

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 864715 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **864715**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C07K 7/10

C07K 17/00

A61K 39/44

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date **19.11.1986**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.11.1986**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **23.05.1987**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

22.11.1985 US 801019

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Oncogen, 3005 First Avenue, Seattle, Wash. 98121, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Marquardt, Hans, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Todaro, George J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Twardzik, Daniel R., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Kasvua estävä käärmemyrkkyseptidi.

Tillväxthämmande ormgiftspeptid.

Kasvua estävä käärmemyrkky

Myrkyllisille aineille on paljon käyttötarkoituksia. Erityisesti kun sytotoksinen aine on spesifinen tai se voidaan muuntaa spesifiseksi tietyille kannoille tai solutyypeille, sytotoksiselle aineelle voi olla käyttöä tietyn kannan tai solutyypin eliminoimisessa viljelmästä tai kudoksesta, jossa on paljon erilaisia soluja. Esimerkiksi pahanlaatuis-
 5 ten kasvainten tapauksessa on toivottavaa kyetä spesifisesti eliminoimaan pahanlaatuiset solut, aiheuttamatta suurta kuol-
 10 leisuutta normaaleille tai terveille soluille.

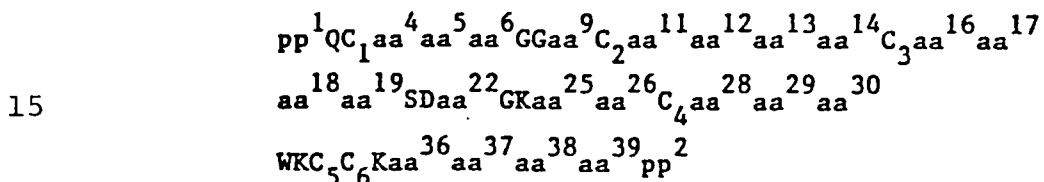
Eräs toksiinien lähde on käärmeenmyrkky. Tunnetaan useita toksineja. Uusien toksiinien löytämiseen on yhä kuitenkin kiinnostusta eri tarkoituksiin käyttökelpoisen toksii-
 15 nivalikoiman laajentamiseksi. Toksiinit voivat erota toisistaan toksiinin synnyttämän immuunivasteen, toisiin reagensseihin kytketymisen helppouden, toksiinin vaikutuspaikan ynnä muun suhteen. Uuden toksiinien löytämiseksi käärmeenmyrkystä tarvitaan käyttökelpoisuustesti, laajoja eristyskäsit-
 20 telyjä, puhdistus ja analyysi puhtauden ja aminohapposekvenssin toteamiseksi.

Useiden kalkkarokäärmelajien myrkystä eristettyjä sytotoksisia peptidejä on sekvensoitu, eristetty ja kuvattu. Myotoksiinia saadaan preeriakalkkarokäärmeen, *Crotalus*,
 25 myrkystä (Fox et al., *Biochemistry* 18 (1979) 678 - 83); krota-
 miinia saadaan Etelä-Amerikan kalkkarokäärmeen, *Crotalus durissus terrificus*, myrkystä (Lauree ja Hoppe-Seyler, *Physiol, Chem.* 356 (1975) 213 - 15); ja toksista peptidiä C saadaan Etelä-Tyynenmeren kalkkarokäärmeen, *Crotalus viridis helleri*,
 30 myrkystä (Maeda et al., *Toxicon* 16 (1978) 431 - 41).

Tarjotaan uusia sytotoksisia tai tolujen kasvua estäviä peptidejä, jotka ovat sukua peptidille, joka on eristetty Western Diamondback-kalkkarokäärmeen, *Crotalus atrox*, myrkys-
 35 tä. Näiden peptidien konjugaatteja spesifisten sitojien, esim. ligandien ja reseptorien kanssa voidaan käyttää solujen poistamiseen selektiivisesti soluseoksesta.

Tarjotaan sytotoksisia aineita, jotka koostuvat Crotalus atroxin myrkystä eristetyistä, noin 6 kilodaltonin (kD) peptidistä, sen sytotoksisista analogeista ja sytotoksisien aineiden konjugaateista peptidien kanssa, erityisesti ligandien ja spesifisesti komplementaariseen sitojaan sitoutuvien reseptorien kanssa. Aktiivisessa osassa on ainakin noin 15 aminohappoa, tavallisesti ainakin noin 25 aminohappoa ja tavallisemmin ainakin noin 35 aminohappoa, eikä enempää kuin noin 60 aminohappoa, tavallisemmin alle 50 aminohappoa. Nämä aktiiviset osat voivat olla kytkeytyneinä suureen määrään erilaisia muita aineita, jotka kuvataan jäljempänä.

Tämän keksinnön peptidien kaava on seuraavanlainen:



jossa:

pp¹ on N-pääteryhmä ja voi olla vety, yksittäinen
aminohappo, erityisesti polaarinen aminohappo, erityisemmin
hydroksisubstituoitu aminohappo tai emäksinen aminohappo,
tai 2 - 20, tavallisemmin 2 - 10 aminohapon muodostama poly-
peptidi, joka voi toimia monissa tehtävissä, kuten kytkentä-
ryhmänä, modifioivana ryhmänä, tms;

25 pp² on C-pääteryhmä ja voi olla terminaalinen hydrok-
syyliiryhmä, yksittäinen aminohappo, erityisesti polaarin
aminohappo, tarkemmin karboksamidon sisältävä aminohappo,
tai 2 - 20, tavallisemmin 2 - 10 aminohapon muodostama poly-
peptidi, joka voi toimia samoissa tehtävissä kuin pp¹;

30 kirjaimilla on tavallisesti merkityksenä yksikirjaimi-
sessa aminohappokoodissa, jotka esitetään alla;

korkeintaan 5, yleensä enintään noin 3 aminohapoista
 voi toimia sidoksina, ollen deleetioita rakenteessa;

C_1 C_5 :n kanssa, C_2 C_4 :n kanssa ja C_3 C_6 :n kanssa muodostavat kysteiinisidoksia, kun kysteiinisidoksia on;

35 aa⁴ on alifaattinen hapan tai aromaattinen aminohappo,
erityisesti D, E, H;

aa⁵ on alifaattinen polaarinen tai emäksinen aminohappo, erityisesti karboksamidosisubstituoitu tai emäksinen, tarkemmin N, Q, K, R;

5 aa⁶ on alifaattinen varautunut aminohappo, joko hapan tai emäksinen, erityisesti D, E, K, tai R;

aa⁹ on aromaattinen aminohappo, erityisesti F, H, W, Y;

aa¹¹ on alifaattinen varautunut aminohappo, erityisesti emäksinen aminohappo, tarkemmin K, R;

10 aa¹² on aromaattinen aminohappo tai alifaattinen polaarinen tai varautunut aminohappo, erityisesti hapan tai neutraali, tarkemmin hydroksisubstituoitu neutraali, mukaanlukien F, H, W, Y, D, E, S, T;

15 aa¹³ on alifaattinen ei-polaarinen tai varautunut aminohappo, erityisesti ei-polaarinen tai emäksinen, tarkemmin 4 - 6-hiiliatominen, mukaanlukien L, I, V, K, R;

aa¹⁴ on alifaattinen ei-polaarinen aminohappo, erityisesti 4 - 6-hiiliatominen, nimittäin L, I, V;

20 aa¹⁶ on alifaattinen ei-polaarinen 4 - 6-hiiliatominen aminohappo, erityisesti P, I, L, V;

aa¹⁷ on alifaattinen ei-polaarinen tai polaarinen 3 - 5-hiiliatominen aminohappo, erityisesti polaarisenä hydroksisubstituoitu, tarkemmin S, T, A, P, V;

25 aa¹⁸ on alifaattinen varautunut tai ei-polaarinen aminohappo, erityisesti emäksinen varattuna ja 3 - 6-, yleensä 4 - 6-hiiliatominen, tarkemmin P, I, L, V, K, R;

aa¹⁹ on alifaattinen polaarinen 3 - 4-hiiliatominen aminohappo, erityisesti hydroksisubstituoitu, tarkemmin S, T;

30 aa²² on alifaattinen ei-polaarinen tai aromaattinen aminohappo, joka alifaattisena on 5 - 6-hiiliatominen, tarkemmin F, I, L, V;

35 aa²⁵ on alifaattinen neutraali 3 - 6-hiiliatominen aminohappo, erityisesti 4 - 6-hiiliatominen, joka on polaarinen tai ei-polaarinen, jossa polaarisenä on rikkiatomi, tarkemmin M, I, L, V;

aa²⁶ on alifaattinen varautunut tai ei-polaarinen aminohappo, polaarisena erityisesti hapan, 2 - 5-, yleensä 2 - 4-hiiliatominen, tarkemmin G, A, P, D, E;

aa²⁸ on alifaattinen varautunut 4 - 6-hiiliatominen aminohappo, joka voi olla hapan tai emäksinen, erityisesti D, E, K, R;

aa²⁹ on alifaattinen tai aromaattinen aminohappo, alifaattisena 3 - 5-hiiliatominen, erityisesti A, P, V, F, H, W, Y;

aa³⁰ on alifaattinen neutraali ei-polaarinen tai emäksinen aminohappo, neutraalina ei-polaarisena 4 - 6-, yleensä 5 - 6-hiiliatominen, erityisesti I, L, V, K, R;

aa³⁶ on alifaattinen emäksinen aminohappo, erityisesti K, R;

aa³⁷ on alifaattinen tai aromaattinen aminohappo, alifaattisena 2 - 3-hiiliatominen, erityisesti G, A, F, H, W, Y;

aa³⁸ on alifaattinen neutraali polaarinen tai ei-polaarinen aminohappo, 2 - 4-hiiliatominen, polaarisena erityisesti hydroksisubstituoitu, tarkemmin G, A, P, S, T;

aa³⁹ on alifaattinen ei-polaarinen 2 - 6-, erityisesti 2 - 3-hiiliatominen aminohappo, tarkemmin G, A, P, I, L, V.

Eri aminohapporyhmät ja yksikirjaimiset viitteet ovat seuraavat:

25	alifaattiset	
	neutraalit	
	ei-polaariset	G, A, P, V, I, L
	polaariset	S, T, M, C, N, Q
	varaukselliset	
30	happamat	D, E
	emäksiset	K, R
	aromaattiset	F, H, W, Y
	G - glysiini	N - asparagiini
	A - alaniini	Q - glutamiini
35	P - proliini	D - aspariinihappo
	V - valiini	E - glutamiinihappo

	I - isoleusiini	K - lyysiini
	L - leusiini	R - arginiini
	S - seriini	F - fenylalaniini
	T - treoniini	H - histidiini
5	M - metioniini	W - tryptofaani
	C - kysteiini	Y - tyrosiini

Erityisen kiinnostavia ovat seuraavat kaavan mukaiset peptidit:

10 S Q C E Q E G G ^F C ^R ^L ^L
 H C K F V I

 C ^P S R ^T S D ^I G K ^L G C E P L W K C C K
 L L S L M

 R
 K W G G

15 jossa:

kun samassa kohdassa kaavaa on kaksi aminohappoa, siinä kohdassa voi olla kumpi tahansa niistä, mutta on edullisempaa että ylärivin aminohapot ovat yhdessä ja alarivin aminohapot samoin yhdessä.

20 On lisäksi ymmärrettävä että sallitaan konservatiiviset substituutiot. Konservatiivisilla substituutioilla ymmärretään sitä, että seuraavassa luettelossa olevat aminohapot voidaan korvata samalla rivillä luettelossa olevalla toisella aminohapolla.

25 G, A

 V, I, L

 D, E

 K, R

 S, T

30 F, H, W, Y

Peptidin N-pääteryhmä voi olla suojattu tai suojaamaton jolloin suojaus yleensä käsittää alifaattisen hapon, esim. etikkahapon tai muurahaishapon, alkylaation, jne. Yhdisteiden todetaan olevan lämmön- ja haponkestäviä koeosassa
35 esiteltyjen kokeiden perusteella.

Erityisen kiinnostava on luonnossa esiintyvä kasvua estävä peptidi, joka on ainakin noin 90-%:isesti edullisemmin 95-%:isesti, vielä edullisemmin 99-%:isesti puhdasta. Sitä voidaan käyttää sinänsä tai yhdessä muiden toksiinien kanssa. Nämä sytotoksiset tai kasvuaestävät yhdisteet voidaan konjugoida moniin erilaisiin ligandeihin ja reseptoreihin tavanomaisilla menetelmillä. Kytkennässä käytettävät funktionaaliset ryhmät voivat olla erilaisia happamia ryhmiä, kuten karboksyyli, sulfonyyli ja fosforyyli, tiolin ja olefiinien yhdistelmiä, ditio, aldehydejä, atsoryhmiä, diatsoryhmiä tai vastaavia. Suurimmaksi osaksi käytetään difunktionaalisia yhdisteitä, joiden reaktiot voidaan tehdä vaiheittain, mutta myöskin yhdellä kertaa reagoivia difunktionaalisia yhdisteitä voidaan käyttää. Kuvaaviin reagensseihin kuuluvat glutaraldehydi, formaldehydi, para-maleimidobentsoehappo, metyyliiditioetikkahappo, diatsobentsoehappo yms. Tapa, jolla sytotoksinen osa kytketään spesifiseen sitoutumisosaan ei ole tämän keksinnön kannalta oleellista.

Spesifiset sitoutumisosat ovat ligandeja ja reseptoreja, kun spesifiset sitoutumisosat suorittavat spesifisen sitoutumisen tiettyyn kohteeseen. Soluilla on tavallisesti esimerkiksi pinta-antigeeneja ja reseptoreja, jotka ovat tyyppillisiä tietylle solutyypille. Niinpä sopivia myrkylliseen aineeseen konjugoituja ligandeja tai reseptoreja käyttäen voidaan myrkyllinen aine edullisesti suunnata niihin soluihin, joissa on vastaava spesifinen sitoutumisoosa.

Yhdisteitä joita voidaan käyttää ligangeina ovat mm. steroidit, low density - lipoproteiini, kasvutekijät, virusproteiinit jne. Joko luonnollisia reseptoreja tai edullisemmin immunoglobuliineja tai niiden fragmentteja voidaan käyttää, kun reseptorit on suunnattu spesifisiin pinta-antigeeneihin. Kiinnostaviin immunoglobuliineihin kuuluvat IgA, IgD, IgM, IgE ja IgG, erityisesti IgG, mukaanlukien kaikki alalajit. Immunoglobuliinit voivat olla peräisin mistä tahansa tavanomaisesta lähteestä, erityisesti hiirestä tai ihmisestä. Immunoglobuliinit voidaan valmistaa hybrididoomista, transformoiduista soluista, esim. EBV-transformoi-

duista lymfosyyteistä, tai rekombinaatio-DNA-tekniikalla. Erityisesti voidaan hiiren muuttuja-alueita liittää ihmisen tai muun isännän vakioalueeseen, jolloin saadaan kimeerisiä immunoglobuliineja, joiden antigeenisuus voi olla alempi. 5 Lisäksi ei tarvitse käyttää koko immunoglobuliinia, vaan sen fragmentteja, kuten Fab, F(ab')₂, Fv, tms.

Ligandi ja toksiini voidaan yhdistää linkeillä, jotka ovat kohdesolussa pysyviä tai pysymättömiä niin, että toksiini ja kohdistinreagenssi voivat erottua solussa. On toivottavaa, että toksiini joutuu solun sisään niin että sen toiminta on solunsisäistä. Kun kohdistinaine ei häiritse toksiinin myrkyvaikutusta, ei ole tarpeen käyttää katkeavaa sidosta. Kun halutaan katkeava sidos, voidaan käytännöllisesti käyttää disulfidisidosta, joka voi pelkistyä isäntäsolussa. 10 15

Konjugaateissa voi olla erilaisia määrasuhteita kohdistusainetta, spesifistä sitoutumisosaa ja toksiinia. Yleensä on ainakin yksi toksiini kohdistinainetta kohden, mutta ei yli yhtä toksiinia/0,5 kilodaltonia (kD) kohdistinainetta. 20 Yleensä on ainakin yksi toksiinimolekyyli/100 kD kohdistinainetta, tavallisemmin ainakin yksi/50 kD kohdistinainetta. Kun kohdistinaine on pieni, kuten pienimolekyyllipainoinen hapteni, voi olla 2 tai useampia ligandeja toksiinia kohden, yleensä ei enempää kuin 5 ligandia toksiinia kohden.

Kyseisiä yhdisteitä voidaan käyttää in vitro tai in vivo. In vitro -käytössä niitä voidaan käyttää tuhoamaan selektiivisesti soluja, jotka voidaan erottaa muista soluista viljelmässä tai kudoksessa. Yhdisteet voidaan lisätä alustaan riittävinä määrinä ei-toivottujen solujen tuhoamiseksi. 25 30 Esimerkiksi etsittäessä tiettyjä histokompatibiliteettiantigeeneja voidaan lisätä reagensseja, jotka sisältävät tietyille histokompatibiliteettiantigeenille spesifisiä vasta-aineita. Lisäämällä väriä, jota vain kuolleet solut absorboivat, värin läsnäolo soluissa osoittaa etsittyä histokompatibiliteettityyppejä. 35 Kohdistetun toksiinireagenssin määrä voidaan vaihdella laajasti ja se optimoidaan kuhunkun tilanteeseen in

vitro -käytössä. Ei pitäisi käyttää liikaa kohdistettua toksiinireagenssia, mistä seuraa epäspesifistä sitoutumista ja virheellisiä positiivisia tuloksia, eikä myöskään liian vähää, mistä voisi seurata virheellisiä negatiivisia tuloksia johtuen alhaisesta sitoutumisasteesta, jota on vaikea havaita.

In vivo -käytössä konjugaatti voidaan antaa parenteraalisesti tai injektiona, erityisesti suonensisäisesti. Käytetty konjugaattimäärä vaihtelee laajalti riippuen tapettavan solun laadusta, solupopulaation laajuudesta, solujen vastustuskyvystä konjugaattia vastaan, konjugaatin tehosta ynnä muusta. Annettuna muuhun kuin spesifiseen kohteeseen, proteiinin määrä vaihtelee yleensä 1 μ g ja 10 mg välillä ja on yleensä korkeintaan 2 mg isännän ruumiinpainokilogrammaa kohden. Spesifisessä kohteessa proteiinimäärä on konsentraatiovaihtelun alapäässä. Konjugaatti voidaan antaa fysiologisesti hyväksyttävässä väriaineessa, kuten fosfaattipuskuroidussa suolaliuoksessa, suolaliuoksessa tai muussa sopivassa kantajassa. Jauheina konjugaatti voidaan yhdistää muihin aineisiin jotka voivat auttaa yhdisteen ohjaamisessa tiettyyn elimeen, saada aikaan pitkitetyn vapautumisen tms. Tavot, joilla proteiinipitoisia koostumuksia voidaan antaa, ovat sinänsä tunnettuja, eikä niitä käsitellä yksityiskohtaisemmin.

Erityisen kiinnostavia kohdesoluja ovat tuumorisolut ja patogeeniset mikro-organismit. Erityisen kiinnostavia yleisyytensä vuoksi ovat keuhkosityövät; paksu- ja peräsuolen syöpäsolut; rintasyöpä; kohtusyöpä; eturauhassyöpä; rakko- ja munuaissyöpä; lymfooma; leukemia; ja Hodgkinsin tauti.

Edustavia patogeenisiä mikro-organismeja ovat alkueläimet, kuten Plasmodium vivax, P. maleriae, P. ovale, ja P. falciparum, gramnegatiiviset bakteerit kuten Pseudomonas, Klebsiella ja Neisseria, gram-positiiviset bakteerit yms.

Kasvua estävän peptidin puhdistus *Crotalus atrox*in
myrkystä

Raaka peptidiyhdiste saatiin lypsämällä myrkkyä
*Crotalus atrox*ista ja se kirkastettiin hitaalla sentrifugoin-
nilla ennen lyofilisointia. Pakastekuivattu myrkky liuotettiin
(10 mg/ml) 1 M etikkahappoon ja liukenematon aine poistettiin
hitaalla sentrifugoinnilla.

Alkupuhdistus suoritettiin panemalla näyte 7,5 ml
erissä 1 M etikkahapolla tasapainotettuun Bio-Gel P10 kolon-
niin, ja fraktiot kerättiin (3,5 ml) ja annokset poistettiin
ja lyofilisoitiin. Annoksista testattiin alunperin DNA-syntee-
sin inhibitio A549 ihmisen keuhkokarsinoomasoluviljelmissä.
Lyhyesti, 2×10^4 A549-solua ympättiin 96-kaivoiselle levylle
ja kiinnittymisen jälkeen soluja käsiteltiin sopivilla kolon-
nifraktioilla. Viiden vrk. kuluttua kaivot käsiteltiin ^{125}I -
deoksiuridiinilla ja DNA-synteesi mitattiin suhteessa kont-
rollikaivoihin ^{125}I -deoksiuridiininoton perusteella. Havait-
tiin kaksi suurempaa inhibitiohuippua. Ensimmäinen alhaisen
molekyylipainon inhibitioaktiivisuushuippu, joka eluoitui
lähelle 6 000 M_r insuliinimerkkiä, puhdistettiin käyttäen
korkeapainenestekromatografiaa (HPLC).

Näyte lyofilisoitiin ja suspensioitiin uudelleen 0,05 %
trifluorietikkahappoon (TFA) HPLC-luokan puhdistetussa vedes-
sä (Water's Associates). Liukenematon aine poistettiin sentri-
fugoimalla ja näyte injisoitiin C_{18} -Novapak -kolonniin. Näy-
tettä eluoitui lineaarisella 20 - 60 % asetonitriiligradien-
tilla 0,05 % TFA:ssa virtausnopeudella 1 ml/min 22°C :ssa.
Jokainen A_{214} absorboiva peptidi kerättiin erikseen ja annok-
set testattiin DNA-synteesi-inhibition suhteen. Peptidi, joka
eluoitui 54 % asetonitriilissä inhiboi A549-solujen DNA-syn-
teesiä; inhibitiota ei havaittu muita kolonnifraktioita käy-
tettäessä. Tämän aktiivisuuden SDS-PAGE osoitti yhtä hopeaa-
värjäävää vyöhykettä; muita vyöhykkeitä ei näkynyt tällä gee-
lillä, mikä osoittaa, että peptidi on puhdistettu homogeeni-
seksi.

Inhiboitujen solujen morfologia

Inhiboiduissa soluissa näkyi hämmästyttävä morfologinen muutos 24 h tällä "kasvua estäväksi peptidiksi" (Growth Arresting Peptide, GAP) kutsutulla peptidillä käsittelyn jälkeen. Sekä ihmisen tuumorisolut että ei-transformoituneet fibroblastit inhiboituivat tässä mittauksessa (50 % soluista ympätty) peptidikonsentraatiolla noin 100 ng/ml. Käsittelyn jälkeen solut tulivat pyöreiksi ja useimmat dendriittimäiset ulokkeet olivat poissa; solut kuitenkin yhä olivat kiinni levyssä. Tämä vaikutus oli palautumaton, sillä käsiteltyjen solujen pesu ja ruokkiminen tuoreella alustalla, joka sisälsi 10 % seerumia ei saanut soluja palautumaan takaisin alkuperäiseen fenotyyppiinsä.

GAP:n kemiallinen rakenne

GAP:n aminohapposekvenssi määritettiin mikrosekvenssianalyysillä peptideistä, jotka oli saatu pelkistetyn ja S-karboksimetyloidun GAP:n entsyymihajotuksesta (a) endoproteinaasilla Lysiini-C; (b) TPCK-trypsiinillä (L-(1-tosyyliamido-2-fenyyli)etyylikloorimetyyliketoni); ja (c) *Stafylococcal aureus* V8:lla. Peptidifragmentit puhdistettiin käänteisfaasi-HPLC:llä käyttäen haihtuvia liuottimia. Amino - terminaalisesti suojattuja peptidejä inkuboitiin 12N HCl:ssä huoneenlämmössä 16 h. Näytteet kuivattiin lyofilisoimalla. Peptideille suoritettiin automaattinen Edman-hajotus kaasufaasi Protein Sequencer malli 470A:lla (Applied Biosystems, Inc.). Fenyyliitiiohydantionaminohapot analysoitiin rpHPLC:llä.

GAP:n aminohapposekvenssi on seuraavanlainen:



Rakenne selvitettiin mikrosekvenssianalyysillä. Lyhyesti, GAP pelksitettiin ditiotreitolilla, S-karboksiamidometyloitiin jodiasetamidilla ja 10 % annokselle suoritettiin automaattinen Edmanhajotus. N-terminaalista aminohappoa ei havaittu, vaikka suoritettiin useita kierroksia Edman-hajotusta,

mikä viittaa siihen, että GAP:n terminaalinen aminoryhmä on suojattu.

45 % annos S-karboksiamidometyloitua GAP hajotettiin Lysiini-C-entsyymillä. Peptidit K1-24 ja K25-32 erotettiin
 5 rPHPLC:llä. Peptidit K33-35 ja K36-39 eivät jääneet kolon-
 niin ja eluoitiin seoksena. Näitä entsyymejä ei yritetty
 puhdistaa. 50 % annoksille peptidejä K1-24 ja K25-32 suori-
 tettiin automaattinen Edman-hajotus. N-terminaalista amino-
 happoa ei havaittu kun K1-24 sekvensoitiin. Jäljelle jäävä
 10 50 % annos K1-24:ää hajotettiin myöhemmin TPCK-trypsiinillä.
 Tryptiset peptidit T1-11, T12-18 ja T19-24 erotettiin
 rPHPLC:llä ja niille suoritettiin Edman-hajotus. N-termi-
 naalista aminohappoa ei havaittu kun K1-24 sekvensoitiin,
 mikä viittaa siihen, että T1-11 on K1-24:n N-terminaalinen
 15 peptidi. Jäljelle jäävästä 50 % T1-11-erästä poistettiin
 myöhemmin suojaryhmät 12N HCl:llä ja happokäsitellyn T1-11:n
 sekvenssi määritettiin. T12-18 sisälsi C-terminaalisen argi-
 niiniryhmän, kun taas K1-24 sisälsi C-terminaalisen lysiini-
 ryhmän, joten sen oletettiin olevan K1-24:n karboksyyliter-
 20 minaalinen peptidi. Peptidi K25-32 sekvensoitiin täydelli-
 sesti. Esitetyt tiedot tukevat GAP:n ehdotettua aminohappo-
 sekvenssiä ryhmille 1 - 32.

Jäljellä oleva 45 % annos S-karboksiamidometyloitua
 GAP:tä hajotettiin Staphylococcal aureus V8:lla. Peptidit
 25 E1-E6, E7-21 ja E22-39 erotettiin rPHPLC:llä 50 % annoksille
 peptidejä E1-6, E7-21 ja E22-39 suoritettiin automaattinen
 Edman-hajotus. N-terminaalista aminohappoa ei havaittu pep-
 tidissä E1-6. E7-21 ja E22-39 täydelliset rakenteet laajen-
 sivat GAP:n ehdotetun rakenteen ryhmien 1-39 suhteen ja
 30 vahvistivat peptidien T12-18, T10-24 ja K25-32 laadun. 50 %
 erästä peptidiä E1-6 poistettiin myöhemmin suojaryhmät 12N
 HCl:llä, mahdollisesti happokatalysoidun N-O asetyylisiirty-
 män Ser-1:ssä avulla. Happokäsitellyn E1-6:n sekvenssi määri-
 tettiin. Jäi jäljelle mahdollisuus, että lisää peptidejä oli-
 35 si rakenteessa Gly-39:n takana, koska GAP:n karboksipepti-
 daasikäsittelyt eivät vahvistaneet Gly-39:ää C-terminaali-
 seksi aminohapoksi. GAP:n ja krotamiinin, myotoksiini A:n

ja toksisen peptidin C ekstensiivinen sekvenssihomologia kuitenkin tukee ehdotettua rakennetta.

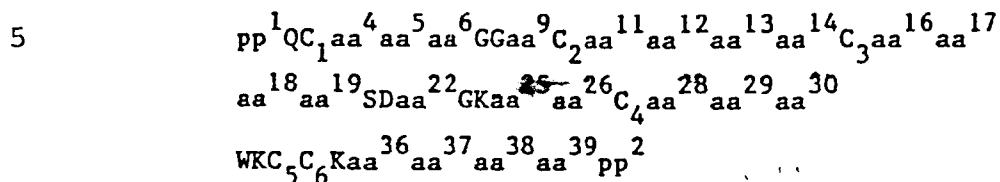
Rakenteellisesti GAP kuuluu kalkkarokäärmetoksiini-perheeseen, ryhmään polypeptidejä, jotka aiheuttavat lihasten degeneraatiota vahingoittaen ensisijaisesti endoplasman retikulumia. GAP:n vertaaminen kaikkiin Protein Sequence Databasen (PIR Release 5,0, Toukokuu 1985) sisältämiin proteiinisekvensseihin ei paljastanut laajaa homologiaa mihinkään muuhun tunnettuun sekvenssiin. GAP:n ja kalkkarokäärmetoksiinien sekvenssit voidaan asettaa rinnakkain niin että kysteiiniryhmien asemat ovat homologiset lisäämällä kaksi deletiota GAP:n ryhmien 10 ja 11 väliin. Se, että GAP sisältää kuusi puolikysteiiniryhmää viittaa siihen, että polypeptidissä on kolme disulfidisiltaa. Yllä kuvattua aminohapposekvenssiä voidaan laajalti muunnella säilyttäen silti muodollisen rakenteen ja sytotoksisen aktiivisuuden.

Keksinnön kohteena olevia toksiineja voidaan käyttää selllaisten toksiinien asemesta kuin risiini, difteriatoksiini, abriini ja muut vastaavat, tunnetun metodologian mukaisesti. Katso esim. Jansen et al., Recept.-Mediated Binding Intern. Toxins Horm. /Proc. Symp./1980 (Pub. 1981) 351 - 356 (C.A. 95:126185u); Masuho et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 90 (1979) 320-326; US-patentti 4 340 535.

Vaikkakin edellä kuvattua keksintöä on kuvattu melko yksityiskohtaisesti esimerkein selvyyden ja ymmärrettävyyden vuoksi, on selvää, että tiettyjä muutoksia ja muunnelmia voidaan tehdä liitteenä olevien patenttivaatimuksien puitteissa.

Patenttivaatimukset:

1. Toksinen peptidi, jolla on kaava:



jossa:

- 10 pp^1 on N-pääteryhmä ja on vety tai 1 - 20 aminohapon muodostama aminohappoketju;
 pp^2 on C-pääteryhmä ja voi olla hydroksyyli tai 1 - 20 aminohapon muodostama aminohappoketju;
 yksittäisillä kirjaimilla on normaalit yksikirjaimisen aminohappokoodin mukaiset merkityksensä;
 15 korkeintaan 5 numeroilla merkityistä aminohapoista voi toimia sidoksina;
 kun kysteiniinisiidoksia on, C_1 muodostaa parin $C_5:n$ kanssa, C_2 $C_4:n$ kanssa ja C_3 $C_6:n$ kanssa;
 20 aa^4 on alifaattinen hapan tai aromaattinen aminohappo;
 aa^5 on alifaattinen polaarinen tai emäksinen aminohappo;
 aa^6 on alifaattinen varautunut aminohappo;
 aa^9 on aromaattinen aminohappo;
 25 aa^{11} on alifaattinen emäksinen aminohappo;
 aa^{12} on aromaattinen aminohappo tai alifaattinen polaarinen tai varautunut aminohappo;
 aa^{13} on alifaattinen ei-polaarinen tai varautunut aminohappo;
 30 aa^{14} on alifaattinen ei-polaarinen aminohappo;
 aa^{16} on alifaattinen ei-polaarinen 4 - 6-hiiliatominen aminohappo;
 aa^{17} on alifaattinen ei-polaarinen tai polaarinen 3 - 5-hiiliatominen aminohappo;
 35 aa^{18} on alifaattinen ei-polaarinen tai emäksinen 3 - 6-hiiliatominen aminohappo;

aa¹⁹ on alifaattinen polaarinen 3 - 4-hiiliatominen amino;

aa²² on alifaattinen ei-polaarinen tai aromaattinen aminohappo;

5 aa²⁵ on alifaattinen neutraali 3 - 6-hiiliatominen aminohappo;

aa²⁶ on alifaattinen varautunut tai ei-polaarinen 2 - 5-hiiliatominen aminohappo;

10 aa²⁸ on alifaattinen varautunut 4 - 6-hiiliatominen aminohappo;

aa²⁹ on alifaattinen 3 - 5-hiiliatominen aminohappo tai aromaattinen aminohappo;

aa³⁰ on alifaattinen ei-polaarinen tai emäksinen 4 - 6-hiiliatominen aminohappo;

15 aa³⁶ on alifaattinen emäksinen aminohappo;

aa³⁷ on alifaattinen 2 - 3-hiiliatominen aminohappo tai aromaattinen aminohappo;

aa³⁸ on alifaattinen neutraali 2 - 4-hiiliatominen aminohappo;

20 aa³⁹ on alifaattinen ei-polaarinen aminohappo, jolloin N-pääteryhmä voi olla suojattu tai suojaamaton.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen toksinen peptidi, tunnettu siitä, että mainittu N-pääteryhmä on suojaamaton.

25 3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen toksinen peptidi, tunnettu siitä, että pp¹ on vety ja pp² on hydroksyyli.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen toksinen peptidi, tunnettu siitä, että N-pääteryhmä on suojattu.

30 5. Toksinen peptidi, jolla on kaava:

S Q C E Q E G G ^FH ^CR ^FL ^LV ^II

C ^PL ^SR ^TS ^DI ^LG ^KM ^LG C E P L W K C C K

35

R
K W G G

jossa silloin, kun kaksi aminohappoa on kuvattu samaan paikkaan, siinä voi olla kumpi tahansa aminohappo.

5 6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen toksinen peptidi, t u n n e t t u siitä, että siinä on vain ylärivin aminohapot.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen toksinen peptidi, t u n n e t t u siitä, että siinä on vain alarivin aminohapot.

10 8. Toksinen peptidi -konjugaatti, t u n n e t t u siitä, että siihen kuuluu patenttivaatimuksen 1 mukainen toksinen peptidi, joka on kovalenttisesti sitoutunut spesifisen sitoutumisparin osaan.

15 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen toksinen peptidi -konjugaatti, t u n n e t t u siitä, että spesifisen sitoutumisparin osa on ligandi.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen toksinen peptidi -konjugaatti, t u n n e t t u siitä, että spesifisen sitoutumisparin osa on reseptori.

20 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen toksinen peptidi -konjugaatti, t u n n e t t u siitä, että reseptori on vasta-aine.

12. Toksinen peptidikonjugaatti, t u n n e t t u siitä, että se käsittää toksiinia Crotalus atroxista, kovalenttisesti sidottuna spesifisen sitoutumisparin osaan.

25 13. Menetelmä ennalta määrätyn soluryhmän kasvun estämiseksi soluseoksessa, t u n n e t t u siitä, että: soluseos yhdistetään patenttivaatimuksen 10 mukaiseen peptidikonjugaattiin, jossa reseptori on spesifinen antigeenille, jota on soluryhmän pinnalla, riittävästi solujen kasvun pysäyttämiseksi, mikä inhiboi mainittujen solujen kasvua.
30

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkintä hakemusjulkaisun esim. saksal. Offenlegungsschriftin numeron
eteen ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen ja p.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

30.9.91

Julka Järvelin

Allekirjoitus