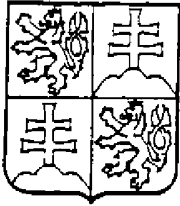


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

ZVEŘEJNĚNÁ PŘIHLÁŠKA
VYNÁLEZU (12)

(21) 01394-92

(13) A3

(22) 07.05.92

(32) 10.09.91, 11.09.90

(31) 91JP/9101201, 90/238922

(33) WO, JP

(40) 16.09.92

5(51) C 07 K 7/08,
A 61 K 37/02

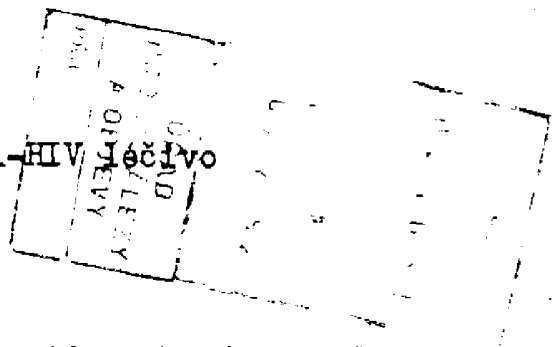
(71) Seikagaku Kogyo Co., Ltd., Tokyo, JP

(72) Fujii Nobutaka, Osaka, JP
Yamamoto Noaki, Tokyo, JP

(54) Nový polypeptid a z něho připravené anti-HIV lé-
čivo

(57) Nový polypeptid obecného vzorce I nebo jeho sůl
a anti-HIV činidlo, které jako účinnou složku
obsahuje tento nový polypeptid nebo jeho sůl.

Nový polypeptid a z něho připravené anti-HIV léčivo



Oblast techniky

Tento vynález se týká nového polypeptidu nebo jeho sole. Podrobněji se tento vynález týká nového polypeptidu, který má silnou afinitu k lipopolysacharidům, zvláště endotoxinu, má zlepšenou protibakteriální aktivitu a zlepšenou protivi-rovou aktivitu, jeho farmaceuticky přijatelné soli a anti-HIV činidla, který jako účinnou složku obsahuje uvedený polypeptid nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

Dosavadní stav techniky

Do dnešní doby (jak ukazuje následující literatura) byly Nakamurou, Iwanagou, Niwou a spol. popsány polypeptidy (tachyplesin a polyphemusin) odvozené od krabů podkovovitých. Tyto polypeptidy vykazují afinitu na endotoxiny. Byly popsány také jejich farmakologické vlastnosti: J. Biol. Chem. 263, 16709 až 16713 (1988), Chem. Pharm. Bull. 37, 2661 až 2664 (1989), japonský vyložený patentový spis č. 53799/1990, japonský patentový vyložený spis č. 152987/1990, japonský vyložený patentový spis č. 167230/1990, J. Biochem. 106, 663 až 668 (1989), Taisha (Metabolism) 26, 301 až 311 (1989) a publikovaná rešeršní přihláška 500194/1990.

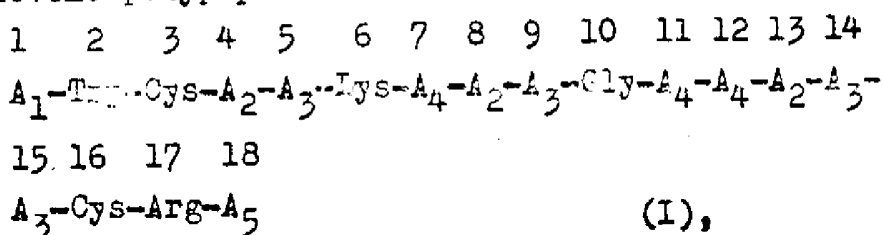
Pokud jde o polypeptidy s afinitou na endotoxiny, které byly izolovány z krabů podkovovitých (rodu Tachyplesus, rodu Lumulus a rodu Carcinoscorpius), existuje podle nejlepších znalostí výzkumníků pět strukturních analog. Každý z nich je polypeptid s cyklickou strukturou se 17 nebo 18 přírodními aminokyselinami. Tyto polypeptidy mají navzájem mimořádně analogické vlastnosti. Takový polypeptid je velice zajímavý jako jedna z klíčových sloučenin, která umožňuje krabům podkovovitým adaptovat se na změny jejich vnějšího prostředí a chránit svůj druh z pradávných dob až do dnešních časů jako žijící zkameněliny.

Na druhé straně - s ohledem na zachování existence člověka, který je vysoce diferencován - jsou žádoucí léky, o nichž se očekává, že mají profylaktický nebo terapeutický účinek na syndrom získané imunitní nedostatečnosti (AIDS) způsobený virem lidské imunitní nedostatečnosti.

