



FI000100169B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 100169 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.10.97

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

A 61K 38/02, C 07K 14/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 892005

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 27.04.89

(24) Alkupäivä - Löpdag 30.08.88

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 27.04.89

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan PCT/US88/02991

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

30.08.87 IL 83687 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Gershoni, Jonathan M., 297 Congressional Lane, Rockville, MD 20251, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Gershoni, Jonathan M., 297 Congressional Lane, Rockville, MD 20251, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Heinänen Ab, Annankatu 31-33 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä molekulaarisen syötin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av ett molekylärt bete

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Chemical Abstracts, vol. 105 (1986): 1928b, Chemical Abstracts, vol. 103 (1985): 50925w,
Chemical Abstracts, vol. 103 (1985): 82334u, Chemical Abstracts, vol. 105 (1986): 75498p,
Chemical Abstracts, vol. 106 (1987): 136804e

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Molekulaariset syötit ovat kemiallisia rakenteita, jotka muistuttavat toiminnallisesti endogeenisiä reseptoreita. Niitä voidaan käyttää hoitamaan ihmisiä tai muita eläimiä, jotka on altistettu vieraalle aineelle, joka saa aikaan eitoivotun vaikutuksen vasta kun se on sitoutunut tähän endogeeniseen reseptoriin. Syötti on endogeenisen reseptorin jakso, jolla on säilynyt vieraan aineen reseptorin sitoutumiskohdan olennaiset osat, tai se on sen syntetttinen tai biosyntetttinen johdannainen. Torpedo californican asetyylikoliinireseptorin α -184-200 aminohappojakso on eräs esimerkki syötistä, joka suojaa kurarimi-meettisiä neurotoksiinejä vastaan. Toinen esimerkki on CD4-reseptorin jakso, joka on säilyttänyt olennaiset osat reseptorista suojaamaan HIV:tä vastaan.

Molekylära beten är kemiska strukturer som påminner funktionellt om endogena receptorer. De kan användas för behandling av människor eller andra djur, som har blivit utsatta för främmande ämnen som åstadkommer en oönskad verkan först efter att ha blivit bundna till den endogena receptorn. Ett bete är en fraktion av en endogen receptor som bibehåller de väsentliga delarna av bindningsstället av receptorn för det främmande ämnet eller är syntetiskt eller biosyntetiskt derivat av receptorn. α -184-200 aminosyrasekvensen av Torpedo californica acetylkolinreceptor är ett exempel av ett bete, som skyddar mot kurarimimetiska neurotoxiner. Ett annat exempel är en fraktion av CD4-receptorn, som bibehåller de väsentliga delarna av receptorn för skydd mot HIV.

MENETELMÄ MOLEKULAARISEN SYÖTIN VALMISTAMISEKSI

Keksinnön alue

Tämä keksintö koskee menetelmää farmaseuttisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa menetelmässä valmistetaan yhdiste, joka vaikuttaa vieraan aineen aiheuttaessa ei-toivotun vaikutuksen sitouduttuaan endogeeniseen reseptoriin.

Keksinnön tausta

Monien patogeenisten ja toksisten aineiden kuten virusten, bakteerien ja myös toksiinien ja myrkkujen on aiheuttaakseen vaikutuksensa elävässä kehossa jouduttava kosketuksiin spesifiin sitoutumiskohtiin, esimerkiksi solupinnan reseptoreihin. Tällaiset sitoutumisilmiöt saattavat olla välttämättömiä ensimmäisenä vaiheena viraalisessa tarttumisessa tai ne saattavat olla välttämättömiä fysiologisen toiminnon toksiselle inaktivoinnille. Reseptori on solukomponentti, joka on vuorovaikutuksessa spesifisen ligandin kanssa. Agonisteiksi luokitellut ligandit aktivoivat reseptoreihinsa sitoutuneena efektorijärjestelmän ja laukaisevat biovasteen. Antagonisteiksi luokitellut ligandit alentavat reseptoreiden toimintaa tai estävät agonistin toiminnan. Kun esimerkiksi kobran myrkkä tai kurare kiinnittyy kolinergiseen reseptoriin, estyy asetyyliholiinin sitoutuminen. Tällaisten määrättyjen ligandi/reseptorikompleksien muodostumisen estäminen olisi eduksi taistelussa patogeenisten tai toksisten aineiden haitallisia vaikutuksia vastaan.

Kompleksinmuodostuksen esto on saavutettavissa joukolla perusteiltaan erilaisia lähestymistapoja. Esimerkiksi antitoksiiniseerumivasta-aineiden muodostaminen on osoittautunut käyttökelpoiseksi lähestymistavaksi käärmeenpistojen hoitoon. Virusten ja bakteerien immunologinen inaktivointi on rokotuksen perusta. Molemmista näistä tapauksista hyvin stereospesifiset immunoglobuliinit pidättävät sisälle soluttautuvan aineen,

mikä puolestaan ehkäisee ainetta saavuttamasta vaikutuskoh-
taansa.

Vaihtoehtoisesti on äskettäin esitetty toisenlainen lähesty-
mistapa, jonka mukaan käytetään vieraalle aineelle analogista
materiaalia esimiehittämään isäntäreseptorin sitoutumiskohta,
ja siten ehkäistään virusten ja bakteerien liittyminen kudok-
seen, jonka ne tavallisesti tartuttaisivat. Näillä tunnetuilla
lähestymistavoilla on eräitä perustavaa laatua olevia haitto-
ja. Immunologinen inaktivointi on "ligandispesifistä". Edel-
leen monilla bakteereilla ja viruksilla on kyky ajoittain
muunnella immunogeenistä ilmiänsuaan randomtyyppisillä mutaati-
oilla ja uudelleenjärjestymistavoilla, mikä tekee immunoglobu-
liinin tehottomaksi. Ligandianalogien käyttö on "reseptoris-
pesifistä". Määritelmän mukaan sellaiset analogit miehittävät
reseptorin ehkäisten sen toiminnan.

Tämä keksintö käyttää uutta lähestymistapaa ongelmaan sellais-
ten ligandi/reseptori-kompleksien muodostumisen estämiseksi,
lähestymistavan ollessa "reseptorispesifinen", ehkäisemättä
perustilaisen reseptorin toimintaa.

Keksinnön yhteenveto

Tämän keksinnön kohteena on poistaa tekniikan tason haitat.

Tämän keksinnön on antaa käyttöön uusi lähestymistapa ligan-
di/reseptori-kompleksien muodostumisen ehkäisemiseksi, joka
lähestymistapa on "reseptorispesifinen" muttei ehkäise resep-
torivaikutuskohtien toimintaa.

Keksinnön kohde on lisäksi antaa käyttöön molekulaariset syö-
tit, jotka eivät ole olennaisesti suurempia kuin perustilaisen
reseptorin ligandinsitoutumiskohdan molekulaarinen rakenne, ja
jota voidaan käyttää sitomaan patogeenisiä tai toksisia ainei-
ta in vivo "kohdespesifisellä" tavalla. Eli ne ovat tarpeeksi

pieniä ollakseen olennaisen ei-immunogeenisiä ja jotka toimivat syötteinä in vivo kilpailemaan luonnollisten sitoutumiskohtien kanssa ja sieppaamaan spesifiset ligandit ja inaktivoimaan ne.

Nämä ja keksinnön muut kohteet tulevat paremmin ymmärretyiksi tutkittaessa seuraavaa yksityiskohtaista edullisten suoritusmuotojen kuvausta oheisten piirrosten kanssa.

Keksinnölle on tunnusomaista se, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

- 1) liuotetaan endogeeninen reseptori, jonka jälkeen proteeni-karkoituksella valitaan mainitun reseptorin pienin osa, joka tarvitaan endogeenisen reseptorin sitoutumispaikan elementtien säilyttämiseksi, säilytetään reseptorin kyky tunnistaa valikoivasti ja spesifisesti vieras aine ja sitoutua siihen affiniteetilla, joka estää vieraan aineen sitoutumista mainittuun endogeeniseen reseptoriin;
- 2) syntetisoidaan kemiallisesti ja/tai rekombinaatti-DNA-tekniikan avulla yhdiste, jonka kemiallinen rakenne vastaa olennaisilta osin mainitussa vaiheessa 1) valittua yhdistettä, joka tunnistaa valikoivasti ja spesifisesti vieraan aineen ja sitoutuu siihen, yhdisteeseen lisätään edullisesti farmaseuttisesti hyväksyttävä lisäosuus, joka ei vaikuta yhdisteen kykyyn tunnistaa vieras esine ja sitoutua siihen.

Uusi ratkaisu ligandi/reseptori-kompleksienmuodostumisongelmaan, kun ligandi on vieras aine, joka saa aikaan ei-toivotun vaikutuksen liittymällä spesifisesti endogeeniseen reseptoriin käsittää ligandin sitoutumiskohdan molekyyli-rakenteen identifioimisen perustilaisessa reseptorissa ja matkivien ligandin-sitoutumiskohtien tuoton. Näitä kohtia saatetaan käyttää in vivo sitomaan toksineja tai viruksia tai mitä hyvänsä muita vieraita aineita "kohdespesifisesti". Siten tämän keksinnön matkivat ligandin sitoutumiskohdat kilpailevat eläimen kehon luonnollisten sitoutumiskohtien kanssa toimien siten syöttei-

nä. Tämän keksinnön tekijä on nimittänyt sellaiset aineet "molekulaarisiksi syöteiksi".

Uskotaan, että luonnolliset reseptorit ovat melko suuria rakenteita käsittäen muutamia satoja aminohappoja, ja ne saattavat olla niin suuria kuin molekyyllipainoltaan noin 25.000. Spesifinen sitoutumiskohta on kuitenkin paljon pienempi ja tämä luo mahdollisuuden valmistaa keinotekoisia, synteettisiä sitoutumiskohtia, jotka ovat tehokkaita sitomaan määritettyjä viruksia, bakteereja, toksineja jne., mutta jotka silti käsittävät paljon pienemmän lukumäärän aminohappoja, edullisesti alle 100, ja joilla on sen vuoksi merkittävästi pienempi molekyyllipaino ja siten vastaavasti pienempi immunogeenisuus. On havaittu mahdolliseksi valmistaa sellaisia sitoutumiskohtia matkivia molekulaarisia syöttejä, jotka ovat mukautuneet sitomaan spesifisiä ligandeja, ja joiden koko on luokkaa 20 aminohappoa. Tällaiset melko pienet peptidirakenteet voidaan valmistaa fysikaalisesti jakamalla endogeeninen reseptori tai ne voidaan valmistaa synteettisesti peptidikemian preparatiivisilla tavoilla, kuten Merrifield-synteesisillä, tai geenitekniologialla. Tämä luo mahdollisuuden tällaisten polypeptidirakenteiden suuren mittakaavan tuotantoon, ja niiden käyttöön vaikuttavina aineina hoidettaessa eläimiä, jotka ovat joutuneet alttiiksi patogeenisille tai toksisille aineille.

Koska molekulaariset syötit sitoutuvat ligandiin samassa kohdassa, jonka ligandi tarvitsee sitoutuakseen endogeeniseen reseptoriin joka tarvitaan saamaan aikaan sen ei-toivottu vaikutus, ei ligandi pysty muuttamaan tätä kohtaa deaktivoitumatta. Siten syötit ovat paljon luotettavampia kuin immunoglobuliinit ja niillä on pitkäkestoinen vaikutus.

Tätä keksintöä voidaan soveltaa laajalla alalla, koska on mahdollista tuottaa molekulaarisia syöttejä, jotka ovat spesifisiä laajalle joukolle ligandeja. Tämä keksintö käsittää ennaltaehkäisevät kuten myös terapeuttiset koostumukset, jotka si-

sältävät vaikuttavat molekulaariset syöttirakenteet riittävässä konsentraatiossa ja määrässä.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvassa 1 esitetään menetelmävaihe 17 aminohappojakson WKHWVY-YTCCPDTPYLD:n saamiseksi yhdistelmä-DNA-teknologialla.

Kuvassa 2 esitetään tulokset erilaisten trpE-fuusioproteiinien indusoimiseen viljeltyjen R4137-kloonin näytteiden erotuksesta polyamidigeeleillä. Solut joko liuotettiin näytepuskuriin (T) tai sonikoitiin paljon suolaa sisältävässä puskurissa (500 mM) ja sentrifugoitiin. Supernatantti (S_1) sisälsi 40 - 60 % fuusioproteiinia ja muodosti pelletin (P_1). Pellettiä uutettiin edelleen vedellä supernatantin (S_2) muodostamiseksi, joka sisälsi noin 15 % alkuperäisestä fuusioproteiinista, ja pelletin (P_2). Polyamidigeelielektroforeesin (PAGE) jälkeen näytteet joko värjättiin Coomassie kiiltävänsinisellä (yllä) tai peitettiin (blotted) ja päällystettiin ^{125}I -leimatulla α -bungarotoksiinilla (BTX), jonka seurasi autoradiografinen määrittäminen (alla). Nuolenpäättämällä ilmaisevat fuusioproteiinin aseman. Numerot ilmaisevat suhteelliset moolipainot yksikössä kDa.

Kuva 3 on graafinen esitys erityisinä aikoina (C_t) sitoutuneen toksinin konsentraatiosta jaettuna tasapainokonsentraatiolla (C_{eq}) R4137:n inkuboinnin jälkeen ^{125}I -leimatulla BTX:llä erilaisia osoitettuja aikoja. Konsentraatiot mitattiin tasamäärin lisäämisen jälkeen positiivisesti varatuille membraanisuodattimille. Aika mitattiin minuutteina taulussa A ja sekunteina taulussa B.

Kuva 4 on graafinen esitys Scatchard-analyysistä toksinin sitoutumisesta R4137:ään. ^{125}I -leimatun BTX:n tasapainon saavuttamiseen asti (30 min) inkuboinnin jälkeen erilaisilla konsentraatiolla sitoutuneen BTX:n nettomäärä määritettiin lisäämällä 1000-kertainen ylimäärä ei-radioaktiivista BTX:ää ja

sitoutunut/vapaa toksiini laskettiin joka pisteelle.

Kuva 5 on graafinen esitys BTX:n kompetitiivisesta sitoutumisesta. ^{125}I -leimatun BTX:n ($2 \cdot 10^{-8}$ M) prosenttiosuus kuvattiin sen jälkeen kun oli sekoitettu seuraavien aineiden kasvavien konsentraatioiden kanssa: leimaamaton BTX:ää (\bullet), kobratoksiini (Δ), dekametonium (\diamond), d-tubokurariini (\circ), NaCl (\square), karbamyylikoliini (X) tai glysiini (ϕ). Seoksia inkuboitiin tasamäärillä R4137:ää 30 min 25°C :ssa ja sitten mitattiin sitoutuneen radioaktiivisen toksiinin nettomäärä.

Kuva 6A on graafinen esitys sitoutuneen ^{125}I -leimatun BTX:n määrästä funktiona kokonaismäärästä ^{125}I -leimattua BXT:tä, joka lisättiin immobilisoitua AcChoR:ää sisältävään konkanavaliini-A-kolonneihin.

Kuva 6B on graafinen esitys immobilisoitua AcChoR:ää sisältävään konkanavaliini-A-kolonneihin sitoutuneen ^{125}I -leimatun BTX:n määrästä funktiona kolonneihin lisätyn R4137:n määrästä sen jälkeen kun kolonneihin oli lisätty erilaisia määriä R4137:ää ja vakiomäärä ^{125}I -leimattua BTX:ää.

Kuva 7 on graafinen esitys R4137:n vaikutuksesta d-tubokurariiniruiskeen saaneiden hiirien eloonjäämistihyteen. Kaksi ryhmää Balb/C-hiiriä (35 kummassakin) ruiskutettiin joko PATH2:lla tai R4137:llä (suunnilleen 3 nmol BXT sitoutumiskoh-tia/hiiri) vatsaontelonsisäisesti. Viisi minuuttia myöhemmin hiirille annettiin d-tubokurariinia (suunnilleen 15 nmol, 9 μg /hiiri, ihonalaisesti). Eloonjääneiden lukumäärä ajan funktiona ruiskeen antamisen jälkeen on esitetty (tiedot ovat taulukon 1 kokeista 2 ja 3).

Yksityiskohtainen kuvaus edullisista suoritustavoista

Vaikka tämä keksintö on sovellettavissa molekulaarisille syö-teille, jotka matkivat minkä hyvänsä endogeenisen reseptorin

sitoutumiskohtaa, se selostetaan yksityiskohtaisesti koliner-
gisen sitoutumiskohdan suhteen. Tiedetään, että α -bungarotok-
siini (BTX), joka on käärmeenmyrkyn α -neurotoksiini, saa tok-
sisen vaikutuksensa aikaan salpaamalla koliergisten ligandien
sitoutumisen nikotiiniseen asetyylikoliinireseptoriin
(AcChoR).

Neuromuskulaarinen liitos on kohta, jossa hermot kohtaavat
lihassäikeet. Kosketuskohta on synapsi, ja sille on luonteen-
omaista se tosiseikka, että hermo ja lihas eivät tosiasiaassa
ole fyysisessä yhteydessä, vaan muodostavat paremminkin ke-
miällisen liitoksen. Kun hermoimpulssi saavuttaa aksonin kär-
jen, erittyy hermon ja lihaksen väliseen aukkoon, se on, "sy-
napsirakoon" asetyylikoliinia, neurotransmitteria. Asetyyliko-
liini sitoutuu reseptoriinsa, joka sijaitsee lihaksen solukal-
von pinnalla liitoksen postsynaptisella puolella. Kahden ase-
tyylikoliinimolekyylin sitoutuminen reseptoreihinsa saa aikaan
ionikanavan aukeamisen, kalvon depolarisoitumisen ja johtaa
mahdollisesti lihassupistukseen.

BTX on antagonisti, joka sitoutuu AcChoR:ään ehkäisten siten
asetyylikoliinia saavuttamasta reseptoriaan ja ehkäisten li-
hassupistuksen. Molekulaarin syötin tekemiseksi BTX:lle altis-
tettujen eläinten hoitoon on ensin identifioitava erityinen
BTX:n sitoutumiskohta. Edullinen tapa tämän tekemiseksi on
ligandinpeittoproteiinikartoitus (ligand overlay of protein
blots). Kun sitoutumiskohta kerran on identifioitu, voidaan
tuottaa matkiva jakso. Sellaista jaksoa lisättäessä syötti
matkii sitoutumiskohtaa ja sitoutuu BTX:n kanssa salvaten
siten toksiinien ei-toivotun vaikutuksen.

BXT:n spesifisen sitoutumiskohdan AcChoR:llä tiedetään sijait-
sevan sen α -alaysikössä. Vähimmäisvaadittavat sitoutumiskoh-
dan osaset, jotka edelleen mahdollistavat valitsevan ja spe-
sifisen sitoutumisen kohtuullisella affiniteetilla BTX:ään
voidaan tunnistaa edelleen proteiinikartoituksen avulla. Pro-

teiniikartoitustekniikat on käsitelty yksityiskohtaisesti Gershoni, "Protein Blotting: A Manual" teoksessa Methods of Biochemical Analysis, toimittanut David Glick, John Wiley & Sons, osa 33, s. 1 - 55, 1988, jonka sisältö liitetään tähän kokonaisuudessaan viitaten. Menetelmä käsittää hajotettujen polypeptidien siirron kromatografiageeleistä immobilisointihikkoihin.

