



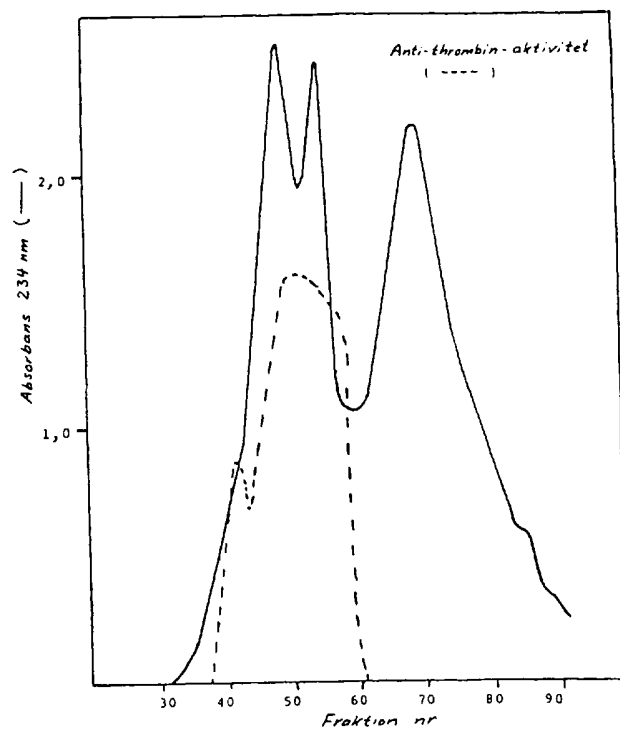
(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

- (51) Int.Cl⁶: C 07 K 14/815
- (21) Patentansøgning nr: PA 1991 00878
- (22) Indleveringsdag: 1991-05-10
- (24) Løbedag: 1989-11-13
- (41) Alm. tilgængelig: 1991-06-21
- (45) Patentets meddelelse bkg. den: 1999-12-20
- (86) International ansøgning nr: PCT/GB89/01345
- (86) International indleveringsdag: 1989-11-13
- (85) Videreførelsesdag: 1989-11-13
- (30) Prioritet: 1988-11-11 GB 8826428
- (73) Patenthaver: **Biopharm (UK) Limited, Bryngelen House, 2 Bryngwili Road, Henty, West Glamorgan SA4 1XB, Storbritannien**
- (72) Opfinder: **Roy Sawyer, Gorwelion Trapp, Nr. Llandello, Dyfed SA19 6TR, Storbritannien**
Anthony Atkinson, Twingley, Mill Corner, Winterbourne Gunner, Salisbury, Wiltshire, Storbritannien
Asgar Electricwala, 6 Ladysmith, East Gomeldon, Salisbury, Wiltshire, Storbritannien
Christopher Powell-Jones, 47 Heol Cennen, Ffairfach, Llandello, Dyfed SA19 6UL, Storbritannien
- (74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**
-

- (54) Benævnelse: **Polypeptid, der specifikt inhiberer thrombin, dets anvendelse til fremstilling af et lægemiddel samt farmaceutisk præparat indeholdende polypeptidet**
- (56) Fremdragne publikationer:
Ingen
- (57) Sammendrag:
Et polypeptid med aminosyresekvensen
X-Y-tyr-thr-asp-cys-thr-glu-ser-gly-gln-asn-tyr-cys-leu-
-cys-val-gly-ser-asn-val-cys-gly-glu-gly-asp-asn-cys-asn-
-D-gln-leu-ser-ser-ser-gly-asn-gln-cys-val-E-gly-glu-gly-
-thr-pro-F-pro-gln-ser-gln-thr-glu-gly-asp-phe-glu-glu-ile-
-pro-asp-glu-Z-ile-lys;
i hvilken X, Y og Z betegner en vilkårlig aminosyrerest,
D betyder cys eller pro, og E betyder glu eller asp eller
his, F betyder asp, lys, eller trp, eller et farmaceutisk
acceptabelt salt eller derivat deraf eller en bioprecursor
derfor, er et specifikt anti-thrombin, der kan anvendes som
et lægemiddel.

Fig. 1
DEAE-A25 Chromatografi af rå igleekstrakt



Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte anti-thrombiner, især hidtil ukendte anti-thrombiner hidrørende fra iglevæv og iglesekreter.

Hirudin er et velkendt og godt karakteriseret polypeptid, der vides at være specifikt for thrombin, og som fås som en ekstrakt fra igler af arten *Hirudo medicinalis*. Polypeptidet har en forholdsvis lav molekylvægt (ca. 7000) og er sammensat af 65 aminosyrer. Sekvensen af den første iso-form af hirudin er blevet bestemt af Dodt, Muller, Seemuller og Chang ("The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin-specific inhibitor", FEBS 165, 180-184 (1984)) som værende som følger:

```

      1           5           10           15
15  Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-Leu-Cys-
      20           25           30
      Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-Ile-Leu-Gly-Ser-Asp
      35           40           45
      -Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-
20  50           55           60           65
      Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln
                                   |
                                   SO3H

```

25 To varianter af hirudin er også blevet karakteriseret, og aminosyresekvenserne er blevet bestemt. En første variant er beskrevet af Dodt, Macleidt, Seemuller, Maschler og Fritz ("Isolation and characterisation of hirudin isoinhibitors and sequence analysis of hirudin PA"), Biol. Chem. Hoppe-
30 Seyler, 367, 803-811 (1986). Denne variant afviger fra den tidligere beskrevne i de følgende henseender:

1. -Ile- i position 1 i stedet for -Val-
2. -Thr- i position 2 i stedet for -Val-
3. -Lys- i position 24 i stedet for -Gln-
- 35 4. -Asn- i position 33 i stedet for -Asp-
5. -Lys- i position 35 i stedet for -Glu-
6. -Gly- i position 36 i stedet for -Lys-
7. -Asn- i position 47 i stedet for -Lys-

8. -Glu- i position 49 i stedet for -Gln-
9. -Asn- i position 53 i stedet for -Asp-

En anden variant er beskrevet af Harvey, Degryse,
5 Stefani, Schamber et al. ("Cloning and expression of a cDNA
coding for the anti-cuagulant hirudin from the bloodsucking
leech, *Hirudo medicinalis*"), Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
1084-1088 (1986). Denne variant er identisk med den først-
nævnte variant fra positionerne 1 til 32 og har dernæst de
10 følgende afvigelser fra det førstnævnte hirudin:

1. -Gln- i position 33 i stedet for -Asp-
2. -Lys- i position 35 i stedet for -Glu-
3. -Asp- i position 36 i stedet for -Lys-
4. -Gln- i position 53 i stedet for -Asp-
- 15 5. -Pro- i position 58 i stedet for -Glu-
6. -Asp- i position 62 i stedet for -Glu-
7. -Asp- i position 64 i stedet for -Leu-
8. -Glu- i position 65 i stedet for -Gln-

20 Som ovenfor angivet er hirudin hidrørende fra igler
af arten *Hirudo medicinalis*. *Hirudinaria manillensis* minder
om *Hirudo medicinalis* derved, at de begge er i stand til at
ernære sig af blod fra amfibier og pattedyr. *Hirudinaria*
er imidlertid udviklingsmæssigt mere avanceret end *Hirudo*
25 *medicinalis*. Det kan ikke med nogen sikkerhed forudsiges,
hvorvidt et aktivt stof, der er til stede i sekreterne fra
en første art af igler kan tænkes at være til stede i en
derfra forskellige art, og, såfremt der findes stoffer med
tilsvarende aktiviteter, hvorvidt disse sandsynligvis har i
30 det væsentlige identiske aminosyresekvenser eller markant
forskellige aminosyresekvenser.

Der er nu blevet isoleret et hidtil ukendt anti-thrombin
fra *Hirudinaria manillensis*, og dette anti-thrombin har
den følgende aminosyresekvens:

```

1           5           10           *           15           *
X-Y-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Tyr-Cys-Leu-Cys-Val-
5           20           * 25 * *           * 30 * * *
Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Glu-Gly-Asp-Asn-Cys-Asn-D-Gln-Leu-Ser-
*
* 35 *           40 *           45 * *           50
Ser-Ser-Gly-Asn-Gln-Cys-Val-E-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-F-Pro-Gln-Ser-
* * *           55           60 *           65
10 Gln-Thr-Glu-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Asp-Glu-Z-Ile-Lys

```

hvor hvert af symbolerne X, Y og Z betegner en vilkårlig aminosyrerest, D betyder Cys eller Pro, E betyder Glu eller Asp eller His, F betyder Asp, Trp eller Lys, og * betegner positioner i anti-thrombin-molekylet, der afviger fra positionerne i den ovenfor nævnte, første variant af hirudin.

Sammenligning med hirudin-sekvensen viser ca. 62% homologi, dvs. ca. 38% forskelle, hvilket er en overraskende væsentlig forskel. Der er i særdeleshed signifikante forskelle ved den betydningsfulde C-terminal samt de følgende,

- klare forskelle:
- i position 13 (-Tyr- i stedet for -Leu);
 - i position 17 (-Val- i stedet for -Glu-);
 - i position 24 (-Glu- i stedet for -Gln-);
 - i position 26 (-Asp- i stedet for -Asn-);
 - i position 27 (-Asn- i stedet for -Lys-);
 - i position 29 (-Asn- i stedet for -Ile-);
 - i position 30 (-Pro- eller -Cys- i stedet for -Leu-);
 - i position 31 (-Gln- i stedet for -Gly-);
 - i position 32 (-Leu- i stedet for -Ser-);
 - i position 33 (-Ser- i stedet for -Asp-);
 - i position 34 (-Ser- i stedet for -Gly-);
 - i position 35 (-Ser- i stedet for -Glu-);
 - i position 36 (-Gly- i stedet for -Lys-);
 - i position 41 (-Glu- eller -Asp- eller -His- i stedet for -Thr-);
 - i position 47 (-Asp-, -Lys- eller -Trp- i stedet for -Pro-);

- i position 51 (-Gln- i stedet for -His-);
- i position 52 (-Thr- i stedet for -Asn-);
- i position 53 (-Glu- i stedet for -Asp-);
- i position 61 (-Asp- i stedet for -Glu-);
- 5 i position 64 (-Ile- i stedet for -Leu-); og
- i position 65 (-Lys- i stedet for -Gln-).

Forskellene i positionerne 61 (aspartat i stedet for glutamat), 64 (isoleucin i stedet for leucin) og 65 (lysin i stedet for glutamin) menes at være af særlig betydning, eftersom sekvensen 55-64 antages at være et kritisk domæne for den inhiberende virkning af hirudin jf. i denne forbindelse Owen et al., "N-terminal replacement of small peptide anti-coagulants based on hirudin", J. Med. Chem. 31, 1009-1011 (1988). Tilstedeværelsen af aspartat (-Asp-), isoleucin 15 (-Ile-) og lysin (-Lys-) i anti-thrombinet ifølge opfindelsen resulterer i et nyt thrombin-inhiberende domæne. Sekvensen 54-65 alene antages at være hidtil ukendt i sig selv og at have hidtil ukendte anti-thrombin-egenskaber.

Opfindelsen angår derfor yderligere et polypeptid, 20 der specifikt inhiberer thrombin og indeholder aminosyresekvensen:

Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Asp-Glu-Z-Ile-Cys, hvor Z betegner en vilkårlig aminosyrerest, eller et farmaceutisk acceptabelt salt eller derivat deraf eller en bio-precursor derfor. 25

Aminosyren i stilling 63 (repræsenteret ved Z i den ovenfor angivne formel) kan være tyrosin (Tyr), der typisk er sulfateret. I modsætning hertil er rekombinant hirudin almindeligvis ikke sulfateret i denne position.

30 Det fra igler hidrørende anti-thrombin ifølge opfindelsen (og tilsvarende DNA-sekvenser, der kan ekstrapoleres derfra) er ikke-homologt med eglin, der er en kendt elastase/chymotrypsin-inhibitor, der vides at være til stede i den medicinske igle *Hirudo medicinalis* og er beskrevet af 35 Seemuller et al. i "Eglin: elastase-cathepsin G-inhibitor from leeches", Meth. Enzymol. 80, 804-816 (1981).

Anti-thrombinet ifølge opfindelsen isoleres typisk enten fra vævet af arten Hirudinaria manillensis ved metoder, der omfatter opløsningsmildelektstraktion og påfølgende fraktionering ved hjælp af chromatografisk teknik eller lignende, og alternativt kan anti-thrombinet isoleres på lignende måde fra sekreter, f.eks. sput, fra Hirudinaria manillensis.

Ifølge et yderligere aspekt af opfindelsen er et polypeptid ifølge opfindelsen derfor fortrinsvis hidrørende fra væv eller sekreter af igler af arten Hirudinaria manillensis. Polypeptidet er et anti-thrombin, som er specifikt i sin aktivitet over for thrombin.

Opfindelsen omfatter yderligere et rekombinant eller protein-konstrueret ækvivalent til polypeptidet ifølge opfindelsen.

Anti-thrombinet ifølge opfindelsen kan anvendes i et farmaceutisk præparat sammen med et farmaceutisk acceptabelt bærestof eller et strækkemiddel derfor. Et sådant præparat kan typisk anvendes til intravenøs indgivelse, i hvilket tilfælde bæreren almindeligvis er steril saltopløsning eller vand med en acceptabel renhed. Anti-thrombinet ifølge opfindelsen er egnet til behandling af thromboemboliske tilstande, f.eks. blodkoagulation. Ifølge en udførelsesform for opfindelsen indgives anti-thrombinet sammen med en plasminogen-aktivator, f.eks. vævplasminogen-aktivator, idet anti-thrombinet ifølge opfindelsen har vist sig at være foreneligt med den sidstnævnte aktivator.

Eksempler på fremgangsmåder til isolering af anti-thrombin ifølge opfindelsen fra iglevæv vil fremgå af de efterfølgende udførelseseksempler.

30

Eksempel 1

Trin 1 - acetoneekstraktion

600 g Hirudinaria manillensis-igler dehydratiseres i ca. 2 liter 96%'s ethanol i 24 timer. Den forreste del af dyrene dissekeres bort fra resten af kroppen og dehydratiseres yderligere i ca. 200 ml 96%'s ethanol i yderligere 24

35

timer.

Dehydratiserede iglehoveder hakkes fint i små stykker, og der tilsættes en blanding af 40 ml acetone og 60 ml vand. Blandingen omrøres i 30 minutter ved stuetemperatur, centrifugeres i 15 minutter ved 2700 omdr./min., og den ovenstående væske dekanteres fra.

Den fremkomne pellet gensuspenderes i yderligere 100 ml af en blanding af acetone og vand i forholdet 40:60, efterfulgt af omrøring ved stuetemperatur i 30 minutter. Blandingen centrifugeres ved 2700 omdr./min. i 15 minutter, og den ovenstående væske dekanteres fra og slås sammen med den oprindelige ovenstående væske. Der sættes 80 ml acetone og 20 ml vand til den samlede ovenstående væske, og pH-værdien nedsættes til 4,4 med iseddike.

Blandingen centrifugeres ved 2700 omdr./min. i 15 minutter, og den ovenstående væske dekanteres fra. pH-værdien af denne opløsning indstilles på 6,0 under anvendelse af 30%'s ammoniak. Rumfanget formindskes til ca. 30 ml ved rotationsfordampning ved 35°C.

Der tilsættes trichloreddikesyre-krystaller til nedsettelse af opløsningens pH-værdi til 1,8, efterfulgt af centrifugering til fjernelse af udfældninger. Det rå anti-thrombin udfældes fra opløsningen under anvendelse af et ni gange så stort overskudsrumfang af acetone.

Blandingen centrifugeres ved 2700 omdr./min. i 15 minutter, og den ovenstående væske kasseres. Den fremkomne pellet gensuspenderes i 50 ml acetone og centrifugeres ved 2700 omdr./min. i 10 minutter. Vaskevæskerne kasseres, og fældningen tørres i en vakuumdesikkator i 1 time. Råt anti-thrombin rekonstitueres i 4,0 ml vand.

Proteinmængden anslås ved hjælp af absorbansen ved 280 nm til at være 78 mg pr. ml. Aktiviteten anslås ved, at hindringen af thrombin/fibrinogen-sammenklumpningen finder sted ved 2400 anti-thrombin-enheder pr. ml (eller ca. 10.000 anti-thrombin-enheder pr. 200 g ituhakkede hoveder). Den totale aktivitet er 9600 anti-thrombin-enheder, og den spe-

cifikke aktivitet beregnes som 30,7 anti-thrombin-enheder pr. mg protein.

Trin 2 - ethanolekstraktion

5 Den rå anti-thrombin-opløsning afkøles til 3°C. Seks
1,2 ml aliquoter af iskold 96%'s ethanol tilsættes med mellemrum på 5 minutter. Blandingen henstilles ved 3°C i yderligere 10 minutter og centrifugeres derpå ved 2400 omdr./min. i 10 minutter. Den ovenstående væske dekanteres fra og bi-
10 beholdes.

Den fremkomne pellet gensuspenderes i 4 ml iskoldt destilleret vand og blandes med 7,2 ml iskold 96%'s ethanol. Dette materiale får lov at henstå ved 3°C i 30 minutter og centrifugeres derefter ved 2400 omdr./min. i 10 minutter.
15 Den ovenstående væske skilles fra ved dekantering og slås sammen med den oprindelige ovenstående væske.

Den fremkomne pellet gensuspenderes i en blanding af 4 ml iskold 96%'s ethanol og henstilles i 30 minutter ved 3°C. Blandingen centrifugeres dernæst ved 2400 omdr./min. i
20 10 minutter, og den ovenstående væske dekanteres fra og slås sammen.

Den samlede ovenstående væske afkøles til 0°C på is, og der tilsættes derefter 50,7 ml ethanol indeholdende 0,5% ammoniumacetat ved -10°C. Denne blanding henstilles i 30
25 minutter og centrifugeres derpå i 10 minutter ved 2400 omdr./min.

Den ovenstående væske kasseres, og fældningen vaskes med 50 ml iskold ethanol. Fældningen tørres derpå i en vakuumdesikkator i 1 time.

30 Denne fældning rekonstitueres derefter i vand, afprøves for anti-thrombin-aktivitet og proteinindhold og kommes dernæst i hætteglas og frysetørres. Det fremkomne rumfang er 1,5 ml.

Proteinmængden anslås at være 19 mg/ml på baggrund
35 af absorbansen ved 280 nm.

Aktiviteten anslås som værende 1000 anti-thrombin-

-enheder (ATU/ml) ved anvendelse af thrombin/fibrinogen-sammenklumpningsprøven. Den specifikke aktivitet beregnes til at være 52,6 ATU/mg protein.

5

Eksempel 2

Trin 1 som i eksempel 1 gentages, efterfulgt af trin 2 og trin 3 som følger:

Trin 2 - kationionbytterchromatografi

10 Råt anti-thrombin rekonstitueres i 10 mM ammoniumacetat/eddikesyre med en pH-værdi på 4,0 og filtreres til fjernelse af uopløselige stoffer.

En carboxymethylcellulose-gel, der er kommercielt tilgængelig under varemærket CM Sephadex C50, for-kvældes i puffer (10 mM ammoniumacetat/eddikesyre, pH = 4,0) og pakkes
15 i en 30 cm lang søjle med en diameter på 2,6 cm. Prøven anbringes på søjlen.

100 ml puffer ledes gennem søjlen og opsamles som spildmateriale. Pufferen ændres dernæst til 10 mM ammoniumacetat med en pH-værdi på 4,2. Der opsamles dernæst 10 ml-
20 -fraktioner, og disse afprøves med hensyn til anti-thrombin-aktivitet og proteinindhold. Den specifikke aktivitet for hver fraktion beregnes, og fraktioner over en tærskelværdi for specifik aktivitet slås sammen, fryses og frysetørres.

25

Trin 3 - anionbytterchromatografi

Frysetørret råekstrakt, der er fremstillet enten ved ethanolekstraktion eller ved CM Sephadex-ekstraktion, rekonstitueres med 10 mM tris/HCl-puffer med en pH-værdi på 7,5 og chromatograferes på en DEAE-Sephadex A-25-søjle (0,9 x 7
30 cm), der er for-ækvilibreret med den samme puffer. Søjlen fremkaldes ved en strømningshastighed på 15 ml pr. time, indtil absorbansen af den udstrømmende væske ved 234 nm er under 0,15. Det bundne materiale elueres derpå med en lineær gradient på fra 0 til 1 M NaCl i ækvilibreringspufferen (60
35 ml i hvert reservoir). Den udstrømmende væske opsamles i fraktioner på 2 ml til måling af absorbans og indhiberende

aktivitet. De opnåede elueringsprofiler er vist for ethanol-ekstraheret materiale (fig. 1 på tegningen) og for CM Sephadex-ekstraheret materiale (fig. 2 på tegningen).

Fraktionerne indeholdende anti-thrombin-aktivitet
5 slås sammen, koncentreres og afsaltes på Sephadex G-25 inden yderligere rensning. Den delvis rensede prøve fraktioneres yderligere ved affinitetechromatografi på thrombin-Sepharose. Søjlen vaskes med ækvilibreringspufferen (0,1 M tris/HCl, pH = 8,0), og det bundne anti-thrombin elueres med 1 M benz-
10 amidin. Det eluerede materiale frysetørres og afsaltes som før. Materialet renses dernæst ved HPLC (high performance liquid chromatography). 50 µl koncentreret prøve påføres en Mikropore RP-300 C-8-søjle (3 x 0,21 cm), der er for-ækvilibreret med 0,1% TFA ved stuetemperatur. Det bundne mate-
15 riale elueres med en lineær gradient på fra 0 til 100% af 60% acetonitril indeholdende 0,09% TFA i 35 minutter ved en strømningshastighed på 0,25 ml/min.

Absorbansen af den udstømmende væske overvåges ved 215 nm. Hver spids eller partielt opløst spids opsamles som
20 en særskilt fraktion til måling af dens inhiberende aktivitet. Den opnåede elueringsprofil er vist i fig. 3 på tegningen og viser, at de spidser, der indeholder anti-thrombin-aktivitet (spidserne 5, 6 og 7) er adskilt fra andre spidser.

25

Sekvensbestemmelse

Hovedspidser indeholdende anti-thrombin-aktivitet (svarende til spidserne 5, 6 og 7 i fig. 3 på tegningen) tørres under vakuum og analyseres for N-terminal aminosyre-
30 sekvens på et automatiseret Applied Biosystems-gasfasesekvensbestemmelsesapparat (model 470A), der er forbundet til en on-line analysator (model 120) til identifikation af PTH-aminosyrer.

Renset anti-thrombin-prøve anbringes direkte på filteret til sekvensbestemmelse. Cysteinrester i sekvensen
35 bestemmes efter derivatisering til pyridylethyl-cystein ved

omsætning af den rensede prøve med dithiothreitol og 4-vinylpyridin.

Tryptiske digestioner af det reducerede og pyridylethylede anti-thrombin opnås med TPCK-trypsin. Reaktionen udføres i 0,05 M ammoniumbicarbonat-puffer ved 37°C i 4 timer, og reaktionen standses ved frysetørring og gensuspension i 0,1% TFA. Fragmenter adskilles ved HPLC i omvendt fase under betingelser, der minder om de, der er beskrevet i det følgende i eksempel 3, trin 5.

C-terminal-sekvensbestemmelse udføres ved kombination af carboxypeptidase Y-digestionen og DABS-Cl-metoder som beskrevet af Chang i FEBS Letts. 164, 307-313 (1983). Den således bestemte sekvens er som ovenfor angivet.

15 Eksempel 3

Trin 1 og 2 som i eksempel 2 gentages, efterfulgt af trin 3 og 4 som følger:

Trin 3 - anionbytterchromatografi

Opløsningen fra trin 2 indstilles på en pH-værdi på 7,0 med 0,1 M NaOH og påføres på en søjle indeholdende en anionbytter, der er kommercielt tilgængelig under handelsbetegnelsen Q-Sepharose, ækvilibreret i 20 mM tris-HCl-puffer med en pH-værdi på 7,0. Pufferen pumpes gennem denne søjle, indtil ubundet protein (detekteret ved absorbans ved 280 nm) er fjernet, hvorefter en gradient af salt (NaCl i den samme puffer) påføres på lineær eller trinsvis måde til eluering af det bundne anti-thrombin. En typisk chromatografisk profil er vist i fig. 4 på tegningen.

Fraktioner indeholdende anti-thrombin-aktivitet slås sammen og koncentrerer ved ultrafiltrering til et rumfang på 25-50 ml. På dette trin har anti-thrombin-præparaterne en specifik aktivitet på 100-400 anti-thrombin-enheder pr. mg protein.

Trin 4 - gelfiltrering

Opløsningen fra trin 3 påføres en gelfiltreringssøjle, der er kommercielt tilgængelig som Superdex 200, ækvilibreret og elueret med 50 mM tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH = 7,5. En typisk chromatografisk profil er vist i fig. 5 på tegningen.

Fraktioner indeholdende anti-thrombin-aktivitet samles, slås sammen og frysetørres. På dette trin har anti-thrombin-præparaterne typisk en specifik aktivitet i området fra 1000 til 4000 anti-thrombin-enheder pr. mg protein.

Trin 5 - afsluttende rensning

Materiale fra trin 4 påføres en affinitetsøjle af thrombin-Sepharose ækvilibreret i 0,1 M tris-HCl, pH = 8,0, og det ubundne materiale elueres med den samme puffer. Det bundne anti-thrombin elueres fra søjlen med 1 M benzamidin, frysetørres og afsaltes derefter under anvendelse af en søjle af Sephadex G 25.

Materiale renses ved affinitetschromatografi renses yderligere ved HPLC (high performance liquid chromatography) under anvendelse af en søjle med omvendt fase (RP-300 C-8). I et typisk eksempel, jf. fig. 6 på tegningen, påføres der prøve på en søjle ækvilibreret i 0,1% trifluoreddikesyre (TFA) ved stuetemperatur, og det bundne anti-thrombin elueres med en lineær gradient af 60% acetonitril indeholdende 0,9% TFA. Spidser af protein (detekteret ved absorbans ved 215/280 nm) opsamles, og de, der indeholder anti-thrombin, tørres under vakuum.

Bestemmelse af anti-thrombin-aktivitet

Anti-thrombin-aktivitet bestemmes ved måling af inhiberingen af koagulationsaktiviteten af thrombin på fibrinogen i det væsentlige som beskrevet af Markwardt i Methods in Enzymology, XIX, side 924, "Hirudin as an inhibitor of Thrombin" (1970), eller ved måling af inhiberingen af thrombin-spaltning af specifikke para-nitrophenol-afledte chromogene substrater såsom S-238, der er kommercielt tilgæn-

geligt fra Kabi.

Aktiviteten af anti-thrombinet ifølge opfindelsen neutraliseres ikke ved en høj koncentration af neutraliserende monoclonale antistoffer, der er specifikke for hirudin
5 (dette er en yderligere immunologisk bekræftelse på, at anti-thrombinet ifølge opfindelsen og hirudin er forskellige).

Anti-thrombinet ifølge opfindelsen og hirudin har imidlertid ensartede partielle thromboplastin-tider for
10 ækvivalente doser. Dette antyder, at de har ensartede anti-koagulerende egenskaber i forhold til humant blod.

P a t e n t k r a v .

1. Polypeptid, der specifikt inhiberer thrombin, og som indeholder aminosyresekvensen:

Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Asp-Glu-Z-Ile-Lys,

5 hvor Z betegner en vilkårlig aminosyrerest, eller et farmaceutisk acceptabelt salt eller derivat deraf eller en bioprecursor derfor.

2. Polypeptid ifølge krav 1, kendt ved, at det har den følgende aminosyresekvens:

10 X-Y-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Tyr-Cys-Leu-Cys-Val-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Glu-Gly-Asp-Asn-Cys-Asn-D-Gln-Leu-Ser-Ser-Ser-Gly-Asn-Gln-Cys-Val-E-Gly-Glu-Gly-Thr-Pro-F-Pro-Gln-Ser-Gln-Thr-Glu-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Asp-Glu-Z-Ile-Lys;

15 hvor X betegner en vilkårlig aminosyrerest, Y betegner en vilkårlig aminosyrerest, Z betegner en vilkårlig aminosyrerest, D betyder Cys eller Pro, og E betyder Glu eller Asp eller His, F betyder Asp, Lys, eller Trp, eller er et farmaceutisk acceptabelt salt eller derivat deraf eller en bioprecursor derfor.

3. Polypeptid ifølge krav 2, kendt ved, at X betegner Val.

4. Polypeptid ifølge krav 2 eller 3, kendt ved, at Y betegner Ser.

25 5. Polypeptid ifølge ethvert af kravene 1-4, kendt ved, at Z betegner Tyr eller et sulfateret derivat deraf.

6. Polypeptid ifølge krav 1 eller 2, kendt ved, at det hidrører fra væv eller sekreter fra igler af arten *Hirudinaria manillensis*.

7. Farmaceutisk præparat, kendt ved, at det indeholder en vandig opløsning af et polypeptid ifølge ethvert af kravene 1-5.

35 8. Anvendelse af et polypeptid ifølge ethvert af kravene 1-6 til fremstilling af et lægemiddel til behandling af thromboemboliske tilstande.

9. Anvendelse af et polypeptid ifølge ethvert af kravene 1-6 til fremstilling af et lægemiddel til indgivelse til en patient sammen med en plasminogen-aktivator.

5

10

15

20

25

30

35

Fig. 1

DEAE-A25 Chromatografi af rå igleekstrakt

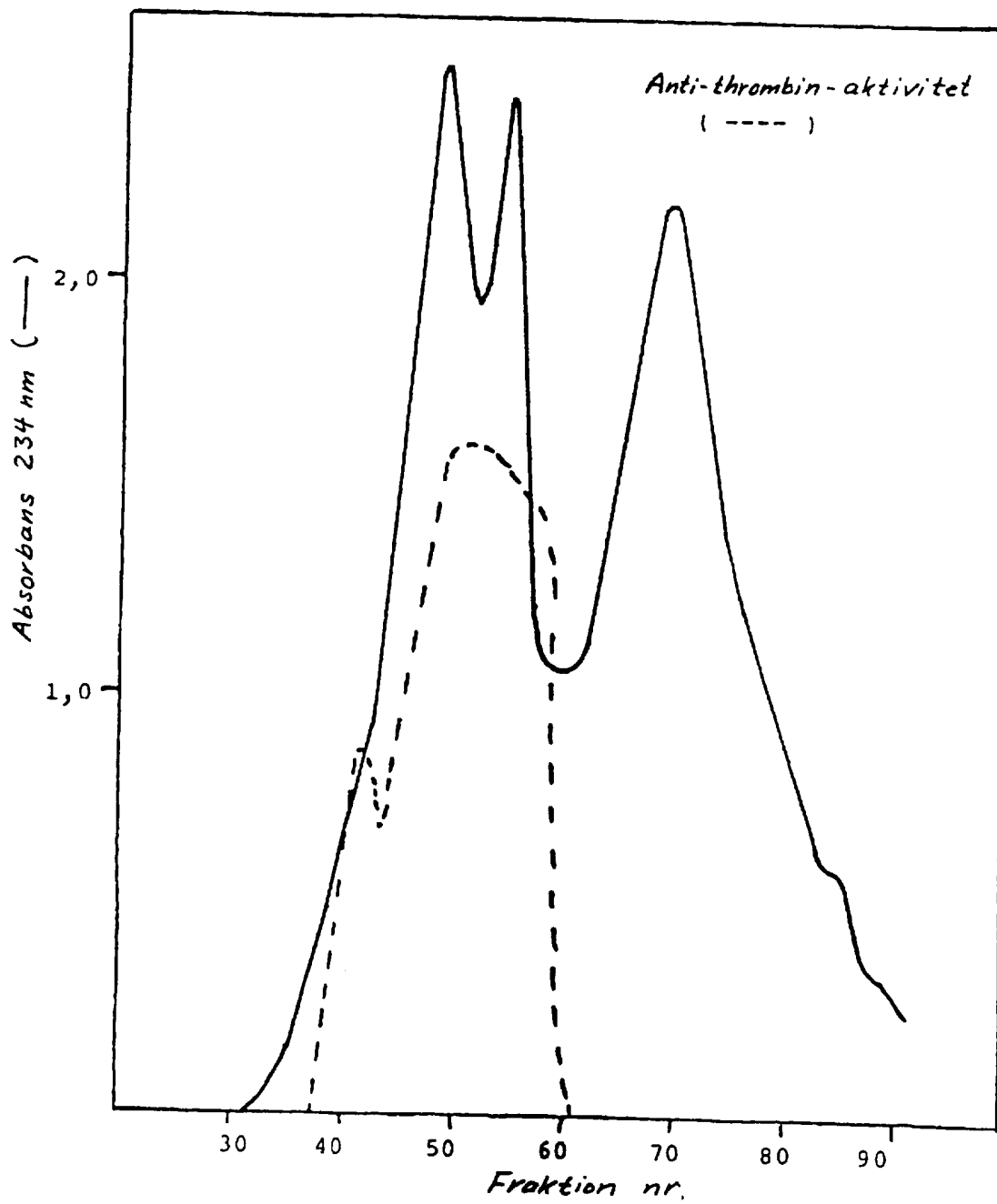


Fig. 2
DEAE Sephadex A 25 Chromatografi af igleekstrakt
efter CM Sephadex Chromatografi

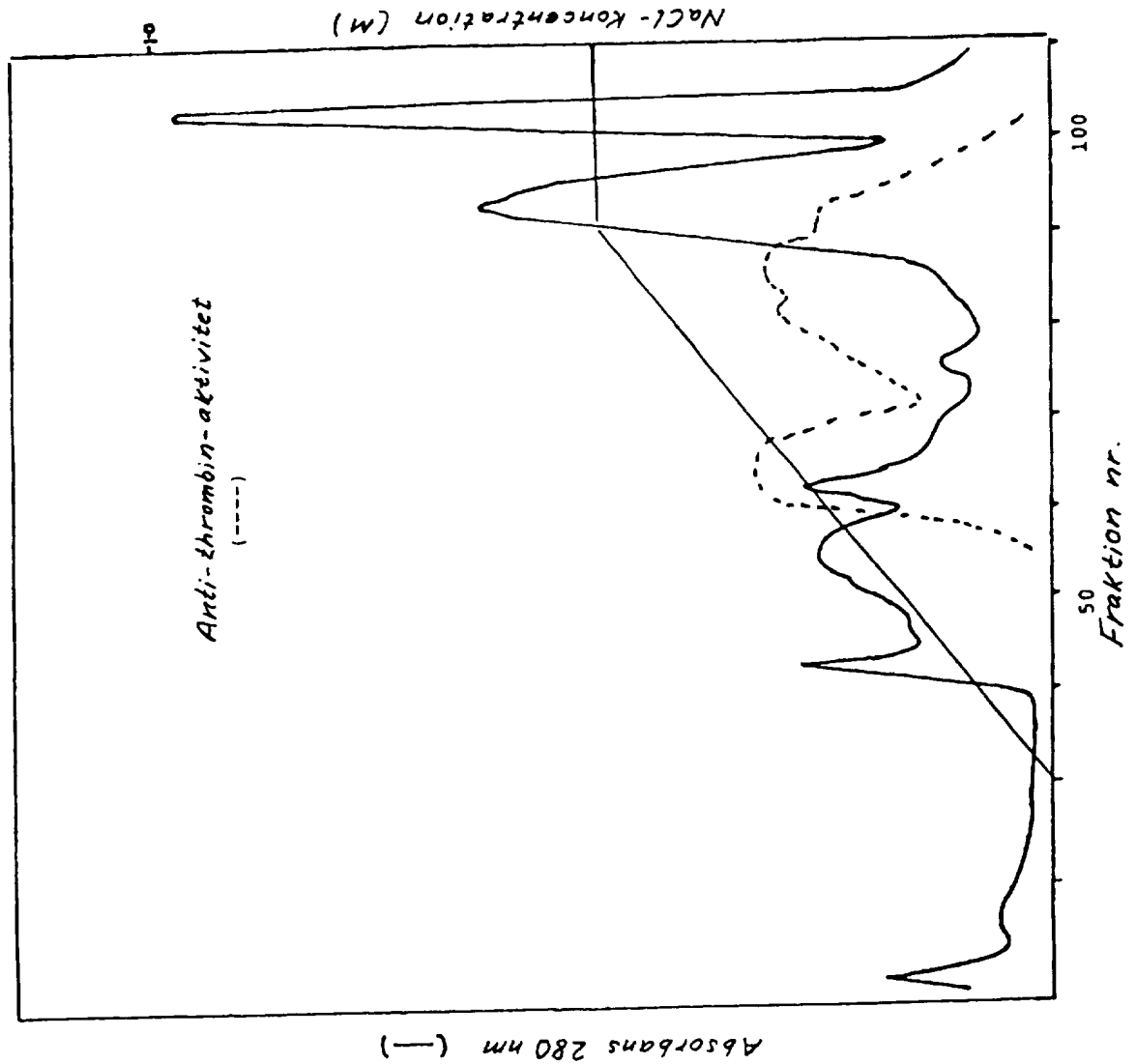


Fig. 3

HPLC-profil af partielt rensset anti-thrombin

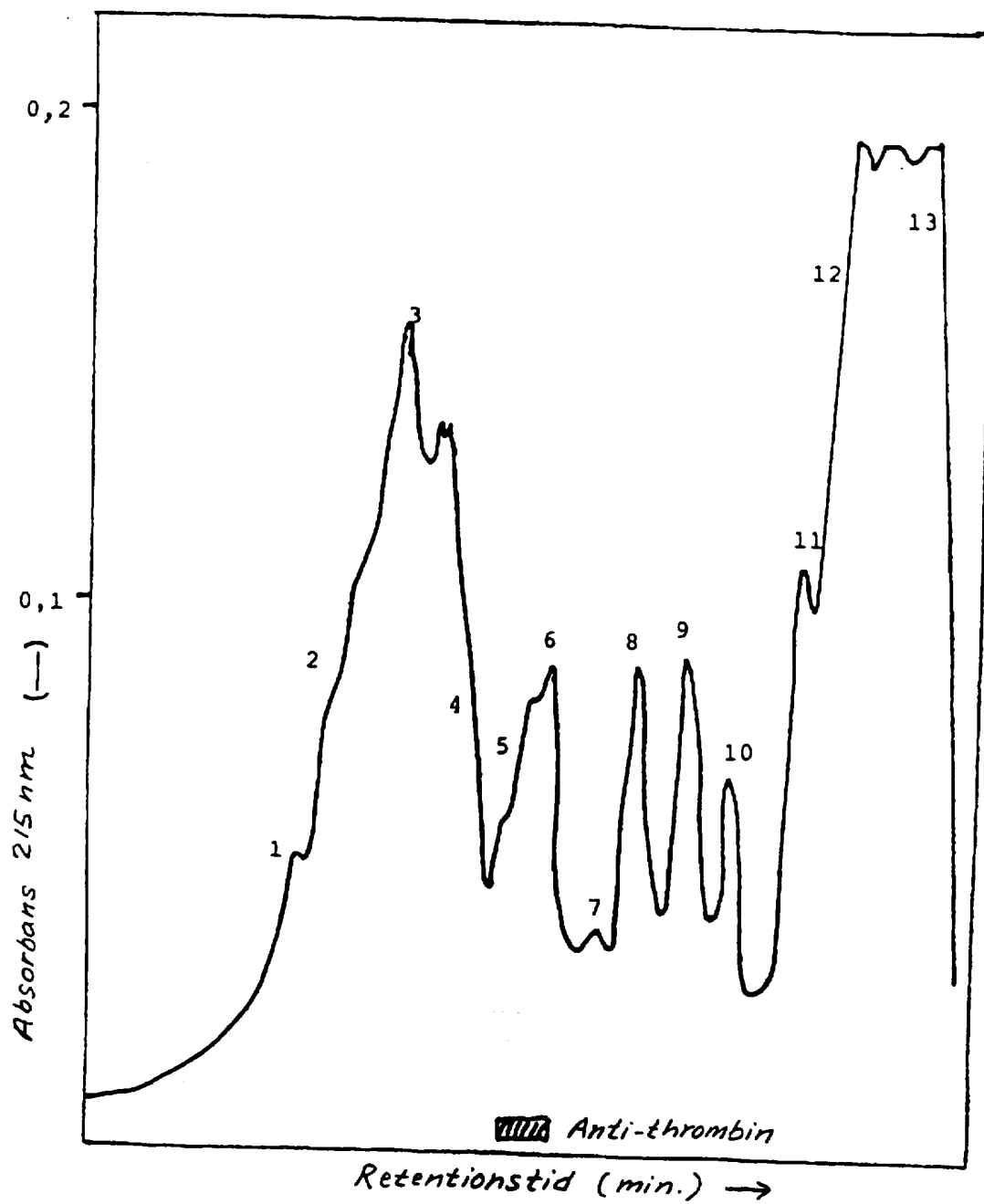


Fig. 4

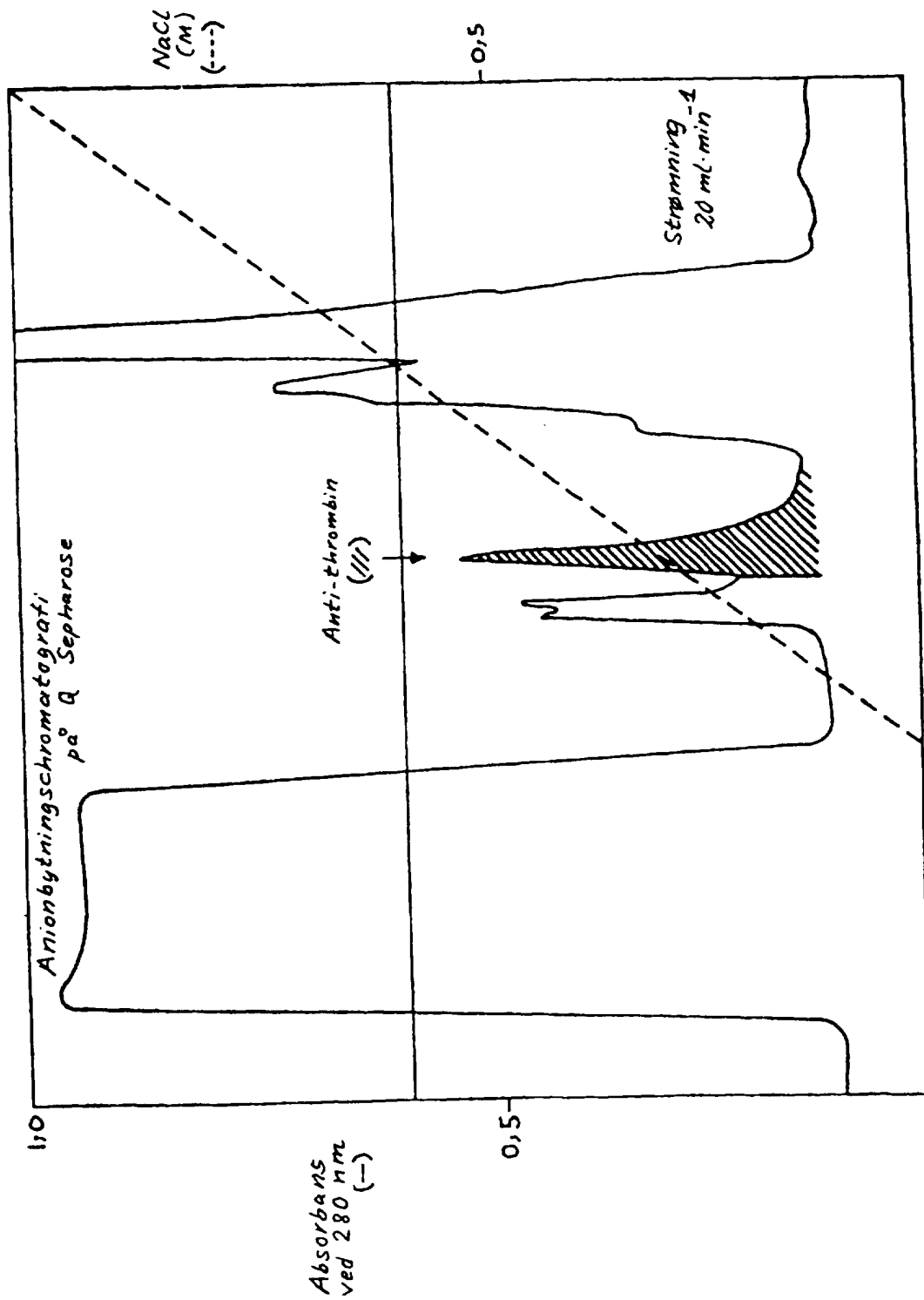


Fig. 5
Gelfiltrering på Superdex 200

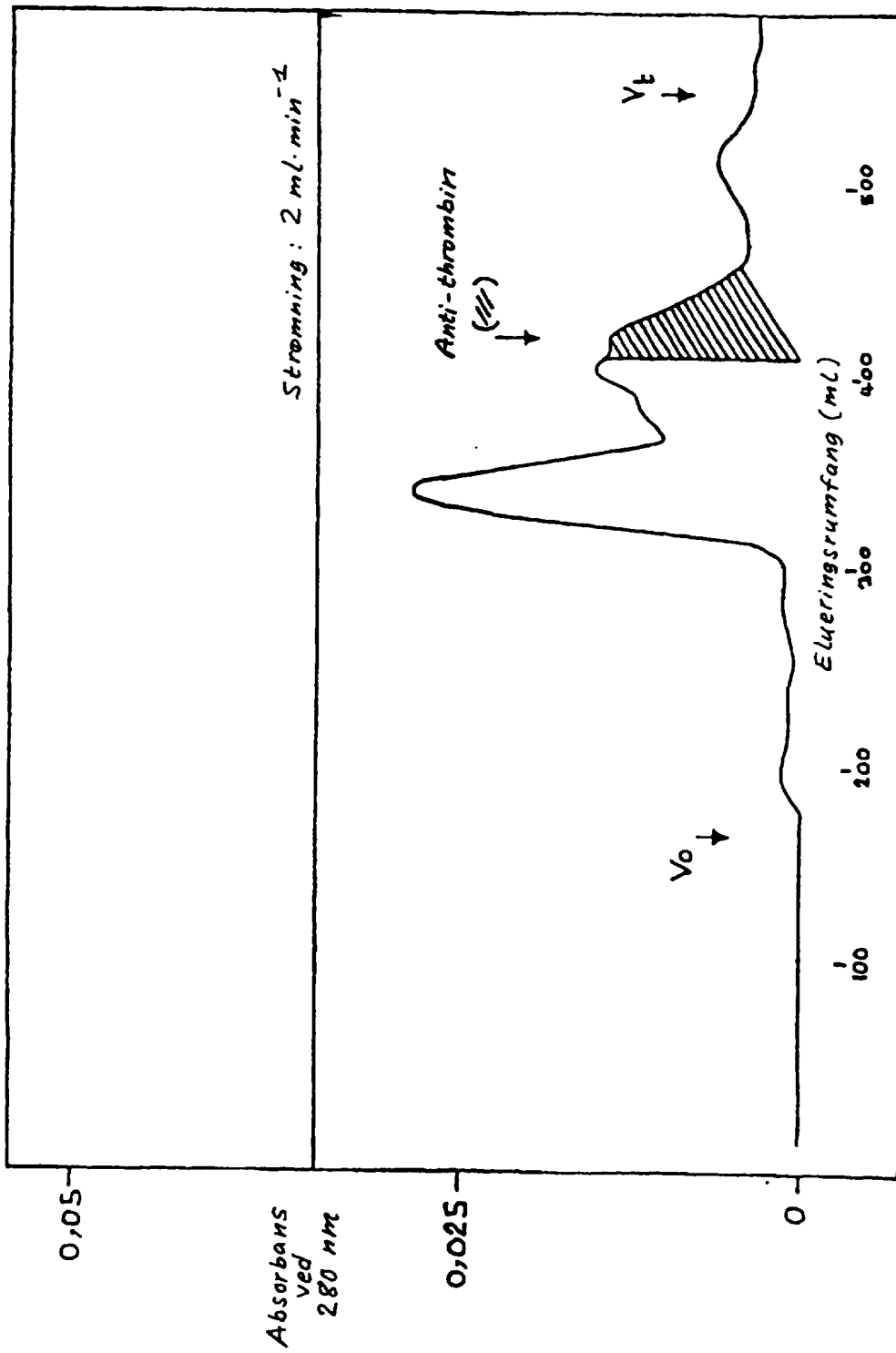


Fig. 6