Autoři tohoto vynálezu věnovali pozornost shora uvedeným polypeptidům afinitním na endotoxin, o nichž se domnívají, že mají vztah k zachovávání druhů kraba podkovovitého. Autoři tohoto vynálezu studovali vztah mezi strukturálními změnami těchto sloučenin a aktivitou na vir lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). Výsledkem těchto studií bylo nalezení polypeptidů, které se podstatně liší od obvyklé struktury známých polypeptidů z krabů podkovovitých s afinitou na endotoxiny. K velkému překvapení autorů bylo zjištěno, že tyto nové polypeptidy mají vynikající účinek a že jejich hodnoty proti-HIV aktivity jsou desítkrát nebo vícekrát větší než proti-HIV aktivity známého polypeptidu s afinitou na endotoxin.

Podstata vynálezu

Tento vynález je založen na uvedených objevech a týká se nového polypeptidu obecného vzorce I



v němž A_1 znamená atom vodíku nebo jeden či dva zbytky aminokyselin, jimiž jsou lysin a arginin,

A_2 nezávisle znamená zbytek tyrosinu, fenylalaninu nebo tryptofanu,

A_3 nezávisle znamená zbytek argininu nebo lysinu,

A_4 nezávisle znamená zbytek alaninu, valinu, leucinu, isoleucinu, serinu, cysteinu nebo methioninu,

A_5 znamená skupinu $-\text{OH}$ (odvozenou od karboxylové skupiny) nebo skupinu $-\text{NH}_2$ (odvozenou od amidové skupiny),

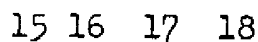
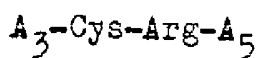
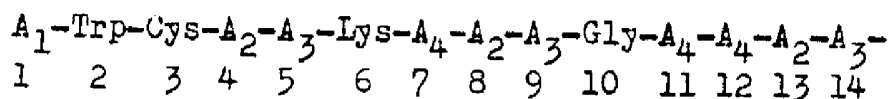
Cys znamená zbytek cysteinu, Gly znamená zbytek glycinu, Lys znamená zbytek lysinu, Arg znamená zbytek argininu a Trp znamená zbytek tryptofanu,

cysteinové zbytky v polohách 3 a 16 mohou být navázány disulfidovou vazbou (-S-S-) a jestliže v obou polohách 7 a 12 jsou cysteinové zbytky, mohou být navázány disulfidovou vazbou (-S-S),

nebo jejich soli.

Nový polypeptid podle tohoto vynálezu má zásadně důležitou vlastnost v tom, že i když ve známých polypeptidech odvozených od krabů podkovovitých zbytek aminokyseliny v poloze 6 obvykle znamená zbytek valinu (Val), zbytek v poloze 6 těchto nových polypeptidů podle vynálezu znamená zbytek lysinu (Lys). Zbytek bazické aminokyseliny má úplně jiné vlastnosti než zbytek valinu.

Nový polypeptid nebo jeho sůl podle vynálezu je podrobněji popsán níže. Nový polypeptid podle vynálezu se může připravovat známým způsobem, například metodou syntézy v pevné fázi. Konkrétní polypeptid podle tohoto vynálezu s přímým řetězcem shora uvedeného obecného vzorce I se může získat napojením karboxylové skupiny N-chráněného argininu na nerozpustnou pryskyřici s aminovými skupinami přímo nebo prostřednictvím spaceru (vymezovače) s funkční skupinou schopnou navázat se na karboxylovou skupinu a karboxylovou skupinou, postupně se navážou způsobem syntézy v pevné fázi příslušné chráněné aminokyseliny od polohy 16 do polohy 1 sekvence aminokyselin následujícího obecného vzorce I



(I),

v němž A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , Cys, Gly, Lys, Arg a Trp znamenají jak shora uvedeno pro obecný vzorec I,

a potom se eliminuje (odstraní) nerozpustná pryskyřice a chránicí skupiny aminokyseliny. V tomto případě

karboxylový konec aminokyseliny v poloze 17 může být buď volný (A_5 odpovídá skupině $-OH$) nebo může být převeden na amid kyseliny (A_5 odpovídá skupině $-NH_2$). V získaném polypeptidu pak dále dva cysteiny v polohách 3 a 16 mohou tvořit disulfidovou vazbu ($-S-S-$) merkaptoskupinami.

A dále, jestliže jak v poloze 7 tak v poloze 12 jsou cysteinové zbytky, mohou tyto cysteiny tvořit disulfidovou vazbu.

Pokud jde o tvorbu této disulfidové vazby, oba dva páry cysteinových skupin mohou být převedeny na disulfidovou vazbu, například oxidací vzduchem. Nebo se disulfidová vazba může vytvořit podle způsobu, který uvádí Ather-ton E. a spol.: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1985, 2065. To se provádí v několika stupních. Nejdříve se selektivně chrání merkaptoskupiny kteréhokoliv páru cysteinů v polohách 3 a 16 a 7 a 12 chránicí skupinou $t-BuS$ (terc. butylthioskupina) a merkaptoskupiny druhého páru cysteinů se chrání chránicí skupinou Ac_m (acetamidomethylová skupina), odstraní se $t-BuS$ částečným oxidováním merkaptoskupin a na konec se odstraní chránicí skupina Ac_m podle známého způsobu.

Příslušnými aminokyselinami, které se používají při způsobu syntézy v pevné fázi, mohou být obecně L-formy nebo D-formy.

Pokud jde o nerozpustné pryskyřice s aminovou skupinou, které se používají při syntéze nového polypeptidu podle vynálezu, lze používat jakékoliv pryskyřice, pokud se mohou vázat svými aminovými skupinami na karboxylovou skupinu N-chráněného argininu na C-konci nebo v některém příkladu na karboxylovou skupinu spaceru (vymezovače) na něj navázaného a následně eliminovat (odstranit).

Mezi příklady takové nerozpustné pryskyřice patří aminomethylové pryskyřice (aminomethylované styren-divinyl-

benzenové kopolymery), benzhydrylamínové pryskyřice, methylbenzhydrylamínové pryskyřice a aminomethylfenoxymethylové pryskyřice a jejich deriváty atd. Jestliže se používá benzhydrylamínová pryskyřice, methylbenzhydrylamínová pryskyřice, dimethylbenzhydrylamínová pryskyřice (DMBHA pryskyřice) nebo aminomethylfenoxymethylová pryskyřice, amid se přímo získá štěpením. Z hlediska výtěžku je výhodná aminomethylová pryskyřice.

Jako vymezovač (spacer) s funkční skupinou schopnou navázat se na karboxylovou skupinu a s karboxylovou skupinou, lze například uvést vymezovač schopný převést karboxylovou skupinu argininu na p-karboxymethylbenzylester, ale neexistují žádná zvláštní omezení pokud jde o omezovač.

Chráněná aminokyselina znamená aminokyselinu, jejíž funkční skupiny jsou chráněny chránicí skupinou známým způsobem. Na trhu se prodávají různé chráněné aminokyseliny.

Při syntéze polypeptidu podle tohoto vynálezu je výhodné vybrat jakoukoliv z následujících chránících skupin. Chránicí skupina α -aminové skupiny aminokyseliny je Boc (terc.butyloxykarbonylová skupina) nebo Fmoc (9-fluorenylmethyloxykarbonylová skupina). Chránicí skupina guanidinové skupiny argininu (Arg) je Tos (tosylová skupina), (nitro skupina) NO_2 , Mtr (4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzensulfonová skupina) nebo Pmc (2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonylová skupina). Jako chránicí skupinu merkaptoskupiny cysteinu (Cys) lze uvést Bzl (benzylovou skupinu), MBzl (4-methoxybenzylovou skupinu), 4-MeBzl (4-methylbenzylovou skupinu), Acn (acetamidomethylovou skupinu), Trt (tritylovou skupinu), Npys (3-nitro-2-pyridinsulfenylovou skupinu), t-Bu (terc.butylovou skupinu) nebo t-BuS (terc.butylthioskupinu). Výhodnými chránicími skupinami jsou skupiny MBzl, 4-MeBzl, Trt, Acn a Npys. Chránicí skupinou pro hydroxylovou skupinu tyrosinu je Bzl, Cl_2Bzl (2,6-dichlorbenzylová skupina) nebo t-Bu, ale tato skupina nesmí být chráněna. Chránicí skupinou ϵ -aminové skupiny

lysinu (Lys) je Z (benzyloxykarbonylová skupina), ClZ (2-chlorbenzyloxykarbonylová skupina), Boc nebo Npys. Je výhodné, aby jako chránicí skupina byla vybrána příslušná chránicí skupina ze známých chránicích skupin podle podmínek syntézy peptidu.

Kondenzaci chráněných aminokyselin lze provádět obvyklým kondenzačním způsobem, jako je například DCC metoda (dicyklohexylkarbodiimidová metoda), DIPCDI metoda (diisopropylkarbodiimidová metoda) [Tartar A. a spol.: J. Org. Chem. 44, 5000 (1979)], metoda aktivního esteru, metoda směšného nebo symetrického anhydridu kyselin, karbonyldiimidazolová metoda, DCC-HOBt metoda (1-hydroxybenzotriazolová metoda) [König W. a spol.: Chem. Ber. 103, 788, 2024 a 2034 (1970).] nebo difenylfosforylazidový způsob. Výhodnými jsou DCC metoda, DCC-HOBt metoda, DIPCDI-HOBt metoda a metoda symetrického anhydridu kyseliny. Tato kondenzační reakce se obvykle provádí v organickém rozpouštědle, jako je například dichlormethan nebo dimethylformamid nebo ve směsi takových rozpouštědel. Jako deblokační reakční činidlo (činidlo, kterým se odstraňuje chránicí skupina) chránicích skupin α -amino-^mvé skupiny se používá trifluoroctová kyselina - dichlormethan, kyselina chlorovodíková-dioxan, piperidin-dimethylformamid nebo podobná směs. Příslušný výběr se provede podle druhu chránicí skupiny. Stupeň postupu kondenzační reakce v každém stupni syntézy se sleduje způsobem podle E. Kaisera a spol. [Anal. Biochem. 34, 595 (1970) (ninhydrinová metoda)].

Podle předcházejících způsobů se může získat pryskyřice s chráněným peptidem, který má žádanou sekvenci aminokyselin.

Jestliže se jako nerozpustná pryskyřice použije aminomethyl-pryskyřice, může se pryskyřice odstranit například reakcí pryskyřice s chráněným peptidem s amoniakem v příslušném rozpouštědle. Výsledný chráněný peptid se pak nechá zreagovat s fluorovodíkem. Získá se tak amid polypeptidu shora uvedeného obecného vzorce, ze kterého jsou odstra-

něny všechny chránicí skupiny. Jestliže se jako nerozpustná pryskyřice použije benzhydrylaminová pryskyřice, methylbenzhydrylaminová pryskyřice, aminomethylfenoxymethylová pryskyřice nebo pryskyřice DMBHA (Funakoshi S. a spol.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1982, 382.), pak se pryskyřice a chránicí skupiny mohou odstranit současně reakcí pryskyřice s chráněným peptidem s fluorovodíkem, TFMSA (trifluormethansulfonová kyselina) [publikováno Academic Press, red. E. Gross, Yajima H. a spol.: The Peptides 5, 65 (1983).], TMSOTf (trimethylsilyltriflát) [Fujii N. a spol.: J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1987, 274.] nebo TMSBr (trimethylsilylbromid) [Fujii N. a spol.: Chem. Pharm. Bull. 35, 3880 (1987).] nebo podobnými činidly.

Potom, jestliže je to žádoucí, výsledný polypeptid se zredukuje 2-merkapt ethanolom, DTT (dithiothreitolom) nebo podobným činidlem, čímž se merkaptoskupiny cysteinu získají v redukované formě. Oxidací se pak získá cyklický polypeptid podle tohoto vynálezu.

Oxidační reakce se provádí známým způsobem. Obvykle se používá takové oxidační činidlo, jako je například vzdušný kyslík nebo hexakvanoželezitan (například hexakvanoželezitan draselný). Takto získaný polypeptid se pak může izolovat a vyčistit způsoby známými z oblasti polypeptidů, například extrakcí, rekrystalizací, různými chromatografiemi (gelová filtrace, na ionexu, rozdělovací, absorpční, s obrácenými fázemi), elektroforesou, protiproudým roztřepáváním atd. Nejúčinnějšími je vysokoúčinná kapalinová chromatografie na obrácených fázích.

Jako specifické příklady polypeptidů podle tohoto vynálezu obecného vzorce I lze uvést polypeptidy následujících vzorců 1 až 22. V následujících vzorcích 1 až 22 každý symbol označuje zbytek aminokyseliny podle mezinárodně přijatého třípísmenného kodu: Arg = arginin, Trp = tryptofan, Cys = cystein, Tyr = tyrosin, Lys = lysin, Gly = glycin, Phe = fenylalanin, Ile = isoleucin, Ser = serin, Leu = leucin, Met = methionin, Val = valin a Ala = alanin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
(1)		Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(2)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(3)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(4)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Met-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(5)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(6)		Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(7)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(8)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(9)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(10)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Val-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(11)		Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH ₂																
(12)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH ₂																
(13)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH ₂																
(14)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ser-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH ₂																
(15)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ala-Cys-Tyr-Arg-Cys-Arg-NH ₂																
(16)		Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Typ-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(17)		Arg-Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Typ-Lys-Gly-Leu-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(18)		Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(19)		Arg-Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Tyr-Lys-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(20)		Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Leu-Ala-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(21)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Ala-Tyr-Lys-Gly-Val-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																
(22)		Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Ser-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂																

Takto získané polypeptidy podle vynálezu obecného vzorce I mají (podobně jako známé polypeptidy odvozené od krabů podkovovitých) schopnost vázat se na endotoxiny, mají antibakteriální aktivitu, mají aktivitu hemolyzovat hemocyty citlivé na endotoxin, mají protivirovou aktivitu a zvláště pak mají dobrou protivirovou aktivitu proti virům lidské imunitní nedostatečnosti (HIV). Tyto polypeptidy mají desetkrát nebo vícekrát vyšší anti-HIV aktivitu než známý polypeptid Tachyplesin I. Některé z těchto polypeptidů mají několik tisíckrát vyšší anti-HIV aktivitu než Tachyplesin I.

Pokud jde o strukturní vlastnosti známých polypeptidů odvozených od krabů podkovovitých, bylo zjištěno, že díky existenci zbytku 4 Cys v polohách 3, 7, 12 a 16 zaujímají strukturu β -škládaného listu, takže v polohách 9 a 10 je ohnuta β -turnem, část peptidu od polohy 3 do polohy 8 a část peptidu od polohy 11 do polohy 16 jsou k sobě přikloněny a čtyři zbytky Cys v polohách 3 a 16 a v polohách 7 a 12 jsou svázány příslušnými disulfidovými vazbami (-S-S). Jako strukturní vlastnosti pro projevení se antivirové aktivity polypeptidů, jejichž zbytek v poloze 6 byl změněn na Lys, jsou pro sloučeniny podle vynálezu zásadně nutné strukturní části sekvencí konstitutivních aminokyselin navzájem mimořádně podobných, jak je vidět u $^3\text{Cys}^4\text{A}_2^5\text{A}_3^6\text{Lys}$ přikloněné k $^{13}\text{A}_2^{14}\text{A}_3^{15}\text{A}_3^{16}\text{Cys}$, nepostradatelnými jsou ^2Trp a ^{17}Arg . Je charakteristické, že dalším navázáním bazické aminokyseliny v A_1 k těmto strukturním částem v poloze 1 se získá taková struktura, která má mimořádně vysokou anti-HIV aktivitu.

Polypeptid podle vynálezu obecného vzorce I má bazické vlastnosti díky vlastnostem konstitutivních aminokyselin. Vytváří tedy s kyselinami soli. Například polypeptid tvoří sůl s anorganickou kyselinou (kyselinou chlorovodíkovou, kyselinou bromovodíkovou, kyselinou fosforečnou, kyselinou dusičnou, kyselinou sírovou nebo podobnými kyselinami) nebo s organickou karboxylovou kyselinou (kyselinou octovou,

kyselinou propionovou, kyselinou maleinovou, kyselinou jantarovou, kyselinou jablěčnou, kyselinou citronovou, kyselinou vinnou, kyselinou salicylovou nebo podobnými kyselinami) nebo s organickou sulfonovou kyselinou (například methansulfonovou kyselinou, p-toluensulfonovou kyselinou nebo podobnými). Polypeptid podle tohoto vynálezu obecného vzorce I se může používat jako takováto farmaceuticky sůl přijatelná.

Léčivo podle vynálezu se připravuje jako farmaceutický prostředek, který jako účinnou složku obsahuje polypeptid obecného vzorce I nebo jeho sůl a farmakologicky přijatelný nosič, který se vybere podle způsobu podávání a formy podávání léčiva. Léčivo podle vynálezu se podává orálně nebo parenterálně podle objektu, který je léčen nebo dezinfikován a to ať jde o léčení in vivo virového onemocnění nebo o dezinfikování in vitro virové infekční části. Léčivo se může připravovat jako prášek, granule, roztok pro injekce nebo orální podávání, tobolky, čípky, mast, krém nebo aerosol s příslušnými farmaceutickými nosiči podle způsobu podávání.

Jestliže se léčivo podle vynálezu podává přímo injekcí do živého těla, polypeptid nebo jeho sůl podle vynálezu se mohou podávat kontinuálně nebo přerušovaně v množství 10 až 5000 mg na kg tělesné hmotnosti člověka za den a intravenózní kapačkou jako roztok ve fyziologickém solném roztoku.

Na připojeném výkresu je jako příklad uvedeno schema stupňů syntézy nového polypeptidu podle vynálezu.

Tento vynález je dále podrobně popsán pomocí příkladů, ale není těmito příklady omezen.

Příklady provedení vynálezu

V následujících příkladech jsou použity následující přístroje a následující reakční činidla: HPLC aparatura - Waters Co. (USA) model 600, kolona Asahipak ODP-90 (Asahi

(3) Zavedení cysteinu z polohy 16

Po odstranění Fmoc skupin z DMBHA pryskyřice, která se připraví podle odstavce (2), do níž byl zaveden arginin, působením 20% piperidinu v dimethylformamidu, se přidá 2,5 ekvivalentu Fmoc-Cys(MBzl)-OH vztaženo na DMBHA pryskyřici. Kondenzační reakce se provádí v dimethylformamidu podle DIPCDI-HOBt metody; podobně jako je tomu v odstavci (2) se postup kondenzační reakce sleduje měřením ninhydrinovým testem.

(4) Zavedení aminokyselin od polohy 15 do polohy 1

Podobně jako shora uvedeno byly zbytky Lys(Boc), Arg(Mtr), Tyr(t-Bu), Cys(MBzl), Ile, Gly, Arg(Mtr), Tyr(t-Bu), Cys(MBzl), Lys(Boc), Arg(Mtr), Tyr(terc.Bu), Cys(MBzl), Trp a Arg(Mtr) postupně zavedeny do DMBHA pryskyřice podle sekvence od C-koncové aminokyseliny. Získá se tak pryskyřice s peptidem A chráněným chránicí skupinou. Kondenzační reakce každé aminokyseliny při syntéze v pevné fázi se provádí podle podmínek, které jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka I

operace	činidlo	rozpouštědlo	dobaxpočet opakování
odstranění Fmoc skupiny	20% piperidin s dimethylform- amidem	DMF	5 minut x 3
promytí	---	DMF	1 minuta x 6
kondenzace	Fmoc-aminokyse- lina (2,5 ekv.) + DIPCDI + HOBt	DMF	2 hodina x 1
promytí	---	DMF	1 minuta x 4

(5) Příprava peptidu vzorce A odstraněním chránících skupin, postup odstranění pryskyřice a částečné čištění

Pryskyřice s peptidem vzorce A chráněným chránicí skupinou, která se připraví podle postupů uvedených v odstavcích (1) až (4), se nechá zreagovat s 20% piperidinem v dimethylformamidu. Odstraní se tak skupine Fmco. Potom se provede dvouhodinová reakce při 25 °C v systému 1M TMSO_f-thioanisol-TFA (10 ml trifluoroctové kyseliny v přítomnosti m-kresolu (100 ekvivalentů) a ethan-thiolu (300 ekvivalentů) na 100 mg pryskyřice. Pryskyřice se odfiltruje od reakční směsi a promyje se dvakrát 1 ml trifluoroctové kyseliny. Ke směsi filtrátu a promývacích podílů se přidá 100 ml ledem ochlazeného suchého etheru. Vytvořená sraženina se odstřeďuje. Zbytek se oddělí od supernatantu dekantací. Výsledný zbytek se promyje studeným etherem, rozpustí se v 10 ml 4N kyseliny octové, přidá se 830 mg (80 ekvivalentů) dithiothreitolu a směs se míchá přes noc za teploty místnosti.

Reakční roztok se odstřeďuje, supernatant se pak nanese na Sephadex G-10 (3,7 x 50 cm) a zfiltruje se na gelu promýváním 4N kyselinou octovou. Frakce, které projdou Sephadexem bez zastavení, se spojí jako hlavní eluční část. Lyofilizací se získá prášek částečně vyčištěného necyklizovaného polypeptidu vzorce A.

(6) Příprava polypeptidu vzorce A vzdušnou oxidací

Hodnota pH poloviny frakcí, které při gelové filtraci projdou Sephadexem bez zastavení, se koncentrovaným vodným amoniakem upraví na 7,5. Tento roztok se oxiduje prov^zdušňováním, aby proběhla cyklizační reakce. Po ukončení vzdušné oxidace se zcyklizovaný polypeptid vzorce A adsorbuje na 10 g pryskyřice Diaion HP-20, desorbuje se a eluuje se 60% acetonitrilem (v 1N kyselině octové). Eluát se zahustí za teploty místnosti a za sníženého tlaku, aby se odstranil acetonitril. Lyofilizací se získá prášek. Tento prášek se rozpustí v malém množství vody. Roztok se nanese na Asahipak a vyčistí se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC-Model 600 vyrobený firmou Waters Co.).

Gradientovou elucí acetonitrilem se získá peptid vzorce A jako jediné maximum ve výtěžku 27 % (vypočtená hodnota je založena na vztahu k pryskyřici s peptidem vzorce A chráněným chránicí skupinou).

(7) Analýza polypeptidu

Složení aminokyselin polypeptidu vyčištěného podle shora uvedeného postupu v odstavci (6) podle štěpení aminopeptidasou dobře odpovídá vypočtenému složení na základě sekvence aminokyselin vzorce A. Hodnota molekulové hmoty podle hmotové spektrometrie (FAB) byla 2310,048, vypočtená hodnota $(M+H)^+$ byla 2309,786. Specifická rotace $[\alpha]_D^{20}$ získaného polypeptidu byla $+14,2^\circ$ ($c = 0,3$, 1N kyselina octová).

Příklad 2 a srovnávací příklady 1 a 2

Protivirová aktivita na virus lidské imunitní nedostatečnosti (HIV)

Protivirová aktivita proti HIV polypeptidu vzorce A který byl syntetizován v příkladu 1, byla testována a vyhodnocována následujícím způsobem.

Buňky MT-4 infektované HIV ($2,5 \cdot 10^4$ buněk na jamku, multiplicita infekce (MOI): 0,001) byly nanесeny bezprostředně po infekci spolu s testovanou látkou v různých koncentracích na mikrotitrovací desku s 96 jamkami. Po pěti dnech inkubace při teplotě 7°C v CO_2 inkubátoru se počet buněk, které přežily, změřil MTT metodou (Pauwels a spol.: J. Virol. Methods 20, 309 až 321 (1988)). Protivirová aktivita je vyjádřena jako koncentrace, při které zasažení buněk HIV infekcí je inhibováno z 50 % (EC 50 znamená 50 % efektivní koncentrace). Na druhé straně, aby se zjistila cytotoxicita testované sloučeniny na buňky MT-4, inkubují se virem neinfektované buňky, podobně jako bylo shora uvedeno, s testovanou sloučeninou v různých koncentracích. Cytotoxicita je vyjádřena jako 50% cytotoxická koncentrace (CC 50) testované sloučeniny. A dále,

hrubý poměr CC 50 k EC 50 (CC 50/ED 50) je vyjádřen jako efektivní poměr (SI).

V tabulce II jsou uvedeny hodnoty EC 50, CC 50 a SI polypeptidu vzorce A, tachyplesinu I, známého polypeptidu s afinitou na endotoxiny, a azidothymidinu, anti-HIV-činidla. Poslední dvě sloučeniny jsou uvedeny pro srovnání.

Tabulka II

	testovaná látka	CC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	EC 50 ($\mu\text{g/ml}$)	SI
příklad 1	polypeptid (A)	39	0,35	110
srovnávací příklad 1	tachyplesin I	49	18,1	3
srovnávací příklad 2	azidothymidin (AZT)	0,80	0,00048	1700

Jak je zřejmé ze shora uvedené tabulky, polypeptid vzorce A podle vynálezu má poněkud silnější cytotoxicitu než tachyplesin I, jehož anti-HIV aktivita byla již dříve objevena, ale vykazuje protiviřovou aktivitu v koncentraci 1/50. Při srovnání s azidothymidinem má polypeptid vzorce A EC 50 při vyšší koncentraci, ale má 60-krát vyšší CC 50, což ukazuje nízkou cytotoxicitu.

Příklad 3

Tabulka III ukazuje strukturální vzorce a fyzikální vlastnosti různých polypeptidů podle vynálezu připravených stejným způsobem jako v příkladu 1 a jejich protiviřové aktivity na HIV, které byly testovány a vyhodnocovány podobně jako v příkladu 2.

Ve sloučeninách tohoto příkladu ve shora uvedené tabulce jsou zbytky Cys v polohách 3, 7, 12 a 16 spojeny disulfidovou vazbou mezi polohami 3 a 16 a polohami 7 a 12, pokud není uvedeno jinak. Ve shora uvedené tabulce "AZT" znamená azidothymidin (obvyklý název: zidovudin).

Tabulka III

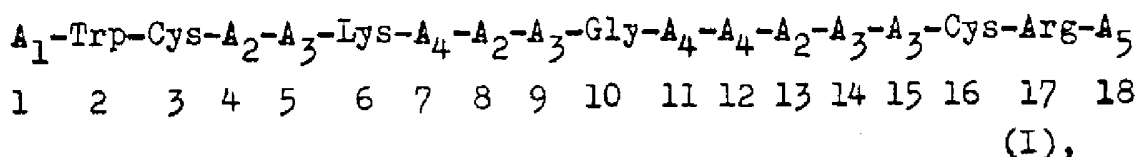
symbol	sloučenina	fyzikální vlastnosti		anti-HIV aktivita	
		$[\alpha]_{D}^{20-22}$	CC ₅₀	EC ₅₀	SI
(1)	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+14.2°	207	6.9	30
(A)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	(C=0.3 1N AcOH)	44.6	0.039	1144
(3)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	-9.0°	49.5	0.009	5500
(7)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	(C=0.1 1N AcOH)	46.0	0.13	354
(8)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	-10.8°	43.4	0.0023	18870
(12)	Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	(C=0.1 1N AcOH)	50.7	0.39	130
(13)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Arg-Cys-Arg-NH ₂	+3.8°	48.0	0.007	6860
(16)	Arg-Trp-Cys-Trp-Arg-Lys-Cys-Tyr-Lys-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Arg-Cys-Arg-NH ₂	+25.8°	46.6	0.18	259
(18)	Arg-Trp-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Phe-Lys-Gly-Ser-Cys-Phe-Lys-Lys-Cys-Arg-NH ₂	(C=0.2 1N AcOH)	43.0	0.36	119
(3H)	Arg-Arg-Trp-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Tyr-Arg-Gly-Ile-Cys-Tyr-Arg-Lys-Cys-Arg-NH ₂	+5.4°	52.0	0.01	5200
srovnávací příklad	A2T	(C=0.06 1N AcOH)	6.8	0.00048	14200

(3H) znamená redukovanou formu (3)

Podle tohoto vynálezu se získává nový polypeptid nebo jeho sůl s protivirovou aktivitou proti viru lidské imunitní nedostatečnosti (HIV) a anti-HIV činidlo, které jako účinnou složku obsahuje tento nový polypeptid nebo jeho sůl.

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Nový polypeptid obecného vzorce I



v němž A_1 znamená atom vodíku nebo jeden či dva zbytky aminokyselin, jimiž jsou lysin a arginin,

A_2 nezávisle znamená zbytek tyrosinu, fenylalaninu nebo tryptofanu,

A_3 nezávisle znamená zbytek argininu nebo lysinu,

A_4 nezávisle znamená zbytek alaninu, valinu, leucinu, isoleucinu, serinu, cysteinu nebo methioninu,

A_5 znamená skupinu $-OH$ (odvozenou od karboxylové skupiny) nebo skupinu $-NH_2$ (odvozenou od amidové skupiny),

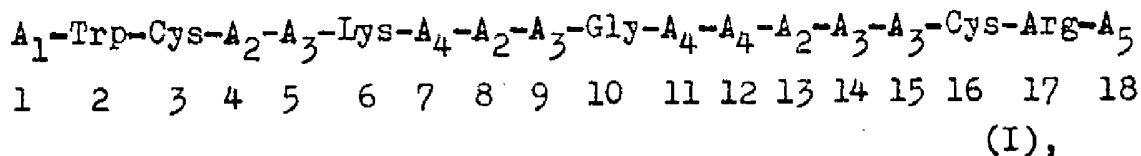
Cys znamená zbytek cysteinu, Gly znamená zbytek glycinu, Lys znamená zbytek lysinu, Arg znamená zbytek argininu a Trp znamená zbytek tryptofanu a

cysteinové zbytky v polohách 3 a 16 mohou být navázány disulfidovou vazbou ($-S-S-$) a jestliže v obou polohách

7 a 12 jsou cysteinové zbytky, mohou být navázány disulfidovou vazbou ($-S-S-$),

nebo jeho súl.

2. Anti-HIV činidlo, vyznačující se tím, že jako účinnou složku obsahuje nový polypeptid obecného vzorce I



v němž A_1 znamená atom vodíku nebo jeden či dva zbytky aminokyselin, jimiž jsou lysin a arginin,

A_2 nezávisle znamená zbytek tyrosinu, fenylalaninu nebo tryptofanu,

A_3 nezávisle znamená zbytek argininu nebo lysinu,

A_4 nezávisle znamená zbytek alaninu, valinu, leucinu,

isoleucinu, serinu, cysteinu nebo methioninu,

A₅ znamená skupinu -OH (odvozenou od karboxylové skupiny) nebo skupinu -NH₂ (odvozenou od amidové skupiny),

Cys znamená zbytek cysteinu, Gly znamená zbytek glycinu, Lys znamená zbytek lysinu, Arg znamená zbytek argininu a Trp znamená zbytek tryptofanu a

cysteinové zbytky v polohách 3 a 16 mohou být navázány disulfidovou vazbou (-S-S-) a jestliže v obou polohách 7 a 12 jsou cysteinové zbytky, mohou být navázány disulfidovou vazbou (-S-S-),

nebo jeho sůl.

Zastupuje:

Aminomethylová pryskyřice

↓ (1) Fmoc-DMBHA . propionová kyselina
DMBHA pryskyřice

↓ Kondenzace chráněných aminokyselin v pořadí podle
sekvence peptidu

↓ (2) Fmoc-¹⁷Arg(Mtr)-DMBHA pryskyřice

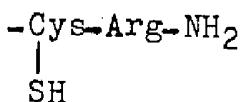
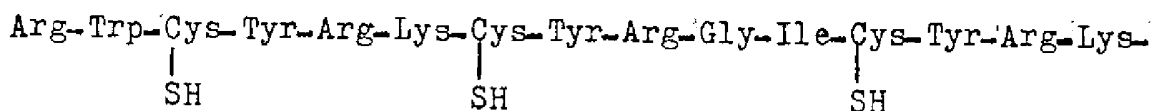
↓ (3) Fmoc-¹⁶Cys(MBzl)-¹⁷Arg(Mtr)DMBHA pryskyřice

↓ (4) Pryskyřice, kde se kondenzují aminokyseliny (chrá-
něné) v polohách 15 až 1

DMBHA pryskyřice s polypeptidem vzorce I chráněným chránící-
mi skupinami

↓ (5) Odstranění chránících skupin a pryskyřice a redukce

Redukovaná forma polypeptidu vzorce A



↓ (6) Oxidační cyklizace, vyčištění (HP adsorbce na pry-
skyřici, desorbce, HPLC chromatografie)

Polypeptid vzorce A

Obrázek 1

