

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 63210 B1

7(51) C 07 K 14/785

A 61 K 38/17



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 101028
(22) Заявено на 04.12.96
(24) Начало на действие
на патента от: 27.05.95

Приоритетни данни

(31) 4418936 (32) 31.05.94 (33) DE

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 1 на 30.01.98
(45) Отпечатано на 29.06.2001
(46) Публикувано в бюлетин № 6
на 29.06.2001
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):
BYK GULDEN LOMBERG CHEMISCHE
FABRIK GMBH, KONSTANZ (DE)

(72) Изобретател(и):
Ruediger Nave
Wolf-Ruediger Ulrich
Ernst Sturm
Uwe Krueger
Dietrich Haefner, Konstanz (DE)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Правда Георгиева Бойкова,
1000 София, ул. "Хан Аспарух" 26

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/EP95/02028, 27.05.95

(87) № и дата на PCT публикация:
WO95/32992, 07.12.95

(54) СИНТЕТИЧНИ ПЕПТИДНИ АНАЛОЗИ НА БЕЛОДРОБНИЯ ПОВЪРХНОСТНО АКТИВЕН ПРОТЕИН SP-C

(57) Изобретението се отнася до нови полипептиди с формула

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| O | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| (A) | Gly | Ile | Pro | B | B | Pro | Val | His | Leu | Lys |
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| | Arg | Leu | Leu | Ile | Val | Val | Val | Val | Val | Val |
| | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| | Leu | Ile | Val | Val | Val | Ile | Val | Gly | Ala | Leu |
| | 31 | 32 | 33 | 34 | | | | | | |
| | Leu | C | Gly | Leu | | | | | | |

в която А означава Н или Phe, В означава Phe или Trp и С е Ile, Leu или Ser, проявяващи повърхностно активни свойства върху белите дробове. Те се получават с високи добиви и чистота и проявяват не по-лоша активност от тази на природните белодробни повърхностно активни вещества. Подходящи са за получаване на фармацевтични състави за лечение на респираторен дистрес синдром при недоносени бебета, както и при възрастни хора.

10 претенции

BG 63210 B1

(54) СИНТЕТИЧНИ ПЕПТИДНИ АНАЛОЗИ НА БЕЛОДРОБНИЯ ПОВЪРХНОСТНО АКТИВЕН ПРОТЕИН SP-C

Област на техниката

Изобретението се отнася до белодробно повърхностно активен полипептид, до метод за получаването му и до фармацевтични състави, съдържащи такъв полипептид.

Предшестващо състояние на техниката

Белите дробове на всички гръбначни животни съдържат смес от вещества, която се нарича белодробно повърхностно активно вещество. То проявява повърхностно активни свойства и създава повърхностно активно напрежение в областта на алвеолите на белите дробове, така че да предотврати колапс, предизвикан от сляпване на алвеолите в областта на крайните точки на дихателните пътища при издишването. Тази смес от повърхностно активни вещества регулира повърхностното напрежение по един динамичен начин, така че по закона на Лаплас очакваният колапс на малките алвеоли спрямо напрежението на по-големите да се предотврати чрез съответстващо нагаждане на повърхностно активното напрежение. В резултат на това се получава балансирана хистологично и физиологично стабилна структура на белите дробове.

Повърхностно активното вещество се обгражда от алвеолните пневмоцити от тип II под формата на ламеларни телца. Те представляват компактни единици от двуслойни фосфолипиди с високо съдържание на дипалмитилфосфатидилхолин (DPPC) и фосфатидилглицерин (PG). Като друг съществен компонент в белодробната повърхностно активна смес се съдържат протеини, които са обозначени като SP-A, SP-B и SP-C протеини. SP-A е високомолекулен гликопротеин, който играе решаваща роля за регулиране на секрецията.

Протеините SP-C и в по-ограничена степен SP-B играят ролята на термодинамични катализатори при изграждане на мономолекулния повърхностно активен филм (на повърхностно активното вещество в тесен смисъл на думата). Чрез наличието на тези протеини кинетиката на разстилане се ускорява необикновено много. Само по този начин е възможно

лишено от забавяне напасване на състава на повърхностно активната смес към изискванията за повърхностно активното напрежение в дадено време. Тези свойства са свързани с изключително хидрофобния характер на протеините, особено на SP-C.

5 Чрез екстракция на тъкан от бял дроб или промиване на бял дроб на животни са получени повърхностно активни препарати, които проявяват активност, както при изследване във физико-химични измервателни устройства и в животински модели, така и при клинично изследване, така че наваксват липсата на повърхностно активно вещество и с това са под-
10 ходящи например за терапия на респираторен дистрес синдром при новородени (IRDS). Тези препарати от животни обаче проявяват следните утежняващи лечението недостатъци.

15 Съставът на фосфолипидите е силно зависим от вида на животното, неговото здравословно състояние, от неговия начин на хранене и съставът може да се регулира само в определена степен чрез примесване на определени компоненти. Съдържанието на повърхностно активни протеини, както и съотношението на SP-S/SP-C е също така недостатъчно определено. Освен това, евентуални протеолитични
20 градувни продукти на протеините или модифицирани производни, например чрез окисление на метионин, също се съдържат в терапевтично прилаганата смес. При едно по-продължително приложение или при приложение на по-големи количества от повърхностно активната смес, например при респираторен дистрес синдром при възрастни (като белодробен шок, ARDS) или в други случаи на приложение, когато това е необходимо, например при използване на повърхностно активното вещество като носител на други вещества при пулмонално
30 приложение проблемът за недостатъците на тези препарати не е разрешен.

Съгласно изобретението посоченият проблем се разрешава чрез получаване на протеини по пътя на генното инженерство, тъй като
35 рекомбинантни протеини са възпроизводими на практика в неограничени количества, особено при използване на система за бактериална експресия и е възможно приложението на модерни методи за анализ и контрол на качеството, поради което при използване на синтетични
40 фосфолипиди може да се получи повърхностно активно вещество с точно определен със-

тав, който да бъде максимално съобразен с изискванията на терапевтичното приложение.

Човешкият протеин SP-C с формула I, в която А означава Н или Phe, В е Cys и С е Met, който протеин е особено важен за кинетиката на разстилане и овлажняване, се състои в основната си част изключително от алифатни, силно хидрофобни аминокиселини, като валин, левцин или изолевцин. Дължината на тази централна част (аминокиселини 12-34) позволява интеграция на пептида в мономолекулен фосфолипиден филм. В последователността Pro-Cys-Cys-Pro (позиция 3-6) двата Cys-остатъка са тиоестерифицирани при SH-групата с палмитинова киселина. Палмитиновата киселина повишава хидрофобния характер на общия протеин още повече и освен това защитава двете SH-групи на цистеина, като ги предпазва от окисление и образуване на дисулфиден мост. Централната област (аминокиселини 13-34) изгражда една трансмембранна спирална област. Тази област е прикрита от N-края чрез една полярна последователност, която съдържа положително натоварени аминокиселини (Lys, 10; Arg, 11).

В патентна публикация WO 91/18015 е описано получаването на рекомбинантна SP-C и на мутанти на SP-C. Там между другото се предлага двата цистеинови остатъка в позиции 4 и 5 да се заместят с два серинови остатъка. При производството това дава предимството, че след изолиране на много хидрофобния протеин отпада необходимостта от технически трудно осъществимото свързване на цистеиновите групи с палмитоилов остатък.

Техническа същност на изобретението

Установено е, че SP-C-мутанти, които се различават от човешкия SP-C-протеин по замяната на двете цистеинови групи в позиции 4 и 5 с фенилаланин или триптофан, както и по замяната на метионина на 32 позиция с изолевцин, левцин или серин, в никакъв случай не проявяват по-лоши функционални качества в сравнение с естествения SP-C-протеин, като дори го превъзхождат по стабилност. Получаването му по пътя на генното инженерство е значително по-опростено и осигурява високи добиви. Новите полипептиди с белодробна повърхностна активност се получават с много висока чистота.

Съгласно изобретението са създадени полипептиди с белодробни повърхностно активни свойства, които имат аминокиселинна последователност с обща формула

| | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| | (A) | Gly | Ile | Pro | B | B | Pro | Val | His | Leu | Lys |
| | | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| | | Arg | Leu | Leu | Ile | Val | Val | Val | Val | Val | Val |
| | | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| | | Leu | Ile | Val | Val | Val | Ile | Val | Gly | Ala | Leu |
| 10 | | 31 | 32 | 33 | 34 | | | | | | |
| | | Leu | C | Gly | Leu | | | | | | |

в която А означава Н или Phe, В означава Phe или Trp и С означава Ile, Leu или Ser.

15 Предпочитан обект на изобретението са полипептиди с обща формула I, в която А означава Н или Phe, В означава Phe и С означава Ile. Особено предпочитани са значенията на заместителите, при които А е Н, В е Phe и С е Ile.

20 Друг обект на изобретението са фармацевтични състави, които се характеризират с това, че съдържат един или повече полипептиди съгласно изобретението и при желание съдържат също един или повече белодробно повърхностно активни полипептиди от групата SP-A и SP-B, за предпочитане SP-B.

25 Пептидите съгласно изобретението могат да се получат или по известните методи за пептиден синтез в твърда фаза или с помощта на рекомбинантни вектори в клетка гостоприемник. Методиките за работа, конструирането на вектори, трансформацията на клетките, предизвикването на синтез на протеини в трансформирани клетки, както и изолирането и пречистването на получените протеини са известни в областта (виж патентни WO 86/03408, WO 87/06588 и WO 91/18015).

30 Получаването на вектори за синтез на SP-C в бактериални системи се свежда до позната рекомбинантна ДНК техника (генно инженерство).

35 Експресията на хидрофобен SP-C протеин в бактерии в голяма степен и без увреждане на клетките гостоприемници е възможно само под формата на подходящи слети протеини, например заедно с хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT). Например векторът pTrcAmpCAT152 кодира за областта на N-края на хлорамфениколацетилтрансферазата и за клонирането в рамка на ДНК фрагменти, които са кодирани

за SP-C, предлага едно място в отрязъка (5'-)EcoR1- и едно място в отрязъка (3'-)Pst1. Хлорамфениколацетилтрансферазата и SP-C се свързват при това взаимно в областта на протеина чрез сливане в хидроксиламинсензитивно място (AsN ↓ Gli). Такива вектори като рТгрАmpCAT152::SPC дават възможност за контролирана експресия на съответните слети протеини до производствен мащаб (ферментация). Експресията на слети протеини предизвиква образуването на клетъчни включения в клетката гостоприемник. При това дължината на САТ частта в слетите протеини може да се изменя, с което може да се постигнат по-високи добиви на клетъчните включения при по-голямо съотношение на SP-C частта.

Такъв синтез може да се осъществи освен в бактерии и в много други системи от гостоприемници, например в клетки на бозайници, гъбички или инсекти. За различните видове гостоприемници се приготвят подходящи ДНК структури и синтезът се осъществява по познатите начини, като по познат начин се изгражда съответната направляема последователност в генома на клетката гостоприемник.

Два ДНК олигонуклеотида могат да се синтезират по обичайния фосфоамидитен метод при използване на ДНК синтезатор от типа MiliGen/Biosearch Cyclone.

Първият ДНК олигонуклеотид се образува по сенс ДНК верига с дължина от 118 нуклеотида. Тя кодира (в посока 5' → 3') един Eco R1-специфичен 5'-край за следващо субклонирание, мястото на отцепване на хидроксиламина Asp/Gly и човешкия SP-C, започвайки с Gly-25 и завършвайки с Leu-58 на SP-C първоначалната последователност, съответстваща на Gly-1, съответно на Leu-34 във формула I. При това познатата последователност на аминокиселините на човешките SP-C протеини се преобразува по правилата на генетичния код в ДНК. Последователността все пак се модифицира по такъв начин, че двата цистеинови остатъка в позиции 28 и 29 на първоначалната последователност на SP-C се заместват с фенилаланин или с триптофан и метионинът в позиция 56 на първоначалната последователност на протеина се замества с изолевцин, левцин или серин. Освен това по този начин може да се има предвид също и честотата на използване на кодоните на клетката гостоприемник.

Промените в SP-C последователността, която съдържа фенилаланин в позиции 4 и 5 и изолевцин в позиция 32 (виж номерирането във формула I), са обозначени като SPC34(FF/I), в съответствие с обичайното кодиране на подреждането за тези две аминокиселини. Освен това сенс ДНК веригата съдържа един стоп ТАА-кодон, за прекъсване на рибозомната трансляция, както и един Pst 1-специфичен 3'-край. Вторият ДНК олигонуклеотид представлява допълнителна не кодирана (антисенс) верига, състояща се от 110 нуклеотида.

Синтетично полученият SP-C ДНК фрагмент се клонира в подходящ експресионен вектор, например рТгрАmpCAT152. Този вектор се поставя заедно от рКК233 (Pharmacia), който съдържа един ампицилин резистентен ген и е произведен на рBR322; trc-промоторът може да се замени с един trp-промотор, както в рТгрАmpCAT152. Също така могат да се използват и други индуциращи промотори.

За субклонирание на SP-C фрагмента допълнителните ДНК олигонуклеотиди първоначално се хибридизират един с друг. Получената при това двойна ДНК верига има запазени краища на двете единична вериги (Eco R1/Pst 1).

Вграждането в ДНК вектор се извършва по познат начин след Eco R1/Pst 1 приемане на ДНК вектор, пречистване на желаните ДНК вектор фрагменти чрез електрофореза с агарозен гел и чрез хибридизиране на SP-C ДНК и на векторния фрагмент чрез кохезионните краища. След това двата фрагмента се свързват чрез лигиране ковалентно по познатите методи.

За амплифициране на ДНК и изолиране на плазмид се действа по познатите приемливи начини, например чрез трансформиране на калциев хлорид компетентни клетки от E. coli MM294 и селекция на носещите плазмид клетки и посяване върху LB агарни плочки с ампицилин. От получените резистентни на ампицилин колонии се изолира ДНК плазмид, който се анализира чрез подходящи комбинации от рестрикционни ензими. Избират се клонове с очакван модел на ДНК рестрикционните фрагменти. Чрез пълно установяване на плазмидната последователност се потвърждава коректното протичане на въвеждането на SPC34(FF/I)-последователност.

Така получените плазмидни вектори поз-

воляват експресията на слят протеин CAT::SPC под контрола на Trp-промотор (или на други промотори). Рекомбинантният слят протеин попада в клетката гостоприемник чрез въвеждане под формата на клетъчни включения.

Слетият протеин CAT152::SPC34(FF/I) има следната, представена по обичайния начин за кодиране на подреждането на аминокиселинната последователност:

```

      10          20          30          40          50
MEKKI TGYTT VDISQ WHRKE HFEAF QVVAQ CTYNO TVQLD ITAFL KTVKK

      60          70          80          90          100
NKNKF YPAFI HILAR LMNAH PEFRM AMKDG ELVIW DSVHP CYTVF HEQTE

      110         120         130         140         150
TFSSL WSEYH DDFRQ FLHIY SQDVA CYGEN LAYFP KGFIE NMFFV SANPE

      160         170         180         186
FNGIP FFPVH LKRLI IVVVV VVLIV VVIVG ALLIG L
      1          10          20          30          34

```

Аминокиселините 34 на SP-C(FF/I) в позиции 153 до 186 на слетия протеин са обозначени чрез подчертаване и посочване на позициите от 1 до 34.

Следващото отцепване с хидроксиламин за отделяне от CAT и SP-C се осъществява между Asp-152 и Gly-153 (отговаря на 1. аминокиселината в SP-C пептида). Изолирането и пречистването на SP-C пептида се провежда по обичайните за химията на протеините методи.

Полипептидите съгласно изобретението могат да се изготвят самостоятелно или като комбинации с други фармацевтични средства за използване във фармацевтични състави, които са подходящи за целите на лечението на дихателните пътища. Фармацевтичните състави са подходящи не само за лечение на респираторен дистрес синдром при новородени и възрастни, но също така и за лечение на пневмония и бронхити. Освен това, полипептидите съгласно изобретението са подходящи за използване като носители за въвеждане на прилагани чрез инхалация лекарствени средства.

Фармацевтичните състави съдържат освен полипептиди и фосфолипиди, за предпочитане такива фосфолипиди, които се съдържат в природните белодробни повърхностно активни смеси, например дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC), палмитоилолеилфосфатидилглицерол (POPG) и/или фосфатидилглицерол (PG). За получаване на подходящ вискозитет съставите съдържат калциеви или магнезиеви йони, както и натриев хлорид. Специалистът в

тази област се ориентира при подбора на вида и количеството на отделните компоненти на сместа по аналогия на познатите състави на природните белодробни повърхностно активни смеси и на други познати от нивото на техниката състави, например описаните в патенти EP-A 0119056 и EP-A 0406732.

Предпочитани състави съгласно изобретението съдържат следните компоненти в тегл.%: от 80 до 95 фосфолипиди, 0,5-3,0 полипептиди, 4-7 мастни киселини, за предпочитане палмитинова киселина и 1-3 калциев хлорид.

Примери за изпълнение на изобретението

1. Получаване на щам
Използваният за синтеза щам *E. coli* 199 се отделя от щам *E. coli* K12 MM294, който е регистриран под № 5208 в Германската сбирка от микроорганизми и клетъчни култури (DSM GmbH, Braunschweig).

Експресионният вектор pTrpAmpCAT152::SPC34 (FF/I), който съдържа гена на слетия протеин CAT152::SPC34(FF/I), се отделя от ДНК последователност pBR322, на едно ColE1 производно [E. Weber (ed.) (1988), *Biologische Sicherheit, Bundesministerium für Forschung und Technologie, Bonn*]. От получен от фирмата Pharmacia плазмид pKK233-2 се изрязва Trc промотора с Eco RI/Hind III и се заменя със синтетичния Trp промотор (pTrp233). Той се състои от промоторна област (място на свързване на РНК полимеразата), операторна об-

ласт (място на свързване на Tgr репресор), от Shine/Dalgarno-(S/D) последователност и от рестрикционните места за клониране. След Tgr промотора се помества кодиращият за 152 аминокиселини на 5'-частта на бактериалната хлорамфеникол-ацетил-трансфераза ген (CAT152). Към CAT152 ДНК частта на веригата се присъединява един синтетичен генен фрагмент, който е кодиран за 34 аминокиселини на протеина SP-C(FF/I), който е подобен на човешкия. Единството на транскрипцията се затваря чрез бактериална gtrB транскрипционна регулаторна последователност T1T2. Получената структура се обозначава като pTgrAmpCAT152::SPC34(FF/I).

Векторът pTgrAmpCAT152::SPC34(FF/I) има следните функционални елементи:

- ген CAT152:SPC34(FF/I), насочен чрез Tgr промотора и T1T2 транскрипционния регулатор;

- ori област и съседните области, които се управляват от броя на копията на плазмидите;

- Amp^r ген.

След въвеждане на плазмид в клетката гостоприемник, тя разполага с голям брой от копия на контролирания от Tgr промотора CAT::SPC(FF/I) ген. Tgr репресорът се създава сам в клетката гостоприемник.

Ферментативното получаване на rCAT::SPC се контролира чрез концентрацията на триптофан в средата, съответно чрез добавяне на β -индолилацирилова киселина (β -IAA).

2. Ферментационна партида

В културална среда (съставът ѝ е даден по-долу) се внася проба от банката за клетъчни култури (глицеринова култура) в колба с възможност за разклащане (като изходна или стартерна култура 1 l) и при 37° се инкубира при разбъркване под силно селекционно налягане от ампицилин. Растежът се осъществява при оптична гъстота 578 nm. След като стартерната култура от E. coli 199 достигне до оптична гъстота повече от 3, културата се внася в 10-литров ферментатор и растежът на бактерии продължава при понижено селекционно налягане от ампицилин. След като стойността на оптичката гъстота достигне границите между 5 и 6, културата се прехвърля от 10-литровия ферментатор в 100-литров ферментатор и инкубирането продължава при същите условия. След достатъчно прорастване

на културата чрез добавяне например на 40 mg/l β -индолилацирилова киселина се индуцира единство на транскрипцията CAT::SPC(FF/I), направлявано от Tgr промотор. След това индуциране за прорастване на клетките културата ферментира още 4-5 h.

По време на ферментацията парциално налягане на кислорода (pO_2), стойността на pH и температурата във ферментационния съд се следят и регулират автономно. Стойността на pH се поддържа постоянна с помощта на разтвор на натриева основа, налягането на кислорода се контролира чрез количеството на подавания кислород и чрез скоростта на оборотите на разклащане. Самостоятелно и постоянно се определят и оптичката гъстота при 578 nm, както и концентрацията на източника на въглерод в средата. Образуването на пяна се следи със сензор, чрез който при необходимост се определя дозирането на противопени- тел за намаляване на количеството на пяната.

Проби от ферментационната течност се вземат в различни етапи на ферментацията. След като се лизират бактериите за контролиране на експресията на E. coli-протеина, той се разделя върху полиакриламиден гел и се оцветява. Процентната част на протеините (доминиращи) спрямо общия протеин от E. coli се определя дензиметрично (чрез определяне плътността на течността). Скоро след индукцията на рекомбинантния ген се явява нова доминираща протеинова група (rCAT::SPC).

Културалната среда има следния състав:

Соев пептон 27,0 g/l, дрождев автолизат KAV 14,0 g/l, натриев хлорид 5,0 g/l, $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ 6,0 g/l, KH_2PO_4 3,0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 5,0 g/l, глицерин (99,5%) 30,0 g/l, антипенител J673 (Struktol Comp.) 0,2 ml/l, L-триптофан 80,0 mg/l и ампицилин 20 mg/l за 1. изходна култура и 5 mg/l за 2. изходна култура и за 100-литровия ферментатор.

Преди поставяне в автоклав и стерилизиране на комплексната хранителна среда стойността на pH се нагласява на pH 6,8 с 2N разтвор на натриева основа. За изходната култура в 10-литровия ферментатор скоростта на въртене на ферментатора е 750 об./min (rpm), при въвеждане на въздух 10 l/min при 37°C, а за основната култура в 100-литровия ферментатор скоростта на въртене на ферментатора е 400 об./min, при въвеждане на въздух 70 l/min при 37°C. Антипенителът се прибавя при

нужда с шприц за еднократно шприцоване през септум (мембрана).

След около 4 h след индукцията клетките се отделят от ферментационната течност чрез филтриране и/или центрофугиране. Влажната клетъчна маса се събира в съд от висококачествена стомана и се разбърква с 10 l обработващ буфер (pH 8,0) в продължение на една нощ в хладилник (16 h при 4°C). Разбърканата клетъчна суспензия се затваря в хомогенизатор под високо налягане (≥ 700 bar) при стайна температура и се прехвърля отново в стерилен съд от висококачествена стомана. Клетъчните включения се отделят след това веднага чрез филтриране и/или центрофугиране (центрофуга тип Sorvall RC2-B, 27000 g) при 4°C, суспендира се отново в буфер (около 1 l) и се прехвърля на порции например по около 350 ml в 1-литрова облодънна колба, където се лиофилизира в продължение на около 96 h. При една 100-литрова ферментация се получават около 200 g сухи клетъчни включения (Inclusion Bodies) със съдържание на слят протеин повече от 20 тегл.%. Леофилизираните клетъчни включения могат да се съхраняват в продължение на месеци при -20°C.

3. Разпадане на слетия протеин и пречистване на липофилния пептид SP-C(FF/l)

Суши клетъчни включения 100 g се разтварят в 1,6 l, 8-моларен разтвор на гуанидин хидрохлорид (917,1 g) при слабо загряване. Неразтворените остатъци се филтрират през нагънат филтър. За разпадане на слетия протеин на мястото на свързване Asp-Gly се прибавя разтвор на 167 g хидроксиламониев хлорид и pH на разтвора се нагласява до 9,6 с 2N разтвор на натриева основа. Този разтвор, който предизвиква разпадането, се оставя след това в продължение на 3-4 дни при стайна температура при разбъркване. Накрая на реакционното време чрез прибавяне на 6,4 l трис-буфер (pH 8,0) се утаява SP-C(FF/l), който

се отделя с помощта на центрофуга (Sorvall RC2-B, 20 000 g). Горният слой се декантира, гранулите от SP-C отново се разбъркват в 400-500 ml трис-буфер и при същите условия отново се центрофугират в продължение на 30 min.

Отделените SP-C гранули се разтварят в 3,5 l солнокисела смес на хлороформ/метанол (1,75 l хлороформ + 1,75 l метанол + около 30 ml 2N солна киселина). Този суров разтвор на SP-C се пречиства по-нататък чрез препаративна високоефективна течна хроматография върху C8 материал с обърната фаза. Екстрактът от хлороформ/метанол се разрежда с 90% метанол в съотношение 1:2 преди вкарването в колоната за провеждане на високоефективната течна хроматография. От този разтвор се зарежда една колона, (напр. с диаметър 5 cm) с около 400 mg SP-C (FF/l), (напр. с - 2 l разреден суров екстракт). SP-C (FF/l) се елуира при кисели условия (pH 2-3) с градиент на смеси от вода/изопропанол (виж условията за разделяне). След провеждане на хроматографията, около 30 min, в областта, където се елуира SP-C (UV детектор при 220 nm), се събират 4-6 фракции от 200 ml. Фракциите се подлагат на проверка чрез аналитична високоефективна течна хроматография и се обединяват. Ако пробите трябва да бъдат съхранявани, те се замразяват с течен азот и се съхраняват в нискоохлаждаща камера при температура -80°C. Пептидът SP-C(FF/l) се получава с чистота от 98,5-99,5%.

Условия за провеждане на разделянето:

Колона: Kromasil C8 100 A 16 μ m 300 mm

* 50 mm I.D.

Елуент: А: Вода, пречистена през устройство с Millipore за високоефективна течна хроматография

В: Изопропанол с линеен градиент

С: 60 mmol/l HCl (разредена от димяща солна киселина)

| Градиент: | Време | %A | %B | %C | Поток (ml/min) |
|-----------|-------|----|----|----|----------------|
| | 0 | 45 | 50 | 5 | 100 |
| | 10 | 45 | 50 | 5 | 100 |
| | 55 | 0 | 95 | 5 | 100 |
| | 65 | 0 | 95 | 5 | 100 |
| | 75 | 45 | 50 | 5 | 100 |
| | 85 | 45 | 50 | 5 | 100 |
| | 90 | 45 | 50 | 5 | 0,2 |

4. Вграждане на SP-C(FF/I) във фосфолипидна матрица

Липофилният пептид SO-C(FF/I) се смесва с разтвор на изопропанол с компонентите на фосфолипидна матрица и се утаява чрез разпръскване в разреден разтвор на натриев хлорид (0,065% w/w NaCl) при стайна температура в хомогенна смес с компонентите на фосфолипидната матрица. От получената суспензия на белодробно повърхностно активни вещества те се отделят чрез Бехер центрофуга, ресуспендират се в електролитен разтвор (натриев хлорид, калциев хлорид) и стойността на рН се нагласява на 6,5 с 0,1N разтвор на натриева основа. Тази водна суспензия се пълни в 20-милилитрови флакони и се лиофилизира. В следващите примери за получаване посочените данни за тегло и обем се отнасят до получаването на 10 g белодробно повърхностно активен препарат.

Дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC) 7,00 g, амониева сол на палмитоилолеилфосфатидил-глицерол (POPG x NH₄) 3,08 g и палмитинова киселина 0,25 g се разтварят при 40°C в 200 ml 90% изопропанол и разтворът се охлажда до стайна температура. Полученият фосфолипиден разтвор се смесва с 1l от получения след пречистване с високоефективна течна хроматография разтвор, който съдържа 200 mg пречистен SP-C(FF/I). Полученият пулверизиран разтвор се алкализират до рН 4,5 при разбъркване с разтвор на бикарбонат (около 5 ml 5% разтвор на натриев бикарбонат).

Пулверизираният разтвор при стайна температура и при скорост на разпръскване от 25 ml/min се въвежда през дюза в 9,6 l разреден разтвор на натриев хлорид (0,065% w/w) при интензивно разбъркване. Получава се опалесциращ разтвор, от който след двучасово престоиване при температура 4 до 8°C чрез впръскване на разтвор на електролит (3,0 g CaCl₂ x 2 H₂O и 61,3 g NaCl в 300 ml вода) изпада белодробно повърхностно активният продукт. Получената суспензия на белодробно повърхностно активния продукт (общ обем 10,8-11,0 l) се оставя една нощ при 4°C и след това се центрофугира около 30 min с центрофуга от вида Solvall-Becher (RC2-B) при натоварване 16000 g. Утайката от центрофугата се ресуспендира в половин обем 0,65% разтвор на натриев хлорид за отстраняване на остатъците от изопропанол и отново се центрофугира. Тази

процедура се повтаря 3-4 пъти. Остатъкът след последното центрофугиране се разрежда с 400 ml 0,65% разтвор на натриев хлорид, алкализират се с 0,1N разтвор на натриева основа до рН 6,5 и се разпределя на порции по 6,2 g в 20 ml флакони. Съдържанието на флаконите се лиофилизира, както следва: замразява се в продължение на 6 h при -45°C и нормално налягане, суши се в продължение на 54 h под налягане 0,16 mbar при -20°C и след това се подлага още 5 h на интензивно сушене при -20°C и налягане 0,02 mbar.

Получават се 65-66 флакона, всеки от които съдържа по 0,150 g белодробно повърхностно активно вещество (изчислено без количеството на натриевия хлорид).

Изушените проби от полученото белодробно повърхностно активно вещество се съхраняват в хладилник при 4°C и преди употреба трябва да се ресуспендират с вода или физиологичен разтвор на натриев хлорид (концентрация на суспензията 25 mg/ml).

Всеки флакон съдържа:

95,6 mg дипалмитоилфосфатидихолин,
42,1 mg палмитоилолеилфосфатидилглицерол (амониева сол),
2,7 mg SP-C(FF/I),
6,8 mg палмитинова киселина и
2,9 mg калциев хлорид (безводен).

Патентни претенции

1. Полипептиди с белодробна повърхностна активност с обща формула

| | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| (A) | Gly | Ile | Pro | B | B | Pro | Val | His | Leu | Lys |
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| | Arg | Leu | Leu | Ile | Val | Val | Val | Val | Val | Val |
| | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| | Leu | Ile | Val | Val | Val | Ile | Val | Gly | Ala | Leu |
| | 31 | 32 | 33 | 34 | | | | | | |
| | Leu | C | Gly | Leu | | | | | | |

в която А означава Н или Phe, В означава Phe или Tgr и С означава Ile, Leu или Ser.

2. Полипептиди съгласно претенция 1, характеризиращи се с това, че А означава Н или Phe, В означава Phe и С означава Ile.

3. Полипептид съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че А означава Phe, В означава Phe и С означава Ile.

4. Фармацевтичен състав за лечение на

респираторен дистрес синдром (RDS) при бо-
зайници, характеризиращ се с това, че съдържа
белодробно повърхностно активен полипеп-
тид съгласно претенциите от 1 до 3.

5. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенция 4, характеризиращ се с това, че съд-
държа поне още един друг белодробно повърх-
ностно активен полипептид от групата SP-A
и SP-B.

6. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенция 5, характеризиращ се с това, че съдържа
SP-B.

7. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенции 4 и 5, характеризиращ се с това, че

съдържа фосфолипид.

8. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенция 7, характеризиращ се с това, че съдържа
дипалмитоилфосфатидилхолин (DPPC),
5 палмитоилолеилфосфатидилглицерол (POPG)
и/или фосфатидилглицерол (PG).

9. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенция 7, характеризиращ се с това, че съдържа
палмитинова киселина и електролит.

10. Фармацевтичен състав съгласно пре-
тенция 9, характеризиращ се с това, че съдържа
като електролит калциеви и/или натриеви
соли.

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Кацарова

Редактор: В. Алтаванова

Пор. № 40690

Тираж: 40 ЗС