

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260641
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 07 K 7/40

(22) Přihlášeno 25 02 87
(21) (PV 1236-87.R)

(40) Zveřejněno 16 05 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)
Autor vynálezu

BENDLOVÁ BĚLA RNDr., LEBL MICHAL ing. CSc.,
ŠTOLBA PAVEL MUDr. CSc., STÁRKA LUBOSLAV MUDr. RNDr. DrSc.,
PRAHA

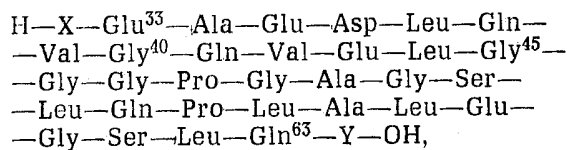
(54) Lidský modifikovaný C-peptid a způsob jeho přípravy

1

2

Lidský modifikovaný C-peptid je vhodný pro radioimunoanalytické stanovení a pro přípravu protilátek, např. králičího a morčecího antiséra.

Předmětem je lidský modifikovaný C-peptid vzorce



kde

X je tyrosin a

Y je např. norvalin nebo norleucin.

Peptid se syntetizuje s výhodou na polymerním nosiči benzhydylaminovém nebo chlormethylovaném známým způsobem.

Vynález se týká modifikovaného lidského C-peptidu pro radioimunoanalytické stanovení a pro přípravu protilátek a způsobu jeho výroby.

Je známo, že lidský C-peptid (AA33-63 lidského proinsulinu) je specifickými proteázami odštěpen z molekuly proinsulinu, a tak vzniká aktivní hormon insulin. Insulin i C-peptid jsou pak secernovány β -buňkami pankreatu v ekvimolárním poměru do portální krve (Středa M.: Diabetologie, Avicenum, Praha, 190 s. /1985/; Kemmler W. a kol.: J. Biol. Chem., 248, 4544 /1973/).

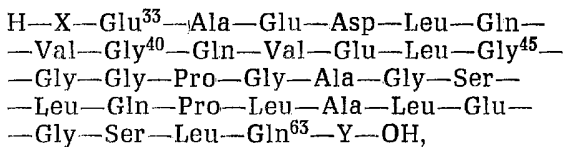
Radioimunoanalytické stanovení hladiny C-peptidu v krevním séru, popř. moči pacientů poskytuje informaci o funkci β -buňek, a je spolehlivou moderní metodou diagnózy diabetes mellitus (Melani F. a kol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 148 /1970/).

Uvedené radiomunoanalytické (RIA) stanovení C-peptidu má oproti jiným diagnostickým metodám diabetu, např. glukosovému tolerančnímu testu či stanovení hladiny insulinu řadu výhod:

1. měření hladiny C-peptidu přímo stanoví produkci vlastního insulinu;
2. na rozdíl od insulinu nedochází k variabilnímu vychytávání C-peptidu v játrech;
3. lze takto sledovat i pacienty, kterým je podáván exogenní insulin.

Nevýhodou dosud syntetizovaných lidských modifikovaných C-peptidů je, že není možno kvantitativně sledovat přímými metodami navázání ligandu na makromolekulární nosič.

Předmět vynálezu je lidský modifikovaný C-peptid vzorce:



kde

X je tyrosin a

Y je např. norvalin nebo norleucin.

Substituent X může být např. Tyr nebo jakákoliv aminokyselina umožňující vnesení radioaktivního atomu a Y napřirozená aminokyselina, tj. aminokyselina nevyskytující se v lidském organismu. Tuto aminokyselinu, např. Nva, Nle apod., lze použít k monitorování vazby na makromolekulární nosič.

Dále je předmětem vynálezu způsob výroby lidského modifikovaného C-peptidu spočívající v tom, že peptid se syntetizuje na benzhydrylaminovém nebo chlormethylovaném polymerním nosiči známým způsobem při teplotě místnosti.

Přehled jednotlivých kroků syntézy je uveden schematicky v tabulce 1 a 2.

