



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 325 T2** 2007.07.05

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 900 235 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 325.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP97/00994**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 905 126.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/031944**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.02.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.09.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.03.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.07.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.07.2007**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/705** (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
9604518 **02.03.1996** **GB**

(73) Patentinhaber:
AdProTech Ltd., Royston, Hertfordshire, GB

(74) Vertreter:
**Kuhnen & Wacker Patent- und
Rechtsanwaltsbüro, 85354 Freising**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**MOSSAKOWSKA, Ewa, Danuta, Third Avenue
Harlow Essex CM19 5AW, GB; EDGE, Michael
SmithKline Beecham Pharmac., Colin, Harlow
Essex CM19 5AW, GB; SMITH, Anthony, Richard,
Third Avenue Harlow Essex CM19 5AW, GB**

(54) Bezeichnung: **CR1 FRAGMENTE UND DEREN VERWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide und ihre Verwendung in der Diagnose und Therapie von Störungen, die mit Komplementaktivität und verschiedenen Entzündungs- und Immunstörungen verbunden sind.

[0002] Das etwa 10 % der Globuline in normalem Serum ausmachende Komplementsystem besteht aus vielen verschiedenen Proteinen, die für die Reaktion des Immunsystems auf Fremdartigene wichtig sind. Das Komplementsystem wird aktiviert, wenn seine Primärkomponenten gespalten werden, und die Produkte aktivieren alleine oder mit anderen Proteinen zusätzliche Komplementproteine, was in einer proteolytischen Kaskade resultiert. Die Aktivierung des Komplementsystems führt zu einer Reihe verschiedener Reaktionen, einschließlich einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Chemotaxis phagozytischer Zellen, Aktivierung von Entzündungszellen, Opsonisation von Fremdpartikeln, direkten Abtötung von Zellen und eines Gewebeschadens. Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch Antigen-Antikörper-Komplexe (der klassische Weg) oder zum Beispiel durch in den Zellwänden pathogener Bakterien vorliegende Lipopolysaccharide (der alternative Weg) ausgelöst werden.

[0003] Eine Komplementaktivierung (CA) tritt bekanntlich bei einer großen Vielfalt akuter Entzündungsprozesse auf, insbesondere bei solchen, die mit Ischämie und einer Reperforationsverletzung verbunden sind (Rosson et al., 1985 *Circ. Res.*, 57, 119; Morgan B.P., 1990 *The biological effects of complement activation*. In 'Complement, Clinical Aspects and Relevance to Disease'. Academic Press. London.)

[0004] Es wird allgemein anerkannt, dass wenigstens einige der Komponenten der klassischen Komplementkaskade durch immunohistochemische Verfahren in enger Verbindung mit senilen Plaques im AD-Gehirn nachgewiesen werden können (Eikelenboom et al., 1994, *Neuroscience*, 59, 561–568). Es gibt einen sicheren Beweis für die Beteiligung von C1, C3 und C4, ein Beweis für die Anwesenheit des C5–C9 Membranangriffskomplexes (MAC) ist jedoch noch nicht ersichtlich (Veerhuis et al. 1995, *Vichows Arch.* 426, 603–610). Zellen des ZNS synthetisieren erwiesenermaßen Komplementkomponenten (für eine Übersicht siehe Barnum, 1995 *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 6, 132–146) und die Produktion von C3 wird als Reaktion auf eine Inkubation mit bA4 Peptid erhöht (Haga et al., 1993 *Brain Res.*, 601, 88–94). Ein Komplement kann daher lokal im Gehirn selbst induziert werden und wird zwangsläufig nicht nur aus dem Plasmakompartiment abgeleitet.

[0005] Besonders interessant ist die Tatsache, dass festgestellt wurde, dass sich das bA4 Peptid direkt an die Initialkomponente der Komplementkaskade (Clq) bindet und das gesamte klassische Komplementsystem *in vitro* (einschließlich MAC) durch einen antikörperunabhängigen Mechanismus initiiert (Rogers et al., 1992, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 89, 10016–10020; Jianh et al., 1994, *J. Immunol.*, 152, 5050–5059). Diese Interaktion scheint die Region 6–16 von β A4 und 14–26 der kollagenartigen Schwanzregion der Clq-A-Kette zu involvieren. Letzterer Ort ist von der IgG-Immunkomplex-Bindungsstelle, die sich auf der kugeligen Kopfdomäne von Clq befindet, getrennt. Es gibt einige Hinweise darauf, dass sich fibrilläres bA4 mit höherer Affinität an Clq bindet als monomeres Peptid, wodurch möglicherweise eine rationale Grundlage für die Komplementaktivierung im Erkrankungsprozess geliefert wird (Jiang et al., 1994, *J. Immunol.*, 152, 5050–5059; Snyder et al., 1994, *Exp. Neurol.*, 128, 136–142).

[0006] Der Komplementrezeptor Typ 1 (CR1) liegt erwiesenermaßen auf den Membranen von Erythrozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen, einigen T-Zellen, folliculären, dendritischen Milzzellen und glomerulären Podozyten vor. CR1 bindet sich an die Komplementkomponenten C3b und C4b und wird auch als der C3b/C4b Rezeptor bezeichnet. Die strukturelle Organisation und Primärsequenz eines Allotyps von CR1 ist bekannt (Klickstein et al., 1987, *J. Exp. Med.* 165: 1095–1112, Klickstein et al., 1988, *J. Exp. Med.* 168: 1699–1717; Hourcade et al., 1988, *J. Exp. Med.* 168: 1255–1270, WO 89/09220, WO 91/05047). Er besteht aus 30 „short consensus repeats“ (SCR – kurze, übereinstimmende Wiederholungen), die jeweils etwa 60–70 Aminosäuren enthalten. In jeder SCR sind etwa 29 der durchschnittlichen 65 Aminosäuren konserviert. Es wurde vorgeschlagen, dass jede SCR eine dreidimensionale Dreifachschleifenstruktur über Disulfidverknüpfungen mit dem dritten und ersten und dem vierten und zweiten Halbcystin in Disulfidbindungen bildet. CR1 ist ferner als 4 lange homologe Wiederholungen (LHR) von jeweils 7 SCR angeordnet. Im Anschluss an eine Leitsequenz besteht das CR1 Molekül aus der N-terminalen LHR-A, den nächsten beiden Wiederholungen, LHR-B und LHR-C, und der C-terminalsten LHR-D, gefolgt von 2 zusätzlichen SCR, einer putativen 25-Reste-Transmembranregion und einem 43-Reste-Zytoplasmaschwanz.

[0007] Auf der Basis des reifen CR1 Moleküls mit einem vorhergesagten N-terminalen Glutaminrest, im Folgenden als Rest 1 bezeichnet, sind die ersten vier SCR-Domänen von LHR-A hierin so definiert, dass sie je-

weils aus den Resten 2–58, 63–120, 125–191 und 197–252 von reifem CR1 bestehen.

[0008] Hourcade et al., 1988, J. Exp. Med. 168: 1255–1270 beobachteten einen alternativen Polyadenylierungsort in der humanen CR1 Transkriptionseinheit, der Vorhersagen zufolge eine sekretierte Form von CR1 produzierte. Die von dieser verkürzten Sequenz kodierte mRNA umfasst die ersten 8,5 SCR von CR1 und kodiert ein Protein von etwa 80 kDa, von dem gesagt wurde, dass es die C4b Bindungsdomäne enthielt. Als eine cDNA, die dieser verkürzten Sequenz entsprach, in COS-Zellen transfiziert und exprimiert wurde, wies sie die erwartete C4b Bindungsaktivität auf, band sich jedoch nicht an C3b (Krych et al., 1989, FASEB J. 3: A368; Krych et al. Proc. Nat. Acad. Sci. 1991, 88, 4353–7). Krych et al. beobachteten auch eine der vorhergesagten ähnliche mRNA in verschiedenen humanen Zelllinien und postulierten, dass eine solche verkürzte lösliche Form von CR1 mit C4b Bindungsaktivität im Menschen synthetisiert werden kann.

[0009] Darüber hinaus haben Makrides et al. (1992, J. Biol. Chem. 267 (34) 24754–61) SCR 1 + 2 und 1 + 2 + 3 + 4 von LHR-A als membran gebundene Proteine in CHO-Zellen exprimiert.

[0010] Mehrere lösliche Fragmente von CR1 wurden auch über DNA-Rekombinationsverfahren erzeugt, indem die Transmembranregion von den exprimierten DNAs eliminiert wurde (WO 98/09220, WO 91/05047). Die löslichen CR1 Fragmente waren funktionell aktiv, banden C3b und/oder C4b und demonstrierten Faktor-I-Co-faktor-Aktivität in Abhängigkeit von den Regionen, die sie enthielten. Solche Konstrukte inhibierten in vitro komplementbezogene Funktionen wie den „oxidative burst“ der Neutrophilen, die komplementvermittelte Hä-molyse und C3a- und C5a-Produktion. Ein spezielles lösliches Konstrukt, sCR1/pBSCR1c, wies auch In-vi-vo-Aktivität in einer umgekehrten passiven Arthus-Reaktion (WO 89/09220, WO 91/05047; Yeh et al., 1991, J. Immunol. 146: 250), unterdrückte postischämische Myokardinfektion und -nekrose (WO 89/09220, WO 91105047; Weisman et al., Science, 1990, 249: 146–1511; Dupe, R. et al. Thrombosis & Haemostasis (1991) 65(6) 695.) und verlängerte Überlebensraten nach einer Transplantation auf (Pruitt & Bollinger, 1991, J. Surg. Res 50: 350; Pruitt et al., 1991 Transplantation 52; 868). Ferner resultierte die Coformulierung von sCR1/pBSCR1c mit p-anisoyliertem humanem Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex (APSAC) in einer ähnlichen antihämolytischen Aktivität wie bei sCR1 alleine, was ein Hinweis darauf war, dass die Kombination des Komplementinhibitors sCR1 mit einem thrombolytischen Agens möglich war (WO 91/05047).

