

(11) Patento numeris: **4393** (51) Int. Cl.⁶: **C07K 5/06,**
C07K 5/08,
(21) Paraiškos numeris: **97-158** **C07K 5/10**

(22) Paraiškos padavimo data: **1997 10 02**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1998 05 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1998 10 26**

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/RU96/00046**

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1996 02 28**

(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1997 10 02**

(31, 32, 33) Prioritetas: **95102461, 1995 03 02, RU**

(72) Išradėjas:

Vladislav Isakovich Deigin, RU
Andrei Marxovich Korotkov, RU

(73) Patento savininkas:

Vladislav Isakovich Deigin, ul. Ossenniaya 4-1-276, 121609 Moskva, RU
Andrei Marxovich Korotkov, ul. Ossenniaya 4-1-135, 121609 Moskva, RU

(74) Patentinis patikėtinis:

Reda Žabolienė, 7, UAB "Metida", Pilies g. 8/1-2, 2600 MTP Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Peptidas ir jo gavimo būdas

(57) Referatas:

Šis išradimas yra iš medicinos srities, jis priklauso biologiškai aktyvių junginių, pasižyminčių imunoreguliuojančiomis savybėmis, gavimo būdams ir gali rasti pritaikymą medicinoje, veterinarijoje, o taip pat ir eksperimentinėje biochemijoje.

Išradimo tikslas - sukurti naują sintetinį biologiškai aktyvų peptidą, pasižymintį imunoreguliuojančiomis savybėmis, kurio formulė

X-Glu-Trp-Y,

kurioje

X yra H arba Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ϵ -aminoheksano rūgštis;

Y yra Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis ϵ -aminoheksano rūgštis, -OH, mono- arba dipakeistas amidas (C_1 - C_9).

Peptido sintezė vykdoma tirpale, nuosekliai ilginant grandinę nuo molekulės C-galo, panaudojant maksimalaus funkcinių grupių blokavimo strategiją, išeinant iš aminorūgšties alkilo esterio; sintezėje naudojamas aktyvuotų esterų metodas ir mišrių anhidridų metodas ir tret-butiloksikarbonilaminorūgštys.

PEPTIDAS IR JO GAVIMO BŪDAS

Technikos sritis

Šis išradimas yra iš medicinos srities, jis priklauso biologiškai aktyvių junginių, pasižyminčių imunoreguliuojančiomis savybėmis, gavimo būdams ir gali rasti pritaikymą medicinoje, vetrinarijoje, o taip pat ir eksperimentinėje biochemijoje.

Ankstesnis technikos lygis

Praktinėje medicinoje, kaip imuninių procesų reguliatoriai, yra gerai žinomi užkrūčio liaukos ekstraktai, konkrečiau - 5-osios frakcijos timozinas (Goldstein A. L., Guna A., Latz M. M., Hardy H. A., White A.), timalinas (CH, Nr.659586). Šie ekstraktai susideda iš polipeptidinės prigimties medžiagų komplekso, ir jų gavimą iš gamtinių šaltinių riboja gamybos sudėtingumas, maža veikliųjų medžiagų išeiga ir didelis jų fizikinių-cheminių charakteristikų bei biologinių savybių nevienodumas. Be to, kadangi gamtiniuose užkrūčio liaukos preparatuose yra balastinių komponentų, ligoniams vartojant šiuos preparatus, dažnai atsiranda pašaliniai reiškiniai. Ši ypatybė pasitarnavo stimulu kurti sintetinius peptidus. Pastaruoju metu yra susintetinta keletas peptidų, kurie pasižymi imunoreguliuojančiomis savybėmis: PCT WO 089/06134, EP Nr. 230052, US Nr.5008246, US Nr. 5013723. Visi šie sintetiniai peptidai, turintys apribotą būtinų savybių kompleksą, pasižymi dideliu aktyvumu, mažu toksiškumu, jie neturi pašalinio poveikio ir todėl gali būti taikomi medicinoje.

Išradimo išaiškinimas

Išradimo tikslas - sukurti naują sintetinį biologiškai aktyvų peptidą, pasižymintį imunoreguliuojančiomis savybėmis, kurio formulė



kurioje

- X yra H arba Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis;
- Y yra Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis, -OH, mono- arba dipakeistas amidas (C_1 - C_3).

Kitas išradimo tikslas yra sukurti iš esmės naują peptidinės prigimties medžiagų technologinį gavimo būdą, kuris, esant minimaliam kiekiui paprastų stadijų, duotų galimybę gauti aukščiau duotos formulės produktą geromis išeigomis.

Naujojo gamybos būdo esmę sudaro peptido sintezė tirpale, nuosekliai ilginant grandinę nuo molekulės C-galo, panaudojant maksimalaus funkcinių grupių blokavimo strategiją, išeinant iš aminorūgšties alkilo esterio; sintezėje naudojamas aktyvuotų esterių metodas ir mišrių anhidridų metodas ir tret-butiloksikarbonilaminorūgštys.

1-je lentelėje duotos kai kurių naujojo peptido junginių R_{f1} (chloroformo-metanolio-32% acto rūgšties = 60:45:20 sistemoje) ir R_{f2} (butanolio-piridino-vandens-acto rūgšties = 5:5:4:1 sistemoje) reikšmės.

1 lentelė

Peptidas	R_{f1}	R_{f2}
Abu-Glu-Trp-OH	0,40	0,56
Aca-Glu-Trp-OH	0,41	0,57
Ala-Glu-Trp-NH ₂	0,40	0,51
Arg-Glu-Trp-OH	0,26	0,48
D-Ala-Glu-Trp-OH	0,37	0,55
D-Ile-Glu-Trp-D-Phe	0,71	0,77
D-Ile-Glu-Trp-OH	0,39	0,54
D-Leu-Glu-Trp-NH ₂	0,35	0,56
D-Leu-Glu-Trp-OH	0,37	0,57
D-NVal-Glu-Trp-OH	0,38	0,56
D-Phe-Glu-Trp-Ala	0,69	0,76
D-Pro-Glu-Trp-OH	0,58	0,72

1 lentelė (tesinys)

Peptidas	R _{f1}	R _{f2}
D-Trp-Glu-Trp-OH	0,47	0,56
D-Tyr-Glu-Trp-OH	0,45	0,57
D-Val-Glu-Trp-NH ₂	0,43	0,53
Gly-Glu-Trp-Gly	0,44	0,49
Gly-Glu-Trp-OH	0,42	0,56
H-Glu-Trp-Abu	0,49	0,54
H-Glu-Trp-Aca	0,51	0,56
H-Glu-Trp-Arg	0,28	0,40
H-Glu-Trp-D-Ala	0,61	0,70
H-Glu-Trp-D-Ile	0,63	0,71
H-Glu-Trp-D-Leu	0,64	0,72
H-Glu-Trp-D-NVal	0,65	0,69
H-Glu-Trp-D-Pro	0,66	0,69
H-Glu-Trp-D-Trp	0,63	0,66
H-Glu-trp-D-Tyr	0,61	0,66
H-Glu-Trp-D-Val	0,65	0,71
H-Glu-Trp-Ile	0,64	0,68
H-Glu-Trp-Gly	0,54	0,58
H-Glu-Trp-NH ₂	0,42	0,55
H-Glu-Trp-N ₂ H ₃	0,32	0,41
H-Glu-Trp-NVal	0,67	0,71
H-Glu-Trp-Trp	0,64	0,67
H-Glu-Trp-Tyr	0,62	0,66
H-Glu-Trp-Val	0,66	0,71
His-Glu-Trp-OH	0,31	0,58
Ile-Glu-Trp-Phe	0,71	0,78
Ile-Glu-Trp-OH	0,38	0,54
Ile-Glu-Trp-Phe	0,72	0,78
Ile-Glu-Trp-Pro	0,68	0,81
Leu-Glu-Trp-OH	0,39	0,56
Lys-Glu-Trp-OH	0,30	0,51
Lys-Glu-Trp-Tyr	0,32	0,50
NVal-Glu-Trp-OH	0,37	0,55
Phe-Glu-Trp-NH ₂	0,53	0,62
Pro-Glu-Trp-Leu	0,67	0,75
Pro-Glu-Trp-OH	0,59	0,72
Trp-Glu-Trp-OH	0,48	0,59
Tyr-Glu-Trp-OH	0,46	0,58
Val-Glu-Trp-Ala	0,61	0,71

1 lentelė (tęsinys)

Peptidas	R _{f1}	R _{f2}
Val-Glu-Trp-NH ₂	0,38	0,52
Val-Glu-Trp-OH	0,36	0,51
Val-Glu-Trp-Tyr	0,59	0,61

Aukščiau duotos formulės peptidas, gautas aprašytu būdu, yra balti milteliai, tirpūs vandenyje, mažai tirpūs alkoholyje ir praktiškai netirpūs chloroforme.

Geriausi išradimo įgyvendinimo variantai

Išradimą iliustruoja toliau duodamas pavyzdys.

Pavyzdys

Šiame pavyzdyje aprašytas peptido, kurio formulė H-Ile-Glu-Trp-OH, gavimo būdas.

1. Boc-Ile-OPFP gavimas

46,0 g (0,2 mol) Boc-Ile-OH ir 40,5 g (0,22 mol) pentafluorfenolio mišinys 100 ml etilacetato atšaldomas iki -5 °C ir pridedama 45,3 g (0,22 mol) N,N-dicikloheksilkarbodiimido. Reakcijos mišinys maišomas 3 valandas kambario temperatūroje, dicikloheksilkarbamidas nufiltruojamas, tirpikliai nugarinami vakuume ir liekana perkristalinama iš etilacetato ir heksano mišinio. Iškritusios nuosėdos nufiltruojamos. Išeiga: 71,3 g (90 %).

2. Boc-Ile-Glu-Trp-OH gavimas

19,8 g (0,05 mol) Boc-Ile-OPFP ištirpinama 100 ml dimetilformamido ir maišant supilamas 20 g (0,06 mol) Glu-Trp ir 5,0 g (0,06 mol) NaHCO₃ tirpalas vandenyje. Tirpalas maišomas 20 val. kambario temperatūroje, po to tirpikliai nugarinami vakuume. Į liekaną įpilama 200 ml etilacetato ir 200 ml 2 % sieros rūgšties tirpalo ir pamašoma. Organinis sluoksnis plaunamas sieros rūgšties tirpalu (2 x 100 ml), sočiu NaCl tirpalu iki pH = 7, džiovinamas bevandeniu natrio sulfatu, ir tirpiklis nugarinamas vakuume. Liekana perkristalinama iš etilacetato ir heksano mišinio, nuosėdos nufiltruojamos ir džiovinamos vakuume. Išeiga: 20,5 g (75 %).

3. H-Ile-Glu-Trp-OH gavimas

20,5 g Boc-Ile-Glu-Trp-OH ištirpinama 150 ml skruzdžių rūgšties, pamaišoma 3,5 val. 45 °C temperatūroje, ir tirpiklis nugarinamas vakuume. Į liekaną įpilama 200 ml vandens ir dar kartą nugarinama vakuume. Į liekaną įpilama 300 ml izopropanolio, 200 ml eterio ir laikoma 10 val. Nuosėdos nufiltruojamos ir džiovinamos vakuume. Išeiga: 15,3 g (75 %).

Peptidas valomas atvirkštinių fazių chromatografijos metodu, panaudojant acetonitrilo - 0,1 % trifluoracto rūgšties sistemą. Išeiga: 13 g (85 %).

Tiriant peptido fizikines-chemines savybes, gautos tokios jo charakteristikos:

pirminė struktūra - H-Ile-Glu-Trp-OH;

Bruto formulė - $C_{24}H_{30}N_4O_4$;

molekulinė masė - 446,5 Da;

išvaizda - balti su šiek tiek gelsvu atspalviu arba pilki milteliai;

tirpumas - tirpus vandenyje, praktiškai netirpus chloroforme;

UV spektro 250-300 nm srityje yra maksimumas ties 280 ± 2 nm ir išlinkimas ties 287 ± 2 nm.

Naujojo peptido biologinis aktyvumas buvo tirtas su jūrų kiaulytėmis, panaudojant bendrai priimtą E-rozečių susidarymo testą. 2-je lentelėje duoti užkrūčio liaukos preparatų ir šio išradimo peptido poveikio į jūrų kiaulyčių limfocitų E-rozečių susidarymo, apdorojus tripsinu, procesą palyginamieji duomenys.

2 lentelė

Preparatas	Fonas, nepaveikti gyvuliukai	Po poveikio tripsinu	E-POK kiekis (%)						
			Po poveikio tripsinu ir preparatu, kurio konc. mg/ml*						
			10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}
Timalinas	66,5	36,1	57,0	40,1	37,0	35,3	37,4	36,5	34,7
Timozinas, 5-ji frakcija	66,5	36,1	60,3	35,4	33,4	39,5	39,1	33,7	35,8
Ile-Glu-Trp	66,5	36,1	61,4	63,9	64,8	60,2	37,5	40,0	34,3

* Kiekviena koncentracija buvo tirta su 5 gyvuliukais. Patikimu buvo laikomas 50 % E-POK padidėjimas, lyginant su kontrole, t.y. iki 55 % ir daugiau.

Nustatyta, kad šio išradimo peptidas *in vitro* yra 10^3 kartų aktyvesnis už žinomus preparatus.

Norint ištirti šio peptido nekenksmingumą, buvo atliekami jo ūmaus toksiškumo tyrimai. Ūmus toksiškumas buvo tirtas pagal Rusijos Federacijos Farmakologijos Komiteto metodines rekomendacijas "Trebovanija k dokliničeskomu izučeniju obščetoksičnogo deistvija novych farmakologičeskich veščestv", M., 1985 m.

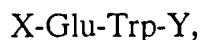
Rezultatų tyrimai parodė, kad 1000 kartų didesnės peptido dozės suleidimas į pilvą nerodė ūmaus toksiškumo ir esant tokioms dozėms negalima pasiekti jo LD₅₀.

Pramoninis pritaikymas

Šis biologiškai aktyvus peptidas gali rasti platų pritaikymą medicinoje ir veterinarijoje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidas, kurio formulė

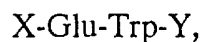


kurioje

X yra H arba Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis;

Y yra Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis, -OH, mono- arba dipakeistas amidas (C_1 - C_3).

2. Peptido, kurio formulė



kurioje

X yra H arba Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis;

Y yra Gly, Ala, Leu, Ile, Val, NVal, Pro, Tyr, Phe, Trp, D-Ala, D-Leu, D-Ile, D-Val, D-NVal, D-Pro, D-Tyr, D-Phe, D-Trp, γ -aminosviesto rūgštis, ξ -aminoheksano rūgštis, -OH, mono- arba dipakeistas amidas (C_1 - C_3),

gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad tirpale vykdo aminorūgšties alkilo esterio reakciją su tret-butiloksikarbonilaminorūgštimi, po to nuosekliai ilgina peptidinę grandinę aktyvuotų esterių metodu ir mišrių anhidridų metodu vieną po kitos prijungia tret-butiloksikarbonilaminorūgštis, prieš tai atskėlę kiekvienoje stadijoje tret-butiloksikarbonilo grupę, apdorodami reakcijos mišinį skruzdžių rūgštimi, ir po to išvalydami tarpinius produktus perkristalinimo būdu, ir gauna X-Glu-Trp-Y formulės produktą, kurį išvalo atvirkštinių fazių chromatografijos metodu.