



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 309095

(13) B1

(51) Int Cl⁷ C 07 K 7/08

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19921407	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	1991.08.09, PCT/SE91/00534
(22) Inng. dag	1992.04.09	(85) Videreføringdag	1992.04.09
(24) Løpedag	1991.08.09	(30) Prioritet	1990.08.10, SE, 9002617
(41) Alm. tilgj.	1992.06.05		
(45) Meddelt dato	2000.12.11		

(71) Patenthaver	Alfa-Laval Agri International AB, Box 39, S-147 00 Tumba, SE
(72) Oppfinner	Magnus Höök, Birmingham, AL, US Martin McGavin, Birmingham, AL, US Giuseppe Raucchi, Pomezia, IT
(74) Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, 0259 Oslo

(54) Benevnelse **Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fibronektinbindende peptid**

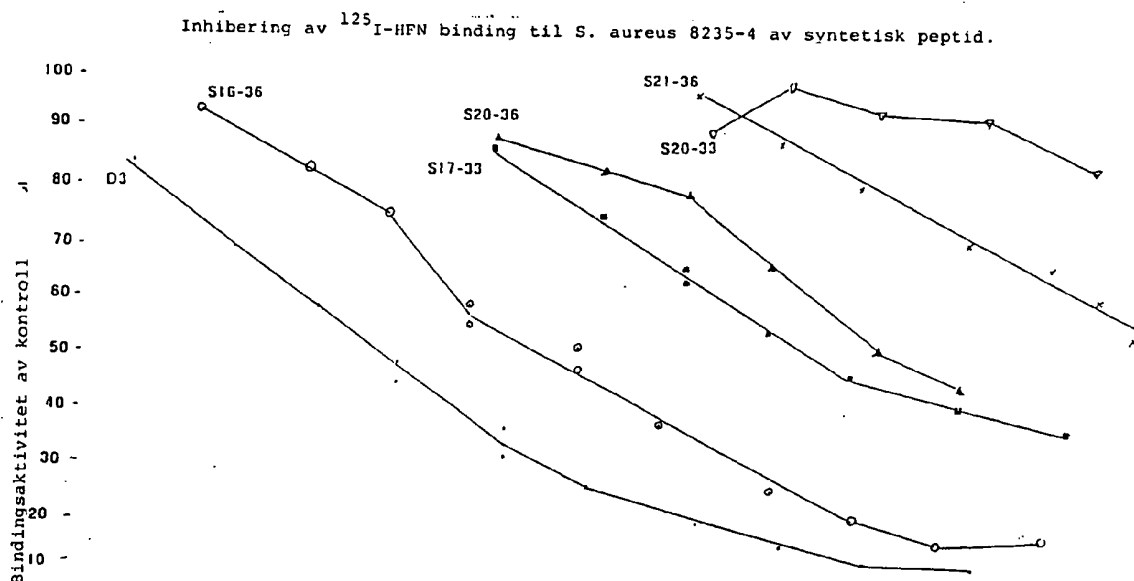
(56) Anførte publikasjoner Signäs, C. et al., Nucleotide sequence..., Proc. Natl. Sci. USA, vol. 86, 1989, s. 699-703

(57) Sammendrag

Fibronektinbindende peptid med strukturen



hvor R¹ er hydrogen eller K eller DK, og R² er hydrok-syl, L, LP eller LPK.



Teknisk område

Foreliggende oppfinnelse angår analogifremgangsmåte ved fremstilling av et terapeutisk aktivt peptid med den struktur som er angitt i krav 1, hvilken analogifremgangsmåte omfatter de trekk som er angitt i krav 1's karakteriserende del.

Målet for foreliggende oppfinnelse er å erholde et minimalt fibronektinbindende peptid.

Ytterligere mål vil bli anskueliggjort fra den følgende beskrivelse.

Bakgrunn for oppfinnelsen

WO-A1-85/05553 beskriver bakterielle celleoverflateproteiner med fibronektin, fibrinogen, collagen og/eller laminin egenskap. Derved er det vist at forskjellige bakterier har en egenskap til å binde til fibronektin, fibrinogen, collagen og eller laminin. Det er videre vist at fibronektinbindende protein har en molekylvekt på 160 kD og/eller 87 kD, hvorved det er sannsynlig at det mindre protein er en del av det større.

Fibronektin er et disulfidbundet dimerisk glykoprotein (Mv 450.000) som er tilstede i en oppløselig form i blodplasma og andre kroppsvæsker og blir avleiret i en fibrilær form som en hovedbestanddel av den ekstracellulære matrise hos løst bindevev. Det består av tre forskjellige strukturelle enheter kalt type I, II og III homologer (Petersen et al., 1983; PNAS), noe som resulterer i en modulær organisering av fibronektinmolekylet hvor dets mange biologiske aktiviteter hver kan bli tilknyttet spesifikke domener. Den viktigste biologiske rolle til fibronektin synes å være relatert til dets egenskap å fremskaffe adhesjon av eukaryote celler til den ekstracellulære matrise via en spesifikk interaksjon mellom enkelte celleoverfatereseptorer og et 105-kDa

- sentralt område av molekylet bestående fullstendig av type III homologienheter (Pierschbacher og Ruoslahti, 1984, Nature 309:30-33). Det cellebindende domene blir fulgt ved sin C-terminale ende av et 31 kDa heparinbindende domene og et 30 kDa fibrinbindende domene. Forutgående for det cellebindende domene er et 42 kDa gelatin-(collagen)-bindende domene og et N-terminalt 29 kDa domene bestående av 5 påfølgende type I repetisjoner som binder fibrin, heparin og bakterier (Yamada 1983, Ann. Rev. Biochem. 52:761-799).
- 10 Flere patogene Gram-positive stafylokokker og streptokokker er blitt angitt å binde utelukkende til det 29-kDa N-terminale domene av fibronektin (Speziale et al., 1984, J. Bacteriol. 157:420-427, Mosher og Proctor, 1980 Science 209:927-929). Enkelte av de Gram-negative enteriske bakterier, nemlig Escherichia coli, Salmonella typhimurium, S. enteritidis, og S. dublin har også blitt rapportert å binde fibronektin (Forman et al., 1984, JBC 259:14899-14905; Van de Water et al., 1983, Science 220:201-204; Faris et al., 1986, FEMS Microbiol. Lett. 34:221-224; Baloda et al., 1986, FEMS Microbiol. Lett. 34:225-229; Baloda et al., 1985, FEMS Microbiol. Lett. 28:1-5; Kristiansen et al., 1987), og det ble rapportert for E. coli, at bakterien bandt seg til det 29 kDa N-terminale domene, og et andre ikke-identifisert sete (Froman et al., 1984). I motsetning til dette, er spirochete Treponema palladium, og trypanosome Trypanosoma cruzi forskjellige fra andre fibronektinbindende mikroorganismer ved at de viser en spesifisitet for det 105 kDa eukaryote cellebindende domene. (Thomas et al., 1985a, J. Exp. Med. 161:514-525; Ouaiissi et al., 1986, J. Exp. Med. 162:1725-1719).
- Assosiasjonskonstantene for intraksjonen mellom disse mikroorganismer og fibronektin viser en 10^2 til 10^3 -ganger høyere affinitet enn den som er angitt for bindingen av intakt fibronektin til humane fibroblaster (Hook et al., 1989; Akiyama og Yamada, 1985, JBC 260:4492-4500). Denne affinitet for fibronektin kan være en virulensfaktor som letter kolo-

nialiseringen av sårvev og blodaggregater hvor en fibronektinrik matrise er kjent for å bli avleiret under første og andre uke av sårreparasjon. (Kurien et al., 1980, Lab Invest. 43:47-51; Grinell et al., 1981, J. Invest. Dermatol. 76:181-189; Clark et al., 1982, J. Invest. Dermatol. 79:269-276). Det har vært hensikten til foreliggende forskning: Å karakterisere mikrobielle fibronektinbindende proteiner (FnBPs), og utvikle reseptoranaloger for potensielt terapeutisk anordninger for å forhindre eller redusere risikoen for sårinfeksjon.

