PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2008-128**
(22) Přihlášeno: **04.03.2008**
(40) Zveřejněno: **16.09.2009**
(Věstník č. 37/2009)
(47) Uděleno: **01.04.2010**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.05.2010**
(Věstník č. 19/2010)

(11) Číslo dokumentu:
301 654
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

C07K 7/08	(2006.01)
C07K 1/36	(2006.01)
C07K 1/02	(2006.01)
C07K 1/04	(2006.01)
A61P 31/04	(2006.01)
A61P 31/10	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

Čeřovský a kol. (2008) Peptides 29, 992-1003; Kuhn-Nentwig (2003) Cell. Mol. Life Sci. 60, 2651-2668; Krishnakumari a Nagaraj (1997) J. Peptide Res. 50, 88-93; Otvos a kol. (2000) J. Peptide Sci. 6, 497-511.

(73) Majitel patentu:
Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i., Praha 6, CZ

(72) Původce:
Čeřovský Václav RNDr. CSc., Praha 6, CZ
Slaninová Jiřina RNDr. CSc., Praha 4, CZ
Hovorka Oldřich RNDr. Ph.D., Dobříš, CZ
Cvačka Josef RNDr. Ph.D., Praha 1, CZ
Voburka Zdeněk Ing., Praha 8, CZ
Fučík Vladimír RNDr. CSc., Praha 7, CZ
Bednárová Lucie RNDr. CSc., Praha 6, CZ

(54) Název vynálezu:
Peptidy, způsob jejich přípravy a jejich použití

(57) Anotace:
Řešení se týká nových peptidů izolovaných z jedových váčků samotářských včel Lasioglossum laticeps následujících vzorců I až III
H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (I),
H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (II) a H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH_2 (III), způsobů jejich přípravy a jejich použití pro výrobu léčiva pro léčení mikrobiálních, virových a plísňových onemocnění a pro léčení rakovin.

CZ 301654 B6

Peptidy, způsob jejich přípravy a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká nových peptidů izolovaných z přírodního materiálu následujících vzorců I až III

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (I)

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (II)

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH_2 (III),

způsobu jejich výroby a jejich použití jako antimikrobiálních, antivirových, protiplísňových a protirakovinných látek.

Dosavadní stav techniky

Pro přežití v přírodě se všechny živé organismy musí bránit proti svým přirozeným nepřátelům, jako jsou například mikroorganismy. První obrana proti mikrobiální infekci, kterou si příroda během evoluce vyvinula, spočívá v sekreci látek peptidové povahy dnes v odborné terminologii označované jako antimikrobiální peptidy [1]. Například v říši hmyzu představují antimikrobiální peptidy hlavní prostředek obrany proti mikrobům [2]. S přihlédnutím k prostředí, ve kterém se hmyz pohybuje, se musí jednat o peptidy velmi účinné. Tyto peptidy jsou schopny velice rychle zabíjet bakterie a některé další mikroorganismy, a to mechanismem zcela odlišným než jaký využívá imunitní systém vyšších organismů. I když tento mechanismus ještě není zcela objasněn, v podstatě spočívá v narušení buněčné membrány tvorbou transmembránových pórů nebo iontových kanálů. To způsobí únik metabolitů a zborcení celé mikrobiální struktury [3]. Obecně je též známo, že antimikrobiální peptidy u bakterií nevyvolávají rezistenci, jako třeba tradiční antibiotika. Zvláštní skupina peptidů s antimikrobiálním účinkem se nachází v jedu hmyzu řádu Hymenoptera [4]. V přírodě je antimikrobiální účinek peptidů izolovaných z jedu vos, včel, čmeláků a mravenců většinou sekundární, a jejich hlavní úloha spočívá spíše v toxicitě či vyvolání bolesti a zánětu, jako třeba u peptidů patřících do skupiny mastoparanů [5].

Podstata vynálezu

Tento vynález se týká nových peptidů izolovaných z přírodního materiálu následujících vzorců I až III

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (I)

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (II)

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH_2 (III)

způsobu jejich výroby a použití peptidů vzorců I až III jako antimikrobiálních, antivirálních, protiplísňových a protirakovinných látek.

Podrobný popis vynálezu

Peptidy vzorců (I, II a III) jsme nazvali lasioglossin I, lasioglossin II a lasioglossin III, a byly izolovány z jedových váčků samotářských včel *Lasioglossum laticeps*. Peptidy I, II a III mají výrazný antimikrobiální účinek a nízkou hemolytickou aktivitu.

Jedná se o jedinečné nové peptidy s výraznými antimikrobiálními účinky a minimální hemolytickou aktivitou. Tyto peptidy mají jedinečnou primární strukturu, která tvoří účinnou sekundární strukturu v přítomnosti buněčné membrány a chemických látek membráně podobných.

Sekundární struktura lasioglossinů, která je neuspořádaná ve vodném prostředí, snadno přechází na strukturu α–helixu v přítomnosti látek tuto strukturu podporujících, jako jsou trifluorethanol či SDS [6], či v kontaktu s biologickou membránou. V tzv. Edmundsonově kruhové projekci (Obr. 1) je patrný amphipathický charakter [6, 7] lasioglossinů s jednotlivými aminokyselinami seskupenými do dobře definovaného hydrofobního (v šedém poli) i hydrofilního sektoru. Rozdělení těchto dvou odlišných sektorů na opačné strany α–helixu, nebo-li tzv. amphipathicita [7], hraje výraznou úlohu při interakci antimikrobiálního peptidu s bakteriální membránou a je tedy jedním z nejdůležitějších faktorů vedoucích k narušení bakteriální membrány a v konečném výsledku ke smrti bakterie [8]. V tomto procesu se zároveň uplatňuje kationicita peptidu [6], která je v případě lasioglossinů zajištěna přítomností pěti lysinů soustředěných v hydrofilních sektorech peptidů. Toto prostorové uspořádání umožňuje elektrostatickou atrakci kladně nabitého sektoru peptidů k záporně nabitým fosfátovým skupinám bakteriální membrány. Hydrofobní sektor peptidů je poté vnořen do lipofilní části membrány a po dosažení určité koncentrace peptidu na bakteriální stěně dojde k jejímu narušení. Teoreticky mohou popisované lasioglossiny vzorců I až III v tzv. anisotropním prostředí vytvořit strukturu optimálního α–helixu o čtyřech závitech. Tyto helikální struktury jsou stabilizovány spojením jednotlivých závitů pomocí vodíkových můstků mezi kyslíky α–karbonylů jednoho závitu a vodíky –NH– skupin závitu následujícího. Jakékoliv chemické změny provedené v molekulách lasioglossinů vedou ke změně jejich sekundární struktury, čímž dojde ke snížení či zvýšení jejich biologických aktivit.

Příklady

Příklad 1

Izolace z přírodního materiálu

Včely *Lasiolossum laticeps* byly pochytány a po několikadenním skladování při –20 °C byly vypreparovány jedové váčky z pěti jedinců. Ty byly extrahovány směsí 50% vodného acetonitrilu s obsahem 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) (25 µl). Extrakt byl frakcionován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na koloně Vydac C–18 (250 x 4,6 mm) při průtoku 1 ml/min za použití gradientu od 5 % acetonitril/voda/0,1 % TFA do 70 % acetonitril/voda/0,1 % TFA. Hlavní peptidové frakce, které byly detekovány UV absorpcí, byly sebrány a koncentrovány v rotačním vakuovém koncentrátoru. Jejich primární struktura byla stanovena pomocí hmotové spektrometrie a metodou automatického Edmanova odbourávání. Lasioglossiny představují hlavní peptidovou složku extraktu.

Příklad 2

Syntéza sloučenin vzorců I, II, III

Na základě stanovené sekvence byly tyto peptidy syntetizovány metodou syntézy peptidů na pevné fázi (SPPS). Syntéza byla provedena manuálně v 5 ml polypropylenových injekčních stříkačkách s teflonovým filtrem na dně stříkačky s využitím protokolu Fmoc–chemie. Jako pevný nosič byla použita Rink Amide MBHA pryskyřice o substituci 0,7 mmol/g. Chráněné Fmoc–aminokyseliny byly kondenzovány ve 4–násobném přebytku v dimethylformamidu a ke kondenzaci byl použit diisopropylkarbodiimid v přítomnosti 1–hydroxybenzotriazolu. Lasioglossiny (I, II a III) byly získány odštěpením z pryskyřice a deprotekcí působením směsi TFA/H_2O/TIS (95 :

2,5 : 2,5) po dobu 3,5 h a poté precipitací *terc*–butylmethyletherem. Tímto postupem bylo získáno 100 až 140 mg surových peptidu. Část tohoto materiálu (15 mg) byla v každém případě čištěna preparativní HPLC na koloně Vydac C–18 (250 x 10 mm) při průtoku 3.0 ml/min a s využitím stejného gradientu, jak je popsáno výše. Takto bylo získáno 7–9 mg HPLC čistých peptidů, jejichž identita byla ověřena hmotovou spektrometrií, jak udává Tabulka 1.

Tabulka 1. Sekvence lasioglossinů (I, II a III)

peptid	sekvence	monoisotopická molekulární hmota (Da)	
		vypočtena	nalezena $[M+H]^+$
(I)	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2	1722,14	1722,8
(II)	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2	1736,16	1737,0
(III)	H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH_2	1764,19	1764,9

Příklad 3

Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita byla stanovena jako tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) pozorováním růstu bakterií v přítomnosti různých koncentrací peptidů (Tabulka 2). Bakterie v exponenciální fázi růstu byly přidány k roztoku testovaného antimikrobiálního peptidu o různé koncentraci (0,5 až 100 μM) v LB médiu v inkubačních destičkách a inkubovány při 37 °C po 20 h za stálého třepání v přístroji Bioscreen C. Absorbance byla měřena při 540 nm každých 15 min. V experimentech bylo použito 1 x 10^4 – 5 x 10^4 CFU bakterií. Jako standard byl použit tetracyklin v koncentraci 1 – 50 μM.

Tabulka 2. Antimikrobiální a hemolytické aktivity lasioglossinů (I, II a III)

peptid	antimikrobiální aktivita MIC [μM]				hemolytická aktivita IC_{50} [μM]
	B.s.	*S.a.*	*E.c.*	*P.a.*	
(I)	1,0	20	2,4	22	>200
(II)	1,0	12,5	2,0	20	>200
(III)	1,0	5,4	2,0	23	>200

B.s,. Bacillus subtilis; S.a., Staphylococcus aureus; E.c., Escherichia coli; P.a., Pseudomonas aeruginosa

Příklad 4

Stanovení hemolytické aktivity

Peptidy v koncentraci 1–100 (200) μM byly inkubovány s potkaními červenými krvinkami (5%) v 0,2 ml fyziologického roztoku po dobu 1 h při 37 °C. Poté byly vzorky centrifugovány při 250 g po dobu 5 min. Absorbance supernatantu byla stanovena při 540 nm. Jako kontrola pro 100% hemolýzu byl místo peptidu použit 0,2% roztok TRITONU X100. Výsledky testování jsou uvedeny v Tabulce 2.

Příklad 5

Cytostatický účinek na rakovinné buňky

Rakovinné buňky byly inkubovány s peptidy v 2–20 mikromolární koncentraci v patřičných růstových médiích po dobu 24, 48 nebo 72 hodin a poté se počet živých buněk stanovoval rutin-

ními testy např. MTT. Stanovovala se koncentrace peptidu IC50, při které přežívá 50 % buněk vzhledem ke kontrolám (místo peptidu pouze fyziologický roztok). V předběžných testech byly použity buňky: myší lymfatické leukémie L1210, lidské akutní lymfoblastické leukémie CCRF–CEM T, lidské promyelotické leukémie HL–60, lidského karcinomu děložního čípku HeLaS3 a buněčná linie PC 12 odvozená z nádoru pheochromocytomu potkaní adrenální meduly. Peptidy lasioglossiny (I, II a III) vykazovaly IC50 4–20 mikromolární (Tabulka 3).

Tabulka 3. Cytostatický účinek lasioglossinů (I, II a III) na rakovinné buňky

Peptid	IC50 [μM]				
	L1210	CCRF-CEM T	HL-60	HeLaS3	PC12
(I)	-	-	-	-	20
(II)	7,11	9,06	7,67	>10	15
(III)	4,72	4,99	4,44	8,40	10

Literatura

1. Hancock R. E. W., Sahl H.–G. Antimicrobial and host–defense peptides as new antiinfective therapeutic strategies. Natur. Bitech. 24, 1551–1557 (2006).
2. Otvos L. Jr. Antimicrobial peptides isolated from insects. J. Peptide Sci. 6, 497–511 (2000).
3. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α–helical antimicrobial peptides. Biopolymers 47, 451–463 (1998).
4. Kuhn–Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell. Mol. Life Sci. 60, 2651–2668 (2003).
5. Mendes M. A., de Souza B. M, Palma M. S. Structural and biological characterization of three novel mastoparan peptides from the venom of the neotropical social wasp *Protopolybia exigua (Saussure)*, Toxicon 45; 101–106 (2005).
6. Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. Amphipathic, α–helical antimicrobial peptides. Biopolymers (Peptide Science) 55, 4–30 (2000).
7. Pathak N., Salas–Auvert R., Ruche G., Janna M.–H., McCarthy D., Harrison R. G. Comparison of the effect of hydrophobicity, amphiphilicity, and α–helicity on the activities of antimicrobiol peptides. Proteins. Struct. Funct. Genet. 22, 182–86 (1995).
8. Yeman M. R., Yount N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharm. Rev. 55, 27–55 (2003).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Peptidy následujících vzorců I až III

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Val-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (I)

H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Ala-Lys-NH_2 (II)

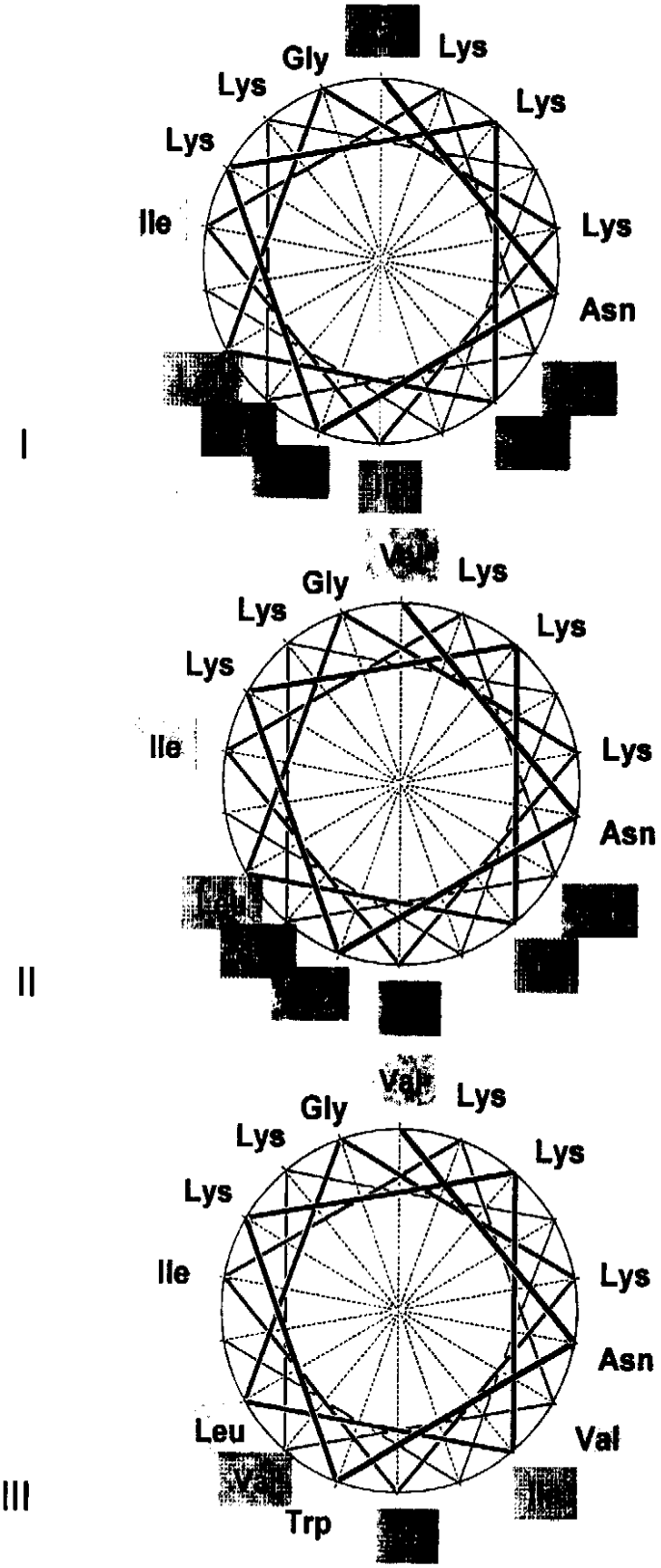
H-Val-Asn-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-Lys-Ile-Ile-Lys-Val-Val-Lys-NH_2 (III)

2. Způsob přípravy peptidů vzorce I až III podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se po vypreparování jedových váčků včel *Lasioglossum laticeps* tyto váčky extrahují směsí 50% vodného acetonitrilu s obsahem 0,1% kyseliny trifluorooctové (TFA) (25 µl), extrakt se frakcionuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií za použití gradientu od 5 % acetonitrilu/voda/0,1 % TFA do 70 % acetonitrilu/voda/0,1 % TFA a hlavní peptidové frakce se zpracují, čímž se získají peptidy vzorce I až III.

3. Způsob přípravy peptidů vzorce I až III podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se syntetizují metodou syntézy peptidů na pevné fázi, SPPS.

4. Použití peptidů vzorců I až III podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro léčení mikrobiálních, virových a plísňových onemocnění a pro léčení rakovin.

1 výkres



Obr. 1 Helikální kruhové projekce lasioglossinů (I, II a III)

Konec dokumentu