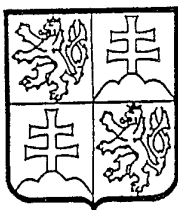


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

277 003

(21) Číslo přihlášky : 1386-88
(22) Přihlášeno : 03.03.88
(30) Prioritní data :

(40) Zveřejněno : 17.06.92
(47) Uděleno : 30.09.92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(13) Druh dokumentu : B6
(51) Int. Cl.⁵ :
C 07 K 7/00

(73) Majitel patentu : Léčiva, s.p., Praha, CS

(72) Původce vynálezu : Krchňák Viktor RNDr.CSc., Praha, CS;
Vágner Josef ing., Praha, CS;
Mach Otakar RNDr.CSc., Praha, CS

(54) Název vynálezu : Peptidy s vlastnostmi antigenních determinant
bílkovinného produktu genu env viru HIV-1

(57) Anotace :

Řešení se týká peptidů s vlastnostmi antigenních determinant bílkovinného produktu genu env viru HIV-1 obecného vzorce I.

H-X-Asn-Y-Z (I)

kde X značí Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Arg-
-Ser-Ile-Arg-Leu-Val
a Y značí Gly-Ser-Leu (Ia)

nebo X značí Cys-Val-Pro-Thr-Asp-Pro
a Y značí Pro-Gln-Glu-Val-Val (Ib)

nebo X značí Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Pro-
-Asn-Asn (Ic)
a Y značí Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile

nebo X značí Gly-Gly-Gly-Asp-Met-Arg-Asp
a Y značí Trp-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr
(Id)

nebo X značí Val-Pro-Trp-Asn-Ala-Ser-Trp-
-Ser (Ie)
a Y značí Lys -Ser-Leu-Glu-Gln-Ile

a Z značí skupinu hydroxylovou nebo amino-
vou, a jejich konjugátů s imunoadjuvantními
látkami typu muryldipeptidu, s nosiči typu
bílkovin nebo makromolekulárních polymerů,
například latexu, spheronu a polystyrenu
nebo s některými aktivovanými membránami.
Peptidy byly připraveny syntézou v pevné
fázi a bylo prokázáno, že je lze použít ja-
ko diagnostikum při detekci protilátek pro-
ti viru způsobujícímu u lidí syndrom ziska-
né imunodeficiency. Popřípadě může být kon-
jugát kteréhokoliv z peptidů s bílkovinným
nosičem použit na přípravu monodeterminant-
ních protilátek proti gp 160 HIV-1.

Peptidy s vlastnostmi antigenních determinant bílkovinného produktu genu env viru HIV-1

Oblast techniky

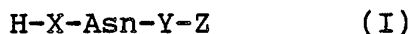
Vynález se týká peptidů s vlastnostmi antigenních determinant bílkovinného produktu genu env viru HIV-1.

Dosavadní stav techniky

Peptidy podle vynálezu jsou nové a autory vynálezu byly u nich mimo jiné prokázány vlastnosti antigenních determinant glykoproteinu gp 160, což je bílkovinný produkt genu env viru HIV-1 způsobujícího u lidí onemocnění syndromem imunitní nedostatečnosti (AIDS).

Podstata vynálezu

Podstata vynálezu spočívá v nových peptidech s vlastnostmi antigenních determinant bílkovinného produktu genu env viru HIV-1 obecného vzorce I



kde X značí Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-Val
a Y značí Fly-Ser-Leu (Ia),

nebo X značí Gys-Val-Pro-Thr-Asp-Pro
a Y značí Pro-Gln-Glu-Val-Val (Ib),

nebo X značí Ule-Asn-Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn
a Y značí Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile (Ic),

nebo X značí Gly-Gly-Gly-Asp-Met-Arg-Asp
a Y značí Trp-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr (Id),

nebo X značí Val-Pro-Trp-Asn-Ala-Ser-Trp-Ser
a Y značí Lys-Ser-Leu-Glu-Gln-Ile (Ie)

a Z značí skupinu hydroxylovou nebo aminovou, a jejich konjugáty s imunoaktivními látkami typu muramyldipeptidu, s nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, například latexu, spheronu a polystyrenu, nebo s některými aktivovanými membránami.

