# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

**zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.**

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.02.2009**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **02.06.2010**

**(Věstník č. 22/2010)**

(21) Číslo dokumentu:

**2009-83**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

| | |
|---|---|
| ***C07K 7/08*** | (2006.01) |
| ***A61K 38/10*** | (2006.01) |
| ***A61P 31/04*** | (2006.01) |
| ***A61P 31/10*** | (2006.01) |
| ***A61P 35/00*** | (2006.01) |


(71) Přihlašovatel:

Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky, v. v. i., Praha 6, CZ

(72) Původce:

Monincová Lenka Mgr., Opava - Kylešovice, CZ
Čeřovský Václav RNDr. CSc., Roztoky, CZ
Slaninová Jiřina RNDr. CSc., Praha 4, CZ
Hovorka Oldřich RNDr. Ph.D., Dobříš, CZ
Cvačka Josef RNDr. Ph.D., Praha 1, CZ
Voburka Zdeněk Ing., Praha 8, CZ
Fučík Vladimír RNDr. CSc., Praha 7, CZ
Borovičková Lenka Ing., Praha 3, CZ

(54) Název přihlášky vynálezu:

## Antimikrobiální peptidy

(57) Anotace:

Popsány jsou peptidy o vzorcích (I) a (II) isolované jedových váčků eusociálních včel Halictus sexcinctus a jejich syntetické analogy připravené záměnou aminokyseliny v poloze 4, 11 nebo 12 vzorce (I) nebo v poloze 4 vzorce (II) aminokyselinou Lys, vykazující biologické účinky a jejich použití pro výrobu léčiva k léčbě mikrobiálních, parazitických a plísňových onemocnění a pro léčení rakovin.

H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ (I)

H-Gly-Lys-Trp-Met-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ (II)

CZ 2009 - 83 A3

PV 2009-83
11255

# Antimikrobiální peptidy

## Oblast techniky

Vynález se týká antimikrobiálních peptidů, isolovaných z přírodního materiálu, vzorců I a II

H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ (I)

H-Gly-Lys-Trp-Met-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ (II)

a jejich syntetických analogů, majících v poloze 4, 11 nebo 12 vzorce (I) nebo v poloze 4 vzorce (II) aminokyselinu Lys, jakož i použití takových sloučenin pro přípravu antimikrobiálních, antiparazitických, protiplísňových a protirakovinných léčiv.

## Dosavadní stav techniky

Prvotní obrana proti mikrobiální infekci, kterou si příroda během evoluce vyvinula, spočívá v sekreci látek peptidové povahy dnes v odborné terminologii označovaných jako antimikrobiální peptidy [1-3]. Ty byly identifikovány prakticky v celém spektru živočišné a rostlinné říše. Například v říši hmyzu právě antimikrobiální peptidy představují hlavní prostředek obrany proti mikrobům [4]. S přihlédnutím k prostředí, ve kterém se hmyz pohybuje, se musí jednat o peptidy velmi účinné. Tyto peptidy jsou schopny velice rychle zabíjet bakterie a některé další mikroorganismy, a to mechanismem zcela odlišným než využívá imunitní systém vyšších organismů. I když tento mechanismus ještě není zcela objasněn, v podstatě spočívá v narušení buněčné membrány bakterií tvorbou transmembránových pórů nebo iontových kanálů. To způsobí únik metabolitů a zborcení celé mikrobiální struktury [5,6]. Obecně je též známo, že antimikrobiální peptidy u bakterií nevyvolávají resistenci, jako třeba doposud používaná tradiční antibiotika. Poněkud zvláštní skupina peptidů s antimikrobiálním účinkem se nachází v jedu hmyzu rodu Hymenoptera [7]. V přírodě je antimikrobiální účinek peptidů isolovaných z jedu vos, včel, čmeláků a mravenců většinou sekundární, a jejich hlavní úloha spočívá spíše v toxicitě či vyvolání bolesti a zánětu,

jako třeba u peptidů patřících do skupiny mastoparanů [8]. Nicméně antimikrobiální účinek peptidů isolovaných například z jedu primitivních včel je značně výrazný a vzhledem k tomu,

že se jedná o peptidy snadno dostupné synteticky, mohly by se tyto peptidy využít v praktické medicíně. To souvisí se současnou situací, kdy překonávání resistence bakteriálních patogenů vůči tradičním antibiotikům vyžaduje vyhledávání stále nových typů antibakteriálních látek, z nichž nejperspektivnějšími se zdají být antimikrobiální peptidy.

## Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu jsou antimikrobiální peptidy mající následující vzorce:

H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ (I)
H-Gly-Lys-Trp-Met-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ (II)
H-Gly-Met-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ (I-A/1)
H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Lys-Arg-$NH_2$ (I-A/2)
H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Lys-$NH_2$ (I-A/3)
H-Gly-Lys-Trp-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ (II-A/1)

Tento vynález se rovněž týká použití uvedených antimikrobiálních peptidů o vzorcích I, II, I-A/1-3 a II-A/1 pro přípravu antimikrobiálních, antiparazitických, protiplísňových a protirakovinných léčiv.

## Podrobný popis vynálezu

Peptidy vzorce (I) a (II) byly nazvány halictin I a halictin II a isolovány z jedových váčků eusociálních včel *Halictus sexcinctus*. Peptidy I a II, mají výrazný antimikrobiální účinek, doprovázený nevýraznou hemolytickou aktivitou.

I když primární funkce těchto peptidů v přírodě není známa, jedná se o jedinečné, nové, dosud nepopsané peptidy s výraznými antimikrobiálními účinky. Své antimikrobiální vlastnosti mají díky jedinečné primární struktuře, která podmiňuje účinnou sekundární

strukturu v přítomnosti buněčné membrány bakterií a chemických látek napodobujících vlastnosti membrán [9].

Sekundární struktura halictinů, která je neuspořádaná ve vodném prostředí, snadno přechází na strukturu α-helixu v přítomnosti látek tuto strukturu podporujících, jako jsou trifluoroethanol či dodecylsulfát sodný (SDS) [9], nebo v kontaktu s biologickou membránou. V tzv. Edmundsonově kruhové projekci [10] (Obr. 1) je patrný amphipathický charakter [11, 12] těchto peptidů s dobře definovaným hydrofobními i hydrofilními sektory. Rozdělení těchto dvou sektorů na opačné strany α-helixu, nebo-li tzv. amphipathicita [11,12], hraje výraznou úlohu při interakci antimikrobiálního peptidu s bakteriální membránou a je tedy jedním z nejdůležitějších faktorů vedoucích k narušení bakteriální membrány a v konečném výsledku ke smrti bakterie [6]. V tomto procesu se zároveň uplatňuje kationicita peptidu [11], která je v případě halictinu I zajištěna přítomností tří bazických aminokyselin (Lys, His, Arg) v sekvenci a v případě halictinu II přítomností čtyř bazických aminokyselin (tři Lys a jeden His) soustředěných v hydrofilních sektorech peptidů. Toto prostorové uspořádání umožňuje elektrostatickou atrakci kladně nabitého sektoru peptidů k záporně nabitým fosfolipidům obsažených v bakteriální membráně. Hydrofobní sektor peptidů je poté vnořen do lipofilní části membrány a po dosažení určité koncentrace peptidu na bakteriální stěně dojde k jejímu narušení. Teoreticky mohou halictiny v tzv. anisotropním prostředí vytvořit strukturu optimálního α-helixu o třech závitech, jenž je stabilizován spojením jednotlivých závitů pomocí vodíkových můstků mezi kyslíky α-karbonylů jednoho závitu a vodíky -NH- skupin závitu následujícího. Z literatury je známo [9], že mírné narušení α-helikální struktury může příznivě eliminovat nežádoucí hemolytickou aktivitu antimikrobiálních peptidů, která je mírou toxicity těchto peptidů. To můžeme ovlivnit náhradou aminokyselin v centrální části molekul halictinů za jiné aminokyseliny narušující α-helikální uspořádání (tzv. helix braker). Dalšími záměnami původních aminokyselin [13] v sekvenci halictinů za jiné ovlivníme celkovou kationicitu, hydrofobicitu či amphipathicitu halictinů ve snaze zvýšit jejich antimikrobiální účinek a na druhé straně potlačit aktivitu hemolytickou. Příklady několika změn a jejich následky na antimikrobiální a hemolytickou aktivitu peptidů jsou uvedeny v příkladech.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje helikální kruhovou projekci halictinů: a) halictin I, b) halictin II. Podtrženě jsou vyznačeny hydrofobní aminokyseliny, kurzívou bazické aminokyseliny (Arg, Lys, His) a tučně ostatní hydrofilní aminokyseliny.

