dýchání zastaveno. Účinek plicních povrchově aktivních látek na podobné respirační selhání byl rovněž popsán (Shuichi Nosaka se spol., Journal of Japanese Medical Society for Biological Interface, díl 22, str. 66, 1991).

Substituční léčba podávání plicních povrchově aktivních látek z vnějška a cestou dýchacího traktu tedy vykazuje významné léčebné účinky u syndromu nedostatečnosti respiračního systému.

V nedávné době byly nalezeny 4 typy apoproteinů, které jsou jedinečné jako plicní povrchově aktivní látky u savců. Jsou to povrchově aktivní apoprotein A a povrchově aktivní apoprotein D, které jsou hydrofilní, a povrchově aktivní apoprotein B (dále bude označován jako SP-B) a povrchově aktivní apoprotein C (dále jako SP-C), které jsou hydrofobní (Toyoaki Akino a Yoshio Kuroki, "Respiration and Circulation", díl 38, č. 18, str. 722, 1990; Hiromoto Yasuda se spol., "Biosurfactants: Chapter 2. The Biochemistry of Surfactants - Surfactants and Apoproteins", str. 131, 1990, Science Forum, Co. Ltd.).

SP-C (sekvence č. 1), získaný z lidských plic, se skládá z 35 aminokyselin a je vysoce hydrofobním apoproteinem, bohatým na valin a jako N-koncovou aminokyselinu má fenylalanin. Apoproteiny SP-C, izolované z hovězích plic (sekvence č. 2), vepřových plic (sekvence č. 3), krysích plic a podobně se rovněž skládají z 34 až 35 aminokyselin a

ačkoli se sekvence aminokyselin na N-konci druhově liší, vykazují extrémně vysokou homologii s lidským SP-C.

Japonský patentový spis č. Hei-3-502095 rovněž uvádí, že syntetický peptid (sekvence č. 4) s níže zmíněnou sekvencí 32 aminokyselin, která je částí struktury SP-C, představuje nejmenší jednotku, vykazující vysokou povrchovou aktivitu a že směs tohoto peptidu a lipidů je účinná vůči syndromu nedostatečnosti respiračního systému. Dále uvádí, že srovnání povrchových aktivit této nejmenší peptidové jednotky a jednotky z jiného syntetického peptidu s kratší sekvencí aminokyselin ukazuje, že ztráta povrchové aktivity je způsobena nikoli ztrátou specifické aminokyseliny, ale zkrácením délky peptidového řetězce.

Část nynějších autorů vynálezu dříve zjistila, že směsi syntetického peptidu (dále zde uváděného jako TP-C), jehož struktura tvoří část struktury SP-C, a lipidů jsou účinné při léčbě syndromu nedostatečnosti respiračního systému a podali žádost o patentování tohoto předmětu (japonská patentová přihláška č. Hei-5-518188).

Vzhledem k výrobě syntetických peptidů, lze obecně říci, že s prodlužováním aminokyselinové sekvence peptidu narůstá během výroby tvorba defektních (poškozených) peptidů, obtížnějším se stávají izolace a vyčištění, zvyšuje se množství času nutného pro výrobu, obtížnější se stává i výroba ve větším objemu a podobně.

Vzhledem k zachování kvality jsou plicní povrchově aktivní prostředky často poskytovány k použití také jako práškovité (sypké) prostředky pro podávání ve formě suspenze ve fyziologickém solném roztoku. Metody, jako je přidávání suspendujícího činidla, např. mannitolu (japonský patentový spis č. Hei-1-60451), a lyofilizace při primární teplotě zamražení -1 až -10°C, byly navrženy ke zlepšení

suspendovatelnosti plicní povrchově aktivní látky. Tyto metody se však komplikovaně provádějí a bylo žádoucí vyvinout jednodušší metody výroby látek.

Prostředek plicní povrchově aktivní látky (dále uváděný jako S-35), vyráběný smísením SP-C se směsí lipidů, která obsahuje cholinový fosfoglycerid, kyselý fosfolipid a analog mastné kyseliny, má extrémně špatnou schopnost rozptýlení ve fyziologickém roztoku, což činí obtížným připravení suspenze dostatečně stejnorodé pro použití ve formě prostředku. K důvodům patří tvorba disulfidických vazeb cysteinovými zbytky v peptidu, které peptid činí velmi kohesivním (přilnavým) a vysoká hydrofobičnost samotné plicní povrchově aktivní látky.

Vzhledem k tomu, že TP-C vykazuje v obecných rozpouštědlech nízkou rozpustnost, bylo nutné k přípravě prostředku plicní povrchově aktivní látky použít kyselinu trifluoroctovou (TFA). U TP-C se tedy vyskytovaly takové problémy, jako to, že k odstranění co největšího množství TFA bylo vyžadováno mnoho času na zahuštění a vysušení a to, že suspenze plicní povrchově aktivní látky se během přípravy prostředku plicní povrchově aktivní látky stala kyselou díky obsahu zbytkové TFA.

Podstata vynálezu

Vzhledem k výše uvedenému studovali nynější autoři syntetické peptidy velice pečlivě a k vytvoření vynálezu došli při zjištění, že nové syntetické peptidy (dále zde uváděné jako "syntetické peptidy podle vynálezu"), obsahující níže zmíněnou sekvenci aminokyselin s hydrofilní peptidovou částí specifické sekvence na N-konci a hydrofobní peptidovou částí, která obsahuje zejména Leu a/nebo Nle, na C-konci, jsou snadno izolovatelné a vyčistitelné, mohou být vyráběny ve větších objemech, jsou dobře rozpustné v kyselině mravenčí, TFA,

trifluoroethanolu, dimethylsulfoxidu (DMSO), chloroformu, ve směsích chloroform-methanol, v methanolu, chlorhydrinu ethylenu a tetrahydrofuranu, a zejména vykazují významně vysokou rozpustnost v methanolu ve srovnání se syntetickým SP-C a TP-C. Autoři předkládaného vynálezu rovněž objevili, že plicní povrchově aktivní látky, připravené ze syntetických peptidů podle vynálezu a směsí lipidů, vykazují, a to i pokud jsou připraveny běžnými metodami lyofilizace, prováděnými při teplotě -20°C nebo nižší a bez přidání suspendujícího činidla, dobrou stejnoměrnou suspendovatelnost ve srovnání s S-35 nebo se syntetickou plicní povrchově aktivní látkou (uváděnou zde dále jako SF-3; japonský patentový spis č. Hei-2-87685), zahrnující pouze směs lipidů, která se skládá z cholinového fosfoglyceridu, kyselého fosfolipidu a z analogu mastné kyseliny, nebo ve srovnání s látkou (dále zde uváděnou jako S-TA; japonský patentový spis č. Sho-61-9924), obsahující kromě mastné kyseliny, také sloučeninu zahrnující fosfolipid, neutrální lipid, celkový cholesterol, cukry a nepatrná množství proteinů, přítomných v savčích plicích a již vykazujících silnou povrchovou aktivitu, která je srovnatelná s aktivitou S-35, S-TA nebo plicní povrchově aktivní látky, zahrnující TP-C a směs lipidů.

Specifická sekvence:

Xaa-Pro-Val-Xbb-Xcc-Lys-Arg-W

(aminokyselinový zbytek Xaa nemusí být přítomný, nebo představuje Cys či Ser, Xbb představuje His či Asn, Xcc představuje Leu nebo Ile a W představuje hydrofobní část).

Syntetický peptid podle vynálezu obsahuje hydrofilní peptidovou část, popsanou níže uvedenou specifickou sekvencí, na N-konci a peptidovou část, zahrnující zejména Leu a/nebo Nle, na C-konci a je syntetickým peptidem, vykazujícím silnou povrchovou aktivitu, pokud je smísen s lipidovou směsí.

Specifická sekvence:

Xaa-Pro-Val-Xbb-Xcc-Lys-Arg

(Xaa nemusí být přítomen, nebo může představovat Cys či Ser, Xbb představuje His či Asn a Xcc představuje Leu či Ile).

Ačkoli se hydrofobní peptidová část skládá z hydrofobních aminokyselin jako je Leu, Nle, Ile, Val, Phe, Nva a Trp, zahrnuje hlavně 12 či více a s výhodou 12 až 20 molekul Leu a/nebo Nle. I když se z důvodů snazšího syntetizování a podobně dává přednost tomu, aby uvedená hydrofobní peptidová část zahrnovala stejné hydrofobní aminokyseliny, může zahrnovat i vhodné sekvence molekul Leu a Nle, nebo může v dané sekvenci obsahovat 1 až 5 molekul Ile, Val, Nva, Trp a jiných hydrofobních aminokyselin.

Syntetické peptidy podle vynálezu rovněž zahrnují syntetické peptidy, vzniklé přidáním aminokyseliny nebo peptidu k N-konci a/nebo C-konci výše uvedeného syntetického peptidu. Aminokyselinou, přidávanou k N-konci, může být Cys nebo Ser. K N-konci může být dále přidán peptid o sekvenci Phe-Gly-Ile-Pro. Thiolová, nebo hydroxylová skupina výše uvedeného syntetického peptidu může být acylována mastnou kyselinou o 14 až 18 atomech uhlíku, s výhodou pak kyselinou palmitovou, nebo může být acetoamidomethylována. Peptid, přidávaný k C-konci, může mít sekvenci Gly-Ala-Leu-Leu nebo Gly-Ala-Leu-Leu-Met-Gly-Leu.

Syntetický peptid podle vynálezu může rovněž obsahovat syntetické peptidy (kromě peptidů, majících částečnou strukturu přírodního SP-C), které obsahují peptidovou skupinu s dobrou hydrofilností a vykazují silné povrchové aktivity při smísení se směsí lipidů, a to i během přidání, odstranění a náhrady (substituce) jedné nebo více z aminokyselin, které obsahují.

Syntetické peptidy podle vynálezu mohou být vyráběny chemickými metodami nebo metodami genetického inženýrství, i když při izolaci a čištění se dává přednost metodám chemickým.

Chemické metody výroby syntetických peptidů podle vynálezu zahrnují metody postupného prodlužování po krocích a metody kondenzace fragmentů, obsahující metody syntézy v kapalně fázi nebo v pevné fázi, jako jsou azidové metody, metody kyselého chloridu, metody kyselého anhydridu, metody směsného kyselého anhydridu, DCC metody, metody aktivovaného esteru (metoda p-nitrofenolového esteru, p-hydroxysukcinimidového esteru, karboimidazolová metoda a pod.), oxidačně-redukční metody a metody aktivace DCC.

Vynález rovněž poskytuje metodu kondenzace fragmentů pro výrobu syntetických peptidů podle vynálezu, při níž hydrofilní peptidová skupina s chráněným N-koncem a chráněnými funkčními vedlejšími řetězci slouží jako meziprodukt výroby.

Ve srovnání s metodou postupného prodlužování po jednotlivých krocích umožňuje metoda kondenzace fragmentů snazší vyčištění cílové látky, je vhodnější pro syntézu ve větším objemu a je charakteristická tím, že lze předcházet ztrátám, způsobeným neočekávanými chybami. Syntetické peptidy podle vynálezu mohou být vyráběny kondenzací hydrofobní části s dříve připravenou hydrofilní peptidovou částí s chráněným N-koncem a chráněnými funkčními vedlejšími řetězci metodami syntézy v kapalně nebo v pevné fázi. Chránicí skupiny N-konce a funkčních vedlejších řetězců nejsou konkrétně omezeny, až na to, že jsou chránicími skupinami, používanými v obvyklé syntéze peptidů. 9-fluorenylmethyloxykarbonylová skupina (Fmoc), 2-chlorobenzyloxykarbonylová skupina (2-CLZ) nebo t-butyloxykarbonylová skupina (Boc) mohou být použity jako chránicí skupiny pro

koncovou aminokyselinovou skupinu, Fmoc, Boc nebo karbobenzoxyskupina (Z) či tosylová skupina (Tos) mohou být použity jako chránící skupiny pro Lys; Trt, Fmoc, Boc, Dnp, Bom, Bzl či Tos mohou být použity jako chránící skupiny pro His; a Mtr, Pmc, Mts nebo Tos mohou být použity jako chránící skupiny pro Arg. K peptidům, kterých lze použít jako meziprojektu pro výrobu syntetických peptidů podle vynálezu, tedy patří Fmoc-Pro-Val-His(Trt)-Leu-Lys(Boc)-Arg(Mtr), Fmoc-Pro-Val-Asn-Leu-Lys(Boc)-Arg(Mtr) a Fmoc-Pro-Val-Asn-Ile-Lys(Boc)-Arg(Mtr).

Plicní povrchově aktivní látka (zde označovaná jako "povrchově aktivní látka podle vynálezu") může být vyráběna smísením syntetického peptidu podle vynálezu se směsí lipidů, skládající se z cholinového fosfoglyceridu, kyselého fosfolipidu a analogu mastné kyseliny.

Je vhodné určit poměrné složení tak, že hmotnostní poměry každé z těchto složek vzhledem k celkové suché hmotnosti konečného produktu činí 0,1 až 5,0 % (hm./hm.) pro syntetický peptid, 50,6 až 80,5 % (hm./hm.) pro cholinový fosfoglycerid, 4,5 až 37,6 % (hm./hm.) pro kyselý fosfolipid a 4,6 až 24,6 % (hm./hm.) pro analog mastné kyseliny.

Příklady cholinových fosfoglyceridů, které mohou být vhodně použity v povrchově aktivní látce podle vynálezu, zahrnují 1,2-diacylglycero-(3)-fosfocholin jako 1,2-dipalmitoylglycero-3-fosfocholin (dipalmitoylfosfatidylcholin), 1,2-distearoylglycero-(3)-fosfocholin, 1-palmitoyl-2-stearoylglycero-(3)-fosfocholin a 1-stearoyl-2-palmitoylglycero-(3)-fosfocholin a pod.; 1-alkyl-2-acylglycero-(3)-fosfocholin jako 1-hexadecyl-2-palmitoylglycero-(3)-fosfocholin a 1-oktadecyl-2-palmitoylglycero-(3)-fosfocholin a pod.; a 1,2-dialkylglycero-(3)-fosfocholin, jako 1,2-dihexadecylglycero-(3)-fosfocholin a podobně. I když u výše uvedených sloučenin existují optické isomery na bázi druhého uhlíku glycerolového zbytku, pro

povrchově aktivní látku podle vynálezu může být využita kterákoli z D-, L- či DL forem. Kromě jednoduchých cholinových fosfoglyceridových sloučenin uvedených výše mohou být jako cholinové fosfoglyceridy použity i směsi dvou nebo více rozdílných 1,2-diacylglycero-(3)-fosfocholinů s acylovými skupinami, s výhodou se dvěmi nasycenými acylovými skupinami, s 12 až 24 atomy uhlíku, nebo směsi takových směsí s výše uvedenými jednoduchými sloučeninami.

Příklady vhodných kyselých fosfolipidů zahrnují kyselinu 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosforečnou (L- α -fosfatidovou kyselinu), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-L-serin (fosfatidylserin), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (fosfatidylglycerol) a 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-(1)-L-myoinositol (fosfatidylinositol). První a druhá poloha těchto sloučenin může být substituována buď stejnou acylovou skupinou, nebo různými acylovými skupinami. Přednost se dává tomu, aby acylová skupina měla 12 až 24 atomů uhlíku.

K příkladům vhodných analogů mastných kyselin patří volné mastné kyseliny, sole alkalického kovu odvozené od mastných kyselin, alkylestery mastných kyselin, glycerinové estery mastných kyselin a amidy mastných kyselin, stejně jako směsi, zahrnující dvě či více z výše uvedených sloučenin a alkoholy a aminy, odvozené od mastných kyselin.

V tomto popisu zahrnuje výraz "analogy mastných kyselin" výše uvedené alkoholy s dlouhým alifatickým řetězcem (odvozené od mastných kyselin) a alifatické aminy.

Jako volné mastné kyseliny mohou být použity kyselina myristová, palmitová či stearová, i když přednost se dává kyselině palmitové.

Jako sůl alkalického kovu, odvozené od mastné kyseliny, mohou

být použity sodné sole, draselné sole, hořečnaté sole a vápenaté sole výše uvedených volných mastných kyselin, i když přednost se dává palmitátu sodnému. Jako alkylestery mastné kyseliny mohou být použity estery nižšího alkylu s 1 až 4 atomy uhlíku, i když přednost se dává ethylpalmitátu. Monoglycerinové estery mohou být použity jako glycerinové estery mastné kyseliny, přednost se dává monopalmitinu.

Jako alkoholy s dlouhým alifatickým řetězcem mohou být použity alkoholy s 14 až 18 atomy uhlíku, přednost se pak dává hexadecylalkoholu. Jako alifatické aminy mohou být použity aminy se 14 až 18 atomy uhlíku, přednost se dává hexadecylaminu.

Výše uvedené cholinové fosfoglyceridy, kyselé fosfolipidy a analogy mastných kyselin mohou být produkty, izolovanými z rostlin či živočichů, polosyntetickými produkty či syntetickými chemickými produkty a použity mohou být komerčně dostupné produkty takových látek.

Povrchově aktivní látka podle vynálezu může být vyráběna sušením a ztužením (ztuhnutím) za sníženého tlaku směsi roztoků peptidu podle vynálezu a výše uvedené směsi lipidů a suspendováním takto získaného zbytku v kapalině vhodné pro suspendování a poté lyofilizací.

K příkladům rozpouštědel, kterých lze použít k přípravě roztoku peptidu podle vynálezu, patří kyselina mravenčí, TFA, trifluoroethanol, DMSO, směs chloroform-methanol, chloroform, methanol, ethylenchlorhydrin a tetrahydrofuran.

K příkladům, kterých lze použít pro přípravu roztoku směsi lipidů, patří chloroform a směs chloroformu a methanolu (1:2 - 5:1, obj./obj.).

K příkladům kapaliny vhodné pro suspendování patří voda a směs voda-ethanol (4:1 - 20:1, obj./obj.), i když přednost se dává směsím voda-ethanol. Suspendování se provádí po dobu 5 až 60 minut a lépe po dobu 15 až 30 minut při teplotě 30 - 60°C, s výhodou pak 40 - 50°C.

