

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **239303**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428089**

(22) Data zgłoszenia: **06.12.2018**

(51) Int.Cl.

A61K 38/08 (2019.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(54)

Peptydy do zastosowania w prewencji i leczeniu stanu zapalnego

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL

UNIwersytet Jagielloński, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

PAULINA KOSIKOWSKA-ADAMUS,
Gdynia, PL

ADAM LESNER, Gdańsk, PL

JOANNA KOZIEŁ, Kraków, PL

ANNA GOLDA, Kraków, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

PL 239303 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są peptydy do zastosowania w ograniczeniu nadmiernego lokalnego stanu zapalnego wywołanego przez infekcje bakteryjne, jak również ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, jak sepsa, zapaleniu, któremu towarzyszy wzrost mediatorów stanu zapalnego, m.in. cytokin, reaktywnych form azotu. Wynalazek dotyczy peptydów – koniugatów mających zastosowanie w prewencji i leczeniu stanu zapalnego.

Organizm ludzki jest stale narażony na działanie chorobotwórczych mikroorganizmów, dzięki czemu w toku ewolucji wypracował szereg skutecznych mechanizmów zapobiegających rozwojowi zakażeń oraz zwalczających infekcje. W wielu przypadkach jednakże organizm nie jest w stanie wyeradycować patogenu i zahamować infekcję, czego konsekwencją jest nadmierny rozwój stanu zapalnego, który może przyczyniać się do postaci ogólnoustrojowej. W związku z czym poszukuje się skutecznych środków leczniczych zapobiegających niekontrolowanemu rozwojowi stanu zapalnego.

Pierwszą reakcją układu odpornościowego w odpowiedzi na stan zapalny np. wywołany przez zakażenie, jest aktywacja komórek immunokompetentnych (makrofagów, monocytów, neutrofilii, komórek dendrytycznych). Czynnikiem aktywującym odpowiedź immunologiczną są tzw. wzorce molekularne specyficzne dla patogennych mikroorganizmów – PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*), do których należą np., lipid A (fragment lipopolisacharydu (LPS)), peptydoglikan (PGN), kwas lipoteichoowy (LTA, ang. lipoteichoic acid). Struktury PAMP są rozpoznawane przez receptory na powierzchni komórek odpornościowych, tzw. receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors- PRR), do których należą receptory TLR (ang. Toll-like receptors). Rozpoznanie antygenów przez receptory TLR uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych w wyniku których zostają uwolnione cytokiny prozapalne, m.in. interleukina 1- α i β (IL-1 α , IL-1 β) interleukina 6, 8, 10 (IL-6, IL-8, IL-10), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α), co opisano w Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." *Clin Microbiol Rev* 22(2): 240–273. Czynniki te uwalniane są również w przypadku zapaleń spowodowanych przez inne czynniki niż bakterie. Nieduże stężenie tych mediatorów zapalnych w organizmie, które wydzielane są w odpowiedzi na komponenty mikroorganizmów (PAMP), aktywuje prawidłową odpowiedź układu immunologicznego neutralizującą zakażenie. W przypadku gwałtownie namnażających się patogenów dochodzi jednakże do ogólnoustrojowej nadmiernej reakcji zapalnej organizmu, mającej na celu szybkie stłumienie infekcji. Skutkuje to uwolnieniem większej ilości patogennych czynników powstających w wyniku rozpadu bakterii i dalszą aktywacją stanu zapalnego. W konsekwencji dochodzi do rozwoju szoku septycznego. Nadmierne pobudzenie układu odpornościowego w takim przypadku może mieć skutek letalny lub powodować trwałe uszkodzenie narządów wewnętrznych. Istotne jest więc w przypadku sepsy nie tylko natychmiastowe zastosowanie antybiotyku o szerokim spektrum działania, lecz wprowadzenie także leków neutralizujących działanie mediatorów stanu zapalnego lub blokujących receptory komórkowe dla tych mediatorów.

Na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego UG od wielu lat prowadzone są badania nad projektowaniem i syntezą biologicznie aktywnych peptydów. W publikacji "Synthesis and Evaluation of Biological Activity of Antimicrobial-Pro-Proliferative Peptide Conjugates." *PLoS One* 10(10): e0140377 przedstawiono wyniki eksperymentów nad analizą właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz pro-proliferacyjnych opracowanych koniugatów peptydowych składających się z wyselekcjonowanych peptydów przeciwdrobnoustrojowych AMP (ang. antimicrobial peptides) oraz wybranych peptydów o innych właściwościach m.in. stymulujących procesy gojenia ran, gdzie, m.in. przeanalizowano aktywność koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DK5. Wspomniane koniugaty składają się z dwóch sekwencji aminokwasowych, odpowiadających peptydom: dalarginie (DAL) oraz DK5, kowalencyjnie połączonym ze sobą przy pomocy linkera PEG (cząsteczka kwasu 8-amino-3,6-dioksaoktanowego). W modelu *in vitro* dla tych związków potwierdzono aktywność hamującą wzrost bakterii gram-ujemnych i gram-dodatnich oraz drożdżaków z rodzaju *Candida*. Publikacja opisuje jedynie analizę wpływu związków na wzrost mikroorganizmów oraz wpływ koniugatów na proliferację i migrację ludzkich keratynocytów i fibroblastów. We wspomnianej publikacji nie analizowano właściwości przeciwwzapalnych koniugatów, których mechanizm jest odmienny od mechanizmu determinującego właściwości przeciwdrobnoustrojowe koniugatów i z opisywanej analizy nie wynikają właściwości przeciwwzapalne.

Dalargina (Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-OH), dalej jako DAL, jest syntetycznym analogiem endogenego peptydu opioidowego Leu-enkefalin. Aktywność fizjologiczna DAL w tkankach obwodowych wy-

nika z oddziaływania z receptorami μ i δ – opioidowymi, co zostało opisane w artykule autorstwa Pencheva, Pospisek i współpracowników "Activity profiles of dalargin and its analogues in μ -, delta- and kappa-opioid receptor selective bioassays." *BrJ Pharmacol* 128(3): 569–576 (1999).

DAL w formie natywnej (nie skoniugowanej z nośnikiem nano-molekularnym) nie przekracza bariery krew-mózg. W publikacjach (Grigorevskii, Korotkina i wsp. 1989 "[Dalargin in the prevention of acute postoperative pancreatitis]." *Klin Khir(II)*: 9–12.; Georgadze, Fomin i wsp. 1990 [Treatment of peptic ulcer hemorrhage with leucine enkephalin analog dalargin]." *Khirurgiia (Mosk)*(3): 39–43; Grekova, Reznikov i wsp. 1994 "[The effect of dalargin on the course of experimental cardiac arrhythmias]." *Eksp Klin Farmakol* 57(2): 24–26.; Dontsov 2015 "[The Antioxidant Effect of Dalargin in Patients with Coronary Heart Disease and Metabolic Syndrome]." *Eksp Klin Farmakol* 78(7): 3–6.) ujawniono, że związek ten hamuje wydzielanie enzymów trawiennych, ma działanie przeciwbólowe, zmniejsza obrzęk po zabiegach operacyjnych trzustki, reguluje rytm pracy serca oraz wykazuje lokalne działanie antyoksydacyjne w przypadku zawału mięśnia sercowego. Nie ujawniono wpływu dalarginy na zmniejszenie stanu zapalnego, w tym wywołanego w skutek zakażenia bakteryjnego.

Dalargina znana jest jako lek skuteczny w terapii choroby wrzodowej żołądka, w leczeniu ostrych stanów zapalnych trzustki. Lek podawany w formie kroplówek lub dożylnie zmniejszał obrzęk trzustki oraz działał przeciwbólowo. Znana jest z patentu RU 2 341 282 mieszanina oktreotydu (0,1 mg/kg) i dalarginy (0,8 i 0,9 mg/kg) o działaniu hamującym aktywność enzymatyczną trzustki.

Peptyd DK5 (Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-Iys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂) jest syntetycznym analogiem naturalnie występującej temporyny – 1CEb, związku pozyskanego ze śluzu skórniego żab *Rana amurensis* i *Rana dybowskii*. W publikacji autorstwa Shang, D., X. Li i współpracowników "Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, temporin1CEb from Chinese brown frog, *Rana chensinensis*." *Chem Biol Drug Des* (2012) 79(5): 653–662 opublikowano że związek posiada wysoką aktywność hamującą wzrost szeregu szczepów gram-ujemnych i gram-dodatnich oraz niską aktywność hemolityczną względem ludzkich erytrocytów.

Powyższe badania nie wskazują, że związek ten działa przeciwzapalnie.

W trakcie badań eksperymentalnych prowadzonych we współpracy pomiędzy zespołem naukowym Wydziału Chemii UG (dr inż. Paulina Kosikowska-Adamus, prof. Dr hab. Adam Lesner) oraz zespołem badaczy z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (dr hab. Joanna Kozieł, dr Anna Golda), nieoczekiwanie okazało się, że koniugaty DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL posiadają zdolność do zapobiegania rozwojowi patologicznego stanu zapalnego oraz zwalczania stanu zapalnego, w tym ogólnoustrojowego stanu zapalnego jak sepsa wywołaną zakażeniem bakteryjnym. Skuteczność związków monitorowana była poprzez ocenę poziomu mediatorów stanu zapalnego, m.in. cytokin, reaktywnych form azotu była potwierdzona w modelach *in vitro* (DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL) i *in vivo* (wyłącznie DAL-PEG-DK5). Badania prowadzone były na modelu zapalenia wywołanego przez bakteryjną endotoksynę – LPS. Wyniki te znalazły odzworowanie w modelu *in vitro* z wykorzystaniem zakażonej bakterią *E. coli* krwi obwodowej, co dowodzi, że obserwacje poczynione z wykorzystaniem LPS znajdują zastosowanie podczas infekcji ogólnoustrojowej. Badania eksperymentalne potwierdzają zatem skuteczność związków w obniżaniu poziomu mediatorów zapalenia, zwłaszcza w przypadku zapalenia wywołanego zakażeniem bakteriami Gram-ujemnymi.

Jako ogólnoustrojowy stan zapalny rozumie się stan spowodowany, na przykład, zakażeniem, któremu towarzyszy aktywacja receptorów odpowiedzi nieswoistej toll-podobnych TLR i/lub uwalnianie cytokin pro-zapalnych (m.in. TNF- α , IL-6, IL-8) oraz powstawanie reaktywnych form azotu (m.in. tlenku azotu NO) i innych mediatorów stanu zapalnego.

Przedmiotem wynalazku jest zatem peptyd o wzorze 1:

Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-Iys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂ do zastosowania w prewencji zapalenia, zwłaszcza do zastosowania w prewencji ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, w tym do zastosowania w prewencji sepsy. Wynalazek dotyczy zwłaszcza zastosowania w prewencji zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym. Zastosowanie do dotyczy ludzi jak i zwierząt.

Wynalazek dotyczy również peptydu o wzorze 1:

Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-Iys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂ do zastosowania w leczeniu zapalenia, zwłaszcza do zastosowania w leczeniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, w tym sepsy. Wynalazek dotyczy zwłaszcza zastosowania w leczeniu zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym. Zastosowanie do dotyczy ludzi jak i zwierząt.

Wynalazek dotyczy również peptydu o wzorze 2:

Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-lys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O2Oc-Tyr-ala-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania w prewencji zapalenia, zwłaszcza do zastosowania w prewencji ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, w tym sepsy. Wynalazek dotyczy zwłaszcza zastosowania w prewencji zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym. Zastosowanie dotyczy ludzi jak i zwierząt.

Wynalazek dotyczy również peptydu o wzorze 2:

Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-lys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O2Oc-Tyr-ala-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania w leczeniu zapalenia, zwłaszcza do zastosowania w leczeniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej, w tym do zastosowania w leczeniu sepsy. Zastosowanie dotyczy zwłaszcza leczenia zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym.

Aktywność przeciwzapalną koniugatów zbadano w modelu linii komórkowych mysich makrofagów (RAW 264.7) i pierwotnych ludzkich makrofagów (hMDM, ang. human monocyte derived macrophages), stymulowanych bakteryjnym lipopolisacharydem (LPS) wyizolowanym z komórek szczepu *Escherichia coli*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że koniugat DAL-PEG-DK5 skutecznie obniża poziom ekspresji mediatorów stanu zapalnego TNF- α , IL-6, IL-8 oraz redukuje powstawanie reaktywnych form azotu (NO), towarzyszących stresowi nitrozacyjnemu komórek. Aktywność przeciwzapalna DK5-PEG-DAL była niższa w porównaniu do DAL-PEG-DK5. Istotne jest jednak, że pojedyncze peptydy DAL i DK5 nie wykazywały żadnych właściwości przeciwzapalnych, gdyż w większości eksperymentów nie miały one wpływu na poziom wydzielanych cytokin, bądź reaktywnych form azotu. Eksperymenty *in vivo*, gdzie wykorzystano myszy model szoku septycznego wywołanego przez LPS, prowadzono z użyciem najbardziej aktywnej pochodnej koniugatu – DAL-PEG-DK5. W tych doświadczeniach udowodniono skuteczność DAL-PEG-DK5 w neutralizacji efektów wywołanych przez toksynę LPS. Podanie dootrzewnowe LPS z *E. coli* w stężeniu 0,1 $\mu\text{g/g}$ powodowało 90% śmiertelność myszy w ciągu 26 godzin. Natomiast jednocześnie podanie LPS z badanym koniugatem DAL-PEG-DK5 (25 $\mu\text{g/ml}$) skutkowało 100% przeżywalnością myszy oraz obniżonym poziomem mediatorów prozapalnych (IFN- γ , MCP-1) mierzonym w surowicy krwi. Szczegółowe wyniki badań przedstawiono w opisie przykładów.

Wyniki tych badań potwierdziły, że koniugat DAL-PEG-DK5 jest zdolny w znacznym stopniu zredukować poziom uwalniania cytokin prozapalnych w odpowiedzi na obecność bakteryjnych antygenów – toksyn (LPS, LTA), składników ściany komórkowej – PGN (peptydoglikan). Ponadto stwierdzono, że efekt przeciwzapalny dla związku DAL-PEG-DK5 wynika ze zdolności do bezpośredniej neutralizacji endotoksyny bakteryjnej, która w ten sposób traci zdolność do aktywacji komórek gospodarza.

Wyniki badań *in vitro* również potwierdzają skuteczność przeciwzapalną obu koniugatów – DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL – redukcję poziomu uwalniania cytokin prozapalnych i innych mediatorów stanu zapalnego.

Określenia i skróty stosowane w opisie mają następujące znaczenie:

AMP – peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial peptides)

DCM – dichlorometan

DIPEA – N,N-diizopropyl-etyloamina

DMF – dimetyloformamid

hMDM – linia pierwotnych ludzkich makrofagów pochodzących z monocytów (ang. Human monocyte derived macrophages)

HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. high-performance liquid chromatography)

IC₅₀ – stężenie hamujące aktywność/proces biologiczny itp. w 50% w stosunku do kontroli

IFN- γ – interferon γ

IL – interleukina

LPS – lipopolisacharyd

LTA – kwas lipoteichoowy (ang. Lipoteichoic acid)

MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów (ang. macrophage chemoattractant protein-1)

MOI – wielokrotność zakażenia (ang. multiplicity of infection)

NF- κ B – jądrowy czynnik transkrypcyjny kappa B

TFA – kwas trifluorooctowy

TLR-toll – podobne receptory (ang. Toll-like receptors)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor)

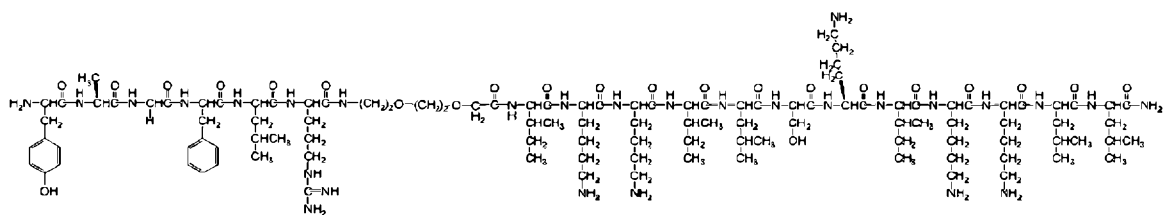
PAMP – wzorce molekularne specyficzne dla patogennych mikroorganizmów (ang. pathogen-associated molecular patterns)

PEG – kwas 8-amino-3,6-dioksaoktanowy

PGN – peptydoglikan

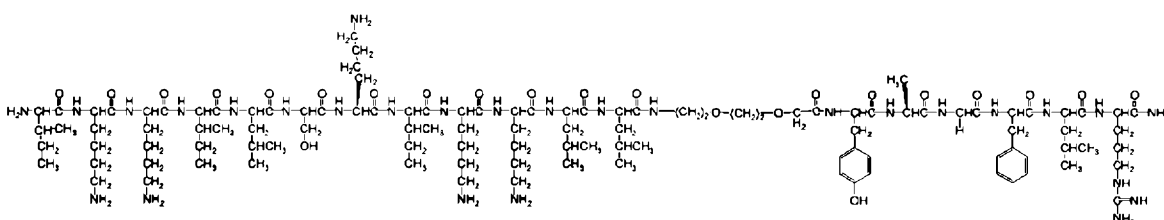
Na wzorze 1 i wzorze 2 przedstawiono strukturę związków według wynalazku, odpowiednio w konfiguracji od pozycji 1 do 19.

Tyr-*α*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-lys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂



Wzór 1 - DAL-PEG-DK5

Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-lys-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu- O₂Oc-Tyr-*α*-Gly-Phe-Leu-Arg- NH₂



Wzór 2 - DK5-PEG-DAL

Wynalazek opisano również bliżej w przykładach wykonania i na rysunku: fig. 1–fig. 10, gdzie na fig. 1–fig. 4 przedstawiono potwierdzenie otrzymania koniugatów, zaś na fig. 5–fig. 10 skuteczność ich działania. Szczegółowo na fig. 1 pokazano widmo mas koniugatu DAL-PEG-DK5 uzyskane techniką spektrometrii MALDI-TOF. Masa teoretycznie obliczona dla DAL-PEG-DK5 wynosi 2277,9 Da, zidentyfikowany jon masowy wynosi 2277,9 Da. Na fig. 2 pokazano widmo mas koniugatów DK5-PEG-DAL uzyskane techniką spektrometrii MALDI-TOF. Masa teoretycznie obliczona dla DK5-PEG-DAL wynosi 2276,9, sygnał 2277,9 stanowi jon pseudomolekularny $[M+H]^+$. Fig. 3 pokazuje chromatogram RP-HPLC koniugatu peptydowego DAL-PEG-DK5. Ustalony czas retencji dla DAL-PEG-DK5 wyniósł 22,735 min. Fig. 4 to chromatogram RP-HPLC koniugatu peptydowego DK5-PEG-DAL. Ustalony czas retencji dla DK5-PEG-DAL wynosi 19,767 min. Fig. 5 wskazuje na ocenę stężenia mediatorów stanu zapalnego indukowanych przez wybrane agonisty receptorów toll-podobnych (TLR) w obecności badanych związków. A-pomiar stężenia cytokiny $TNF\alpha$; B-pomiar stężenia NO (pośrednie) wg metody Griessa. Fig. 6 pokazuje analizę stężenia uwalnianych cytokin prozapalnych w hodowli ludzkich makrofagów (hMDMs) stymulowanych LPS (A); analiza poziomu cytokiny $TNF\alpha$ w próbkach krwi po 20 godzinach od dodania LPS (B); analiza stężenia cytokiny $TNF\alpha$ w nadsączach komórkowych hodowli hMDMs zainfekowanej szczepem *E. coli* (MOI 1:50). Fig. 7 reprezentuje analizę porównawczą wpływu peptydów na redukcję poziomu $TNF\alpha$ oraz NO w obecności LPS. A. wyniki uzyskane dla ludzkich makrofagów (hMDMs); B. wyniki uzyskane dla mysich makrofagów (RAW 264.7). Fig. 8 wskazuje analizę wpływu peptydu DAL-PEG-DK5 na wiązanie się LPS do powierzchni makrofagów (A) ludzkich, hMDMs, (B) mysich, RAW 264,7. LPS+DAL-PEG-DK5 – LPS był dodawany jednocześnie z koniugatem; LPS/DAL-PEG-DK5 – dodanie peptydu było poprzedzone 2-godzinną pre-inkubacją komórek z LPS; DAL-PEG-DK5/LPS – dodanie LPS było poprzedzone 2-godzinną inkubacją komórek z DAL-PEG-DK5. (C) Analiza wiązania znakowanego fluorescencyjnie LPS (AF488-LPS) do powierzchni komórek RAW 264,7. Fig. 9 reprezentuje ocenę wpływu DAL-PEG-DK5 oraz SCR na dimeryzację kompleksu TLR4/MD2 (A)

oraz aktywację szlaku sygnałowego NF- κ B (B), a 10 (A) ocenę wpływu podania DAL-PEG-DK5 na przeżywalność myszy szczepu C57BL/6 w modelu szoku septycznego wywołanego przez LPS, 10 (B) stężenia cytokin prozapalnych w surowicy krwi myszy po 26 godzinach od podania LPS lub LPS z DAL-PEG-DK5.

Przykład 1

Synteza chemiczna koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL

Do otrzymania koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL wykorzystano strategię syntezy na nośniku stałym zgodnie z metodą chemii Fmoc/tBu. Użyto w tym celu żywicy polimerowej TentaGel S RAM (Rapp Polymere GmbH, Niemcy) o stopniu osadzenia 0,24 mmol/g. Syntezę obu związków wykonano manualnie.

Synteza DAL-PEG-DK5 i DK5-PEG-DAL składała się z następujących etapów:

1. Usunięcie ugrupowania Fmoc grupy aminowej żywicy TentaGel S RAM poprzez wytrząsanie z roztworem 20% piperydyny w DMF. Trzykrotne przemycie żywicy z użyciem, kolejno: DMF, izopropanolu, DCM.
2. Przyłączenie pierwszej Fmoc-chronionej reszty aminokwasowej. W przypadku DAL-PEG-DK5 do żywicy dodano roztwór Fmoc-Leu-OH w DMF, dla DK5-PEG-DAL-Fmoc-Arg(Pbf)-OH w DMF. Dodatkowo do roztworu dodano odczynniki aktywujące grupy karboksylowe Fmoc-chronionych reszt aminokwasowych – HOBt/HBTU i DIPEA. Stosunek molowy poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej wynosił (1:1:1:2), tzn. 1 mol chronionego aminokwasu : 1 mol HOBt : 1 mol HBTU: 2 mole DIPEA. Do reakcji użyto 3-krotnego nadmiaru odczynników w stosunku do stopnia osadzenia żywicy. Reakcję acylowania prowadzono wytrząsając żywicę z mieszaniną reakcyjną przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym odpłukaniu żywicy (DMF/izopropanol, DCM), reakcję powtórzono. Postęp reakcji acylowania kontrolowano wykonując test chloranilowy, wykrywający na powierzchni ziarna żywicy wolne grupy aminowe.
3. Deprotekcję osadzonej na żywicy reszty aminokwasowej prowadzono tak jak w pkt. 1 stosując 20% piperydynę w DMF oraz przemywając żywicę po deprotekcji trzykrotnie DMF, izopropanolu, DCM.
4. Przyłączenie kolejnej reszty Fmoc-chronionego aminokwasu odbywało się wg. tej samej procedury opisanej w pkt. 2. Następnie usunięcie grupy ochronnej Fmoc przyłączonej reszty prowadzono wg. procedury opisane w pkt. 1 lub 3.

Kolejność przyłączania reszt aminokwasowych w trakcie syntezy DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL przedstawia tabela 1

Tabela 1. Wykaz i kolejność przyłączania reszt aminokwasowych w przebiegu syntezy koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL

Kolejność przyłączania reszt aminokwasowych	Synteza peptydów	
	DAL-PEG-DK5	DK5-PEG-DAL
1	Fmoc-Leu-OH	Fmoc- Arg(Pbf)-OH
2	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leu-OH
3	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Phe-OH
4	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Gly-OH
5	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-D-Ala-OH
6	Fmoc-D-Lys (Boc)-OH	Fmoc-Tyr-OH
7	Fmoc-Ser(tBu)-OH	Fmoc-O ₂ Oc-OH
8	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leu-OH
9	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Leu-OH
10	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
11	Fmoc-Lys(Boc)-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
12	Fmoc-Ile-OH	Fmoc-Ile-OH
13	Fmoc-O ₂ Oc-OH	Fmoc-D-Lys (Boc)-OH
14	Fmoc- Arg(Pbf)-OH	Fmoc-Ser(tBu)-OH
15	Fmoc-Leu-OH	Fmoc-Leu-OH
16	Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Ile-OH
17	Fmoc-Gly-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
18	Fmoc-D-Ala-OH	Fmoc-Lys(Boc)-OH
19	Fmoc-Tyr-OH	Fmoc-Ile-OH

5. Po przyłączeniu ostatniej reszty z sekwencji aminokwasowej (punkt 19 Tabeli 2) i usunięciu osłony Fmoc peptydy DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL zdjęto z żywicy z jednoczesnym usunięciem osłon bocznych przy użyciu mieszaniny TFA/Fenol/Triisopropylsilan/H₂O (88:5:2:5. v/v).

Surowe preparaty peptydów następnie poddano oczyszczaniu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC, ang. reverse-phase high-performance liquid chromatography) w celu uzyskania homogennych preparatów koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL.

Masa cząsteczkowa koniugatów została potwierdzona za pomocą spektrometrii mas z desorpcją laserową z udziałem matrycy oraz analizatorem czasu przelotu MALDI-TOF (ang. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation –Time of Flight Mass Spectrometry). Przedstawione we wniosku widma masowe dla DAL-PEG-DK5 i DK5-PEG-DAL (Fig. 1, 2) wskazują na obecność jonu dominującego o stosunku masy do ładunku (m/z) wynoszącym 2277,9 Da, który jest zgodny z teoretyczną masą cząsteczkową obliczoną dla koniugatów, odpowiednio: 2277,9 Da dla DAL-PEG-DK5 oraz 2276,9 Da dla DK5-PEG-DAL, dla którego dodatkowy ładunek na widmie masowym wynika z obecności jonu pseudomolekularnego $[M+H]^+$. Jednorodność końcowych preparatów zbadano z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (RP-HPLC). Związki poddano rozdzielaniu w gradiencie 1–80% fazy B w fazie A w ciągu 30 min przy przepływie 1 ml/min. Faza A: 0,1% roztwór TFA w wodzie, faza B: 80% roztwór acetonitrylu w fazie A. Detekcję prowadzono przy długości fali wynoszącej 226 nm. Do analizy wykorzystano system HPLC marki Shimadzu oraz kolumnę Phenomenex Jupiter 4 μ m Proteo 90Å (250 x 4,6 mm). Przedstawione we wniosku chromatogramy (Fig. 3, 4) przedstawiają frakcje analitu odpowiadające koniugatowi DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL o wyznaczonych czasach retencji, odpowiednio: 22,735 min oraz 19,767 min.

Potwierdzenie tożsamości chemicznej oraz homogeniczności preparatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL pokazano na fig. 1–fig. 4.

Przykład 2

Badanie właściwości przeciwwzapalnych koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL – potwierdzenia *in vitro* działania prewencyjnego i leczniczego zapalenia miejscowego jak i ogólnoustrojowego

I. Eksperymenty *in vitro*:

1. Wpływ koniugatów DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL na poziom uwalniania cytokiny TNF- α oraz reaktywnych form azotu (NO) w modelu mysich makrofagów w obecności LPS, LTA i PGN

Celem eksperymentów było określenie wpływu DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL na zmniejszenie stopnia odpowiedzi pro-zapalnej mysich makrofagów (RAW 264.7) w obecności LPS, LTA oraz PGN. Aktywność koniugatów w tym zakresie została porównana do aktywności ich składowych (DK5, DAL). Komórki były stymulowane, odpowiednio: 10 ng/ml LPS, 10 μ g/ml LTA lub 2 μ g/ml PGN w obecności badanych związków w stężeniu 25 μ g/ml lub bez peptydów. Po upływie 20 godzin mierzono za pomocą testów ELISA albo Griess'a, odpowiednio, poziom ekspresji cytokiny TNF- α oraz stężenie uwolnionego tlenku azotu (NO). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że koniugat DAL-PEG-DK5 charakteryzuje się najlepszą (w porównaniu do wyników uzyskanych dla DAL, i DK5) zdolnością do hamowania ekspresji markerów odpowiedzi zapalnej (najniższe stężenie mediatorów stanu zapalnego TNF- α , NO) wywoływanej przez wybrane typy agonistów receptorów TLR (Fig. 5). Aktywność koniugatu DK5-PEG-DAL w obecności LPS była porównywalna dla wartości uzyskanych dla DAL-PEG-DK5 (Fig. 5, panel LPS), natomiast była znacząco niższa (na poziomie próby kontrolnej, bez badanych związków) w obecności LTA oraz PGN, porównywalna do wartości uzyskanych dla DAL i DK5.

2. Wpływ DAL-PEG-DK5 oraz DK5-PEG-DAL na poziom uwalniania cytokin prozapalnych w modelu ludzkich makrofagów w obecności LPS oraz zawiesiny bakterii *Escherichia coli*

Poziom aktywacji makrofagów określano przez pomiar stężenia cytokin TNF- α , IL-6, IL-8 oraz IL-10 uwalnianych przez komórki pod wpływem LPS (10 ng/ml). Analizę wykonano po 20 godzinach od stymulacji bakteryjną endotoksyną. Eksperymenty prowadzono z wykorzystaniem pierwotnej linii ludzkich makrofagów (hMDM), do których dodawano badane związki w stężeniu 10 μ g/ml. Uzyskane wyniki przedstawione na Fig. 6 jednoznacznie wykazały, że peptydy DAL-PEG-DK5 i DK5-PEG-DAL istotnie statystycznie hamują ekspresję cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10) (Fig. 6A).

Dodatkowo, sprawdzono wpływ obecności peptydów na poziom ekspresji cytokiny TNF- α w pełnej krwi obwodowej stymulowanej LPS (10 ng/ml) oraz w hodowli komórkowej makrofagów zakażonej

E. coli (MOI 1:50; MOI, ang. multiplicity of infection). W obu przypadkach koniugat DAL-PEG-DK5 najbardziej wydajnie hamował uwalnianie cytokiny TNF- α . Aktywność koniugatu DK5-PEG-DAL w tych eksperymentach była niższa, jednak lepsza niż w przypadku wolnej DAL lub DK5 (Fig. 6B, C).

Wyniki badań jednoznacznie wskazują na to, że obecność koniugatu DAL-PEG-DK5 skutecznie obniża poziom ekspresji markerów stanu zapalnego w hodowli pierwotnych ludzkich makrofagów w obecności LPS oraz zakażonych bakteriami *E. coli*. Co więcej, koniugat DAL-PEG-DK5 wydajnie neutralizuje endotoksynę w środowisku przypominającym warunki fizjologiczne – eksperyment prowadzony z wykorzystaniem pełnej krwi ludzkiej.

3. Wyznaczenie wartości współczynnika inhibicji IC_{50} ekspresji mediatorów stanu zapalnego (TNF- α oraz NO) dla koniugatów DAL-PEG-DK5 i DK5-PEG-DAL oraz ich składowych

W celu określenia skuteczności działania przeciwzapalnego dla poszczególnych związków wyznaczono stężenie hamujące o 50% (IC_{50} , ang. inhibitory concentration) stymulację makrofagów wywołaną przez LPS. Ludzkie (hMDM) i mysie (RAW 264.7) makrofagi były inkubowane w obecności LPS (10 ng/ml) lub mieszaniny LPS (10 ng/ml) z poszczególnymi peptydami (analizowany zakres stężeń od 2,5 do 50 μ g/ml). Po upływie 20 godzin przeanalizowano stężenie cytokiny TNF- α oraz poziomu NO w nadsączach komórkowych. Uzyskane wyniki potwierdziły, że peptyd DAL-PEG-DK5 jest ponad 9-krotnie bardziej aktywny w modelu ludzkich makrofagów oraz ponad 5-krotnie w modelu mysim niż wyjściowy peptyd przeciwdrobnoustrojowy DK5. W przypadku DK5-PEG-DAL zaobserwowano pozytywny wpływ związku na redukcję poziomu cytokiny TNF α , natomiast jego efekt na stężenie NO był porównywalny do wartości uzyskanych dla natywnego peptydu DK5 (Fig. 7 Tab. 2)

Tabela 2: Wartości współczynnika inhibicji (IC_{50}) indukowanej przez LPS stymulacji makrofagów.

IC_{50} [μ g/ml]	hMDMs	RAW264.7
DK5	18,68	17,70
DAL	no *	no
DK5-PEG-DAL	15,58	19,83
DAL-PEG-DK5	2,015	3,098
SCR **	no	no

* no, nie oznaczono

** SCR - ang. scrambled peptide, peptyd typu mieszanego zaprojektowany na podstawie sekwencji DAL-PEG-DK5. Służy w doświadczeniach jako kontrola, potwierdzająca związek pomiędzy sekwencją badanych peptydów a ich aktywnością biologiczną.

Aktywność związku DK5-PEG-DAL została potwierdzona w testach *in vitro* – stwierdzono jego wpływ w stężeniu 10 μ g/ml na obniżenie poziomu cytokin prozapalnych TNF- α , IL-6, IL-10.