Modifikovaný C-peptid byl připraven dvěma způsoby na pevné fázi (Stewart J. M.; Young J. D.: Solid phase peptide synthesis, Pierce Chemical Company Rockford, 176 s. /1984/), kdy jako výchozích látek bylo použito 9-fluorenylmethyloxykarbonyl-(Fmoc), resp. t-butyloxykarbonyl-(Boc) derivátů aminokyselin. Výsledný produkt byl odštěpen z pryskyřice a čištěn obvyklými purifikačními metodami — např. elektroforeticky, gelovou a ionexovou chromatografií, vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC). Čistota byla ověřována elektroforeticky, HPLC a aminokyselinovou analýzou. Imunoreaktivita byla ověřena radioimunoanalyticky.

Modifikovaný C-peptid je imunoreaktivní a bylo jej použito k přípravě polyklonálního králičího antiséra. Lze jej značit např. radioaktivním ^{125}I a použít tak pro přípravu kompletní soupravy pro RIA stanovení C-peptidu.

Dále jsou uvedeny příklady způsobu výroby modifikovaného lidského C-peptidu podle vynálezu.

Přík l a d 1

Příprava modifikovaného C-peptidu podle vynálezu pomocí Fmoc-derivátů aminokyselin

Bylo použito 1,0 g benzhydrylaminové pryskyřice, na kterou bylo navázáno acidolabilní ramínko (3/4-hydroxymethylfenoxypropionát) s první C-koncovou aminokyselinou Nva, substituce byla 0,4 mmol/g pryskyřice (Albericio F.; Barany G.: Int. J. Peptide Protein Res., 26, 92 /1985/).

α -aminoskupiny aminokyselin byly chráněny skupinou Fmoc-, postranní řetězce Glu a Asp byly chráněny skupinou OBU^t - (t-butylester) a hydroxylová skupina Ser byla chráněna Bu^t - (t-butylether-). Karboxylové skupiny byly aktivovány jako estery N-hydroxybenztriazolu (HOBt) (u Gln bylo použito symetrického anhydridu). Syntéza byla prováděna podle postupu, viz tab. 1. Fmoc-skupina byla odštěpována roztokem piperidinu v dimethylformamidu (DMF) (1:1). Jako kondenzační činidlo byl používán dicyklohexylkarbodiimid. Úplnost kondenzace byla sledována ninhydrinovým testem (u Pro chloranilovým testem).

Hotový peptid (a zároveň chránící skupiny postranních řetězců aminokyselin) byl štěpen z pryskyřice 45% roztokem trifluoroctové kyseliny (TFA) v dichlormethanu (2 h), a vysrážen etherem, z pryskyřice byl dále extrahován 30% kyselinou octovou, vodou a lyofilizován. Peptid byl čištěn na Biogelu P4, DEAE Sephadexu a vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (HPLC).

Výtěžek po gelové filtraci byl 0,904 g peptidu, tj. 70 %. Peptid čištěný pomocí ione-

xové chromatografie a preparativní HPLC je elektroforeticky (s relativní pohyblivostí ke glycinu v pufru o pH = 2,4, E = 0,25) i HPLC jednotný. Výsledek aminokyselinové analýzy odpovídá aminokyselinovému složení:

Teoretické zastoupení		Analýza
Asp	1	0,83
Ser	2	1,8
Gln + Glu	8	7,6
Pro	2	2,2
Gly	7	6,5
Ala	3	3,0
Val	2	1,7
Nva	1	0,97
Leu	6	5,97
Tyr	1	0,7

Peptid byl navázán na hovězí sérumalbumin a konjugátu bylo použito pro přípravu králičího a morčecího antiséra.

Příklad 2

Příprava modifikovaného C-peptidu podle vynálezu pomocí Boc- chráněných aminokyselin

Bylo použito 0,5 g chlormethylované pryskyřice, na které byl navázán Nle v substituci 0,32 mmol/g pryskyřice. α -aminoskupiny

Tabulka 1

Fmoc-příprava		
krok	reagencie (~ 15 ml)	min.
1	CH ₂ Cl ₂ (2X)	3
2	DMF (2X)	3
3	DMF : piperidin (2X) (1 : 1)	20
4	DMF (2X)	3
5	dioxan : H ₂ O (2 : 1) (2X)	10
6	DMF (3X)	5
7	CH ₂ Cl ₂ (či DMF) (3X)	5
8	HOBt ester Fmoc-AK či symetrický anhydrid (3 ekv.) v CH ₂ Cl ₂ (či CH ₂ Cl ₂ : DMF)	15 a více
9	ninhydrinový test	5
10	opakovat kondenzaci v př. potřeby (krok 7-9)	
11	DMF (5X)	8
12	2-propanol (5X)	8
13	CH ₂ Cl ₂ (5X)	8

Poznámka:

TEA = triethylamin

AK = aminokyselina

ny aminokyselin byly chráněny skupinou Boc-, karboxylové skupiny postranních řetězců Glu, Asp skupinou OBzl- (benzylester-), hydroxyskupina Ser skupinou Bzl- (benzylether-). Aminokyseliny byly aktivovány jako estery N-hydroxybenzotriazolu, popř. jako symetrické anhydridy. Syntéza byla prováděna podle postupu v tab. 2. Boc-skupina byla štěpena 45% trifluoroctovou kyselinou v dichlormethanu. Jako kondenzačního činidla bylo použito dicyklohexylkarbodiimidu. Průběh kondenzace byl sledován ninhydrinovým, popř. chloranilovým a acetylačním testem.

Hotový peptid (a chránicí skupiny postranních řetězců) byl štěpen 1 h kapalným fluorovodíkem v přítomnosti 3% thioanizolu, který byl potom extrahován ethylacetátem, peptid byl extrahován 30% kyselinou octovou, vodou a lyofilizován. Čištěn byl gelovou chromatografií (na Biogelu P4 nebo Fraktogelu), popř. elektroforeticky. Byla získána směs peptidů (0,493 g), v níž byl prokázán celý C-peptid. Imunoreaktivita produktu byla 60% aktivity komerčního C-peptidu (fy BIODATA). Produktu bylo použito pro tvorbu konjugátu s hovězím sérumalbuminem a pro produkci králičího antiséra.

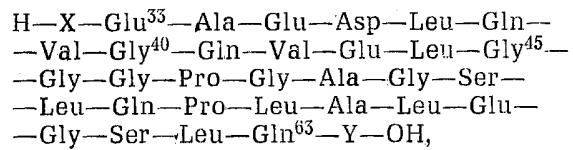
Lidský modifikovaný C-peptid podle vynálezu je vhodný pro radioimunoanalytické stanovení a pro přípravu protilátek, např. králičího a morčecího antiséra.

Tabulka 2

Boc-příprava		
krok	reagencie (~ 15 ml)	min.
1	CH ₂ Cl ₂ (4X)	7
2	45 % TFA v CH ₂ Cl ₂ (1X)	2
3	45 % TFA v CH ₂ Cl ₂ (1X)	20
4	CH ₂ Cl ₂ (3X)	5
5	8% TEA v CH ₂ Cl ₂ (2X)	3
6	CH ₂ Cl ₂ (4X)	7
7	HOBt ester Boc-AK či symetr. anhydrid (3 ekv.) v CH ₂ Cl ₂	40 i více
8	ninhydrinový test	5
9	CH ₂ Cl ₂ (3X)	5
10	2-propanol (3X)	5
11	CH ₂ Cl ₂ (4X)	7
12	opakovat kondenzaci v př. potřeby (krok 7-11)	

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Lidský modifikovaný C-peptid vzorce:



kde

X je tyrosin a

Y je norvalin nebo norleucin.

2. Způsob přípravy lidského modifikovaného C-peptidu podle bodu 1, vyznačený tím, že peptid se syntetizuje na benzhydrylaminovém nebo chlormethylovaném polymerním nosiči, při teplotě místnosti.