Studier av FnBPs har foreløpig for det meste beskjeftiget seg med FnBP av S. aureus. En FnBP med en Mv av 210.000 er blitt rapportert fra tre laboratorier (Espersen og Clemmensen, 1982, Infect. Immun. 37:526-531; Froman et al., 1989, PNAS 86:699-703). Genet som koder for FnBP til S. aureus 8325-4 er blitt klonet og uttrykt i E. coli (Flock et al., 1987, EMBO J. 2351-2357). Den fibronektinbindende aktivitet var lokalisert til et 600 basepar-innskudd, som, når det ble fusert i ramme med DNA som koder for to IgG-bindende domener av stafylokokkisk protein A, ga en proteinfusjon betegnet ZZ-FR som hadde samme fibronektinbindende aktivitet som den native 210 kDa reseptor. Etterfølgende DNA sekvensanalyser viste at det 600 basepar store innskudd kodet for 184 aminosyrer hvor et fremstående trekk var en 38 aminosyrers homologienhet gjentatt tre ganger og delvis en fjerde (Signas et al., 1989).

Det er blitt funnet at syntetiske peptidanaloger til hver av homologienhetene angitt som D1, D2 og D3, var effektive inhibitorer for fibronektinbinding til S. aureus 8325-4. Peptidet D3 konstruert på den tredje homologienhet var 50 til 100 ganger mer effektiv som en inhibitor for fibronektinbinding, men viste et vesentlig fravik fra den basiske homologienhet. I foreliggende oppfinnelse er videre definert den fibronektinbindende determinant innen D3 homologienheten ved hjelp av kjemisk modifisering, proteolytisk spaltning og

kjemisk syntese av et antall mindre peptider omfattende D3-sekvensen.

Beskrivelse av foreliggende oppfinnelse

Foreliggende oppfinnelse angår fremstilling av et minste
5 fibronektinbindende peptid med strukturen



hvor R¹ er hydrogen, K eller DK, og R² er hydroksyl. L, LP eller LPK.

	A	Ala, Alanin
10	R	Arg, Arginin
	N	Asn, Asparagin
	D	Asp, Aspartinsyre
	C	Cys, Cystein
	C	Cys, Cystin
15	G	Gly, Glycin
	E	Glu, Glutaminsyre
	Q	Gln, Glutamin
	H	His, Histidin
	I	Ile, Isoleucin
20	L	Leu, Leucin
	K	Lys, Lysin
	M	Met, Metionin
	F	Phe, Fenylalanin
	P	Pro, Prolin
25	S	Ser, Serin
	W	Trp, Tryptofan
	Y	Tyr, Tyrosin
	V	Val, Valin

Materialer og metoder

Bakterie og vekstmedier

Staphylococcus aureus 8325-4, beskrevet av Lofdahl et al., (1983, PNAS USA 80: 697-701) ble lagret i dyp agar ved 4°C. 5 Kulturer ble oppstartet ved inokulering i hjerne-, hjerte-infusjonsmedium (Difco, Detroit, MI). Etter inkubering over natten ved 37°C ble bakteriene samlet opp ved sentrifugering, suspendert i fosfatbufret fysiologisk saltvann (pH 7,4), inneholdende 0,02% (vekt/pr. volum) natriumazid, og 10 justert til en verdi på 10^{10} celler pr. ml suspensjon under henvisning til en standardkurve angående celletall til optisk tetthet. Cellene ble så varmeavlivet ved 88°C i 20 minutter, delt opp i porsjoner og lagret frosset ved -20°C.

Fremstilling og iodinerings av ligander

15 Human fibronectin ble enten kjøpt fra New York Blood Center, eller rensset fra utgått plasma erholdt fra samme kilde beskrevet Engvall og Rouslahti (1977, Int. J. Cancer Res, 20:1-5). For opprensning av 29-kDa N-terminalt domene av fibronectin, ble humanfibronectin fortynnet til 1 mg/ml i 20 buffer bestående av 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 50 mM natriumklorid, 2,5 mM kalsiumklorid og 0,5 mM etylendiamintetraeddiksyre (EDTA). Proteasefordøyning ble igangsatt ved tilsetning av 5 µg termolysin (Calbiochem, La Jolla, CA) for hvert 1 mg fibronectin, fulgt av inkubering i 2 timer ved 25 romtemperatur og roterende blanding. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av EDTA til 5 mM. 29 kDa-fragmentet ble så isolert ved så å passere fordøyningen gjennom en affinitetsmatrise bestående av ZZ-FR fusjonsprotein (Flock et al., 1987) koblet til Sepharose CL-4B (Pharmacia, Uppsala, 30 Sverige), og derpå eluert med 4M guanidin-hydroklorid i fosfatbufret fysiologisk saltvann (PBS). Eluatet ble så dialysert i utstrakt grad mot PBS. Iodinerings av enten fibronectin eller det 29 kDa store fragment ble fortsatt i henhold til kloramin T metoden til Hunter (1978).

Assay av fibronektinbinding

Syntetiske peptider ble analysert for fibronektinbinding ved aktivt å måle deres egenskap til å konkurrere med S. aureus 8325-4 celler av ¹²⁵I-merket fibronektin, eller merket N-terminalt 29 kDa-fragment nøyaktig som beskrevet tidligere (Signas et al., 1989). Hvor det er gunstig ble dette assay modifisert ved å erstatte den bakterielle suspensjon med 40 liter ZZ-FR Sepharose (koblingsgrad på 0,3 mg/ml svellet gel). I dette tilfellet ble bakgrunnsradioaktiviteten målt fra et assay hvor umodifisert Sepharose ble brukt istedet for affinitets-matrisen. Radiomerket ligand bundet enten til bakterier eller ZZ-FR Sepharose ble mengdebestemt i en LKB gammateller (Turku, Finland).

Syntese og opprensning av peptider

Alle peptider med unntak av S16-36 ble syntetisert på en Applied Biosystems automatisk peptidsyntetisator ved the University of Alabama ved Birmingham Cancer Center og facility som tidligere beskrevet (Signas et al., 1989). Peptid S16-36 ble syntetisert av Vega Biotechnologies (Tucson, AZ) ved å bruke en F-moc syntetisert prosedyre. Peptidet ble rensset fra grovpreparatene ved revers-fase HPLC ved å bruke en preparativ C₁₈ kolonne (Vydoc 218TP510; The Separation Group, Hesperia, CA) og et LKB HPLC system. Bufferen brukt for opprenskningen var TEAP/EDTA (pH 5,5), bestående av 0,11 % (vol/vol) fosforsyre, 0,28% (vol/vol) trietylamin, og 0,25 mM EDTA. Elueringsbufferen var 15% av TEAP/EDTA i acetonitril. Trietylamin ble kjøpt fra Pierce (Rockford, IL), mens HPLC-gradert fosforsyre og acetonitril var fra Fisher (Pittsburgh, PA). Etter revers-fase kromatografi ble de passende fraksjoner dialysert i utstrakt grad mot 50 mM ammoniumbikarbonat og frysetørket. Renheten av de resulterende preparater ble undersøkt ved revers-fase kromatografi på en analytisk C₁₈ kolonne (Vydoc 218TP546; The Separation Group, Hesperia, CA) ved å bruke en buffer bestående av 0,1% (vol/vol) trifluoreddiksyre (Pierce;

Rockford, IL) i vann, og 0,1% (vol/vol) TFA i 60% acetonitril som elueringsbuffer. Peptider som eluerte i dette buffersystem ble tørket ved rotorinndamping og underkastet enten N-terminal sekvensanalyse eller aminosyre-sammensetningsanalyse.

Peptidsekvensering ble foretatt ved the Protein Chemistry Core hos the University of Alabama at Birmingham på en Applied Biosystems peptidsekvensator, modell 470A. Aminosyreanalysen ble foretatt ved the Atherosclerosis Research Unit Protein Chemistry Core.

Proteolytisk fordøying av syntetiske peptider

L-(tosyloamido-2-fenyl)-etyl-klormetyl-ke-ton-(TPCK)-behandlet trypsin (kode TRTPCK) og kymotrypsin (kode CDS) ble erholdt fra Worthington (Freehold, NJ). Soyabønne-trypsininhibitor og TPCK ble kjøpt fra Sigma (St. Louis, MO), endoproteinase Glu-c (V8 protease) ble kjøpt fra Boehringer mannheim og lysin endopeptidase C (LEC) ble erholdt fra Calibiochem (LA Jolla, CA).

For både trypsin- og kymotrypsinfordøying ble peptid D3 oppløst ved 2 mg/ml i 0,1M ammoniumbikarbonat og behandlet med protease ved et enzym-til-substratforhold på 1:200 i 24 timer ved 37°C. Trypsin ble inaktivert ved tilsetning av soyabønne-trypsininhibitor og fenylmetylsulfonylfluorid til henholdsvis 20 g/ml og 1 mM. For kymotrypsin ble TPCK og PMSF tilsatt for å oppnå konsentrasjoner på henholdsvis 0,3 mg/ml og 1 mM.

For endoproteinase-Glu-c-fordøying, var enzym-til-substratforholdet 1:100 og peptid var 2 mg/ml i fosfatbufret fysiologisk saltvann. Etter inkubering i 24 timer ved romtemperatur ble fordøyingen stoppet ved tilsetning av PBS til 1 mM. For LEC-fordøying ble peptidet oppløst i PBS ved 2 mg/ml, til hvilket det ble tilsatt 1 enhet protease pr. ml. Fordøying ble tillatt å fortsette i 40 timer ved 37°C og ble

avsluttet når spaltningsproduktene ble adskilt ved HPLC. For hver fordøyning ble revers-fase HPLC med TEAP/EDTA buffersystemet brukt for å overvåke fremgangen av proteolyse og å rense opp spaltningsproduktene. Prøver som var nødvendig for sammensetningsanalyse eller N-terminal sekvensering ble videre kromatografert med TFA buffersystemet.

Kjemisk modifisering av syntetiske peptider

Dihydroksypropyleringsreduksjon av aminosidekjeden av lysin var en modifisering av metoden til Acharya (1984; J. Chrom 297:37-38). Peptid ble oppløst i PBS (2,5 mg/ml), fulgt av tilsetning av DL-glyceraldehyd og natriumcyanoborhydrid (Sigma, St. Louis, MO) til en endelig konsentrasjon på henholdsvis 0,1 og 1,0 molar. Reaksjonen ble foretatt ved romtemperatur i 1 time og ble stoppet ved å lyse mot 50 mM ammoniumbikarbonat. Omfanget av derivatisering av lysin-sideresiduer ble bestemt ved aminosyreanalyse.

Karboksylsyre sidekjedene av glutaminsyre og asparaginsyre residuene ble omdannet til glycinmetylestere ved 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid-(EDC)-mediert kondensasjon (Lungblad og Noyes, 1985; Chemical Reagents for Protein Modification, Vol II). Peptid ble oppløst i dobbelt destillert vann ved 2 mg/ml og gjort 1M i glycinetyleter (Sigma). pH ble justert til 4,3 med 0,1M HCl og EDC ble tilsatt til en konsentrasjon på 0,1M. Oppløsningen ble blandet i 3 timer ved romtemperatur med justering av pH tilbake til 4,3 etter 30 min., og igjen etter 1,5 time. Reaksjonen ble stoppet ved dialyse mot PBS. Derivatiseringsgraden ble bestemt ved økning av glycinmolarforholdet sammenlignet med det uderivatiserte peptid. En derivatisering ble foretatt hvor etanolamin ble brukt istedet for glycinmetylester, og et kontrollforsøk ble utført hvor kun EDC ble blandet med peptidet.

Fenylsidekjedene til tyrosinresiduene ble oksydert ved tilsetning av 10 µl tetranitrometan (TNM; Sigma) til hver ml

av 1 mg/ml peptid oppløst i 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 8,0), og blanding i 1 time ved romtemperatur fulgt av dialyse mot Tris/NaCl buffer (pH 8,0) for å fjerne TNM.

Aminosyresekvensen av de tre D-gjentakelser er vist i figur 1. D1- og D2-gjentakelsene viser en høy grad av homologi som er forskjellig kun i 5 av 38 residuer (87% homologi), mens D3 viser mindre enn 50% homologi med D2. Imidlertid, som bemerket tidligere (Signas *et al.*, 1989), fremskaffet peptidet en 50% inhibering av ¹²⁵I-HFN-binding til celler av *S. aureus* 8325-4 ved en konsentrasjon på 2 µg/ml, mens konsentrasjoner på 90 µg og 230 µg/ml for D2 og D1 var henholdsvis nødvendig for å gi samme grad av inhibering. Søker valgte følgelig peptid D3 for videre karakterisering.

Kjemisk modifisering

Tabell 1 består av data fra aminosyre-sammensetningsanalysen av peptidet D3 og dets derivatiseringprodukter. Dihydroksypropylering av lysin-sideresiduen var kvantitativt fullstendig, og viste mer enn 98% reduksjon i lysininholdet sammenlignet med D3. En mindre sidereaksjon som normalt inntreffer ved bruk av denne fremgangsmåte, var derivatiseringen av fenylalanin i posisjon 1 via dets frie NH₂-gruppe, som angitt ved en svak økning i fenylalanininnholdet. Omdannelse av asparaginsyre og glutaminsyre-residuer til glycinmetyler var også kvantitativt fullstendig som angitt ved endringen i glycininnhold fra 54 residuer pr. 1.000 til 293. Dette er verdien som er ventet for de glycinresiduer i D3, og de 9 ytterligere residuer som ble lagt til ved fullstendig kjemisk modifisering av asparaginsyre/glutaminsyreresiduen. Den TNM-medierte oksydering av tyrosin ble også vellykket og viste en 95% reduksjon i tyrosininhold.

Figur 2 viser inhiberingsaktiviteten av de kjemisk modifiserte peptider sammenlignet med den til umodifisert D3. Selv om lysin- og tyrosin-modifiseringene kun delvis senket

aktiviteten til D3, resulterte modifisering av asparaginsyre-
/glutaminsyreresiduen i totalt tap av aktivitet. Dette
resultat ble observert med enten glysinmetylester eller
etanolaminkondensering og karboksylsyresidekjedene. Som en
5 kontroll viste EDC-behandling alene kun et lite tap i
aktivitet sammenlignet med det observert med lysin- og tyro-
sin-modifiseringene. Det observerte tap av aktivitet er
følgelig grunnet spesielt modifisering av karboksylside-
kjeder.

10 Revers-fase HPLC av trypsin-, kymotrypsin- og endoprotease-
Glu-c-fordøyinger av D3 bekreftet at peptidsubstratet var
fullstendig omgjort til mindre produkter. Representative
revers-faseprofiler av D3 og dets tryptiske fordøyinger er
vist i figur 3, sammen med identiteten til fragmentene som
15 etterfølgende ble renset. Initielle assays ble utført med
grovfordøyinger i nærvær av passende proteaseinhibitorer
for å undersøke for binding av enten ^{125}I -HFN eller det ^{125}I -
29 kDa N-terminale fragment til en S. aureus cellesuspensjon
(fig. 4). Etter fullstendig trypsinfordøyning, som bekreftet
20 i fig. 3, viste de resulterende ufraksjonerte spalt-
ningsprodukter lite tap i biologisk aktivitet, mens
kymotrypsinfordøyinger viste ingen inhibitorisk aktivitet.
Resultatene var mindre klare med endoprotease-Glu-c-for-
døyingen som viste inhibitorisk aktivitet ved å bruke ^{125}I -29
25 kDa som ligand, men ingen med ^{125}I -HFN. Dette kan være
grunnet endringer i konformasjon når det N-terminale domene
blir fjernet ved proteolytisk spaltning.

Figur 1 viser aminosyresekvensene av flere spaltning-
produkter som ble renset fra grovfordøyinger ved revers-
30 fase HPLC. Hovedspaltningsproduktet renset fra trypsin-
fordøyingen bestod av residuer 15-36 (T15-36) av det 37
aminosyrerstore D3, og biologisk aktivitet ble beholdt av
dette peptid (fig. 5). Videre fordøyning av dette peptid med
lysinendopeptidase-c resulterte i fjerning av et N-terminalt
35 dipeptid og dannet TL17-36 som fremdeles viste inhibitorisk
aktivitet. Spaltning av T15 - 36 med endoprotease-Glu-c-

resulterte i fjerning av C-terminalt heksapeptid og påfølgende tap av aktivitet. Sekvensene av peptider isolert fra endoprotease Glu-c og kymotrypsin-fordøyinger av D3 er også gitt i fig. 1. Ingen av disse peptider hadde inhibitorisk aktivitet (fig. 5).

Siden T15-36 viste biologisk aktivitet lignende den til D3 ble flere syntetiske peptider som omfattet denne sekvens konstruert (fig. 2), og undersøkt for biologisk aktivitet (fig. 6). Peptid S16-36, et residium kortere ved N-terminalen enn T15-26, ga 50% inhibering av fibronektinbinding ved en konsentrasjon på 10 nmol/ml sammenlignet med 3 nmol/ml for D3. I betraktning av at peptid TL17-36 opprettholdt biologisk aktivitet konstruerte søker peptid S17-33 for å undersøke for betydningen av de C-terminale aminosyrer i fibronektinbinding. Det ble funnet å ha en markert redusert, men konsistent reservert biologisk aktivitet som fremmer 50% inhibering av fibronektinbinding ved en konsentrasjon på 100 nmol/ml. Videre reduksjon av størrelse av dette peptid fra N-terminalen som danner S20-33 resulterte i et nesten fullstendig tap av aktivitet. Imidlertid resulterte utvidelse av peptid, S20-33, fra C-terminalen for å danne S20-36 i et peptid som hadde et aktivitetsnivå som var sammenlignbart med det til D17-33, som viser 50% inhibering ved 200 nmol/ml. Peptid S21-36 som fremdeles viste inhiberingsaktivitet som var direkte proporsjonal med mengden av peptid, men var omkring 10 ganger mindre effektiv enn S20-36. Søker har følgelig redusert det fibronektinbindende område av D3 til et kjernepeptid S20-33, som er essensielt for aktivitet, men alene ikke er tilstrekkelig til å inhibere binding. Tilføring av sekvensen PSY til N-terminalen eller LPK til C-terminalen resulterte i peptider med lignende biologisk aktivitet. Noen ytterligere reduksjon i størrelse av disse peptider forårsaker en stor reduksjon i aktivitet.

Adhesjon av bakterier til fibronektin er blitt foreslått som en virulensfaktor som tillater bakterier å kolonialisere

sårvev og blodaggregater (Ryden et al., 1983, JBC 258: 3396-3401; Proctor et al., 1982, JBC 257: 14788-14794); og det å forhindre denne interaksjon, er et attraktivt mål for enten profylaktiske eller vaksinerings-studier. Noe fremskritt mot å oppnå dette mål er blitt tidligere rapportert fra tidligere studier av fibronektinbinding av Treponema palladium (Thomas et al., 1985, J. Exp. Med., 14-25) og Trypanosoma cruzi. Et monoklonalt antistoff som inhiberer festing av eukaryote celler til fibronektinbelagte substrater blokkerer også bindingen av fibronektin til Treponema palladium (Thomas et al., 1985a) og Trypanosoma cruzi (Ouaissi et al., 1986; J. Exp. Med., 162: 1715-1719). Binding ble også forhindret av peptidet RGDS, aminosyrasekvensen inne i det cellebindende av fibronektin som blir gjenkjent av de eukaryote fibronektinintegrinreseptorer (Thomas et al., 1985b; J. Exp. Med. 162: 1715-1719; Ouaissi et al., 1986). Dette samme peptid blokkerte også festing av sprocheter til dyrkede humane celler. Imidlertid må det bli tatt i betraktning at RGDS-peptidet også ville oppheve rollen til fibronektin. For det andre er disse mikroorganismer uvanlige i sin spesifisitet for det cellebindende domene til fibronektin.

Fremgangsmåten har vært å karakterisere interaksjonen mellom fibronektin og S. aureus reseptoren ved det molekylære nivå via bruk av syntetiske peptider.

Resultater fra kjemisk modifisering av D3-peptidet indikerer at glutaminsyre- og sparaginsyre-residuene er essensielle for binding til fibronektin. Dette er av spesiell interesse ettersom motivet til enten FEEDT eller DFEEDT opptrer i hver av de tre D3-gjentakelser til S. aureus FN-reseptoren. Faktisk er dette motiv gjentatt to ganger i del tre. Videre viser sekvensdata erholdt fra gener som koder for 2 fibronektinrespetorer til Streptococcus dysgalactia hver tre gjentakende sekvenser inneholdende enten DFTEEDT-(gene I) eller EVEDT-(gen II)- motiver i hver av gjentakelsene (innlevert for publisering). Tap av aktivitet ved spaltning

ved endoprotease Glu-c kan være grunnet ødeleggelse av FEEDT-motivet og er ytterligere indikasjon på at sure aminosyreresiduer er involvert.

Aktiviteten vist av det D3-tryptiske fordøyingsprodukt T15-
5 36, og syntetisk peptid S16-36 lokaliserte effektivt den fibronektinbindende determinant av D3 til den C-terminale halvdel av peptidet som inneholder FEEDT- motivet. Det er interessant at sekvensen i IEEDT også opptrer nær N-terminalen av D3 (Residuum 8-12) og at repetisjonene D1 og D2
10 inneholder FEEDT ved samme beliggenhet. Tilstedeværelsen av dette motiv gjentatt to ganger i D3 kan være ansvarlig for dets vesentlig høyere biologiske aktivitet sammenlignet med D1 og D2.

Forsøk på ytterligere å lokalisere den fibronektinbindende
15 determinant innen peptid S16-36 resulterte i vesentlige tap av biologisk aktivitet. Søker antar at peptid S20-33 inneholder aminosyreresiduene som etablerer kontakt med og binder til fibronektin. Dette peptid i seg selv viser i hovedsak ingen aktivitet. Imidlertid resulterte tilsetning
20 av tripeptidet PSY til N-terminalen (S17-33) eller LPK til C-terminalen (20-36) i dramatisk gjenvinning av aktivitet. Hvis dette kjernepeptid skulle ha begge flankerende sekvenser, ville det være et residuum kortere ved N-terminalen enn peptid S16-36 som hadde et aktivitetsnivå som var direkte
25 sammenlignbart med D3. Søkers kjemiske modifiserings-eksperimenter indikerte at hverken tyrosin eller lysin er involvert i kontakter med fibronektin. Søker antar at de PSY- og LPK-flankerende tripeptider ikke er involvert i kontakter med fibronektin, men er nødvendige for peptidet
30 for å innta en passende og stabil konformasjon. Søker merker seg at tap av 1 aminosyre fra N-terminalen hos S20-36 forårsaket en større en 10 ganger reduksjon i aktivitet.

Det tidligere studium av D3 og ZZ-FR fusjonsproteinet
(Signas et al., 1989), i kombinasjon med foreliggende re-
35 sultater indikerer at mens et dramatisk fall av aktivitet

intreffer når kontinuiteten av de tre tandem D-repetisjoner blir forstyrret, er endringen i aktivitet når D3 er redusert til S17-36 ganske irrelevant. Ytterligere reduksjon i størrelsen av S17-36 forårsaker et tap i aktivitet som kan

5 sammenlignes med det observert via fysisk separasjon av tandem-gjentakelsene. Følgelig gir den sekundære struktur av de individuelle gjentakelser et affinitetsnivå for fibronektin og den tertiære organisering av de tre gjentakelser resulterer i en affinitet som er en størrelsesorden høyere.

10 Et tredje hypotetisk, og til nå utforsket, organiseringsnivå og ytterligere økning i affinitet for fibronektin kan bli oppnådd via den kvarternære organisering av fibronektinreseptorer på celleoverflaten av S. aureus 8325-4.

Tabell 1

Aminosyresammensetning av peptid D3 og dets derivatiseringsprodukter

		Aminosyreresiduer pr. 1,000			
		<u>Umodifisert</u>	<u>DHP-K¹</u>	<u>Gly-OCH^{2,3}</u>	<u>TNM-V³</u>
5	Asx*	217,7 (189,2)	226,8	155,9	157,1
	Glx*	156,3 (162,2)	193,4	138,4	175,9
	Ser	51,4 (54,1)	58,7	44,7	57,7
	Gly*	54,6 (54,1)	62,7	292,7	64,6
	His	57,4 (54,1)	65,8	43,5	46,6
10	Arg	-	-	-	-
	Thr	82,7 (81,1)	95,3	76,9	100,6
	Ala	-	-	-	-
	Pro	54,5 (54,1)	63,5	49,9	60,4
	Tyr*	18,2 (27,0)	23,4	10,5	0,9
15	Val	51,6 (54,1)	61,6	39,3	57,1
	Met	-	-	-	-
	Cys	-	-	-	-
	Ile	29,3 (54,1)	33,8	26,8	31,8
	Leu	30,6 (27,0)	33,5	22,2	32,8
20	Phe	70,2 (81,1)	55,0	57,6	72,1
	Lys*	107,9 (108,1)	2,4	89,2	100,9

Aminosyrer enten målrettet for eller påvirket av kjemisk modifisering er angitt med asterisker. Tall i parentes refererer til de ventede verdier basert på kjente sammenligninger av D3.

- 1 Dihydroksypropyleringsreduksjon av lysin.
- 2 Omdannelse av asparaginsyre og glutaminsyre residuer til glycinmetylestere.
- 3 Tetranitrometanoksidering av tyrosin.

Det foreliggende fibronektinbindende peptid kan bli brukt for immunisering, hvorved peptidet fortrinnsvis i kombinasjon med et fusjonsprotein for å danne et stort antigen å reagere mot, injiseres i doser som forårsaker immunologisk reaksjon hos vertsdyret. Således kan det fibronektinbindende peptid bli brukt i vaksinerings av drøvtyggere mot mastitis forårsaket av stafylokokkinfeksjoner.

Videre kan det fibronektinbindende peptid bli brukt til å blokkere en infeksjon i et åpent hudsår ved sårbehandling ved å bruke det fibronektinbindende peptid i en suspensjon. Således kan det fibronektinbindende peptid bli brukt for behandling av sår f.eks. for å blokkere proteinreseptorer eller for immunisering (vaksinerings). I det sistnevnte tilfellet danner vertslaget spesifikk antistoff som kan beskytte mot invasjon av bakterielle stammer omfattende et slikt fibronektinbindende peptid. Herved blokkerer antistoffene festingen av de bakterielle stammer til skadet vev.

Eksempler på kolonialisering av en vevsskade er:

- a) å kolonialisere sår i hud og bindevev hvilke sår er forårsaket av mekanisk trauma, kjemisk skade og/eller termisk skade;
- b) å kolonialisere sår på mukøse membraner så som i munnhulen, eller i melkeproduserende kjertler, uretra eller vagina;
- c) å kolonialisere på bindevevsproteiner som er blitt eksponert ved en minimal vevsskade (mikrolesjon) i forbindelse med epitelium og endotelium (mastitis, hjerteklaffinfeksjon, hofteutbyttings-kirurgi).

Ved foreliggende FNBP, eller peptidet, blir brukt for formål med immunisering (vaksinerings) i pattedyr innbefattende mennesket blir peptidet dispergert i steril isotonisk saltoppløsning, eventuelt under tilsetning av farmasøytisk

akseptable dispergeringsmidler. Forskjellige typer adjuvanter kan videre bli brukt for å opprettholde frigjøringen i vevet, og således eksponere peptidet for en lengre tid til det immunbeskyttende system i kroppen.

- 5 En passende dosering for å erholde immunisering er 0,5 til 5 µg av peptidet pr. kg kroppsvekt og injeksjon av immunisering. For å erholde en vedvarende immunisering bør vaksineringsbli utført ved mer enn ett påfølgende tilfelle med et intervall på 1 til 3 uker, fortrinnsvis ved 3 tilfeller.
- 10 Når foreliggende peptid blir brukt for topisk, lokal tilførsel blir proteinet dispergert i en isoton saltoppløsning ved en konsentrasjon på 25 - 250 µg pr. ml. Sårene blir så behandlet med en slik mengde kun for å erholde en fullstendig fuktning av såroverflaten. For et gjennomsnittlig sår
- 15 blir således kun et par ml oppløsning brukt på denne måte. Etter behandling ved å bruke peptidoppløsning blir sårene passende vasket med isoton saltoppløsning eller annen passende sårbehandlingsoppløsning.

- Videre kan det fibronektinbindende peptid så vel som det
- 20 minimale fibronektinbindende setepeptid fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse bli brukt til å diagnostisere bakterielle infeksjoner forårsaket av stafylokokkstammer, hvorved det fibronektinbindende peptid fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse blir mobilisert på et fast bære-
- 25 middel så som små latex- eller sefarosekuler, hvorpå serum inneholdende antistoff blir tillatt å passere og å reagere med FNBP således immobilisert. Agglutinerings blir så målt ved kjente metoder.

- Videre kan peptidet bli brukt i en ELISA-test (Enzymtil-
- 30 knyttet Immuno Sorbent Assay; E Engvall, Med. Biol. 55, 193, (1977)). Herved blir brønner i en polystyrenmikrotiterplate belagt med FNBP og inkubert over natten ved 4°C. Platene blir så grundig vasket ved å bruke PBS inneholdende 0,05% TWEEN 20, og tørket. Seriell fortykning av pasientens serum

ble foretatt i PBS-TWEEN, ble tilsatt brønnene og inkubert ved 30°C i 1 1/2 timer. Etter rensing med henholdsvis anti-human IgG-konjugert med et enzym, eller et antibovinn-IgG-konjugert med et enzym, ble pepperrot-peroksydase eller en alkalisk fosfatase tilsatt til brønnene og inkubert ved 30°C i 1 1/2 time, hvorpå IgG hadde blitt bundet dertil, og etter rensing, blir et enzymsubstrat tilsatt, henholdsvis et p-nitrofosfat i tilfelle med en alkalisk fosfatase eller ortofenylendiaminsubstrat (OPD) i tilfelle en peroksydase er blitt brukt. Platene omfattende brønnene blir således renses ved å bruke en citratbuffer inneholdende 0,005/ OPD, og 0,005% H₂O₂, og inkubert ved 30°C i 10 min. Enzymreaksjonen ble stoppet ved å tilsette 4N oppløsning av H₂SO₄ til hver brønn. Fargeutviklingen ble målt ved å bruke et spektrofotometer.

Avhengig av typen enzymsubstrat som ble brukt, kan fluoresensmåling også bli brukt.

En annen metode for å diagnostisere stafylokokkinfeksjoner er ved å bruke DNA gen-probemetoden basert på peptidsekvensen. Derved blir de naturlige eller syntetiske DNA sekvenser festet til et fast bæremateriale så som en polystyrenplate som nevnt ovenfor ved f.eks. tilsetning av melk i tilfelle med diagnostisering av mastitis til overflaten. DNA gen-proben, eventuelt merket enzymatisk eller med et radioaktivt isotop, blir så tilsatt til den faste plateoverflate omfattende DNA-sekvensen hvorved DNA gen-proben fester seg til sekvensen hvor den opptrer. Enzymet eller den radioaktive isotop kan så lett bli bestemt ved kjente metoder.

Figur forklaring

30

Figur 1

Aminosyresekvens av tandemgjentakelsene omfattende det fibronektinbindende sete til S. aureus 8325-5 FnBP. Syntetiske peptider tilsvarende hver av gjentakelsene er blitt

gitt navnet D1, D2 og D3. Under sekvensen til D3 er det illustrert sammensetningen av flere proteolytiske spaltningsprodukter av D3-peptidet og av mindre syntetiske peptider som blir brukt for videre å definere den fibronektinbindende determinant til D3. To tall som ligger bak en eller to bokstaver blir brukt for å identifisere de individuelle peptider. Tallene refererer til posisjonen av den N- og C-terminale residuer til hvert peptid innen den 37 aminosyrers store sekvens til D3. Bokstavene V, C og T indikerer henholdsvis spaltningsprodukter isolert fra endoprotease Glu-c, trypsin- og kymotrypsin-fordøyinger av peptid D3. Peptid T15-36 ble underkastet en andre fordøying med enten lysin endopeptidase-c som danner TL17-36, eller med endoprotease Glu-c som danner TV15-30. Bokstaven S blir brukt for å betegne peptider dannet via kjemisk syntese.

Figur 2

Effekt av kjemisk modifisering på egenskapen til peptid D3, å inhibere binding av ^{125}I -HFN til S. aureus 8325-4. Den angitte mengde av peptid ble dannet med 5×10^8 celler og 5×10^4 cpm av ^{125}I -HFN i et assayvolum på 0,05 ml PBX supplementert med 0,1% (vekt/volum) bovinserumalbumin, 0,1% (vol/vol) TWEEN 80, og 0,02% (vekt/volum) natriumazid. Etter 60 min. med roterende blanding ved romtemperatur ble ubundet fibronektin fortynnet ved tilsetning av 3 ml av iskald PBS inneholdende 0,1% (vol/vol) TWEEN 80. Etter sentrifugering ved $1.350 \times g$ i 20 min. ble supernatanten aspirert og radioaktiviteten assosiert med den bakterielle pellet ble mengdebestemt på en LKB gammeteller.

Panel A: Inhibitorisk aktivitet av umodifisert D3 (-), og etter modifisering på tyrosin (Δ - Δ), eller lysin (o-o) residuer.

Panel B: Inhibitorisk aktivitet av umodifisert D3 (-), og etter modifisering av karboksylsyreresiduer med glycin-

metylester (o-o), etanolamin (Δ - Δ), eller EDC reagens alene (\square - \square).

Figur 3

Revers-fase HPLC av peptid D3 før (panel A) og etter (panel B) fordøyning med trypsin. Kromatografering ble foretatt ved å bruke en Vydac C₁₈ analytisk kolonne og TFA-bufret acetonitril som elueringsmiddel ved en strømningshastighet på 1 ml pr. min. Tallene over toppene identifiserer de første og siste residuer av spaltningsproduktene innen sekvensen av D3. Panel C er en profil av trypsin alene.

Figur 4

Assay for egenskapen av peptid D3 å inhibere binding av ¹²⁵I-HFN eller ¹²⁵I-29 kDa fragment av HFN til S. aureus 8325-4 enten før (Δ - Δ), eller etter (o-o) fullstendig fordøyning ved trypsin (A,D), kymotrypsin (B,E), eller endoprotease Glu-c (C,F).

Figur 5

Assay for egenskapen av rensede protease spaltningsprodukter å inhibere binding av ¹²⁵I-HFN til S. aureus 8325-4. ¹²⁵I-HFN bundet av celler ved fravær av peptid ble angitt som 100%, og binding av nærvær av peptider ble uttrykt relativt til denne verdi.

Figur 6

Assay for egenskapen av syntetiske peptider å inhibere binding av ¹²⁵I-HFN til celler av S. aureus 8325-4. Assay-betingelser var som beskrevet i forklaringen til figur 2. Sekvensen av peptidene er illustrert i fig. 1. Resultatene er uttrykt som %-del av fibronektinbundet av celler ved fravær av peptid.

Patentkrav

Analogifremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt fibronektinbindende peptid med strukturen



- 5 hvor R' er hydrogen eller K eller DK, og R² er hydroksyl, L, LP eller LPK,
- k a r a k t e r i s e r t v e d a t peptidet fremstilles ved fastfasesyntese eller syntese i flytende fase, fortrinnsvis en F-moc-syntese; ved at et lengre peptid, som kan
- 10 spaltes, enten enzymatisk eller kjemisk ved de aktuelle aminosyrer, fremstilles ved fastfasesyntese eller syntese i flytende fase, fulgt av spalting av det fremstilte peptid til et peptid med den ovennevnte aminosyresekvens; ved at et
- 15 peptid omfattende aminosyrer som kjemisk kan modifiseres til aminosyrer som inngår i den ovennevnte sekvens fremstilles, og det fremstilte peptid omdannes ved kjemisk modifisering til det ovennevnte peptid ved at delstykker av det ovennevnte peptid syntetiseres kjemisk ved fastfasesyntese eller
- 20 syntese i flytende fase, hvorpå delstykkene bindes sammen for å danne et peptid med ovennevnte aminosyresekvens; fulgt eventuelt av isolering og opprensing av det aktuelle peptid på i en for seg kjent måte.

D1 Q H S G H Q S F E E D T E E D K P K Y E Q G G H I V D I D F D S V P Q I H G
 D2 Q H K G N Q S F E E D T E K D K P K Y E H G G H I I D I D F D S V P H I H G
 D3 F H K H T E I I E E D T N K D K P S Y Q F G G H N S V - D F E E D T L P K V

V1-6

V11-30

V31-37

C1-21

C22-37

T15-36

TV15-30

TL17-36

S16-36

S20-36

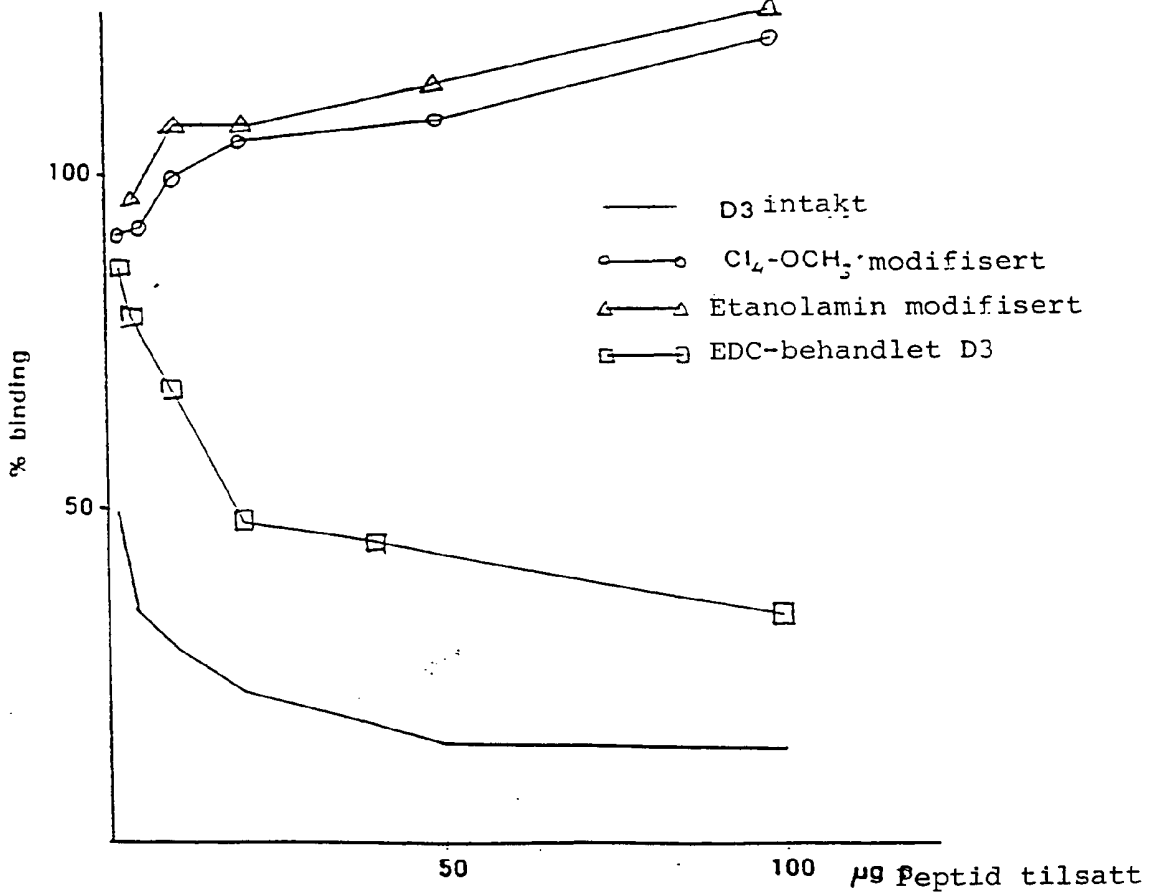
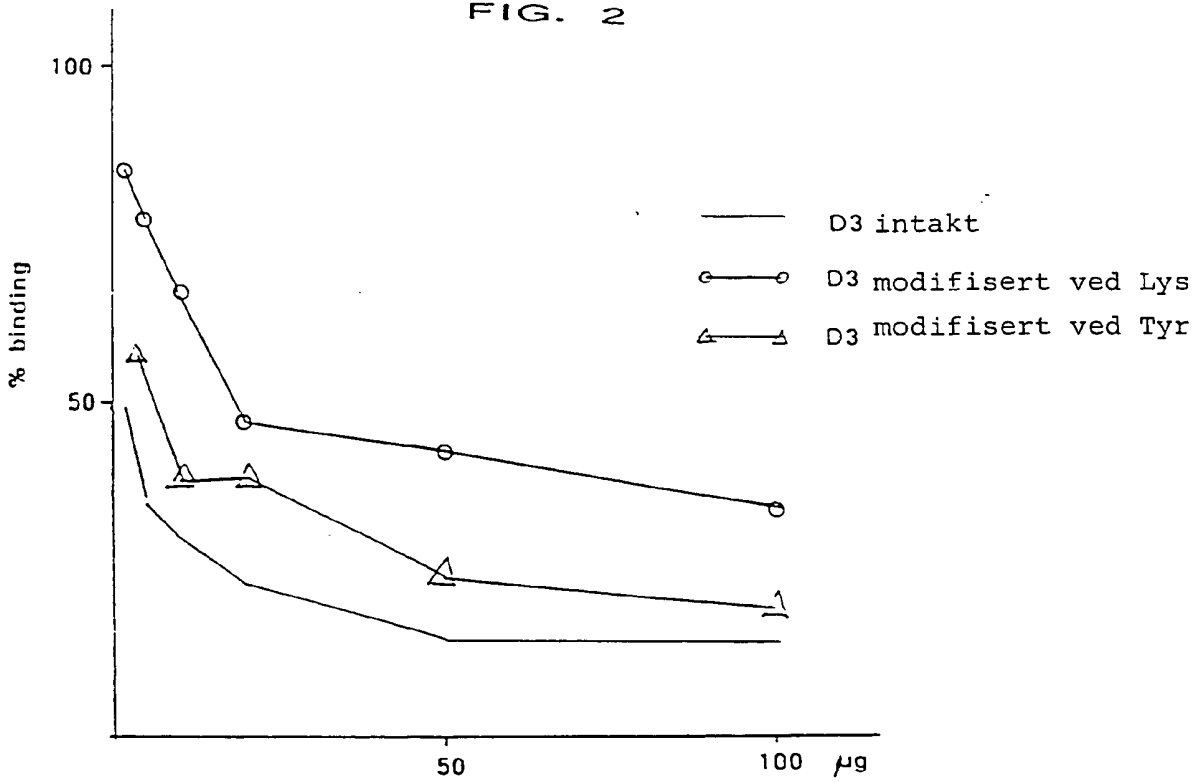
S21-36

S17-33

S20-33

FIG. 1

FIG. 2



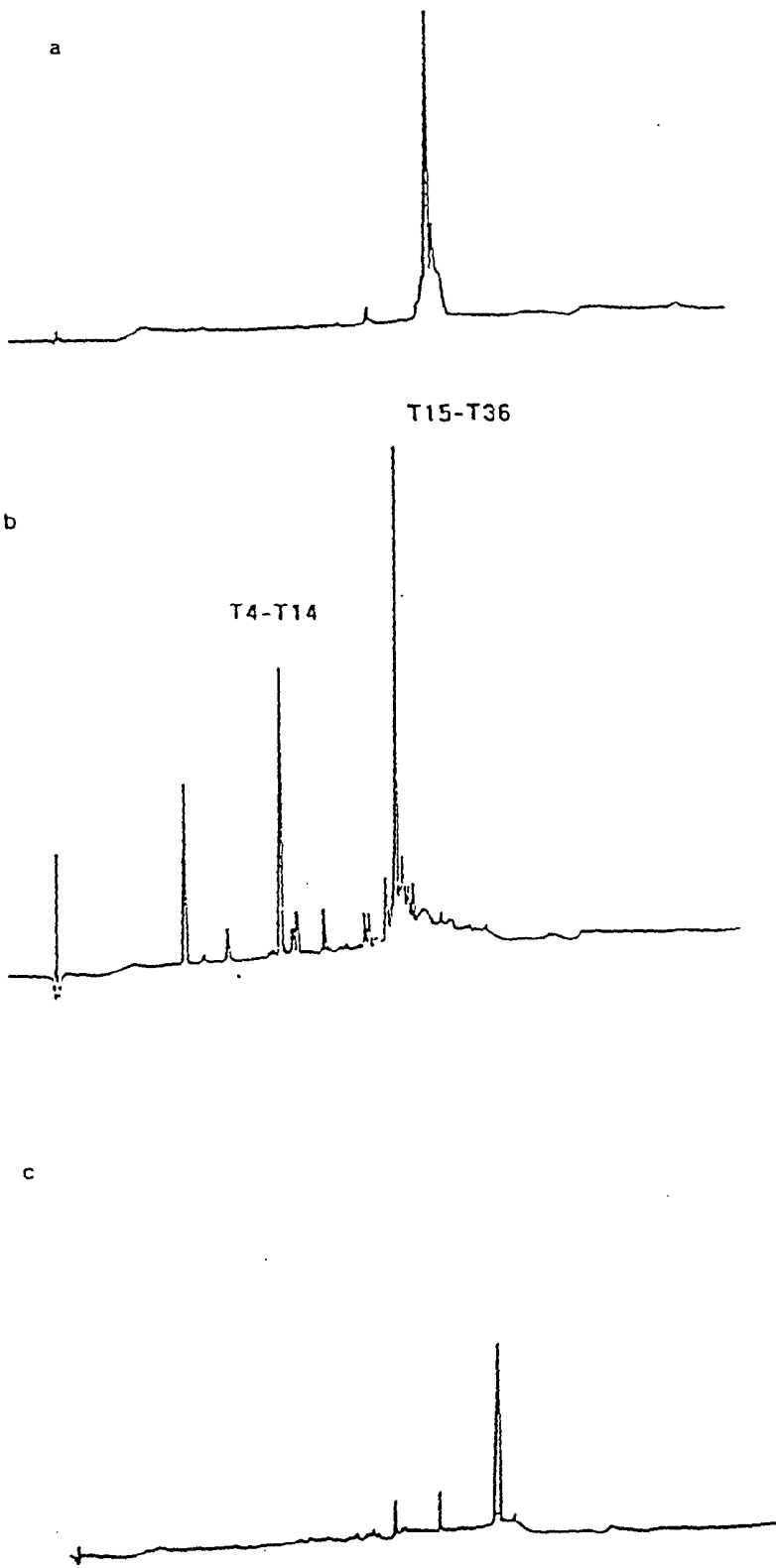


FIG. 3

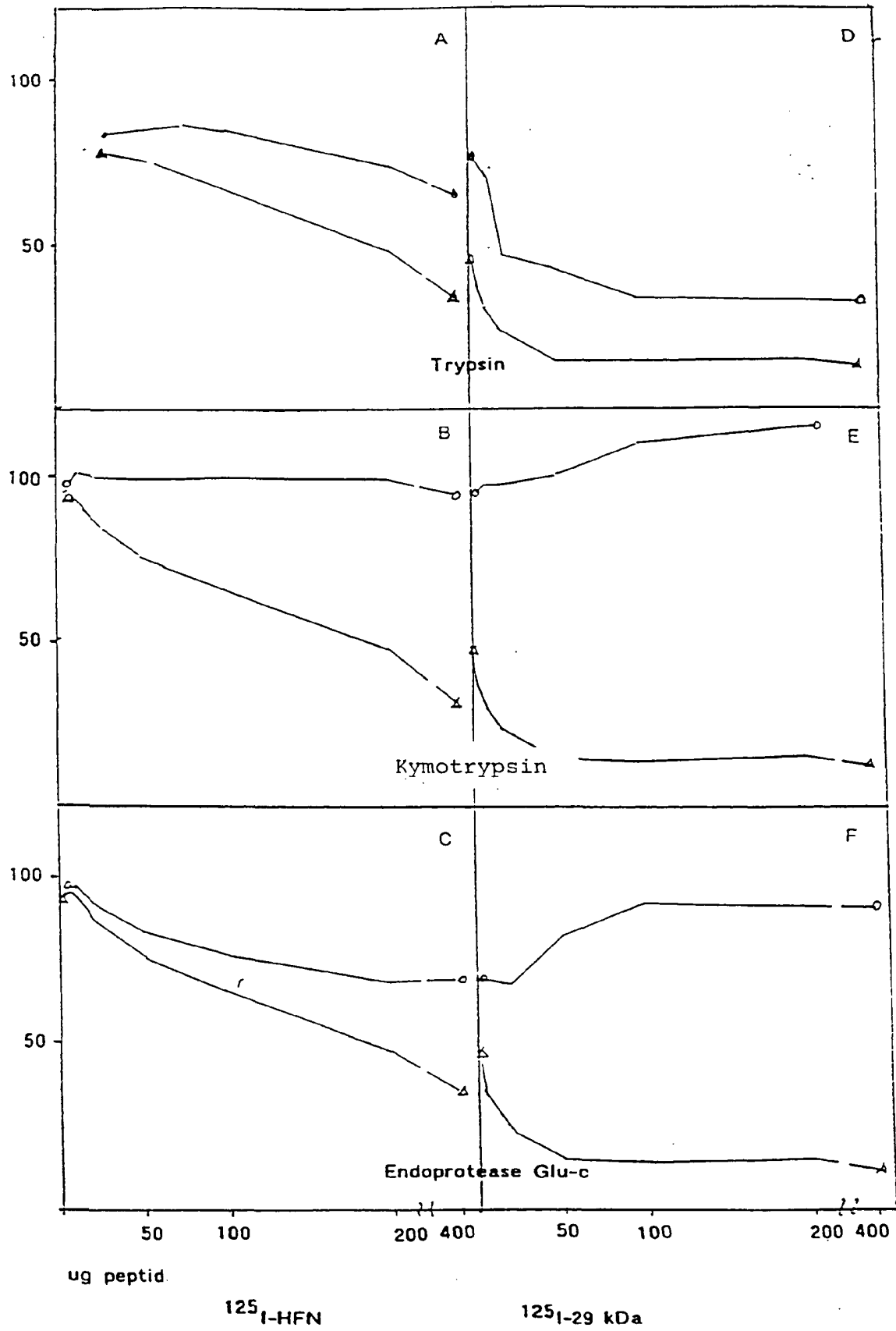


FIG. 4

Bindingsaktivitet (% av kontroll)

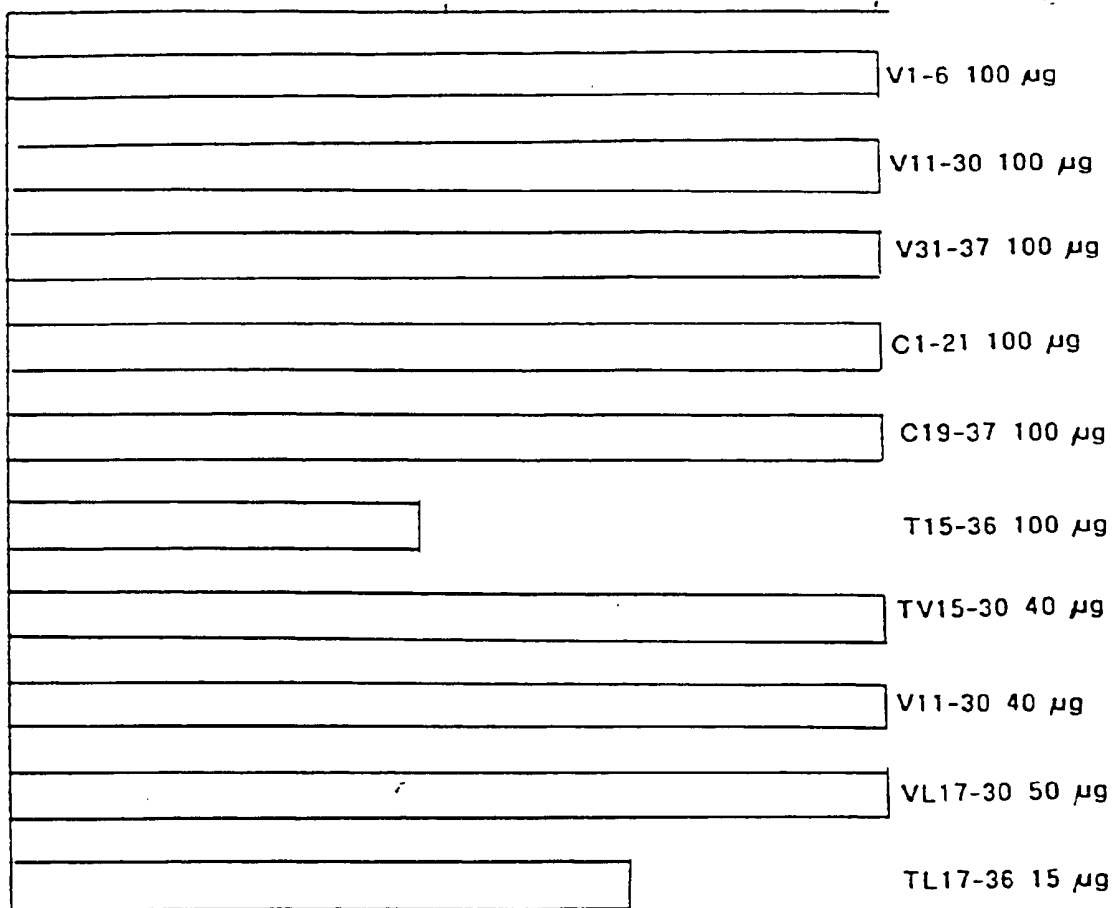


FIG. 5

Inhibering av ¹²⁵I-HFN binding til S. aureus 8235-4 av syntetisk peptid.

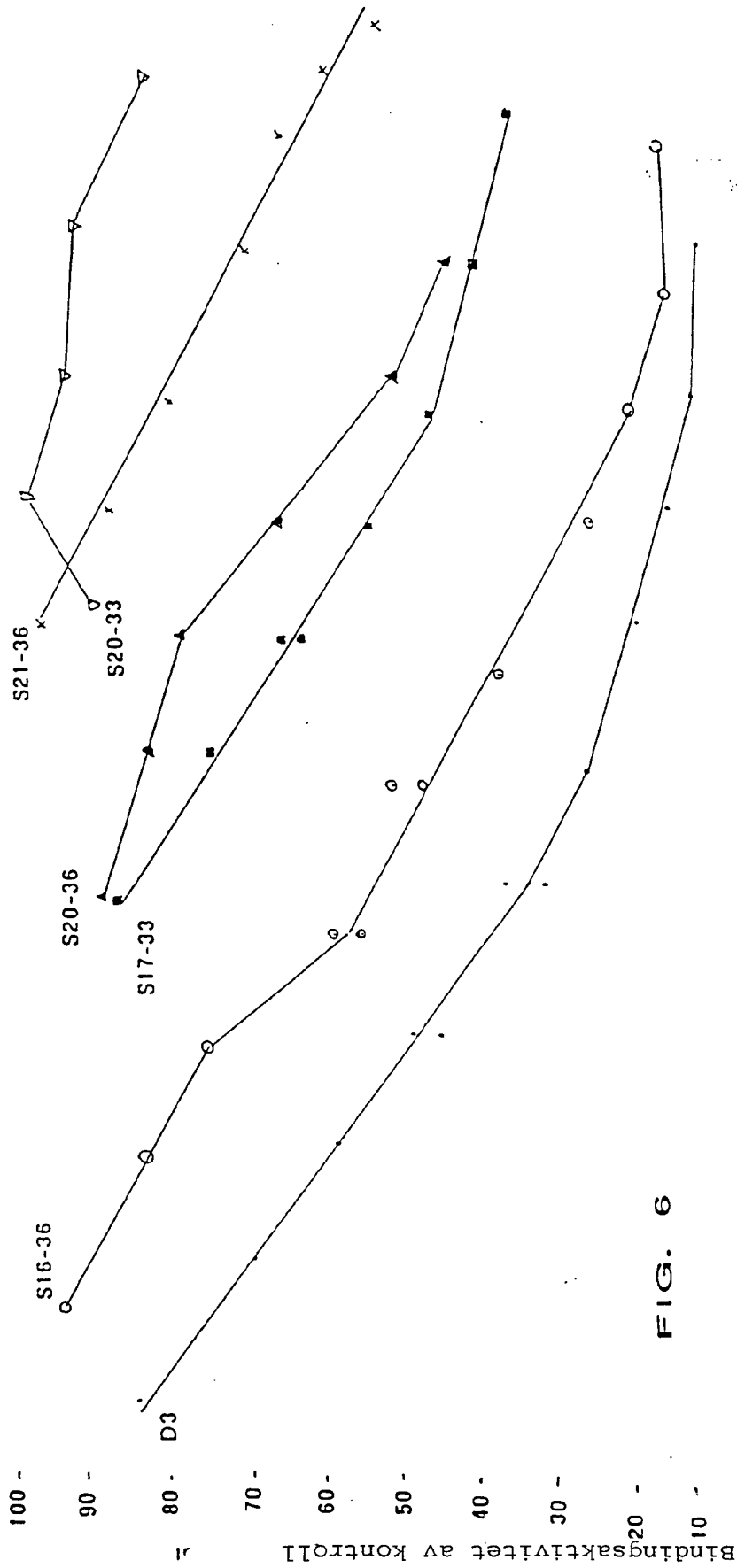


FIG. 6