4. Określenie potencjalnego mechanizmu neutralizacji LPS przez DAL-PEG-DK5

a. Blokowanie bezpośredniego oddziaływania LPS z powierzchnią komórek makrofagów

W celu ustalenia czy najbardziej aktywna forma koniugatu DAL-PEG-DK5 zapobiega rozpoznaniu LPS przez makrofagi, przeprowadzono eksperyment, w którym komórki hMDM oraz RAW 264,7 były pre-inkubowane przez 2 godziny z LPS, po czym do hodowli dodano DAL-PEG-DK5 w stężeniu 10 μ g/ml w przypadku hMDM, lub 25 μ g/ml w przypadku RAW 264,7. Alternatywnie, obie linie makrofagów pre-inkubowano w obecności badanego peptydu dodanego w stężeniach jak wyżej i następnie komórki stymulowano LPS. W trzecim wariantcie fagocyty stymulowano endotoksyną w obecności DAL-PEG-

-DK5 (stężenia jak wyżej). Poziom uwolnionego TNF- α oraz NO zmierzono po 20 godzinach od stymulacji. Uzyskane wyniki wykazały, że uwalnianie TNF- α oraz NO jest znacząco hamowane w sytuacji, gdy DAL-PEG-DK5 jest podawany jednocześnie z LPS lub gdy komórki przed dodaniem LPS były preinkubowane z badanym koniugatem. Nie zaobserwowano efektu przeciwzapalnego dla DAL-PEG-DK5, gdy peptyd był dodany do komórek po ich uprzedniej pre-stymulacji LPS (Fig. 8A, B).

Wyniki te sugerują, że DAL-PEG-DK5 zapobiega oddziaływaniom LPS z powierzchnią komórek makrofagów.

Hipoteza ta została dodatkowo potwierdzona w eksperymentach z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej, w których znakowany fluorescencyjnie LPS (AF488-LPS) inkubowano z makrofagami RAW 264,7 (5×10^5 komórek/ml) bez peptydu lub w obecności DAL-PEG-DK5 w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$. Umieszczony na rys. 8C histogram wskazuje, że DAL-PEG-DK5 skutecznie blokuje oddziaływania LPS z powierzchnią makrofagów, gdyż tylko 14% z badanej puli komórek była LPS-pozytywna. (Fig. 8C). W przypadku komórek kontrolnych (pre-stymulacja LPS bez peptydu) pozytywny sygnał fluorescencyjny uzyskano dla 74% makrofagów.

b. Blokowanie dimeryzacji kompleksów TLR4/MD2 oraz szlaku sygnałowego NF- κ B przez DAL-PEG-DK5

Receptor TLR4 jest białkiem transbłonowym należącym do rodziny receptorów TLR, jest on obecny na powierzchni wielu komórek układu immunologicznego (neutrofilii, makrofagów, komórek dendrytycznych, limfocytów B, monocytów, mastocytów). TLR4 jest receptorem rozpoznającym lipopolisacharyd. Aktywacja receptora TLR4 wymaga m.in. współdziałania zewnątrzkomórkowego białka MD2. Pod wpływem LPS dochodzi do dimeryzacji kompleksu TLR4/MD2, co stanowi początkowy etap w kaskadzie aktywującej czynnik jądrowy NF- κ B.

W celu określenia wpływu DAL-PEG-DK5 na proces dimeryzacji kompleksu TLR4/MD2 użyto specyficznych przeciwciał anti-TLR4/MD2 wiążących się wyłącznie do monomerycznej formy kompleksu TLR4/MD2. Selekcja komórek z wykorzystaniem techniki cytometrii przepływowej wykazała, że obecność DAL-PEG-DK5 w zawiesinie makrofagów zapobiega aktywacji receptora TLR4 pod wpływem LPS na etapie dimeryzacji kompleksu TLR4/MD2 (Fig. 9A).

Wpływ koniugatu DAL-PEG-DK5 na aktywację czynnika NF- κ B zbadano używając reporterowej hodowli makrofagów RAW 263.7. NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym, który po wnikięciu do jądra komórki, indukuje ekspresję genów kodujących cytokiny prozapalne. Wyniki eksperymentu wykazały, że koniugat DAL-PEG-DK5 po 6 h od stymulacji komórek LPS istotnie hamuje aktywację czynnika

NF- κ B. Efekt ten nie występuje w przypadku mieszanego analogu DAL-PEG-DK5 (SCR ang. scrambled peptide) (Fig. 9B).

II. Eksperymenty in vivo – badania właściwości prewencji i leczenia zapalenia ogólnoustrojowego typu sepsa

Efekt koniugatu DAL-PEG-DK5 na przeżywalność transgenicznych myszy szczepu C57BL/6 uciążliwionych D-galaktozaminą (D-GalN) w warunkach szoku septycznego wywołanego LPS. LPS w stężeniu 0,1 $\mu\text{g/ml}$ był podany dootrzewnowo. Wyniki doświadczenia wskazują, że podanie wyłącznie LPS wywołało w 90% skutek letalny, natomiast jednoczesne podanie LPS oraz DAL-PEG-DK5 w stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ spowodowało, że wszystkie myszy z tej grupy przeżyły (Fig. 10A). Wyniki doświadczenia *in vivo* korespondują z wynikami eksperymentów *in vitro*, gdzie udowodniono, że jednoczesne podanie LPS i DAL-PEG-DK5 znacząco redukuje poziom uwalnianej cytokiny TNF- α oraz reaktywnych form tlenu azotu (NO) (Fig. 8A, B).

Analiza poziomu cytokin w surowicy pobranej od myszy, którym podano endotoksynę razem z DAL-PEG-DK5, wykazała spadek poziomu cytokin pro-zapalnych IFN- γ , MCP-1 (ang. monocyte chemoattractant protein -1, białko chemotaktyczne monocytów). W przeciwieństwie do tego, zaobserwowano wzrost poziomu cytokin IL-6 oraz IL-10, a stężenie TNF- α pozostało na niezmiennym poziomie. Powyższe dane potwierdzają potencjalną skuteczność koniugatu peptydowego DAL-PEG-DK5 w neutralizacji endotoksyny LPS oraz zapobieganiu powikłań towarzyszących szokowi septycznemu (Fig. 10.B).

Zastrzeżenia patentowe

1. Peptyd o wzorze 1:
Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂
do zastosowania w prewencji zapalenia.
2. Peptyd o wzorze 1:
Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂
do zastosowania według zastrz. 1 w prewencji ogólnoustrojowej reakcji zapalnej.
3. Peptyd o wzorze 1:
Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂
do zastosowania według zastrz. 2 w prewencji sepsy.
4. Peptyd o wzorze 1:
Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂
do zastosowania według zastrz. 1–3 w prewencji zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym.
5. Peptyd o wzorze 1:
Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-O₂Oc-Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-NH₂
do zastosowania w leczeniu zapalenia.
6. Peptyd do zastosowania według zastrz. 5 w leczeniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej.
7. Peptyd do zastosowania według zastrz. 6 w leczeniu sepsy.
8. Peptyd do zastosowania według zastrz. 5–7 w leczeniu zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym.
9. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania w prewencji zapalenia.
10. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 9 w prewencji ogólnoustrojowej reakcji zapalnej.
11. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 8 w prewencji sepsy.
12. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 9–11 w prewencji zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym.
13. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania w leczeniu zapalenia.
14. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 13 w leczeniu ogólnoustrojowej reakcji zapalnej.
15. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 14 w leczeniu sepsy.
16. Peptyd o wzorze 2:
Ile-Lys-Lys-Ile-Leu-Ser-*lys*-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-O₂Oc-Tyr-*ala*-Gly-Phe-Leu-Arg-NH₂ do zastosowania według zastrz. 13–15 w leczeniu zapalenia wywołanego zakażeniem bakteryjnym.

Rysunki

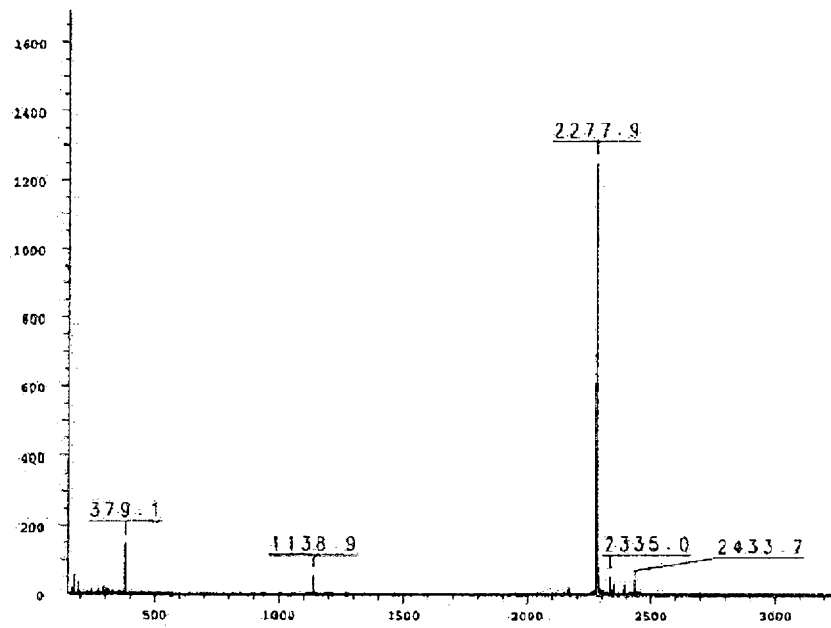


Fig. 1

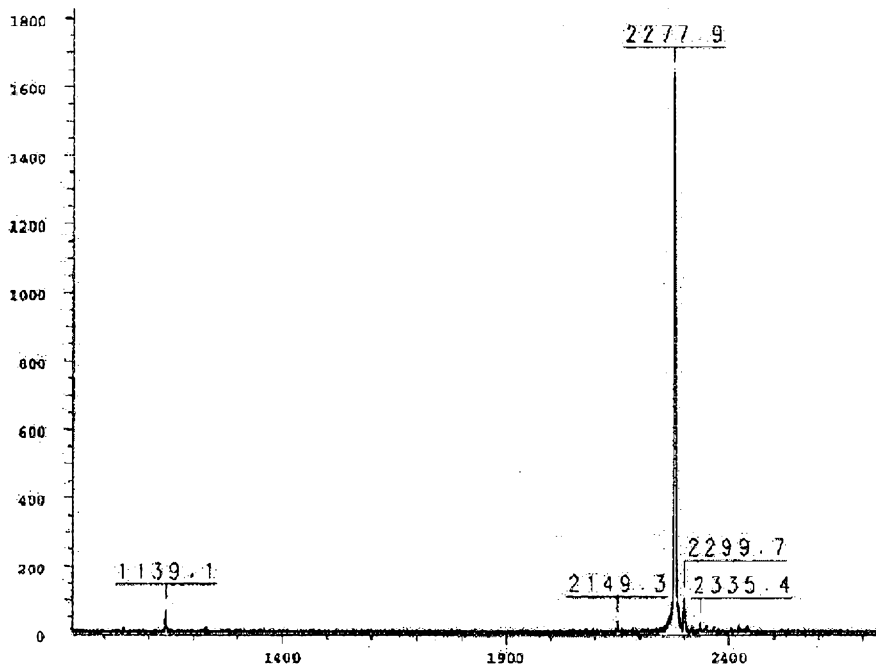


Fig. 2

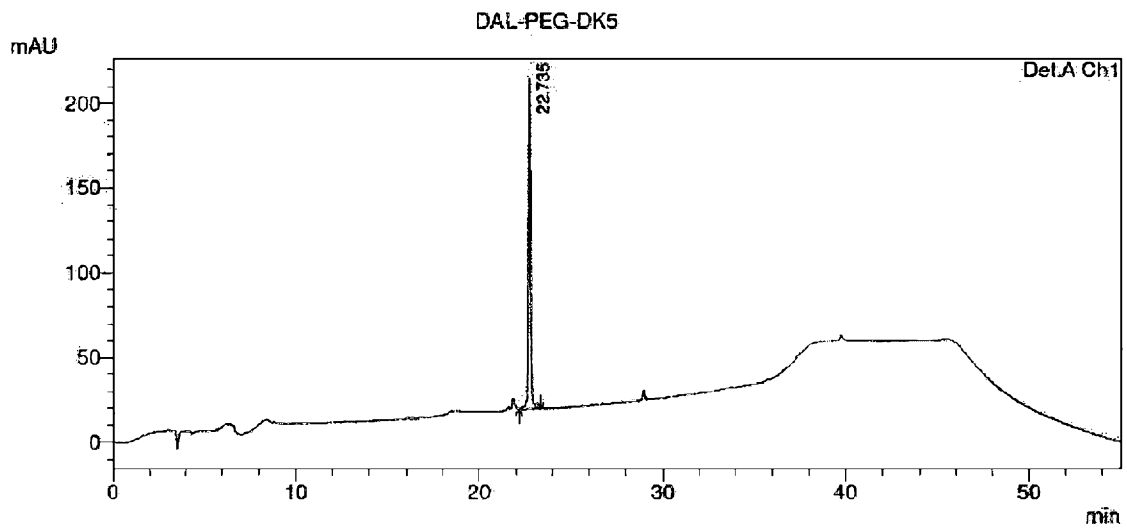


Fig. 3

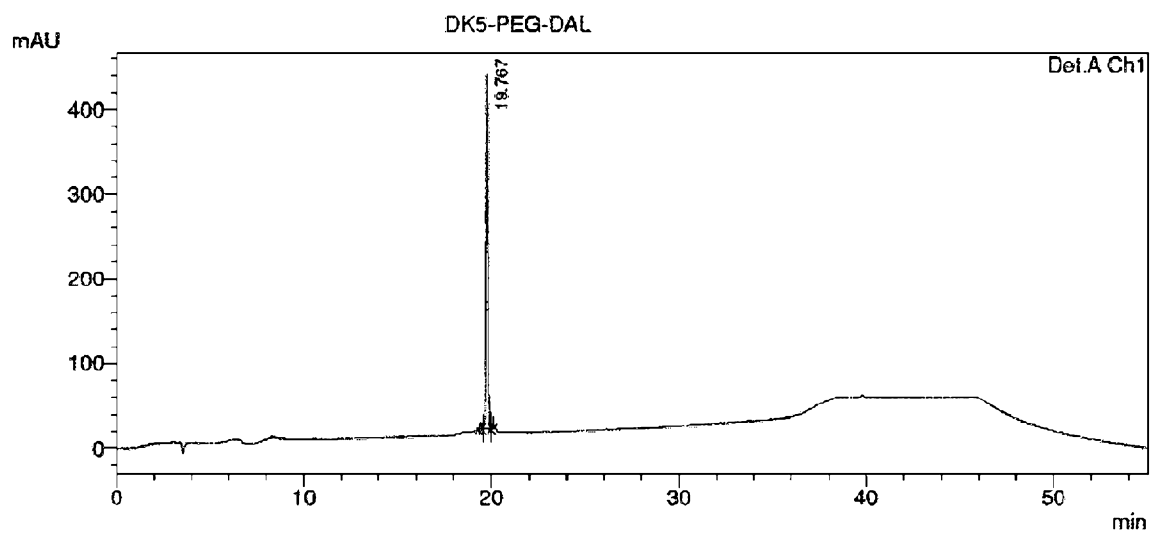


Fig. 4.

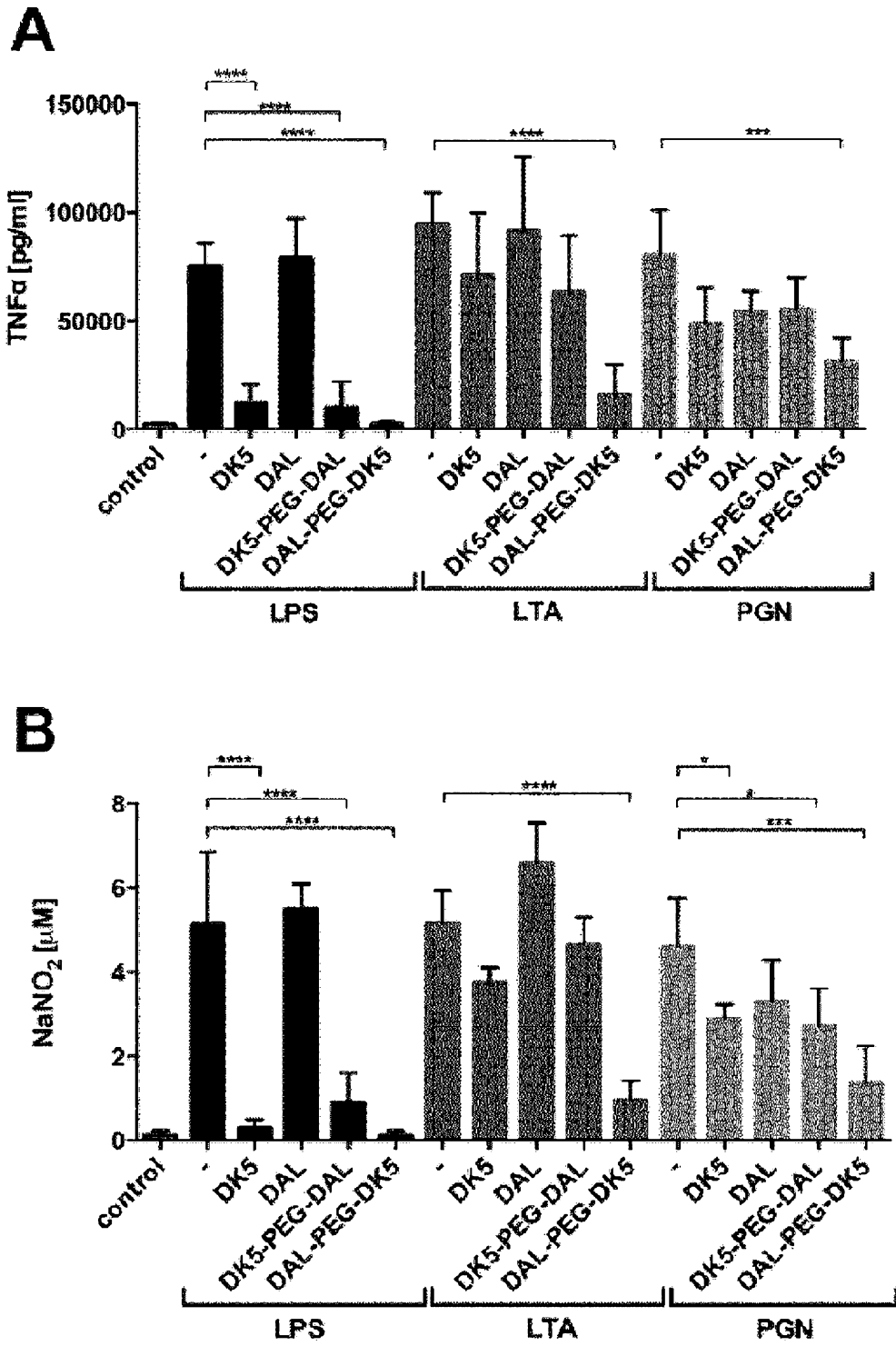


Fig. 5

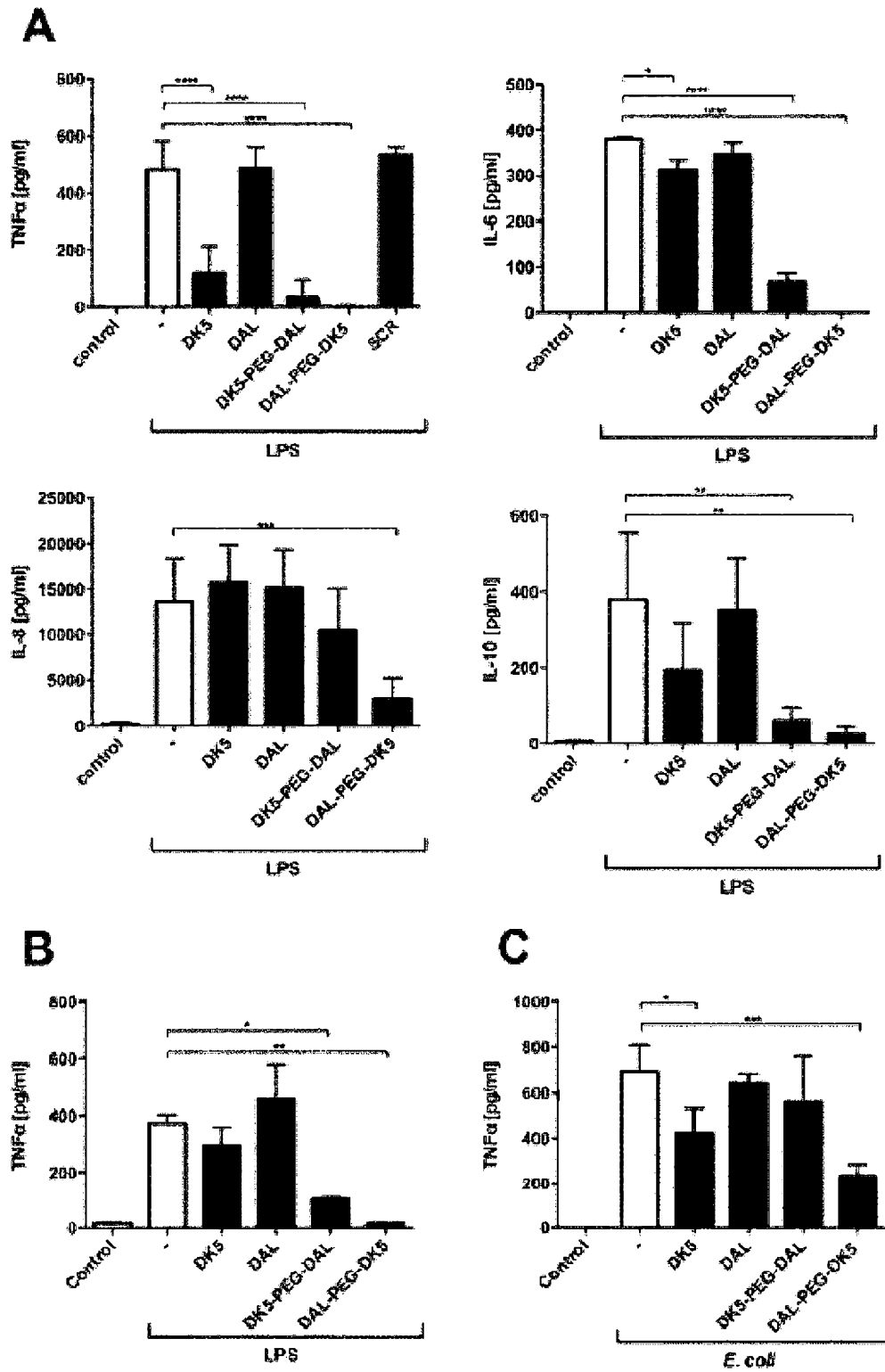


Fig. 6

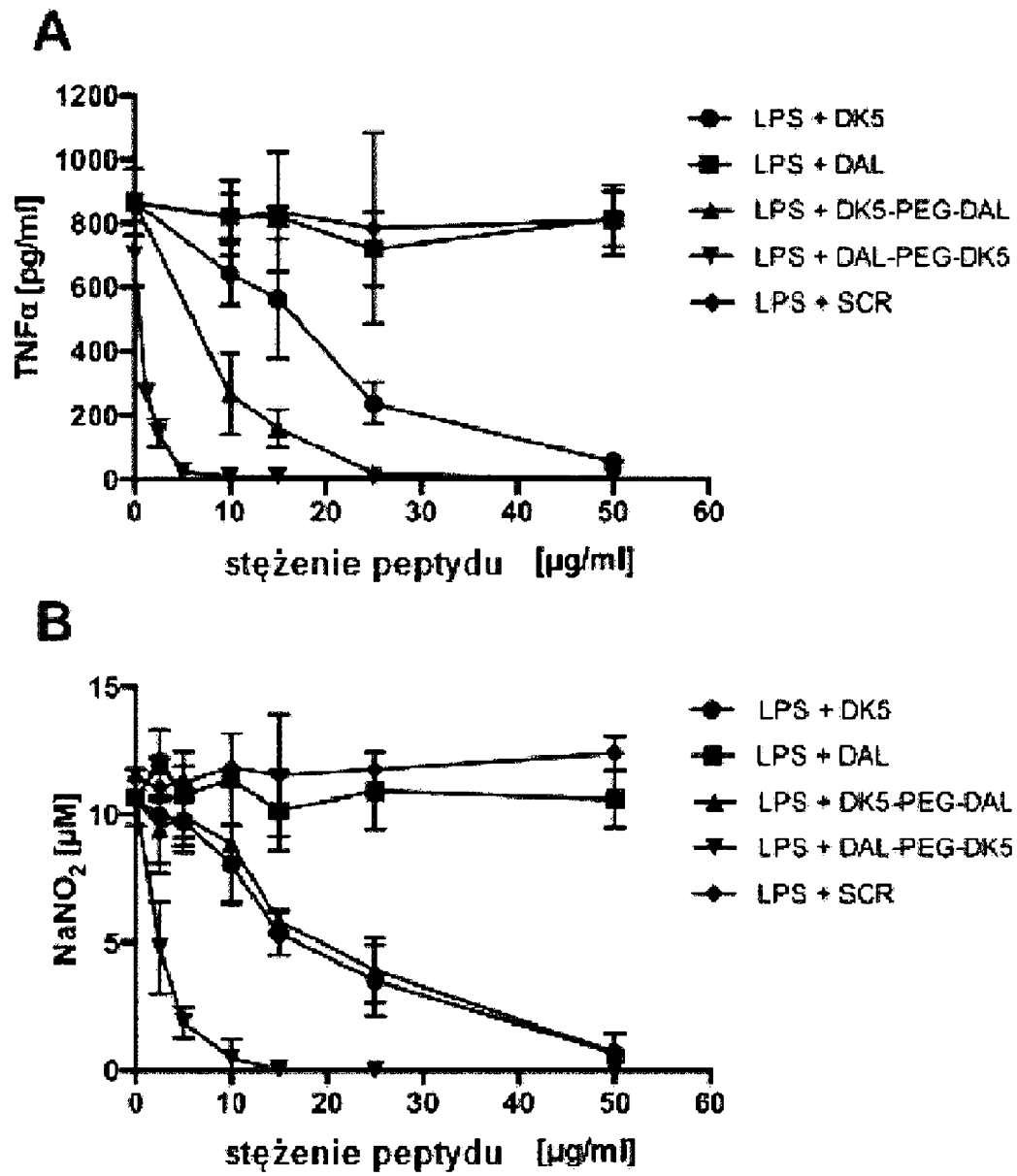


Fig. 7

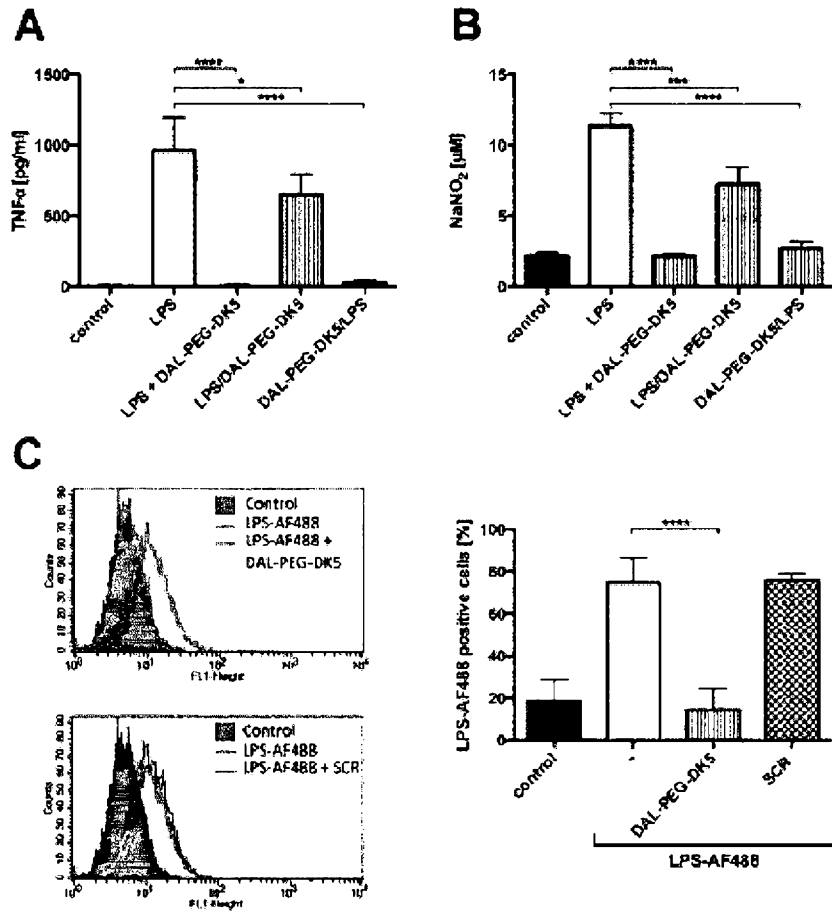


Fig. 8

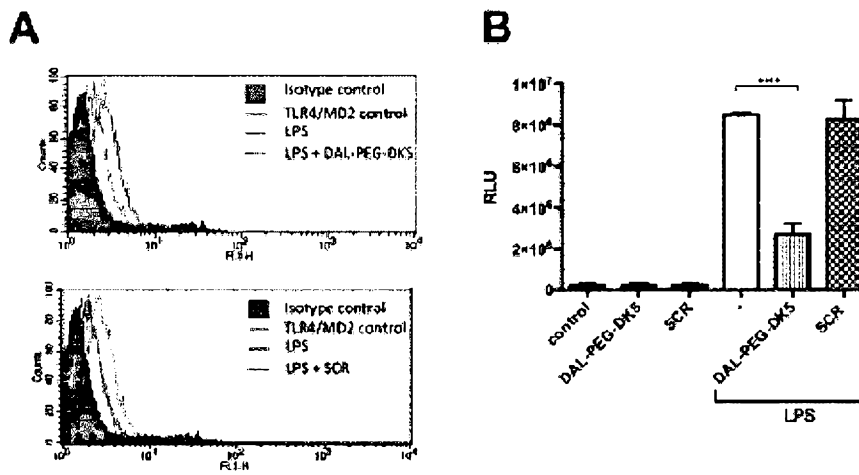


Fig. 9

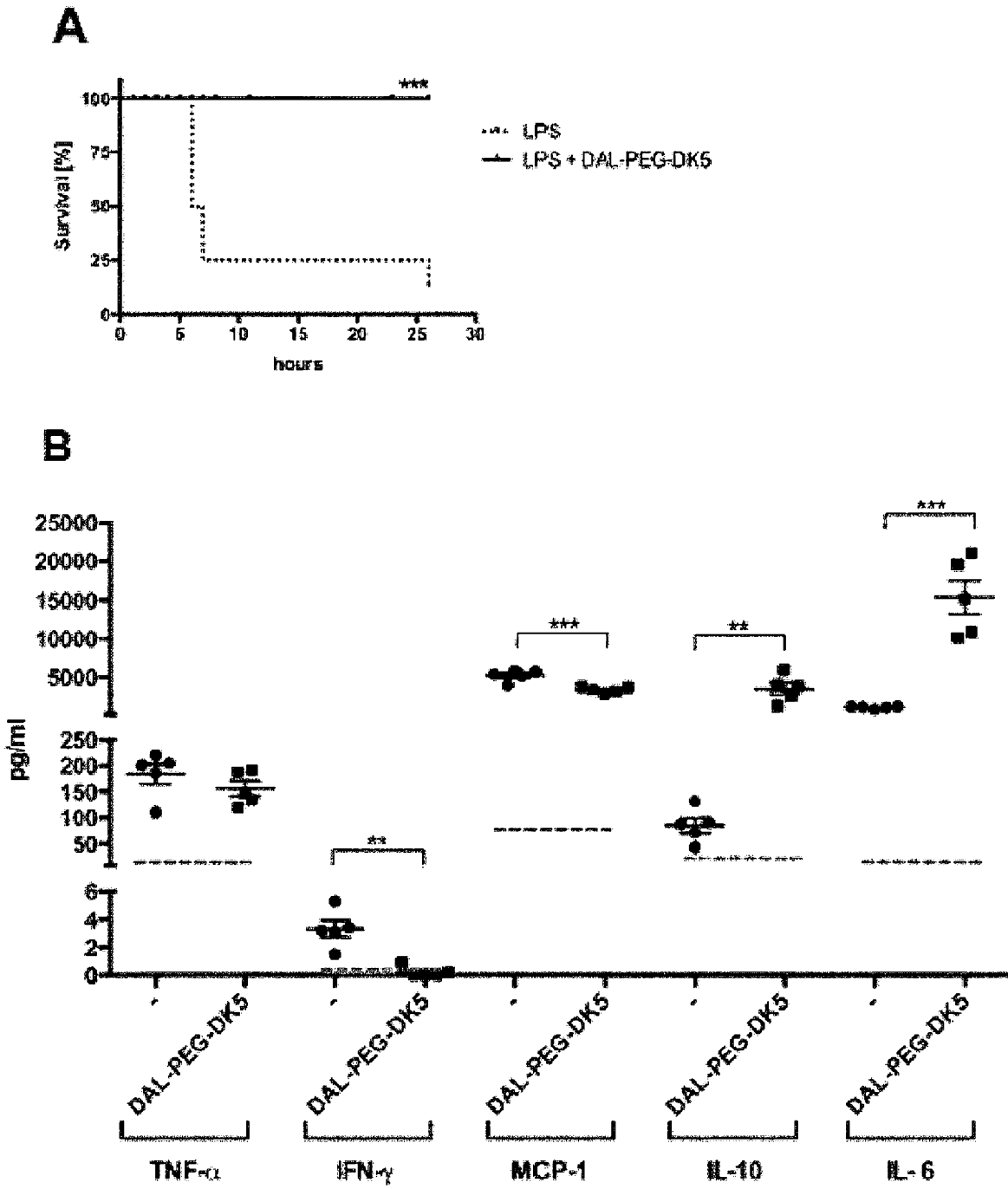


Fig. 10