Příklady

Příklad 1

Isolace z přírodního materiálu

Včely *Halictus sexcinctus* byly pochytány v oblasti východních Čech v lokalitě Veská u Hradce Králového a po několikadenním skladování při -20 °C byly vypreparovány jedové váčky z pěti jedinců. Tyto byly extrahovány směsí 50% vodného acetonitrilu s obsahem 0,1% kyseliny trifluorooctové (TFA) (25 µl). Extrakt byl frakcionován pomoci vysoceúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na koloně Vydac C-18 (250 x 4.6 mm) při průtoku 1 ml/min za použití gradientu od 5% acetonitril/voda/0,1% TFA do 70% acetonitril/voda/0,1%TFA. Hlavní peptidové frakce, které byly detekovány UV absorpcí, byly sebrány a koncentrovány v rotačním vakuovém koncentrátoru. Jejich primární struktura byla stanovena pomoci hmotové spektrometrie a metodou automatického Edmanova odbourávání. Halictiny představují hlavní peptidovou složku extraktu.

Příklad 2

Syntéza sloučenin vzorců (I), (II) a jejich analogů I-A a II-A

Tyto peptidy lze syntetizovat metodou syntézy peptidů na pevné fázi (SPPS). Syntéza byla provedena manuálně v 5 ml polypropylenových injekčních stříkačkách s teflonovým filtrem na dně stříkačky s využitím protokolu Fmoc-chemie. Jako pevný nosič byla použita pryskyřice Rink Amide MBHA o substituci 0,7 mmol/g. Chráněné Fmoc-aminokyseliny byly kondensovány ve 4-násobném přebytku v dimethylformamidu a ke kondensaci byl použit diisopropylcarbodiimid v přítomnosti 1-hydroxybezotriazolu. Surové halictiny (I) a (II) byly

získány odštěpením z pryskyřice a deprotekcí působením směsi TFA/1,2-ethanedithiol/$H_2O$/thioanisol/triisopropylsilan (90 : 2,5 : 2,5 : 3 : 2) po dobu 3,5 hodi a následnou precipitací *tert*-butyl methyl etherem. Tímto postupem bylo získáno 70 - 80 mg surových peptidů. Část tohoto materiálu (20 mg) byla v každém případě čištěna preparativní HPLC na koloně Vydac C-18 (250 x 10 mm) při průtoku 3.0 ml/min a s využitím stejného gradientu, jaký je popsán výše. Takto bylo získáno 8-11 mg peptidů čistých podle HPLC, jejichž identita byla ověřena hmotovou spektrometrií, jak udává Tabulka 1.

Tabulka 1. Sekvence halictinů (I) a (II) jejich syntetických analogů (I-A) a (II-A)

| peptid | sekvence | monoisotopická molekulární hmotnost (Da) | |
|---|---|---|---|
| | | vypočtená | nalezená |
| (I) | H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ | 1408,81 | 1408,9 |
| (II) | H-Gly-Lys-Trp-Met-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ | 1451,88 | 1451,8 |
| (I-A/1) | H-Gly-Met-Trp-**Lys**-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ | 1449,88 | 1449,8 |
| (I-A/2) | H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-**Lys**-Arg-$NH_2$ | 1423,82 | 1423,6 |
| (I-A/3) | H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-**Lys**-$NH_2$ | 1380,81 | 1380,6 |
| (II-A/1) | H-Gly-Lys-Trp-**Lys**-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ | 1448.93 | 1449,0 |

(zaměněné aminokyseliny jsou vytištěny tučně)

Příklad 3

Stanovení antimikrobiální aktivity

Antimikrobiální aktivita byla stanovena jako tzv. minimální inhibiční koncentrace (MIC) pozorováním růstu bakterií v přítomnosti různých koncentrací peptidů (Tabulka 2). Bakterie v exponenciální fázi růstu byly přidány k roztoku testovaného antimikrobiálního peptidu o různé koncentraci (0,5 až 100 $\mu mol.l^{-1}$) v LB médiu (obsahuje v 1 l destil. vody 10 g tryptonu, 5 g kvasinkového extraktu a 10 g NaCl) v inkubačních destičkách a inkubovány při 37 °C po 20 h za stálého třepání v přístroji Bioscreen C. Absorbance byla měřena při 540 nm každých 15 min. V experimentech bylo použito 1 x $10^4$ – 7,5 x $10^4$ CFU bakterií (CFU =

colony forming unit, tzn. jednotka vytvářející kolonie). Jako standard byl použit tetracyklin v koncentraci 1 - 50 μmol.l$^{-1}$.

Tabulka 2. Antimikrobiální a hemolytické aktivity halictinů (I) a (II) a jejich analogů

| peptid | antimikrobiální aktivita MIC [μmol.l$^{-1}$] | | | | hemolytická aktivita $LC_{50}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | *B.s.* | *S.a.* | *E.c.* | *P.a.* | |
| (I) | 0,7 | 7,4 | 3,8 | 45 | 80 |
| (II) | 0,8 | 7,5 | 2,2 | 33 | 80 |
| (I-A/1) | 1,1 | 6,0 | 1,8 | 12,5 | 93 |
| (I-A/2) | 2,2 | 100 | 28 | 90 | >200 |
| (I-A/3) | 0,75 | 12,5 | 6.0 | 50 | 111 |
| (II-A/1) | 1,5 | 25 | 3 | 12,5 | 95 |

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

Příklad 4

Stanovení hemolytické aktivity

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

Literatura


1. Zasloff M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature 415, 389-395
2. Hancock R.E.W., Sahl H.-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Natur. Bitech. 24, 1551-1557 (2006)
3. Toke O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infection. Biopolymers (Peptide Science) 80, 717–735 (2005).
4. Otvos L. Jr. Antimicrobial peptides isolated from insects. J. Peptide Sci. 6, 497-511 (2000)
5. Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic α-helical antimicrobial peptides. Biopolymers 47, 451-463 (1998)
6. Yeaman M.R., Yount N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. Pharm. Rev. 55, 27-55 (2003)
7. Kuhn-Nentwig L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. Cell. Mol. Life Sci. 60, 2651–2668 (2003)
8. Čeřovský V., Slaninová J., Fučík V, Hulačová H, Borovičková L., Ježek R and Bednárová L. New potent antimicrobial peptides from the venom of Polistinae wasps and their analogs. Peptides (2008) 29, 992-1003.
9. Čeřovský V., Hovorka O., Cvačka J., Voburka Z., Bednárová L., Borovičková L., Slaninová J., and Fučík V. Melectin: a novel antimicrobial peptide from the venom of the cleptoparasitic bee Melecta albifrons. ChemBioChem 9, 2815-2821 (2008).
10. Schiffer M. and Edmundson A. B. Use of helical wheels to represent the structures of proteins and to identify segments with helical potential. Biophys. J. 7, 121-135 (1967).
11. Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. Amphipathic, α-helical antimicrobial peptides. Biopolymers (Peptide Science) 55, 4–30 (2000)
12. Pathak N., Salas-Auvert R., Ruche G., Janna M.-H., McCarthy D., Harrison R.G. Comparison of the effect of hydrophobicity, amphiphilicity, and α-helicity on the activities of antimicrobial peptides. Proteins: Struct. Funct. Genet. 22; 182-86 (1995)
13. Conlon J. M., Al-Ghaferi N., Abraham B. and Leprince J. Strategies for transformation of naturally-occurring amphibian antimicrobial peptides into therapeutically valuable anti-infective agents. Methods 42, 349-357 (2007).

PV 2009 - 83
11 255

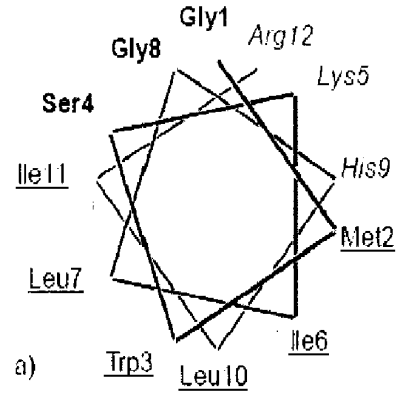
# PATENTOVÉ NÁROKY

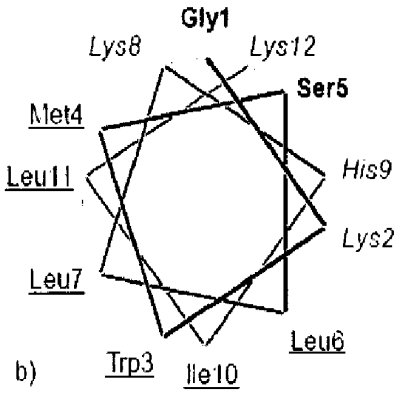
1. Antimikrobiální peptidy mající následující vzorce:

| | |
|---|---|
| H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ | (I) |
| H-Gly-Lys-Trp-Met-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ | (II) |
| H-Gly-Met-Trp-Lys-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-$NH_2$ | (I-A/1) |
| H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Lys-Arg-$NH_2$ | (I-A/2) |
| H-Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Lys-$NH_2$ | (I-A/3) |
| H-Gly-Lys-Trp-Lys-Ser-Leu-Leu-Lys-His-Ile-Leu-Lys-$NH_2$ | (II-A/1) |

2. Použití antimikrobiálních peptidů podle nároku 1 pro výrobu léčiva pro léčení mikrobiálních, parazitických, plísňových onemocnění a pro léčení rakovin.

PV 2009 - 33
1797




Obr. 1 Helikální kruhové projekce halictinů: a) halictin I, b) halictin II