

- (11) Patento numeris: **4476** (51) Int. Cl.⁶: **C07K 5/06**
C07K 5/08
(21) Paraiškos numeris: **98-004** **C07K 5/10**
A61K 38/05
(22) Paraiškos padavimo data: **1998 01 07** **A61K 38/06**
A61K 38/07
(41) Paraiškos paskelbimo data: **1998 10 26**
(45) Patento paskelbimo data: **1999 03 25**
(86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/RU96/00116**
(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **1996 05 06**
(85) Nacionalinės procedūros pradžia: **1998 01 07**
(31, 32, 33) Prioritetas: **95108559, 1995 06 07,**
(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:

Išradimas skirtas medicinai, o būtent - biologiškai aktyvių medžiagų, pasižyminčių imunoreguliacinio poveikio, gavimo būdai, ir gali būti pritaikytas medicinoje, veterinarijoje, o taip pat eksperimentinėje biochemijoje.

Išradimo pagrindą sudaro naujo sintetinio biologiškai aktyvaus peptido, pasižyminčio imunoreguliuojamomis savybėmis sukūrimas, kurio formulė

X - A - D - Trp - Y,

kurioje

A - D-Glu, iD-Glu,

X - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis;

Y - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis, -OH arba pakeistasis amidas (C1-C3).

Peptido gavimo būdą sudaro glutamino peptidų sintezė tirpale, išskleidžiant tributiloksidikarbonilglutamino (D arba L) rūgšties vidinį anhidridą preparato D-Trp-Y tinkama K-druska ir po to chromatografiškai atskiriant α - ir γ -izomerus. Tolesnė sintezė vykdoma auginant peptido grandinę tributiloksidikarbonilamino rūgščių aktyvuotųjų esterių pagalba.

Išradimas skirtas medicinai, o būtent - biologiškai aktyvių medžiagų, pasižyminčių imunoreguliacinio savybėmis, gavimo būdui, ir gali būti pritaikytas medicinoje, veterinarijoje, o taip pat eksperimentinėje biochemijoje.

Naujų, nekenksmingų imunoreguliacinio peptidų, galinčių sustabdyti progresuojantį tokių susirgimų, kaip piktybiniai dariniai, sepsis, lėtinės ir ilgalaikės infekcijos, besivystančios imunodeficitu būsenos fone, sukūrimo aktualumą patvirtina daugybė tyrimų, atliktų šioje srityje.

Labiausiai paplitęs naujų peptidų sukūrimo būdas yra aktyvių peptido frakcijų išskyrimas iš apjungtų audinių ekstraktų, frakcionavimas ir valymas, gaunant individualią identifikuatą medžiagą (SU Nr.1600047, SU Nr.1638849, SU Nr.1737798). Praktinėje medicinoje kaip imuninių procesų reguliatoriai gerai žinomi timuso ekstraktai, būtent, timozino 5 frakcija /Goldstein A.L., Guna A., Latz M.M., Hardy H.A., White A./, timalinas/CH, Nr.659586/. Šiuos ekstraktus sudaro polipeptidinės prigimties medžiagų kompleksas ir jų gavimą iš gamtinių šaltinių riboja gamybos sudėtingumas, maža aktyvių medžiagų išeiga ir didelis jų fizikinių-cheminių charakteristikų ir biologinių savybių kintamumas. Be to, timuso gamtinių preparatų sudėtyje yra balastinių komponentų, todėl, juos vartojant, ligoniai retkarčiais jaučia šalutinius poveikius. Pastaroji aplinkybė ir buvo stimulus sukurti sintetinius peptido preparatus. PCT WO 089/06134, SU 1541821, SU Nr.1518956, EP Nr.230052, EP Nr.406931, US Nr.5021551, US Nr.5013723 išradimuose aprašyti peptidų, pasižyminčių imunoreguliacinio savybėmis, sintezės būdai. Kiekvienas gautas sintetinis peptidas, turintis ribotą būtinų savybių kompleksą, yra labai aktyvus, netoksiškas, nesukelia šalutinių poveikių, apsprendžiančių jų galimą pritaikomumą medicinoje.

Šio išradimo tikslas - sukurti naują sintetinį biologiškai aktyvų, pasižymintį imunoreguliacinio savybėmis, peptidą, kurio formulė:



kurioje

A - D-Glu, iD-Glu;

X - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis;

Y - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis, -OH arba pakeistasis amidas ($C_1 - C_3$).

Taip pat šio išradimo tikslas yra sukurti naują technologinį peptido medžiagos gavimo procesą, kuris leistų nesudėtingai kelių stadijų metu gauti aukščiau parašytos formulės produktą.

Šio išradimo esmę sudaro glutamilo peptidų sintezė tirpale, išskleidžiant tributiloksikarbonilglutamino (D arba L) rūgšties atitinkamu dariniu D-Trp-Y ir po to chromatografiškai atskiriant α - ir γ - izomerus. Tolesnė sintezė buvo atliekama, auginant peptido grandinę tributiloksikarbonilamino rūgščių aktyvuotųjų esterių pagalba.

1 lentelėje pateiktos peptido junginių analogų reikšmės R_{f1} (chloroformas-metanolis-32 % acto rūgštis=60:45:20) ir R_{f2} (butanolis-piridinas-vanduo-acto rūgštis=5:5:4:1) sistemoje.

1 lentelė

Peptidas	R_{f1}	R_{f2}
Abu-D-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,53
Abu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,29	0,49
Aca-D-Glu-D-Trp-OH	0,31	0,52
Aca-iD-Glu-D-Trp-OH	0,28	0,49
Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,61
Ala-iD-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,55
D-Ala-D-Glu-D-Trp-D-Ala	0,22	0,41
D-Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0,26	0,51
D-Ala-iD-Glu-D-Trp-D-Ala	0,25	0,50
D-Ala-D-Glu-D-Trp-OH	0,25	0,51
D-Ile-D-Glu-D-Trp-D-Leu	0,35	0,53
D-Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,54
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Leu	0,34	0,53
D-Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0,27	0,52
D-Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,53
D-Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,52
D-NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,51
D-NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0,32	0,51
D-Phe-D-Glu-D-Trp-Ala	0,37	0,56

1 lentelės tęsinys

D-Phe-iD-Glu-D-Trp-Ala	0,36	0,55
D-Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0,38	0,58
D-Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0,37	0,58
D-Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,59
D-Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0,40	0,59
D-Tyr-D-Glu-D-Trp-D-Tyr	0,39	0,58
D-Tyr-ID-Glu-D-Trp-D-Tyr	0,38	0,58
D-Val-D-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,51
D-Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,50
Gly-D-Glu-D-Trp-NVal	0,29	0,51
Gly-D-Glu-D-Trp-OH	0,30	0,54
Gly-iD-Glu-D-Trp-NVal	0,32	0,53
Gly-iD-Glu-D-Trp-OH	0,29	0,53
H-D-Glu-D-Trp-Abu	0,33	0,52
H-D-Glu-D-Trp-Aca	0,30	0,53
H-D-Glu-D-Trp-D-Ide	0,35	0,58
H-D-Glu-D-Trp-D-Pro	0,37	0,61
H-D-Glu-D-Trp-Gly	0,29	0,54
H-D-Glu-D-Trp-Ile	0,36	0,58
H-D-Glu-D-Trp-Leu	0,36	0,59
H-D-Glu-D-Trp-Lys	0,28	0,47
H-D-Glu-D-Trp-OH	0,36	0,56
H-D-Glu-D-Trp-Phe	0,39	0,61
H-D-Glu-D-Trp-Pro	0,38	0,59
H-D-Glu-D-Trp-Tyr	0,37	0,58
H-D-Glu-D-Trp-Val	0,38	0,61
H-iD-Glu-D-Trp-Abu	0,34	0,51
H-iD-Glu-D-Trp-Aca	0,33	0,50
H-iD-Glu-D-Trp-D-Ile	0,34	0,55
H-iD-Glu-D-Trp-D-Pro	0,36	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Gly	0,28	0,52
H-iD-Glu-D-Trp-Ile	0,34	0,57
H-iD-Glu-D-Trp-Leu	0,35	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Lys	0,27	0,45
H-iD-Glu-D-Trp-OH	0,30	0,52
H-iD-Glu-D-Trp-Phe	0,38	0,61
H-iD-Glu-D-Trp-Pro	0,37	0,60
H-iD-Glu-D-Trp-Tyr	0,35	0,58
H-iD-Glu-D-Trp-Val	0,36	0,60
Ile-D-Glu-D-Trp-D-Phe	0,42	0,68
Ile-D-Glu-D-Trp-OH	0,38	0,56
Ile-iD-Glu-D-Trp-D-Phe	0,40	0,67
Ile-iD-Glu-D-Trp-OH	0,37	0,55
Leu-D-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,62
Leu-iD-Glu-D-Trp-OH	0,27	0,57

1 lentelės tęsinys

NVal-D-Glu-D-Trp-OH	0,35	0,61
NVal-iD-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,60
Phe-D-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,63
Phe-iD-Glu-D-Trp-OH	0,40	0,62
Pro-D-Glu-D-Trp-OH	0,43	0,63
Pro-iD-Glu-D-Trp-OH	0,42	0,62
Trp-D-Glu-D-Trp-OH	0,45	0,68
Trp-iD-Glu-D-Trp-OH	0,44	0,67
Tyr-D-Glu-D-Trp-OH	0,42	0,64
Tyr-iD-Glu-D-Trp-OH	0,41	0,63
Val-D-Glu-D-Trp-D-Val	0,46	0,68
Val-D-Glu-D-Trp-OH	0,33	0,50
Val-iD-Glu-D-Trp-D-Val	0,44	0,66
Val-iD-Glu-D-Trp-OH	0,34	0,52

Išradimas iliustruojamas pateiktu pavyzdžiu.

Pavyzdys.

H-D-Glu-D-Trp-OH ir H-iD-Glu-D-Trp-OH

1. Boc-D-Glu-OH gavimas.

14,7 g (0,1 molio) H-D-Glu-OH buvo ištirpinta 200 ml distiliuoto vandens, vienmolio KOH tirpalo pagalba pH buvo nustatytas iki 10,2, intensyviai maišant buvo pridėta 33,0 g (0,3 molio) BOC_2O tirpalo dioksane. Buvo stebimas pH dydis pH-metre. Pasibaigus reakcijai, mišinys buvo patalpintas į dalijamąjį piltuvą, iš šarminės terpės ekstraguotas etilacetatu 3×150 ml, vandens fazė buvo iš lėto rūgštinama 0,2% sieros rūgšties tirpalu iki $\text{pH}=3,0$ ir Boc-D-Glu-OH ekstraguotas į organinę fazę (3×200 ml). Organinis sluoksnis buvo praplautas 3×200 ml sočiuoju Na_2SO_4 tirpalu, gaunant neutralią terpę, džiovintas Na_2SO_4 , gārintas vakuume iki aliejaus būvio. Išėiga: 16,7 g (68%).

2. Boc-D-Glu-D-Trp-OH ir Boc-iD-Glu-D-Trp-OH mišinio gavimas.

16,7 g (0,068 molio) Boc-D-Glu-OH buvo ištirpinta 200 ml dimetilformamide, tirpalas buvo atšaldytas iki 0°C ir maišant pridėta 20,6 g (0,1 molio) N,N'-dicikloheksilkarbodiimido, ištirpinto 100 ml dimetilformamido, tirpalo. Mišinys buvo maišomas 4 val. $+4^\circ\text{C}$ temperatūroje, ir paliktas 8 val. nusistovėti kambario temperatūroje. Iškritusios dicikloheksilkarbamido nuosėdos buvo nufiltruotos, praplautos 2×50 ml dimetilformamidu, filtratas buvo garintas vakuume, sumažinant jo tūrį perpus, ir, šaldant iki $+4^\circ\text{C}$ temperatūros bei

intensyviai maišant, buvo pridėta 24,3 g (0,1 molio) H-D-Trp-OK. Mišinys buvo paliktas palaipsniui įšilti iki kambario temperatūros. Apie reakcijos pabaigą spręsta pagal plonasluoksnės chromatografijos duomenis sistemoje (chloroformas:etilacetatas:metanolis 6:3:1) iki išnykstant rūgšties vidinio anhidrido Boc-D-Glu dėmei. Dicikloheksilkarbamido liekanos buvo nufiltruotos, dimetilformamidas garintas vakuume. Į aliejaus pavidalo liekaną buvo pridėta 200 ml etilacetato ir 200 ml 0,2% sieros rūgšties tirpalo. Organinis sluoksnis buvo atskirtas, praplautas, neutralizuojant jį sočiuoju Na_2SO_4 tirpalu, džiovintas Na_2SO_4 , etilacetato tirpalas garintas vakuume. Taip buvo gautos aliejaus pavidalo nuosėdos, kurias sudarė Boc-D-Glu-D-Trp-OH ir Boc-iD-Glu-D-Trp-OH mišinys. Bendra masės išeiga sudarė 25,4 g (70%).

3. H-D-Glu-D-Trp-OH ir H-iD-Glu-D-Trp-OH gavimas.

25,4 g (0,048 molio) mišinio buvo ištirpinta 200 ml skruzdžių rūgšties, maišyta 1 val 40°C temperatūroje ir garinta vakuume iki aliejaus būvio. Peptidų atskyrimas ir valymas jonų mainų chromatografijos pagalba buvo atliktas kolonėlėje su Sefadeksu piridinacetatinio buferio gradientu 0,01-0,2 M. Išeiga: 5,7 g (35%) H-D-Glu-D-Trp-OH ir 5,7 g (35%) H-iD-Glu-D-Trp-OH.

Ištyrus fizikines-chemines peptido savybes, gautos sekančios jo charakteristikos:

Pirminė struktūra - H-D-Glu-D-Trp-OH ir H-iD-Glu-D-Trp-OH

Bruto formulė - $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5$

Molekulinis svoris - 334,35

Išvaizda - balti su gelsvu atspalviu arba pilki milteliai.

Tirpumas - lengvai tirpstantis vandenyje, ribotai - spirite, netirpus chloroforme.

Ultravioletinis spektras yra 250-300 nm srityje, maksimumas - 280 ± 2 nm, petys - 287 ± 2 nm.

Biologinis naujojo peptido aktyvumas buvo išbandytas ant Balb/c linijos pelių. Pelių blužnies ląstelės buvo suspenduotos RPMI 1640 terpėje su 2 ml glutamino ir 5% neaktyvuoto fetalinio serumo ir 100 μl buvo įvesta į plokščiadugnes planšetes po 200000 ląstelių į kiekvieną duobutę atitinkamai. Tiriamasis preparatas buvo įvestas kultivavimo pradžioje. Kaip mitogenas buvo

panaudotas konkanavalinas A, kurio galutinė koncentracija sudarė 2 μg į kiekvieną duobutę. Planšetės buvo inkubuotos 48 val, esant 37°C temperatūrai ir 5% CO₂. Ląstelių proliferacija buvo įvertinta pagal 3H-timidino, kurio 5 mkg/ml dozė buvo įvesta, likus 24 val iki kultivavimo pabaigos, įsisavinimą, apskaičiuotą scintiliacinio skaitiklio pagalba, ir išreikšta skilimų kiekiu per minutę (CPM). Gauti rezultatai pateikti 2 lentelėje.

2 lentelė

Pelių blužnies ląstelių proliferacija

Preparatas	CPMI*			
	Preparato dozė (mkg/ml)			
	1	5	10	20
iD-Glu-D-Trp	68594	63428	20043	13222
Ciklosporinas A	67649	2698	574	569
Kontrolinis	61467			

* - trijų reikšmių vidurkis

Nustatyta, kad naujasis peptidas pasižymi savybe slopinti blužnies ląstelių proliferaciją.

Siekiant išsiaiškinti ar naujasis peptidas yra nekenksmingas, buvo atliktas jo ūmaus toksiškumo įvertinimas. Šis įvertinimas buvo atliktas pagal Rusijos Federacijos farmakologijos komiteto metodines rekomendacijas "Naujų farmakologinių medžiagų bendro toksinio poveikio priešklinikinio tyrinėjimo reikalavimai", M., 1985.

Tyrimų rezultatai parodė, kad, įvedus 1000 peptido dozių į pilvaplėvę, jis nesukėlė aštraus toksinio poveikio ir, esant tokioms dozėms, buvo neįmanoma pasiekti jų LD₅₀.

Biologiškai aktyvus peptidas gali būti plačiai pritaikytas medicinoje ir veterinarijoje.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Peptidas, kurio formulė



kurioje

A - D-Glu, iD-Glu;

X - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis;

Y - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis, -OH arba pakeistasis amidas ($C_1 - C_3$).

2. Peptido, kurio formulė



kurioje

A - D-Glu, iD-Glu;

X - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis;

Y - 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 -aminobutano rūgštis, ξ -aminokaprono rūgštis, -OH arba pakeistasis amidas ($C_1 - C_3$), gavimo būdas, besiskiriantis tuo, kad peptido sintezę vykdo tirpale, atidarant tributiloksikarbonilglutamino (D ar L) rūgšties vidinį anhidridą D-Trp-Y K-druskos pagalba, po to augina peptido grandinę aktyvuotųjų esterių ir mišriųjų anhidridų būdais, prieš tai atskėlus tributiloksikarbonilo grupę skruzdžių rūgštimi, ir chromatografiškai atskiriant α - ir γ - izomerus.