



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) 175900

(13) B

(51) Int Cl⁵ C 07 K 3/02, 3/28, 13/00,
A 61 K 35/78, 37/64

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	892266	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	02.06.89	(85) Videreføringdag	
(24) Løpedag	02.06.89	(30) Prioritet	04.06.88, DE, 3819078
(41) Alm. tilgj.	05.12.89		
(44) Utlegningsdato	19.09.94		

(71) Patentsøker Hoechst AG, D-65929 Frankfurt am Main, DE
(72) Oppfinner Werner Bonin, Kelkheim (Taunus), DE
 Paul Habermann, Eppstein/Taunus, DE
 Dominique Tripier, Eppstein/Taunus, DE
 Elisabet Wöhner, Flörsheim am Main, DE
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) Benevnelse **Frengangsmåte for isolering av amblyommin**

(56) Anførte publikasjoner NO B 170430
 Journal of Experimental Medicine NY, vol. 161(2), 1985, pp. 332.344

(57) Sammendrag

Foreliggende oppfinnelse vedrører et nytt virkemiddel - amblyommin - for antikoagulasjonsterapi samt en frengangsmåte for isolering derav fra skogbjørn. Det isolerte proteinet med trombininhibitorisk virkning har en molekylvekt på 20.000 til 30.000 dalton, et isoelektrisk punkt mellom 5,05 og 5,65 og aminosyresekvensen

-Ile-Leu-Phe-Thr-Gln-Gly-Asn-X-Gly-Glu-Leu-Glu-Asn-X-Phe-Glu-,

-Lys-Ile-Leu-Phe-X-Gln-Gly- og

-Ala-Ser-Tyr-Ile-Val-X-Ser-Glu-Ser-Ile-Gln-Ile-Leu-X-Leu-Ser-Glu-Gly-Ile-,

hvor i hver rest X kan være lik eller forskjellig og eventuelt stå for en naturlig forekommende aminosyre.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for isolering av det nye virkemidlet amblyommin for antikoagulasjonsterapi.

5 Antikoagulasjonsmidler er av stor betydning i medisinen. Eksempel på sentrale, medisinske problemer omfatter f.eks. tromboseprofylakse, arteriell reokklusjonsprofylakse, behandling av tromboser, forbrukskoagulopati og ekstrakorporal sirkulasjon.

10 Midler som for tiden kan anvendes innen antikoagulasjonsterapi utviser vanligvis en del uønskede ulemper så som f.eks. blødningsrisiko, trombozyttreduksjon, virkning på ZNS, uegnethet eller indirekte virkning så som f.eks. blir
15 oppdaget på heparinvirkningsskjemaet.

Walsmann og Markwardt (Die Pharmazie Bd. 36 (1981) S. 653) beskriver den farmasøytiske betydningen til hybridiner isolert fra *Hirudo medicinalis*. Dette er et polypeptid med en
20 lengde på 64-65 aminosyrer (Chan. FEBS Bd. 164 (1983) S. 307; United States Patent 4.668.662). Peptidet er en høyspesifikk trombinhemmer som dessuten ser ut til å være farmakologisk inert. Ulemper med forbindelsen omfatter den relativt korte halveringstiden til forbindelsen og i den parenterale
25 applikasjonsformen.

En antitrombinvirksom forbindelse som ikke utviser noen av de nevnte ulempene er ønskelig. Det er også viktig å lete etter ytterligere antikoagulasjonsmidler som avdekker den
30 ovenfor nevnte medisinske problematikken.

Skogbjørn, familie Ixodidae er i alle utviklingsstadiene temporære, blodsugende ektoparasitter på reptiler, fugler, pattedyr og mennesker. Voksne hunn-skogbjørner forblir
35 vanligvis flere dager på verten og suger blod til hundre ganger av hennes egen vekt. Skogbjørnene har stikkende-sugende munnleddanordninger bestående av de parvis oppstilte

cheliserne og hypostomet. Med skjæremekanismen til chelicerne, dvs. digitene, skjærer skogbjørnen et sår i Epidermis, og cheliceren og hypostomet blir innført heri, og sugekanalen blir dermed dannet. Spyttkjertlene til de fleste skogbjørnarter produserer et protein, det såkalte sement, som blir avgitt til såret og hvori tennene til hypostomene blir forankret slik at skogbjørnene festes til verten for næringsopptak.

Videre avgir skogbjørnene et sekret fra spyttkjertlene som inneholder antikoagulasjonsmidler.

For blodsuging trenger munnredskapene til skogbjørnene ikke direkte inn i blodkapillærer, men inn i vevet. Ved hjelp av spyttkjertelenzymer lyserer de vevet, og skader de fineste kapillærene slik at blodet renner ut. Ved den levringshemmende virkningen til spyttkjertelsekretene, blør de skadede karene en stund og oppnår dermed en vevsvakuole som skogbjørnene tar opp næring fra.

For tilveiebringning av stoffer med blodlevringshemmende egenskaper ble dermed spyttkjertler fra skogbjørner undersøkt.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for isolering av et protein med trombininhibitorisk virkning eller et farmasøytisk anvendbart salt derav, som har en molekylvekt på 20.000 til 30.000 dalton, et isoelektrisk punkt mellom 5,05 og 5,65 og har aminosyredelsekvensen

- Ile-Leu-Phe-Thr-Gln-Gly-Asn-X-Gly-Glu-Leu-Glu-Asn-X-Phe-Glu-

- Lys-Ile-Leu-Phe-X-Gln-Gly- og

- Ala-Ser-Tyr-Ile-Val-X-Ser-Glu-Ser-Ile-Gln-Ile-Leu-X-Leu-Ser-Glu-Gly-Ile

hvor i hver rest X kan være lik eller forskjellig og betyr en naturlig forekommende aminosyre eller en hvilken som helst etter translasjon modifisert aminosyre, som trimetyllysin eller karboksyglutaminsyre, kjennetegnet ved at proteinet blir ekstrahert fra skogbjørner med aceton, utfelt med

eddiksyre eller trikloreddiksyre ved pH 1,8, fraksjonert ved gelfiltrering og trombinsepharose-affinitetskromatografi.

5 Proteinet eller det farmasøytisk anvendbare saltet derav blir isolert fra spyttkjertler og hemmer blodlevringen via trombininhibering.

10 Selv om dette proteinet og hirudin virker på samme substrat, er begge proteinene overraskende tydelig forskjellig fra hverandre. Proteinet som blir isolert ifølge oppfinnelsen-
betegnet amblyommin - har en medisinsk innstillingsverdi forskjellig fra hirudin. Amblyommin er et nytt protein. Det er det første isolerte virkemidlet fra spyttkjertlene til sydafrikanske skogbjørner.

15 Amblyommin er kjennetegnet ved følgende fysiske egenskaper. Det har forholdsmessig lav affinitet overfor Coomassie Brilliant Blue R250 Bio-Rad. Etter lyofilisering er det vanskelig oppløsbart i vann. Proteinet er uforanderlig i
20 alle anvendte buffere. Fryser man eluatet etter HPLC-rensing ved -80°C , oppnås ingen bestembar aktivitetsreduksjon. Forbindelsen er videre stabil ved 40°C . Den er fellbar med aceton ved pH 1,8 (eddiksyre eller trikloreddiksyre). Dermed oppnås også fullstendig aktivitet i oppløsningen til
25 fellingen også etter minst 12 dager. Hvis man anvender for HPLC-analyse et Water 600 Multisolvent Delivery System og en Biorad RP304 adskillelses-kolonne, og påfører en gradient på 80% A - 20% B (med A = 0,1% TFA og B = 0,1% TFA i 80% acetonitril i HPLC-vann), idet 50% B blir oppnådd etter en
30 løpetid på 40 minutter, blir en reaksjonstid på 27 minutter målt for amblyommin. Med gelfiltrering over G75 superfint materiale har proteinet en molekylvekt på 20.000-30.000 dalton. I en SDS-polyakrylamidgel blir en molekylvekt på 2000 dt \pm 2000 dt bestemt. Ved bestemming av det isoelektriske
35 punktet oppnås en verdi på ca. $5,35 \pm 0,3$. Til slutt blir følgende delaminosyresekvens oppnådd:

-Ile-Leu-Phe-Thr-Gln-Gly-Asn-X-Gly-Gln-Leu-Glu-Asn-X-Phe-Glu-,

-Lys-Ile-Leu-Phe-X-Gly- og

-Ala-Ser-Tyr-Ile-Val-X-Ser-Glu-Ser-Gln-Ile-Leu-X-Leu-Ser-Glu-Gly-Ile-,

idet hver rest X kan være lik eller forskjellig og til tross for dette kan bety en naturlig forekommende aminosyre så som f.eks. Tyr, Ser, Thr, Glu, Asp, Asn eller en hvilken som helst modifisert aminosyre som oppstår etter translasjon, så som trimetyllysin eller γ -karboksyglutaminsyre.

Den spesifikke hemmingen av trombin er den fremragende biologiske egenskapen. Proteinet isolert ifølge oppfinnelsen anvendes i medisinen som et antitrombotikum.

EKSEMPEL 1

Isolering av skogbjørner

Spyttkjertelen til skogbjørnen er et parvis organ og sitter i sagittalretningen på høyre og venstre side av den fremre kroppshalvdelen. Alt etter funksjonstilstand er spyttkjertelene i sultende eksemplarer små eller veldig store i sugende skogbjørner. De anvendte skogbjørnene hørte til Syd-afrikansk Bunt-skogbjørn, *Amblyomma hebraeum* og *Rhipicephalus evertsi*, avlet i kolonier i laboratorium i to år ifølge kjente fremgangsmåter.

Delsugde hunner i vektområdet 150-400 mg ble tatt fra vertsdyyret og umiddelbart deretter dissikert under et stereomikroskop, idet skogbjørnene ble fiksert i en Petriskål med ryggsiden på dobbeltsidig klebrig limband og spytt med PBS-buffer pH 7,2. Etter et snitt ved hjelp av en fin skapell langs periferien til skogbjørnen, ble over- og undersiden oppsprettet og spyttkjertelene ble forsiktig tatt ut og dypfryst i nitrogen.

EKSEMPEL 2

Ekstraksjon av virkemidlene ut i fra spyttkjertlene til
skogbjørnene

5
10
15
20
25

Spyttkjertler fra skogbjørn av arten *Amblyomma hebraeum* ble isolert og deretter knust under nitrogen til et fint pulver. Homogenisatet ble løst og lyofilisert. Den tørkede resten ble oppslemmet i 40% azeton og rystet kraftig ved 40°C i 30 minutter. Til slutt ble det sentrifugert i 10 minutter ved 15000 g. Sedimentet ble, som beskrevet, på ny ekstrahert og resten ble slått sammen med den første ekstraksjonen og sakte omsatt med 1 M eddiksyre til en pH på 5 ble oppnådd. Fellingen ble sentrifugert av og den klare supernatanten isolert. Supernatanten ble omsatt med 10% trikloreddiksyre i azeton til en pH på 1,81 ble oppnådd. Deretter ble iskaldt azeton i 10 ganger volumet tilsatt og felt i 3,5 timer ved 20°C. Fellingen blir sentrifugert ut i 10 minutter ved 6000 rpm i Sorvall-kjølesentrifuge. Sedimentet ble vasket med iskald aceton og eter, og tilslutt suspendert i vann. Suspensjonen ble frosset ved -80°C og til slutt lyofilisert i rotasjonsvakuum-avdamper. Den tørkede resten ble tatt opp i buffer (0,05 M trietanolamin-HCl 0,4 M NaCl pH 7,8).

EKSEMPEL 3

Gelfiltrering

30
35

Proteinblandingen i eksempel 2 ble rensset ved gelfiltrering. Til dette ble en kolonne med diameter på 1,6 cm og 78,3 cm høyde fylt med G 75 superfine Material fra firmaet Pharmacia. Elueringshastigheten var på 10 ml/time. Søylen ble kalibrert med et gelfiltreringskalibrerings-kit fra firmaet Pharmacia (art. nr. 17-0442-01). Trombinhemmende aktivitet ble registrert i fraksjoner med molekylvektsområde 20.000-30.000.

EKSEMPEL 4

Hemming av levring i plasma

5 Ut i fra de enkelte G 75-fraksjonene ble aliquoter på 50 µl
blandet med 50 µl H₂O og 100 µl citratbehandlet hundeplasma,
som inneholder 3 U trombin pr. ml og trombintiden ble
bestemt. Dette ble utført så som i Markwardt et al.
(Pharmazie 43 (1988) 202; Fol. Haematol. 115 (1988) 70).

10

EKSEMPEL 5

Hemming av trombinkatalysert spalting fra kromozym TH

15

Bestemningen foregikk ifølge publikasjonen til Griesbach et
al. (Thromb. Res. 37 (1985), 347-50), men metoden ble
forandret på en slik måte at reaksjonen ble gjennomført i
"Mikrotiter Platten"-brønner med sluttvolum på 0,2 ml.
20 Vurderingen foregikk ved 405 nM med et "Elisa"-avlesningsap-
paratur.

25

EKSEMPEL 6Rensing ved hjelp av trombinkolonne-affinitets-
kromatografi

30

Trombin-sepharose ble fremstilt ifølge metoden til Walsmann,
P. (Pharmazie 36 (1981) 860-861). G 75-fraksjonene som viser
aktivitet blir slått sammen, lyofylisert og lysatet tatt opp
i 0,1 M eddiksyre. Proben blir avsaltet på en avkjølt G 25-
kolonne og eluatet ifølge eksempel 5 blir undersøkt for
35 aktivitet. Den tørkede resten blir tatt opp i 0,05 M Tris-HCl
(pH 8) og applisert på en forbehandlet trombin-kolonne. Alle
trinnene ble utført ved 4°C. Kolonnen ble vasket 2 ganger med

0,05 M Tris-buffer pH 8 før den ble eluert med 5 M benzamidiniumklorid i 0,05 M Tris-HCl (pH 8). Fraksjonene ble samlet og aliquoter av disse ble tatt ut og slått sammen og dialysert mot H₂O og testet på trombinhemming. Fraksjonene som utviste høyeste aktivitet ble dialysert og lyofilisert. Lyofylisatet ble analysert ved SDS-polyakrylamidgelelektroforese med påfølgende sølvfarging ved anvendelse av et "farve-kit" fra firmaet Bio-Rad. Et proteinbånd ble oppdaget ved MW-området på ca. 25000 dalton som ikke tidligere ble oppdaget ved eluering av kolonnen uten tidligere pålegging av skogbjørn-probe.

EKSEMPEL 7

Avling av skogbjørn

Avling av trevert-skogbjørn, fra arten *Rhipicephalus evertsi* foregår ifølge Th. Hiepe (Lehrbuch der Parasitologie, Bd. 4, Gustav Fischer Verlag Stuttgart 1982, s. 46 ff.). Varigheten er ca. 3-4 måneder. Hunn-skogbjørner blir for egglegging oppbevart ved 20°C og ved en luftfuktighet som er høyere enn 90%. Etter at larvene er kommet ut, blir disse satt på for det første blodmåltidet. Etter måltidet foregår hudskifting til nymfer. Disse blir satt på kaninene for det andre blodmåltidet. De fullsugde nymfene går nå over i differensieringsstadiumet til voksne hanner og hunner.

Etter avsluttende differensiering anvendes de voksne dyrene.

EKSEMPEL 8

Isolering av amblyommin fra voksne skogbjørner

5 Voksne skogbjørner ble opphakkert i H₂O i en Ultra-Turrax-anordning fra fa. Janke und Kunkel. Skogbjørnhomogenisatet ble til slutt inkubert i 40 minutter ved 40°C, og deretter sentrifugert i 30 minutter ved 10.000 rpm og 5°C i en Sorvall-sentrifuge. Sedimentet blir resuspendert i H₂O og
10 påny inkubert ved 40°C i 30 minutter og til slutt sentrifugert. Supernatantene fra begge sentrifugeringstrinnene ble slått sammen og filtrert gjennom et blåbåndsfiler. Den klare supernatanten ble lyofilisert og resten tatt opp i 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) og til slutt renset over Q-sepharose Fast
15 Flow-kromatografi (gradient 0-1 NaCl i 20 mM Tris-HCl, pH 7,5). De amblyomminholdige fraksjonene ble identifisert ifølge eksempel 5, lyofylisert og sendt igjennom en G 75 superfine kolonne i eksempel 3. De antitrombotisk virksomme fraksjonene eluerte i molekylvektsområdet på 20-30000 dalton.
20 De ble slått sammen, og ved hjelp av "reversfase" HPLC renset over en Bio-Rad RP 304-kolonne. Som anordning ble Waters 600 Multisolvent Delivery-system anvendt. Følgende gradient ble kjørt: Start 80% A - 20% B (med A = 0,1% TFA og B = 0,1% TFA i 80% acetonitril) til 100% B i en løpetid på 60 minutter. De
25 antitrombotisk aktive fraksjonene ble slått sammen, lyofylisert og på ny renset over "reversfase" HPLC. Følgende gradient ble kjørt: Start 80% A : 20% B (A = 0,1% TFA; B = 0,1 % TFA i 80% acetonitril). Etter en elueringstid på 40 minutter ble 50% B oppnådd.

30

Under disse betingelsene ble en retensjonstid for amblyomminfraksjonen oppnådd på 27 minutter.

35

EKSEMPEL 9

Bestemming av molekylvekten til amblyommin

5 HPLC-fraksjonen med retensjonstid på 27 minutter ble analysert på en 17,5%-ig SDS-polyakrylamidgel. Som "molekylvektsmarkører" ble "elektroforesekalibrerings-kitet" til fa. Pharmacia (Art. nr. 17-0446-01) anvendt. Amblyommin vandrer i dette systemet noe under "karbon-anhydrasen", som er
10 beskrevet å ha en molekylvekt på 30.000 dt. For Amblyommin ble en molekylvekt på 26.000 ± 2.000 dt.

15

EKSEMPEL 10

Bestemming av det isoelektriske punktet

Amblyommin isolert ifølge eksempel 8 ble underkastet ultra-
20 tynnsljiktspokusering som foreslått av dr. Schulte et al. fra fa. LKB Instrument GmbH. Et isoelektrisk punkt på $5,35 \pm 0,3$ ble oppnådd.

25

EKSEMPEL 11

Proteinsekvensanalyse av amblyommin

30 Autentisk isolert protein fra voksne skogbjørner kunne ikke bli N-terminalt sekvensert. Materialet ble deretter underkastet en trypsinspaltning. For å muliggjøre en kvantitativ trypsinspaltning ble proteinet først derivatisert i en karboksymetyleringsreaksjon. Det ble dermed løst i 24 μ l
35 buffer (8 M guanidinium-HCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) og 51 μ g DTE i 4 μ l buffer samt 4,52 μ g 2-merkaptoetanol i 5 μ l ble tilsatt. Reaksjonsblandingen ble inkubert i en time ved 37°C

og deretter omsatt med 8,3 μ l av en jodacetamidoppløsning (0,25 M jodacetamid pH 8,0 innstilt med KOH) og inkubert ved romtemperatur i 1 time. Deretter ble 59 μ l H₂O tilsatt for å fortynne oppløsningen og etter tilsetning av 400 μ l C₂H₅OH etter kraftig rysting utfelt og ved 12000 rpm sentrifugert.

Sedimentet ble deretter ristet med 100 μ l CHCl₃ og omsatt med 300 μ l H₂O og påny sentrifugert. Den øvre fasen ble blandet med 300 μ l C₂H₅OH. Blandingen ble sentrifugert og sedimentet for trypsinspaltning ble løst i 66 μ l 0,2 M n-metylmorfolin (pH 8,5 innstilt med eddiksyre). Deretter ble 5 μ l trypsinoppløsning (3,3 μ g trypsin i N-metylmorfolinbuffer) tilsatt og blandingen ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur.

Fragmentblandingen ble deretter adskilt over et mikro-bor-reversert fase HPLC-skritt. (Mikro-bor-kolonne: 1 mm x 25 cm, Herst. firma Braun-Lee).

En lineær gradient på 10% A - 60% B ble påført (A = 10% acetonitril i HPLC-vann + 0,1% TFA; B = 10% H₂O i acetonitril + 0,1% TFA).

Det var mulig å isolere tre topp-fraksjoner. De ble enkeltvis tørket på glassfiberfiltrene til gassfasesekvenatoren og sekvensanalyse ble utført. Ved en 470 A gassfase-proteinsekvenator fra fa. Applied Biosystems ble anvendt med online PTH-identifikasjonssystem.

Følgende delaminosyresekvenser ble identifisert, og X står for en naturlig forekommende aminosyre:

- a) Ile-Leu-Phe-Thr-Gln-Gly-Asn-X-Gly-Gln-Leu-Glu-Asn-X-Phe-Glu
- b) Lys-Ile-Leu-Phe-X-Glu-Gly
- c) Ala-Ser-Tyr-Ile-Val-X-Ser-Glu-Ser-Ile-Gln-Ile-Leu-X-Leu-Ser-Glu-Gly-Ile.

P a t e n t k r a v

1.

Fremgangsmåte for isolering av et protein med trombininhibitorisk virkning eller et farmasøytisk anvendbart salt derav, som har en molekylvekt på 20.000 til 30.000 dalton, et isoelektrisk punkt mellom 5,05 og 5,65 og har aminosyredelsekvensen

- Ile-Leu-Phe-Thr-Gln-Gly-Asn-X-Gly-Glu-Leu-Glu-Asn-X-Phe-Glu-

- Lys-Ile-Leu-Phe-X-Gln-Gly- og

- Ala-Ser-Tyr-Ile-Val-X-Ser-Glu-Ser-Ile-Gln-Ile-Leu-X-Leu-Ser-Glu-Gly-Ile

hvor i hver rest X kan være lik eller forskjellig og betyr en naturlig forekommende aminosyre eller en hvilken som helst etter translasjon modifisert aminosyre, som trimetyllysin eller karboksyglutaminsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinet blir ekstrahert fra skogbjørner med acetone, utfelt med eddiksyrer eller trikloreddiksyrer ved pH 1,8, fraksjonert ved gelfiltrering og trombinsepharoseaffinitetskromatografi.

2.

Fremgangsmåte ifølge et eller flere av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at det nevnte proteinet blir isolert fra *Rhipicephalus evertsi*.

3.

Fremgangsmåte ifølge ett eller flere av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at det nevnte proteinet blir isolert fra *Amblyomma hebraeum*.