[0011] In einem Modell antikörpervermittelter, demyelinisierender, experimenteller allergischer Encephalomy-elitis (ADEAE) erzielte die systemische Inhibition von CA unter Verwendung von sCR1 über 6 Tage Verbesserungen der klinischen Bewertung und blockierte die ZNS-Entzündung, Demyelinisierung und Ablagerung von Komplementkomponenten (Piddlesden et al., 1994, J. Immunol. 152, 5477). ADEAE kann als ein Modell eines akuten Rückfalls bei multipler Sklerose (MS) angesehen werden, und diese bemerkenswerten Ergebnisse legen eine mögliche Anwendung von sCR1 in der MS-Therapie nahe, trotz der hohen relativen Molekülmasse (245 Kilodalton) dieses Agens.

[0012] In einem Rattenmodell einer traumatischen Gehirnverletzung wurde demonstriert, dass der Komplementinhibitor sCR1 (BRL55730) die Myeloperoxidaseaktivität (ein Indikator für Neutrophilenakkumulation) nach einer traumatischen Verletzung reduzierte (Kaczorowska et al, 1995, J. Cerebral Blood Flow and Metabolism, 15, 860–864). Es wird nahe gelegt, dass hierdurch die Beteiligung der Komplementaktivierung in der lokalen Entzündungsreaktion demonstriert wird.

[0013] Lösliche Polypeptide, die einem Teil von CR1 entsprechen, mit funktioneller komplementinhibitorischer, einschließlich antihämolytischer, Aktivität sind in der WO94/00571 beschrieben und beinhalten der Reihe nach ein bis vier „short consensus repeats“ (SCR), ausgewählt aus SCR 1, 2, 3 und 4 der langen homologen Wiederholung (long homologous repeat) A (LHR-A) als die einzige strukturell und funktionell intakte SCR-Domäne von CR1, und schließen wenigstens SCR3 ein.

[0014] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Polypeptid bereitgestellt, das einen Teil der Sequenz der folgenden allgemeinen Formel (I) umfasst:

CNPGSGGRKVFELVGEPsiYCTSNDDQVGIWSG (I)

mit einer Länge von 6 bis 23 Aminosäuren, und umfassend Sequenz a) und/oder b):

a) GGRKVF

b) FELVGEPsiY

[0015] Die erfindungsgemäßen Peptide stammen von der Region von SCR3 von humanem CR1 zwischen den Aminosäuren C154 und G186.

[0016] Es ist zu verstehen, dass Variationen der Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen Polypeptids mittels Addition, Deletion oder konservativer Substitution von Resten, einschließlich Allelvariationen, bei denen die biologische Aktivität des Polypeptids erhalten bleibt, in der Erfindung eingeschlossen sind. Unter konservativer Substitution ist die Beibehaltung der Ladung, Hydrophobie/Hydrophilie und Größencharakteristiken der Aminosäureseitenkette zu verstehen, zum Beispiel Arginin ersetzt durch Histidin oder Lysin.

[0017] Das Polypeptid kann so modifiziert werden, dass es Cysteinreste an den C- und N-Termini hat, um ein Molekül bereitzustellen, das ein zyklisches Molekül bilden kann, das durch eine Disulfidbindung überbrückt ist. Das Peptid kann auch an bestimmten Aminosäuren verändert werden, um chemisch reaktive Aminosäuren wie Cystein zu entfernen oder solche Aminosäuren durch konservative Substitutionen wie Serin zu ersetzen.

[0018] Das Polypeptid kann chemisch reaktive Aminosäuren wie Cystein, Lysin oder Glutaminsäure an den N- oder C-terminalen Enden haben, optional weiter derivatisiert oder derivatisierbar, um einen Weg zur chemischen Verknüpfung mit anderen Peptiden oder Chemikalien bereitzustellen. Vorzugsweise ist die terminale Aminosäure Cystein und ein Derivat ist S-(2-Pyridyl)dithio.

[0019] Eine erhöhte Aktivität kann durch die Bildung multimerisierter Polypeptide erreicht werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein multimeres Polypeptid bereitgestellt, das zwei oder mehr, zum Beispiel zwei bis acht, erfindungsgemäße Polypeptide umfasst, die mit einer Kernstruktur verknüpft sind, die ein Kernpeptid oder ein multifunktionelles Molekül sein kann. Das Kernpeptid ist vorzugsweise ein Lysinderivat wie das 'MAP'-Peptid (Posnett, D.N. & Tam, J.P, Methods in Enzymology, 1989, 178, 739–746), exemplifiziert durch (lys)₄(lys)₂ lys ala, wobei das erste Lysin zwei weitere Lysine hat, die sowohl mit Alpha- als auch mit Epsilon-Aminogruppen verknüpft sind, und die beiden zweiten Lysine jeweils zwei weitere Lysine haben, so dass ein verzweigtes (dendritisches) Polymer mit acht nicht substituierten Aminogruppen erhalten wird. Weitere Beispiele für Kernstrukturen sind Tris(aminoethyl)amin und 1,2,4,5-Benzoltetracarbonsäure. Jedes Polypeptid ist mit der Kernstruktur verknüpft. Vorzugsweise ist ein Cystein-terminiertes Peptid mit der thiolreaktiven Kernstruktur verknüpft.

[0020] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein chimäres Polypeptid bereit, bei dem ein erfindungsgemäßes Polypeptid in Sequenzen eingesetzt ist oder Sequenzen substituiert, die für die Gesamtarchitektur oder den Faltungsweg eines Wirtsproteins nicht wesentlich sind.

[0021] Alternativ enthält das Wirtsprotein eine oder mehrere SCR-Wiederholung(en), wie ein SCR-haltiges Protein der Komplementkontrollproteinfamilie, zum Beispiel Faktor H, C4 Bindungsprotein, Zerfallbeschleunigungsfaktor, Membran-Cofaktorprotein oder Komplementrezeptor 2. Solche Insertionen oder Additionen können als ein Mittel zum Hinzufügen und/oder Verbessern von Anti-Komplement-Aktivität des Wirtsproteins verwendet werden. Vorzugsweise erfolgen solche Substitutionen oder Insertionen in Schleifenregionen (anhand von Sekundärstruktur-Vorhersagealgorithmen, Homologiemodellierung der Tertiärstruktur oder Sequenzanalogien vorhergesagt, die Insertionen variabler Länge vor einem ansonsten konservierten Sequenzhintergrund identifizieren) des SCR-Moduls.

[0022] Als eine weitere Alternative ist das Wirtsprotein ein Plasmaprotein und die Insertion oder Substitution kann zum Übertragen von Anti-Komplement-Aktivität zum Wirtsprotein und zum Verändern der Stabilität oder des pharmakokinetischen Verhaltens des eingefügten Polypeptids in vivo verwendet werden. Zu geeigneten Beispielen für solche Substitutionen oder Insertionen gehören solche, die in eine Oberflächenschleife einer Immunglobulin-Fc-Domäne, eine nicht komplementaritätsbestimmende Region (CDR) einer Fab-Domäne, eine turn-Region einer Kringle- oder Wachstumsfaktordomäne oder einen Beta-turn in einer 'Finger'-Domäne, wie in Fibronectin zu finden, erfolgen.

[0023] Der im Folgenden verwendete Begriff 'erfindungsgemäßes Polypeptid' bezieht sich auf Polypeptide, die von der Sequenz der allgemeinen Formel (I) abstammen, sowie auf multimerisierte Polypeptide und chimäre Polypeptide der Erfindung.

[0024] Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Polypeptids bereit, wobei das Verfahren das Exprimieren von DNA, die das genannte Polypeptid kodiert, in einer rekombinanten Wirtszelle und Gewinnen des Produkts und anschließend optional das chemische Verknüpfen des Polypeptids mit einer Kernstruktur beinhaltet.

[0025] Insbesondere kann das Verfahren die folgenden Schritte beinhalten:

- i) Präparieren eines replizierbaren Expressionsvektors, der in einer Wirtszelle das DNA-Polymer exprimie-

ren kann, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die das genannte Polypeptid kodiert;

ii) Transformieren einer Wirtszelle mit dem genannten Vektor;

iii) Kultivieren der genannten transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des genannten DNA-Polymers zulassen, um das genannte Polypeptid zu produzieren; und

iv) Gewinnen des genannten Polypeptids.

[0026] Das DNA-Polymer, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die das Polypeptid kodiert, bildet ebenfalls einen Bestandteil der Erfindung.

[0027] Das erfindungsgemäße Verfahren kann durch konventionelle Rekombinationstechniken wie die in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory manual 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) und *DNA Cloning vols I, II and III* (D. M. Glover ed. IRL Press Ltd) beschriebenen erfolgen.

[0028] Erfindungsgemäße DNA-Polymere können durch Kondensieren von geeigneten Mono-, Di- oder oligomeren Nucleotideinheiten hergestellt werden.

[0029] Die Herstellung kann nach Bedarf chemisch, enzymatisch oder durch eine Kombination der beiden Methoden, *in vitro* oder *in vivo* erfolgen. Folglich kann das DNA-Polymer durch die enzymatische Ligation geeigneter DNA-Fragmente mit konventionellen Verfahren wie die von D. M. Roberts et al. in *Biochemistry* 1985, 24, 5090–5099 beschriebenen hergestellt werden.

[0030] Die DNA-Fragmente können durch den Verdau von DNA, die die erforderlichen Sequenzen von Nucleotiden enthält, mit geeigneten Restriktionsenzymen, durch chemische Synthese, durch enzymatische Polymerisierung oder durch eine Kombination dieser Verfahren erhalten werden.

[0031] Der Verdau mit Restriktionsenzymen kann in einem geeigneten Puffer bei einer Temperatur von 20°C bis 70°C, im Allgemeinen in einem Volumen von 50 µl oder weniger mit 0,1–10 µg DNA stattfinden.

[0032] Die enzymatische Polymerisierung von DNA kann *in vitro* unter Verwendung einer DNA-Polymerase wie DNA-Polymerase 1 (Klenow-Fragment) in einem geeigneten Puffer, der nach Bedarf die Nucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthält, bei einer Temperatur von 10°C bis 37°C, im Allgemeinen in einem Volumen von 50 µl oder weniger durchgeführt werden.

[0033] Die enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten kann unter Verwendung einer DNA-Ligase wie T4 DNA-Ligase in einem geeigneten Puffer bei einer Temperatur von 4°C bis 37°C, im Allgemeinen in einem Volumen von 50 µl oder weniger durchgeführt werden.

[0034] Die chemische Synthese des DNA-Polymers oder der Fragmente kann durch konventionelle Phosphotriester-, Phosphit- oder Phosphoramidit-Chemie unter Anwendung von Festphasentechniken wie die in *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments – A Laboratory Manual'* (ed. H.G. Gassen und A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982) oder in anderen wissenschaftlichen Publikationen beschriebenen erfolgen (zum Beispiel M.J. Gait. H.W.D. Matthes M. Singh. B.S. Sproat und R.C. Titmas. *Nucleic Acids Research*. 1982, 10. 6243; B.S. Sproat und W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*. 1983, 24. 5771; M.D. Matteucci und M.H. Caruthers. *Tetrahedron Letters*. 1980. 21 719; M.D. Matteucci und M.H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 3185; S.P. Adams et al., *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661; N.D. Sinha. J. Biernat J. McMannus und H. Koester, *Nucleic Acids Research*. 1984. 12,4539; und H.W.D. Matthes et al., *EMBO journal*, 1984, 3, 801). Vorzugsweise wird ein automatisierter DNA-Synthesizer verwendet (zum Beispiel der Applied Biosystems 381A Synthesizer).

[0035] Das DNA-Polymer wird vorzugsweise durch Ligieren von zwei oder mehr DNA-Molekülen hergestellt, die zusammen eine DNA-Sequenz umfassen, die das Polypeptid kodiert.

[0036] Die DNA-Moleküle können durch den Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen von Vektoren erhalten werden, die die erforderlichen Kodierungssequenzen tragen.

[0037] Die präzise Struktur der DNA-Moleküle und die Art und Weise, in der sie erhalten werden, ist von der Struktur des gewünschten Produktes abhängig. Die Entwicklung einer geeigneten Strategie für die Konstruktion des das Polypeptid kodierenden DNA-Moleküls ist für die Fachperson eine Routineangelegenheit.

[0038] Insbesondere kann die Codon-Nutzung der jeweiligen Wirtszelle in Erwägung gezogen werden. Die

Codone können für eine starke Expression in E. coli unter Anwendung der in Devereux et al. (1984) Nucl. Acid Res. 12. 387 dargelegten Prinzipien optimiert werden.

[0039] Die Expression des das Polypeptid kodierenden DNA-Polymers in einer rekombinanten Wirtszelle kann mit einem replizierbaren Expressionsvektor erfolgen, der das DNA-Polymer in der Wirtszelle exprimieren kann. Der Expressionsvektor ist neuartig und stellt ebenfalls einen Bestandteil der Erfindung dar.

[0040] Der replizierbare Expressionsvektor kann durch Spalten eines mit der Wirtszelle kompatiblen Vektors, um ein lineares DNA-Segment mit einem intakten Replikon bereitzustellen, und Kombinieren des genannten linearen Segments mit einem oder mehreren DNA-Molekül(en), die zusammen mit dem genannten linearen Segment das Polypeptid kodieren, unter Ligationsbedingungen präpariert werden.

[0041] Die Ligation des linearen Segments und des mehr als einen DNA-Moleküls kann nach Bedarf simultan oder sequentiell erfolgen.

[0042] Folglich kann das DNA-Polymer bei Bedarf vorgeformt oder während der Konstruktion des Vektors geformt werden. Die Wahl des Vektors wird zum Teil durch die Wirtszelle bestimmt, die prokaryotisch, z.B. E. coli, oder eukaryotisch sein kann, z.B. Maus-C127-, Mausmyelom-, Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, Pilz-, z.B. faserige Pilze, oder einzellige 'Hefe'- oder Insektenzellen, wie Drosophila. Die Wirtszelle kann auch in einem transgenen Tier vorliegen. Geeignete Vektoren sind Plasmide, Bakteriophagen, Cosmide und rekombinante Viren, die beispielsweise von Baculoviren oder Vaxinia abstammen.

[0043] Das DNA-Polymer kann in Vektoren assembliert werden, die für eine Isolierung stabiler transformierter Säugetierzelllinien ausgelegt sind, die das Fragment exprimieren, z.B. Rinderpapillomvirusvektoren in Maus-C127-Zellen oder amplifizierte Vektoren in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (DNA Cloning Vol. II D.M. Glover ed. IRL Press 1985; Kaufman. R.J. et al. Molecular and Cellular Biology 5, 1750–1759, 1985; Pavlakia G.N und Hamet. D.H. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 80. 397–401. 1993; Gveddel. D.V, et al., Europäische Patentanmeldung Nr. 0093619, 1983).

[0044] Die Herstellung des replizierbaren Expressionsvektors kann konventionell mit geeigneten Enzymen zur Restriktion, Polymerisation und Ligation der DNA mit Verfahren erfolgen, die zum Beispiel in Sambrook et al. (siehe oben) beschrieben sind. Die Polymerisation und Ligation kann wie oben für die Herstellung des DNA-Polymers beschrieben durchgeführt werden. Der Verdau mit Restriktionsenzymen kann in einem geeigneten Puffer bei einer Temperatur von 20° bis 70°C, im Allgemeinen in einem Volumen von 50 µl oder weniger mit 0,1 bis 10 µg DNA stattfinden.

[0045] Die rekombinante Wirtszelle wird durch Transformieren einer Wirtszelle mit einem replizierbaren Expressionsvektor der Erfindung unter Transformationsbedingungen hergestellt. Geeignete Transformationsbedingungen sind konventionell und zum Beispiel in Sambrook et al. (siehe oben) oder "DNA Cloning" Vol. II. D.M. Glover ed.. IRL Press Ltd. 1985 beschrieben.

[0046] Die Auswahl der Transformationsbedingungen wird durch die Wirtszelle bestimmt. Folglich kann ein bakterieller Wirt wie E. coli mit einer Lösung aus CaCl₂ (Cohen et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 1973. 69. 2110) oder mit einer Lösung aus einem Gemisch von RbCl, MnCl₂, Kaliumacetat und Glycerol und dann mit 3-[N-Morpholino]-propan-sulfonsäure, RbCl und Glycerol oder durch Elektroporation wie zum Beispiel von Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalifornien, USA, Hersteller eines Elektroporators, beschrieben, behandelt werden. Säugetierzellen in Kultur können durch Kalzium-Mitfällung der Vektor-DNA auf Zellen oder durch die Verwendung kationischer Liposomen transformiert werden.

[0047] Die Erfindung erstreckt sich außerdem auf eine mit einem replizierbaren Expressionsvektor der Erfindung transformierte Wirtszelle.

[0048] Die Kultivierung der transformierten Wirtszelle unter Bedingungen, die eine Expression des DNA-Polymers zulassen, erfolgt konventionell, wie zum Beispiel in Sambrook et al. und „DNA Cloning“ (siehe oben) beschrieben ist. Folglich wird die Zelle vorzugsweise mit Nährstoffen versorgt und bei einer Temperatur unter 45°C kultiviert.

[0049] Das Proteinprodukt wird durch konventionelle Verfahren entsprechend der Wirtszelle gewonnen. Wenn die Wirtszelle ein Bakterium wie E. coli ist und das Protein wird intrazellulär exprimiert, dann kann es folglich physikalisch, chemisch oder enzymatisch lysiert und das Proteinprodukt aus dem resultierenden Lysat

isoliert werden. Stammt die Wirtszelle von einem Säugetier, dann wird das Produkt gewöhnlich aus dem Nährstoffmedium isoliert.

[0050] Wenn die Wirtszelle ein Bakterium wie E. coli ist, dann setzt das von der Kultur erhaltene Produkt möglicherweise eine Faltung für eine optimale funktionelle Aktivität voraus. Dies ist am ehesten der Fall, wenn das Protein als Einschlusskörper exprimiert wird. Es gibt eine Reihe von Aspekten des Isolations- und Faltungsprozesses, die als wichtig angesehen werden. Insbesondere wird das Polypeptid vorzugsweise vor dem Falten teilweise gereinigt, um die Bildung von Aggregaten mit kontaminierenden Proteinen zu minimieren und eine Fehlfaltung des Polypeptids zu minimieren. Folglich sind die Entfernung kontaminierender E. coli Proteine durch spezifisches Isolieren der Einschlusskörper und die nachfolgende zusätzliche Reinigung vor dem Falten wichtige Aspekte des Verfahrens.

[0051] Der Faltungsprozess findet in einer solchen Weise statt, dass eine Aggregation von Zwischenfaltungszuständen des Polypeptids minimiert wird. Daher müssen unter anderem Salztyp und -konzentration, Temperatur, Proteinkonzentration, Redoxpufferkonzentrationen und die Dauer der Faltung sorgfältig beachtet werden. Die exakten Bedingungen für jedes vorgegebene Polypeptid können im Allgemeinen nicht vorhergesagt werden und müssen im Versuch bestimmt werden.

[0052] Es gibt zahlreiche Verfahren für die Faltung von Proteinen von Einschlusskörpern, die der Fachperson bekannt sind. Die Verfahren schließen im Allgemeinen das Aufbrechen aller Disulfidbindungen im Einschlusskörper, zum Beispiel mit 50 mM 2-Mercaptoethanol, in Anwesenheit einer hohen Konzentration eines Denaturierungsmittels wie 8 M Harnstoff oder 6 M Guanidinhydrochlorid ein. Der nächste Schritt beinhaltet die Entfernung dieser Agenzien, damit eine Faltung der Proteine stattfinden kann. Die Bildung der Disulfidbrücken setzt eine Oxydationsumgebung voraus, die auf verschiedene Weisen erzeugt werden kann, zum Beispiel durch Luft oder durch die Einbeziehung eines geeigneten Redoxsystems, zum Beispiel ein Gemisch aus reduziertem und oxidiertem Glutathion.

[0053] Vorzugsweise wird der Einschlusskörper mit 8 M Harnstoff in Anwesenheit von Mercaptoethanol solubilisiert und Protein wird nach der anfänglichen Entfernung von kontaminierenden Proteinen durch die Zugabe eines kalten Puffers gefaltet. Ein bevorzugter Puffer ist 20 mM Ethanolamin, das 1 mM reduziertes Glutathion und 0,5 mM oxidiertes Glutathion enthält. Die Faltung findet vorzugsweise bei einer Temperatur im Bereich von 1 bis 5°C über einen Zeitraum von 1 bis 4 Tagen statt.

[0054] Wird eine Ausfällung oder Aggregation beobachtet, dann kann das aggregierte Protein auf verschiedene Weisen entfernt werden, wie zum Beispiel durch Zentrifugation oder durch eine Behandlung mit Präzipitanten wie Ammoniumsulfat. Werden beide dieser Verfahren übernommen, dann ist monomeres Polypeptid das hauptsächliche lösliche Produkt.

[0055] Wenn die Bakterienzelle das Protein sekretiert, dann ist eine Faltung gewöhnlich nicht erforderlich.

[0056] Alternativ kann das Polypeptid durch konventionelle Festphasenpeptidsynthese synthetisiert werden, zum Beispiel mit einem automatisierten Peptidsynthesizer und Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-Chemie auf para-Alkoxybenzylalkohol-(Wang)-Harz mit zuvor angelagerter C-terminaler Aminosäure.

[0057] Demzufolge stellt die Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt ein Verfahren zum Herstellen eines erfindungsgemäßen Polypeptids bereit, das das Kondensieren von geeigneten Peptideinheiten und anschließend optional das chemische Verknüpfen des Polypeptids mit einer Kernstruktur beinhaltet.

[0058] Bei dem multimeren Polypeptid der Erfindung sind die Polypeptide vorzugsweise mit dem Kernpeptid oder multifunktionellen Molekül über chemische brückenbildende Gruppen verknüpft, zu denen die in der EP0109653 und EP0152736 gehören. Die brückenbildende Gruppe hat im Allgemeinen die Formel:

-A-R-B- (II)

wobei A und B, die gleich oder unterschiedlich sein können, jeweils -CO-, -C(=NH₂⁺)-, Maleimido-, -S- oder eine Bindung repräsentieren und R eine Bindung oder eine Verknüpfungsgruppe ist, die eine oder mehrere -(CH₂)- oder meta- oder para-disubstituierte Phenyleinheiten enthält.

[0059] Wenn das Polypeptid und das Kernpeptid oder multifunktionelle Molekül beide ein Cystein enthalten, dann hat die chemische brückenbildende Gruppe die Form -S-S-. Die Brücke wird durch konventionelle Disul-

fid austauschchemie, durch Aktivieren eines Thiols auf dem Polypeptid und Reagieren des aktivierten Thiols mit einem freien Thiol auf der Kernstruktur erzeugt. Alternativ kann das freie Thiol auf dem Polypeptid und die aktivierte Gruppe auf der Kernstruktur vorliegen. Solche Aktivierungsverfahren setzen Disulfide ein, die stabile Thiolatanionen nach der Spaltung der S-S-Verknüpfung erzeugen und Reagenzien wie 2,2"-Dithiopyridin und 5,5"-Dithio(2-nitrobenzoesäure, DTNB) enthalten, die Intermediatmischdisulfide bilden, die mit Thiolen weiter reagieren können, um stabile Disulfidverknüpfungen zu erzeugen.

[0060] R kann Anteile enthalten, die mit Wasser interagieren, um die Wasserlöslichkeit der Verknüpfung aufrechtzuerhalten, und zu geeigneten Anteilen gehören $-\text{CO-NH-}$, $-\text{CO-NMe-}$, $-\text{S-S-}$, $-\text{CH(OH)-}$, $-\text{SO}_2-$, $-\text{CO}_2-$, $-(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_m-$ und $-\text{CH(COOH)-}$, wobei m eine ganze Zahl von 2 oder mehr ist.

[0061] Beispiele für R sind $-(\text{CH}_2)_r-$, $-(\text{CH}_2)_p-\text{S-S}-(\text{CH}_2)_q-$ und $-(\text{CH}_2)_p-\text{CH(OH)-CH(OH)-}(\text{CH}_2)_q-$, wobei r eine ganze Zahl von wenigstens 2 ist, vorzugsweise wenigstens 4, und p und q unabhängig ganze Zahlen von wenigstens 2 sind.

[0062] Die brückenbildende Gruppe der Formel (II) kann von einem Verknüpfungsgagens der Formel (III) abgeleitet werden:



wobei R_1 eine Verknüpfungsgruppe ist, die eine oder mehrere $-(\text{CH}_2)-$ Einheiten enthält, und X und Y funktionelle Gruppe sind, die mit Oberflächenaminosäuregruppen, vorzugsweise eine Lysin- oder Cysteingruppe, oder der N-terminalen Aminogruppe oder einer Proteinanlagerungsgruppe in Reaktion treten können.

[0063] Bevorzugte Agenzien sind solche, bei denen X und Y unterschiedlich sind, die als heterobifunktionelle Agenzien bekannt sind. Jedes Ende des Agensmoleküls wird wiederum mit jedem zu verknüpfenden Molekül in separaten Reaktionen zur Reaktion gebracht. Beispiele für heterobifunktionelle Agenzien der Formel (III) sind:

3-(2-Pyridyldithio)propionsäure-N-oxysuccinimidester

4-(N-Maleimido)capronsäure-N-oxysuccinimidester

3-(2-Pyridyl)methylpropionimidathydrochlorid

[0064] In jedem Fall kann Y mit einer Thiolgruppe auf einem Polypeptid in Reaktion treten, wobei es sich um ein natives Thiol oder ein solches handeln kann, das als eine Proteinanlagerungsgruppe eingeführt wird.

[0065] Die Proteinanlagerungsgruppe ist eine durch Modifikation eines Polypeptids mit einem für eine oder mehrere Aminosäureseitenketten spezifischen Reagens gewonnene Funktionalität, die eine Gruppe enthält, die mit einem spaltbaren Abschnitt auf dem anderen Molekül in Reaktion treten kann. Ein Beispiel für eine Proteinanlagerungsgruppe ist eine Thiolgruppe. Ein Beispiel für einen spaltbaren Abschnitt ist eine Disulfidbindung. Alternativ kann der spaltbare Abschnitt eine α,β -Dihydroxyfunktion umfassen.

[0066] Als ein Beispiel gestattet die Einführung einer freien Thiofunktion durch die Reaktion eines Polypeptids oder einer Kernstruktur mit 2-Iminothiolan, 3-(2-Pyridyldithio)propionsäure-N-oxysuccinimidester (mit anschließender Reduktion) oder N-Acetyl-homocysteinethiolacton die Kopplung der Proteinanlagerungsgruppe mit einer thiolreaktiven B-Struktur. Alternativ kann die Proteinanlagerungsgruppe eine thiolreaktive Entität wie die 6-Maleimidohexylgruppe oder eine 2-Pyridyldithio-Gruppe enthalten, die mit einem freien Thiol in X in Reaktion treten kann. Vorzugsweise stammt die Proteinanlagerungsgruppe von proteinmodifizierenden Agenzien wie 2-Iminothiolan, die mit Lysin- ϵ -Aminogruppen in Protein reagieren.

[0067] Wenn X eine Gruppe repräsentiert, die direkt mit der Aminosäureseitenkette eines Proteins reagieren kann, dann ist sie vorzugsweise eine N-Oxysuccinimidylgruppe. Wenn X eine Gruppe repräsentiert, die mit einer Proteinanlagerungsgruppe reagieren kann, dann ist sie vorzugsweise eine Pyridylthiogruppe.

[0068] In den obigen Verfahren findet die Modifikation eines Polypeptids zur Einführung einer Proteinanlagerungsgruppe vorzugsweise in einem wässrigen gepufferten Medium bei einem pH-Wert zwischen 3,0 und 9,0, je nach dem verwendeten Reagens, statt. Für das bevorzugte Reagens 2-Iminothiolan liegt der pH-Wert vorzugsweise bei 6,5–8,5. Die Konzentration des Polypeptids ist vorzugsweise hoch ($> 10 \text{ mg/ml}$) und das Modifikationsreagens wird in einem mäßigen (1,1–5fachen) molaren Überschuss je nach der Reaktivität des Reagens verwendet. Temperatur und Dauer der Reaktion liegen vorzugsweise bei 0°C – 40°C und 10 Minuten bis 7 Tagen. Das Ausmaß der Modifikation des Polypeptids kann durch einen Assay im Hinblick auf eingeführte

Anlagerungsgruppen bestimmt werden.

[0069] Solche Assays können standardmäßige chemische Proteintechniken sein, wie Titration mit 5,5"-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure). Vorzugsweise werden durchschnittlich 0,5 bis 3,0 Mol der Proteinanlagerungsgruppe je Mol Polypeptid eingeführt. Das modifizierte Polypeptid kann von überschüssigen Modifikationsagenzien durch Standardtechniken wie Dialyse, Ultrafiltration, Gelfiltration und Lösungsmittel- oder Salzpräzipitation getrennt werden. Das Zwischenmaterial kann in gefrorener Lösung oder lyophilisiert aufbewahrt werden.

[0070] Wenn eine Proteinanlagerungsgruppe auf diese Weise eingeführt wird, dann wird die brückenbildende Gruppe (II) in einer Reaktion des Verknüpfungsagens (III) und der Proteinanlagerungsgruppe gebildet.

[0071] Das/die zu verknüpfende Polypeptid und Kernstruktur werden getrennt mit dem Verknüpfungsagens oder dem Reagens zur Einführung einer Proteinanlagerungsgruppe zur Reaktion gebracht, indem typischerweise ein Überschuss des Reagens, gewöhnlich in einem neutralen oder mäßig alkalischen Puffer, zum Polypeptid gegeben wird und nach der Reaktion Materialien von geringer relativer Molekülmasse durch Gelfiltration oder Dialyse entfernt werden. Die präzisen Bedingungen von pH-Wert, Temperatur, Puffer und Reaktionszeit hängen von der Beschaffenheit des verwendeten Reagens und dem zu modifizierenden Polypeptid ab. Die Polypeptidverknüpfungsreaktion findet vorzugsweise durch Vermischen des modifizierten Polypeptids und der Kernstruktur in einem neutralen Puffer bei einem molaren Überschuss des Polypeptids statt, der für die Zahl reaktiver Funktionalitäten in der Kernstruktur angemessen ist. Andere Reaktionsbedingungen, z.B. Zeit und Temperatur, sollten so gewählt werden, dass der gewünschte Grad an Verknüpfung erreicht wird. Werden Thioaustauschreaktionen einbezogen, dann sollte die Reaktion vorzugsweise unter einer Stickstoffatmosphäre stattfinden. Vorzugsweise werden UV-aktive Produkte produziert (z.B. aus der Freisetzung von Pyridin-2-thion von 2-Pyridyldithioderivaten), so dass die Kopplung überwacht werden kann.

[0072] Im Anschluss an die Verknüpfungsreaktion kann das multimere Polypeptid durch eine Anzahl chromatographischer Verfahren wie Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie oder hydrophobe Interaktionschromatographie isoliert werden. Diese Verfahren können entweder Niederdruck- oder Hochleistungsvarianten sein.

[0073] Das multimere Polypeptid kann durch eine Anzahl von Techniken charakterisiert werden, einschließlich Niederdruck- oder Hochleistungsgelfiltration, SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese oder isoelektrische Fokussierung und Massenspektrometrie.

[0074] Das erfindungsgemäße Polypeptid ist zur Behandlung oder Diagnose vieler komplementvermittelter oder komplementbezogener Krankheiten und Störungen von Nutzen, die u.a. die nachfolgend aufgeführten einschließen.

Komplement involvierende Krankheiten und Störungen

Neurologische Störungen

multiple Sklerose
Hirnschlag
Guillain-Barré-Syndrom
traumatische Gehirnverletzung
Parkinsonsche Krankheit
allergische Enzephalitis
Alzheimersche Krankheit

Störungen mit unangemessener oder unerwünschter Komplementaktivierung

Hämodialysekomplikationen
hyperakute Allograftabstoßung
Xenograftabstoßung
Hornhauttransplantatabstoßung
Interleukin-2-induzierte Toxizität während der IL-2- Therapie
paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Entzündliche Störungen

Inflammation von Autoimmunkrankheiten
Crohnsche Krankheit
Atemnotsyndrom des Erwachsenen
thermische Verletzung, einschließlich Verbrennungen oder
Erfrierungen
Uveitis
Psoriasis
Asthma
akute Pankreatitis
Gefäßentzündungskrankheiten wie die Kawasaki-Krankheit

Postischämische Reperfusionzustände

Myokardinfarzierung
Ballon-Angioplastik
Atherosklerose (cholesterolinduziert) & Restenose
Hypertension
Postpump-Syndrom bei kardiopulmonalem Bypass oder renale Hämodialyse, renaler Ischämie,
Intestinalischämie

Immunkomplexstörungen und Autoimmunkrankheiten

Rheumatoidarthritis
Systemischer Lupus erythematosus (SLE)
SLE-Nephritis
proliferative Nephritis
Glomerulonephritis
Hämolyseanämie
Myasthenia gravis

Infektionskrankheiten oder Sepsis

multipler Organausfall
septischer Schock

Reproduktionsstörungen

antikörper- oder komplementvermittelte Unfruchtbarkeit

Wundheilung und Vorbeugung gegen Narbenbildung

[0075] Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen Polypeptids wie oben definiert und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Exzipient umfasst.

[0076] Die Erfindung stellt außerdem ein erfindungsgemäßes Polypeptid zur Verwendung als eine aktive therapeutische Substanz und zur Verwendung für die Behandlung einer Krankheit oder Störung in Verbindung mit einer Entzündung oder unangemessenen Komplementaktivierung bereit.

[0077] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Krankheit oder Störung in Verbindung mit einer Entzündung oder unangemessenen Komplementaktivierung vor.

[0078] Mit Bezug auf die vorliegende Erfindung ist der Empfänger jeder beliebigen Behandlung ein menschliches oder nicht menschliches Säugetier, vorzugsweise ein Mensch.

[0079] Eine zur Behandlung einer Krankheit oder Störung wirksame Menge des Polypeptids liegt im Bereich von 0,01 bis 100 mg/kg, vorzugsweise bei 0,1 mg bis 10 mg/kg.

[0080] Zur Verabreichung sollte das Polypeptid zu einer angemessenen pharmazeutischen oder therapeutischen Zusammensetzung formuliert werden. Ein solche Zusammensetzung enthält typischerweise eine therapeutisch aktive Menge des Polypeptids und einen pharmazeutisch akzeptablen Exzipient oder Träger wie Salzlösung, gepufferte Salzlösung, Dextrose oder Wasser. Die Zusammensetzungen können auch spezifische Stabilisierungsmittel wie Zucker, einschließlich Mannose und Mannitol, und lokale Anästhetika für injizierbare Zusammensetzungen, einschließlich beispielsweise Lidocain, enthalten.

[0081] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung eines thrombotischen Zustands, insbesondere akute Myokardinfarzierung, bei einem Patienten vor, der eine solche Behandlung benötigt. Das Medikament kann eine effektive Menge eines erfindungsgemäßen Polypeptids und eine effektive Menge eines thrombolytischen Mittels umfassen. Das Medikament kann gemäß den in der WO 91/05047 beschriebenen Verfahren und Verwendungsmöglichkeiten eingesetzt werden.

[0082] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS) bei einem Patienten vor, der eine solche Behandlung benötigt.

[0083] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikamentes zur Verzögerung einer hyperakuten Allograft- oder hyperakuten Xenograftabstoßung bei einem eine solche Behandlung benötigenden Patienten vor, der ein Transplantat erhält. Die Verabreichung kann an den Patienten oder das Transplantat vor der Implantation erfolgen.

[0084] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Wunden bei einem Patienten vor, der eine solche Behandlung benötigt. Das Medikament kann entweder topisch oder parenteral, z.B. intravenös, verabreicht werden.

[0085] Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit vor. Die vorliegende Erfindung sieht außerdem die Verwendung des Polypeptids in der Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von entzündlichen ZNS-Störungen vor, wie zum Beispiel solche, die mit einem ischämischen Hirnschlag zusammenhängenden.

VERFAHREN

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

[0086] Vorgegossene Novex-Gele (4–20 %) wurden von British Biotechnology erworben und in Xcell II Elektrophoresezellen gemäß Herstelleranweisungen verwendet.

Peptidsynthese

[0087] Peptide wurden durch die Festphasentechnik unter Verwendung eines Applied Biosystems 430A Peptidsynthesizers und Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-Chemie auf para-Alkoxybenzylalkohol-(Wang)-Harz mit zuvor angelagerter C-terminaler Aminosäure synthetisiert. Das Harz wurde mit Benzoesäureanhydrid (2 mmol) in Anwesenheit von N,N-Dicyclohexylcarbodiimid (1 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (0,04 mmol) in N-Methylpyrrolidon (NMP) und N,N-Dimethylformamid (DMF) behandelt, um jegliche restlichen freien Hydroxylgruppen vor der Kettenverlängerung zu blockieren. Jeder Einfachkopplungszyklus bestand aus den folgenden Schritten: 1. das Harz wurde mit NMP (1×) gewaschen; 2. Fmoc-Schutzaufhebung erfolgte mit zwei aufeinander folgenden Behandlungen (3 min und 15 min) des Harzes mit einer Lösung aus Piperidin in NMP (Ausgangskonzentration 20 % v/v); 3. das Harz wurde mit NMP gewaschen (5×); 4. das Harz wurde mit einer Lösung der zuvor aktivierten Aminosäure (1 mmol) in NMP und DMF gekoppelt (60 min); 5. das Harz wurde mit NMP (7×) gewaschen. Im Falle eines Zweifachkopplungszyklus wurden die Schritte 4 und 5 zweimal durchgeführt. Fmoc-Aminosäuren (1 mmol) wurden zuvor mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) (1 mmol) in Anwesenheit von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (1 mmol) und N,N-Diisopropylethylamin (DIEA) (2 mmol) 6 bis 12 min lang aktiviert. Nach der Kettenverlängerung wurde die Fmoc-Gruppe entfernt. Der verwendete Seitenkettenschutz war 2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl (PMC) für Arginin, Trityl für Asparagin, Glutamin und Cystein, tert-Butyloxycarbonyl für Lysin und Tryptophan und tert-Butyl für Serin, Threonin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Alle Reste wurden zweifach gekoppelt, sofern nicht anders angegeben.

Spaltung vom Harz

[0088] Das eisgekühlte Peptidylharz wurde mit eisgekühltem Spaltungsgemisch A oder B (10 ml) behandelt und 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde filtriert und das Filtrat wurde in vacuo auf ein geringes Lösungsvolumen (3 bis 5 ml) verdampft. Dieses wurde in vacuo mit trockenem Toluol (2 ×) azeotrop behandelt und das restliche Öl wurde mit trockenem Diethylether (3 × 50 ml) trituriert, um ein weißes Präzipitat zu erhalten. Dieses wurde aufgefangen und in vacuo getrocknet, um jegliche Spuren von Diethylether vor der Lyophilisation von verdünnter wässriger Essigsäure zu entfernen. Die verwendeten Spaltungsgemische waren A: TFA/Wasser/Thioanisol/1,2-Ethandithiol (EDT)/Phenol (88,9 4,4 : 4,4 : 2,2 : 6,7 v/v/v/v/w); B: TFA/Wasser/EDT (75 : 5 20 v/v/v).

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

[0089] Trennungen erfolgten mit einem Gilson Gradientsystem mit einem Nachweis bei 220 nm. Eine analytische HPLC wurde auf einer Spherisorb C-18 Säule (25 cm × 4,6 mm ID), Elution bei 1 ml/min, durchgeführt, und eine präparative HPLC fand auf einer Spherisorb C-8 Säule (25 cm × 10 mm ID), Elution bei 4 ml/min, sofern nicht anders angegeben, mit den Elutionsmitteln A = 0,1 % wässriges TFA und B = Acetonitril statt. Die verwendeten Gradienten waren A: isokratische Elution für 5 min mit 10 % B, gefolgt von 45 min linearem Gradient auf 60 % B; B: isokratische Elution für 5 min mit 10 % B, gefolgt von 45 min linearem Gradient auf 80 % B; C: isokratische Elution für 5 min mit 10 % B, gefolgt von 50 min linearem Gradient auf 50 % B; D: isokratische Elution für 1 min mit 10 % B, gefolgt von 30 min linearem Gradient auf 80 % B; E: isokratische Elution für 5 min mit 15 % B, gefolgt von 60 min linearem Gradient auf 30 % B; F: isokratische Elution für 1 min mit 30 % B, gefolgt von 30 min linearem Gradient auf 40 % B; G: isokratische Elution für 5 min mit 10 % B, gefolgt von 60 min linearem Gradient auf 40 % B; H: isokratische Elution für 5 min mit 1 % B, gefolgt von 60 min linearem Gradient auf 35 % B; I: isokratische Elution für 5 min mit 5 % B, gefolgt von 60 min linearem Gradient auf 30 % B; J: isokratische Elution für 1 min mit 20 % B, gefolgt von 30 min linearem Gradient auf 30 % B.

BEISPIELE

[0090] Die Nummerierung der Peptidreste entspricht der von humanem CD35 (C3b/C4b Rezeptor, CR1) (Klickstein et al., 1987, J. Exp. Med. 165: 1095–1112; Klickstein et al., 1988, J. Exp. Med 168: 1699–1717; Hourcade et al., 1988, J. Exp. Med. 168: 1255–1270). Mit dieser Nummerierung ist SCR3 von LHR-A R122-KI96:

Arg Ile Pro Cys Gly Leu Pro Pro Thr Ile Thr Asn Gly Asp Phe
122 130

Ile Ser Thr Asn Arg Glu Asn Phe His Tyr Gly Ser Val Val Thr Tyr
140 150

Arg Cys Asn Pro Gly Ser Gly Gly Arg Lys Val Phe Glu Leu Val Gly
160

Glu Pro Ser Ile Tyr Cys Thr Ser Asn Asp Asp Gln Val Gly Ile Trp
170 180

Ser Gly Pro Ala Pro Gln Cys Ile Ile Pro Asn Lys
190 196

[0091] Peptidsequenzen werden konventionell mit den N-terminalen Resten auf der linken Seite präsentiert.

BEISPIEL 1: C154-C174 (E1a lineares Peptid (SEQ ID Nr. 1), E1b zyklisches Peptid (SEQ ID Nr. 2))

CNPGSGGRKVFELVGEPSIYC (E1)

[0092] E1 enthält Sequenz, die die Reste C154-C174 von reifem humanem CR1 umfasst, die dem zweiten und dritten Cystein von SCR3 entsprechen. Diese beiden Cysteine bilden normalerweise kein Disulfid in Wild-

typ-CR1, da C154 ein Paar mit C191 und C174 mit C125 bildet.

1a Synthese von E1

[0093] Eine stufenweise Assemblierung von Fmoc-Cys(Trt)-Harz (0,20 g; 0,10 mmol) brachte das 21-Res-te-Peptidylharz mit entfernter N-terminaler Fmoc-Gruppe hervor (0,57 g). Das Peptidylharz (0,28 g) wurde unter Verwendung des Gemischs A gespalten, um einen Rohfeststoff (0,14 g) nach der Lyophilisation zu erhalten. Das Rohprodukt wurde durch Gelfiltration über Sephadex G25 (Säule 83 cm × 2,5 cm ID; Nachweis bei 220 nm) unter Verwendung von 1 M wässriger Essigsäure als Elutionsmittel gereinigt. Das Peptid eluierte als ein einzelner Peak, der in sechs Fraktionen unterteilt wurde (kombiniertes Gewicht 0,082 g; 49 %): A (11 mg), B (22 mg), C (17 mg), D (24 mg), E (4 mg) und F (4 mg).

1b Charakterisierung von E1

[0094] Eine HPLC-Analyse unter Verwendung von Gradient F ergab die Anwesenheit von drei Peaks mit Retentionszeiten von 17,8 min (Peak 1), 18,6 min (Peak 2) und 19,8 min (Peak 3) in jeder Fraktion in den folgenden Anteilen:

Fraktion	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Früher eluierendes Material
A	6	15	61	18
B	15	11	61	13
C	36	14	50	-
D	49	16	35	-
E	72	20	8	-
F	54	14	6	26

[0095] Durch eine Behandlung mit Dithiothreitol (DTT) und Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde jeweils gezeigt, dass Peak 1 und 3 jeweils eine reduzierte und oxydierte Form des Peptids waren. Peak 2 war eine unbekannte Kontaminante, die weder durch DTT noch durch DMSO beeinflusst wurde. Eine wässrige Lösung der Fraktion B (pH 7,5) wurde mit einem Überschuss an DTT behandelt; eine HPLC nach 6 h mit Gradient F zeigte, dass Peak 1 zunahm, wohingegen Peak 3 abnahm. Die Fraktion B wurde mit einer wässrigen Lösung von DMSO (20 % v/v) behandelt; eine HPLC nach 11 h mit Gradient F zeigte, dass Peak 1 verschwand, wohingegen Peak 3 zunahm. Eine wässrige Lösung der Fraktion E (pH 7,5) wurde mit einem Überschuss an DTT behandelt; eine HPLC nach 5,8 h mit Gradient F zeigte, dass Peak 3 verschwand, wohingegen Peak 1 zunahm. Die Fraktion E wurde mit einer wässrigen Lösung von DMSO (20 % v/v) behandelt; eine HPLC nach 12 h mit Gradient F zeigte, dass Peak 1 verschwand, wohingegen Peak 3 zunahm.

[0096] Eine Elektrospraymassenspektrometrie erbrachte den Beweis, dass Peak 1 und 3 jeweils lineare (E1a) und zyklische (E1b) Formen des Peptids waren.

Fraktion A lieferte Ionen entsprechend $[M + 2H]^{2+}$ bei m/z 1105,8 (rel. Intensität 53 %, dekonvolviert entspricht MW 2209,6, berechnet für zyklische Form 2209,0), m/z 1106,3 (66 %, 2210,6) und m/z 1106,8 (53 %, 2211,6, berechnet für lineare Form 2210,0).

Fraktion C lieferte Ionen entsprechend $[M + 2H]^{2+}$ bei m/z 1105,8 (41 %, 2209,6), m/z 1106,4 (66 %, 2210,8), m/z 1106,9 (100 %, 2211,8), m/z 1107,3 (98 %, 2212,6) und m/z 1107,8 (75 %, 2213,6).

Fraktion F lieferte Ionen entsprechend $[M + 2H]^{2+}$ bei m/z 1106,8 (98 %, 2210,6), m/z 1107,3 (99 %, 2212,6) und m/z 1107,7 (83 %, 2213,4).

Aminosäureanalyse: Fraktion A: Asx 1,0 (theoretisch), Glu 2,4 (2), Ser 2,3 (2), Gly 4,2 (4), Arg 1,3 (1), Pro 2,2 (2), Tyr 0,9 (1), Val 1,5 (2), Cys 1,1 (2), Ile 1,1 (1), Leu 1,3 (1), Phe 0,1 (1), Lys 1,7 (1). Fraktion C: Asx 1,1, Glu 2,5, Ser 2,1, Gly 4,0, Arg 1,2, Pro 2,1, Tyr 1,0, Val 1,6, Cys 1,1, Ile 1,1, Leu 1,3, Phe 0,1, Lys 1,8.

Fraktion F: Asx 1,1, Glu 2,4, Ser 2,3, Gly 4,1, Arg 1,2, Pro 2,4, Tyr 1,1, Val 1,4, Cys 0,9, Ile 1,3, Leu 1,1, Phe 0,1, Lys 1,6. (Hinweis: Cys teilweise zerstört und Val-Phe-Bindung nur teilweise hydrolysiert nach Säurehydrolyse).

BEISPIEL 2: S158-C174 (E2, SEQ ID Nr. 3)

SGGRKVFELVGEPSIYC (E2)

[0097] Dieses Peptid umfasst die Sequenz von reifem humanem CR1 S158 bis C174.

2a Synthese von E2

[0098] Eine stufenweise Assemblierung von Fmoc-Cys(Trt)-Harz (0,49 g; 0,25 mmol) brachte das 17-Reste-Peptidylharz mit entfernter N-terminaler Fmoc-Gruppe (1,03 g) hervor. Die Reste Ser¹, Gly^{2,11}, Phe, Glu^{8,12} and Pro¹³ waren einfach gekoppelt. Das Peptidylharz (0,51 g) wurde mit dem Gemisch A gespalten, um einen Rohfeststoff (0,22 g) nach der Lyophilisation zu erhalten. Eine Reinigung von 0,072 g durch präparative HPLC mit den Gradienten A, B und C brachte einen gereinigten Feststoff hervor (0,048 g; 66 %).

2b Charakterisierung von E2

[0099] Gemäß einer analytischen HPLC war das Produkt zu > 95 rein und hatte eine Retentionszeit von 18,6 min unter Verwendung von Gradient D. Seine Identität wurde durch die Beobachtung eines $[M + H]^+$ Ions im FAB Massenspektrum bei m/z 1842 und durch eine Aminosäureanalyse von Glx 1,97 (theoretisch 2), Ser 1,86 (2), Gly 2,85 (3), Arg 1,13 (1), Pro 1,08 (1), Tyr 0,94 (1), Val 1,82 (2), Ile 0,99 (1), Leu 1,12 (1), Phe 1,11 (1), Lys 1,14 (1) verifiziert. (Cys wurde aufgrund seiner Zerstörung bei der Säurehydrolyse nicht berechnet).

BEISPIEL 3: Multiple-Antigenpeptid-(MAP)-E2-Konjugat (E3)

[0100] Zum Potenzieren der Aktivität von S158–C174 (E2) wurden mehrere Bindungsstellen durch Vernetzen von E2 mit einem Lysinkernrest erzeugt.

3a Derivatisierung des MAP-Peptids

(i) N-(2-Pyridyl)dithiopropionyl MAP

[0101] MAP-Peptid (Struktur $(Lys)_4(Lys)_2Ala-OH$) wurde von Peptide and Protein Research, Exeter, UK erworben. Das Peptid (9,8 mg, 10 Mikromol) wurde in einem Gemisch aus trockenem Dimethylsulfoxid (DMSO, 100 Mikroliter) und trockenem Pyridin von ACS-Qualität (200 Mikroliter) gelöst, in dem 3-(2-Pyridyl)dithiopropionsäure-N-oxysuccinimidester (Pharmacia, 25 mg, 80 Mikromol, 1 Mol äquivalent zu freien Aminogruppen im MAP-Peptid) gelöst worden war. Die klare Lösung wurde über Nacht (15 h) bei Umgebungstemperatur (~22°C) vorsichtig gerührt und dann bei -80°C gelagert.

(ii) Konjugation mit E2

[0102] Peptid E2 (wie oben, 7,4 mg, 4 Mikromol) wurde in einem Gemisch aus trockenem DMSO (180 Mikroliter) und trockenem Pyridin von ACS-Qualität (90 Mikroliter) gelöst und das obige PDP-MAP (15 Mikroliter der Lösung, ~0,5 Mikromol, ~4 Mikromol PDP-äquivalent) wurde zugegeben. Das Gemisch wurde unter trockenem Stickstoff 6 h lang bei Umgebungstemperatur gerührt und es wurde eine leicht gelbe Farbe bemerkt. Anschließend wurde es mit 20 mM Ammoniumbicarbonat, pH 7,4, bei 4°C auf ein Endvolumen von 1,5 ml verdünnt. Die leicht trübe Lösung wurde auf eine 1 × 10 cm Sephadex G-25m Säule aufgebracht, äquilibriert und eluiert mit dem Ammoniumbicarbonatpuffer bei 4°C. Zwischen 2,5 und 5,5 ml, 5,5 und 7,5 ml und 7,5 und 9,0 ml eluierende Fraktionen wurden aufgefangen und lyophilisiert. Lediglich die erste davon enthielt einen messbaren Feststoff als ein weißes Pulver (etwa 14 mg).

3b Charakterisierung des Map-E2-Konjugats

[0103] Die Elutionsposition des Konjugats auf der Sephadex G-25 Säule legte eine effektive relative Molekülmasse von ~10.000 nahe. Dies entspricht mindestens 4 E2 Einheiten Disulfid verknüpft mit MAP (theoretisch M_r 9910). Die maximale Substitution ist 8 Einheiten/MAP (theoretisch M_r 17.750).

BEISPIEL 4: C-(G159-F164)-C (E4, SEQ ID Nr. 4)

CGGRKVFC (E4)

[0104] Diese Sequenz umfasst die Reste G159–F164 von reifem humanem CR1. Um eine Zirkularisierung zu ermöglichen, wurde Cystein den N- und C-terminalen Enden des Peptids zugegeben.

4a Synthese von E4

[0105] Eine schrittweise Assemblierung von Fmoc-Cys(Trt)-Harz (0,49 g; 0,25 mmol) brachte das 8-Reste-Peptidylharz mit entfernter N-terminaler Fmoc-Gruppe hervor (0,74 g). Die Reste Gly^{2,3} waren einfach gekoppelt. Das Peptidylharz (0,68 g) wurde unter Verwendung des Gemischs A gespalten, um einen Rohfeststoff (0,22 g) nach der Lyophilisation zu erhalten. Eine Reinigung durch präparative HPLC mit den Gradienten G, H und I brachte einen gereinigten Feststoff hervor (0,017 g; 8,6 %).

4b Charakterisierung von E4

[0106] Gemäß analytischer HPLC war das Produkt zu > 90 rein und hatte eine Retentionszeit von 14,6 min mit Gradient J. Durch eine Behandlung mit DTT und DMSO wurde gezeigt, dass das Produkt in einer oxydierten Form vorlag. Eine wässrige Lösung des Produkts (pH 7,5) wurde mit einem Überschuss an DTT behandelt; eine HPLC nach 2,3 h mit Gradient J zeigte, dass der Peak bei RT 14,6 min abnahm, wohingegen ein neuer Peak bei RT 15,0 min erschien. Das Produkt wurde mit einer wässrigen Lösung von DMSO (20 v/v) behandelt; eine HPLC nach 1,3 h mit Gradient J zeigte keine Veränderung. Seine Identität als das zyklische Peptid wurde durch die Beobachtung eines $[M + H]^+$ Ions im FAB Massenspektrum bei m/z 868 verifiziert.

BEISPIEL 5: F164–G186 (C174S) (E5, SEQ ID Nr. 5)

FELVGPSIYSTSNDDQVGIWSG (E5)

[0107] Dieses Peptid umfasst die Reste F164–G186 von reifem humanem CR1. C174 wurde durch Serin substituiert.

5a Synthese von E5

[0108] Eine schrittweise Assemblierung von Fmoc-Gly-Harz (0,14 g; 0,10 mmol) brachte das 23-Reste-Peptidylharz mit entfernter N-terminaler Fmoc-Gruppe hervor (0,51 g). Die Reste Phe¹, Glu², Gly⁵, Pro, Tyr¹⁰, Ser^{13,22}, Asn¹⁴ und Asp^{15,16} waren einfach gekoppelt. Das Peptidylharz (0,24 g) wurde unter Verwendung des Gemischs B gespalten, um einen Rohfeststoff (0,14 g) nach der Lyophilisation zu erhalten. Eine Reinigung durch präparative HPLC auf einer Spherisorb C-18 Säule (25 cm × 4,6 mm ID) mit Gradient E brachte einen gereinigten Feststoff hervor (0,0039 g; 3,3 %).

5b Charakterisierung von E5

[0109] Gemäß einer analytischen HPLC war das Produkt zu > 90 rein und hatte eine Retentionszeit von 12,2 min mit Gradient F. Seine Identität wurde durch die Beobachtung eines $[M + H]^+$ Ions im FAB Massenspektrum bei m/z 2501 und durch eine Aminosäureanalyse von Asx 2,91 (theoretisch 3), Glx 3,01 (3), Ser 3,99 (4), Gly 2,88 (3), Thr 1,07 (1), Pro 1,05 (1), Tyr 0,87 (1), Val 2,47 (2), Ile 1,75 (2), Leu 0,97 (1), Phe 1,00 (1) verifiziert. (Trp wurde aufgrund seiner Zerstörung bei der Säurehydrolyse nicht berechnet).

BIOLOGISCHE AKTIVITÄT

Anti-Komplementaktivität gemessen durch die Hämolyse von Schaferythrozyten

[0110] Die funktionelle Aktivität von Komplementinhibitoren wurde durch Messen der Inhibition der komplementvermittelten Lyse von Schaferythrozyten gemessen, die mit Kaninchenantikörpern (von Diamedix Corporation, Miami, USA bezogen) sensibilisiert wurden. In 0,1 M HEPES, pH 7,4/0,15 M NaCl-Puffer 1/125 verdünntes Humanserum war die Komplementquelle und wurde aus einem Pool Freiwilliger im Wesentlichen wie in (Dacie & Lewis 1975) beschrieben präpariert. Kurz, Blut wurde 5 Minuten lang auf 37°C erwärmt, das Gerinnsel wurde entfernt und das verbleibende Serum wurde durch Zentrifugation geklärt. Die Serumfraktion wurde in kleine aliquote Teile unterteilt und bei -196°C aufbewahrt. Aliquote Teile wurden nach Bedarf aufgetaut und in HEPES-Puffer unmittelbar vor dem Gebrauch verdünnt. Wo angebracht, wurde Stickstoffgas oder Heliumgas durch den Puffer etwa 30 Minuten lang durchperlen gelassen, woraufhin die den Puffer enthaltene Flasche verstopft wurde.

[0111] Die Inhibition der komplementvermittelten Lyse sensibilisierter Schaferythrozyten wurde mit einem standardmäßigen Hämolyseassay unter Verwendung eines V-Boden-Mikrotiterplattenformats wie folgt gemessen, im Wesentlichen wie von Weisman et al (1990) Science 249 146–151 beschrieben.

[0112] 50 µl eines Bereichs von Konzentrationen eines in HEPES-Puffer verdünnten Inhibitors wurden mit 50 µl des 1/125 inkubiert. 100 µl von zuvor erwärmten sensibilisierten Schaferythrozyten wurden zugegeben und Proben wurden 1 Stunde lang bei 37°C in einem endgültigen Reaktionsvolumen von 200 µl inkubiert. Proben wurden bei 300 g bei 4°C 15 Minuten lang geschleudert und anschließend wurden 150 µl Überstand in Flachboden-Mikrotiterplatten gegeben und die Absorption wurde bei 410 nm bestimmt, wodurch die Lysemenge in jeder Testlösung reflektiert wird. Die Maximallyse wurde durch Inkubieren von Serum mit Erythrozyten ohne jeglichen Inhibitor (E + S) bestimmt, wovon der Anteil der Hintergrundlyse subtrahiert worden war (ermittelt durch Inkubieren von Erythrozyten mit Puffer (E)). Die Hintergrundlyse durch den Inhibitor wurde durch Inkubieren des Inhibitors mit Erythrozyten (E + I) und dann Subtrahieren des Ergebnisses von den Testproben beurteilt (E + I + S). Die Inhibition wurde als ein Bruchteil der gesamten Zellyse ausgedrückt, so dass IH50 die Konzentration des Inhibitors darstellt, die für eine 50%ige Inhibition der Lyse benötigt wird.

Maximallyse: $A_{max} = (E + S) - (E)$

Lyse mit Inhibitor: $A_o = (E + I + S) - (E + I)$

$$\text{Grad der Inhibition: IH} = \frac{A_{max} - A_o}{A_{max}}$$

Ergebnisse

[0113] E1 Die Peptide von jeder Fraktion wurden in 0,1 M HEPES, pH 7,4/0,15 M NaCl Puffer resuspendiert, der unter N₂ gehalten wurde, um Sauerstoff zu entfernen und den Grad der Oxydation für zyklische Peptide zu begrenzen. Die Peptide wurden direkt im Hinblick auf Anti-Komplement-(antihämolytische)-Aktivität geprüft; die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 1 enthalten.

Peptid	Peak 1 % linear	Peak 2 % zirkulär	IH50 µM	
			Assay 1	Assay 2
E1 Fraktion A	6	61	200	160
E1 Fraktion B	15	61	600	
E1 Fraktion C	36	50	100	
E1 Fraktion D	49	35	75	90
E1 Fraktion E	72	8	40	

[0114] Anhand der Daten ist erkennbar, dass dieses Peptid antihämolytische Aktivität aufweist, wobei eine zunehmende Potenz mit einer Zunahme des Anteils des linearen Peptids (E1a) korreliert. Bei der Bildung des zyklischen Peptids (E1b) wird ein Disulfid zwischen zwei Resten gebildet, die normalerweise in der nativen SCR nicht gepaart sind, wodurch das Peptid möglicherweise in einer ungünstigen Struktur eingeschränkt wird.

[0115] E2 Das Peptid wurde mit unter N₂ gehaltenem Puffer wie oben beschrieben geprüft. Es fanden drei separate Assays statt, deren Ergebnisse einen durchschnittlichen IH50 von ~670 µM lieferten.

[0116] E3 Anhand SDS-PAGE wurde der Mr des konjugierten Peptids auf ~8000 Da geschätzt. Der IH50 des MAP-Peptids alleine lag bei etwa 2000 µM und für nicht konjugiertes E2 bei etwa 600 µM. Konjugat E3 lieferte einen IH50 von etwa 13 µM, was auf eine 46fache Verbesserung der Aktivität durch Multimerisieren der Orte hinwies.

[0117] E4 Das Peptid wurde in 0,1 M HEPES, pH 7,4/0,15 M NaCl Puffer resuspendiert, der unter N₂ gehalten worden war, um Sauerstoff zu entfernen und den Grad der Oxydation für zyklisches Peptid zu begrenzen. Das Peptid hatte einen IH50 von etwa 300 µM.

[0118] E5 Das Peptid wurde in 0,1 M HEPES, pH 7,4/0,15 M NaCl resuspendiert. Die Aktivität des Peptids wurde bei etwa 80 µM bestimmt.

Sequenzaufzählung

SEQ ID Nr. 1 lineares CNPGSGGRKVFELVGEPSIYC (E1a)

SEQ ID Nr. 2 S-S-verknüpftes zyklisches
CNPGSGGRKVFELVGEPSIYC (E1b)

SEQ ID Nr. 3 SGGRKVFELVGEPsiYc (E2)

SEQ ID Nr. 4 CGGRKVFC (E4)

SEQ ID Nr. 5 FELVGEPsiYSTSNDDQVGiWsg (E5)

Patentansprüche

1. Polypeptid, das einen Teil der Sequenz der folgenden allgemeinen Formel (I) umfasst:

CNPGSGGRKVFELVGEPsiXCTSNDDQVGiWsg (1)

mit einer Länge von 6 bis 23 Aminosäuren, und umfassend eine Sequenz a) und/oder b):

a) GGRKVF

b) FELVGEPsiY

2. Polypeptid nach Anspruch 1, das Cystein-Reste an den C- und N-Termini umfasst, um ein Molekül bereitzustellen, das ein zyklisches Molekül bilden kann, das durch eine Disulfidbindung überbrückt ist.

3. Polypeptid nach Anspruch 1 mit chemisch reaktiven Aminosäuren an den N- oder C-terminalen Enden, optional weiter derivatisiert oder derivatisierbar, um einen Weg zur chemischen Verknüpfung mit anderen Peptiden oder Chemikalien bereitzustellen.

4. Polypeptid nach Anspruch 3, wobei die terminale Aminosäure Cystein und das Derivat S-(2-Pyridyl)dithio ist.

5. Polypeptid nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei ein oder mehrere Cystein-Rest(e) durch Serin ersetzt ist/sind.

6. Polypeptid nach Anspruch 5, wobei die Sequenz YCT durch die Sequenz YST ersetzt ist.

7. Multimeres Polypeptid, das zwei oder mehr Polypeptide nach einem der vorherigen Ansprüche umfasst, die mit einer Kernstruktur verknüpft sind.

8. Multimeres Polypeptid nach Anspruch 7, wobei die Kernstruktur ein Lysinderivat ist.

9. Multimeres Polypeptid nach Anspruch 8, wobei die Kernstruktur $(lys)_4(lys)_2 lys ala$ oder Tris(aminoethyl)amin und 1,2,4,5 Benzoltetracarbonsäure ist.

10. Multimeres Polypeptid nach Anspruch 7 oder 8 mit zwei bis acht Polypeptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

11. Chimäres Polypeptid, bei dem ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 in Sequenzen eingesetzt ist oder diese substituiert, die für die Gesamtarchitektur oder den Faltungsweg eines Wirtsproteins nicht wesentlich sind.

12. Chimäres Polypeptid nach Anspruch 11, bei dem das Wirtsprotein eine oder mehrere SCR-Wiederholung(en) enthält.

13. Chimäres Polypeptid nach Anspruch 11, wobei das Wirtsprotein ein Plasmaprotein ist.

14. Polypeptid nach Anspruch 1, das aus Folgendem ausgewählt ist:

lineares CNPGSGGRKVFELVGEPsiYc

S-S-verknüpftes, zyklisches CNPGSGGRKVFELVGEPsiYc

SGGRKVFELVGEPsiYc

CGGRKVFC

FELVGEPsiYSTSNDDQVGiWsg

15. Multimeres Polypeptid nach Anspruch 7, das $(Lys)_4(Lys)_2 Ala-OH$ ist, verknüpft durch N-(ϵ -Thiopropionyl)-Linker, die disulfidgebunden sind an Cysteinthiol des Peptids
SGGRKVFELVGEPsiYc

16. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids nach einem der vorangehenden Ansprüche, das das Kon-

densieren von geeigneten Peptideinheiten und anschließend optional das chemische Verknüpfen des Polypeptids mit einer Kernstruktur beinhaltet.

17. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Verfahren das Exprimieren von DNA, die das genannte Polypeptid kodiert, in einer rekombinanten Wirtszelle und Gewinnen des Produkts und anschließend optional das chemische Verknüpfen des Polypeptids mit einer Kernstruktur beinhaltet.

18. DNA-Polymer, das eine Nucleotidsequenz umfasst, die das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder 11 bis 13 kodiert.

19. Replizierbarer Expressionsvektor, der in einer Wirtszelle das DNA-Polymer aus Anspruch 18 exprimieren kann.

20. Wirtszelle, die mit einem replizierbaren Expressionsvektor nach Anspruch 19 transformiert ist.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger oder Exzipient umfasst.

22. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Verwendung als eine aktive therapeutische Substanz.

23. Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Verwendung bei der Behandlung einer Krankheit oder Störung, die mit einer Entzündung oder unangebrachten Komplementaktivierung zusammenhängt.

24. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung einer Krankheit oder Störung, die mit einer Entzündung oder unangebrachten Komplementaktivierung zusammenhängt.

25. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 und einer wirksamen Menge eines thrombolytischen Mittels zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung eines thrombotischen Zustands.

26. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung des Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS).

27. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikaments zur Verzögerung einer hyperakuten Allograft- oder hyperakuten Xenograftabstoßung.

28. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Wunden.

29. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung der Alzheimerschen Krankheit.

30. Verwendung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1 bis 15 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von entzündlichen ZNS-Störungen.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen