



(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

219 261 B

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 01211
(22) A bejelentés napja: 1991. 08. 09.
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
90/02617 1990. 08. 10. SE
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/SE 91/00534
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 92/02555

(51) Int. Cl.⁷

C 07 K 7/08

C 07 K 15/04

(40) A közzététel napja: 1992. 11. 30.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2001. 03. 28.

(72) Feltalálók:

Höök, Magnus, Birmingham, Alabama (US)
McGavin, Martin, Birmingham, Alabama (US)
Raucci, Giuseppe, Pomezia (IT)

(73) Szabadalmas:

Alfa-Laval Agri International Aktiebolag,
Tumba (SE)

(74) Képvisező:

S. B. G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

(54)

Fibronektint megkötő peptid

KIVONAT

Jelen találmány fibronektint megkötő peptidre vonatkozik, mely

$R' - \text{PSYQFGGHNS VD FEEDT} - R^2$

szerkezettel rendelkezik, ahol R' hidrogén vagy K, vagy DK, és R^2 hidroxil, L, LP vagy LPK.

HU 219 261 B

Jelen találmány fibronektint megkötő peptidre vonatkozik.

Jelen találmány tárgya a legkisebb lehetséges, fibronektint megkötő polipeptid előállítás.

További tárgya nevezett peptid kémiai szintézissel történő előállítási lehetőségének elérése.

További tárgyait a következő leírás világítja meg.

A találmány háttere

WO-A1-85/05553 olyan bakteriális sejtfelületi proteinek ismertetését, melyek fibronektint, fibrinogént, kollagént és/vagy laminint megkötő képességgel rendelkeznek. Ezáltal bemutatásra került, hogy különböző baktériumok képesek fibronektint, fibrinogént, kollagént és/vagy laminint megkötni. Továbbá bemutatásra került, hogy a fibronektint megkötő protein molekulásúlya 165 kD és/vagy 87 kD, így lehetséges, hogy a kisebb protein a nagyobbak részét képezi.

A fibronektin diszulfidkötésű, dimer glikoprotein ($M_r=450\ 000$), ami oldható formában van jelen a vérplazmában és más testnedvekben, és rostos formában rakódik le, mint a laza kötőszövet extracelluláris sejtközi állományának fő alkotórésze. Három különböző szerkezetű elemből áll, melyeket I., II. és III. típusú homológoknak neveznek (Petersen *et al.*, 1983; PNAS), aminek végeredménye a fibronektinmolekula modulszerű szerkezete, amelynek különböző biológiai hatásai meghatározott doméneknek tulajdonítható.

A fibronektin fő biológiai szerepe abban mutatkozik meg, hogy rendelkezik a képességgel, hogy elősegítse az eukariótasejteknek az extracelluláris sejtközi állománnyal való összekapcsolódását különálló sejt felszíni receptorok és a molekula teljes egészében a III. típusú homológ egységekből képzett 105 kDa-os központi területe közötti specifikus kölcsönhatáson keresztül (Pierschbacher and Ruoslahti, 1984, *Nature*, 309: 30-33). A sejt megkötő domént C-terminális végén egy 31 kDa-os heparinmegkötő domén és egy 30 kDa-os fibrinmegkötő domén követi. A sejt megkötő domént megelőzi egy 42 kDa-os zselatin (kollagén)-megkötő domén és egy N-terminális 29 kDa-os domén, ami öt egymást követő, I. típusú ismétlődésből áll, ami fibrint, heparint és baktériumokat köt meg (Yamada, 1983, *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 761-799).

Több kórokozó Gram-pozitív staphylococcuszal és streptococcuszal kapcsolatban beszámoltak arról, hogy kizárólag a fibronektin 29 kDa-os N-terminális doménjéhez kapcsolódnak (Speziale *et al.*, 1984, *J. Bacteriol.* 157: 420-427; Mosher and Proctor, 1980, *Science* 209: 927-929). Néhány Gram-negatív bélbaktérium, név szerint *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* és *S. dublin* szintén említésre került, hogy megköti a fibronektint (Froman *et al.*, 1984, *JBC* 259: 14 889-14 905; 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.*, 1986, *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 225-229; Baloda *et al.*, 1985, *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 1-5; Kristiansen *et al.*, 1987), és *E. colival* kapcsolatban beszámoltak arról, hogy a baktériumok megkötik a 29 kDa-os N-terminális domént és egy másik, nem azonosított területet (Froman *et al.*, 1984). Ezzel szemben a spirochéta *Treponema pallidum* és a Trypanosoma *Trypanosoma cruzi* különböznek a többi, fibronektint megkötő mikroorganizmustól a 105 kDa-os eukarióta sejt megkötő domén iránti specifitásuk tekintetében (Thomas *et al.*, 1985a, *J. Exp. Med.* 161: 514-525; Ouaiissi *et al.*, 1986, *J. Exp. Med.* 162: 1715-1719).

E mikroorganizmusok és fibronektin közötti kölcsönhatás disszociációs állandói 10^2 - 10^3 -szor nagyobb affinitást mutatnak, mint amiről ép fibronektinnek humán kötőszöveti sejtekhez való kapcsolódása esetén beszámoltak (Hook *et al.*, 1989; Akiyama and Yamada, 1985, *JBC* 260: 4492-4500). A fibronektinnek ez az affinitása ártalmas tényező lehet, elősegítve a sérült szövetek és vérrögök bakteriális fertőződését, mivel a fibronektinben gazdag sejtközi állomány, mint ismeretes, a sebgyógyulás első és második hetében lerakódik (Kurikinen *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). Jelen kutatásunk célja az volt, hogy jellemezzük a mikrobiális, fibronektint megkötő proteinek (FnBP-k), és receptoranalógokat fejlesszünk ki lehetséges terápiás alkalmazásra a sebfertőzés kockázatának megelőzésére vagy csökkentésére.

Az FnBP-kről szóló tanulmányok eddig főként az *S. aureus* FnBP-jével foglalkoztak. 210 000 M_r -rel rendelkező FnBP-ről számolt be három laboratórium (Esperesen and Clemmensen, 1982, *Infect. Immun.* 37: 526-531; Froman *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 6564-6571; Signas *et al.*, 1989, *PNAS*, 86: 699-703). Az *S. aureus* 8325-4 FnBP-jét kódoló gént klónozták és kifejezték *E. coliban* (Flock *et al.*, 1987, *EMBO J.*, 2351-2357). A fibronektint megkötő aktivitást lokalizálták 600 bázispárnyi szakaszban, melyek, amikor egyesültek szerkezetileg a staphylococcus A protein két IgG-kötő doménjét kódoló DNS-sel, ZZ-FR-rel jelölt proteinfúziót hoztak létre, ami ugyanolyan, fibronektint megkötő hatással rendelkezett, mint a természetes 210 kDa-os receptor. Az ezt követő DNS-szekvencia-analízis azt mutatta, hogy a 600 bázispárszakasz 184 aminosavat kódol, melyek közül kiemelkedett egy 38 aminosavas homológ egység, ami háromszor és részben negyedszer ismétlődött (Signas *et al.*, 1989).

Úgy találtuk, hogy minden homológ egység szintetikus peptidanalógiái, melyeket D1-gyel, D2-vel és D3-mal jelölünk, hatékonyan gátolták fibronektinnek *S. aureus* 8325-4-hez való kapcsolódását. A harmadik homológ egység alapján előállított D3-peptid 50-100-szor hatékonyabb volt, mint fibronektin kapcsolódás inhibitora, de jelentős eltérést mutatott az alap-homológ egységtől. Jelen találmányban továbbá meghatározzuk a fibronektint megkötő determinánst a D3 homológ egységben kémiai módosítás, proteolitikus hasítás útján, valamint számos, a D3-szekvenciát tartalmazó kisebb peptid kémiai szintézisének útján.

Jelen találmány leírása

Jelen találmány a legkisebb lehetséges, fibronektint megkötő peptidre vonatkozik, melynek szerkezete $R'-PSYQFGGHNSVDFEEDT-R^2$,

ahol R' hidrogén, K vagy DK, és R² hidroxi, L, LP vagy LPK, amiből

A Ala, alanin
R Arg, arginin
N Asn, aszparagin
D Asp, aszparaginsav
C Cys, cisztein
C Cys, cisztin
G Gly, glicin
E Glu, glutaminsav
Q Gln, glutamin
H His, hisztidin
I Ile, izoleucin
L Leu, leucin
K Lys, lizin
M Met, metionin
F Phe, fenil-alanin
P Pro, prolin
S Ser, szerin
W Trp, triptofán
Y Tyr, tirozin
V Val, valin

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktériumok és táptalajok

Lofdahl *et al.* (1983, PNAS USA 80: 697–701) által leírt *Staphylococcus aureus* 8325–4-et mély agar-agarban, 4 °C-on tároltunk. A tenyészetek agy-szív infúzió (Brain Heart Infusion) táptalajba (Difco, Detroit, MI) való oltással indultak fejlődésnek. Egy éjszakán át tartó, 37 °C-os inkubálás után a baktériumokat centrifugálással összegyűjtöttük, 0,02% (súly/térfogat) nátrium-azidot tartalmazó, foszfátpuffer sóoldatban (pH=7,4) szuszpendáltuk, és a szuszpenziót 10¹⁰ sejt/ml értékre állítottuk be egy, az optikai sűrűség alapján történő sejtszámlálásra vonatkozó standard görbe segítségével. A sejteket azután 88 °C-on, 20 perc alatt előltük, egyenlő részekre osztottuk és –20 °C-ra fagyasztva tároltuk.

Ligandumok készítése és jódozása

Humán fibronectint a New York-i Vérellátó Központtól (New York Blood Center) vásároltunk, vagy ugyanabból a forrásból beszerzett régi plazmából nyertük ki, ahogy azt Engvall és Rouslahti leírta (1977, Int. J. Cancer Res. 20: 1–5). A fibronectin 29 kDa-os, N-terminális doménjének megtisztításához humán fibronectint 1 mg/ml-re hígítottunk 25 mM tris-HCl-ből (pH=7,6), 50 mM nátrium-kloridból, 2,5 mM kalcium-kloridból és 0,5 mM etilén-diamin-tetraecetsavból (EDTA) álló pufferben. Proteázfeltárás kezdődött minden 1 mg fibronectinre számított 5 µg termolizin (Calbiochem, La Jolla, CA) hozzáadásával, amit 2 órán keresztül szobahőmérsékleten való inkubálás követett állandó keveréssel. A reakciót EDTA 5 mM-ig történő hozzáadásával állítottuk le. A 29 kDa-os fragmenst azután a feltárt anyag Sepharose CL–4B-hez (Pharmacia, Uppsala, Svédország) kapcsolt ZZ–FR fúziós proteint (Flock *et al.*, 1987) tartalmazó affinitás-gélmátrixon való átbochtásával izoláltuk, és ezt követően foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) 4 M guanidin-hidrokloriddal eluáltuk. Az eluátumot azután nagymértékben dializáltuk PBS-sel szemben. A fibronectin vagy a

29 kDa-os fragmens jódozását Hunter klór-amin T protokollja szerint végeztük (1978).

Fibronectin megkötésének vizsgálata

5 Szintetikus peptideket elemeztünk fibronectint megkötő hatékonyság szempontjából, képességük mérésével, hogy összehasonlítsuk az *S. aureus* 8325–4 sejtekkel ¹²⁵I-vel jelölt fibronectin vagy jelölt N-terminális, 29 kDa-os fragmens megkötése szempontjából, pontosan úgy, ahogy korábban leírták (Signas *et al.*, 1989).
10 Ahol jeleztük, ezt a vizsgálatot módosítottuk a baktériumos szuszpenzió 40 l ZZ–FR Sepharose-ra való kicsérelésével (0,3 mg/ml a duzzasztott gélhez kapcsolódás aránya). Ebben az esetben a radioaktív háttérsugárzást olyan vizsgálattal határoztuk meg, melyben módosítás nélküli Sepharose-t használtunk az affinitásmátrix helyett. A baktériumhoz vagy ZZ–FR Sepharose-hoz kötött, radioaktívan jelölt ligandumot LKB gamma-számlálóban (Turku, Finnország) számoltuk meg.

Peptidek szintézise és tisztítása

20 S16–36 kivételével minden peptidet Applied Biosystems automata peptidszintetizáló berendezéssel szintetizáltunk az Alabamai Egyetemen (University of Alabama) a Birminghami Rákkutató Központ (Birmingham Cancer Center) központi szervezeténél a korábbiakban leírtak szerint (Signas *et al.*, 1989). Az S16–36 peptidet a Vega Biotechnologiesnél (Tucson, AZ) szintetizáltuk F-moc szintézismódszerrel. A peptideket fordított fázisú HPLC-vel tisztítottuk meg a tisztítatlan készítményektől preparatív méretű C₁₈ oszlop (Vydac 218TP510; The Separation Group, Hesperia, CA) és LKB HPLC-rendszer felhasználásával. A tisztításhoz használt puffer TEAP/EDTA (pH=5,5) volt, ami 0,11% (térfogat/térfogat) foszforsavból, 0,28% (térfogat/térfogat) trietil-aminből és 0,25 mM EDTA-ból állt. Az eluálópuffer 35 15% TEAP/EDTA volt acetonitrilben.

A trietil-amint Pierce-től (Rockfort, IL), míg a HPLC-minőségű foszforsavat és acetonitrilt Fishertől (Pittsburgh, PA) szereztük be. A fordított fázisú kromatográfia után a megfelelő frakciókat nagymértékben dializáltuk 50 mM ammónium-bikarbonáttal szemben, és liofilizáltuk. A kapott készítmények tisztaságát fordított fázisú kromatográfiával, analitikai C₁₈ oszlopon (Vydac 218TP546; The Separation Group, Hesperia, CA) ellenőriztük 0,1%-os (térfogat/térfogat), vízben hígított trifluor-ecetsavból (Pierce; Rockford, IL) és 0,1%-os (térfogat/térfogat), 60%-os acetonitrilben hígított TFA-ból álló puffer mint eluálópuffer felhasználásával. Az ebben a pufferrendszerben eluált peptideket rotoevaporációval szárítottuk és N-terminális szekvenenciaanalízisnek vagy aminosavösszetétel-analízisnek vetettük alá.

50 A peptidek szekvenenciaanalízisét a birminghami Alabama Egyetem (University of Alabama) Proteinkémiai Központja (Protein Chemistry Core) végezte Applied Biosystems peptidszekvenencia-analizátorral, 470A modell. Az aminosavanalízist az Atherosclerosis Kutató Részleg Proteinkémiai Központ (Atherosclerosis Research Unit Protein Chemistry Core) végezte.

Szintetikus peptidek proteolitikus feltárása

60 L-(Tozil-amido-2-fenil)-etil-klór-metil-ke-tonnal (TPCK) kezelt tripsint (kód: TRTPCK) és kimotrip-

szint (kód: CDS) a Worthington cégtől (Freehold, NJ) szereztünk be. Szójabab tripszin inhibitor és TPCK-t a Sigmától (St. Louis, MO), Glu-c endoproteináz (V8 proteáz) a Boehringer-Mannheimtől vásároltunk, és lizin endopeptidáz C-t (LEC) a Calbiochemtől (La Jolla, CA) szereztünk be.

Tripszin és kimotripszin feltáráshoz is D3-peptidet 2 mg/ml-re feloldottunk 0,1 M ammónium-bikarbonátban, és proteázzal kezeltük 1:200 enzimszubsztrátarány mellett 24 órán keresztül 37 °C-on. Tripszint szójabab tripszin inhibitor és fenil-metil-szulfonil-fluorid hozzáadásával, 20 g/ml, illetve 1 mM koncentrációjánál inaktívtávtunk. Kimotripszinhez, TPCK-hoz és PMSF-hoz annyit adtunk hozzá, hogy elérjük a 0,3 mg/ml, illetve 1 mM koncentrációt.

Glu-c endoproteináz feltáráshoz az enzimszubsztrát aránya 1:100 volt, és 2 mg/ml peptid volt foszfáttal pufferolt sóoldatban. 24 óráig, szobahőmérsékleten való inkubálás után a feltárást PMSF 1 mM-ig történő hozzáadásával leállítottuk. LEC-feltáráshoz a peptidet 2 mg/ml-re oldottuk fel PBS-ben, amihez ml-enként 1 egység proteázot adtunk. A feltárást 37 °C-on 40 órán keresztül lehetett folytatni, és akkor ért véget, amikor a hasítási termékeket HPLC-vel leválasztottuk. Minden feltáráshoz fordított fázisú HPLC-t használtunk TEAP/EDTA pufferrendszerrel a proteolízis folyamatának figyelemmel kíséréséhez és a hasítási termékek tisztításához. Az összetételi analízishez vagy N-terminális szekvenanciaanalízishez szükséges mintákat tovább kromatografáltuk a TFA pufferrendszerrel.

Szintetikus peptidok kémiai módosítása

Lizin aminosavoldallancának dihidroxipropilezéses redukciója Acharya módszerének (1984; J. Chrom 297: 37-38) egy változata volt. A peptidet PBS-ben feloldottuk (2,5 mg/ml), amit DL-gliceraldehid és nátrium-ciano-bór-hidrid (Sigma, St. Louis, MO) hozzáadása követett 0,1, illetve 1,0 mólos végső koncentrációig. A reakciót szobahőmérsékleten egy órán keresztül végeztük, és dialízissel állítottuk meg 50 mM ammónium-bikarbonáttal szemben. Lizin oldalcsoportjai derivatizációjának mértékét aminosavanalízissel határoztuk meg.

Glutamin- és aszparaginmaradékok karbonsavoldallancáit glicerin-metil-észterekké alakítottuk át 1-etil-3-(3-dimetil-amino-propil)-karbodiimiddel (EDC) végzett kondenzációval (Lungblad and Noyes, 1985; Chemical Reagents for Protein Modification, II. kötet). A peptidet feloldottuk kétszer desztillált vízben 2 mg/ml-re, és 1 M-t glicin-metil-észterben (Sigma) felolvasztottunk. A pH-t 4,3-re állítottuk be 0,1 M HCl-dal és EDC-t adtunk hozzá 0,1 M koncentrációig. Az oldatot szobahőmérsékleten 3 órán keresztül kevertük a pH-érték 4,3-re történő visszaállításával 30 perc múlva, majd 1,5 óra múlva ismét. A reakciót PBS-sel szembeni dialízissel állítottuk le. A derivatizációs fokot a glicinmólarány növelésével állapítottuk meg, összehasonlítva a nem derivatizált peptiddel. A derivatizációt úgy végeztük, hogy glicin-metil-észter helyett etanol-amint használtunk, és ellenőrző kísérletet úgy végeztünk, hogy csak EDC-t kevertünk össze a peptiddel.

Tirozinmaradékok feniloldallancáit oxidáltuk 10 ml tetranitro-metánnak (TNM; Sigma) 100 mM tris-HCl-ban, 150 mM NaCl-ban (pH=8,0) feloldott 1 mg/ml peptid minden ml-éhez való hozzáadásával és 1 órán keresztül szobahőmérsékleten való keverésével, amit tris/NaCl pufferrel (pH=8,0) szemben történő dialízis követett TNM eltávolítása céljából.

A három D-ismétlődés aminosavszekvenciáit az 1. ábra mutatja. A D1- és D2-ismétlődés nagyfokú homológiát mutat, amennyiben 38 maradékból csak 5 különbözik (87% homológia), míg D3 50%-nál kisebb homológiát mutat D2-vel. Azonban a korábbiakban leírtak szerint (Signas *et al.*, 1989) a peptid a ¹²⁵I-HFN kötés 50%-os gátlását okozta *S. aureus* 8325-4 sejtjeihez 2 g/ml koncentráció esetén, míg 90 g, illetve 230 g/ml koncentráció volt szükséges D2, illetve D1 esetén ugyanolyan fokú gátlás eléréséhez. Ezért mi a D3-peptidet választottuk további jellemzésre.

Kémiai átalakítás

Az 1. táblázat a D3-peptid és derivatizációs termékei aminosav-összetételi analízisének adatait tartalmazza. Lizin oldalmaradékainak dihidroxipropilezéses teljes mennyiségében a lizintartalom 98%-nál nagyobb redukcióját mutatta D3-hoz viszonyítva. Kis mellékreakció, ami normálisan előfordul e protokoll használata esetén, volt fenil-alanin derivatizációja az 1. pozícióban szabad NH₂ csoportján át, amint azt a fenil-alanin-tartalom kismértékű csökkenéséből észleltük. Aszparagin- és glutaminmaradékok glicin-metil-észterre alakítása is mennyiségileg teljes volt, amint azt 54 maradék glicintartalmának 1000-ról 293-ra való csökkenéséből észleltük. Ez az az érték, amit vártunk a D3-ban lévő 2 glicinmaradékra és arra a további 9 maradékra, melyeket az aszparagin- és glutaminmaradékok kémiai átalakításának elvégzéséhez hozzáadtunk. Tirozin TNM-en keresztül végzett oxidációja ugyancsak sikeres volt, a tirozintartalom 95%-os redukcióját okozta.

A 2. ábra a kémiaileg módosított peptidok inhibíciós aktivitását mutatja, összehasonlítva a módosítatlan D3-éval. Míg a lizin és tirozin átalakításai csak részlegesen csökkentették D3 aktivitását, az aszparagin- és glutaminmaradékok átalakítása az aktivitás teljes elvesztését okozta. Ezt az eredményt észleltük glicin-metil-észter vagy etanol-amin kondenzációjával a karboxioldallancokon. Ellenőrzésként csak EDC-kezelés mutatott egy kis csökkenést az aktivitásban a lizin és tirozin átalakításánál megfigyelthez hasonlóan. Az aktivitás megfigyelt csökkenése így határozottan a karboxioldallancok átalakításának tulajdonítható.

D3 tripszin, kimotripszin és Glu-c endoproteáz feltárt anyagának fordított fázisú HPLC-je igazolta, hogy a peptidszubsztrát teljes egészében kisebb termékekkel alakult át. D3 és tripszines feltárt anyagának jellegzetes, fordított fázisú profilját a 3. ábra mutatja, azoknak a részeknek az azonosságával, melyek később tisztításra kerültek. A kezdeti vizsgálatokat a nyers, feltárt anyagokkal végeztük megfelelő proteázinhibitorok jelenlétében, hogy a ¹²⁵I-HFN vagy a ¹²⁵I-29 kDa-os, N-terminális fragmens *S. aureus* sejtcsuszpenzióhoz való kötését vizsgáljuk (4. ábra). Teljes tripszines feltárást követően,

amint azt a 3. ábrán igazoltuk, a kapott, nem frakcionált hasítási termékek a biológiai aktivitás kis csökkenését mutatták, míg kimotripszin feltárt anyaga nem mutatott gátlási aktivitást. Kevésbé voltak világosak az eredmények Glu-c endoproteáz feltárt anyagával, ami gátlási aktivitást mutatott ¹²⁵I-29 kDa ligandumként történő felhasználásával, de semmit nem mutatott ¹²⁵I-HFN-nél. Ez lehet azon konformációváltozások következménye, amikor az N-terminális domént proteolitikus hasítással leválasztjuk.

Az 1. ábra több olyan hasítási termék aminosavszekvenciáit mutatja, melyeket a nyers, feltárt anyagokból fordított fázisú HPLC-vel tisztítottunk meg. A legtöbb, tripszin feltárt anyagából megtisztított hasítási termék anyagából megtisztított hasítási termék a 37 D3-aminosavból 15-36 maradékot (T15-36) alkotott, és a biológiai aktivitás fennmaradt ennél a peptidnél (5. ábra). E peptid további, lizin-endopeptidáz-c-vel végzett feltárása TL16-36-ot termelő, N-terminális dipeptid eltávolítását eredményezte, ami még gátlási aktivitást mutatott. T15-36-nak Glu-c endoproteázzal való hasítása egy C-terminális hexapeptid eltávolítását és ezzel együtt az aktivitás csökkenését okozta. A D3 Glu-c endoproteáz és kimotripszin feltárt anyagából elkülönített peptidszekvenciákat is az 1. ábrán adjuk meg. E peptidek közül egy sem rendelkezett gátlási aktivitással (5. ábra).

Mivel T15-36 D3-éhoz hasonló biológiai aktivitást mutatott, több, e szekvenciát átfogó szintetikus peptidet építettünk fel (2. ábra), és vizsgáltuk biológiai aktivitásukat (6. ábra). Az S16-36 peptid, mely egy maradékkal rövidebb az N-terminálison, mint T15-36, fibronectin megkötésének 50%-os gátlását mutatta 10 nmol/ml koncentrációnál, összehasonlítva a D3 3 nmol/ml koncentrációjával. Annak ismeretében, hogy a TL17-36 peptid megőrizte biológiai aktivitását, létrehoztuk az S17-33 peptidet, hogy megvizsgáljuk a C-terminális aminosavak fibronectint megkötő képességét. Úgy találtuk, hogy jelentősen csökkent, de egyenesen észlelt biológiai aktivitással rendelkezik, fibronectin megkötésének 50%-os gátlásával 100 nmol/ml koncentráció esetén. E peptid méretének az N-terminálison való további csökkentésével S20-33-at állítottunk elő, ami az aktivitás közel teljes megszűnését okozta. Azonban az S20-33 peptid C-terminálison való növelése S20-36 előállításához olyan peptidet eredményezett, melynek aktivitási szintje az S17-33-éhoz volt hasonló, 50%-os gátlást mutatva 200 nmol/ml esetén. Az S21-36 peptid még olyan gátlási aktivitást mutatott, ami egyenesen arányos volt a peptid mennyiségével, de körülbelül tízszer kevésbé hatékony, mint az S20-36. Ezért D3 fibronectint megkötő területét alappeptidre, S20-33-ra csökkentettük, ami nélkülözhetetlen az aktivitáshoz, de önmagában nem elegendő a kötés gátlásához. A PSY-szekvencia hozzáadása az N-terminálishoz vagy LPK-é a C-terminálishoz hasonló biológiai aktivitású peptideket eredményezett. E peptidek méretének bármilyen további csökkentése az aktivitás nagyfokú csökkenését okozza.

Baktériumok adhéziója fibronectinhez feltevések szerint fertőzőképességi tényező, ami képessé teszi a baktériumokat arra, hogy megtelepedjenek sebszö-

veteken és véralvadékokon (Ryden *et al.*, 1983, JBC 258: 3396-3401; Proctor *et al.*, 1982, JBC 257: 14 788-14 794); és e kölcsönhatás megakadályozása vonzó cél a profilaxissal vagy oltással foglalkozó tanulmányoknak. E cél megvalósításának irányában elért előrehaladásról számoltak be a korábbiakban *Treponema pallidum* (Thomas *et al.*, 1985, J. Exp. Med., 14-25) és *Trypanosoma cruzi* fibronectint megkötő képességéről szóló tanulmányok. Olyan monoklonális antitest, mely gátolja az eukariótasejtek kapcsolódását fibronectinnel borított szubsztráthoz, szintén akadályozza a fibronectin kapcsolódását *Treponema pallidum*hoz (Thomas *et al.*, 1985a) és *Trypanosoma cruzi*hoz (Ouassi *et al.*, 1986, J. Exp. Med. 162: 1715-1719). A kötést szintén gátolta az RGDS-peptid, az aminosavszekvencia a fibronectin sejtmegekötő doménjén belül, amit felismernek az eukarióta fibronectin integrin receptorok (Thomas *et al.*, 1985b, J. Exp. Med. 162: 1715-1719; Ouassi *et al.*, 1986). Ugyanez a peptid gátolta spirochéták kapcsolódását is tenyésztett humán sejtekhez. Azonban tekintetbe kell venni, hogy az RGDS-peptid befolyásolja is a fibronectin funkcióját. Másodszer, ezek a mikroorganizmusok specifikusságuk miatt szokatlanok a fibronectin sejtmegekötő doménje részére.

A téma tárgyalásának célja, hogy jellemezzük a fibronectin és az *S. aureus* receptor közti, molekuláris szintű kölcsönhatást szintetikus peptidek felhasználásával.

A D3-peptid kémiai átalakításának eredményei azt mutatják, hogy a glutamin- és aszparaginmaradékok nélkülözhetetlenek a fibronectinhez való kapcsolódáshoz. Ez különös jelentőséggel bír, mivel FEEDT vagy DFEEDT motívuma megjelenik az *S. aureus* FN-receptor mindhárom D-ismétlődésében. A D3-ban ez a motívum valóban kétszer ismétlődik. Továbbá *Streptococcus dysgalactiae* két fibronectinreceptorára kódoló génekből nyert szekvenciaadatok mindegyike három ismétlődő szekvenciát mutat, melyek minden ismétlődésben DFTEDT (I. gén) vagy EVEDT (II. gén) motívumokat tartalmaznak (publikációra benyújtva). Az aktivitás csökkenését a Glu-c endoproteázzal való hasítás során az FEEDT motívum szakadásának tulajdoníthatjuk, és a savas aminosavmaradékok részvételének további jele.

A T15-36 D3 tripszines feltárási termék és az S16-36 szintetikus peptid által mutatott aktivitás hatékonyan lokalizálta a D3 fibronectint megkötő determinánst a peptid C-terminális felé, ami az FEEDT motívumot tartalmazza. Érdekes, hogy az IEEDT-szekvencia is megjelenik D3 N-terminális mellett (8-12 maradék), és hogy a D1- és D2-ismétlődések FEEDT-t ugyanabban a helyzetben tartalmazzák. Ennek a D3-ban kétszer ismételt motívumnak a jelenléte érthetővé teszi ennek lényegesen nagyobb biológiai aktivitását D1-gyel és D2-vel összehasonlítva.

Azok a kísérletek, hogy tovább lokalizáljuk a fibronectint megkötő determinánst az S16-36 peptiden belül, a biológiai aktivitás lényeges csökkenését okozták. Úgy hisszük, hogy az S20-33 peptid tartalmazza azokat az aminosavmaradékokat, melyek kapcsolatba lépnek és kötődnek a fibronectinhez. Ez a peptid önmagá-

ban alapvetően nem mutat aktivitást. Azonban PSY tripeptid hozzáadása az N-terminálisához (S17–33) vagy LPK hozzáadása a C-terminálisához (20–36) az aktivitás drámai visszanyerését okozta. Ha ez a magpeptid mindkét oldalszekvenciával rendelkezne, az N-terminálison egy maradékkal rövidebb lenne, mint az S16–36 peptid, aminek aktivitási szintje egészen hasonló volt D3-hoz. Kémiai átalakítási kísérleteink azt mutatták, hogy sem a tirozin, sem a lizin nem vesz részt fibronektinnel létesített kapcsolatban. Feltesszük, hogy a PSY és LPK oldaltripeptidek nincsenek bevonva a fibronektinnel létesített kapcsolatba, de szükséges a peptidhez, hogy megfelelő és stabil szerkezetet vegyen fel. Megjegyezzük, hogy egy aminosav eltávolítása S20–36 N-terminálisáról az aktivitás több mint tízszeres csökkenését okozta.

5
10
15

A D3-ról és a ZZ–FR fúziós proteinről szóló korábbi tanulmány (Signas *et al.*, 1989) a jelen eredményekkel összesítve azt mutatja, hogy míg az aktivitás drámai esése bekövetkezik, amikor a három egymás utáni D-ismétlődés folytonossága megszűnik, az aktivitás változása, ha D3-at S17–36-ra redukáljuk, egészen lényegtelen. S17–36 méretének további csökkentése hasonló aktivitáscsökkenést okoz, mint a tandemismétlődések fizikai szétválasztásánál megfigyelt. Így az egyes ismétlődések szekunder szerkezete egy affinitási szintet biztosít fibronektinnek, és a három ismétlődés tercier szerkezete olyan aktivitást okoz, ami egy nagyságrenddel nagyobb. Fibronektin harmadik, feltételezett és még ismeretlen szerkezeti szintje és aktivitásának további növekedése a fibronektinreceptorok kvaterner szerkezetével érhető el az *S. aureus* 8325–4 sejtfelületén.

1. táblázat

D3 peptid és derivatívációs termékeinek aminosav-összetétele

	Aminosavmaradék 1000-enként			
	Módosítatlan	DHP–K ¹	Gly–OCH ₂ ³	TNM–Y ³
Asx*	217,7 (189,2)	226,8	155,9	157,1
Glx*	156,3 (162,2)	193,4	138,4	174,9
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
Arg	–	–	–	–
Thr	82,7 (81,1)	95,3	76,9	100,5
Ala	–	–	–	–
Pro	54,5 (54,1)	63,5	49,9	60,4
Tyr*	18,2 (27,0)	23,4	10,5	0,9
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
Phe	70,2 (81,1)	55,0	57,6	72,1
Lys*	107,9 (108,1)	2,4	89,2	100,9

A kémiai átalakításra szánt vagy kémiai átalakítással módosított aminosavakat csillaggal jelöltük. A zárójelben lévő számok azokra a várható értékekre utalnak, melyek D3 ismert összehasonlító adatain alapulnak.

¹ Dihidroxi-propilezés – lizin redukciója.

² Aszparagin- és glutaminmaradékok átalakítása glicin-metil-észterekké.

³ Tirozin oxidációja tetranitro-metánnal.

A jelen, fibronektint megkötő peptid immunizálásra használható úgy, hogy a peptidet, lehetőleg fúziós proteinnel kombinálva, válaszként nagy antigén létrehozására, olyan adagokban, hogy immunológiai reakciót okozzon, befecskendezzük a baktériumgazda emlősbé. Így a fibronektint megkötő peptid felhasználható kérődzők oltásában staphylococcus-fertőzés okozta mastitis ellen.

55
60

Továbbá a fibronektint megkötő peptid felhasználható nyílt bőrseb fertőzésének megakadályozására, a fibronektint megkötő peptidet szuszpenzióban felhasználva a seb kezelésére. Így a fibronektint megkötő peptid felhasználható sebek kezelésére, például proteinreceptorok megállítására vagy immunizálásra (oltás). Az utóbbi esetben a baktériumgazda-test sajátos antitest-

ket termel, melyek képesek védekezni az olyan baktériumtörzsek hirtelen elterjedése ellen, melyek ilyen, fibronektint megkötő peptidet tartalmaznak. Ezáltal az antitestek gátolják a baktériumtörzsek felületi kötődését a sérült szövethez.

Példák szövetsérülések fertőződésére a következők:

a) olyan sebek fertőződése a bőrben és a kötőszövetben, melyeket mechanikus sérülés, vegyi sérülés és/vagy termikus sérülés okozott;

b) sebek fertőződése nyálkahártyán, mint a szájuégben vagy a tejmirigyekben, húgycsőben vagy hüvelyben;

c) fertőződés olyan kötőszöveti proteineken, melyek minimális szöveti sérülésnek (mikrolézió) voltak kitéve hámmal vagy behámmal kapcsolatban (emlőgyulladás, szívbillentyű-fertőzés, csípőcsereműtét).

Ha jelen FNBP-t vagy a peptidet immunizálás (oltás) céljára emlősökön, az embert is beleértve, használjuk, a peptidet steril, izotóniás sóoldatban diszpergáljuk, tetszés szerinti idő alatt hozzáadva egy gyógyszerészeti elfogadható diszpergálószert. A továbbiakban különböző típusú adjuvánsok használhatók fel annak érdekében, hogy fenntartsuk a felszabadulást a szövetben, és így a peptidet hosszabb időre tegyük ki egy test immunológiai védelmi rendszerének.

Immunitás megszerzéséhez a megfelelő adag a 0,5–5 µg-ja testsúly-kg-onként és immunizálójekciónként. Tartós immunitás megszerzése érdekében az oltást egynél több egymást követő alkalommal, 1–3 hetes időközökben, lehetőleg három alkalommal el kell végezni.

Ha jelen peptidet helyi, lokális alkalmazásra használjuk, a peptidet izotóniás sóoldatban 25–250 µg/ml koncentrációra diszpergáljuk. A sebeket ezután olyan mennyiséggel kezeljük, hogy csak a sebfelület teljes benedvesítését érjük el. Így egy átlagos sebre csak néhány milliliter oldatot használunk ezzel a módszerrel. A peptidoldattal történt kezelés után a sebeket megfelelően megmossuk izotóniás sóoldattal vagy más megfelelő, sebkezelő oldattal.

Továbbá a fibronektint megkötő peptid, valamint jelen találmány legkisebb lehetséges fibronektint megkötő helyi peptidje felhasználható staphylococcus törzsek által okozott bakteriális fertőzések diagnosztizálására, amikor jelen találmány fibronektint megkötő peptidjét szilárd hordozóanyagon, mint kisméretű latex vagy Sepharose^R szemek, rögzítjük, ezt követően a szérumokat tartalmazó antitesteknek lehetőséget adunk áthaladni és reagálni az így mozdulatlaná tett FNBP-vel. Az agglutinációt ezután ismert módszerekkel mérjük.

Továbbá a peptid felhasználható ELISA-tesztben [Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (enzimmel összekapcsolt immunsorbens-vizsgálat); E. Engvall, Med. Biol., 55, 193 (1977)]. Itt polisztirol mikrotiterlemezben lévő lyukakat befedünk FNBP-vel és egy éjszakan át 4 °C-on inkubáljuk. A lemezeket ezután 0,05% TWEEN 20-at tartalmazó PBS-sel alaposan átmoszuk és megszáritjuk. PBS-Tween-ben elkészítettük a páciensszérumot, hozzáadtuk a lyukakhoz és 30 °C-on, 1,5 órán keresztül inkubáltuk. Enzimmel kapcsolt antihumán-IgG, illetve enzimmel kapcsolt antiszarvas-

marha-IgG-öblítés után torna-peroxidáz enzimet vagy lúgos foszfatázt adtunk a lyukakhoz és 30 °C-on, 1,5 órán keresztül inkubáltuk, majd IgG odakötődése és öblítés után enzimszubsztrátot adtunk hozzá, lúgos foszfatáz esetén p-nitro-foszfátot, illetve peroxidázenzim esetén orto-fenilén-diamin-szubsztrátot (OPD) használtunk. A lyukakat tartalmazó lemezeket ezután 0,055% OPD-t és 0,005% H₂O₂-ot tartalmazó citrátpufferrel leöblítettük, és 30 °C-on, 10 percen keresztül inkubáltuk.

10 Az enzimreakciót 4 N H₂SO₄-oldat minden lyukhoz való hozzáadásával állítottuk le. A színeképződést spektrofotométer felhasználásával mértük.

A felhasznált enzimszubsztrát fajtájától függően fluoreszcenciamérés is alkalmazható.

15 Staphylococcus-fertőzések diagnosztizálásának másik módszere a peptidszekvencián alapuló DNS-gén-szonda-módszer alkalmazása. Ekkor a természetes vagy szintetikus DNS-szekvenciákat szilárd hordozóhoz, mint polisztirollemez felületére kötjük a fentiekben említettek szerint, például mastitis diagnosztizálására tej hozzáadásával. A tetszés szerint enzimmel vagy radioaktív izotóppal jelzett génszondát ezután hozzáadtuk a DNS-szekvenciát tartalmazó szilárd lemezfelülethez, így a DNS-gén-szonda ott kapcsolódik a szekvenciához, ahol megjelenik. Az enzimet vagy a radioaktív izotópot ezután ismert módszerekkel könnyen meghatározhatjuk.

AZ ÁBRÁK MAGYARÁZATA

30 1. ábra

Az *S. aureus* 8325–4 FnBP fibronektint megkötő helyét képező tandemisméltódések aminosavszekvenciája. Minden egyes ismétlődésnek megfelelő szintetikus peptidet D1-nek, D2-nek és D3-nak neveztünk el. 35 A D3-szekvencia alatt ábrázoljuk a D3-peptid és olyan kisebb szintetikus peptidok több proteolitikus hasítási termékének összetételét, melyeket D3 fibronektint megkötő determinánsának meghatározására használtunk. Két számot, amit egy vagy két betű előz meg, az egyes peptidok azonosítására használunk. A számok minden egyes peptid N- és C-terminális maradékainak helyzetére vonatkoznak D3 37 aminosavszekvenciáján belül. A V, C és T betű a D3-peptid Glu–c endoproteáz, tripszin, illetve kimotripszin feltárásából elkülönített hasítási termékeket jelöli. A T15–36 peptidet második feltárásnak vetettük alá TL17–36 előállításához lizin-endoproteáz–c-vel vagy TV15–30 előállításához Glu–c endoproteázzal. Az S betűt kémiai szintézissel előállított peptidok jelölésére használjuk.

50

2. ábra

Kémiai módosítás hatása a D3-peptid azon képességére, hogy ¹²⁵I–HFN *S. aureus* 8325–4-hez való kapcsolódását akadályozza. A peptid jelzett mennyiségét 55 összekevertük: 5 × 10⁸ sejttel és 5 × 10⁴ cpm ¹²⁵I–HFN-nel 0,5 ml PBS vizsgálati mennyiségben, kiegészítve 0,1% (súly/térfogat) szarvasmarha-szérumalbuminnal, 0,1% (térfogat/térfogat) Tween 80-nal és 0,02% (súly/térfogat) nátrium-aziddal. 60 perces, szobahőmérsékleten való folyamatos keverés után a megkötetlen

fibronektint 0,1% (térfogat/térfogat) Tween 80-at tartalmazó, 3 ml jéghideg PBS hozzáadásával felhígítottuk. 20 perces, 1,350×g centrifugálás után a felülúszót kiszívtuk, és a baktériumos szemcséhez társuló radioaktivitást LKB gamma-számlálón megmértük.

A függvény: módosítás nélküli D3 gátlási aktivitása (-) és tirozin- (Δ - Δ) vagy lizinmaradékokkal (o-o) való módosítás után.

B függvény: módosítás nélküli D3 gátlási aktivitása (-) és a karboxil-oldalmaradékok glicin-metil-észterrel (o-o), etanol-aminnal (Δ - Δ) vagy az EDC-reagenssel önmagában (\square - \square) való módosítás után.

3. ábra

A D3-peptid fordított fázisú HPLC-je tripszinnel való feltárás előtt (A függvény) és után (B függvény). A kromatográfiát Vydac C₁₈ analitikai oszlop és TFA-val pufferolt acetonitril mint eluens felhasználásával végeztük 1 ml/perc átfolyásnál. A csúcsok fölötti számok a hasítási termékek első és utolsó maradékát azonosítják D3 szekvenciáján belül. A C függvény tripszin rajza önmagában.

4. ábra

D3-peptid ¹²⁵I-HFN-nek vagy HFN ¹²⁵I-29 kDa-os fragmensének *S. aureus* 8325-4-hez való kötődését gátló képességének vizsgálata tripszinnel (A, D),

kimotripszinnel (B, E) vagy Glu-c endoproteázzal (C, F) való teljes feltárás előtt (Δ - Δ) vagy után (o-o).

5. ábra

5 Tisztított proteáz hasítási termékek ¹²⁵I-HFN-nek *S. aureus* 8325-4-hez való kötődését gátló képességének vizsgálata. A peptid hiányában sejtek által megkötött ¹²⁵I-HFN-t vettük 100%-nak, és a peptid jelenlétében megvalósult kötést ezen értékhez viszonyítva fejeztük ki.

6. ábra

6 Szintetikus peptidek ¹²⁵I-HFN-nek *S. aureus* 8325-4 sejtjeihez való kötődését gátló képességének vizsgálata. A vizsgálati körülmények a 2. ábra magyarázatánál leírtakkal megegyezők voltak. A peptid szekvenciái az 1. ábrán láthatók. Az eredményeket a peptid hiányában sejtek által megkötött fibronektin százalékában fejeztük ki.

SZABADALMI IGÉNYPONT

25 Fibronektint megkötő peptid, azzal jellemezve, hogy szerkezete az R'-PSYQFGGHNS VD FEEDT-R² képlet szerinti, ahol R' hidrogén vagy K, vagy DK, és R² hidroxil, L, LP vagy LPK.

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

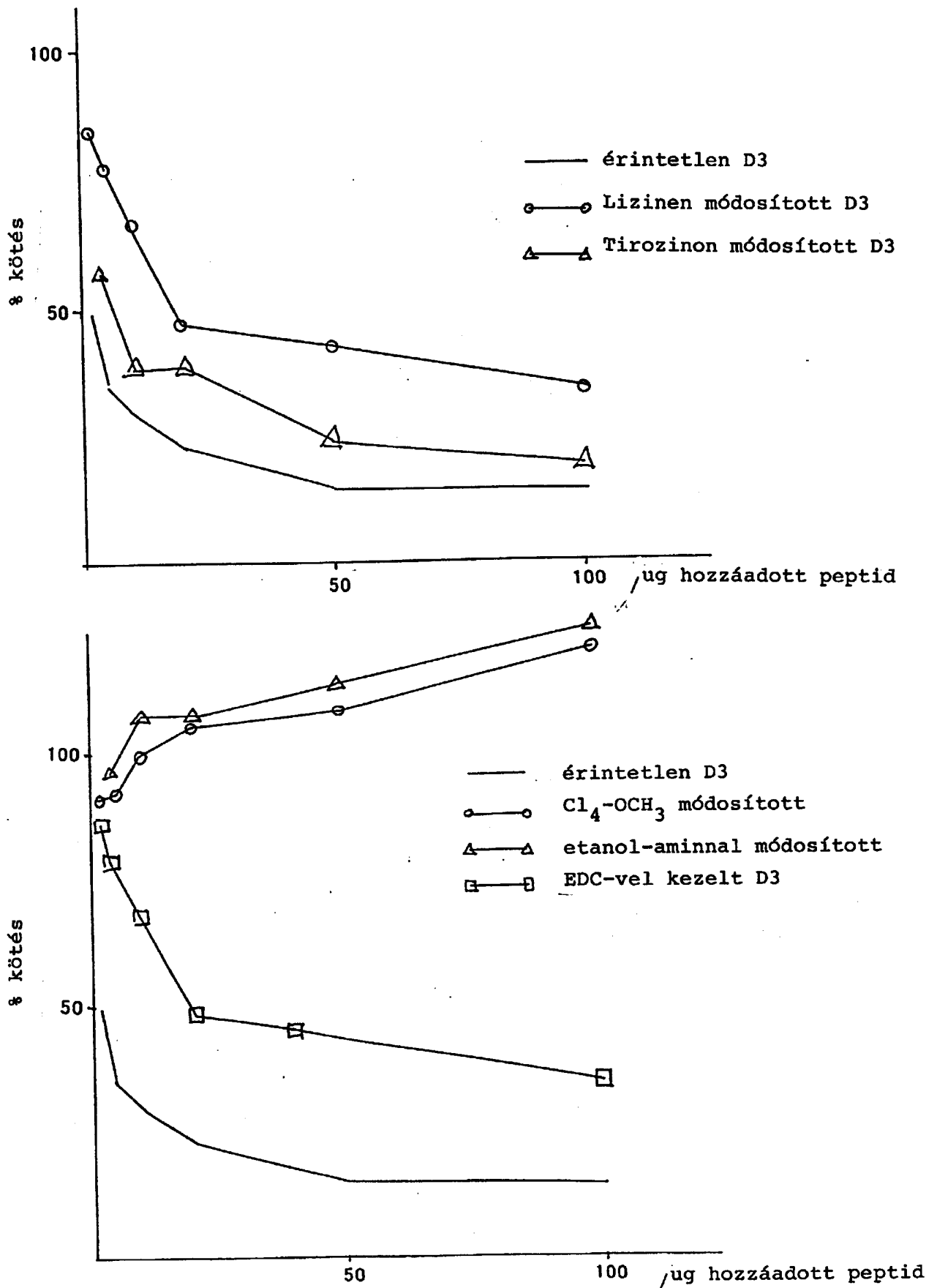
S20-36

S21-36

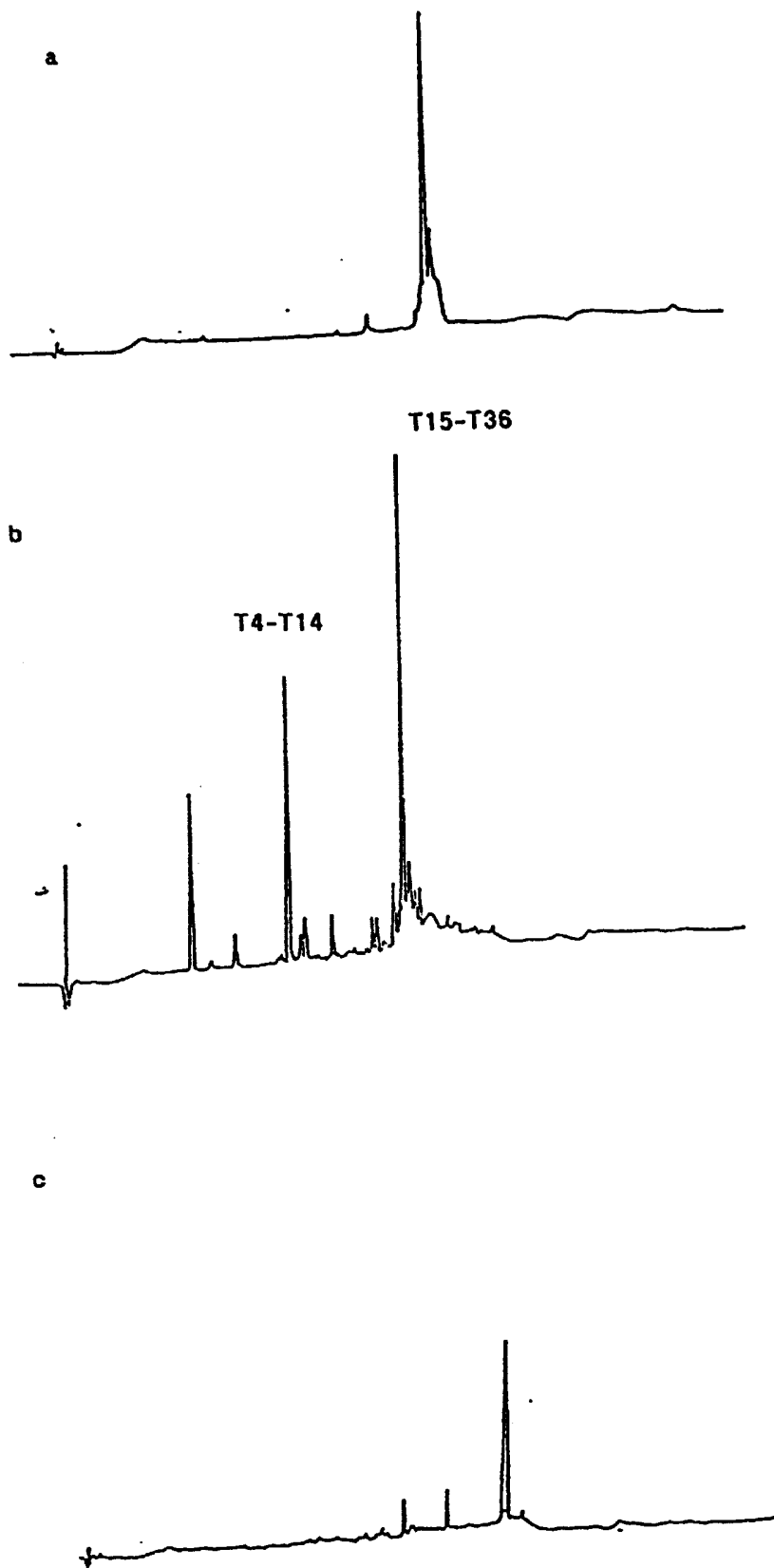
S17-33

S20-33

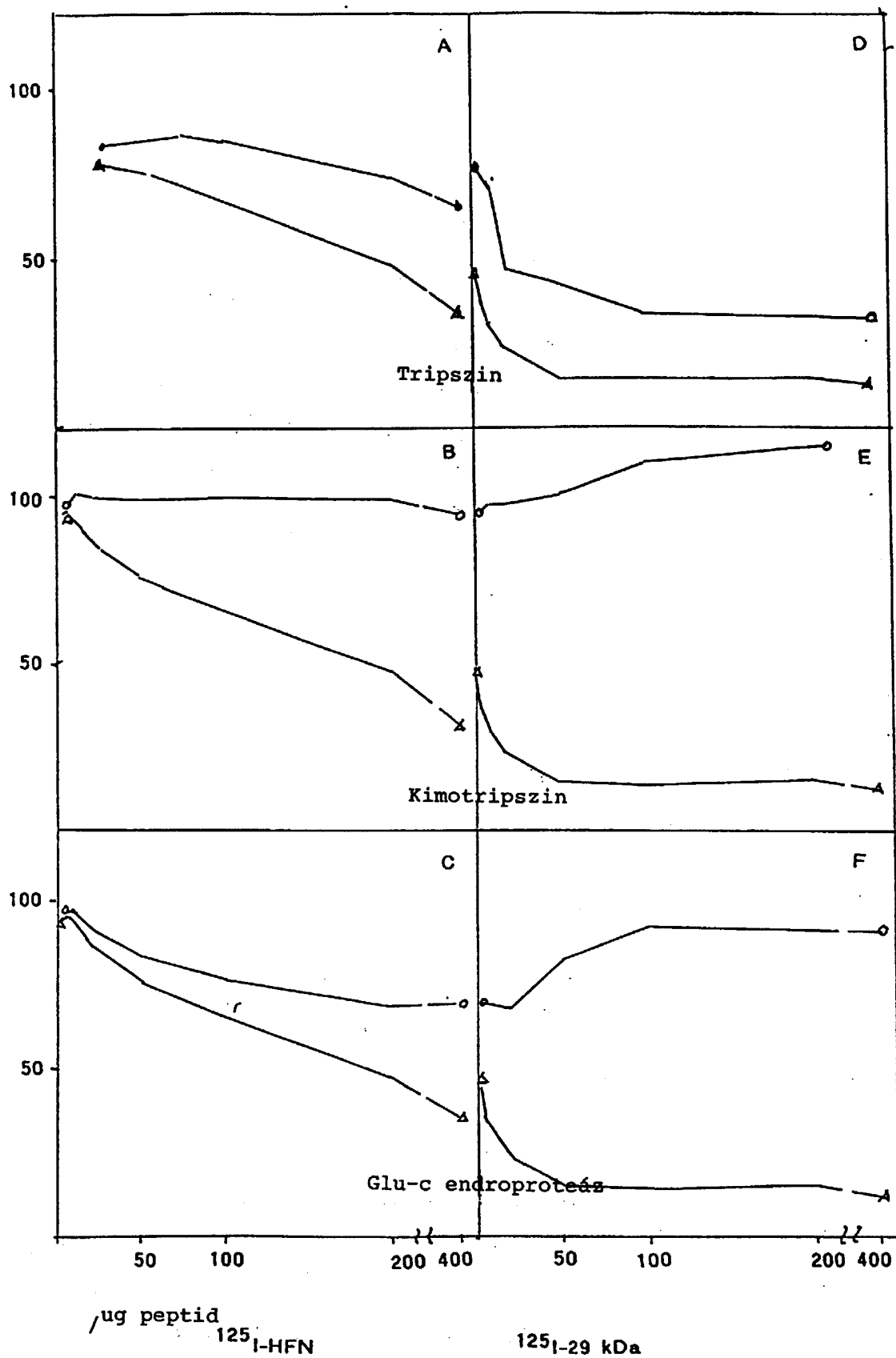
1. ábra



2. ábra

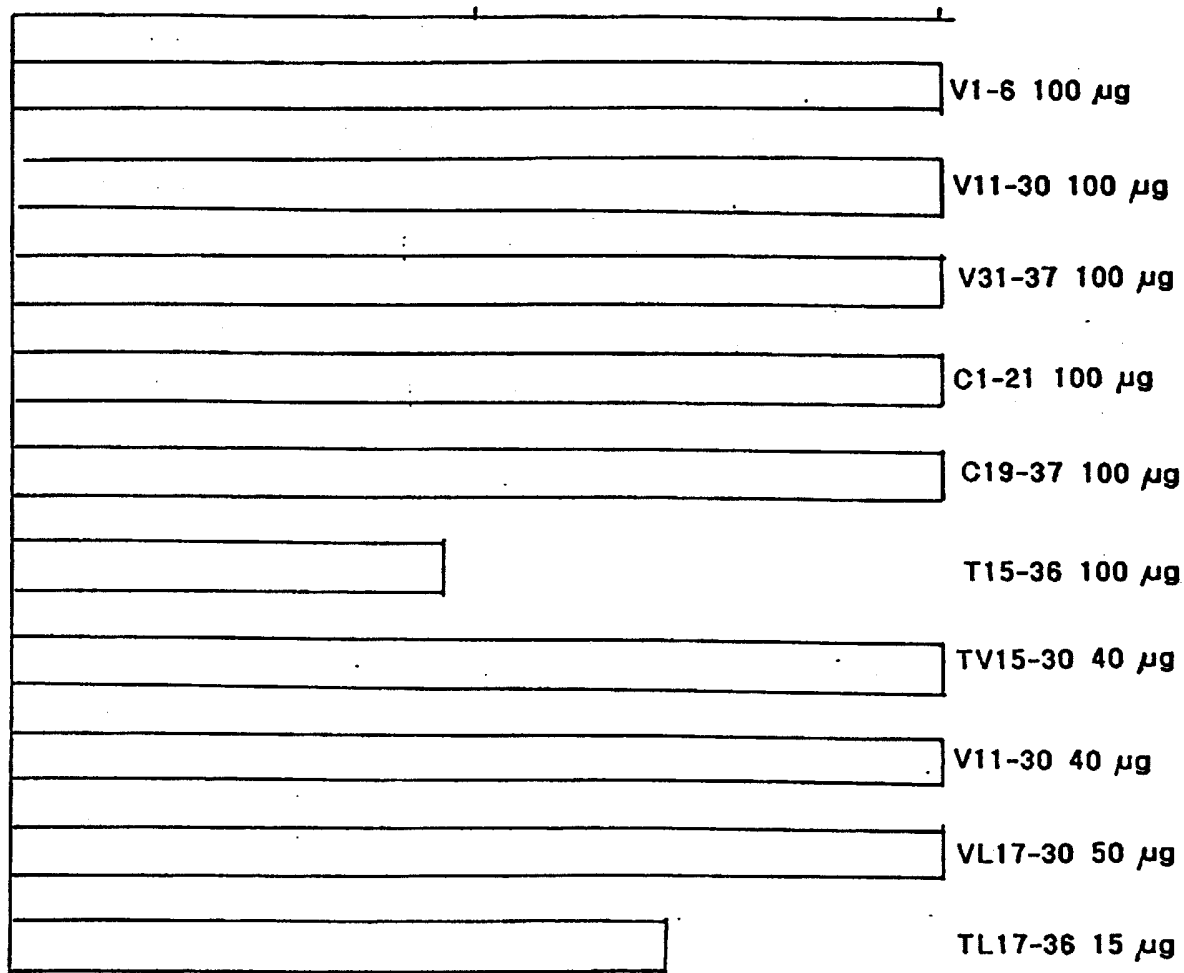


3. ábra



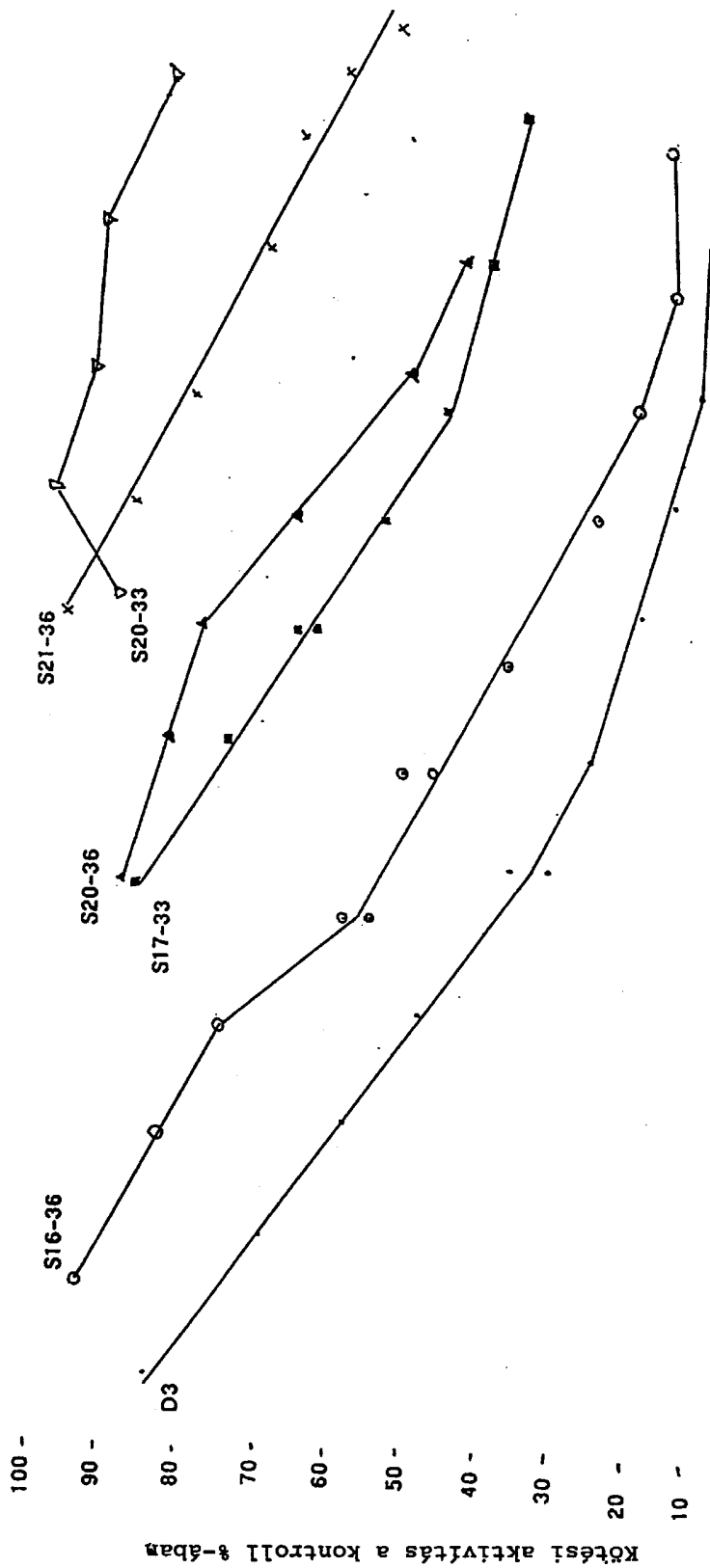
4. ábra

Kötési aktivitás (a kontroll %-ában)



5. ábra

125 IFN kötődések gátlása S.aureus 8235-4-hez szintetikus peptidekkel



6. ábra

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest