

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 159206 B



(21) Patentansøgning nr.: 5474/86

(51) Int.Cl.⁵ C 07 K 7/04

(22) Indleveringsdag: 14 nov 1986

(41) Alm. tilgængelig: 17 jun 1987

(44) Fremlagt: 17 sep 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 nov 1985 DK 5282/85

(71) Ansøger: *Novo Industri A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Jesper *Zeuthen; DK, Lars *Thim; DK, Niels Peter Hundahl *Møller; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) K-cellestimulerende peptider og salte deraf samt farmaceutiske præparater indeholdende disse

(56) Fremdragne publikationer

EP off. g. skrift nr. 107509

Andre publikationer. The journal of biological chemistry,
259, nr. 3 (1984) side 1695-1702;

Scand. J. Immunol. 10 (1979) side 593-596.

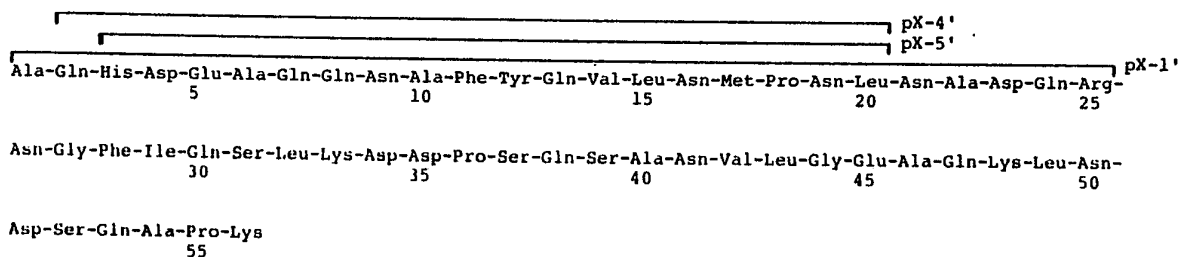
5474-86

(57) Sammendrag:

Peptider med formlen R¹-His-Asp-Gln-Ala-R, hvori R¹ er Ala-Gln, og R vælges fra en gruppe polypeptider med op til 50 aminosyregrupper, og hvori én eller flere af aminosyregrupperne i R¹ og/eller R uafhængigt kan udelades, har vist sig anvendelige til at forstærke cellemedieret cytotoxicitet og kan dermed anvendes til at behandle cancertyper og virusinfektioner. Peptiderne kan fremstilles syntetisk, ved rekombinant DNA-teknik, eller nogle af dem kan fremstilles ved proteolytisk nedbrydning af protein A fra Staphylococcus aureus.

Fig. 1

5474-86



DK 159206 B

K-CELLESTIMULERENDE PEPTIDER OG SALTE DERAFT SAMT
FARMACEUTISKE PRÆPARATER INDEHOLDENDE DISSE

Opfindelsen angår hidtil ukendte peptider med formelen I nedenfor og fysiologisk forenelige salte deraf, hvilke peptider har interessante og overraskende farmakologiske egenskaber, idet de besidder en evne til at forstærke
5 cellemedieret cytotoxicitet. Opfindelsen angår således også farmaceutiske præparater, der indeholder i det mindste ét af disse peptider.

I den følgende beskrivelse og kravene er den anvendte nomenklatur i overensstemmelse med J.Biol.Chem.
10 247 (1972), 977 ff.

Cancertyper og virusinfektioner er alvorlige lidelser, og der er indtil nu ikke fremkommet noget lægemiddel, der kan anvendes over for alle cancertyper eller virusinfektioner uden bivirkninger.

15 Naturlig dræbning (herefter NK) og antistofafhængig cellulær cytotoxicitet (herefter ADCC) er kendte eksempler på immunologiske forsvarsmekanismer over for cancer og virusinfektioner. Adskillige undersøgelser har antydnet en forbindelse mellem disse typer cellulære cytotoxiske reaktioner og forsvarsmekanismer over for cancer
20 samt virusinfektioner. Derfor anses stimulering af NK- og/eller ADCC-aktivitet samt andre cellulære cytotoxicitetsmekanismer (herefter kollektivt betegnet cellulær dræbning (K-celleaktivitet)) in vivo for at være af stor
25 betydning ved behandling af cancertyper og virusinfektioner.

Det har vist sig, at én gruppe proteiner, dvs. interferonerne, stimulerer disse reaktionstyper. Det er også kendt, at visse andre peptider og proteiner stimulerer
30 K-celleaktiviteter. Lymfokinen interleukin-2 er blevet angivet som værende særlig vigtig ved stimulering af K-celleaktivitet, og forstærkningen af K-celleaktivitet med lymfokiner efter stimulering i 3 - 5 dage benævnes ofte lymfokinaktiveret dræbning (herefter LAK), og stimulerede

celler benævnes lymfokinaktiverede dræberceller (herefter LAK-celler).

Det er kendt, at protein A fra *Staphylococcus aureus* stimulerer K-celleaktiviteter.

5 Det er endvidere kendt, at *S. aureus* protein A (herefter SpA) har et antal andre immunologiske egenskaber herunder aktivering af komplementsystemet, polyklonal stimulering af B- og T-lymfocytter, polyklonal aktivering af antistofsyntese og interferoninduktion.

10 Disse egenskaber ved SpA har frembragt stor interesse for anvendelsen af SpA som immunologisk reagens, og det er yderst ønskeligt at komme frem til en måde, hvorpå SpA's nyttige egenskaber kan udnyttes uden at fremkalde de mere skadelige egenskaber ved dette protein.

15 SpA kan ikke anvendes direkte in vivo, eftersom det kan fremkalde overfølsomhedsreaktioner (sandsynligvis på grund af dets binding til immunoglobuliners Fc-del med efterfølgende aktivering af komplement etc.). Forskellige præparater med det fuldstændige SpA molekyle har imidlertid
20 været anvendt til ekstrakorporeal plasmaadsorbition i stor skala (J. Balint Jr. et al: Cancer Research 44 (1984), 734 - 743), hvilket er blevet fortolket som en vekselvirkning med immunoglobuliner i immunkomplekser, eller til intravenøs infusion i dyr (H.D. Harper et al.: Cancer
25 (1985), 1863 - 1867) med gunstige resultater.

Protein A fra *S. aureus* er et protein, hvor den NH₂-terminale del indeholder fem homologe enheder hver omfattende fra 56 til 61 aminosyrer, og den COOH-terminale del indeholder adskillige gentagelser af en octapeptid (cf.
30 Uhlén M. et al.: J.Biol.Chem. 259, 3 (1984), 1695 - 1702).

De fem homologe områder i den N-terminale del benævnes som regel E-, D-, A-, B- og C-områderne, og den C-terminale del benævnes X-området.

35 SpA's struktur er blevet indgående undersøgt og er ud over i den tidligere henvisning beskrevet i en række publikationer, såsom WO 8400773, WO 8400774, WO 8403130

(alle Pharmacia AB) og EP A2 107,509 (Repligen Corp.), hvortil der henvises.

Resultater, der er opnået i undersøgelser udført af J. Sjö Dahl og G. Møller (Scand.J.Immunol. 10 (1979), 593 - 596) og Olinescu et al. (Immunol.Letters 6 (1983), 231 - 237), er blevet fortolket som angivende, at den aktive del af SpA molekylet skulle ligge i det såkaldte X-område, den C-terminalt lokaliserede del af molekylet. En tilsvarende angivelse af aktive sites i SpA findes på side 3 i ovennævnte europæiske ansøgning nr. EP A2 107.509.

Det har nu overraskende vist sig, at peptider med formelen I nedenfor har K-cellestimulerende virkning. Et antal forbindelser med formelen I er blevet identificeret ud fra proteolytisk spaltning af SpA og isolering af fragmenter, som udviser ingen eller kun ringe binding til immunoglobuliner (d.v.s. de er i det væsentlige uden immunoglobulin tværbindingsaktivitet). Disse fragmenter har vist sig at have K-cellestimulerende virkning in vitro over for både NK-følsomme og -ufølsomme targetceller.

Som angivet ovenfor kan de omhandlede peptider afledes fra SpA som fragmenter bestående af en kontinuerlig del af aminosyresekvensen fra det såkaldte E-område (jfr. Uhlén M. et al.: J.Biol.Chem. 259, 3 (1984), 1695 - 1702), hvilke fragmenter indeholder fra 20 aminosyregrupper og op til 25 aminosyrerester fra hele sekvensen for E-området.

Peptiderne ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de har den almene formel I

30

Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-
Tyr-Gln-Val-Leu-Asn-Met-Pro-Asn-R (I)

hvor R er Leu, Leu-Asn, Leu-Asn-Ala, Leu-Asn-Ala-Asp, Leu-Asn-Ala-Asp-Gln eller Leu-Asn-Ala-Asp-Gln-Arg, og fysiologisk forenelige salte deraf.

35

Som eksempler på specifikke og foretrukne peptider med formlen I kan de følgende nævnes:

Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gln-Val-
5 Leu-Asn-Met-Pro-Asn-Leu-Asn-Ala-Asp-Gln-Arg, pX-1'
(svarende til de første 25 aminosyregrupper i E-området),
og
Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gln-Val-
Leu-Asn-Met-Pro-Asn-Leu, pX-2',
10 (svarende til de første 20 aminosyregrupper i E-området),

De farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen er ejendommelige ved, at de indeholder i det mindste ét peptid eller salt deraf ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 3 i
15 kombination med et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel eller excipiens.

Ifølge et foretrukket aspekt angår opfindelsen peptider og kompositioner, der er nyttige til forstærkning
20 af K- celleaktiviteten i dyreceller, omfattende et peptid med en aminosyresekvens svarende til et fragment af E-området i SpA, hvor peptiderne er yderligere karakteriseret ved, at de er i det væsentlige fri for immunoglobulin-bindingsaktivitet, og fysiologisk forenelige salte deraf.

25 Nedenfor beskrives opfindelsen nærmere under henvisning til tegningen, hvori

fig. 1 viser aminosyresekvenserne for område E i protein A fra *Staphylococcus aureus* stamme 8325-4 (jfr.
30 Uhlén et al. ovenfor),

fig. 2 viser det elueringsmønster, der opnås ved isoleringen af et peptid ifølge opfindelsen,

fig. 3 viser resultaterne af en komparativ test mellem SpA og non-IgG-bindingsfragmenter, og

35 fig. 4 viser resultaterne af en test for komplementaktivering med SpA og et peptid ifølge opfindelsen.

Opfindelsen er baseret på den overraskende observation, at SpA's evne til at forstærke cellemedieret cytotoxicitet øjensynlig ligger i E-området eller fragmenter deraf.

5 Endvidere har det også overraskende vist sig, at E- området eller fragmenter deraf har ingen eller ringe affinitet til immunoglobuliner, hvorved aktivering af komplement i det væsentlige elimineres.

Disse fragmenter omfatter alle aminosyregrupperne
10 His-Ala-Glu-Ala.

I fig. 1 er aminosyresekvensen for område E angivet med markeringer, der anfører de foretrukne peptider ifølge opfindelsen.

Den omhandlede opfindelse angiver et antal pepti-
15 der, hvoraf nogle kan udledes fra SpA's aminosyresekvens. Et af disse blev frembragt ved plasminnedbrydning af SpA, og aminosyresekvensen blev bestemt som følger:

20	Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gln-Val-Leu-	
	5 10 15	
	Asn-Met-Pro-Asn-Leu-Asn-Ala-Asp-Gln-Arg	(pX-1')
	20 25	

Et andet syntetiseredes som:

25	Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gln-Val-Leu-	
	5 10 15	
	Asn-Met-Pro-Asn-Leu	(pX-2')
	20	

30

Begge disse peptider ifølge opfindelsen blev afprøvet og fandtes at forstærke cellemedieret cytotoxicitet ved in vitro undersøgelser for forstærkning af K-celleaktiviteten.

35 Aminosyresekvenserne for pX-1' og pX-2' svarer til sekvenserne for henholdsvis de første 25 og 20 aminosyregrupper i SpA, svarende til den N-terminale del af område E, der omfatter de første 56 aminosyregrupper i SpA.

De omhandlede peptider kan syntetiseres efter en vilkårlig, kendt fremgangsmåde. En oversigt over sådanne teknikker kan ses i J.M. Stewart og J.D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman, San Francisco, 1969 og J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, Vol. 2, (1973), side 46, Academic Press, New York, for fastfasesyntese og i E. Schroder og K. Lubke, The Peptides, Vol. 1, (1965), Academic Press, New York, for klassisk opløsningssyntese.

I almindelighed omfatter disse metoder en sekventiel tilføjelse af én eller flere aminosyrer eller passende beskyttede aminosyrer til en voksende peptidkæde. I almindelighed beskyttes enten amino- eller carboxylgruppen i den første aminosyre med en passende beskyttelsesgruppe. Den beskyttede eller derivatiserede aminosyre kan derefter enten fæstnes til et inert fast underlag eller anvendes i opløsning ved at tilføje den næste aminosyre i sekvensen med den komplementære (amino- eller carboxyl-) gruppe beskyttet passende under betingelser, der er egnede til at danne amidbindingen. Derefter fjernes den beskyttende gruppe fra denne nyligt tilføjede aminosyregruppe, og den næste aminosyre (passende beskyttet) tilføjes derefter, og så fremdeles. Efter at alle de ønskede aminosyrer er blevet forbundet i den korrekte sekvens, fjernes alle tilbageblevne beskyttelsesgrupper (og ethvert fast underlag) sekventielt eller samtidigt til opnåelse af det endelige peptid. Ved enkel modificering af denne almene procedure er det muligt at tilføje mere end én aminosyre på én gang til en voksende kæde, f.eks. ved (under betingelser, der ikke racemiserer kirale centre) at koble et beskyttet tripeptid til et passende beskyttet dipeptid til efter fjernelse af beskyttende grupper at danne et penta-peptid.

De omhandlede polypeptider kan endvidere fremstilles ved rekombinant DNA-teknologi, f.eks. ved modificering og anvendelse af en del af den DNA-sekvens, der koder for S. aureus protein A.

De omhandlede peptider kan også fremstilles ved proteolytisk eller kemisk spaltning af SpA og efterfølgende fraktionering og isolering af SpA-fragmenterne.

5 Til nedbrydningen kan der anvendes forskellige proteolytiske enzymer såsom trypsin, plasmin, Armillaria mellea protease eller clostripain, chymotrypsin, carboxypeptidaser eller S. aureus V8 protease. Til kemisk spaltning kan der anvendes CNBr, syrer eller baser.

10 Peptidernes isolering kan udføres efter en vilkårlig, passende, kendt fremgangsmåde, såsom ved højtrykssvæskrokromatografi (HPLC).

Peptider med formlen I eller peptider med en aminosyresekvens svarende til E-området i SpA eller fragmenter deraf overføres i farmaceutiske præparater og
15 indgives fortrinsvis til mennesker efter kendte metoder. Peptider med formlen I samt salte eller estere deraf kan indgives peroralt, topisk, rektalt, vaginalt, intravenøst, intramuskulært, intratekalt eller subkutant med dosis i området fra ca. 1 til 1000 µg/kg legemsvægt, skønt mindre
20 eller større dosis også kan indgives. Den fornødne dosis vil afhænge af, hvor alvorlig patientens tilstand er, det anvendte peptid, indgiftsmåden og behandlingens varighed.

Præparaterne kan formuleres som "slow-release" præparater eller depotpræparater.

25 Til parenteral indgift opløses peptider med formlen I i sterile isotoniske saltopløsninger.

Som eksempler på salte af de ovennævnte peptider kan nævnes natrium-, kalium-, magnesium-, kalций- og zink-salte og syreadditionssalte med organiske eller uorganiske
30 syrer såsom myresyre, methansulfonsyre, saltsyre og svovlsyre. Foretrukne salte af peptider med formlen I er fysiologisk og farmaceutisk acceptable salte.

Ud over et af de nævnte peptider eller et salt deraf kan de farmaceutiske præparater omfatte et farmaceutisk acceptabelt bæremiddel, fortyndingsmiddel, fortrinsvis
35 isotoniske saltopløsninger og/eller excipients.

Opfindelsen beskrives nærmere i de følgende ek-

sempler.

Eksempel 1

Fremstilling af peptider ved proteolytisk spaltning af SpA

5

a) plasminedbrydning.

15 mg rensset SpA fra pharmacia, Uppsala, Sverige, opløstes i 600 μ l 0,1 M ammoniumformat (pH 7,5), og 600 μ l plasmin (svarende til 14 CU (caseinenheder)) opløst i samme puffer tilsattes. Blandingen inkuberedes ved 37°C i 205 minutter. Omsætningen standsedes ved tilsætning af aprotinin koblet til Sepharose 4B efterfulgt af yderligere 15 minutters inkubering ved stuetemperatur. Reaktionsblandingen centrifugeredes derefter og den ovenstående væske sugedes bort. 1,0 ml 0,1 M ammoniumformat sættes til pelleten (indeholdende immobiliseret aprotinin samt resterende reaktionsblanding), prøven blandedes og centrifugeredes, og den ovenstående væske sugedes bort. Den sidstnævnte procedure gentoges to gange.

20 Endelig samledes alle de ovenstående væsker og lyophiliseredes gentagne gange.

b) Rensning.

25 Peptiderne fra ovenfor rensedes ved HPLC på en modfasesøjle (Nucleosil 5C₁₈) med det følgende udstyr: 2 LKB 2150 HPLC pumper, LKB 2151 variabel bølgelængdemonitor, LKB 2152 HPLC kontrol, LKB 2220 registreringsintegrator og LKB Superrac.

Rensningerne udførtes som følger:

30 Puffer A: 0,02 M ammoniumformat (pH 6,5); puffer B: 40% 0,05 M ammoniumformat (pH 6,5) og 60% ethanol; strømningshastighed: 0,5 ml/min; fraktionsrumfang: 0,25 ml.

35 Materialet i fraktionerne 150 - 152 valgtes til karakterisering.

HPLC rensningens resultater er vist i fig. 2, hvor de udvalgte fraktioner er angivet.

Produktet indeholdt 2 peptider, der sekventeredes efter den følgende forskrift:

Edman-nedbrydninger af peptiderne udførtes med en Applied Biosystems model 470A gasfasesekvensor som beskrevet (R.M. Hewick, M.W. Hunkapiller, L.E. Hood og W.J. Dreyer: J.Biol.Chem. 256 (1981), 7990 - 7997; M.W. Hunkapiller, R.M. Hewick, W.J. Dreyer og L.E. Hood: Methods Enzymol. 91 (1983), 399 - 413) med adskillige modifikationer. Et fjerde opløsningsmiddel (S1 = n-heptan) inkluderedes til vask af filteret i 30 sekunder efter kobling med phenylisothiocyant (PITC). For at opnå de methylerede derivater af Asp og Glu udførtes omdannelsen af aminosyreanilinothiazolinoner til phenylthiohydantoiner med 1 N methanolisk HCl i stedet for 25% trifluoreddikesyre (TFA). Sekvensorprogrammet justeredes efter dette reagens, eftersom kortere tørretidsrum var nødvendige. Phenylthiohydantoinamino-syrerne (PTH-a.a.) opløstes i ca. 0.25 ml methanol og tørredes i en Savant vakuumcentrifuge i 10 minutter ved 45°C. Tørrede PTH-a.a. genopløstes i 0,025 ml methanol indeholdende methylthiohydantoin (MTH)tyrosin som intern standard. PTH-a.a. identificeredes og kvantificeredes ved modfase HPLC på en 25 cm x 0.46 cm IBM cyanosøjle udrustet med en 5 cm x 0,46 cm Permaphase ETH cyano guard søjle (DuPont) (M.W. Hunkapiller og L.E. Hood: Methods Enzymol. 91 (1983), 486 - 493) i en Hewlett Packard væskechromatograf model 1084B udstyret med en variabel UV detektor model 79875. A opløsningsmidlet var 16 mM natriumacetat, pH 5,60, og B opløsningsmidlet var acetonitril/methanol, 9:1 (rumfang/rumfang). Søjlen bragtes i ligevægt med 15% B og elueredes med en lineær gradient på 15% - 51,4% B i 0 - 15,30 minutter. PTH-a.a. detekteredes ved 263 nm ved 1,5 mAUFS (Absorption Unit Full Scale).

Aminosyresekvensdataene er anført i tabel 1 nedenfor:

Tabel 1

Sekvensanalyse af peptid-pool

Prøve: Fraktion 150 - 152 (se Fig. 2)

5 Gennemsnitligt gentagent udbytte: 95.7%

	Cyklus nr.	PTH-a.a.	Mængde (pmol)	PTH-a.a.	Mængde (pmol)
	1	Asp	391	Ala	853
10	2*	Gln	(1500)	Gln	(750)
	3	Gln	1405	His	266
	4	Ser	59	Asp	168
	5	Ala	870	Glu	424
	6	Phe	715	Ala	505
15	7	Tyr	1062	Gln	749
	8*	Glu	(850)	Gln	(425)
	9	Ile	746	Asn	665
	10	Leu	624	Ala	360
	11	Asn	531	Phe	298
20	12	Met	575	Tyr	454
	13	Pro	519	Gln	560
	14	Asn	820	Val	383
	15*	Leu	(483)	Leu	(241)
	16*	Asn	(737)	Asn	(368)
25	17	Glu	198	Met	323
	18	Ala	288	Pro	176
	19	Gln	540	Asn	419
	20	Arg	140	Leu	392
	21			Y ₁	-
30	22			Ala	280
	23			Y ₂	-
	24			Gln	79
	25			Arg	177

* Samme aminosyregruppe forekommer i begge peptider, den
35 fundne mængde deles derfor proportionalt mellem peptiderne

Af tabel 1 fremgår det, at det rensede, samlede

materiale indeholder en blanding af to peptider. De ikke identificerede aminosyregrupper Y_1 og Y_2 kan tilordnes som henholdsvis Asn og Asp ved at sammenligne sekvensen med sekvensen af protein A fra S. aureus (Uhlen et al., se ovenfor).

Produktet består således af 33% peptid, pX-1', med formelen
Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gln-Val-Leu-Asn-Met-Pro-Asn-Leu-Asn-Ala-Asp-Gln-Arg,
svarende til de første 25 aminosyregrupper i den N-terminale del af SpA, hvilket også er de første 25 aminosyregrupper af den N-terminale del af region E, og 67% af et peptid svarende til aminosyregrupperne 11 til 30 i region D.

Produktet viste sig at have K-celleaktivitet, idet det forstærkede aktiviteten i de nedenfor beskrevne assay-procedurer.

Eksempel 2

20

Fremstilling af peptidblandinger ved proteolytisk spaltning af SpA

a) Nedbrydning med plasmin

150 μ g rensset SpA blev nedbrudt med 0,3 CU (casein enheder) plasmin (KABI) ved 37°C i 60 minutter.

Reaktionen blev afsluttet ved tilsætning af aprotinin bundet til Sepharose 4B og inkubation i 15 minutter ved stuetemperatur. Supernatanten blev fjernet efter centrifugering og anvendt i de følgende eksperimenter.

b) Analyse af K cellestimuleringsaktivitet

Med henblik på evaluering af betydningen af non-Fc bindingspeptider ved in vitro stimulering af K celleaktivitet blev det proteolytiske nedbrydningsmateriale fra før (svarende

til 8 μ g SpA) inkuberet med human IgG bundet til Sepharose 4B eller med kontrol-Sepharose 4B i 30 minutter ved stuetemperatur. Renset SpA blev inkuberet under identiske forhold som kontrol. Reaktionsblandingerne blev centrifugeret, og supernatanten blev anvendt direkte i K celleprøven som forklaret i det følgende. Normale cirkulerende blodleukocyter (PBL) blev inkuberet med 1) SpA absorberet med IgG-Sepharose 4B, 2) SpA absorberet med kontrol-Sepharose 4B, 3) plasminnedbrudt SpA absorberet med IgG Sepharose 4B, 4) plasminnedbrudt SpA absorberet med kontrol-Sepharose 4B. PBL inkuberet blot med medium tjente som kontrol. Resultaterne udtrykt som Kill% er vist i fig. 3. Det fremgår, at det ved proteolytisk spaltning af rensat SpA er muligt at opnå peptider med ingen eller lav IgG binding, men med K cellestimuleringsaktivitet.

Eksempel 3

Syntetisk fremstilling af peptider

pX-2'

a) Ala-Gln-His-Asp-Glu-Ala-Gln-Gln-Asn-Ala-Phe--Tyr-Gln-Val-Leu-Asn-Met-Pro-Asn-Leu, pX-2, svarende til de første 20 aminosyregrupper af den N-terminale del af område E, fremstilledes syntetisk som angivet ovenfor.

pX-2' havde K-celleaktivitet, idet det forstærkede aktiviteten i de nedenstående assay-procedurer.

Assay-procedurer

K-celleaktivitet er her defineret som forøgelsen i cellemedieret cytotoxicitet for normale perifere blodlymfocytter (PBL) over for tumorafløede targetceller. PBL isoleredes efter Böyum-metoden (Scand.J.Clin.Lab.Invest. 22 (1968), 77) ved centrifugering af hepariniseret blod fra sunde donorer på Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala,

Sverige). I et stort antal eksperimenter fjernedes vedhæftede celler ved at inkubere PBL i sterile glasflasker ved 37°C i 1 til 2 timer. Som targetceller anvendtes både den NK følsomme K562- (C.B. og B.B. Lozzio, J.Nat.Cancer
5 Inst. 50 (1973), 535 - 538) og de relativt NK-resistente Daudi- (E. Klein et al., Cancer Res. 28 (1968), 1300 - 1-310) og Raji- (R.J.V. Pulvertaft, J.Clin.Pathol. 18 (1965), 261 - 273) cellelinier for de ved proteolytisk nedbrydning af SpA opnåede peptider, mens kun Raji- og Daudi--
10 cellelinier anvendtes til de syntetiske peptider.

Cellelinierne holdtes i kultur i RPMI 1640 (Gihco, Paisley, Scotland, Katalog nr. 041-1875), hvortil der var sat føtalt kalveserum (10% vægt/vægt) (FCS) samt penicillin (100 IU/ml) og streptomycin (100 µg/ml), ved 37°C og
15 carbondioxid i luft.

Targetcellerne mærkedes med ⁵¹Cr (New England Nuclear, Dreieich, Vesttyskland).

K-celle-assay

20

PBL inkuberedes med rensede peptider eller med SpA i 24 timer ved 37°C med 6% CO₂ i luft. Det anvendte medium var RPMI 1640, hvortil der var sat 10% FCS, penicillin (100 IU/ml) og streptomycin (100 µg/ml). Efter inkubering
25 justeredes celletætheden, og cellerne fordeltes i rundbundede mikrotiterplader (NUNC, Roskilde, Danmark). ⁵¹Cr-mærkede K652 targetceller tilsattes til et ønsket forhold mellem effektor-(E) og target-(T)celler (E/T 10:1). Efter yderligere 4 timers inkubering ved 37°C med 6% CO₂ i
30 luft anbragtes pladerne på en Titertek mikrotiterpladeryster (Flow Laboratories Ltd., Ayrshire, Scotland). Mikrotiterpladerne centrifugeredes, og kendte rumfang af ovenstående væske sugedes bort og taltes (⁵¹Cr-prøve). Som maksimumsværdi (⁵¹Cr-max) anvendtes den ovenstående væske
35 fra K562 inkuberet med saponin. Den spontane frigørelse af ⁵¹Cr (⁵¹Cr-spont) målt ved at inkubere ⁵¹Cr-K562 uden effektorceller. Den specifikke drabsprocent (drabs-%) bereg-

nedes efter den følgende ligning (alle værdier henviser til ^{51}Cr i direkte sammenlignelige ovenstående væsker):

Drabs-%: $100 \frac{(^{51}\text{Cr}\text{-sample} - ^{51}\text{Cr}\text{-spont})}{(^{51}\text{Cr}\text{-max} - ^{51}\text{Cr}\text{-spont})}$

Den anvendte metode var i praksis den samme som ovenfor for Daudi- og Raji-targets. Den eneste væsentlige forskel var, at der ikke gennemførtes nogen præinkubation inden tilsætning af de ^{51}Cr -mærkede targetceller, og den fuldstændige inkubation af effektor- og targetceller udførtes på 24 timer. Drabsprocenten beregnedes som beskrevet ovenfor.

De ovennævnte assays for peptidernes aktivitet anvendtes til den endelige karakterisering samt ved adskillige screeningsundersøgelser. Screeningsundersøgelserne udførtes direkte på fraktioner fra de forskellige trin ved HPLC-rensningen, og i de fleste tilfælde lyophiliseredes fraktionerne først. To forskellige targetceller (K562 og Daudi) anvendtes ved screeningsundersøgelserne. Kun de fraktioner, der var positive i begge prøvesystemer, anvendtes i den yderligere rensning og karakterisering.

Korttidsprøve. NK-lignende aktivitet

4×10^5 monocytdepleterede enkeltkernede celler inkuberedes med 4×10^4 ^{51}Cr -mærkede Raji-celler. Totalt rumfang: 800 μl . Hertil sættes henholdsvis 1, 5, 6, 25 eller 100 μg peptid pr. ml. Kontrollerne var: ikke-stimulerede effektorceller + ^{51}Cr -mærkede Raji- og effektorceller stimuleret med SpA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (in duplo). Efter 2 timers inkubation udtoges 3 X 200 μl til inkubering i rundbundede mikrotiterbakker. Inkubering ved 37°C , 7% CO_2 , 18 timer.

Langtidsprøve. LAK-lignende aktivitet

6×10^6 monocytdepleterede monokernede celler inkuberedes i 6 ml RPMI 1640 + 5% FCS, penicillin (100 IU/ml) og streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) i vertikalt ophængte Falcon-kolber (Falcon Plastics, Oxnard, CA., USA, Katalog nr. 3013). Som ved korttidsprøven tilsættes henholdsvis 1, 5, 6, 25 eller 100 μg peptid pr. ml. Kontroller var:

ikke-stimulerede effektorceller og effektorceller + SpA (20 $\mu\text{g/ml}$). Inkubering ved 37°C , 7% CO_2 , 72 timer. Cellerne taltes, tætheden justeredes, og cellerne inkuberedes sammen med ^{51}Cr -mærkede Raji- og Daudi-targetceller. E/T forhold
 5 var: 10:1 og 20:1. Ved Daudi-prøven varede inkuberingen 16 timer, og ved Raji-prøven 18 timer (rundbundede mikrotiter-plader som ovenfor).

Resultaterne af de ovennævnte assays er vist i den følgende tabel 2 for SpA-peptiderne og i tabel 3 for de
 10 syntetiske peptider.

Tabel 2

Naturlig dræber-lignende (NK)-aktivitet induceret ved
 15 inkubering af periferae blodlymphocytter (PBL) med peptider isoleret ved proteolytisk nedbrydning af SpA eller intakt SpA.

		<u>drabs-%*</u>	
		<u>Raji</u>	<u>Daudi</u>
20	<u>Kontrol</u>	<u>15</u>	<u>46</u>
	Pool- (pX-1'**) ca. 100 pmol/ml	27	75
	20 pmol/ml	27	72
	<u>4 pmol/ml</u>	<u>24</u>	<u>68</u>
25	Protein A 10 $\mu\text{g/ml}$ (250 pmol/ml)	46	77
	5 $\mu\text{g/ml}$ (125 pmol/ml)	46	71
	<u>0,5 $\mu\text{g/ml}$ (12,5 pmol/ml)</u>	<u>31</u>	<u>66</u>

* E/T forhold = effektor- targetcelle-forhold = 10:1

** pX-1' koncentrationer er omtrentlige.

Tabel 3

Virkningen af det syntetiske peptid, pX-2', på de NK- og LAK- lignende virkninger af PBL.

	Targets	Stimuleringsindex			
		<u>Korttidsassay</u>		<u>Langtidsassay</u>	
		<u>(NK-lignende aktivitet)</u>		<u>(LAK-lignende aktivitet)</u>	
		<u>Raji</u>	<u>Raji</u>	<u>Daudi</u>	
10	<u>E/T" forhold</u>	<u>10:1</u>	<u>10:1 20:1</u>	<u>10:1 20:1</u>	
	100 µg/ml	0,79	n.d.** n.d.	n.d. n.d.	
	25 "	1,15	1,41 1,48	1,15 1,07	
	6 "	1,23	1,02 1,12	1,05 1,03	
15	<u>1,5 "</u>	<u>0,97</u>	<u>0,94 0,97</u>	<u>1,00 0,99</u>	
	<u>SpA 20 µg/ml</u>	<u>1,08</u>	<u>1,51 1,17</u>	<u>1,19 1,07</u>	

* E/T forhold = effektor- targetcelle-forhold

** ikke udført

20 Af tabel 2 fremgår det, at en anslået mængde materiale på 100 pmol/ml (beregnet på basis af pX-1') viste den samme NK-cellestimulerende virkning som 125 til 250 pmol/ml intakt SpA med Daudi-celler som targets, mens dens aktivitet over for Raji-celler var noget mindre.

25 Af tabel 3 fremgår det, at pX-2' har en aktivitet ved alle undersøgelserne, der er lig med aktiviteten af intakt SpA.

Komplementaktivering

30 For at undersøge indflydelsen af forbindelserne ifølge opfindelsen på komplementsystemet blev der udført en test, hvor frembringelsen af komplementspaltningsproduktet C5a blev anvendt som målestok for aktiveringen af komplement.

35 Testen blev udført ved inkubering af normal human serum med SpA (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden) eller pX-2' i 60 minutter. Alikvoter blev udtaget efter 0, 30 og 60 minutter og C5a des-Arg blev bestemt med et kom-

mercielt RIA-kit (Upjohn Company,).

Resultaterne er vist i fig. 4, og det ses tydeligt, at pX-2' helt mangler aktiverende effekt, medens SpA har en betydelig C5a skabende kapacitet, som afhængigt af dosis øgede dannelsen af C5a-des-Arg (den stabile C5a metabolit).

Marsvinemodel

Der blev udført en yderligere test, hvor evnen hos peptiderne ifølge opfindelsen og SpA til at fremkalde en anaphylactoidlignende reaktion ved intravenøs indgift i anæstetiserede og kunstigt respirerede marsvin blev undersøgt.

Marsvin af Dunkin-Hartley stammen (ca. 500 g) blev anæstetiserede med natriumpentobarbital og blev forsynet med et kateter i jugularvenen til indførelse af medikament. Blodtrykket blev målt fra en karotid arterie. Dyrene blev respireret kunstigt med en Harvard respirator til små dyr med en cyklus på 38 åndedræt pr. minut og et volumen på 1 ml pr. 100 g dyr.

Protein A og pX-2' blev indgivet intravenøst, og man fandt, at protein A afhængigt af dosis (10 - 100 µg/ml i.v.) fremkaldte en anaphylactoidagtig reaktion angivet ved en initial bronchokonstriktion og hypertension (senere hypotension) efter intravenøs indgift, medens pX-2' ikke fremkaldte en sådan reaktion.

Eksempel 4

Et præparat til parenteral indgift indeholdende 1 mg peptid med formlen I pr. ml kan fremstilles som følger:

1 g peptid med formlen I samt 99 g lactose opløses i 1 liter destilleret vand, og pH justeres til ca. 7,0. Opløsningen sterilfiltreres. Den sterile opløsning fyldes på 10 ml glas på en sådan måde, at hvert glas indeholder 1,0 ml opløsning. Opløsningerne lyophiliseres, og glassene lukkes under aseptiske betingelser.

Præparatet i hvert enkelt glas skal opløses i 1,0 ml steril, isotonisk saltopløsning inden indgift.

Eksempel 5

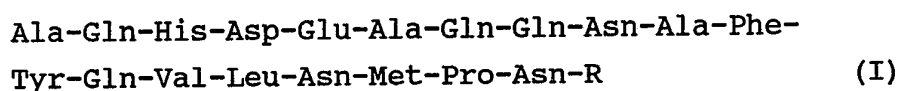
5

Rectale stikpiller fremstilles ved at blande 1 mg peptid med formelen I med 4 g kakaosmør.

PATENTKRAV

1. K-cellestimulerende peptider, kendetegnet ved,
at

5 de har den almene formel I



10 hvori R er Leu, Leu-Asn, Leu-Asn-Ala, Leu-Asn-Ala-Asp,
Leu-Asn-Ala-Asp-Gln eller Leu-Asn-Ala-Asp-Gln-Arg,
og fysiologisk forenelige salte deraf.

15 2. Peptider ifølge krav 1, kendetegnet ved, at
deres aminosyresekvenser er identiske med en kontinuerlig
del af E området i protein A fra Staphylococcus aureus og
indeholder aminosyresekvensen His-Asp-Glu-Ala.

20 3. Peptider ifølge krav 1, kendetegnet ved, at de
har aminosyresekvenser svarende til et fragment af E
området i SpA, og at de endvidere i det væsentlige mangler
immunoglobulinbindingsaktivitet, og fysiologisk acceptable
salte deraf.

25 4. Farmaceutisk præparat, kendetegnet ved, at det
indeholder i det mindste ét peptid eller salt deraf ifølge
et vilkårligt af kravene 1 til 3 i kombination med en
farmaceutisk acceptabel bærer eller excipients.

FIG. 1

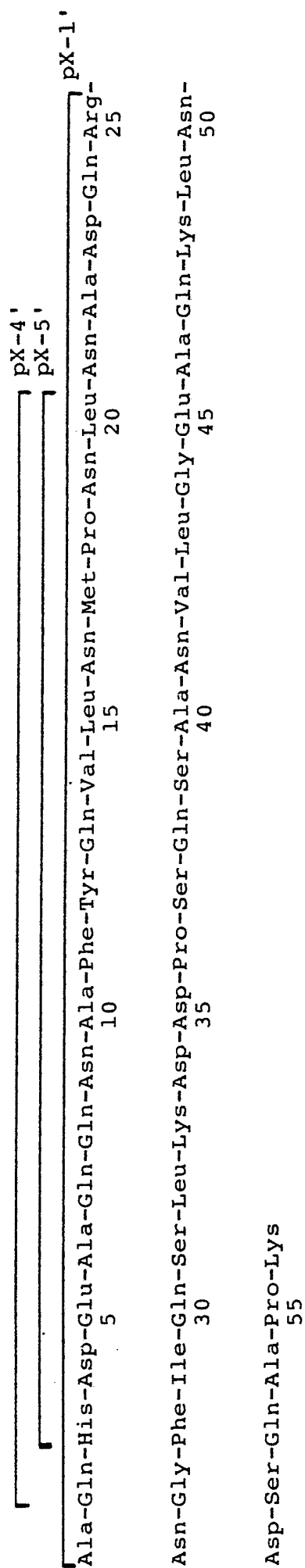
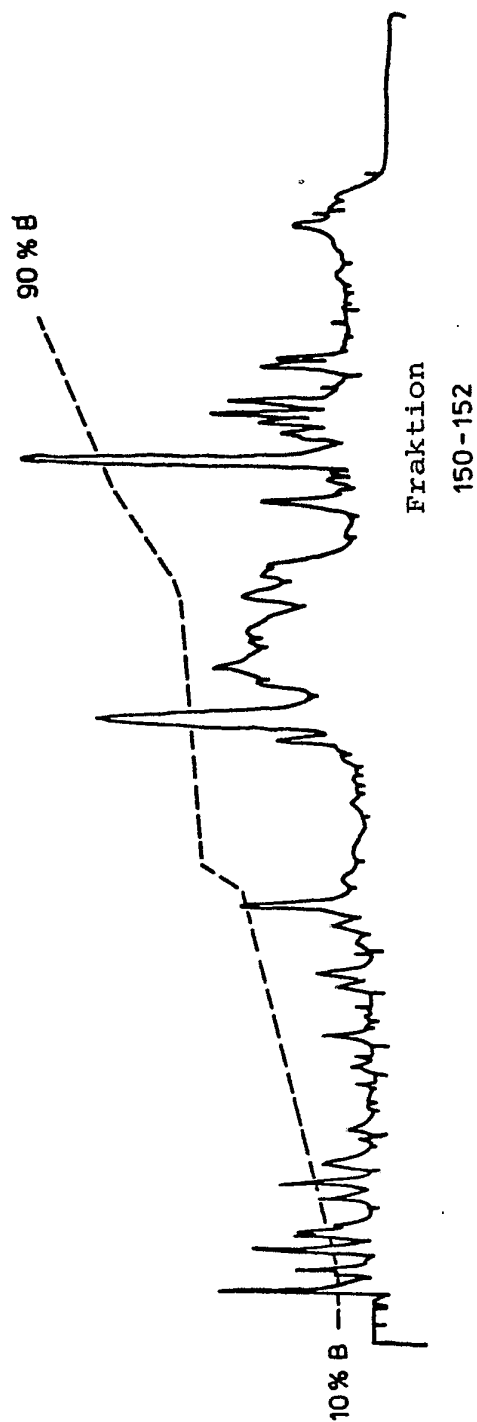


Fig.2



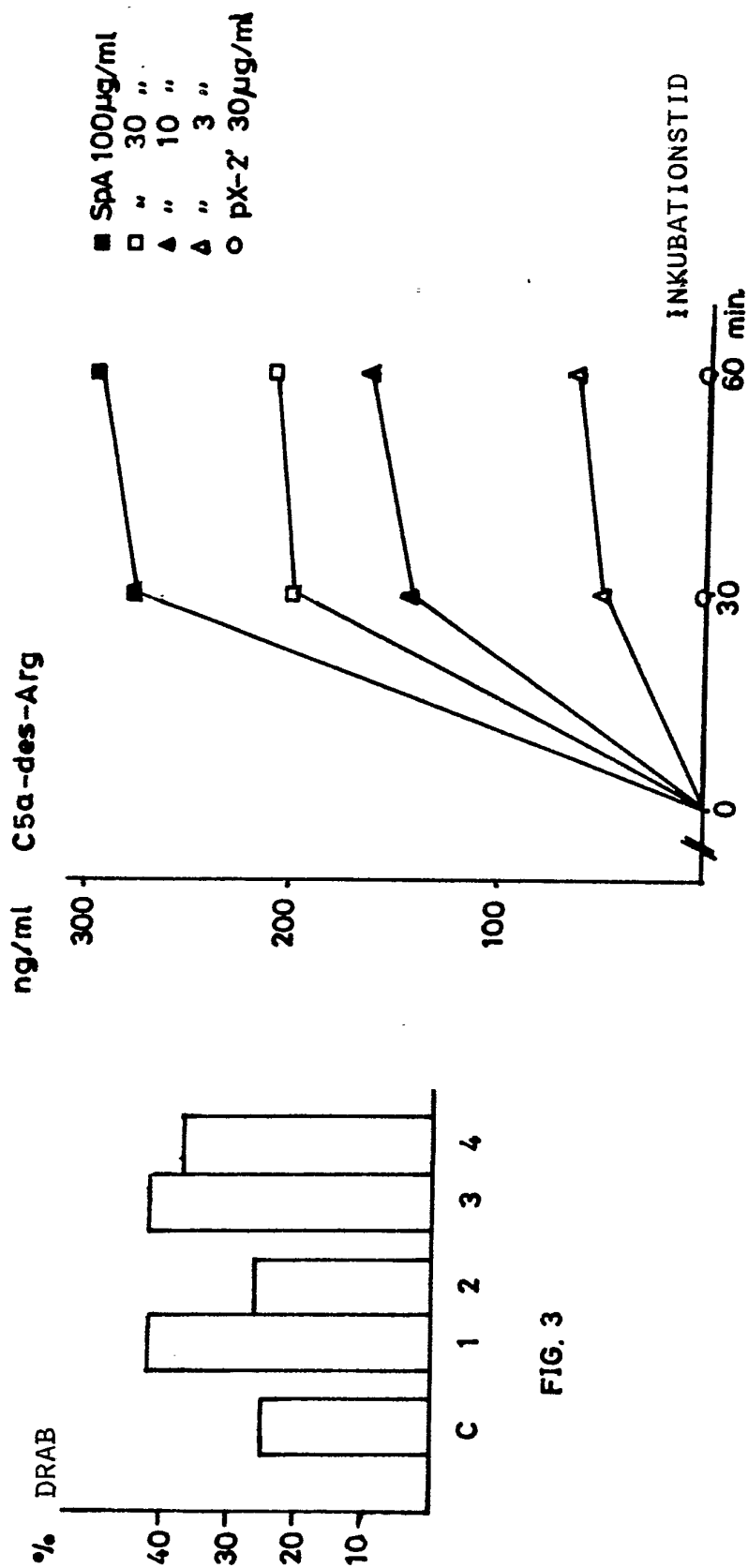


FIG. 4