Peptidy obecného vzorce I byly připraveny Merrifieldovou metodou syntézy peptidů v pevné fázi. Jako polymerní nosič byl použit polystyren síťovaný divinylbenzenem, s výhodou jedním procentem, s funkčními skupinami p-methylbenzhydraminovými nebo chlormethylovými. N- α -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 HCl v DCM, čs. autorské osvědčení č. 255 500). Postranní funkční skupiny vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Kondenzace chráněných aminokyselin byly prováděny vhodně aktivovanými deriváty, s výhodou HOBt estery. Kondenzace byly urychlovány v ultrazvukové lázni, jak je popsáno v čs. autorském osvědčení č. 271 584. Ukončení

reakce bylo monitorováno barevnou změnou acidobazického indikátoru, s výhodou bromfenolovou modří podle čs. autorského osvědčení č. 268 230. Po ukončení syntézy byl peptid z pryskyřice odštěpen a současně byly odstraněny chránící skupiny vícefunkčních aminokyselin acidolyticky, s výhodou působením kapalného HF. Surový produkt byl čištěn buď pomocí sloupcové chromatografie na nosičích používaných v chemii peptidů, s výhodou nosičů fungujících jako molekulární síta. Peptidy byly charakterizovány aminokyselinovou anýlázou a jejich čistota byla ověřena chromatografickými a elektroforetickými metodami.

Aminokyselinová sekvence peptidů obecného vzorce I byla odvozena z aminokyselinové sekvence glykoproteinu gp 160 viru způsobujícího u lidí imunodeficienci HIV-1 tak, aby zahrnovala antigenní determinanty zmíněného proteinu.

Základem diagnostické reakce, jejíž provedení blíže objasňuje například čs. autorského osvědčení č. 258 288, je interakce syntetických peptidů podle vynálezu s protilátkami vytvořenými v organismu, který byl infikován virem. Syntetické peptidy obecného vzorce I jsou určeny pro detekci protilátek produkovaných infikovanými jedinci proti virovému glykoproteinu gp 160 viru HIV-1. Při praktickém použití lze s výhodou použít například enzymoimunologický test (ELISA), který byl autory vynálezu proveden tak, jak již bylo popsáno v čs. autorském osvědčení č. 256 960. Hodnoty absorbancí pro jednotlivá pozitivní séra, ředěná v poměru 1 : 20 až 100, byly významně vyšší ve srovnání s negativními séry. Použitá séra byla pozitivní při testování v komerčním ELISA testu, kde jako antigen byl použit lyzát HIV-1 a byla také verifikována metodou Western Blot. Reakce s kontrolním negativním sérem se pohybovala na úrovni pozadí a v hodnotách absorbance nepřevýšila v průměru hranici 0,15.

Peptidy podle vynálezu bylo možno dále použít pro produkci monodeterminantních protilátek proti glykoproteinu gp 160, a to polyklonálních nebo monoklonálních, směřovaných proti antigenní determinantě, kterou zahrnuje peptid, kterým byla imunizace prováděna. Autoři vynálezu prováděli imunizaci pokusných zvířat, s výhodou myši nebo králíků, peptidy obecného vzorce I, s výhodou ve směsi s muramyllopeptidem, kovalentně navázaným muramyllopeptidem na peptidy obecného vzorce I nebo peptidy polymerizovanými glutaraldehydem nebo metodou aktivních esterů nebo po navázání na vhodnou bílkovinu, s výhodou kravský serumalbumín, thyreoglobulin nebo hemocyanin z keyhole limpetu, za použití kondenzačního činidla, s výhodou glutaraldehydu, karbodiimidu, bifunkčních činidel nebo pomocí aktivních esterů. Jako imunoadjuvans použili autoři vynálezu Freundovo kompletní adjuvans nebo muramyllopeptid.

Detekce protilátek byla provedena testem ELISA s peptidem obecného vzorce I zakotveným na plastické polystyrenové destičce. Přenosný postup ELISA testu je popsán v čs. autorském osvědčení č. 256 960. Za použití vhodného anti-králíčího nebo anti-myšího IgG značeného enzymem, s výhodou peroxidázou nebo alkalickou fosfatázou, poskytovala získaná séra pozitivní reakci až do ředění 10^{-4} až 10^{-5} .

Příklady provedení

Příklad 1

Do průtokového reaktoru (vnitřní objem 10 ml) bylo umístěno 400 mg p-methylbenzhydrylaminové kopoly (styren-1 % divinylbenzen)ové pryskyřice (MBHA, obsah aminoskupin 0,4 meq/g). Syntéza byla provedena na manuálně ovládaném syntetizátoru vlastní konstrukce (viz čs. autorské osvědčení č. 262 081) kontinuální průtokovou metodou (čs. autorské osvědčení č. 255 089). N- α -aminoskupiny byly chráněny Boc skupinou, postranní řetězce vícefunkčních aminokyselin byly chráněny skupinami benzylového typu. Arg p-toluensulfonovou skupinou a chráněné aminokyseliny byly aktivovány pro kondenzaci formou HOBt esteru. 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-diisopropylaminu v chloroformu, 3 min,
4. promývání, DMF, do neutrálního efluentu,
5. kondenzace, chráněná aminokyselina, 0,8 meq v DCM (nebo DCM : DMF, 4:1, je-li třeba), přidat HOBt, 0,8 meq v DMF, přidat DCC, 0,8 meq v DCM, 30 min při 20°C, odfiltrovat N,N-dicyklohexylmočovinu, promýt DCM, odpařit DCM za sníženého tlaku ($t < 25^{\circ}\text{C}$), naředit DMF, zfiltrovat, promýt DMF, doplnit DMF na koncentraci 0,2 M, přidat několik kapek 0,001 M roztoku bromfenolové modře v DMF (70 mg/100 ml), nastříknout do průtokového reaktoru, ponechat reagovat v ultrazvukové lázni do přechodu acidobazického indikátoru z modré do žluté barvy,
6. promývání, DMF, 5min.

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 aminokyseliny (krok /1/) a peptisyl-pryskyřice byla promyta DCM, metanem a vysušena proudem dusíku. Výtěžek 920 mg. 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 330 mg. Surový peptid byl čištěn na koloně (2,6x100 cm) obsahující jako stacionární fázi polysmidový biogel. 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 4,5 min, mobilní fáze 50 % MeOH, 50 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol: kyselina octová: voda - 4:1:1) a elektroforézou na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

94 mg H-Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-Val-Asn-
-Gly-Ser-Leu-NH₂

Příklad 2

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ib. K chránění postranní skupiny cysteinu byla použita p-methylbenzylová skupina. Výtěžek peptidylpryskyřice 820 mg, výtěžek surového produktu 262 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena analytickou HPLC (Rt 4,5 min, mobilní fáze 40 % MeOH, 60 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol: kyselina octová: voda - 4:1:1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

132,5 mg H-Cys-Val-Pro-ThrAsp-Pro-Asn-Pro-Gln-Glu-Val-Val-
-HN₂

Příklad 3

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ic. K chránění postranní skupiny cysteinu byla použita p-methylbenzylová skupina. Výtěžek peptid-pryskyřice 1 005 mg, výtěžek surového produktu 346 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami. Čistota produktu byla potvrzena analytickou HPLC (Rt 6,0 min, mobilní fáze 45 % MeOH, 55 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol:kyselina octová:voda -4:1:1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

201 mg H-Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn-Asn-Thr-Arg-Lys-
-Ser-Ile-Arg-Ile-HN₂

Příklad 4

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Id. K chránění postranní funkce tryptofanu byla použita formylová skupina. Výtěžek peptidyl-pryskyřice 945 mg, výtěžek surového produktu 401 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena analytickou HPLC (Rt 7,5 min, mobilní fáze 45 % MeOH, 55 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol : kyselina octová : voda - 4:1:1) a elektroforéze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

199 mg H-Gly-Gly-Gly-Asp-Met-Arg-Asp-Asn-Trp-Arg-Ser-Glu-
-Leu-Tyr-NH₂

Příklad 5

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ie. K chránění postranní funkce tryptofanu byla použita formylová skupina. Výtěžek peptidyl-pryskyřice 840 mg, výtěžek

surového produktu 368 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena analytickou HPLC (Rt 7,5 min, mobilní fáze 55 % MeOH, 45 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol: kyselina octová: voda - 4:1:1) a elektrofořeze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

94,0 mg H-Val-Pro-Trp-Asn-Ala-Ser-Trp-Ser-Asn-Lys-Ser-Leu-Glu-Gln-Ile-NH₂

Příklad 6

Podle postupu, který je uveden v příkladu 1, byl syntetizován peptid Ia. Jako polymerní nosič byl použit polystyren síťovaný 1 % divinylbenzenem finkcionalizovaný chlormethylovými skupinami (obsah Cl 0,8 meq/g). První chráněná aminokyselina Boc-Leu byla k nosiči připojena esterifikací pomocí KF. Výtěžek peptidyl-pryskyřice 940 mg, výtěžek surového produktu 298 mg. Výsledný produkt měl aminokyselinovou analýzu shodnou s teoretickými hodnotami, čistota produktu byla potvrzena analytickou HPLC (Rt 8,5 min, mobilní fáze 45 % MeOH, 45 % vody obsahující 0,1 % TFA), chromatografií na tenké vrstvě (soustava n-butanol: kyselina octová: voda - 4:1:1) a elektrofoze na papíře při pH 2,5.

Výtěžek:

104 mg H-Gly-Glu-Arg-Asp-Arg-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-Val-Asn-Gly-Ser-Leu-OH

Příklad 7

K roztoku 10 mg peptidu Ia v 10 ml HCl (pH 3,0) byl za míchání při 0°C přidán roztok 10 mg ECD v 10 ml HCl (pH 3,0), směs ponechána 15 min při 0°C, potom byl přidán roztok 10 mg KLH v 0,1 M uhličitanovému pufru tak, aby výsledné pH bylo neutrální. Směs byla inkubována 2 h při 20°C, po této době byl za míchání přidán roztok 10 mg MDP v PBS pufru o pH 7,2 a směs byla inkubována 16 h při 8°C. Potom byla reakční směs dialyzována proti PBS, rozplněna po alikvotech na jednotlivé imunizační dávky a uchovávána při -20 °C. Aminokyselinovou analýzou konjugátu bylo zjištěno, že v průměru došlo k vazbě 30 molekul peptidu na jednu molekulu bílkovinného nosiče. Při gelové chromatografii byl pozorován charakteristický rozptyl mol. vah od 5 000 do 30 000

Příklad 8

Peptidy Ia až Ie podle vynálezu byly potaženy jamky polystyrenových destiček ELISA. Potom byly do jamek odpipetována vhodně naředěná séra (v tomto případě 1:20) ředicím roztokem, obsahujícím blokujičindiferentní bílkovinu, obvykle hovězí sérový albumin v koncentraci 2 až 5 % hmot. Po inkubaci 15 minut při 37 °C byly vzorky sér z jamek odsáty, jamky byly 4 x promyty fosfátovým pufrem pH 7,2 s 0,05 % hmot. neionogenního detergentu, například Tweenu 20. Potom byl do jamky adpipetován vhodně naředěný roztok konjugátu prasečího protilidského γ -globulinu s křenovou peroxidázou. Inkubace byla 15 minut při 37 °C. Potom byly jamky 4x promyty a byl do nich odpipetován roztok chromogenu, například

o-fenylendiaminu. Vyvolání barevné reakce proběhlo za 5 až 7 minut. Reakce byla zastavena přidáním 2N H₂SO₄ a intenzita zabarvení byla odečtena při 490 nm. Byla používána negativní séra dárců krve a pozitivní séra na přítomnost protilátek proti HIV 1, ověřená testy například Wellcome a Western blot).

Absorbance (490 nm)	Negativní séra		Pozitivní séra	
Peptid				
Ia	0,107	0,079	0,615	0,524
	0,102	0,062	0,676	0,489
Ib	0,080	0,160	0,811	0,850
	0,079	0,157	0,725	0,784
Ic	0,086	0,157	0,903	0,574
	0,097	0,174	0,880	0,588
Id	0,104	0,211	0,905	0,666
	0,106	0,170	0,934	0,779
Ie	0,288	0,092	0,886	0,923
	0,214	0,097	0,928	0,927

Průmyslová využitelnost

Peptidy podle vynálezu mají vlastnosti intigenních determinant glykoproteinu gp 160, což je bílkovinný produkt genu eno viru HIV-1, který způsobuje u lidí onemocnění syndromem imunitní nedostatečnosti (AIDS). Dále mohou dobře sloužit jako vhodné diagnostikum k detekci protilátek proti viru HIV a navíc jsou použitelné pro produkci monodeterminantních protilátek.

Vysvětlivky ke zkratkám použitých v textu:

HIV	virus způsobující u lidí imunodeficienci
ARC	komplex chorob příbuzných AIDS
AIDS	syndrom získané imunodeficiens
ELISA	enzymoimunologický test
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TFA	kyselina trifluoroctová
DCM	dichlormetan
DMF	N,N-dimethylformamid
HOBt	N-hydroxybenzotriazol
Boc	t-butyloxykarbonyl
Tos	p-toluensulfonyl
Bzl	benzyl
For	formyl
DIEA	ethyl-diisopropylamin
MeOH	methanol
DCC	N,N -dicyklohexylkarbodiimid
HF	fluorovodík
Arg	arginin
Asp	kyselina asparágová

Asn	asparagin
Cys	cystein
Gln	glutamin
Gly	glycin
Glu	kyselina glutámová.
Ile	isoleucin
IgG	imunoglobulin G
Leu	leucin
Lys	lysin
Met	methionin
Pro	prolin
Ser	serin
Thr	threonin
Trp	tryptofan
Val	valin
ECD	N-ethyl-N -(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid
KLH	hemocyanin keyhole limpetul
MDP	murymyldipeptid
PBS	fosforečný pufr.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Peptidy s vlastnostmi antigenních determinant bílkovinného produktu genu env viru HIV-1, obecného vzorce I

H-X-Asn-Y-Z (I)

kde X značí Gly-Glu-Arg-Asp-Asp-Arg-Ser-Ile-Arg-Leu-Val
a Y značí Gly-Ser-Leu (Ia),

nebo X značí Cys-Val-Pro-Thr-Asp-Pro
a Y značí Pro-Gln-Glu-Val-Val (Ib),

nebo X značí Ile-Asn-Cys-Thr-Arg-Pro-Asn-Asn
a Y značí Thr-Arg-Lys-Ser-Ile-Arg-Ile (Ic),

nebo X značí Gly-Gly-Gly-Asp-Met-Arg-Asp
a Y značí Trp-Arg-Ser-Glu-Leu-Tyr (Id),

nebo X značí Val-Ori-Trp-Asn-Ala-Ser-Trp-Ser
a Y značí Lys-Ser-Leu-Glu-Gln-Ile (Ie),

a Z značí skupinu hydroxylovou nebo aminovou, a jejich konjugáty s imunoaktivními látkami typu muramylpeptidu s nosiči typu bílkovin nebo makromolekulárních polymerů, například latexu, sferonu a polystyrenu nebo s některými aktivovanými membránami.

Konec dokumentu