Povrchově aktivní látka, vyrobená tímto způsobem, nevyhnutelně obsahuje malé množství zbytkové vody. Přednost se však dává vysoušení povrchově aktivní látky až k dosažení hmotnostního poměru zbytkové vody 5,0 % (hm./hm.) anebo méně vzhledem k celkové hmotnosti. Pokud je povrchově aktivní látka vysušena na tuto úroveň, stane se v případě použití směsí voda-ethanol ethanolový zbytek nezměřitelným (nedetegovatelným).

Suché práškové prostředky povrchově aktivní látky podle vynálezu mohou být stejnoměrně suspendovány a rozptýleny v roztoku s vhodnou fyziologickou koncentrací sole jednomocného nebo dvojmocného kovu, například s 0,9% chloridem sodným či 1,5 mmol.l⁻¹ chloridem vápenatým, nebo ve fyziologickém roztoku pufru s obsahem takových solí za použití protřepávání v ruce nebo mixéru o různých rychlostech či pomocí přístroje, vytvářejícího ultrazvuk.

Nyní budou popsány povrchová aktivita, suspendovatelnost a farmakologické vlastnosti takto vyráběné povrchově aktivní látky podle vynálezu.

(I) Povrchová aktivita

(1) Efekt snížení povrchového napětí

Účinky snižující povrchové napětí byly měřeny metodou Tanaky a spol. (Journal of Japanese Medical Society for Biological Interface 13 (2), 87, 1982).

Suspenze povrchově aktivní látky podle vynálezu byla nakapána do fyziologického roztoku (s plochou povrchu $54,0 \text{ cm}^2$) tak, že na 1 cm^2 připadalo $1,0 - 2,0 \text{ } \mu\text{g}$ povrchově aktivní látky podle vynálezu. Uvedená plocha povrchu byla stlačována a ponechána expandovat v rozmezí $54,0 - 21,6 \text{ cm}^2$ v čase od 2 do 5 minut a při 37°C bylo nepřetržitě měřeno povrchové napětí Wilhelmyho povrchovým rovnovážným zařízením (vyrobeným firmou Kyowa Interface Science Co. Ltd.). Maximální povrchová napětí činila $24,7 - 34,1 \text{ dyn/cm}$ ($= 24,7 \cdot 10^{-3}$ až $34,1 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$) a minimální povrchová napětí činila $0,2 - 8,7 \text{ dyn/cm}$ ($= 0,2 \cdot 10^{-3}$ až $8,7 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$), což ukazuje, že se schopnost snižovat povrchové napětí, pozorovaná u povrchově aktivní látky podle vynálezu, projevila snížením povrchové napětí fyziologického roztoku.

Výsledkem měření schopnosti snížit povrchové napětí SF-3 stejnou metodou byla maximální povrchová napětí $26,8$ až $50,3 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-1}$ a minimální povrchová napětí $1,0$ až $13,5 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$.

Povrchové napětí samotného fyziologického roztoku při 37°C činilo $70,5 \cdot 10^{-3} \text{ N/m}$.

(2) Schopnost rozprostřít se na rozhraní plynu a kapaliny

Suspenze povrchově aktivní látky podle vynálezu byla nakapána na povrch fyziologického roztoku tak, že na 1 cm^2 fyziologického roztoku připadalo $0,8 - 1,5 \text{ } \mu\text{g}$ povrchově aktivní látky a změny povrchového napětí byly metodou svislé plotny měřeny v závislosti na čase od bodu bezprostředně po nakapání suspenze. Teplota měření činila 37°C .

Rovnovážný stav (ekvilibrace) odpovídá době, nutné k tomu, aby povrchové napětí dosáhlo od bodu bezprostředně po nakapání stálé

hodnoty a hodnota, dosažená právě v této době, je nazývána rovnovážné povrchové napětí.

Povrchově aktivní látka podle vynálezu vytvořila na rozhraní plynu a kapaliny film v krátké době 30 - 60 sekund a snížila povrchové napětí na $26,7$ až $34,3 \times 10^{-3}$ N/m.

Měření schopnosti SF-3 rozprostřít se na povrchu rozhraní plyn-kapalina, prováděná stejnou metodou, ukázala, že povrchové napětí činilo po 120 sekundách $38,1$ až $52,9 \times 10^{-3}$ N/m.

To ukazuje, že se povrchově aktivní látka podle vynálezu rychle rozprostře na rozhraní plyn-kapalina a rychle snižuje povrchové napětí.

(3) Efekt adsorpce na rozhraní plyn-kapalina

Připraveny byly suspenze fyziologického roztoku, obsahující $0,2$ až $1,0$ mg povrchově aktivní látky podle vynálezu na 1 ml při 37°C a měřena byla rychlost adsorpce suspendovaných povrchově aktivních látek podle vynálezu na rozhraní plyn-kapalina fyziologického roztoku.

Efekt adsorpce byl měřen metodou Kinga a spol. (American Journal of Physiology 223, 715, 1972).

Suspenze byla při ní injikována na dno teflonového tanku o průměru 5 cm, obsahujícího fyziologický roztok, který byl míchaný magnetickým míchadlem. Efekt adsorpce byl stanovován ze změn povrchového napětí po zastavení míchání.

Povrchově aktivní látka podle vynálezu snížila povrchové napětí na $28,3$ až $36,8 \times 10^{-3}$ N/m ve 30 až 100 sekundách po skončení míchání a poté zůstalo povrchové napětí konstantní.

To ukazuje, že se povrchově aktivní látky podle vynálezu, v podmínkách suspenze, vznášely a adsorbovaly na rozhraní plyn-kapalina během 30 až 100 sekund a vytvořily film o silné povrchové aktivitě.

Při měření stejnou metodou SF-3 vykázal dosažení konstantních povrchových napětí od 42,2 do 58,3 x 10⁻³ N/m během 150 či více sekund.

To ukazuje, že efekt adsorpce SF-3 na rozhraní plyn-kapalina je nižší než tentýž efekt u povrchově aktivních látek podle vynálezu a že povrchově aktivní látka podle vynálezu vykazuje silnou schopnost podporovat povrchovou adsorpci.

(II) Schopnost suspendování

Testy suspendovatelnosti plicní povrchově aktivní látky byly prováděny podle metody, uvedené ve spisu japonského užitého vzoru č. Hei-4-76965.

Suspendovatelnost byla tedy stanovována z efektivit rozptýlu (dispergování) ve specifických časech po začátku provádění suspendování a z maxima velikosti rozptýlené částice 2 minuty po začátku suspendování.

Testy efektivit rozptýlení byly prováděny následovně. 60 mg každé z plicních povrchově aktivních látek bylo rozděleno do zkumavek o objemu 20 ml. Do každé z těchto zkumavek pak byly přidány 2 ml fyziologického roztoku a zkumavky byly umístěny do protřepávačky typu Iwaki KM Shaker-V-S (výrobek firmy Iwaki Sangyo Co. Ltd.) a protřepávány rychlostí 270 pohybů za minutu. Stav rozptýlu každého vzorku byl vizuálně sledován zvětšovacím sklem každých 30 sekund

během prvních 2 minut po začátku protřepávání, každou minutu v rozmezí 2 až 4 minut po začátku protřepávání a každých 10 minut v době po 4. minutě od začátku protřepávání.

Stav suspenze byl hodnocen v každém ze stanovených časů dvěma osobami, z nichž každá hodnotila 10 vzorků. Vzorky byly považovány za suspendované, pokud ve zkumavkách nebyly malé kočky hmoty a pokud byl prostředek rozptýlen ve fyziologickém roztoku stejnoměrně a vytvářel bílou, soudržnou suspenzi.

Efektivita rozptylu byly stanovovány každou osobou ve všech určených časech jako procentní množství vzorků s dokončeným suspendováním vzhledem k celkovému počtu (10 zkumavek) vzorků a byly vyjádřeny jako průměry hodnot, stanovených dvěma osobami.

Maximální velikosti rozptýlených částic byly měřeny následovně. 60 mg každé z plicních povrchově aktivních látek bylo rozděleno do zkumavek o objemu 20 ml. Pak byly do každé zkumavky přidány 2 ml fyziologického roztoku a zkumavky byly nepřetržitě protřepávány 2 minuty za stejných podmínek protřepávání, jako byly popsány výše. Pod mikroskopem pak byly vyhledávány největší částice v suspenzi a jejich průměr byl měřen pomocí odpichovátko. Bylo zjištěno, že povrchově aktivní látky podle vynálezu byly většinou suspendovány během 2 minut a jejich maximální velikosti částic činily 0,8 mm nebo méně, což ukazuje na dobrou suspendovatelnost.

(III) Farmakologické vlastnosti

(1) Akutní toxicita

Akutní toxicity povrchově aktivních látek podle vynálezu byly testovány za použití 5 týdnů starých myších samců kmene ICR a

potkanů albínů kmene Wistar. Orální dávky LD_{50} a peritoneální dávky LD_{50} činily u myši 2,4 - 10,0 g/kg a 1,0 - 5,0 g/kg, zatímco u potkanů albínů činily 1,5 - 5,0 g/kg a 1,5 - 2,5 g/kg.

(2) Subakutní toxicita

Povrchově aktivní látky podle vynálezu byly podávány intraperitoneálně (do dutiny břišní) dospělým potkanům albínům kmene Wistar v denních dávkách 300 - 600 mg/kg po dobu 1 měsíce. Nenastaly žádné změny hmotnosti zvířat a při histologických pozorováních pouhým okem nebyly zjištěny žádné abnormality.

(3) Efekt uchování alveolárního objemu

Nezralé králičí zárodky obtížně produkují jakoukoli plicní povrchově aktivní látku v gestační periodě (době těhotenství) 27 dnů a jsou ve stavu nedostatku plicní povrchově aktivní látky. Používají se tedy jako modelová zvířata ke studiu novorozeneckého syndromu nedostatečnosti respiračního systému.

Použito bylo pět králičích zárodků v gestační periodě 27 dnů a měřeny byly objemy alveolárního prostoru (uváděné zde jako plicní objem) za různého tlaku v dýchacích cestách při 37°C.

Krk plodu byl proříznut a vodním manometrem, připevněným na tracheu, byla v době od 5 minut po podání povrchově aktivní látky podle vynálezu do dýchacího traktu prováděna nepřetržitá měření. Tlak vzduchu v dýchacích cestách byl zvýšen na 30 cm H_2O (= 2 941,8 Pa) dvoukanálovou, nezávisle pracující vstřikovací pumpou č. 940 (vyrobenou firmou Harvard Co., USA) k rozšíření alveol. Poté byl tlak v dýchacích cestách snížen na 0 Pa k vyvolání kolapsu alveol (plicních

sklípků), zatímco byly plicní objemy měřeny při různých tlacích H_2O . Objemy plic pak byly vyjádřeny v mililitrech na 1 kg hmotnosti (ml/kg).

Povrchově aktivní látky podle vynálezu (60 mg/kg) byly podávány do dýchacího traktu přímou injekcí 0,05 - 0,5 ml suspenze fyziologického roztoku s povrchově aktivní látkou v koncentraci 1,0 až 6,0 % (hmotn./objem).

Plicní objem v okamžiku, kdy byl tlak snížen na 490,3 Pa (5 cm H_2O) ukazuje zbytkovou funkční kapacitu a čím větší je objem, tím vyšší je aktivita plicní povrchově aktivní látky.

Jako kontrola byl místo povrchově aktivní látky podle vynálezu podáván fyziologický roztok. Plicní objemy (při 490,3 Pa) nezralých králičích zárodků kontrolní skupiny činily 1 - 5 ml/kg, což ukazuje, že alveoly byly stěží rozšířené.

Zralé zárodky v gestační periodě 30 dnů měly normální hladinu plicní povrchově aktivní látky. Jejich plicní objemy (při 490,3 Pa) činily 35 - 53 ml/kg, což ukazuje odpovídající rozšíření alveol a možnost normálního dýchání.

V případech, kdy byl podáván SF-3, činily plicní objemy (při 490,3 Pa) nezralých zárodků 15 - 25 ml/kg, což ukazovalo odpovídající rozšíření alveol.

V případech, kdy byla podávána povrchově aktivní látka podle vynálezu, plicní objemy (při 490,3 Pa) činily 39 - 55 ml/kg, což ukazuje, že povrchově aktivní látka podle vynálezu zlepšuje plicní objem nezralých zárodků na normální úroveň.

Jak bylo uvedeno výše, vykazují syntetické peptidy podle vynálezu efekt (účinek) silného zvýšení povrchové aktivity lipidových směsí. Je tedy možné z povrchově aktivních látek podle vynálezu, zahrnujících syntetické peptidy podle vynálezu a směs lipidů, připravit léčebná činidla, působící proti syndromu nedostatečnosti dýchacího systému, které jsou účinné pokud se týká povrchové aktivity, možnosti uvedení do suspenze (suspendovatelnosti) a farmakologických vlastností.

Prostředky, obsahující povrchově aktivní látku podle vynálezu jako aktivní složku, mohou být rovněž používány k léčbě jiných onemocnění, vůči nimž vykazují plicní povrchově aktivní látky léčebný účinek, včetně pooperačního respiračního selhání, astmatu, bronchitidy, novorozenecké nekrotické enteritidy, žaludečních a dvanáctníkových vředů, virových respiračních onemocnění a neprůchodnosti trubic a dále mohou být používána k prevenci adheze vejcovodu, pooperační adheze orgánů a jako expektorans.

Léčebné prostředky, které poskytuje vynález, působící vůči syndromu nedostatečnosti dýchacího systému, obsahují 50 - 1000 mg povrchově aktivní látky podle vynálezu na 1 dávku pro použití u dětí a 500 až 5000 mg povrchově aktivní látky na 1 dávku pro použití u dospělých. Takové dávky účinné složky jsou připravovány jejím suspendováním ve vodě, fyziologickém roztoku nebo v pufrech a podobně, které mohou být fyziologicky tolerovány, v koncentracích od 1,0 do 10,0 % (hm./objem). Ty jsou pak používány tím způsobem, že se podávají během 72 hodin po výskytu respirační poruchy injekčně nebo rozprašováním do dýchacího traktu jednou až desítkrát. Prostředky mohou být také vdechovány samy o sobě, tedy jako práškové činidlo bez suspendování. Dávkování, způsob použití a četnost použití mohou být vhodně obměňovány v závislosti na příznacích u pacienta a souběžné léčbě.

Léčebný prostředek podle vynálezu může, pokud je to nezbytné, obsahovat takové farmaceutické pomocné látky, jako stabilizační činidlo, ochranné látky, izotonizující činidlo, pufrační činidlo, činidlo napomáhající vzniku suspenze, antioxidační činidlo a povrchově aktivní látku, nebo taková léčiva jako bronchodilatátor, protialergické činidlo, kancerostatické činidlo, protivirové činidlo, protizánětlivé činidlo a činidlo, působící proti houbovým infekcím.

Dávkování je vhodné ve formě kapaliny nebo prášku. Léčebné prostředky podle vynálezu mohou být plněny do uzavřených zásobníků, jako jsou lahvičky a ampule a chráněny jako sterilní prostředky.

Příklady provedení vynálezu

Vynález bude nyní podrobněji popsán ve vztahu k následujícím příkladům.

(I) Výroba peptidu

V dále popisovaných příkladech byla molekulová hmotnost syntetizovaného peptidu měřena hmotnostní spektrometrickou metodou ostřelování rychlými atomy (FABMS, fast atom bombardment mass spectrometry). Použitým hmotnostním analyzátozem byl JMS-S102A (JEOL Ltd.) a jako zdroj iontů cesiové dělo (10 KeV).

Příklad 1

Peptid (peptid A), označený sekvencí č. 5, byl syntetizován na povrchu fenylacetoamidomethylové (PAM) pryskyřice postupem syntézy v pevné fázi podle metody, popsané v knize "The Peptides" (editoři E. Gross a J. Meinenhofe) autorů G. Baranyho a R. Merrifielda, díl 2, str. 1-284, Academic Press, New York 1980.

Leucinový zbytek na C-konci byl přeměněn na t-butyloxykarbonyl-leucin (Boc-Leu) a navázán na PAM pryskyřici pomocí oxymethylfenylacetoamidomethylové vazby. Po navázání C-konce byla Boc-Leu-PAM pryskyřice (0,70 mol/g, 0,35 g) převedena do reakční nádoby (zásobníku) syntetizátoru (Model 990E, Beckmann Instruments, Inc.). Aminokyseliny, byly podrobeny ochrannému působení, byly poté přidány ve směru N-konce na povrch pryskyřice symetrickou anhydridovou metodou k syntéze plně chráněného peptidu, navázaného na pryskyřici přes kyslíkový atom. Při kondenzaci argininu byla ovšem vytvořena dvojná vazba za použití N,N-dicyklohexylkarbodiimid/hydroxybenzotriazolu (Connie se spol.; Chem. Ber. 103, 788-798, 1970).

N-koncová aminoskupina všech aminokyselin byla chráněna skupinou Boc a funkční vedlejší řetězce byly před použitím aminokyselin v reakci chráněny následujícími skupinami:

Arg-Tos : (tosyl)
Lys-2CLZ : (2-chlorobenzyloxykarbonyl)
Cys-4MeBzl : (4-methylbenzyl)
His-Tos : (tosyl)

Jejich kondenzační reakce byly ověřeny testováním ninhidrinovou metodou. Soustava "plně chráněný peptid-O-pryskyřice" (155 mg) byla po dobu 5 minut ponechána nabobtnat v dichlormethanu. Poté byla chránicí skupina N- α -Boc odstraněna v TFA, obsahující 1% (obj./obj.) indol a 0,1 % (obj./obj.) ethandithiol. Peptid byl dále odštěpen z pryskyřice působením bezvodého fluorovodíku (HF) (11 ml), do něhož byl přidán p-kresol (1 ml), p-thiokresol (0,2 g) a DMSO (1 ml), na soustavu "nechráněný peptid-O-pryskyřice" po dobu 60 minut při teplotě 0°C.

HF a DMSO byly oddestilovány ve vakuu při 0°C. Oddělený peptid

a pryskyřice byly trojnásobně promyty studeným diethyletherem (15 ml) a oddělený peptid byl extrahován čtyřnásobným promytím ve studené TFA (5 ml). Extrahovaná kapalina byla okamžitě zfiltrována a pro vysrážení surového peptidu byla přidána ledově studená voda (150 ml). Surový peptid byl odstřeďován při 1000 g a 0°C po dobu 30 minut a znovu získán ve formě sraženiny, která byla následně promyta diethyletherem (15 ml). Po opakovaném promytí diethyletherem, ethylacetátem a destilovanou vodou bylo získáno 84 mg peptidu A.

Tento surový peptid byl rozpuštěn v 50% vodném roztoku DMSO a vyčištěn HPLC na reverzní fázi za použití kolony μ -Bondaspheres a C8-300 ke shromáždění čistého peptidu A.

Eluce probíhala 5 minut za použití 50% vodného roztoku acetonitrilu, obsahujícího 0,1 % TFA, jako elučního činidla. Poté eluce probíhala 30 minut za použití lineárního koncentračního gradientu, tvořeného výše uvedeným elučním činidlem a 80% vodným roztokem acetonitrilu, obsahujícím 0,1 % TFA.

Přítomnost peptidu v eluátu byla sledována při 245 nm (spektrofotometrem; Japan Spectroscopic Co. Ltd. Model 870-UV) a diferenčním refraktometrem (Shimadzu Manufacturing Corporation, Model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 3837,1 (vypočítaná molekulová hmotnost: 3835,9)

Příklad 2

Peptid (peptid B) o sekvenci č. 6 byl syntetizován metodou syntézy v pevné fázi za použití multipeptidového syntetického systému v pevné fázi "Kokku-San" (firmní jméno; Kokusan Chemical Works Co.

Ltd.) a podle metody, popsané v knize "Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach" autorů E. Athertona a R.C. Shepparda (str. 25-189, Oxford University Press, Oxford) a metody Kenichi Akagiho a spol. (Chem. Pharm. Bull., 37(10), 2661-2664, 1989).

Systém "N- α -9-fluorenylmethoxykarbonyl-leucin-O-pryskyřice" (Fmoc-Leu-O-pryskyřice) (0,20 mmol/0,5 g), v němž je N- α -9-fluorenylmethoxykarbonyl-leucin (Fmoc-Leu) navázán na 4-(hydroxymethyl)-fenoxymethyl-kopolymerní (styren 1% divinylbenzen) pryskyřici, byl použit jako počáteční pryskyřice. Pryskyřice byla ponechána bobtnat 20 minut v N,N-dimethylformamidu (DMF) a pak byla čtyřnásobně promyta DMF. Přidán byl 20% piperidin v DMF a směs byla protřepána k odstranění chránících skupin. Tento krok byl k úplnému odstranění chránících skupin opakován třikrát. Následovalo trojnásobné promytí DMF, trojnásobné promytí N-methyl-2-pyrrolidonem a trojnásobné promytí opět DMF k odstranění přebytku piperidinu v pryskyřici. Přítomnost piperidinu byla kontrolována použitím pH papírku.

Poté byly přidány DMF (6 ml), Fmoc-Leu (0,5 mmol), N-hydroxybenzotriazol (0,05 mmol) a N,N'-diisopropylkarbodiimid (0,05 mmol) a směs byla protřepávána 90 minut k proběhnutí kondenzační reakce. Pak byla pryskyřice čtyřnásobně promyta DMF k eliminování přebytku reakčních činidel. Kondenzační reakce byla testována ninhydrinovou metodou.

Následovala plánovaná syntéza a aminokyseliny byly přidávány krok po kroku ve směru N-konce na povrch pryskyřice tak, aby vznikala soustava "peptid-O-pryskyřice" s N-koncem a funkčními skupinami plně chráněnými.

Kondenzační reakce k zavedení Arg, Lys, His, Pro a Cys byly prováděny dvakrát, každá po dobu 120 minut.

Poté byl k soustavě "chráněný peptid-O-pryskyřice" přidán 20% pyridin v DMF k odstranění chránicí skupiny Fmoc na N-konci. Soustava "peptid-O-pryskyřice" pak byla šestinásobně promyta DMF a rovněž šestinásobně methanolem a vysušena za sníženého tlaku. Dále byly k vysušené soustavě "peptid-O-pryskyřice" za míchání a ochlazování v ledové lázni přidány m-kresol (0,2 ml), 1,2-ethandithiol (0,5 ml), thioanisol (1,2 ml), TFA (7,5 ml) a trimethylsilylbromid (1,4 ml). Směs byla za stálého ochlazování v ledové lázni míchána 120 minut k odstranění chránicích skupin z vedlejších funkčních řetězců a k uvolnění peptidu z pryskyřice. Poté byla zfiltrována přes skleněný filtr (G3). Filtrát byl zahuštěn v odparce za sníženého tlaku na přibližně 5 ml. Pak byl k vysrážení peptidu přidán diethylether. Peptidová sraženina byla shromážděna pomocí skleněného filtru (G3), pětinaásobně promyta diethyletherem a během sušení za sníženého tlaku bylo získáno 60 mg peptidu B.

N-koncové aminoskupiny všech aminokyselin byly chráněny skupinami Fmoc a vedlejší funkční řetězce byly před použitím aminokyselin v reakci chráněny následujícími skupinami:

Arg-Mtr : (4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonyl)

Lys-Boc : (trityl)

His-Trt : (trityl)

Přibližně 100 mg surového peptidu bylo rozpuštěno v TFA (1 ml) a čtyřnásobek tohoto množství rozpouštědla mobilní fáze, tj. 10 mmol.l⁻¹ β-merkaptoethanolu v soustavě TFA-dichlormethan (5:95, obj./obj.) byl přidán k přípravě roztoku vzorku (20 mg/ml) pro čištění HPLC za použití kolony Asahipak GS-510 (7,5 x 500 mm) (firmní jméno; Asahi Chemical Industry Co. Ltd.) pro nashromáždění čistého peptidu B.

Jako eluent byl použit 10 mmol.l⁻¹ roztok β -merkapt ethanolu v soustavě TFA-dichlormethan (5:95, obj./obj.) a eluce probíhala při rychlosti toku 0,8 ml/min po dobu 80 minut. Přítomnost peptidu v eluátu byla sledována při 245 nm (spektrofotometr firmy Japan Spectroscopic Co. Ltd., model 870 - UV) a diferenčním refraktometrem (firmy Shimadzu, model RID-6A).

FABMS (M+H⁺): 3017,9 (vypočítaná molekulová hmotnost: 3016,9)

Příklad 3

Peptid (peptid C) o sekvenci č. 7 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS (M+H⁺): 3116,0 (vypočítaná molekulová hmotnost: 3115,1)

Příklad 4

Peptid (peptid D) o sekvenci č. 8 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS (M+H⁺): 2663,7 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2662,5)

Příklad 5

Peptid (peptid E) o sekvenci č. 9 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS (M+H⁺): 2211,2 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2209,9)

Příklad 6

Peptid (peptid F) o sekvenci č. 10 byl připraven stejným způsobem

jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2647,5 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2646,4)

Příklad 7

Peptid (peptid G) o sekvenci č. 11 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 3018,1 (vypočítaná molekulová hmotnost: 3016,9)

Příklad 8

Peptid (peptid H o sekvenci č. 12 byl syntetizován metodou syntézy v pevné fázi za použití systému multipetidové syntézy v pevné fázi jako v Příkladu 2.

N - α - 9 - fluorenylmethyloxykarbonyl - norleucin - O - pryskyřice (Fmoc-Nle-O-pryskyřice) (0,20 mmol/0,5 g) byla použita jako výchozí pryskyřice. Tato pryskyřice byla ponechána 20 minut bobtnat v DMF a poté byla čtyřnásobně promyta DMF. Následně byl přidán 20% piperidin v DMF a směs byla protřepávána k oddělení chránících skupin. Tato operace byla třikrát opakována k úplnému odstranění chránících skupin. Poté následovalo devítinásobné promytí DMF k odstranění přebytku piperidinu v pryskyřici. Přítomnost zbytkového piperidinu byla současně ověřována použitím pH papírku.

Pak byly přidány DMF (6 ml), Fmoc-Nle (0,5 mmol), N-hydroxybenzotriazol (0,5 mmol) a N,N'-diisopropylkarbodiimid (0,5 mmol) a směs byla protřepávána 90 minut k proběhnutí kondenzační reakce. Pryskyřice pak byla čtyřnásobně promyta DMF k eliminování

přebytku reagujících látek. Tato kondenzační reakce byla určena testem ninhydrinové metody.

Následovala plánovaná syntéza a aminokyseliny byly přidávány krok po kroku ve směru N-konce na povrch pryskyřice tak, aby vznikala soustava "peptid-O-pryskyřice" s N-koncem a funkčními skupinami plně chráněnými.

Kondenzační reakce k zavedení Arg, Lys, His, Pro a Cys byly prováděny dvakrát, každá po dobu 120 minut.

Poté byl k soustavě "chráněný peptid-O-pryskyřice" přidán 20% pyridin v DMF k odstranění chránicí skupiny Fmoc na N-konci. Soustava "peptid-O-pryskyřice" pak byla šestinásobně promyta DMF a rovněž šestinásobně methanolem a vysušena za sníženého tlaku. Dále byly k vysušené soustavě "peptid-O-pryskyřice" (100 mg) za míchání a ochlazování v ledové lázni přidány m-kresol (0,2 ml), 1,2-ethandithiol (0,5 ml), thioanisol (1,2 ml), TFA (7,5 ml) a trimethylsilylbromid (1,4 ml). Směs byla za stálého ochlazování v ledové lázni míchána 120 minut k odstranění chránících skupin z vedlejších funkčních řetězců a k uvolnění peptidu z pryskyřice. Poté byla zfiltrována přes skleněný filtr (G3). Filtrát byl zahuštěn v odparce za sníženého tlaku na přibližně 5 ml. Pak byl k vysrážení peptidu přidán diethylether. Peptidová sraženina byla shromážděna pomocí skleněného filtru (G3), pětínásobně promyta diethyletherem a během sušení za sníženého tlaku bylo získáno 65 mg peptidu H.

N-koncové aminoskupiny všech aminokyselin byly chráněny skupinami Fmoc a vedlejší funkční řetězce byly před použitím aminokyselin v reakci chráněny následujícími skupinami:

Arg-Mtr : (4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonyl)

Lys-Boc : (t-butyloxykarbonyl)

Cys-Trt : (trityl)

His-Boc : (t-butyloxykarbonyl)

Přibližně 10 mg peptidu bylo rozpuštěno v 3,0 ml směsného rozpouštědla chloroform-methanol (C/M) o poměru 2:1 (obj./obj.). Poté byl vzorek čištěn na koloně Sephadex LH-60 (2,5 cm x 90 cm), ekvilibrované směsným rozpouštědlem C/M o poměru 2:1 (obj./obj.) k získání čistého peptidu H.

Přítomnost peptidu v eluátu byla sledována při 245 nm (spektrofotometr firmy Japan Spectroscopic Co. Ltd., model 870 - UV) a difererenčním refraktometrem (firmy Shimadzu, model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 2663,6 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2662,5)

Příklad 9

Peptid (peptid I) o sekvenci č. 13 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 8.

FABMS ($M+H^+$): 2560,4 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2559,3)

Příklad 10

Peptid (peptid J) o sekvenci č. 14 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 8.

FABMS ($M+H^+$): 2663,8 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2662,5)

Příklad 11

Peptid (peptid K) o sekvenci č. 15 byl připraven stejným způsobem

jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2663,5 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2662,5)

Příklad 12

Peptid (peptid L) o sekvenci č. 16 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2503,6 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2502,4)

Příklad 13

Peptid (peptid M) o sekvenci č. 17 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2736,7 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2735,5)

Příklad 14

Peptid (peptid N) o sekvenci č. 18 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2640,4 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2639,4)

Příklad 15

Peptid (peptid O) o sekvenci č. 19 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 8.

FABMS ($M+H^+$): 2640,3 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2639,4)

Příklad 16

Fmoc-Pro-Val-His(Trt)-Leu-Lys(Boc)-Arg(Mtr)

Peptid (peptid P) uvedený v nadpisu byl syntetizován metodou syntézy v pevné fázi za použití zařízení Peptide Synthesizer System 9050 (firmy Millipore Corp.).

Jako výchozí pryskyřice bylo použito N - α - 9 - fluorenylmethyl-karbonyl - N- ω -4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonyl-arginin - O - pryskyřice (Fmoc-Arg(Mtr)-O-pryskyřice) (0,20 mmol), u níž je N - α - 9 - fluorenylmethylkarbonyl - N- ω -4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonyl-arginin (Fmoc-Arg(Mtr)) navázán na 2-methoxy-4-alkoxybenzylalkohol-pryskyřici (pryskyřice Sasrin, výrobní jméno firmy Bachem Co., Ltd.) a postupně byly na povrch pryskyřice přidávány aminokyseliny ve směru N-konce podle protokolu syntézy na zařízení Peptide Synthesizer System 9050 k syntetizování soustavy "peptid-O-pryskyřice" s plně chráněným N-koncem a funkčními skupinami.

Soustava "plně chráněný peptid-O-pryskyřice" byla pak pětinasobně promyta methanolem a vysušena za sníženého tlaku. K vysušené soustavě "peptid-O-pryskyřice" (330 mg) byl za míchání a chlazení v ledové lázni přidán roztok TFA a dichlormethanu (1:99, obj./obj.). Směs pak byla za chlazení v ledové lázni míchána 30 minut a následně míchána 90 minut při laboratorní teplotě k oddělení peptidu od pryskyřice, přičemž chránící skupiny byly na peptidu stále připojeny. Směs byla zfiltrována přes skleněný filtr (G3) a filtrát byl zahuštěn na odparce za sníženého tlaku na přibližně 5 ml. K vysrážení peptidu byl přidán diethylether, sraženina peptidu byla shromážděna na skleněném filtru, pětinasobně promyta diethyletherem a vysušena za sníženého tlaku. Získáno tak bylo 180 mg peptidu P.

Před použitím v reakci byla N-koncová aminoskupina byla u všech

aminokyselin chráněna skupinou Fmoc a vedlejší funkční řetězce byly chráněny následujícími skupinami:

Arg-Mtr : (4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonyl)

Lys-Boc : (t-butyloxykarbonyl)

His-Trt : (trityl)

K surovému peptidu byl přidán roztok TFA a dichlormethanu (1:99, obj./obj.) pro přípravu roztoku vzorku (10 mg/ml), který byl čištěn HPLC za použití kolony Asahipak GS-510 (21,5 x 500 mm) (výrobní jméno; Asahi Chemical Industry Co. Ltd.) k získání čistého peptidu P.

Roztok TFA a dichlormethanu (1:99, obj./obj.) byl použit i jako eluent a eluce byla prováděna po dobu 120 minut při rychlosti toku 8,1 ml/min. Přítomnost peptidu v eluátu byla sledována při 245 nm (spektrofotometr firmy Japan Spectroscopic Co. Ltd., model 870 - UV) a difererenčním refraktometrem (firmy Shimadzu, model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 1405,0 (vypočítaná molekulová hmotnost: 1403,8)

Příklad 17

H-Nle-(Nle)₁₄-Nle-O-pryskyřice byla syntetizována multipeptidovým syntézním systémem v pevné fázi podle Příkladu 8.

Dále, po přidavku DMF k syntetizované H-Nle-(Nle)₁₄-Nle-O-pryskyřici, byl místo Fmoc-Arg(Mtr) přidán peptid P. Přidány byly také N-hydroxybenzotriazol a N,N'-diisopropylkarbodiimid a směs byla následně protřepávána 8 hodin. Tato kondenzační reakce byla prováděna dvakrát a ověřována testem ninhidrinové metody.

Poté byly, podle metody Příkladu 8, eliminovány chránící skupiny funkčních skupin a peptid byl uvolněn z pryskyřice a čištěn HPLC k přípravě peptidu (peptidu I) o sekvenci č. 13.

FABMS ($M+H^+$): 2560,2 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2559,3)

Příklad 18

Peptid (peptid Q) s thiolovými skupinami peptidu D v acetoamidomethylované (ACM) formě byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 4 s tou výjimkou, že místo Fmoc-Cys(Trt) byl použit Fmoc-Cys(ACM).

FABMS ($M+H^+$): 2734,7 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2733,6)

Příklad 19

Peptid R byl připraven esterifikací thiolových skupin peptidu E kyselinou palmitovou způsobem podle Sarina, Virendera a Kumara (EP 0 458 167A1).

FABMS ($M+H^+$): 2448,5 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2448,3)

Srovnávací příklad 1

Peptid (peptid S) o sekvenci č. 20 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 2793,8 (vypočítaná molekulová hmotnost: 2792,6)

Srovnávací příklad 2

Peptid (peptid T) o sekvenci č. 21 byl připraven stejným způsobem jako v Příkladu 2.

FABMS ($M+H^+$): 3018,3 (vypočítaná molekulová hmotnost: 3016,9)

Analýza aminokyselinového složení syntetických peptidů podle vynálezu

Syntetické peptidy podle vynálezu byly podrobeny kyselé hydrolýze 12 N roztokem HCl-TFA (2:1, obj./obj.), obsahujícím 5% (hm./obj.) fenol, ve vakuu po dobu 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 a 72 hodin při 150°C a produkty hydrolýzy byly po odstranění kyseliny analyzovány na přístroji Shimadzu Automatic Amino Acid Analysis System (LC-9A). Trp peptidu M byl podroben alkalické hydrolýze 4,2 N vodným roztokem hydroxidu sodného po dobu 16, 24 a 32 hodin a poté neutralizován pomocí HCl a analyzován na přístroji Amino Acid Analysis System. Aminokyselinové složení, vypočítané z hodnot pro aminokyseliny, ukazujících vyšší opětné získávání při hydrolýzách od 1 do 72 hodin, udávalo hodnoty v zásadě odpovídající hodnotám, vypočteným z chemických vzorců.

Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

(Hodnoty v Tabulce platí pro případ, kdy je obsah His určen na 1,0; s výjimkou peptidů N a O, jejichž hodnoty platí pro případ, kdy Asx je určeno na 1,0)

Tabulka 1. Aminokyselinové složení syntetických peptidů podle vynálezu

p e p t i d

amino- kyselina	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	S	T
Lys	1,1	0,9	1,0	0,8	0,9	1,0	0,7	0,7	1,1	1,1	0,9	1,2	0,9	1,2	0,9	1,3	0,9
Arg	1,0	1,1	0,9	0,8	0,9	0,7	0,8	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	1,1	1,1	1,2	1,0	1,2
His	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	-	-	1,0	1,0
Gly	3,2	1,2	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	1,0
Ser	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cys	1,9	1,3	1,0	0,9	1,1	-	0,8	0,7	-	0,7	0,9	0,8	0,6	0,7	0,8	0,6	0,8
Ala	0,9	1,0	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1	0,9
Val	0,9	1,0	0,8	0,9	0,8	1,2	0,8	0,8	0,9	1,1	1,0	3,9	0,9	1,0	0,9	16,5	0,9
Leu	19,5	18,7	20,5	16,8	13,1	16,9	3,1	1,1	0,9	8,9	13,6	11,8	15,7	16,8	-	2,8	2,7
Ile	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	-	-	-	0,9	-	15,6
Met	1,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pro	2,3	1,2	0,9	0,7	0,8	0,8	0,7	0,9	0,8	0,9	1,1	0,8	1,0	1,2	1,0	1,0	1,0
Phe	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nle	-	-	-	-	-	-	15,7	15,9	16,1	7,9	-	-	-	-	15,8	-	-
Nva	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1	-	-	-	-	33
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-
Asx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1,0	-	-

Výroba povrchově aktivních látek podle vynálezu

Povrchově aktivní látky podle vynálezu byly připraveny smísením peptidů podle vynálezu se třemi lipidickými složkami, zahrnujícími cholinový fosfoglycerid, kyselý fosfolipid a analog mastné kyseliny.

Příklad 20

Sterilizovaná množství 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholinu (1350 mg), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerolu (s acylovou skupinou, obsahující 14 až 24 uhlíků; získaného od firmy Sigma Chemical Co., Ltd.) (450 mg) a kyseliny myristové (200 mg) byla rozpuštěna při laboratorní teplotě ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 1000 ml) a 25 mg peptidu A bylo rozpuštěno v TFA (1,0 ml). Tyto roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány (převáděny na pevnou látku) za sníženého tlaku. Získané zbytky byly suspendovány ve směsi vody a ethanolu (9:1, obj./obj., 1000 ml) po dobu 15 minut při 40°C. Zmražením této suspenze na -50°C a poté vysoušením 36 hodin ve vakuu 85-100 $\mu\text{m Hg}$, tj. 11,3-13,3 Pa, byla povrchově aktivní látka (2070 mg) získána jako bílý prášek.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 65,2 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 21,7 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 9,7 % (hm./hm.) pro kyselinu myristovou, 1,2 % (hm./hm.) pro peptid A a 2,2 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 21

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (300,0 mg), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24

atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.) (100,0 mg) a kyselina palmitová (40,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 300 ml) a 10,0 mg peptidu B bylo rozpuštěno ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 2,0 ml). Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (9:1, obj./obj., 100 ml) po dobu 20 minut při 45°C. Zmražením této suspenze na -60°C a poté vysoušením 40 hodin ve vakuu 60-110 $\mu\text{m Hg}$ tj. 7,99-14,66 Pa bylo získáno 459,1 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 65,3 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 21,8 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 8,7 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid B a 2,0 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 22

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (280,0 mg), 1,2-dilauroyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (120,0 mg) a kyselina palmitová (27,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 150 ml) a 2,8 mg peptidu C bylo rozpuštěno ve směsi chloroformu a methanolu (1:2, obj./obj., 0,5 ml). Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (8:2, obj./obj., 100 ml) po dobu 45 minut při 40°C. Zmražením této suspenze na -65°C a poté vysoušením 36 hodin ve vakuu 50-80 $\mu\text{m Hg}$ tj. 6,66-10,65 Pa bylo získáno 437,6 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah

každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 64,0 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 27,4 % (hm./hm.) pro 1,2-dilauroyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 6,2 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 0,6 % (hm./hm.) pro peptid C a 1,8 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 23

Kromě toho, že byl místo 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerolu (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.) použit 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, byl použit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 451,9 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 66,4 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 22,1 % (hm./hm.) pro 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 8,9 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid D a 0,4 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 24

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (320,0 mg), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (80,0 mg) a kyselina palmitová (60,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (1:1, obj./obj., 200 ml) a 14,0 mg peptidu E bylo rozpuštěno v TFA (0,3 ml). Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (10:1, obj./obj., 50 ml) po dobu 60 minut při 45°C. Zmražením této suspenze na -45°C a poté vysoušením 24 hodin ve vakuu 50-110 μ m Hg tj.

6,66-14,66 Pa bylo získáno 479,2 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 66,8 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycerol-(3)-fosfocholin, 16,7 % (hm./hm.) pro 1,2-dimyristoyl-sn-glycerol-(3)-fosfo-sn-glycerol, 12,5 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,9 % (hm./hm.) pro peptid E a 1,1 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 25

Kromě toho, že byl místo peptidu B (10,0 mg) použit peptid F (22,0 mg) a 1,2-distearoyl-sn-glycerol-(3)-fosfo-sn-glycerol místo 1,2-diacyl-sn-glycerol-(3)-fosfo-sn-glycerolu (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.), byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 463,9 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 64,7 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycerol-(3)-fosfocholin, 21,6 % (hm./hm.) pro 1,2-distearoyl-sn-glycerol-(3)-fosfo-sn-glycerol, 8,6 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 4,7 % (hm./hm.) pro peptid F a 0,4 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 26

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid G, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 454,1 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 66,1 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 22,0 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.), 8,8 % (hm./hm.) pro kyselinu myristovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid G a 0,9 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 27

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (210,0 mg), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.) (90,0 mg) a kyselina stearová (33,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (3:1, obj./obj., 100 ml) a 1,9 mg peptidu H bylo rozpuštěno v methanolu. Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (9:1, obj./obj., 90,0 ml) po dobu 15 minut při 50°C. Zmražením této suspenze na -55°C a poté vysoušením 28 hodin ve vakuu 100-120 $\mu\text{m Hg}$, tj. 13,32-15,98 Pa, bylo získáno 340,2 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 61,7 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 26,5 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 9,7 % (hm./hm.) pro kyselinu stearovou, 0,5 % (hm./hm.) pro peptid H a 1,6 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 28

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (210,0 mg), 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-(3)-fosfo-L-serin (90,0 mg) a kyselina palmitová (33,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (4:1, obj./obj., 100 ml) a 11,0 mg peptidu I bylo rozpuštěno v TFA (0,5 ml). Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (9:1, obj./obj., 110 ml) po dobu 25 minut při 45°C. Zmražením této suspenze na -55°C a poté vysoušením 28 hodin ve vakuu 100-120 μ m Hg, tj. 13,32-15,98 Pa, bylo získáno 348,7 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 60,2 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 25,8 % (hm./hm.) pro 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-(3)-fosfo-L-serin, 9,5 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 3,2 % (hm./hm.) pro peptid I a 1,3 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 29

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid J, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 459,3 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 30

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid K, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 452,5 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 31

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid L, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 456,6 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 32

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid M, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 453,9 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 33

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid N, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 452,5 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 34

Kromě toho, že byl místo peptidu B použit peptid O, byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 458,1 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Příklad 35

1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin (30,0 mg), 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.) (10,0 mg) a kyselina palmitová (4,0 mg) byly rozpuštěny ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 30 ml) a 1,0 mg peptidu Q bylo rozpuštěno ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 2,0 ml). Oba roztoky byly smíchány a poté sušeny a ztužovány za sníženého tlaku. Získaný zbytek byl suspendován ve směsi vody a ethanolu (9:1, obj./obj., 10,0 ml) po

dobu 20 minut při 45°C. Zmražením této suspenze na -60°C a poté vysoušením 36 hodin ve vakuu 60-120 $\mu\text{m Hg}$, tj. 7,99-15,98 Pa, bylo získáno 45,4 mg bílé, práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 66,1 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 22,0 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol, 8,8 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid Q a 0,9 % (hm./hm.) pro vodu.

Příklad 36

Kromě toho, že byl místo peptidu Q použit peptid R, byl využit stejný postup jako v Příkladu 35 k vytvoření 45,7 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

Srovnávací příklad 3

Kromě toho, že byl místo roztoku peptidu B (10,0 mg) ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 2,0 ml) použit roztok peptidu S (10,0 mg) v TFA (0,3 ml), byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 455,2 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 65,9 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 22,0 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.), 8,8 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid S a 1,1 % (hm./hm.) pro vodu.

Srovnávací příklad 4

Kromě toho, že byl místo roztoku peptidu B (10,0 mg) ve směsi chloroformu a methanolu (2:1, obj./obj., 2,0 ml) použit roztok peptidu T (10,0 mg) v TFA (0,3 ml), byl využit stejný postup jako v Příkladu 21 k vytvoření 456,0 mg bílé práškovité povrchově aktivní látky.

V tomto prášku nebyla detegovatelná množství ethanolu a obsah každé ze složek vzhledem k celkové hmotnosti povrchově aktivní látky činil 65,8 % (hm./hm.) pro 1,2-dipalmitoylglycero-(3)-fosfocholin, 21,9 % (hm./hm.) pro 1,2-diacyl-sn-glycero-(3)-fosfo-sn-glycerol (s acylovou skupinou, obsahující 14-24 atomů uhlíku, výrobek firmy Sigma Chemical Co., Ltd.), 8,8 % (hm./hm.) pro kyselinu palmitovou, 2,2 % (hm./hm.) pro peptid S a 1,3 % (hm./hm.) pro vodu.

Tabulka 2 ukazuje výsledky testů povrchové aktivity a efekt uchování objemu alveolárního prostoru u povrchově aktivních látek podle vynálezu.

Jak bylo popsáno výše, nové syntetické polypeptidy podle vynálezu jsou snadno izolovatelné a snadno se čistí, mohou být vyráběny metodami, umožňujícími produkci ve větším objemu, jsou vysoce rozpustné v obecných rozpouštědlech a ve srovnání s běžnými prostředky vykazují lepší rovnoměrnou suspendovatelnost a odpovídající silné povrchové aktivity.

Prostředky podle vynálezu tedy mohou být použity jako léčebná činidla pro syndrom nedostatečnosti respiračního systému, což je onemocnění, působící silné dýchací obtíže.

Tabulka 2: Povrchové aktivity a efekt uchování alveolárního
objemu povrchově aktivních látek podle vynálezu

číslo příkla- du	povrchová aktivita						efekt udržení alveolárního objemu
	efekt snížení povrch. napětí		rozprostření na roz- hraní plyn-kapal.		absorbovatelnost narozhr. plyn-kapal.		
	max (mN/m)	min (mN/m)	dobu ekvilibra- ce (s)	rovnováž. povrch. napětí (mN/m)	dobu ekvilibra- ce (s)	rovnováž. povrch. napětí (mN/m)	objem plic (při 490 Pa) ml/kg
20	29,0	0,2	30	27,5	65	30,3	48
21	24,7	0,5	30	26,7	30	29,2	55
22	32,6	4,3	60	33,1	90	34,8	41
23	26,8	2,5	40	28,5	50	32,3	51
24	33,1	7,3	60	33,5	100	34,6	39
25	33,7	7,4	60	32,8	100	34,2	39
26	27,2	1,1	60	28,3	40	29,9	49
27	27,2	8,7	60	27,5	50	28,3	46
28	34,1	3,9	60	34,3	95	36,8	40
29	28,0	0,8	30	27,6	30	29,9	53
30	31,5	1,6	50	28,0	80	32,1	47
31	34,2	1,2	60	33,1	100	34,5	40
32	33,7	3,0	30	32,6	60	33,9	44
33	28,7	3,2	30	26,9	50	30,2	51
34	30,8	2,1	50	29,8	70	31,9	49
35	30,1	2,5	40	30,4	50	31,7	49
36	33,4	3,9	60	31,3	90	32,9	45
srov. 3	40,1	10,3	90	37,2	180	41,5	28
srov. 4	39,0	2,5	95	36,4	150	39,7	29

Tabulka sekvencí

sekvence č.: 1

délka sekvence: 35

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val

1

5

10

15

Val Val Val Val Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu

20

25

30

Met Gly Leu

35

sekvence č.: 2

délka sekvence: 34

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Leu Ile Pro Cys Cys Pro Val Asn Ile Lys Arg Leu Leu Ile Val Val

1

5

10

15

Val Val Val Val Leu Leu Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met

20

25

30

Gly Leu

sekvence č.: 3

délka sekvence: 35

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Leu Arg Ile Pro Cys Cys Pro Val Asn Leu Lys Arg Leu Leu Val Val

1 5 10 15

Val Val Val Val Val Leu Val Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu

20 25 30

Met Gly Leu

35

sekvence č.: 4

délka sekvence: 32

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Val Val Val Val Val

1 5 10 15

Val Leu Ile Val Val Val Ile Val Gly Ala Leu Leu Met Gly Leu His

20 25 30

sekvence č.: 5

délka sekvence: 35

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Phe Gly Ile Pro Cys Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu
 20 25 30
Met Gly Leu
 35

sekvence č.: 6

délka sekvence: 27

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Leu Leu
 20 25

sekvence č.: 7

délka sekvence: 27

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25

sekvence č.: 8

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
20

sekvence č.: 9

délka sekvence: 19

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu

sekvence č.: 10

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

20

sekvence č.: 11

délka sekvence: 27

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

1 5 10 15

Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Gly Ala Leu Leu

20 25

sekvence č.: 12

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

5 10 15

Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

20

sekvence č.: 13

délka sekvence: 22

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Pro Val His Leu Lys Arg Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

1 5 10 15

Nle Nle Nle Nle Nle Nle

20

sekvence č.: 14

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Nle

1 5 10 15

Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

20

sekvence č.: 15

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Ile Leu Leu Leu Leu Ile Leu

20

sekvence č.: 16

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Val Leu Nva Leu Val

1 5 10 15

Leu Nva Leu Leu Leu Leu Val

20

sekvence č.: 17

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Trp

20

sekvence č.: 18

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvence: peptid

sekvence

Cys Pro Val Asn Leu Lys Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu

20

sekvence č.: 19

délka sekvence: 23

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvice: peptid

sekvence

Cys Pro Val Asn Ile Lys Arg Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

1 5 10 15

Nle Nle Nle Nle Nle Nle Nle

20

sekvence č.: 20

délka sekvence: 27

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvice: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Val Val Val Val Val Val Val Val

1 5 10 15

Val Val Val Val Val Val Val Gly Ala Leu Leu

20

25

sekvence č.: 21

délka sekvence: 27

forma sekvence: aminokyselinová

typologie: rovný řetězec

typ sekvice: peptid

sekvence

Cys Pro Val His Leu Lys Arg Ile Ile Ile Ile Ile Ile Ile Ile

1 5 10 15

Ile Ile Ile Ile Ile Ile Ile Gly Ala Leu Leu

20

25

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Syntetické peptidy, vyznačující se tím, že obsahují následující specifickou sekvenci:

Xaa-Pro-Val-Xbb-Xcc-Lys-Arg-W

kde Xaa je buď chybějící nebo představuje Cys či Ser, Xbb představuje His nebo Asn, Xcc představuje Leu nebo Ile a W představuje hydrofobní peptidovou část, složenou z 12 až 20 zbytků Leu a/nebo Nle.

2. Syntetické peptidy, vyznačující se tím, že 12 až 20 hydrofobních aminokyselin, vytvářejících hydrofobní peptidovou část syntetického peptidu podle nároku 1, zahrnuje 1-5 zbytků Ile, Val, Nva a/nebo Trp.

3. Syntetické peptidy podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že syntetický peptid se specifickou sekvencí je představován kteroukoli ze sekvencí č. 5 až 19, nebo je S-acetamido-methylovaným produktem peptidu o sekvenci č. 8 či S-palmitoylovaným produktem peptidu o sekvenci č. 9.

4. Peptid pro syntézu, vyznačující se tím, že, byly chráněny jeho N-konec i funkční vedlejší řetězce v hydrofilní peptidové části, představované následující specifickou sekvencí

Xaa-Pro-Val-Xbb-Xcc-Lys-Arg

kde kde Xaa je buď chybějící nebo představuje Cys či Ser, Xbb představuje His nebo Asn, Xcc představuje Leu nebo Ile.

5. Peptid pro syntézu podle nároku 4, vyznačující se tím, že je tvořen Fmoc-Pro-Val-His(Trt)-Leu-Lys(Boc)-Arg(Mtr), Fmoc-Pro-Val-Asn-Leu-Lys(Boc)-Arg(Mtr) nebo Fmoc-Pro-Val-Asn-Ile-Lys(Boc)-Arg(Mtr).

6. Způsob výroby syntetických peptidů podle nároku 1 či 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o kondenzaci hydrofobní peptidové části syntetického peptidu podle nároku 1 či 2 a peptidu pro syntézu podle nároku 4 nebo 5.

7. Plicní povrchově aktivní látka, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje syntetický peptid podle nároku 1, 2 nebo 3, cholinový fosfoglycerid, kyselý fosfolipid a mastnou kyselinu.

8. Farmaceutický prostředek vůči syndromu nedostatečnosti respiračního systému, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jako aktivní složku plicní povrchově aktivní látku, zahrnující syntetický peptid podle nároku 1, 2 nebo 3, cholinový fosfoglycerid, kyselý fosfolipid a mastnou kyselinu.

Zastupuje: