

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 100554A

(51) C07K 14/785

A61K 38/17

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Заявителски № 100554				(71) Заявител(и):
(22) Заявено на 02.05.1996				MITSUBISHI-TOKYO
(24) Начало на действие				PHARMACEUTICALS, INC, ., TOKYO,
на патента от:				TOKYO (JP);
Приоритетни данни				(72) Изобретател(и):
				TAKEI, TSUNETOMO ., TOKYO (
(31) 5-307657	(32) 08.12.1993	(33)	JP	JP); OHTSUBO, EIJI ., TOKYO (JP);
				OHKAWA, HIROSI ., TOKYO (JP);
				(74) Представител по индустриална
				собственост:
				Валентина Великова Нешева , 1408
				София , ул."Димитър Манов" 20
(41) Публикувана заявка в				(86) № на PCT заявка:
бюлетин № 12 31.12.1996				PCT/ JP94/0 / 2057 , 07.12.1994
(45) Отпечатано на				(87) № и дата на PCT публикация:
(46) Публикувано в бюлетин №				95/159 / 80 , 15.06.1995
на				
(56) Информационни източници:				
(62) Разделена заявка от рег. №				

(54) НОВ СИНТЕТИЧЕН ПЕПТИД, СЪДЪРЖАЩО ПЕПТИДА БЕЛОДРОБНО ПОВЪРХНОСТНО АКТИВНО ВЕЩЕСТВО И ЛЕКАРСТВЕНО СРЕДСТВО ЗА ЛЕЧЕНИЕ НА ДИХАТЕЛНА НЕДОСТАТЪЧНОСТ

(57) Изобретението се отнася до синтетичен пептид, включващ последователността хаа pro val хвв хсс lys arg w , където хаа липсва или представлява cys или ser; хвв представя ява his или asu, хсс представлява leu или jle и w представлява хидрофобна пептидна част, до един междинен продукт за получаване на пептида, до метод за получаване на пептида, до белодробно повърхностно о активно вещество, което го съдържа, до липидна смес и до лекарство средство за лечение на синдрома на дихателната недостатъчност, съдържащо повърхностно активното вещество като активен ингредиент. Пептидът се изолира лесно и е подходящ за масово производство. Тъй като е лесно разтворим в метанол и други подобни разтворители, той може лесно да бъде смесван с липидна смес и е подходящ за получаване на белодробно повърхностно активно вещество. Последното показва добре изразена способност да образува суспензии, както и потенциална повърхностна активност, поради което е приложимо за получаване на лекарство средство за лечение на синдрома на дихателната недостатъчност.

10 претенции, 10 претенции, 0

BG 100554A

НОВ СИНТЕТИЧЕН ПЕПТИД. СЪДЪРЖАЩО ПЕПТИДА БЕЛОДРОБНО
ПОВЪРХНОСТНО АКТИВНО ВЕЩЕСТВО И ЛЕКАРСТВЕНО СРЕДСТВО ЗА
ЛЕЧЕНИЕ НА ДИХАТЕЛНА НЕДОСТАТЪЧНОСТ

Област на техниката

Представяното изобретение се отнася за нов синтетичен пептид. По-подробно, касае се за синтетичният пептид, който бидейки смесен с липидна микстура, показва силнодействуваша повърхностна активност. Изобретението също се явява междинен продукт за производството на такъв синтетичен пептид, с качества на белодробно повърхностно активно вещество, съдържащо пептида и липидна смес и лекарствено средство за лечение на синдрома дихателна недостатъчност, съдържащо активна съставна част.

Предшествувашо състояние на техниката

Синдромът на дихателна недостатъчност е заболяване,

при което повърхностната активност на алвеоларната повърхност е понижена дължаща се на липса на белодробно повърхностно активно вещество. Това неизбежно води до колабиране на алвеолите, което от своя страна причинява тежки респираторни разстройства. Този синдром се среща често при недоносени новородени и завършва с висок процент на смъртност. Известно е, че такива белодробни повърхностно активни вещества са силно ефективни при синдрома на неонатална дихателна недостатъчност.

Хората в зряла възраст също страдат от хипоксия при различни заболявания и съществуват много примери, когато дифузни сенки, наподобяващи матово стъкло се виждат при рентгенови снимки на гръдния кош и се наблюдава респираторна инсуфициенция, въпреки командното дишане с респиратор. Ueda и сътрудници (Hiromoto Yasuda, "Biosurfactants. Chapter 3, Medical Practices Using Surfactants. Section 1. Clinical Applications of Surfactants. V. Aspiration Pneumonia and Surfactants." p. 184. 1990, Science Forum, Co. Ltd.) съобщават за два случая на пневмония при възрастни хора (1) пневмония от дишане на газове на азотна киселина и 2) рецидивираща аспирационна пневмония, породена от мозъчен тумор, довели до хипоксемия и предизвикали влошаване на общото състояние и дихателна недостатъчност) при които беше постигнато значително подобрение и живота на пациентите беше спасен благодарение на инжектиране в респираторния тракт на белодробно повърхностно активно вещество. Следоперативна дихателна инсуфициенция може да се получи след сърдечни операции, след спиране на дишането през време на операцията. Ефектът от прилагането на белодробни повърхностно активни вещества при такива случаи на дихателна недостатъчност е

съобщаван и от други автори (Shuichi Nosaka et al., Journal of Japanese Medical Society for Biological Interface, Vol. 22, p. 66, 1991).

Заместителната терапия посредством прилагането на артефициални белодробни повърхностно активни вещества през респираторния тракт в това отношение показва значителни терапевтични ефекти при третирането на синдрома на дихателна недостатъчност.

Напоследък, бяха открити четири типа апопротеини, които са единствени по рода си за белодробни повърхностно активни вещества от бозайници. Съществуват апопротеин за повърхностно активно вещество А и апопротеин за повърхностно активно вещество D, които са с хидрофилни свойства, и апопротеин за повърхностно активно вещество В (оттук нататък ще бъде отбелязван като SP-B) и апопротеин за повърхностно активно вещество С (оттук нататък ще бъде отбелязван като SP-C), които са с хидрофобни свойства (Toyoki Akino and Yoshio Kuroki, Respiration and Circulation, vol. 38, No. 18, p. 722, 1990; Hiromoto Yasuda et al., Biosurfactants: Chapter 2. The Biochemistry of Biosurfactants - Surfactants and Apoproteins, p. 131, 1990, Science Forum, Co. Ltd.).

SP-C (секвенция No 1), получен от човешки бял дроб, се състои от 35 аминокиселини и е апопротеин със силно изразени хидрофобни свойства, богат на валин и има фенилаланин, като N-терминална аминокиселина. SP-C са изолирани от волски бял дроб (последователност No 2), свински бял дроб (секвенция No 3), бял дроб от плъхове и т.н., също се състоят от 34 до 35 аминокиселини и макар че аминокиселинните секвенции на N-терминала са различни за различните видове, те демонстрират екстремално висока степен

на хомоложност с човешкия SP-C.

Патентна публикация в Япония с No Hei-3-502095 също посочва, че синтетичният пептид (последователност No 4), със споменатата по-долу 32 аминокиселинна последователност, която е част от структурата на SP-C, е минималната единица, която показва висока повърхностна активност, така че смеси от гореспоменатия пептид и липиди са ефективни при лечението на синдрома на белодробна инсуфициенция и че сравнения между повърхностните активности на тази минимална единица пептид и на друг синтетичен пептид с по-къси аминокиселинни последователности показват, че загубата на повърхностна активност се дължи не на загубата на специфична аминокиселина, а на намаляването на дължината на пептидната верига.

Предварително, част от авторите на представяното изобретение са установили, че смеси от синтетичен пептид (ще бъде споменаван оттук нататък като TP-C), и липид са ефективни при лечението на синдрома на дихателна недостатъчност и са заявени за патентване в този предмет на патент (Japanese patent application No. Hei-5-518188).

Относно производството на синтетични пептиди, най-общо е упоменато, че аминокиселинната последователност на пептида става дълга, образуването на погрешни пептиди в процеса на добиване зачестява, изолирането и пречистването стават трудни, удължава се времето за производство, обема на продукцията намалява и т.н.

Също така, поради съображения за запазване на качествените показатели, композициите на белодробните повърхностно активни вещества често се предлагат под формата на прах за приложение като суспензия на физиологичен

разтвор. Такива методи, като прибавяне на суспендиращи средства например манитол (Japanese patent publication No. Hei-1-60541) и лиофилизация при първично замразяващи температури от -1 до -10 $^{\circ}\text{C}$, са били предлагани за подобряване на суспензибилитета на белодробните повърхностно активни вещества. Обаче, тези методи са комплицирани за производството и по-нататъшното им усъвършенствуване за получаването на лекарствени средства е желано.

Съставът на белодробното повърхностно активно вещество (упоменаващо по-нататък като S-35), получен посредством свързването на SP-C с липидна смес, включваща кисел фосфолипид и масленокиселинен аналог, има крайно ниска дисперсибилност във физиологичен разтвор, правейки го труден за приготвяне на суспензия, която е достатъчно постоянна, за да бъде използвана като композиция. Причините включват формирането на дисулфидни връзки посредством цистеинови остатъци в пептида, които придават на пептида силна способност за свързване и голяма хидрофобност на белодробното повърхностно активно вещество.

Тъй като TP-C е с ниска разтворимост в най-често прилаганите разтворители, необходимо да се използва трифлуороцетна киселина (TFA) за получаването на състава на белодробното повърхностно активно вещество. TP-C поражда също проблеми, като например е необходимо по-продължително време за концентриране и изсушаване за отделянето на колкото е възможно повече TFA и суспензията на белодробното повърхностно активно вещество става подкиселена през време на добиването на белодробното повърхностно активно вещество, поради остатъчната TFA.

Авторите на представяното изобретение изследват задълбочено синтетични пептиди достигат до изобретението, откривайки, че неизвестни до сега синтетични пептиди (по-нататък ще се наричат "синтетичните пептиди от изобретението"), които съдържат спомената по-долу аминокиселинна последователност с хидрофилна пептидна част на специфична секвенция на N-края и хидрофобна пептидна част, съставена главно от леуцин и/или Илеуцин на C-края, лесни за изолране и пречистване, годни за получаване в големи количества, добре разтворими в мравчена киселина, трифлуороцетна киселина, трифлуоретилов алкохол, диметилсулфоокис (DMSO), хлороформ, хлороформ-метанолови микстури, метанол, етиленов хлорхидрин и тетрахидрофуран и, особено, имат значително висока разтворимост в метанол в сравнение с синтетични SP-C и TP-C.

Авторите на представяното изобретение също са открили, че белодробните повърхностно активни вещества, получени от синтетичните пептиди от изобретението и липидни смеси показват, дори когато са получени посредством обикновени лиофилизационни методи, пробедени при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или повече и без прибавяне на суспендиращо средство, добра постоянна суспензибилност в сравнение с S-35 или с синтетично белодробно повърхностно активно вещество (споменаващо оттук нататък като "SF-3"; Japanese patent publication No. Hei-2-87685) съдържащи само липидна микстура, състояща се от холинов фосфолипид, кисел фосфолипид и мастна киселинен аналог или субстанция (споменаваща оттук нататък като "S-TA"; Japanese patent publication No. Sho-61-9924) съдържаща заедно с мастна киселина и вещество, съдържащо фосфолипид, неутрален липид,

общ холестерол, въглехидрати и протеини, намиращи се в белите дробове на бозайници и показвали висока повърхностна активност, която е еквивалентна на тази на S-35. S-TA или белодробно повърхностно активно вещество, съдържащо TP-C и липидна смес.

Хаа - Пролин - Валин - Хbb - Хсс - Лизин - Аргинин - W

(Хаа може да не е представена или може да представлява цистеин или серин, Хbb представлява хистицин или аспарагин, Хсс представлява леуцин или изолеуцин и W представлява хидрофобната част.)

Синтетичния пептид от изобретението съдържа хидрофилна пептидна част описана посредством спомената по-долу специфична последователност на N-край и пептидна част от леуцин и/или Nлеуцин на C-край и синтетичен пептид, който разкрива голяма повърхностна активност когато е съединен с липидна микстура.

Хаа - пролин - валин - Хbb - Хсс - лизин - аргинин

(Хаа може да не е представена или може да представлява цистеин или серин, Хbb представлява хистицин или аспарагин, Хсс представлява леуцин или изолеуцин).

Въпреки че хидрофобната пептидна част е съставена от такива хидрофобни аминокиселини като леуцин, Nлеуцин, изолеуцин, валин, фенилаланин, Nвалин и триптофан, тя основно включва 12 или повече и предимно 12 - 20 молекули на леуцин и/или Nлеуцин. Въпреки че е предпочитана за целите на синтеза, тази хидрофобна пептидна част е съставена от същите хидрофобни аминокиселини, последната може да включва подходяща секвенция от молекули на леуцин и Nлеуцин или може да съдържа от 1 до 5 молекули изолеуцин, валин, триптофан и други хидрофобни аминокиселини в техните секвенции.

Синтетичните пептиди от изобретението също съдържат синтетични пептиди, в които аминокиселина или пептид са прибавени към N-края и/или C-края на гореспоменатия синтетичен пептид. Аминокиселина, която се прибавя към N-терминала може да бъде цистеин или серин. Освен това, пептид с последователност фенилаланин - глицин - изолеуцин - пролин може да бъде прибавена към N-края. Тиоловата група или хидроксилната група присъстващи в гореспоменатият синтетичен пептид могат да бъдат ацилирани посредством мастна киселина с 14 до 18 въглеродни атома и за предпочитане посредством палмитинова киселина или може да бъде ацетамидметилат d. Пептидът, който се прибавя към C-терминала може да има последователност - глицин - аланин - леуцин - леуцин или глицин - аланин - леуцин - леуцин - метионин - глицин - леуцин.

Освен това, синтетичния пептид от изобретението също включва синтетични пептиди (с изключение за пептидите, имащи частичната структура на природен SP-C), които съдържат пептидна група за да покажат силни повърхностни активности, когато са свързани с липидни смеси, дори при прибавяне, отстраняване или заместване на една или множество включени аминокиселини.

Синтетичния пептид от изобретението може да бъде получен чрез химически или генно инженерни методи, въпреки че химичните методи са за предпочитане, имайки предвид процесите на изолране и пречистване.

Химическите способи за получаване на синтетичния пептид от изобретението включват етапни методи за елонгиране и фрагментни кондензационни способи, включващи методи за синтез с течна фаза или твърда фаза, такива като азидни

методи, методи с кисел хлорид, методи с кисел анхидрид, методи със смесен кисел анхидрид, DCC методи, методи с активиран естер (р-нитрофенол), естерен метод, метод с р-хидроксисуцинамиден естер, карбоимидазолов метод и т.н.), окислително-редукционни методи и DCC-активационни методи.

Изобретението също предлага фрагментен кондензационен метод за производство на синтетичните пептиди от изобретението в които хидрофилната пептидна група със защитен N-край и защитени функционална страна на беригите служи преходен за производство.

В сравнение с поэтапният елонгационен метод, фрагментния кондензационен метод осигуряващ по-лесно пречистване на необходимата субстанция, е по-подходящ за синтез с голям обем и има особеност, че могат да бъдат предотвратени загубите от неочаквани грешки. Синтетичните пептиди от изобретението могат да бъдат получени посредством кондензиране на хидрофобната част с предимно произведена хидрофилна пептидна част със защитен N-край и защитена функционалната страна на беригите, посредством метод за синтеза с течна или твърда фаза. Защитните групи за N-терминала и функционалната страна на беригите не са частично ограничени като дължина, тъй като те са защитни групи и се прилагат в обикновена синтеза на пептиди. Групите на 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc), 2-хлорбензилокси карбонил (2-CLZ) или t-бутилоксикарбонил (Boc) могат да бъдат прилагани като протективни групи за терминалната аминокиселинна група, Fmoc, Boc или карбобензокси (Z) или толуолсулфонилна група (Tos) могат да бъдат използвани като протективни групи за лизин, триптофан, Fmoc, Boc, Dnp, Bom, Bzl или Tos могат да бъдат използвани

като протективна група за хистидин и Mtr, Pmc, Mtr или Tos могат да бъдат използвани като протективна група за аргинин. Така, пептидите, които могат да бъдат използвани като междинни за получаването на синтетичният пептид от изобретението включват Fmoc - пролин - валин - хистидин(Trt) - леуцин - лизин(Boc) - аргинин(Mtr), Fmoc - пролин - валин - аспарагин - леуцин - лизин(Boc) - аргинин(Mtr) и Fmoc - пролин - валин - аспарагин - изолеуцин - лизин(Boc) - аргинин(Mtr).

Белосдробното повърхностно активно вещество (по-нататък в текста ще бъде означавано като "повърхностното активно вещество от изобретението") може да бъде получавано посредством съединяването на синтетичния пептид от изобретението с липидна смес, състояща се от хлорфосфоглицерид, киселинен фосфолипид и аналог на мастна киселина.

Подходящо е да се установят композиционни съотношения, така че тегловните съотношения на всеки от тези компоненти към общото сухо тегло на крайния продукт да са 0.1 - 0.5% (W/W) за синтетичния пептид, 50.6 - 80.5% (W/W) за хлорфосфоглицерида, 4.5 - 37.6% (W/W) за киселинния фосфолипид и 4.6 - 24.6% (W/W) за аналога на мастна киселина.

Примери за холинови фосфоглицериди, които могат да бъдат използвани съвместно в състава на повърхностното активно вещество от изобретението включват 1,2 - диацилглицеро - (3) - фосфохолин, такива като 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (дипалмитоилфосфатидилхолин), 1,2 - дистеароилглицеро - (3) - фосфохолин, и 1 - стеароил - 2 - палмитоилглицеро - (3) - фосфохолин и т.н.; 1 - алкил - 2 - ацилглицеро - (3) -

фосфохолини, такива като хексадецил - 2 - палмитоилглицеро - (3) - фосфохолин и 1 - октадецил - 2 - палмитоилглицеро - (3) - фосфохолин и т.н.; и 1,2 - диалкилглицеро - (3) - фосфохолини, такива като 1,2 - диhexадецилглицеро - (3) - фосфохолин и т.н. Въпреки че, оптични изомери, базирани на вторият въглероден атом на глицероловия остатък, са налице за гореспоменатите съединения, всяка от D- (дяснобъртяща), L- (лявобъртяща) и DL-форми могат да бъдат използвани като повърхностното активно вещество от изобретението. Освен споменатите по-горе единични съединения на холинобите фосфоглицериди и микстури съставени от два или повече различни 1,2 - диацилглицеро - (3) - фосфохолини с ацилови групи, за предпочитане с две наситени ацилови групи с 12 до 24 въглеродни атома или смеси от такива микстури, и гореспоменатите единични съединения могат да бъдат използвани като холинов фосфоглицерид.

Примери за подходящи кисели фосфолипиди включват 1,2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфорна киселина (Л - α - фосфатидна киселина), 1,2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - Л - серин (фосфатидилсерин), 1,2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (фосфатидилглицерол) и 1,2 - диацил - sn - глицеро - (3) - (1) - Л - мио - инозитол (фосфатидилинозитол). Първата и втората позиции на тези съединения могат да бъдат заместени от същата ацилова група или от различни ацилови групи. Тук за предпочитане е ациловата група да има от 12 до 24 въглеродни атома.

Примерите за подходящи аналози на мастни кисели киселини включват свободни мастни киселини, соли на алкални метали на мастни киселини, алкилови естери на мастни киселини, глицеринови естери на мастни киселини и мастни

амини или смеси, състоящи се от два или повече от горепозброените и мастни алкохоли и мастни амини.

В представяното описание на изобретението, терминът "аналози на мастни киселини" включва гореспоменатите мастни алкохоли и алифатни амини.

Миристиновата киселина, палмитиновата киселина или стеариновата киселина могат да бъдат използвани като свободни мастни киселини, въпреки че палмитиновата киселина е за предпочитане.

Натриевите соли, калиевите соли, магнезиевите соли и калциевите соли на гореспоменатите мастни киселини могат да бъдат използвани като соли на алкалните метали на мастни киселини, въпреки че натриевият палмитат е предпочитан. Леките алкилови естери с от 1 до 4 въглеродни атома могат да бъдат използвани като алкилови естери на мастните киселини, въпреки че е предпочитан етиловият палмитат. Моноглицериновите естери могат да бъдат използвани като глицеринови естери на мастни киселини, въпреки че предпочитаният е монопалмитинът.

Алкохоли с от 14 до 18 въглеродни атома могат да бъдат използвани като мастни алкохоли, въпреки че е предпочитан хексадециловия алкохол. Амини с 14 до 18 въглеродни атома могат да бъдат използвани като алифатни амини, въпреки че хексадециловият амин е предпочитан.

Гореспоменатите холиноб фосфоглицерид, кисел фосфолипид и аналог на мастна киселина могат да бъдат продукти, извлечени от растения или животни, полусинтетични продукти или синтетични химически продукти, а също и от продукти, предложени на пазара.

Повърхностното активно вещество от изобретението може

да се продуцира посредством изсушаване и отбърдяване под регулирано налягане, микстура от разтвори на пептидът от изобретението и гореспомената липидна смес и суспендиране на така получения остатък в подходяща суспендираща течност и след това последваща лиофилизация.

Примери за разтворители, които могат да бъдат прилагани за получаване на разтвора на пептида от повърхностното активно вещество от изобретението включват мравчена киселина, TFA, DMSO, хлороформ-метанол, хлороформ, метанол, етиленов хлорхидрин и тетрахидрофуран.

Примерите за разтворители, които могат да бъдат прилагани за получаване на разтвора на липидната смес, включват хлороформ и хлороформ-метанол [1:2 - 5:1 (V/V)].

Примери за суспендираща течност включват вода и водно-метанолови смеси [4 : 1 - 20 : 1 (V/V)], въпреки че водно-метаноловите смеси са за предпочитане. Суспендиращата реакция се извършва в продължение на 5 - 6 минути, за предпочитане за 15 - 30 минути при 30 - 60° C и най-добре при 40 - 50° C.

Повърхностното активно вещество от изобретението, получено по този метод, неизбежно съдържа малко количество от остатъчна вода. Обаче, за предпочитане е да се извърши изсушаване, така че тегловния процент на остатъчната вода се намали до 5.0% (W/W) или по-малко от общото тегло на продукта. Ако повърхностното активно вещество е изсушено до това равнище, етаноловият остатък ще стане неоткриваем в случаите, когато се използват водно-етанолови микстури.

Суши композиции на повърхностното активно вещество от изобретението под формата на прах могат да бъдат еднакво суспендирани или диспергирани в разтвор с подходяща

физиологична концентрация на едновалентна или двувалентна сол на метали, например 0.9% разтвор на натриев хлорид или 1.5 mM калиев хлорид, или буферен физиологичен разтвор, съдържащ такива соли, посредством използването на ръчна бъркалка или миксер с няколко скорости или прибор, генериращ ултразвук.

Повърхностната активност, суспензibilitетa и фармакологичните свойства на повърхностното активно вещество от изобретението, получено по този начин, ще бъдат подробно описани по-долу.

1) Повърхностна активност

а) Ефект на снижаване на повърхностното напрежение

Ефектите на снижаване на повърхностното напрежение са измерени посредством методът на Tanaka и сът. (Journal of Japanese Medical Society for Biological Interference, vol. 13, No 2, p. 87, 1982).

Суспензия на повърхностното активно вещество от изобретението (ПАВИ) беше накапана във физиологичен разтвор (с повърхностна зона от 54.0 cm²), така че да се получат 1.0 - 2.0 μ g от ПАВИ за 1 cm². Споменатата повърхностна зона беше стеснена и разширена в границите на 54.0 - 21.6 cm² за 2 до 5 минути и беше извършено продължително измерване на повърхностното напрежение при 37°C с безна на Wilhelmy (произведена от Kyowa Interface Science Co.Ltd.). Максималното повърхностно напрежение бе 24.7 - 34.1 dyne/cm а минималното - от 0.2 до 8.7 dyne/cm, показвайки, че снижавайки повърхностното напрежение, ефектите на повърхностното активно вещество от изобретението понижават на повърхностното напрежение на физиологичен разтвор.

Измервания извършени със същия метод за снижаване на

повърхностното напрежение показват понижаване на ефекта на SF-3 до максимални стойности от 26.8 - 50.3 dyne/cm и минимални стойности 1.0 - 13.5 dyne/cm.

Повърхностното напрежение на физиологичния разтвор при 37° C бе 70.5 dyne/cm.

б) Способност за разпространение над разделителната
повърхност между газ-течност

Суспензия на повърхностното активно вещество от изобретението беше накапана върху повърхността на физиологичен разтвор, така че да се получат 0.8 - 1.5 μ g за 1 cm² от повърхността на физиологичния разтвор и изменението във времето на повърхностното напрежение беше измерено чрез метода на вертикална пластина от момента, непосредствено след като суспензията беше накапана. Температурата при измерването бе 37°C.

Равновесното състояние се отнася за времето, когато повърхностното напрежение достига фиксирана стойност от момента, непосредствено след накапването на пробата и стойността след това време се нарича равновесно повърхностно напрежение.

Повърхностните активни вещества от изобретението формират филм върху повърхността между газ-течност за кратко време от 30 - 60 секунди и понижават повърхностното напрежение до 26.7 - 34.3 dyne/cm.

Измервания, извършени със същия метод за разпространение на повърхност газ-течност, на ефекта на SF-3 показват, че след 120 секунди повърхностното напрежение беше 38.1 - 52.9 dyne/cm.

Това показва, че повърхностните активни вещества от изобретението се разпростират бързо над повърхността

газ-течност и бързо снижават повърхностното напрежение.

в) Абсорбционна способност към разделителната
повърхност между газ-течност

Бяха приготвени суспензии на физиологичен разтвор, съдържащи 0.2 - 1.0 mg от повърхностното активно вещество от изобретението на 1 ml при 37°C и бяха измерени степените на абсорбция на суспендираните повърхностни активни вещества от изобретението от разделителната повърхност между газ-течност на физиологичен разтвор.

Абсорбционните способности бяха измери според метода на King и сътр. (American Journal of Physiology, No.223, p.715, 1972).

Суспензията беше инжектирана на дъното на тefлонов резервоар с диаметър 5 cm, съдържащ физиологичен разтвор и след това беше извършено разбъркване с магнитна бъркалка. След прекратяването на разбъркването, абсорбционната способност беше определена чрез разликата на повърхностното напрежение.

Повърхностното активно вещество от изобретението понижи повърхностното напрежение до 28.3 - 36.8 dyne/cm за 30 до 100 секунди след спиране на разбъркването и след това повърхностното напрежение остана постоянно.

Това показва, че повърхностното активно вещество от изобретението, в суспендирано състояние, се абсорбира от разделителната повърхност между газ-течност за 30 до 100 секунди и образува филм със силна повърхностна активност.

Когато се измерва по същия начин SF-3, се установява, че постоянни повърхостни напрежения от 42.2 до 58.3 dyne/cm бяха осъществени за 150 секунди и повече.

Това показва, че абсорбционната способност към

разделителната повърхност между газ-течност на SF-3 е по-ниска от тази на повърхностното активно вещество от изобретението, и че последното притежава голяма способност да повишава повърхностната абсорбция.

2) Способност за суспензия

Бяха проведени тестове за изпитване на способността за суспендиране в съответствие с метода посочен от Japanese utility model publication No. Hei-4-76965.

Способността за суспендиране беше оценена по отношение на дисперсионната ефективност за специфично време след началото на процеса на дисперсия, както и на размера на максималните диспергирани частици 2 минути след началото на процеса.

Бяха проведени тестове за изпитване на способността за суспензия, както следва. По 60 mg от всяко от повърхностните активни вещества от изобретението бяха диспергирани във 20 милилитрови стъкленици. След това бяха прибавени по 2 ml физиологичен разтвор към всеки съд и биялите бяха поставени в шедърът на Iwaki KM Shaker-V-S (произведен от Iwaki Sangyo Co., Ltd.) и разклащани при 270 удар за минута. Дисперсионните свойства на всяка проба бяха визуално наблюдавани с увеличителни стъкла на всеки 30 секунди през първите 2 минути след началото на бъркането, всяка минута между 2-та минута и 4-та минута след началото на разбъркването и всеки 10 минути след четвъртата минута от началото на бъркането.

Способността за суспензия беше оценена по отношение на дисперсионната ефективност за всяко специфично време от две лица, като всяко лице оценява по 10 проби. За суспензията на пробите се съдеше по това да няма малки

количества в контейнера и дали съставът е диспергират равномерно във физиологичния разтвор, формирайки бяла консистентна суспензия.

Способността за суспензия беше оценена по отношение на дисперсионната ефективност за всяко специфично време от всяко лице, като процент на пробите, за които суспензията е завършена по отношение на общия брой (10 стъкленици) на пробите и беше посочена като средна стойност, определена от двете лица.

Беше измерен размера на максималните диспергирани частици както следва. По 60 ml от всяко от повърхностните активни вещества от изобретението бяха диспергирани във 20 ml стъкленици. След това бяха прибавени по 2 ml от физиологичен разтвор към всяка стъкленица и последните бяха разклащани непрекъснато за 2 минути при същите условия, като споменатите по-горе. След това беше търсена с микроскоп най-голямата частица в суспензията и нейният диаметър бе определен с дебеломер. Беше установено, че повърхностните активни вещества от изобретението бяха по-добре диспергирани за двете минути, и че максималните размери на техните частици беше с 0.8 mm или по-малък, показвайки, че тяхната способност за суспензия е добра.

3) Фармакологични свойства

а) Остра токсичност

Острата токсичност на повърхностните активни вещества от изобретението бяха изпитани, като се използваха 5 седмични мъжки мишки ICR и плъхове Wister. Оралната летална доза - 50 (LD-50) и перитонеалната (LD-50) за мишките беше 2.4 - 10.0 g/kg и 1.0 - 5.0 g/kg респективно, докато за същите за плъховете бяха 1.5 - 5.0 g/kg и 1.5 - 2.5 g/kg

респективно.

б) Подостра токсичност

Повърхностните активни вещества от изобретението бяха инжектирани интраперитонеално на зрели плъхове тип Wister с дневни дози от по 300 - 600 mg/kg в продължение на 1 месец. Нямаше различия в теглото на плъховете и не бяха видени аномалии при хистологичните изследвания с невъоръжено око.

б) Ефекти, поддържащи алвеоларния обем

Недоразвити зародиш от заек, едва ли произвеждат белодробно повърхностно активно вещество в 27 ден от периода на бременността и са в състояние на дефицит на белодробно повърхностно активно вещество. Така те се използват като модел на опитни животни за изучаване на синдрома на дихателна недостатъчност при новородените.

5 заешки зародиша в 27-ия ден на бременността бяха използвани и обемите на алвеоларното пространство (от сега ще бъде означаван като белодробен обем) бяха измерени при различни стойности на въздушно налягане при 37°C.

Шията на фетуса беше срязана и бяха извършени продължителни измервания с боден манометър, прикрепен към трахеята, 5 минути след прилагането на повърхностното активно вещество от изобретението в респираторния тракт. Въздушното налягане нарасна до 30 cm H₂O с двуканална с отделно задвижване на буталата помпа No. 940 (производство на Harvard Co., USA) за разширяване на алвеолите. Въздушното налягане след това беше намалено до 0 cm H₂O до колапс на алвеолите, докато се измерваха белодробните обеми при различни налягания. Белодробните обеми бяха отбелязани в милиметри за килограм тегло (ml/kg).

Повърхностните активни вещества от изобретението бяха

инжектирани чрез директни инжекции от 0.05 - 0.5 ml суспензии на физиологичен разтвор и концентрации на повърхностни активни вещества от 1.0 - 6.0% (W/V) в респираторния тракт.

Белодробният обем в момента, когато налягането беше намалено до 5 cm H₂O, показва функционалния остатъчен капацитет, като нарастването на този обем води до по-висока активност на повърхностното активно вещество от изобретението.

Като контрола беше поставен физиологичен разтвор вместо повърхностното активно вещество от изобретението. Белодробните обеми (при 5 cm H₂O) на недоразвитите зародиши от зайци от контролната група бяха от 1 - 5 ml/kg. Отбелязваме, че алвеолите трудно бяха разширени.

В пълния срок фетусите в 30-ия ден от бременността имат нормални нива на белодробно повърхностното активно вещество. Техните белодробни обеми (при 5 cm H₂O) са 35 - 53 ml/kg, показвайки че алвеолите са адекватно разширени, и че може да бъде осъществена нормална аспирация.

В случаите, където SF-3 беше прилаган, белодробните обеми (при 5 cm H₂O) на недоразвити зародиши бяха 15 - 25 ml/kg, показвайки неадекватно разширяване на алвеолите.

В случаите, където повърхностното активно вещество от изобретението беше инжектирано, белодробните обеми (при 5 cm H₂O) бяха 39 - 55 ml/kg, показвайки че повърхностното активно вещество от изобретението подобрява белодробния обем на недоразвитите зародиши до нормални нива.

Както бе описано по-горе, синтетичните пептиди от изобретението притежават качеството силно да повишават повърхностната активност на липидните смеси. Това дава

възможност да се произведат терапевтични средства за лечение на синдрома на дихателна недостатъчност, които са активни по отношение на повърхностна активност, суспензибилитета и фармакологични свойства на повърхностни активни вещества от изобретението, съдържащи синтетичните пептиди от изобретението и липидна смес.

Лекарствените състави, имащи повърхностни активни вещества от изобретението, като активният инградиент може също да бъде използван за лечението на други заболявания, за които белодробното повърхностно активно вещество показва терапевтичен ефект, включително при постоперативна дихателна недостатъчност, астма, бронхити, некротични ентерити при новородени, стомашни и дуоденални язви, респираторни болести, причинени от вируси и тръбна непроходимост, и за предпазване на сраствания на фалопиевата тръба и за следоперативни органични сраствания, и като експекторанти.

Терапевтични средства за синдрома на дихателна инсуфициенция, предлагани чрез изобретението, съдържат 50 - 1000 mg от повърхностното активно вещество от изобретението за доза при употреба от деца и 500 - 5000 mg от повърхностното активно вещество за доза за употреба от възрастни. Такива дози са приготвени посредством суспендирането във вода, физиологичен разтвор или буфери, т.е. те са физиологично толерантни при концентрации от 1.0 - 10.0% (W/V). Тогава те се прилагат за лечение до 72 часа след изявите на белодробни нарушения, посредством инжектиране в белодробния тракт от 1 до 10 пъти. Композициите могат също да бъдат администрирани под формата на прах без суспендиране. Дозирането, начина на употреба и честотата на приема могат да бъдат променяни, в зависимост

от симптоматиката на пациента и съпадащо лечение.

Терапевтични средства от изобретението могат да съдържат, ако е необходимо, такива фармакологични средства като стабилизиращо средство, предпазно средство, изотонично средство, буферни средства, суспендиращо средство, антиокислително средство и повърхностно активно вещество или такива лекарства като бронходилататори, антиалергични средства, карциномостатични средства, антивирусни средства, протибовъзпалителни средства и антигъбични средства.

Дозата може съвместно да се приема под формата на течност или прах. Терапевтичните средства от изобретението могат да бъдат напълнени в запечатани опаковки като ампули и флакони и съхранявани като стерилни лекарствени средства.

Примери за изпълнение на изобретението

Ще бъде описана с повече подробности референция за изобретението със следните примери.

(1) Получаване на пептида

В примерите, изброени по-долу, молекулното тегло на синтезирания пептид беше измерено с помощта на мас спектрометър чрез бомбардиране с бърз атом (FAB/MS). Беше използван Мас анализаторът JMS-S102A (JEOL.Ltd.) и беше използвана цезиева пушка 10 KeV) като източник на йони.

[Пример 1]

Пептидът (пептид А) показан чрез [последователност No 5], беше синтезиран на фенилацетамидметил (PAM) на повърхност от смола с помощта на метода за синтеза на твърда фаза в съответствие метода, описан в "Пептидите" (Gross E. and Meinenhofe J. eds., Barany G. and Merrifield R. authors, vol. 2, pp. 1-284, Academic Press, New York, 1980).

Остатък от лебцин с C-терминал беше трансформиран с t-бутилоксикарбонил - лебцин (Вос - лебцин) и свързан към РАМ смола през оксиметилфенилацетамидметилова връзка. След свързване C-терминала, смолата Вос - лебцин - Ram (0.70 mol/g, 0.35 g) беше трансферирана към реакционния контейнер на пептиден синтезатор (Model 990E, Beckman Instruments, Inc.). Аминокиселини, към които се прилага предпазно третиране, след това бяха прибавени в посока на N-края на повърхност от смола чрез симетричен анхидриден метод за синтезиране на напълно защитен пептид - O - смола. Но при кондензацията на аргинина, беше извършено двойно съединяване, при използване на N,N - дициклохексилкарбодиимид/ хидроксибензотриазол [Conie et al., Chem. Ber., 103, 788-798 (1970)].

N-терминална amino група от всички аминокиселини беше защитена с Вос група и функционалните странични вериги бяха защитени със следните групи преди използването на аминокиселини в реакцията:

аргинин	-	Tos	:	(тосил)
лизин	-	2CLZ	:	(2-хлорбензилоксикарбонил)
цистеин	-	4MeBzl	:	(4-метилбензил)
хистидин	-	Tos	:	(тосил)

Техните кондензационни реакции бяха потвърдени чрез нинхидриновия метод на Kaiser test. Напълно защитената пептид - O - смола (155 mg) беше оставена да набъбне за 5 минути в дихлорметан. Беше отстранена N - α - Вос защитна група с TEA, съдържаща 1% (v/v) индол и 0.1% (v/v) етандитиол. След това пептидът беше разцепен от смолата посредством третиране на незащитения пептид-O-смола с безводен водороден флуорид (HF) (11 ml), към който бяха

прибавени p-крезол (1 ml), p-тиокрезол (0.2 g) и DMSO (1 ml) за 60 минути при 0°C.

Водороден флуорид и DMSO бяха дестилирани под вакуум при 0°C. Отстраненият пептид и след това смолата бяха промити трикратно със студен диетилов етер (15 ml) и отделения пептид беше екстрахиран чрез промиване за четири пъти с студен TFA (5 ml). Екстрахираната течност беше филтрирана незабавно и беше прибавена леденостудена вода за да преципитира суровия пептид. Суровия пептид след това беше центрифугиран на 1000 x g и 0° C за 30 минути и възстановен като преципитат. Този преципитат беше промит с диетилов етер (15 ml). След повтарянето на тези промиващи процеси с използване на диетилов етер, етилов ацетат и дестилирана вода, бяха добити 84 mg от пептид A.

Този суров пептид беше разтворен в 50% воден разтвор на DMSO и беше пречистен чрез обратима фаза на прецизна течна хроматография под високо налягане (HPLC) използвайки μ -Bondaspheres и C8-300 колона за събиране на чист пептид A.

Беше извършено елюиране за 5 минути с използване на 50% воден разтвор на ацетнитрил, съдържащ 0.1% TFA, като елюент. След това беше извършена елюиране за 30 минути под линейно концентрационен градиент, формиран чрез гореспоменатия елюент и 80% воден разтвор на ацетнитрид, съдържащ 0.1% TFA.

Наличието на пептида в елюента беше демонстрирано на дължина 245 nm (спектрофотометър; Japan Spectroscopic Co.Ltd. Model 870-UV) и с диференциален рефрактометър (Shimadzu Manufacturing corporation Model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$); 3837.1 (изчислено молекулно тегло; 3835.9)

Пептидът (пептид В) със [секвенция No. 6] беше синтезиран посредством метод с твърда фаза с използването на системата за синтез на полипептиди със твърда фаза, "Kokku-San" (търговска марка: Kokusan Chemical works Co.Ltd.), и позовавайки се на методите показани в "Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach" от E. Atherton and R.C. Sheppard (pp.25-189), Oxford University Press, Oxford) и от Kenichi Akagi et al. (Chem. Pharm. Bull., pp.2661-2664, 1989).

N - α - 9 - флуоренилметилоксикарбонил - левцин - D - смола (Fmoc - левцин - D - смола) (0.20 mmol/0.5 g), в която N - α - 9 - флуоренилметилоксикарбонил - левцин (Fmoc - левцин) е свързан към 4 - (хидроксиметил) феноксил-съполимер (стирен 1% дивинилов бензин) смола, беше използван като започна смолата. Този смола беше оставена да набъбне за 20 минути с N, N - диметилформанид (DMF) и след това промита четири пъти с DMF. 20% пиперидин в DMS беше след това прибавен и сместа беше разклашана за отстраняване на защитните групи. Тази операция беше повторена три пъти да отдели напълно защитните групи. Последва трикратно промиване с DMF, трикратно с N - метил - 2 - пиролон и трикратно с DMF отново за отделяне на излишъка от пиперидин в смолата. Наличието на пиперидин беше проверено по това брене с хартия за pH.

DMF (6 ml) Fmoc - левцин (0.5 mmol), N - хидроксибензотриазол (0.5 mmol) и N, N' - диизопропилкарбодимид (0.5 mmol) бяха прибавени и сместа беше разклашана в продължение на 90 минути за да се проведе реакцията кондензация. Смолата след това беше промита четири пъти с DMF за да бъдат елиминирани излишните

реагенти. Тази кондензационна реакция беше тествана с Kaiser тест чрез нинхидринов метод.

Набелязаният план за синтеза беше изпълняван и аминокиселините бяха прибавяни стъпка по стъпка в посока на N-терминала на повърхността на смолата, посредством това да формира пептида - O - смола с N-край и напълно защитени функционални групи.

Кондензационните реакции за въвеждането на аргинин, лизин, хистидин, пролин и цистеин бяха изпълнени двукратно за 120 минути всяка.

Посредством това, 20% пиридин в DMF бяха прибавени към защитения пептид - O - смола за да отдели Fmoc защитната група от N-терминала. След това пептида - O - смола беше промит шест пъти с DMF и шест пъти с метанол и изсушен при понижено налягане. m-крезол (0.2 ml), 1,2 - етандитиол (0.5 ml), тиозанизол (1.2 ml), TFA (7.5 ml) и триметилсилилбромид (1.4 ml) бяха прибавени към изсушения пептид - O - смола (100 mg), докато се извършваше разбъркване и охлаждане с лед. След това сместа беше разбъркана за 120 минути, докато охлаждането с лед отдели защитните групи от функционалните странични берици и отдели пептида от смолата и след това последва филтриране през стъклен филтър (G3). Филтратът беше концентриран под редуцирано налягане до приблизително 5 ml с евапоратор. След това беше прибавен диетилов етер за да преципитира пептида. Така преципитираният пептид беше събран чрез стъклен филтър (G3), промит петкратно с диетилов етер и след изсушаване под намалено налягане, бяха получени 60 mg от пептида B.

Аминогрупите с N-терминал на всички аминокиселини бяха защитени с Fmoc група и функционалните странични берици

Бяха защитени със следните групи преди използването на аминокиселините в реакцията:

аргинин - Mtr : (4-метокси-2,3,6-триметилбензенсулфонил)

лизин - Boc : (t-бутилоксикарбонил)

цистеин - Trt : (тритил)

хистидин - Trt : (тритил)

Приблизително 100 mg от суровия пептид бяха разтворени в TFA (1 ml) и четири пъти това количество от подвижна фаза на разтворител, т.е. 10 mM β - меркаптоетанол в TFA - дихлорметан (5 : 95, V/V), беше прибавено за да се получи 20 mg/ml разтвор на проба за пречистване посредством HPLC с използването на Asahipak GS - 510 (ϕ 7.5 x 500 mm) колона (търговска марка: Asahi Chemical Industry Co.Ltd.) посредством това да се събере чист пептид B.

Бяха използвани 10 mM β - меркаптоетанол в TFA - дихлорметан (5:95, V/V) като елюент и елюирането беше проведено при скорост на потока от 0.8 ml/min за 80 минути. Наличието на пептида в елюанта беше регистрирано на дължина 245 nm (спектрофотометър; Japan Spectroscopic Co.Ltd. Model 870-UV) и с диференциален рефрактометър (Shimadzu Manufacturing corporation Model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 3017.9 (изчислено молекулно тегло: 3016.9)

[Пример 3]

Пептидът (пептид C) с [последователност No. 7] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS ($M+H^+$): 3116.0 (изчислено молекулно тегло: 3115.1)

[Пример 4]

Пептидът (пептид D) със [секвенция No. 8] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS ($M+H^+$): 2663.7 (изчислено молекулно тегло: 2662.5)

[Пример 5]

Пептидът (пептид Е) със [секвенция No. 9] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H⁺): 2211.2 (изчислено молекулно тегло: 2209.9)

[Пример 6]

Пептидът (пептид F) със [секвенция No. 10] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H⁺): 2647.5 (изчислено молекулно тегло: 2646.4)

[Пример 7]

Пептидът (пептид G) със [секвенция No. 11] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H⁺): 3018.1 (изчислено молекулно тегло: 3016.9)

[Пример 8]

Пептидът (пептид H) със [секвенция No. 12] беше използвайки системата за синтез на полипептиди със твърда фаза, по същия начин както при пример 2.

За начална смола беше използвана смола N - α - флуоренил метилоксикарбонил -норлевцин - O - смола (Fmoc - норлевцин-O- смола) (0.20 mmol/0.5 g). Тази смола беше оставена да набъбне за 20 минути с DMF и след това промита четири пъти с DMF. 20% пиперидин в DMS беше след това прибавен и сместа беше разклащана за отстраняване на защитните групи. Тази операция беше повторена три пъти да отдели напълно защитните групи. Последва деветкратно промиване с DMF за отделяне на излишъка от пиперидин в смолата. Наличието на пиперидин беше проберено по това време с хартия за pH.

DMF (6 ml) Fmoc-Nle (0.5 mmol), N - хидроксибензотриазол (0.5 mmol) и N, N' - диизопропилкарбодимид (0.5 mmol) бяха прибавени и сместа

беше разклащана в продължение на 90 минути за да се пробере реакцията кондензация. Смолата след това беше промита четири пъти с DMF за да бъдат елиминирани излишните реагенти. Тази кондензационна реакция беше тествана с Kaiser тест чрез нинхидринов метод.

Набелязаният план за синтеза беше изпълняван и аминокиселините бяха прибавяни стъпка по стъпка в посока на N-терминала на повърхността на смолата, посредством това да формира пептида - O - смола с N-край и напълно защитени функционални групи.

Кондензационните реакции за въвеждането на аргинин, лизин, хистидин, пролин и цистеин бяха изпълнени двукратно за 120 минути всяка.

Посредством това, 20% пиридин в DMF бяха прибавени към защитения пептид - O - смола за да отдели Fmoc защитната група от N-терминала. След това пептида - O - смола беше промит шест пъти с DMF и шест пъти с метанол и изсушен при понижено налягане. m-крезол (0.2 ml), 1,2 - етандитиол (0.5 ml), тиозанизол (1.2 ml), TFA (7.5 ml) и триметилсилилбромид (1.4 ml) бяха прибавени към изсушения пептид - O - смола (100 mg), докато се извършваше разбъркване и охлаждане с лед. След това сместа беше разбъркана за 120 минути, докато охлаждането с лед отдели защитните групи от функционалните странични вериги и отдели пептида от смолата и след това последва филтриране през стъклен филтър (G3). Филтратът беше концентриран под редуцирано налягане до приблизително 5 ml с евапоратор. След това беше прибавен диетилов етер за да преципитира пептида. Така преципитираният пептид беше събран чрез стъклен филтър (G3), промит петкратно с диетилов етер и след изсушаване под намалено налягане, бяха получени

65 mg от пептида H.

Аминогрупите с N-терминал на всички аминокиселини бяха защитени с Fmoc група и функционалните странични вериги бяха защитени със следните групи преди използването на аминокиселините в реакцията:

аргинин - Mtr : (4-метокси-2,3,6-триметилбензенсулфонил)

лизин - Boc : (t-бутилоксикарбонил)

цистеин - Trt : (тритил)

хистидин - Trt : (тритил)

Приблизително 10 mg от пептида бяха разтворени в 3.0 ml от смесен разтворител на хлороформ - метанол (C/M 2:1 (V/V)). Пробата след това беше пречистена със Sephadex LH-60 колона (ϕ 2.5 cm x 90 cm), която бе така балансирана с C/M смесен разтворител 2:1 (V/V) да събере чистия пептид H.

Наличието на пептида в елюанта беше регистрирано на дължина 245 nm (спектрофотометър; Japan Spectroscopic Co. Ltd. Model 870 - UV) и с диференциален рефрактометър (Shimadzu Manufacturing corporation Model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 2663.6 (изчислено молекулно тегло: 2662.5)

Пример 9]

Пептидът (пептид I) със [секвенция No. 13] беше синтезиран по същия начин както при пример 8.

FABMS ($M+H^+$): 2560.4 (изчислено молекулно тегло: 2559.3)

[Пример 10]

Пептидът (пептид J) със [секвенция No. 14] беше синтезиран по същия начин както при пример 8.

FABMS ($M+H^+$): 2663.8 (изчислено молекулно тегло: 2662.5)

[Пример 11]

Пептидът (пептид K) със [секвенция No. 15] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H+): 2663.5 (изчислено молекулно тегло: 2662.5)

[Пример 12]

Пептидът (пептид L) със [секвенция No. 16] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H+): 2503.6 (изчислено молекулно тегло: 2502.4)

[Пример 13]

Пептидът (пептид M) със [секвенция No. 17] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H+): 2736.7 (изчислено молекулно тегло: 2735.5)

[Пример 14]

Пептидът (пептид N) със [секвенция No. 18] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.

FABMS (M+ H+): 2640.4 (изчислено молекулно тегло: 2639.4)

[Пример 15]

Пептидът (пептид O) със [секвенция No. 19] беше синтезиран по същия начин както при пример 8.

FABMS (M+ H+): 2640.3 (изчислено молекулно тегло: 2639.4)

[Пример 16]

Фмос - пролин - валин - хистидин(Trt) - левцин - лизин(Boc) - аргинин(Mtr)

Пептидът (пептид P) от заглавието беше синтезиран с помощта на метода за синтеза на твърда фаза, използвайки Системата за синтез на пептиди 9050 (Millipore Corp.).

N - α - 9 - флуоренилметилоксикарбонил - N - Ω - 4 - метокси - 2, 3, 6, триметилбензенсулфонил - аргинин - O - смола (Фмос - аргинин(Mtr) -O- смола) (0.20 mmol), в която N - α - 9 - флуоренилметилоксикарбонил - N - Ω - 4 - метокси - 2, 3, 6, триметилбензенсулфонил - аргинин(Фмос - аргинин(Mtr) е свързан с 2 - метокси - 4 - алкоксибензилалкохол - смола (Sasrin resin, търговска марка

на Bachem Co., Ltd.) беше използвана за начална смола и бяха последващо прибавени аминокиселини в посока на N-терминала на повърхността на смолата в съответствие с протокол за синтеза от Системата за синтез на пептиди 9050 (Millipore Corp.) за да се синтезира пептид - O - смола с N - терминал и напълно защитени функционални групи.

Напълно защитения пептид - O - смола беше промит пет пъти с метанол и изсушен при понижено налягане. Разтвор на TFA - дихлорметан (1:99), V/V) беше след това прибавен към изсушения пептид -O- смола (330 mg), докато се извършваше разбъркване и охлаждане с лед. След това сместа беше разбъркана за 30 минути и след това разбъркана за 90 минути при стайна температура за да отдели пептида от смолата със защитните групи, още прикрепени към пептида. След това последва филтриране през стъклен филтър (G3) и филтратът беше концентриран под редуцирано налягане до приблизително 5 ml с евапоратор. След това беше прибавен диетилов етер за да преципитира пептида. Така преципитираният пептид беше събран чрез стъклен филтър (G3), промит петкратно с диетилов етер и след изсушаване под намалено налягане. Бяха получени 180 mg от пептида P.

. Аминогрупите с N-терминал на всички аминокиселини бяха защитени с Fmoc група и функционалните странични вериги бяха защитени със следните групи преди използването на аминокиселините в реакцията:

аргинин - Mtr : (4-метокси-2,3,6-триметилбензенсулфонил)

лизин - Boc : (t-бутилоксикарбонил)

хистидин - Trt : (тритил)

След това беше прибавен разтвор на TFA - дихлорметан (1:99, V/V) към суров пептид за да се получи проба от 10

mg/ml разтвор, който беше пречистен посредством HPLC, с помощта на Asahipak GS - 510 (ϕ 21.5 x 500 mm) колона (търговска марка: Asahi Chemical Industry Co. Ltd.) посредством това да се събере чист пептид P.

Беше използван TFA - дихлорметан (1:99, V/V) като елюент и елюирането беше проведено при скорост на потока от 0.1 ml/min за 120 минути. Наличието на пептида в елюиранта беше регистрирано на дължина 245 nm (спектрофотометър; Japan Spectroscopic Co.Ltd. Model 870-UV) и с диференциален рефрактометър (Shimadzu Manufacturing corporation Model RID-6A).

FABMS ($M+H^+$): 1405.0 (изчислено молекулярно тегло: 1403.8)

[Пример 17]

H - Nлевцин - (Nлевцин)₁₄ - Nлевцин - O - смола бяха синтезирани с помощта на метода за синтеза на твърда фаза, по същия начин както при пример 8.

След това, прибавяйки DMF към синтезирания H - Nлевцин - (Nлевцин)₁₄ - Nлевцин - O- смола, пептида P беше прибавен вместо Fmoc - аргинин(Mtr). N - хидроксисбензотриазол и N, N' - диизопропилкарбодимид бяха прибавени и след това сместа бе разклащана 8 часа. Тази кондензационна реакция беше изпълнена двукратно. Кондензационната реакция беше потвърдена с Kaiser тест чрез нинхидриновия метод.

След това, в съответствие с метода от [пример 8], защитните групи на функционалните групи бяха елиминирани и пептида беше отделен от смолата и пречистен чрез HPLC за да се получи пептида (пептид I) с [последователност No. 13]. FABMS ($M+H^+$): 2560.2 (изчислено молекулярно тегло: 2559.3)

[Пример 18]

Пептидът (пептид Q) с тиоловите групи от пептид D, формиран от ацетамидметил (ACM), беше приготвен по същия начин както при пример 4, с изключение на това, че Fmoc - цистеин(ACM) беше използван вместо Fmoc - цистеин(Trt).
FABMS (M+ H⁺): 2734.7 (изчислено молекулно тегло: 2733.6)

[Пример 19]

Пептидът R бе получен чрез естерификация на тиоловите групи от пептид E с палмитинова киселина, в съответствие с метода на Sarin, Virender and Kumar (EP 0 458 167A1).
FABMS (M+ H⁺): 2448.5 (изчислено молекулно тегло: 2448.3)

[Сравнителен Пример 1]

Пептидът (пептид S) със [секвенция No. 20] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.
FABMS (M+ H⁺): 2793.8 (изчислено молекулно тегло: 2792.6)

[Сравнителен Пример 2]

Пептидът (пептид T) със [секвенция No. 21] беше синтезиран по същия начин както при пример 2.
FABMS (M+ H⁺): 3018.3 (изчислено молекулно тегло: 3016.9)

[Анализ на аминокиселинния състав на синтетичните пептиди от изобретението]

Синтетичните пептиди от изобретението бяха подложени на кисела хидролиза с 12 N разтвор на солна киселина и TFA [2:1 (V/V)], съдържащ 5% (w/v) фенол под вакуум, при 150° C за 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 и 71 часа и след това продуктите на хидролизата бяха анализирани със Shimadzu Automatic Amino Acid Analysis System след отделяне на киселината. Триптофанът от пептида M беше подложен на алкална хидролиза с 4.2 N воден натриев хидроксид за 16, 24 и 32 часа, след това неутрализиран със солна киселина и след това бе анализиран с Amino Acid Analysis System. Аминокиселинните

състави, изчислени на базата на аминокиселинните стойности, които показваха по-високо възстановяване у хидролизите от 1 до 72 часа, показваха стойности, които съществено потвърдиха стойностите, пресметнати от химическите формули.

Резултатите са показани в Таблица 1.

(2) Получаване на повърхностните активни вещества от изобретението

Повърхностните активни вещества от изобретението бяха получени от смесването на пептидите от изобретението с трите липидни компонента на холинوفосфолипид, кисел фосфолипид и аналог на мастна киселина.

[Пример 20]

Стерилизирани количества от 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (1359 mg), 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ацилобата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома: произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) (450 mg) и миристинова киселина (200 mg), бяха разтворени при стайна температура в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (1000 ml) и 25 mg от пептида А бяха разтворени в TFA (1.0 ml). Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и втвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [9:1 (V/V)] (100 ml) за 15 минути при 40° C. Тези суспензия беше замразена при -50° C и след това изсушена за 36 часа при вакуум от 85 - 100 μ Hg, като беше добито повърхностното активно вещество (2070 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше: 65.2% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 21.7% (W/W)

за 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 9.7% (W/W) за миристинова киселина, 1.2% (W/W) за пептида А и 2.2% (W/W) вода.

[Пример 21]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (300.0 mg), 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ациловата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома: произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) (100.0 mg) и палмитинова киселина (40.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (300 ml) и 10.0 mg от пептида В бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (2.0 ml). Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и втвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [9:1 (V/V)] (100 ml) за 20 минути при 45° C. Тази суспензия беше замразена при -60° C и след това изсушена за 40 часа при вакуум от 60 - 110 μ Hg и беше получено повърхностното активно вещество (459.1 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 65.3% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 21.8% (W/W) за 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 8.7% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида В и 2.0% (W/W) вода.

[Пример 22]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (280.0 mg), 1, 2 - дилауроил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (120.0 mg) и палмитинова киселина (27.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (150

ml) и 2.8 mg от пептида C бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (0.5 ml). Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и отвърдени под намаляно налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [8:2 (V/V)] (100 ml) за 40 минути при 40° C. Тази суспензия беше замразена при -65° C и след това изсушена за 36 часа при вакуум от 50 - 80 μ Hg и беше получено повърхностното активно вещество (437.1 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 64.0% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 27.4% (W/W) за 1, 2 - дилауроил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 6.2% (W/W) за палмитинова киселина, 0.6% (W/W) за пептида C и 1.8% (W/W) вода.

[Пример 23]

Освен използването на пептида D вместо пептида B и използването на 1 - палмитоил - 2 - олеоил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол вместо 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ациловата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома; произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.), същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 451.9 mg повърхностно активно вещество под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 66.4% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 22.1% (W/W) за 1 - палмитоил - 2 - олеоил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn

- глицерол, 8.9% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида D и 0.4% (W/W) вода.

[Пример 24]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (320.0 mg), 1, 2 - димиристоил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (80.0 mg) и палмитинова киселина (60.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [1:1 (V/V)] (200 ml) и 14.0 mg от пептида E бяха разтворени в TFA (0.3 ml). Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и втвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [10:1 (V/V)] (50 ml) за 60 минути при 45° C. Тази суспензия беше замразена при -45° C и след това изсушена за 24 часа при вакуум от 50 - 110 μ Hg и беше получено повърхностното активно вещество (479.2 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 66.8% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 16.7% (W/W) за 1, 2 - димиристоил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 12.5% (W/W) за палмитинова киселина, 2.9% (W/W) за пептида E и 1.1% (W/W) вода.

[Пример 25]

Освен използването на пептида F (22.0 mg) вместо пептида B (10.0 mg) и използването на 1,2 - дистеароил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол вместо 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ациловата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома; произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.), същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 463.9 mg повърхностно

активно вещество под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 64.7% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 21.6% (W/W) за 1,2 - дистеароил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 8.6% (W/W) за палмитинова киселина, 4.7% (W/W) за пептида F и 0.4% (W/W) вода.

[Пример 26]

Освен използването на пептида B вместо пептида B, същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 454.1 mg повърхностно активно вещество под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 66.1% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 22.0% (W/W) за 1,2 - ацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ациловата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома: произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) 8.8% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида B и 0.9% (W/W) вода.

[Пример 27]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (210.0 mg), 1,2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ациловата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома: произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.), (90 mg) и стеаринова киселина (33.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [3:1 (V/V)] (100 ml) и 1.9 mg от пептида H бяха разтворени в метанол (0.5 ml) Тези разтвори бяха

смесени, след това изсушени и бтвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [9:1 (V/V)] (50 ml) за 15 минути при 50° C. Тази суспензия беше замразена при -55° C и след това изсушена за 28 часа при вакуум от 100 - 120 μ Hg и беше добито повърхностното активно вещество (340.2 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 61.7% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 26.5% (W/W) за 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 9.7% (W/W) за стеаринова киселина, 0.5% (W/W) за пептида H и 1.6% (W/W) вода.

[Пример 28]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (210.0 mg), 1 - палмитоил - 2 - олеоил - sn - глицеро - (3) - фосфо - L - серин (90.0) и палмитинова киселина (33.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [4:1 (V/V)] (100 ml) и 11.0 mg от пептида I бяха разтворени в TFA (0.5 ml). Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и бтвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [9:1 (V/V)] (100 ml) за 25 минути при 45° C. Тази суспензия беше замразена при -55° C и след това изсушена за 28 часа при вакуум от 100 - 120 μ Hg и беше добито повърхностното активно вещество (348.7 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 60.2% (W/W) за

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 25.8% (W/W) за
1 - палмитоил - 2 - олеил - sn - глицеро - (3) - фосфо - L
- серин 9.5% (W/W) за палмитинова киселина, 1.3% (W/W) за
пептида Н и 1.6% (W/W) вода.

[Пример 29]

Освен използването на пептида J вместо пептида B,
същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за
да се получат 459.3 mg повърхностно активно вещество под
формата на бяла прах.

[Пример 30]

Освен използването на пептида K вместо пептида B,
същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за
да се получат 452.5 mg повърхностно активно вещество под
формата на бяла прах.

[Пример 31]

Освен използването на пептида L вместо пептида B,
същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за
да се получат 456.6 mg повърхностно активно вещество под
формата на бяла прах.

[Пример 32]

Освен използването на пептида M вместо пептида B,
същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за
да се получат 453.9 mg повърхностно активно вещество под
формата на бяла прах.

[Пример 33]

Освен използването на пептида N вместо пептида B,
същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за
да се получат 452.5 mg повърхностно активно вещество под
формата на бяла прах.

[Пример 34]

Освен използването на пептида Q вместо пептида B, същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 458.1 mg повърхностно активно вещество под формата на бяла прах.

[Пример 35]

1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин (30.0 mg), 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ацилобата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома; произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) (10.0 mg) и палмитинова киселина (4.0 mg) и бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (30 ml) и 1.0 mg от пептида Q бяха разтворени в смес от хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (2.0 ml) Тези разтвори бяха смесени, след това изсушени и втвърдени под намалено налягане. Получения остатък беше суспендиран в смес на вода и етанол [9:1 (V/V)] (10 ml) за 20 минути при 45° C. Тази суспензия беше замразена при -60° C и след това изсушена за 36 часа при вакуум от 60 - 120 μ Hg и беше добило повърхностното активно вещество (45.4 mg) под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 66.1% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 22.0% (W/W) за 1, 2 - диацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол, 8.8% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида Q и 0.9% (W/W) вода.

[Пример 36]

Освен използването на пептида R вместо пептида Q, същите процедури като тези в [Пример 35] бяха изпълнени за да се получат 45.7 mg повърхностно активно вещество под

формата на бяла прах.

[Сравнителен Пример 3]

Освен използването на разтвор на пептида S (10.0 mg) в TFA (0.3 ml) вместо разтвор на пептида B (10.0 mg) смес на хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (2.0 ml), същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 455.2 mg повърхностно активно вещество под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 65.9% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 22.0% (W/W) за 1, 2 - ацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ацилобата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома; произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) 8.8% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида S и 1.1% (W/W) вода.

[Сравнителен Пример 4]

Освен използването на разтвор на пептида T (10.0 mg) в TFA (0.3 ml) вместо разтвор на пептида B (10.0 mg) смес на хлороформ и метанол [2:1 (V/V)] (2.0 ml), същите процедури като тези в [Пример 21] бяха изпълнени за да се получат 456.0 mg повърхностно активно вещество под формата на бяла прах.

Не бяха открити количества от етанол в този прах и съдържанието на всеки от компонентите по отношение на общото тегло на повърхностното активно вещество беше 65.8% (W/W) за 1,2 - дипалмитоилглицеро - (3) - фосфохолин, 21.9% (W/W) за 1, 2 - ацил - sn - глицеро - (3) - фосфо - sn - глицерол (с ацилобата група, имаща 14 - 24 въглеродни атома:

произведена от Sigma Chemical Co., Ltd.) 8.8% (W/W) за палмитинова киселина, 2.2% (W/W) за пептида Т и 1.3% (W/W) вода.

Таблица 2 показва резултатите от изпитването на повърхностната активност и алвеоларното пространство — поддържащото действие на повърхностните активни вещества от изобретението.

[Потенциални възможности за приложения в промишлеността]

Като бе описано по-горе, неизвестните досега синтетични полипептиди от изобретението лесно се изолират и пречистват, могат да бъдат получавани посредством методи, даващи добив в промишлени количества, притежават висока разтворимост в общите разтворители и показват по-добра еднородна суспензибилност и равномерно разпространена повърхностна активност, в сравнение с конвенционалните лекарствени средства.

Изобретението може също да бъде прилагано и като терапевтично средство за лечение на синдрома на дихателна недостатъчност, който е заболяване, което предизвиква различни респираторни нарушения.

Последовательность:

Последовательность:

Тип на секвенцията: петти

Последователност:

левцин	аргинин	изолевцин	пролин	цистеин	цистеин	пролин	валин	аспарагин	левцин	лизин	аргинин	левцин	левцин	валин	валин
1				5					10					15	
валин	валин	валин	валин	валин	левцин	валин	валин	валин	валин	изолевцин	валин	глицин	аланин	левцин	левцин
				20				25					30		
метионин	глицин	левцин													
				35											

Секвенция No: 4

Дължина на секвенцията: 32

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин	цистеин	пролин	валин	хистидин	левцин	лизин	аргинин	левцин	левцин	изолевцин	валин	валин	валин	валин	валин
1				5					10					15	
валин	левцин	изолевцин	валин	валин	валин	изолевцин	валин	глицин	левцин	хистидин					
				20					30						

Секвенция No: 5

Дължина на секвенцията: 35

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

фенилалаанин	глицин	изолевцин	пролин	цистеин	цистеин	пролин	валин	хистидин	левцин	лизин	аргинин	левцин	левцин	левцин	левцин
1				5					10					15	
левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	левцин	глицин	аланин	левцин	левцин
				20				25					30		
метионин	глицин	левцин													
				35											

Секвенция No: 6

Дължина на секвенцията: 27

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

истеин пролин валин хистидин левцин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин глицин аланин левцин левцин

20 25

Секвенция No: 7

Дължина на секвенцията: 27

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

истеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

20 25

Секвенция No: 8

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

истеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

20

Секвенция No: 9

Дължина на секвенцията: 19

Вид на секвеницията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвеницията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин

Секвениция No: 10

Дължина на секвеницията: 23

Вид на секвеницията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвеницията: пептид

Последователност:

серин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

20

Секвениция No: 11

Дължина на секвеницията: 27

Вид на секвеницията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвеницията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин глицин аланин левцин левцин

20

25

Секвениция No: 12

Дължина на секвеницията: 23

Вид на секвеницията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин**

1 5 10 15

Нлевцин **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин**

20

Секвенция No: 13

Дължина на секвенцията: 22

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

пролин валин хистидин левцин лизин аргинин **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин**

1 5 10 15

Нлевцин **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин**

20

Секвенция No: 14

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

Нлевцин **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин** **Нлевцин**

20

Секвенция No: 15

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права верига

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин изолеуцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10

изолеуцин левцин левцин левцин изолеуцин левцин

20

Секвенция No: 16

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права верига

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин валин левцин N-валин левцин валин

1 5 10 15

левцин N-валин левцин левцин левцин левцин валин

20

Секвенция No: 17

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права верига

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1 5 10 15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин триптофан

20

Секвенция No: 18

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин аспарагин левцин лизин аргинин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

1

5

10

15

левцин левцин левцин левцин левцин левцин левцин

20

Секвенция No: 19

Дължина на секвенцията: 23

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин аспарагин изолевцин лизин аргинин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин

1

5

10

15

Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин Нлевцин

20

Секвенция No: 20

Дължина на секвенцията: 27

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права берица

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин валин валин валин валин валин валин валин валин

1

5

10

15

валин валин валин валин валин валин валин глицин аланин левцин левцин

20

25

Секвенция No: 21

Дължина на секвенцията: 27

Вид на секвенцията: аминокиселина

Топология: права верига

Тип на секвенцията: пептид

Последователност:

цистеин пролин валин хистидин левцин лизин аргинин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин

1

5

10

изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин изолевцин глицин аланин левцин левцин

15

20

25

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ:

Нашите патентни претенции са за:

1. Синтетични пептиди, имащи следната специфична последователност: Хаа - пролин - валин - Хвв - Хсс - лизин - аргинин - W (Хаа може да не присъства или може да представлява цистеин или серин, Хвв представлява хистидин или аспарагин, Хсс представлява левцин или изолевцин и W представлява хидрофобната част).

2. Синтетични пептиди, както в претенция 1, характеризиращи се с това, че хидрофобната пептидна част се състои от 12 до 20 молекули на левцин и/или Nлевцин.

3. Синтетични пептиди, както в претенции 1 и 2, характеризиращи се с това, че хидрофобната пептидна част съдържа хидрофобни аминокиселини, освен левцин и/или Nлевцин.

4. Синтетични пептиди, както в претенции 1 - 3 включително, характеризиращи се с това, че хидрофобната пептидна част съдържа 1 до 5 молекули на изолевцин, валин, Nвалин или триптофан.

5. Синтетичен пептид, както в претенция 1, имащ една от секвенциите от 5 до 19 като специфична пептидна секвенция или който е S - ацетоамидометилирана форма на пептида с последователност No 8, или който е S - палмитоилна форма на пептида с последователност No 9, триптофан.

6. Пептиди за синтез, в които N - края и

функционалните групи на хидрофилната пептидна част, изразени чрез сентенцията по-долу са защитени: Хаа — пролин — валин — Хbv — Хсс — лизин — аргинин (Хаа може да не присъства или може да представлява цистеин или серин, Хbv представлява хистидин или аспарагин, Хсс представлява леуцин или изолеуцин).

7. Пептиди за синтез, както в претенция 6, характеризираш се с това, в които N — края и че е или Fmoc — пролин — валин — хистидин(Trt) — леуцин — лизин (Boc) — аргинин(Mtr), или Fmoc — пролин — валин — аспарагин — леуцин — лизин(Boc) — аргинин(Mtr), или Fmoc — пролин — валин — аспарагин — изолеуцин — лизин(Boc) — аргинин(Mtr).

8. Метод за произвеждане на синтетичните пептиди от претенция 1, характеризираш се с кондензиране на хидрофобната пептидна част, показана в претенции 1 — 4 включително, със пептидите за синтез, показани в претенции 6 или 7.

9. Белодробни повърхностно активни вещества, съдържащи синтетичен пептид, имащ специфична последователност, холинов фосфолипид, кисел фосфолипид и аналог на мастна киселина.

10. Терапевтично средство за лечение на синдрома на дихателна недостатъчност, съдържащо като активна съставна част белодробно повърхностно активно вещество, съдържащо синтетичен пептид, имащ специфична последователност, холинов фосфолипид, кисел фосфолипид и аналог на мастна киселина.

Таблица 1. Аминокиселинен състав на синтетичните пептиди съгласно изобретението

П е п т и д																	
А	В	С	Д	Е	Р	С	Н	И	Ј	К	Л	М	Н	О	С	Т	
Амино- киселина																	
Лизин	1.1	0.9	1.0	0.8	0.9	1.0	0.7	1.1	1.1	0.9	1.2	0.9	1.2	0.9	1.3	0.9	
Аргинин	1.0	1.1	0.9	0.8	0.9	0.7	0.8	0.9	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.2	1.0	1.2	
Хистидин	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	-	-	1.0	1.0	
Глицин	3.2	1.2	-	-	-	-	1.1	-	-	-	-	-	-	-	1.1	1.0	
Серин	-	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Цистеин	1.9	1.3	1.0	0.9	1.1	-	0.8	0.7	-	0.7	0.9	0.8	0.6	0.7	0.8	0.8	
Аланин	0.9	1.0	-	-	-	-	0.8	-	-	-	-	-	-	-	1.1	0.9	
Валин	0.9	1.0	0.8	0.9	0.8	1.2	0.8	0.8	1.1	1.0	3.9	0.9	1.0	0.9	16.5	0.9	
Певцин	19.5	18.7	20.5	16.8	13.1	16.9	3.1	1.1	0.9	8.9	13.6	11.8	15.7	16.8	-	2.8	2.7
Изолевцин	1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	2.9	-	-	-	-	0.9	-	15.6
Метионин	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Пролин	2.3	1.2	0.9	0.7	0.8	0.8	0.7	0.9	0.8	0.9	1.1	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	
Фенил- аланин	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Норлевцин	-	-	-	-	-	-	15.7	15.9	16.1	7.9	-	-	-	-	15.8	-	
Норвалин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.1	-	-	-	-	-	
Триптофан	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	
Аспарагин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	1.0	-	

Таблица 2. Повърхностна активност и ефекти, разширяващи алвеоларния обем на повърхностно-активните вещества съгласно изобретението

	Повърхностна активност						Ефекти, увеличаващи алвеоларния обем
	Ефект, понижаващ повърхностното напрежение		Разпространение върху газозово-течна повърхност		Способност за абсорбция на газозово-течна повърхност		
	Max dyne/cm	Min dyne/cm	Време за настъпване на равновесие сек.	Уравновесяващо повърхностно напрежение dyne/cm	Време за настъпване на равновесие сек.	Уравновесяващо повърхностно напрежение dyne/cm	Обем на белия дроб (при 5cm H ₂ O ml/kg
Пример 20	29.0	0.2	30	27.5	65	30.3	48
Пример 21	24.7	0.5	30	26.7	30	29.2	55
Пример 22	32.6	4.3	60	33.1	90	34.8	41
Пример 23	26.8	2.5	40	28.5	50	32.3	51
Пример 24	33.1	7.3	60	33.5	100	34.6	39
Пример 25	33.7	7.4	60	32.8	100	34.2	39
Пример 26	27.2	1.1	60	28.3	40	29.9	49
Пример 27	27.2	8.7	60	27.5	50	28.3	46
Пример 28	34.1	3.9	60	34.3	95	36.8	40
Пример 29	28.0	0.8	30	27.6	30	29.9	53
Пример 30	31.5	1.6	50	28.0	80	32.1	47
Пример 31	34.2	1.2	60	33.1	100	34.5	40
Пример 32	33.7	3.0	30	31.6	60	33.9	44
Пример 33	28.7	3.2	30	26.9	50	30.2	51
Пример 34	30.8	2.1	50	29.8	70	31.9	49
Пример 35	30.1	2.5	40	30.4	50	31.7	49
Пример 36	33.4	3.9	60	31.3	90	32.9	45
За сравнение Пример 3	40.1	10.3	90	37.2	180	41.5	28
За сравнение Пример 4	39.0	2.5	95	36.4	150	39.7	29