BTX on polypeptiditoksiini (74 aminohappotähdettä), joka voidaan jodata ja joka sitoo reseptorin affiniteetilla $K_b = 10^{-11}$ M. Puhdistettu AcChoR ajetaan polyakryyliamidigeelielektrofooresilla (PAGE) lievästi denaturoiden keittämättä näytettä ja litiumdodekyylisulfaattia (SDS) käyttäen. Sitten valmistetaan täplät ja testataan sitten 125 I-leimatulla BTX:llä. Tällaiset kokeet osoittavat, että AcChoR:n α -alayksikkö leimautuu (Gershoni et al, "Binding of α -Bungarotoxin to Isolated α -Subunit of the Acetylcholine Receptor of *Torpedo californica*: Quantitative Analysis with Protein Blots", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 80: 493-4977 (1983)). Tämän jälkeen α -alayksikkö proteolysoidaan ja sitten sen proteiinitäplät testataan alkaalisen fosfataasihydratsidilla, konkanavaliini-A:lla, BXT ja jaksospesifisillä vasta-aineilla, jotka yhdessä mahdollistavat toksisen sitoutumiskohdan kartoituksen alueelle α -160-330 ja erityisemmin α -160-210 ja yhä erityisemmin alueelle α -180-200 (katso Neuman et al, "Mapping of the α -Bungarotoxin Binding Site with the α -Subunit of the Acetylcholine Receptor", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 83: 3008-3011 (1986), jonka sisältö kokonaisuudessaan liitetään tähän viitaten).

Kolinergisen sitoutumiskohdan määrittämiseksi vielä erityisemmin valmistettiin joukko synteettisiä peptidejä, ja määritettiin niiden kapasiteetti sitoa kolinergisiä ligandeja. Monista testatuista peptideistä ainoat, jotka pystyivät sitomaan BXT:tä, sisälsivät jakson α -185-196. Tällä peptidillä havaittiin olevan alhainen affiniteetti (10^{-8} M), mutta siitä huolimatta hyvin spesifinen BTX-sitomiskyky. Jaksolla α -173-204

havaittiin suurempi affiniteetti (10^{-7} M)

BXT-sitomisjaksoja voidaan valmistaa myös yhdistelmä-DNA-tekniikalla, valmistettiin hiiren tai Torpedo californican α -alayksiköiden cDNA:n alaklooneja ekspressiovektoreita käyttäen. Käytettiin trpE fuusiovektori pATH₂:ta. Puhdistettiin 1% agarosigeeleillä restriktiofragmentteja plasmidista p42, joka on Torpedo californica AcChoR:n α -alayksikön cDNA-klooni. Plasmideista saatiin preparatiivisia määriä, ja suoritettiin liittäminen E. coli kanta HB101-muunnelmiin menetelmällä, jonka on kuvaillut Maniatis et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982. Tällä tavoin valmistettiin fuusioproteiineja E. coli-muunnellussa kannassa (Gershoni, "Expression of the α -Bungarotoxin Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor by Echerichia coli Transformants", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84, s. 4318-4321 (1987), jonka sisältö liitetään tähän kokonaisuudessaan viitaten). Nämä fuusioproteiinit osoittautuivat sitovan BTX:ää spesifisesti (affiniteetti: 10^{-7} M). Siten esimerkiksi bakteerisesti ekspressoitujen proteiinien, jotka sisältävät α -166-200 sitovat toksinia kun taas ne, jotka ekspressoivat α -201-315, eivät.

Valmistettiin kaksi oligonukleotidia kuvassa 1(1) kuvaillulla tavalla. Ne suunniteltiin bakteriaalisesti suosittuja koodoneita käyttäen koodittamaan aminohappojajaksoja: Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp, joka käsittää Torpedo californica AcChoR:n α -184-200 kuten myös tähteeseen W184 N-terminaalaisesti lisätyn pentapeptidin. Ensimmäinen glysiini on tulos trinukleotidista dGGG, joka on välttämätön toiminnallisen SmaI-kohdan säilyttämiselle. Seuraava jakso on koaguloititekijän Xa (CFX) spesifinen katkaisukohta. Siten ekspressoitu fuusioproteiini tulee tällä entsyymillä katkaistavaksi, joka mahdollistaa kiinnostuksen kohteena olevan kohdan vapauttamisen, se on, 17 aminohapon jakson: WKHWVYYTCCPDTPYLD. Kaksi oligonukleotidia

kuumennettiin yhdessä suhteessa 1:1 ja annettiin karkaistua muodostamaan 9 emäsparin dupleksin. Komplementaariset säikeet "täytettiin" entsyymaattisesti Klenow-polumeraasia käyttäen (1 μ l; 5 yksikköä), kuten ilmenee kuvasta 1(2), jonka jälkeen DNA uutettiin fenolilla ja saostettiin etanolissa glykokeeniväliaineessa. Muodostelma liitettiin sitten SmaI:llä katkaistun, puhdistetun pATH2 ekspressiovektorin kanssa. Liitetyt vektorit käytettiin muuntamaan E. coli kanta HB101, kokonaan Aronheim et al.:n kuvaileman tekniikan mukaisesti: "Characterization of the Binding of α -Bungarotoxin to Bacterially-Expressed Cholinergic Binding Sites", J. Biol. Chem., 263, 20:9933-9937 (1988), jonka sisältö liitetään tähän kokonaisuudessaan viitaten.

Muunnellut bakteerikloonit, jotka sisälsivät lisäksi oikeassa suunnassa, valittiin pesäketäplien 125 I-leimatun BTX:n pääallystämällä. Näiden muunnosten havaittiin tuottavan tehokasta toksiniin sitoutuvaa fuusioproteiinia (36kDa merkitty R4137, kuva 2). R4137 voitiin rikastaa sonikoimalla muunnellut solut fosfaattipuskurissa + 500 mM suolaa. Sentrifugointi tuotti pellettejä, jotka sisälsivät R4137:ää 40 - 60 % kokonaisuudesta ja vähän yli (kuva 2, P₁). Tämä pelletti voitiin uuttaa vedellä antamaan liukoisen jakeen, joka oli pääosin R4137:ää (kuva 2, S₂).

S₂-jakeen R4137 karakterisoitiin biokemiallisesti mittaamalla toksiniin sitoutuminen siihen tekniikalla, jonka on kuvaillut Gershoni et al, "Molecular Decoys: Ligand-Binding Recombinant Proteins Protect Mice from Curarimimetic Neurotoxins", Proc. Natl. Acad. Sci (USA), 85, 4087-4089 (1988), jonka sisältö liitetään tähän kokonaisuudessaan viitaten. Olennaisesti tasamäärät S₂:ta inkuboitiin 125 I-leimatun BTX:n kanssa. Sitten seos suodatettiin varausmuunnellun membraanisudattimen läpi erottamaan sitoutunut toksini vapaasta. Sen jälkeen laskettiin suodattimien radioaktiivisuus. Tätä tekniikkaa käyttäen havaittiin, että BXT yhdistyy R4137:n kanssa pseudo ensimmäi-

sen asteen kinetiikalla, joka saavuttaa 50 % täydentymisen 40 sekunnissa ja noin 90 % täydentymisen 6 min. jälkeen (kuva 3). Mittaukset toksinin sitoutumisesta tasapainotilassa (30 minuutin reaktio) osoitti, että toksinin sitoutumisessa R4137:ään $K_D = 1,2 \cdot 10^{-7}$ M (kuva 4). Muut kolinergiset ligandit pystyivät kilpailemaan tämän sitoutumisen kanssa samanlaisilla tehokkuuksien etenemisellä kuin mitä tunnetaan perustilaisille reseptoreille (kuva 5).

Sen mukaisesti, R4137 osoittaa, että 17 aminohapon jakso: α -184-Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Tyr-Leu-Asp-200 on riittävä BTX:n sitomiseen. Vaikka tämä sitominen on olennaisesti vähäisempää kuin perustilaisella reseptorilla, se muistuttaa AcChoR:n täydellisen α -alayksikön (437 aminohappoa) sitomisominaispiirteitä.

Jotta selvitetäisiin, voitaisiinko R4137:ää käyttää hoitamaan eläimiä, jotka ovat altistuneet neurotoksiinille, suoritettiin koe selvittämään että R4137 voi kilpailla perustilaisia AcChoR:ta vastaan yhteisellä ja rajoitetulla BTX-annoksella. Tämän suorittamiseksi ei ole ainoastaan erotettava sitoutunutta BTX:ää vapaasta, vaan on myös tehtävä ero AcChoR-sitoutuneen ja R4137-sitoutuneen toksinin välillä. Tämän suorittamiseksi AcChoR sidottiin ensin konkanavaliini-A-kolonneihin. Havaittiin, että tällä oli vähän tai ei lainkaan vaikutusta toksinin sitoutumiseen (kuva 6A). Sitten tällaista immobilisoitua AcChoR:ää sekoitettiin erilaisilla R4137:n konsentraatioilla ja vakiomäärillä 125 I-leimattua BTX:ää. Kolonnit pestiin jälkikäteen toistetuilla sentrifugointi/uudelleensuspoinneilla ja määritettiin kolonneihin liittyvän radioaktiivisuuden määrä. Kuten voidaan nähdä (kuva 6B), R4137 kilpailee BTX:stä AcChoR:ää vastaan.

Lopuksi R4137:n kilpailu testattiin AcChoR:ta vastaan in vivo. Koiras- ja naarashiiret (noin 5 viikkoa, 20 - 25 g), sekä sukusiitetyjä (Balb/C) että ulkosiitetyjä (CD1) kantoja, sai-

vat ensin ruiskeen vatsaontelonsisäisesti R4137:llä tai plasebolla - samanlainen jae, joka on peräisin bakteereista, jotka on muunneltu muuntelemattomalla vektorilla pATH2 (näillä soluilla ei ole toksiininsitomiskapasiteettia). Viisi minuuttia myöhemmin kaikki hiiret altistettiin erilaisille määrille d-tubokurariinia tai α -kobratoksiinia (CTX). Mitattiin annos, joka aiheutti 80 % kuoleman käsittelemättömissä hiirissä. Toksiinit annettiin ihonalaisena ruiskeena eläinten niskaan. Eläimiä tarkkailtiin ja rekisteröitiin kuolemantapaukset kahden tunnin aikana toksiiniruiskeesta. Tulokset esitetään taulukossa 1. Kuten kuvasta 7 ilmenee, oli eloonjäämisaste R4137:llä käsitellyillä hiirillä merkittävästi parempi verrattuna kontrolliin ja absoluuttinen paranemislukumäärä oli ainakin 300 % parempi kuin plaseboa saaneilla hiirillä.

TAULUKKO 1

koee	bakteeri- proteiini (i.p.)	kanta	sukup.	toksiini (s.c.)	annos mg/kg	hiirten eloonj. lukum.	
1	pATH2 R4137	Balb/C	K	tubo	0,40	10 10	0 3
2	pATH2 R4137	Balb/C	K	tubo	0,36	10 10	1 7
3	pATH2 R4137	Balb/C	K	tubo	0,36	25 25	5 12
4	pATH2 R4137	CD1	K	tubo	0,36	37 38	10 21
5	pATH2 R4137	CD1	N	tubo	0,29	20 20	6 15
6	pATH2	CD1	K	CTX	0,15	10	1

6	R4137					10	10
7	pATH2	CD1	K	CTX	0,15	21	6
	R4137					20	12

Suoritettiin edelleen kokeita, joissa hiiret ruiskutettiin ensin tappavalla annoksella kobran myrkyä ja tunti myöhemmin annettiin joko plaseboa tai kolinergistä syöttiä. Plaseboa saaneet eläimet kuolivat kaikki, kun taas syöttiä saaneet eläimet säästyivät dramaattisesti (90 % eloonjääneitä). Tulokset esitetään taulukossa 2. On ymmärrettävä, että sama reseptorikohta on yhteydessä kaikkiin joukosta BTX, CTX ja d-tubokurariini kuten myös decametonium ja rabiesvirus.

TAULUKKO 2

ruiskutettu aine	aika toksiinin jälkeen (minuuttia)	eloonjääneet
R4137 (syötti)	30	6/10
	60	9/10
	90	6/7
pATH (plasebo)	60	0/10

Tosiseikka, että R4137 on osoittautunut syötiksi toksiinille, on vain yksi tapaus liittyen yleisen väitteeseen molekulaarisista syöteistä terapeuttisina aineina. AcChoR:n erkoistapauksessa R4137 tai parannetut versiot tästä molekulaarisesta syöttistä saattavat toimia vasta-aineena kobrantyyppisille käärmeenpistoille sieppaamalla näiden käärmeenmyrkyjen ainesosat spesifisesti. Lisäksi d-tubokurariinia käytetään rutiininomaisesti kirurgiassa neuromuskulaarisena salpaajana ja R4137:ään perustuva syötti saattaisi olla äärimmäisen hyödyllinen sen vasta-aineena. Tämä käyttökelpoisuus on erityisen tärkeää, koska tekniikan tasolla kuvailut ligandianalogit voivat olla

yhtä haitallisia kuin salpaajat itse. Edelleen on äskettäin osoitettu, että rabiesvirus sitoutuu spesifisesti AcChoR:ään ja että d-tubokuraniini tai BTX saattavat kilpailla sen sitoutumista vastaan (Lentz et al., Science, 215, 182-184 (1982)). Siten R4137:ään perustuva syötti antaa myös käyttöön terapeutisia vaikutuksia rabiesin hoidossa.

On ymmärrettävä, että R4137 on vain välivaihtoyökalu joka sallii sen geneettisellä muuntelulla tai kemiallisella käsittelyllä ammattimiesten kehittää vielä tehokkaampia kolinergisiä syöttejä. Siten tämä keksintö on tarkoitettu käsittämään ei vain R4137:n erityistä 17 aminohapon jaksoa vaan sen muunnelmia ja johdannaisia, joilla on säilyneet ja mahdollisesti parantuneet toiminnalliset tai farmakologiset ominaispiirteet. Esimerkiksi muunneltuja peptidijaksoja voidaan valmistaa helposti ja testata rutiininomaisilla tekniikoilla edullisia toksisiin sitomisominaispiirteitä varten tehokkaammin kilpailemaan perustason reseptorin kanssa. Sellainen muuntaminen saattaa käsittää aminohappojen korvauksen, poistamisen tai lisäyksen tai niiden kemiallisen muuntelun. Esimerkiksi pitkäikäisempiä syöttejä voidaan saada tällä tavalla. Koska syöttien entsyymaattinen hajoaminen in vivo saattaa tehdä jotkin syötin suhteellisen lyhytikäisiksi, olisi eräs menetelmä sellaisen hajoamisen estäminen tekemällä d-aminohappoja sisältäviä synteettisiä peptidejä. Vaihtoehtoisesti fuusioproteiinin luonnokseen perustuen voidaan suunnitella orgaanisia molekyylejä, se on, ei-proteiinisiä, jotka täyttävät fysikokemialliset vaatimukset syöttille, jonka on muodostettava toksiinille toiminnallinen esto.

On edelleen ymmärrettävä, että tämän keksinnön syöttejä voidaan muunnella laajentamalla polypeptidiä tai lisäämällä erityisiä kemiallisia osia, joiden on tarkoitus auttaa lääkkeen suunnittelijaa antamaan käytettävälle syöteille lisäkäyttöä. Eräs sellainen muunnelma olisi polypeptidin laajentaminen osilla, joiden on tarkoitus vaikuttaa liukoisuuteen, esimer-

kiksi hydrofiilisen tähteen lisäyksellä, kuten seriinin tai varatun tähteen kuten glutamiinihapon. Edelleen syöttiä voitaisiin laajentaa stabiilisuussyistä ja toivotun konformaation säilyttämiseksi, kuten lisäämällä kysteiinitähteitä disulfidisoltojen muodostamiseksi.

Toinen syy syöttien muuntamiseksi olisi syöttien tekeminen havaittaviksi, myös annon jälkeen. Tämä voitaisiin tehdä radiojodauksella radioaktiivisella jodi-isotoopilla, suoraan, tai lisäämällä tyrosiinia seuraavaa radiojodausta varten. Sellaisia havaittavissa olevia syöttejä voitaisiin käyttää erityisten patogeenisten aineiden tai toksiinien läsnäolon ja/tai sijainnin havaitsemiseen. Esimerkiksi R4137:n kerääntymisen havaitseminen koiranpureman alueella ilmaisisi rabiesviruksen läsnäolon. Siten sellaisia havaittavia syöttejä voitaisiin käyttää määrättyjen vieraiden aineiden selektiiviseen havaitsemiseen tai kartoitukseen tai sellaisten aineiden tunkeutumisen diagnosointiin.

Edelleen muu syy muunnella syöttejä olisi vieraan konjugoituneen aineen nopeutunut poistuminen kehosta. Esimerkiksi asialoglyko-osaan liittyneen syötin voisi odottaa eliminoituvan maksan kautta. Siten esimerkiksi antisyyöpäkemoterapeuttisten aineiden reseptorikohtaa matkiva syötti ja sellainen, joka sisältää asialoglyko-osan, tai minkä hyvänsä muun osan joka auttaisi sen poistumista elimistöstä, voitaisiin käyttää inaktiivoimaan ja nopeasti poistamaan ylimääräinen kemoterapeuttinen aine terapian loppuunsaattamisen jälkeen sivuvaikutusten vähentämiseksi.

R4137:n tehokkuuden todistaminen syöttinä in vivo toksiineja vastaan näyttää toteen tämän keksinnön yleiskäsitteen. Sen mukaisesti on ymmärrettävä, että tämä keksintö ei käsitä ai-noastaan kolinergiseen sitoutumiskohtaan perustuvia syöttejä, vaan mihin hyvänsä vieraiden aineiden endogeeniseen reseptoriin perustuvia syöttejä, vieraiden aineiden aiheuttaessa ei-

toivotun vaikutuksen vasta sitouduttuaan tähän endogeeniseen reseptoriin. Ensimmäinen vaatimus tämän keksinnön mukaiselle syöttille on, että se matkii endogeenista reseptoria, se on, sen on muistutettava sitoutumiskohtaa toiminnallisesti vaikka sen täytyy erota fysikaalisesti. Käsite "toiminnallinen muistuttaminen" tarkoittaa, että syötti sitoutuu kyseessä olevaan vieraaseen aineeseen selektiivisesti ja erityisellä tavalla ja kohtuullisella affiniteetilla. Reseptori saattaa olla tämän keksinnön tarkoituksiin mikä hyvänsä ligandia sitova molekyyli kuten esimerkiksi perinteisen solupinnan reseptorin ligandia sitova kohta, entsyymin substraattia sitova kohta, gangliosidin ligandia sitova kohta jne.

On kuitenkin ymmärrettävä, että tämän keksinnön mukainen syötti ei voi olla immunoglobuliini eikä sitä voida johtaa immunoglobuliineista. Vaikka on totta, että patogeenin "sitoutumisaluetta" kohtaan ohjattu immunoglobuliini saattaisi yleisesti toimia syöttinä, ei sellaista ole tarkoitettu sisällytettäväksi tämän keksinnön käsitteeseen.

Tämän keksinnön mukainen syötti ei saisi olla olennaisen immunogeeninen. Koon pienentäminen on keino aineen immunogeenisyyden vähentämiseksi, mutta kaikki suuret molekyylit eivät ole yhtä immunogeenisiä kuin eräät pienet molekyylit. Tämän keksinnön mukaiseksi syötiksi luokitelluksi tulemiseksi aineen on oltava olennaisen ei-immunogeeninen isäntäjärjestelmässä riippumatta aineen koosta vaikka pienin mahdollinen koko on edullinen. On hyvin kuitenkin tärkeää, että syötti ei annettaessa in vivo ole riittävän immunogeeninen aiheuttamaan autoimmuunivaste vastetta endogeenistä reseptoria kohtaan. Kolinergisen reseptorin tapauksessa sellainen autoimmuunivaste saattaisi aiheuttaa myasthenia gravis-tapauksen.

Tämän keksinnön mukaisen syötin on sisällettävä reseptorin sitoutumiskohdan olennaiset osat eikä olennaisesti enempää. Tämän keksinnön tarkoituksiin sitoutumiskohdan "olennaiset

osat" määritellään osina, jotka ovat olennaisia syöttivaikutukselle, se on, ligandintunnistaminen ja sitoutuminen. Reseptori koostuu useista tähteistä, joista vain harvat liittyvät ligandintunnistukseen ja sitoutumiseen. Kuitenkin, kuten edellä todettiin, tämän keksinnön syöttejä voidaan muunnella edelleen lääkesuunnittelusyistä. Siten esimerkiksi koko AcChoR:n α -alalyksikköä ei kelpuutettaisi syötiksi, sen ollessa sekä immuno-geeninen ja myös huomattavasti pidempi kuin tarpeen. α -alalyksikkö sisältää kuitenkin mahdollisen syötin suunnitteluun ja rakentamiseen tarvittavan informaation, se on, jakson α -184-200. Se seikka, että joitain lisäpeptidiyksiköitä olisi läsnä, esimerkiksi parantamaan olennaisen vaadittavan jakson liukoisuutta, ei poistaisi rakennetta syöttien luokasta mikäli se olisi edelleen olennaisen ei-immunogeeninen ja olisi edelleen selektiivinen, spesifinen ja sillä olisi kohtuullinen affiniteetti. Sokerimolekyylien lisäys saattaisi olla samantehoinen muunnelma. Lääkesuunnittelutarkoituksessa tehtyjä lisäyksiä molekyyliin ei huomioida määritettäessä sisältääkö aine olennaisesti enemmän kuin endogeenisen reseptorin osat, jotka tarvitaan kyseessä olevan vieraan aineen sitomiseen.

Kuten edellä mainittiin, syötin on oltava selektiivinen ja sillä on oltava kohtuullinen affiniteetti aineeseen nähden, jolle se on suunniteltu. Siten esimerkiksi mannoosi, yksinkertainen sokeri, saattaa vaikuttaa infekioon bakteereilla, joilla on tyyppin I mannoosispesifinen piluksia; mannoosin selektiivisyys ei kuitenkaan ole riittävä eikä myöskään sen affiniteetti.

Syötti on lääke, joka on suunniteltu sieppaamaan tunkeutuva vieras aine, jolla on ei-toivottu vaikutus. Sellaiset vieraat aineet saattavat käsittää toksineja, myrkkyjä, bakteereita, viruksia, käsittäen retrovirukset jne. Mikäli vieras aine saa aikaan patogeenisen tai toksisen vaikutuksensa (tai minkä hyvänsä muun vaikutuksen, joka halutaan eliminoida) vasta sitoututtuaan reseptorikohtaan jossain isännässä, voidaan suunnit-

tella tämän keksinnön mukainen sieppaaja estämään sellainen sitoutuminen ja siten poistamaan sellainen ei-toivottu vaikutus. Kun keksinnön tavat kerran tunnetaan, kuten myös se tosi-seikka, että sellaiset reseptorin osia sisältävät ligandeja sitovat kohdat sitovat edelleen kompetitiivisesti ligandeja in vivo, ymmärtävät ammattimiehet, että muista reseptoreista peräisin olevat syötit, jotka on suunniteltu sitomaan muita patogeenisiä aineita ja toksineja, voidaan saada käyttämättä muita kuin rutiinikokeita.

Patogeenisten aine/reseptori-parien joukossa, joille syötit on helposti saatavissa tämän keksinnön mukaisesti, on T-solupinnan glykoproteiini CD4 (T4), joka on solureseptori ihmisen immuniteettikatoviruksessa, tyyppi 1 (HIV-1), ensimmäinen jäsen virusten joukossa, jotka aiheuttavat hankitun immuunivasteen-heikkenemisoireyhtymän (AIDS). HIV-viruksen tartunta alkaa sen kuoriproteiinin (gp120) sitoutumisella T4-reptoriin (CD4), joka sijaitsee T4-imusoluissa. Äskettäin on varmistettu, että liukoisia, eritettyjä CD4:n muotoja voidaan käyttää sitomaan HIV-1 kompetitiivisesti ja siten neutraloimaan HIV-1:n tartuttavuus (Smith et al, "Blocking of HIV-1 Infectivity by a Soluble, Secreted Form of the CD4 Antigen", Science, 238, 1704-1707 (1987)). Perustilainen CD4 ei kokonsa puolesta olisi tämän keksinnön mukainen syötti. Sillä on kuitenkin syötin ominaispiirteet. CD4:n minimaalinen sitomisalue voidaan identifioida käyttämättä muita kuin rutiinikokeita tässä kolinergisen reseptorin minimaalisen sitomisalueen saavuttamiseksi, esimerkiksi proteolyysin ja proteiinitäpläkokeella, jota seuraavat yhdistelmä-DNA-työtavat.

Toinen ligandi/reseptori-pari, joka on erityisen sovelias tämän keksinnön mukaisten syöttien valmistukselle, on organofosfaatti-asetyylikoliiniesteraasi. Sellainen syötti saattaisi vähentää joitain hermokaasun vaikutuksista. Muita esimerkkejä ovat LSD ja serotoniinireseptori ja stryknini ja glysiinireseptori.

Taulukossa 3 esitetään lisää ligandi/reseptoripareja, joille voidaan suunnitella tämän keksinnön mukaisia syöttejä käyttämättä muita kuin rutiinikokeita:

TAULUKKO 3

ligandi	reseptori
kalsium	28 kDa naudan pikkuaivot ja munuaiset kalmoduliini
hepariini	ihmisen plasman apoE ja apoB
Gonococcus-pilukset	CHO-solujen 14 ja 16 kDa proteiinit
virus	
retrovirus tyyppi 3	67 kDa glykoproteiini rotan imu- ja hermosoluissa
sendaivirus	ihmisen punasolujen glykoforiini
peruna sukkula kyhmy	ydinproteiinit
viroidi (Potato spindle tuber viroid)	

Tämän keksinnön syöttejä voidaan antaa eläimille, käsittäen ihmispotilaan, parantamaan vieraan aineen, jota varten se on suunniteltu, ei-toivotut vaikutukset. Sellaisia syöttejä ei voida käyttää ainoastaan ihmisten hoitoon, vaan myös muiden eläinten hoitoon käsittäen nisäkkäät, siipikarjan, kalan jne. Edelleen tämän keksinnön mukaiset syötit voitaisiin suunnitella kasviensuojeluun tai -hoitoon. Ammattimiehet voivat helposti määrittää kokeellisesti erityiset vaikuttavat annokset min-
kä hyvänsä vieraan aineen käsittelyyn ilman kohtuuttomia kokeita. Ammattimiehet ymmärtävät kuitenkin, että syötin annostelu riippuu jonkin verran vieraan aineen määrästä isäntäjär-

jestelmässä. Syötin suhde vieraan aineen molekyyliin on alueella 1:1 - 1:10. Eläinkokeet ovat osoittaneet, etteivät syötin suuret ylimäärät ole välttämättömiä tehon kannalta. Vieraan aineen määrää isännän verivirrassa tarkkaillaan edullisesti ja syötin annos säädetään sen mukaisesti hoidon aikana.

Tämän keksinnön suoja-alan käsittämiin koostumuksiin kuuluvat koostumukset, joissa syötti on läsnä tehokkaassa määrässä aiotun tarkoituksen saavuttamiseksi. Tehokkaan määrän määrittäminen on tekniikan tasolla tunnettua.

Tämän keksinnön syöttien lisäksi farmaseuttiset koostumukset saattavat sisältää sopivia farmaseuttisesti hyväksyttäviä väliaineita, jotka käsittävät täyteaineet ja apuaineet, jotka helpottavat vaikuttavan aineen käsittelyä farmaseuttisesti käytettäväksi valmisteiksi. Edullisesti valmisteet, erityisesti ne, jotka voidaan antaa ruiskeena, sisältävät noin 0,1 - 99 %, ja edullisesti noin 25 - 85 paino-% vaikuttavaa ainetta yhdessä täyteaineiden kanssa.

Tämän keksinnön antoon voidaan käyttää mitä hyvänsä tavantomaista antoon käytettyä reittiä. Vaikka edullinen anto on ruiskeena, esimerkiksi laskimonsisäisesti, ihonsisäisesti, vatsaontelonsisäisesti jne., ne voidaan antaa myös oraalisesti, peräpuikkona tai muuta reittiä.

Muita ei-tavallisia antotapoja voidaan kuvitella, jotka myös on tarkoitettu tämän keksinnön suoja-alaan kuuluviksi. Esimerkiksi kun nykyisessä järjestelmässä vaikuttavan aineen ekspressointi bakteerissa käsittää bakteriaalisen ekspressiovektorin PATH2, esiintyy muita bakteriaalisia ekspressiojärjestelmiä, jotka tosiasiaassa erittävät ekspressoituneen proteiinin väliaineeseen. Voitaisiin ajatella, että sellaista erityis-ekspressiojärjestelmää voitaisiin käyttää muodostamaan syöttiä isännän sisältä paremminkin sen tuottaminen ex vivo ja

antaminen isännälle. Ilmeisesti erityisjärjestelmän on oltava kilpaileva isännälle. Käsite "anto" tässä julkaisussa ja patenttivaatimuksissa käytettynä on tarkoitettu käsittämään sellaiset in vivo-erityisjärjestelmät.

Tämän keksinnön farmaseuttiset valmisteet valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla, esimerkiksi tavanomaisten sekoitus-, liuotus- tai lyofilisointimenetelmien avulla. Sopivat valmisteet parenteraaliseen antoon käsittävät vesiliukoisessa muodossa olevien vaikuttavien yhdisteiden vesiliuokset. Lisäksi voidaan antaa vaikuttavan aineen suspensioita sopivina öljypohjaisina ruiskesuspensioina. Sopivita lipofiiliset liuottimet tai väliaineet käsittävät rasvaiset öljyt kuten seesamiöljy, tai synteettiset rasvahappoesterit kuten etyylioleaatti tai triglyseridit. Vesiruiskesuspensiot saattavat sisältää suspension viskositeettia lisääviä aineita kuten natriumkarboksimeetylliselluloosa, sorbitoli ja/tai dekstraani. Valinnaisesti suspensio saattaa sisältää stabilaattoreita. Tämän keksinnön syötit voidaan antaa liposomien muodossa, farmaseuttisten koostumusten muodossa, joissa vaikuttava aine sisällytetään joko dispergoituna tai vaihtelevasti esiintyen jyväsissä, jotka käsittävät vesipohjaisia samankeskisiä lipidikerrokseen tarttuneina. Vaikuttava aine saattaa esiintyä sekä vesikerroksessa että lipidikerroksessa, tai, joka tapauksessa, epähomogeenisessä järjestelmässä, joka tunnetaan yleensä liposomisuspensiona.

Edeltävä kuvaus erityisistä suoritusmuodoista välittää niin täysin keksinnön yleisen luonteen, että muut voivat soveltamalla nykyistä tietämystä, helposti muuntelemalla ja/tai soveltamalla erilaisiin sovellutuksiin kuten erityiset suoritusmuodot poikkeamatta yleiskäsitteestä, ja siksi sellaiset sovellutukset ja muunnelmat on tarkoitettu ymmärrettäviksi esitettyjen suoritusmuotojen ekvivalenttien tarkoituksen ja alueen sisälle kuuluviksi. On ymmärrettävä, että tässä käytetty fraseologia ja terminologia on kuvausmielessä eikä rajoitettavasti.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä farmaseuttisen yhdisteen valmistamiseksi, jossa menetelmässä valmistetaan yhdiste, joka vaikuttaa vieraan aineen aiheuttaessa ei-toivotun vaikutuksen sitouduttuaan endogeeniseen reseptoriin, tunnettu siitä, että menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

1) liuotetaan endogeeninen reseptori jonka jälkeen proteenikar-toituksella valitaan mainitun reseptorin pienin osa joka tarvi-taan endogeenisen reseptorin sitoutumispaikan elementtien säi-lyttämiseksi, säilytetään reseptorin kyky tunnistaa valikoivasti ja spesifisesti vieras aine ja sitoutua siihen affiniteetilla joka estää vieraan aineen sitoutumista mainittuun endogeeniseen reseptoriin;

2) syntetisoidaan kemiallisesti ja/tai rekombinantti-DNA-tekniikan avulla yhdiste, jonka kemiallinen rakenne vastaa olennaisil-ta osin mainitussa vaiheessa 1) valittua yhdistettä joka tunnis-taa valikoivasti ja spesifisesti vieraan aineen ja sitoutuu sii-hen, yhdisteeseen lisätään edullisesti farmaseuttisesti hyväk-syttävä lisäosuus joka ei vaikuta yhdisteen kykyyn tunnistaa vieras aine ja sitoutua siihen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmässä valmistettu yhdiste ei ole olennaisesti suu-rempi kuin koko, joka tarvitaan säilyttämään reseptorin sitoutu-miskohdan olennaiset osat.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmässä endogeeninen reseptori on kolinerginen resep-tori ja mainittu vieras aine on kurarimimeettinen neurotoksiini.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että menetelmässä endogeeninen reseptori on nikotiininen asetyy-likoliinireseptori ja mainittu vieras aine on α -bungarotoksiini, kobratoksiini, d-tubokurariini, decametonium tai rabiesvirus.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmässä endogeeninen reseptori on imusolujen T4-soluantigeeni ja mainittu vieras aine on HIV-virus.
6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmässä aine on tuotettu luonnollisesta endogeenisestä reseptorista jakamalla endogeeninen reseptori osaan, joka on tarpeeksi pieni ettei se saa aikaan autoimmuunivastetta endogeenistä reseptoria vastaan annettuna in vivo, tai jolta muuten puuttuu olennainen imunogeenisyys, mutta joka silti säilyttää mainitun reseptorin sitoutumiskohdan olennaiset osat.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että menetelmässä aine on peptidiketju, joka on ekspressoitu yhdistelmä-DNA-tekniikalla geenimanipuloiduissa soluissa.
8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu aine on synteettinen peptidi.
9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se käsittää aminohappojakson:
Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Typ--
Leu-Asp tai sen muunnelma, joka säilyttää sitoutumisominaispiirteet kurarimimeettisellä neurotoksiinilla, sitoutumisominaispiirteiden ollessa muunnelmalla ainakin yhtä voimakkaat kuin mainitulla jaksolla samalla neurotoksiinilla.

PATENTKRAV

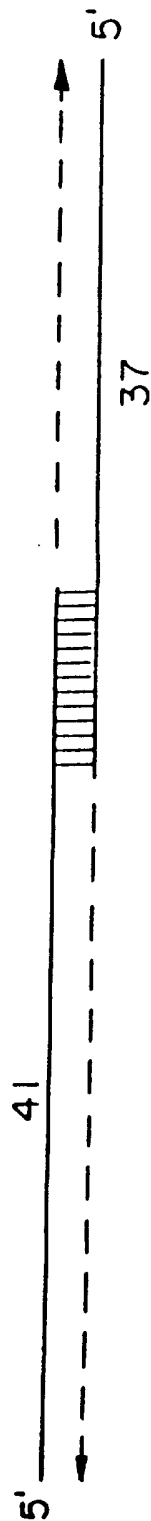
1. Förfarande för framställning av en farmaceutisk förening, vid vilket förfarande det framställs en förening som är verksam då ett främmande ämne har önskad verkan efter att ha bundit sig till en endogen receptor, **kännetecknat** av att i förfarandet ingår följande faser:
 - 1) den endogena receptorn upplöses, varefter det genom proteinkartläggning väljs den minsta del i nämnda receptor som behövs för att bevara elementen på bindningsstället för den endogena receptorn, receptorns förmåga att selektivt och specifikt igenkänna det främmande ämnet och binda sig därtill med en affinitet som förhindrar det främmande ämnets bindning till nämnda endogena receptor bevaras;
 - 2) en förening vars kemiska struktur till väsentliga delar motsvarar den under nämnda fas 1) valda föreningen, som selektivt och specifikt igenkänner det främmande ämnet och binder sig därtill, syntetiseras kemiskt och/eller genom en rekombinant-DNA-teknik, till föreningen tillsätts en tilläggsinsats som företrädesvis är farmaceutiskt acceptabel och som inte påverkar föreningens förmåga att igenkänna det främmande ämnet och binda sig därtill.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den vid förfarandet framställda föreningen väsentligen inte är större än den storlek som behövs för att bevara de väsentliga delarna i bindningsstället för receptorn.
3. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att den endogena receptorn vid förfarandet utgörs av en kolinergisk receptor och att nämnda främmande ämne är ett kurarimimetiskt neurotoxin.

4. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att den endogena receptorn vid förfarandet utgörs av den nikotiniska acetylkolinreceptorn och att nämnda främmande ämne är α -bungarotoxin, kobratoxin, d-tubokurarin, decametonium eller rabiesvirus.
5. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att den endogena receptorn vid förfarandet är T4-cellantigenen hos lymfocyter och att nämnda främmande ämne är ett HIV-virus.
6. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att substansen vid förfarandet har producerats ur en naturlig endogen receptor genom att uppdelas den endogena receptorn i en del som är tillräckligt liten för att inte åstadkomma ett autoimmunsvar mot den endogena receptorn när den ges in vivo, eller som på annat sätt saknar väsentlig immunogenicitet men som ändå kan bevara de väsentliga delarna i bindningsstället för nämnda receptor.
7. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att substansen vid förfarandet är en peptidkedja uttryckt genom en kombinations-DNA-teknik i genmanipulerade celler.
8. Förfarande enligt patentkrav 1, kännetecknat av att nämnda substans är en syntetisk peptid.
9. Förfarande enligt patentkrav 3, kännetecknat av att där ingår följande aminosyresekvens:
Trp-Lys-His-Trp-Val-Tyr-Tyr-Thr-Cys-Cys-Pro-Asp-Thr-Pro-Typ-Leu-Asp eller en variant därav som bevarar det kurarimimetiska neurotoxinets bindningssärdrag, varvid bindningssärdragen hos varianten är åtminstone lika starka som i nämnda sekvens i samma neurotoxin.

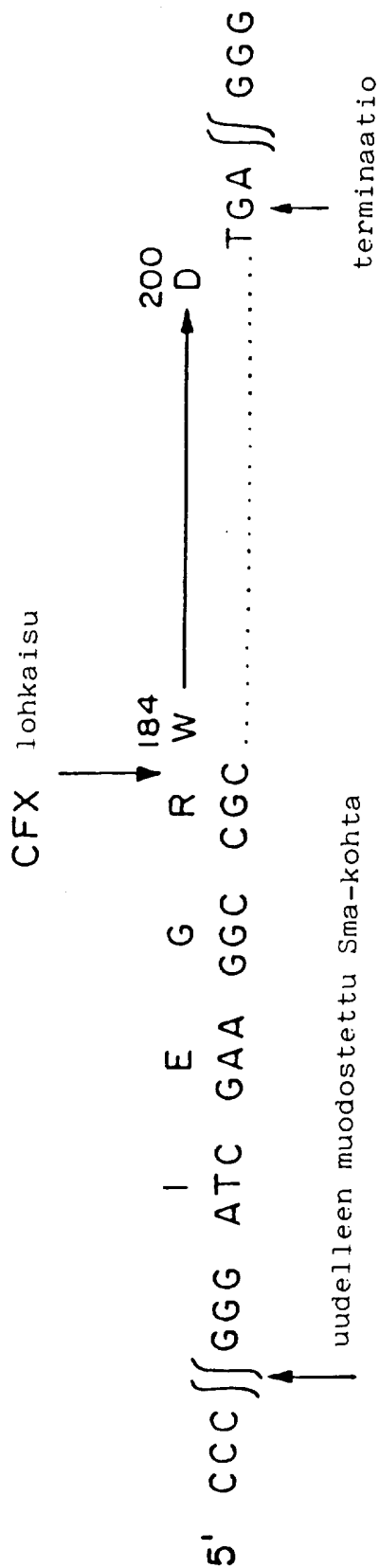
1) Synteettiset oligonukleotidit

41: 3'-GTCCACATCATTTGGGTCACAAAGGTCGCCGGGAAGCTAGGG-5'
 37: 3'-GATGTGGACGACGGCCCTGTGAGGCATGGACCTGACT-5'

2) Klenow'in täyttö



3) pATH2:n lisäys Sma-kohtaan:



Synteettinen sitoutumiskohta

Fig. 1

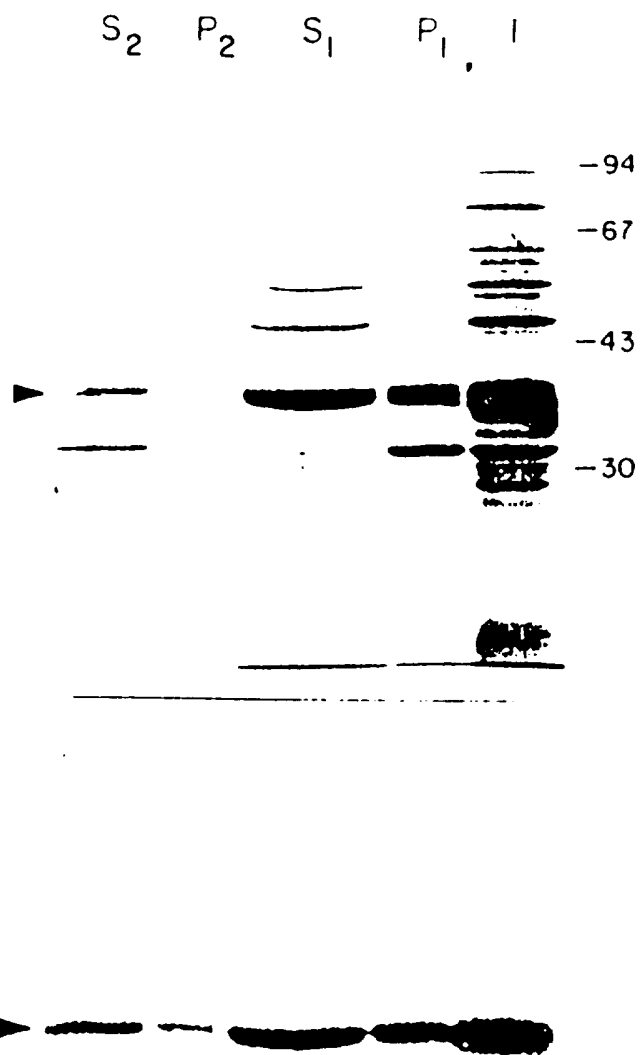


Fig. 2

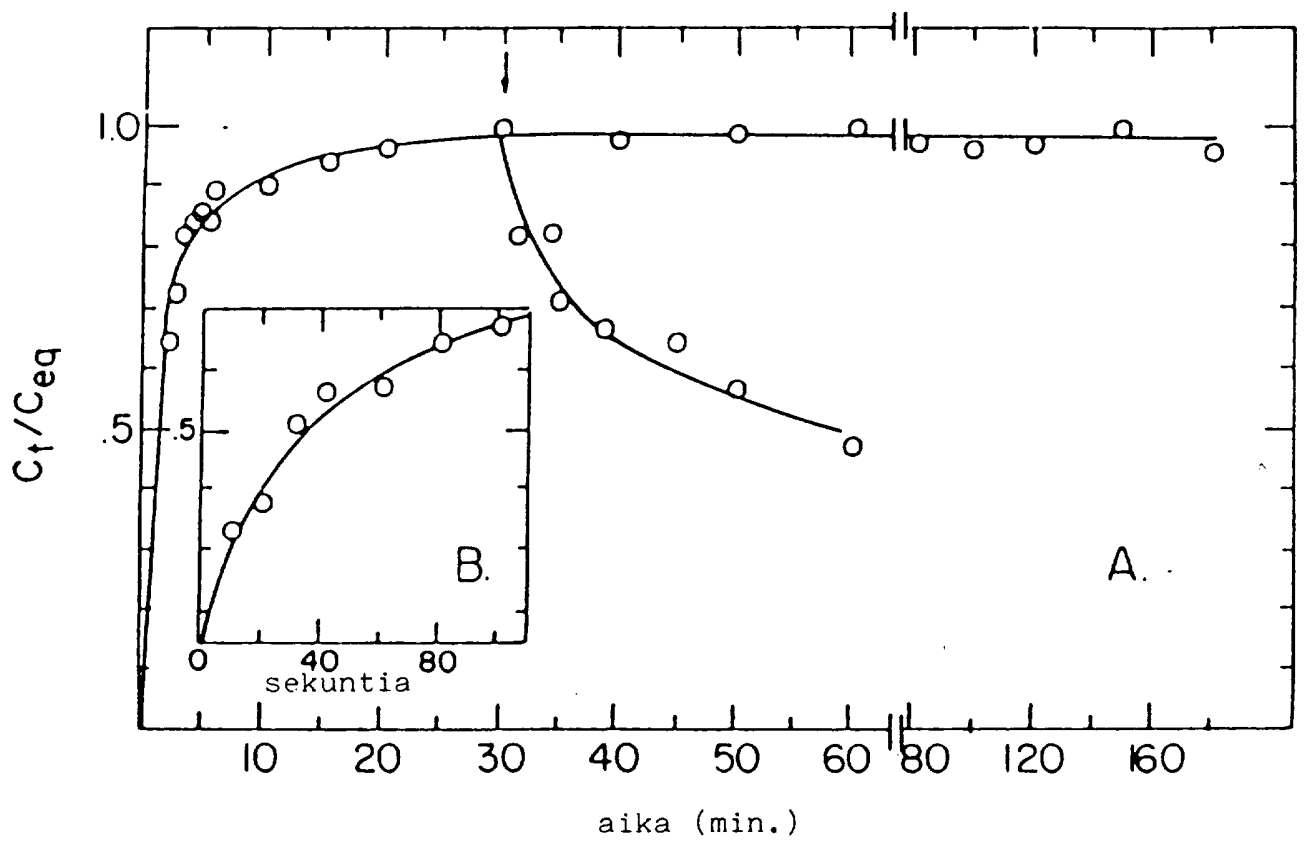


Fig. 3

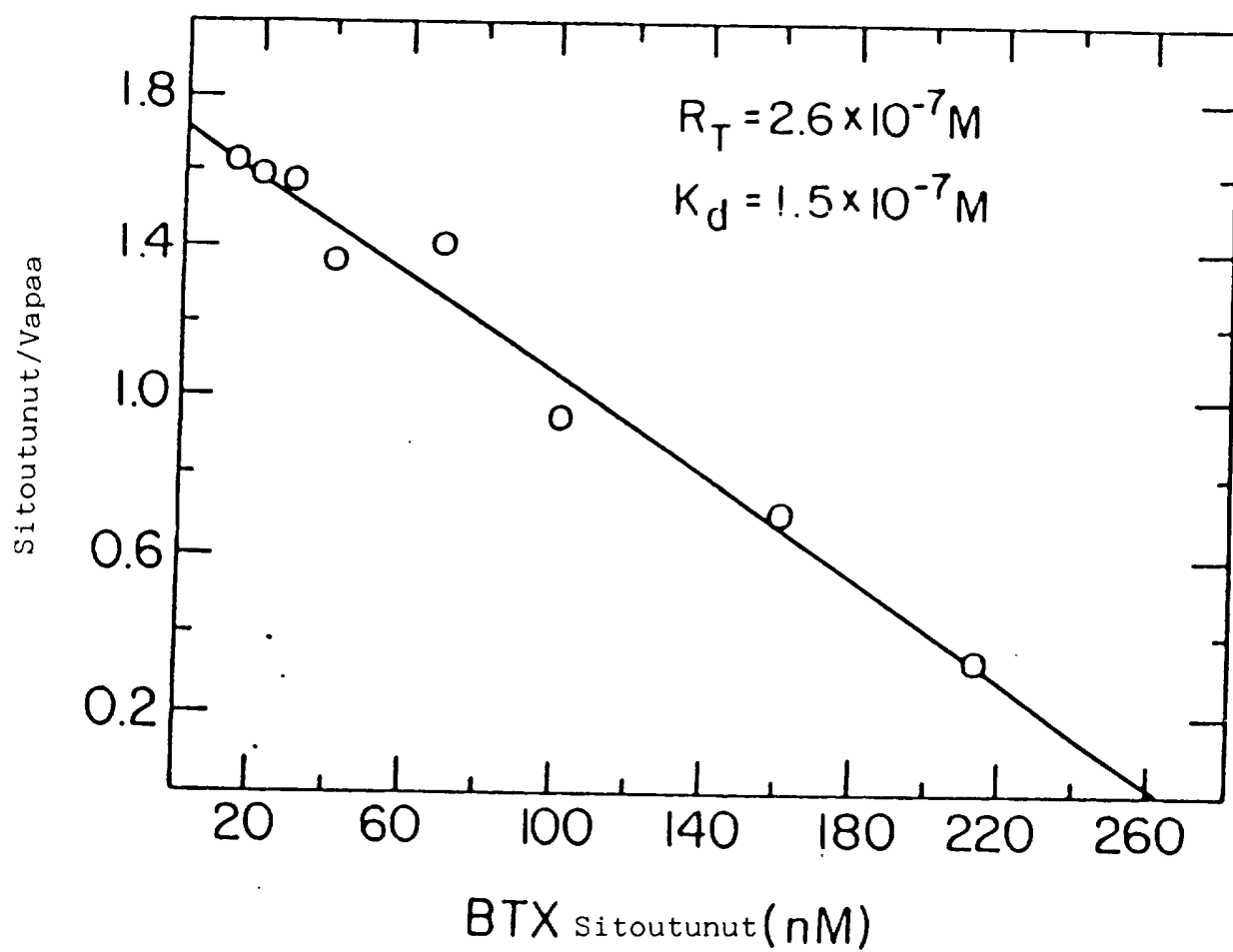


Fig. 4

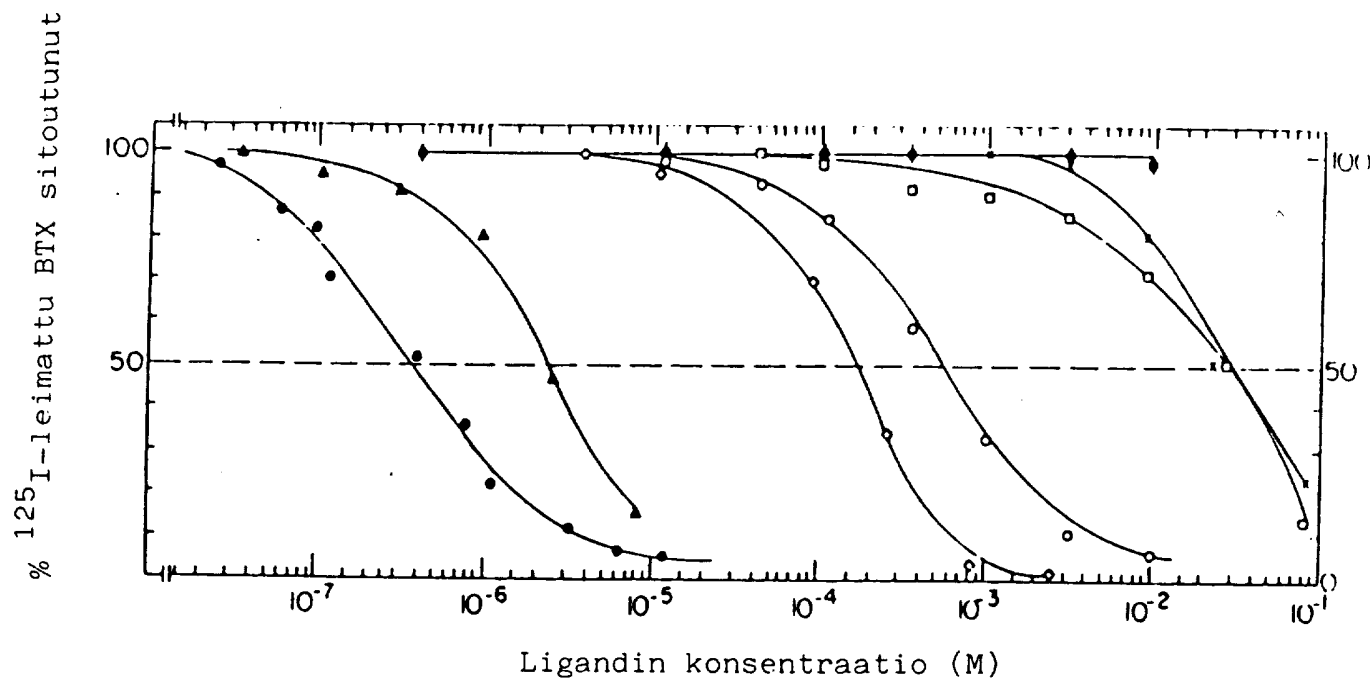


Fig. 5

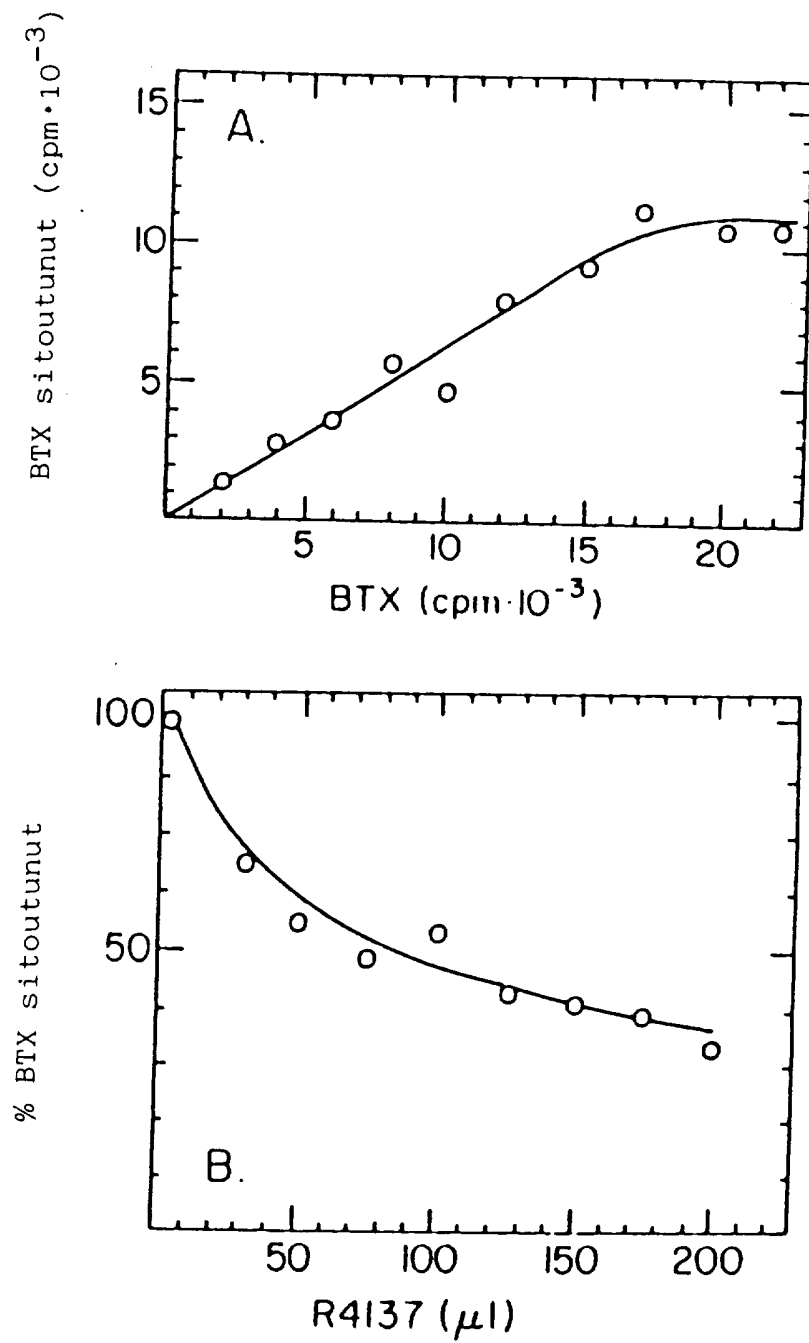


Fig. 6

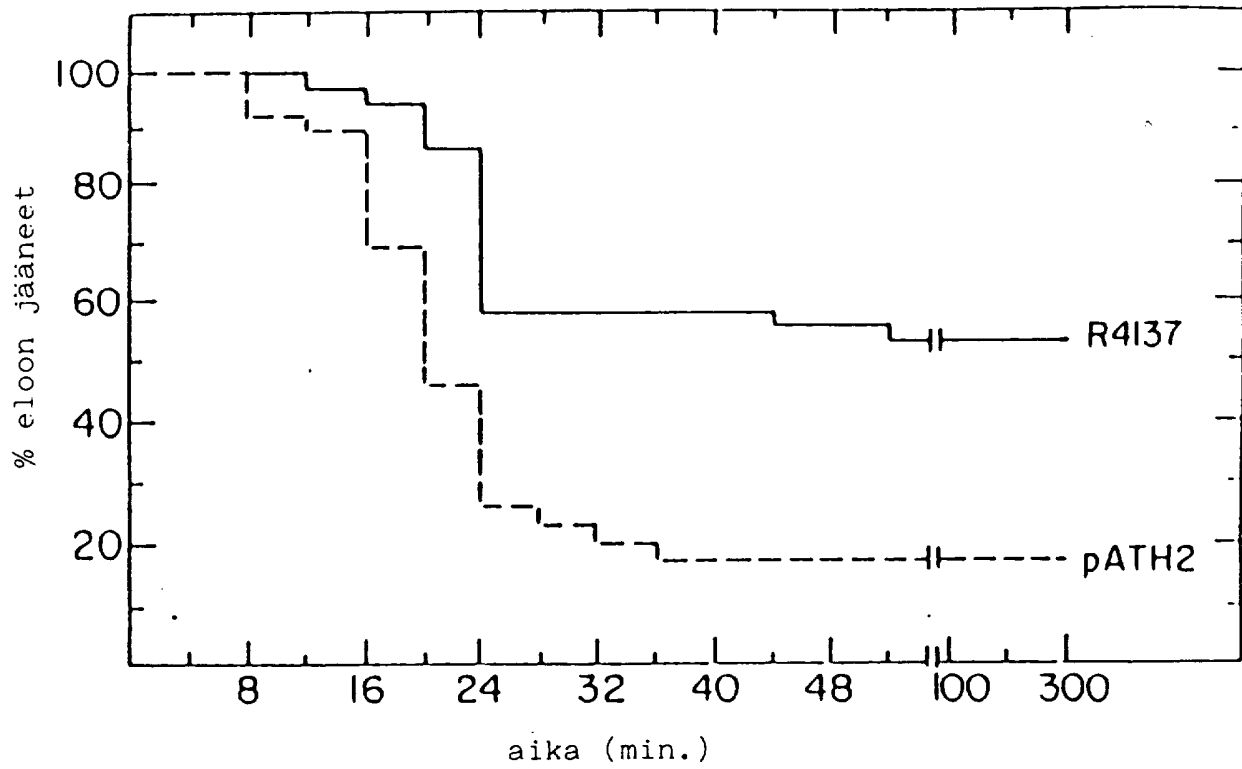


Fig. 7