



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 304267

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 7/00, 14/435, 14/78, 14/81,
G 01 N 33/566

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19914962	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	15.06.1990, PCT/US90/03417
(22) Inng. dag	16.12.1991	(85) Videreføringdag	16.12.1991
(24) Løpedag	15.06.1990	(30) Prioritet	16.06.1989, US, 367509
(41) Alm. tilgj.	31.01.1992		06.10.1989, US, 418028
(45) Meddelt dato	23.11.1998		20.02.1990, US, 483229

(73) Patenthaver	COR Therapeutics Inc, 256 East Grand Avenue, Suite 80, South San Francisco, CA 94080, US
(72) Oppfinner	Robert M. Scarborough, Belmont, CA, US David Lawrence Wolf, Palo Alto, CA, US Israel F. Charo, Lafayette, CA, US
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, 0106 Oslo

(54) **Benevnelse** Analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv spesifikk blodplateaggregasjonsinhibitor (PAI) peptid

(56) **Anførte publikasjoner** Dennis M.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 87, 1989, s. 2471-2475
Nachman R.L. et al., Journ. of Clin. Investigation, vol. 69, 1982, s. 263-269
Bennet J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 80, 1983, s. 2417-2421
Phillips D.R., Blood, vol. 71, nr. 4, 1988, s. 831-843

(57) **Sammendrag** En analyse for screening av slangevenom for tilstedeværelse eller fravær av blodplateaggregasjonsinhibitorer (PAI) basert på spesifikk reseptorbinding er beskrevet. Ved anvendelse av denne analysen ble identifikasjon og karakterisering av PAI i mange slangevenomprøver oppnådd. Isolert og rensset PAI fra flere av disse aktive slangevenomene er blitt beskrevet og karakterisert. I tillegg er PAI som mangler Arg-Gly-Asp (RGD) adhesjonssekvens, men som inneholder K^{*}-(G/Sar)-D hvori K^{*} er et modifisert lysylresidie med formel R¹₂N(CH₂)₄CHNECO, hvori hver R¹ er uavhengig H, alkyl(1-6C) eller opptil en R¹ er R²-C-NR³ der R² er H, alkyl(1-6C), fenyl eller benzyl, eller er NR⁴ der hver R⁴ er uavhengig H eller alkyl(1-6C), og R³ er H, alkyl(1-6C), fenyl eller benzyl, eller R²-C-R³ er en rest valgt fra gruppen bestående av (a), (b), (c) og (d) der m er et tall på 2-3, og hver R⁵ er uavhengig H eller alkyl(1-6C) og hvori en eller 2 (CH₂) kan bli erstattet med O eller S, forutsatt at nevnte O eller S ikke er ved siden av et annet heteroatom, fremstilt og vist å spesifikt inhibere bindingen av fibrinogen eller von Willebrand-faktor til GP IIb-IIIa.

Foreliggende oppfinnelse vedrører analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv spesifikk blodplateaggregasjonsinhibitor (PAI) peptid med evne til å inhibere bindingen av Fg eller vWF, GP IIb-IIIa med vesentlig mer, 5 dvs. at enten er prosent inhibisjon minst to ganger høyere ved en gitt konsentrasjon av PAI eller at konsentrasjonen av PAI som forårsaker 50% inhibisjon, er minst to ganger mindre for Fg eller vWF/GP IIb-IIIa bindingsinhibisjonen enn for alternativ ligand/-reseptorbinding.

10

Peptidene er beslektet med blodplateaggregasjonsinhibitorer, isolert og rensset fra forskjellige slangevenomer. Disse peptidene er nyttige som terapeutiske midler for behandling av, og forhindring av, blodplateassosierte, ischemiske forstyrrelser. De blokkerer spesifikke reseptorer for adhesiv- 15 proteiner involvert i adherens og aggregasjon av blodplater.

20

Hjertesykdom er hovedårsaken til dødsfall i de fleste vestlige land. Dødsfall forårsaket av hjertesykdom er ofte indusert av blodplate-avhengige ischemiske syndromer som blir initiert av aterosklerose og arteriosklerose og omfatter, men er ikke begrenset til, akutt myokardialt infarkt, kronisk ustabil angina, transient ischemiske angrep og slag, perifer vaskulær sykdom, arteriell trombose, preeklampsi, embolisme, 25 restenose og/eller trombose etter angioplasti, karotid endarterektomi, anastomose av vaskulære podninger, og kronisk kardiovaskulære anordninger (f.eks. inngående katetere eller ledende "ekstrakorporale sirkulerende anordninger"). Disse syndromene representerer forskjellige stenotiske og okklusive 30 vaskulære forstyrrelser som antas å bli initiert ved blodplateaktivering enten på karvegger eller innenfor hulrommet av blodbårne mediatorer, men er manifisert av blodplateaggregater som danner tromber som hemmer strømmingen av blod.

35

Mange studier har bidratt til en forståelse av mekanismen ved blodplateaggregering og trombedannelse. Blodplater reagerer overfor forskjellige skader på blodkar, såsom innsnevring av

åpningen, plakkdannelse og tilstedeværelse av fremmede legemer (f.eks. katetre), o.l. Responsen til blodplatene i disse skadene er en sekvens av hendelser som omfatter blodplateadherens og aktivering, og frigjøring av blodplatekomponenter, inkludert potente cellulære mytogene faktorer. De aktiverte blodplateaggregatene induserer dannelsen av fibrin som videre stabiliserer trombene.

Mye er nå kjent om mekanismene som regulerer disse responsene. Til tross for at ustimulerte blodplater inneholder reseptorer for flere adhesive proteiner inkludert laminin (VLA 2, VLA 6) og kollagen (VLA 2, GPIV, andre), antas den opprinnelige kobling av blodplatene til subendotelet å være formidlet av bindingen av blodplatemembranglykoproteinet (GP) Ib til den immobiliserte von Willebrand faktoren. Påfølgende aktivering av blodplater kan bli initiert av en eller flere kjente fysiologiske agonister inkludert: ADP, efenifrin, trombin, kollagen og tromboksan A₂.

Blodplateaggregasjonen er mediert av GP I Ib-IIIa komplekset på overflaten av blodplatemembranen. GP I Ib-IIIa eksisterer på overflaten av ustimulerte blodplater i en inaktiv form. Når blodplatene blir aktivert ved adhesjon og de fysiologiske agonistene, blir GP I Ib-IIIb også aktivert slik at den blir en reseptor for fibrinogen (Fg), von Willebrand faktor (wWF), og fibronektin (Fn) (se Phillips et al., Blood (1988) 71:831-843); det antas derimot at bindingen av fibrinogen og/eller von Willebrand faktor er hovedsakelig ansvarlig for blodaggregasjon og trombedannelsen in vivo. Forbindelser som spesifikt inhiberer bindingen av fibrinogen eller von Willebrand faktor til GP I Ib-IIIa inhiberer blodplateaggregasjon og kan være kandidater for inhibering av trombedannelsen in vivo.

Blodplate GP I Ib-IIIa er nå kjent for å være et medlem av en superfamilie av strukturelt beslektede adhesive proteinreseptorer kjent kollektivt som "integriner". Som GP I Ib-

IIIa er alle integrinene som er kjent opp til nå, molekylet med to subenheter med en større alfa-subenhet (f.eks. GP IIB) og en mindre beta-superenhet (f.eks. GP IIIa). Det er en høy grad av homologi mellom de kjente sekvensene til integrin-subenhetene, og dette tyder på at integrinene er utviklet fra en felles forløper. Integrinene virker i forskjellige cellulære adhesjoner, og er blitt funnet i leukocytter, endoteliske celler, glatte muskelceller og andre celler i muskulaturen. P.g.a. at integriner er meget spredte, mens GP IIB-IIIa er begrenset til blodplatene, vil et foretrukket anti-aggregeringsmiddel selektivt inhibere GP IIB-IIIa i forhold til andre integriner.

Flere klasser av peptider er blitt beskrevet som blokkerer bindingen av adhesive proteiner til aktiverte blodplater, og som inhiberer blodplateaggregasjonen (se Hawiger et al., US patent 4.661.471; og Rouslahti et al., US patentene 4.614.517; 4.578.079; 4.792.525; og UK-søknad GB 2.207.922A). I en klasse av peptider er sekvensene RGD kritisk, og tetrapeptidsekvensene RGDS, RGDT, RGDC er blitt anvendt spesifikt. Aminosyresekvensen RGDX finnes i forskjellige adhesivproteiner inkludert Fg, Vn, vWF og Fn. Denne sekvensen er blitt demonstrert å spille en viktig rolle ved interaksjonen ved adhesive proteiner med adhesive proteinreseptorer p.g.a. at peptider inneholdende disse sekvensene blokkerer bindingen av adhesive proteiner. Se f.eks. Pierschbacher, M.D. et al., J. Biol. Chem (1987) 262:17294-17298; Ruggeri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USDA) (1986) 83:5708-5712; og Rouslahti et al. Cell (1986) 44:517-518. Tetrapeptider inneholdende denne sekvensen er beskrevet i EP søknad 319.506 publisert 7. juni 1989. Korte peptider inneholdende homoarginin istedenfor arginin i RGD-sekvensene er beskrevet i PCT-søknad W089/07609 publisert 24. august 1989.

De strukturelle variasjonene som er tillatt i RGD-inneholdende peptider, er blitt undersøkt av Pierschbacher M.D. et al., J. Biol. Chem. (supra). I disse studiene ble det

funnet at manipulering av den RGD-inneholdende sekvensen ikke bare påvirket aktiviteten relatert til inhibisjon av bindingen av fibronektin eller vitronektin til substratet, men kunne også påvirke differensieringen mellom bindingene av de to ligandene. Peptidsekvensen GRGDSPC som ble tatt fra cellekoblingsdomenen til fibronektin, ble anvendt som et modellpeptid. Visse substitusjoner, såsom erstatning av L-Arg med D-Arg ser ikke ut til å ha noen virkning på bindingen av hvilke som helst av liganden, men substituering av D-Ala for Gly, eller D-Asp for L-Asp ødelegger inhibisjonsaktiviteten. P.g.a. at substituering D-Ser med L-Ser reduserte inhibisjonen av nitronektininteraksjonen med vitronektinreseptoren, var det liten virkning på fibronektininteraksjonen med fibronektinreseptoren; substitusjon av Asn for Ser resulterte i et peptid som hadde forsterket inhibisjon av fibronektinbinding, og en redusert virkning på vitronektinbindingen. Alternative substisjoner for Ser hadde andre virkninger. Treonin substituert for Ser ga et peptid med øket inhibisjon for binding til nitronektinreseptoren og substitusjon av L-Pro førte til et inaktivt peptid. Et cyklisk peptid ble også fremstilt av sekvensen Gly-Pen-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Cys-Ala, der "Pen" er penicillamin, og en disulfidbro ble dannet mellom Pen og Cys. Penicillamin hadde ifølge forfatterne en funksjon som førte til økning av konformasjonshemming på ringen, mens N-terminal Gly og karboksyterminal Ala ble tilsatt for å distansere de frie amino- og karboksylgruppene fra ringen. Dette cykliske peptidet kunne inhibere nitronektinbindingen sterkere enn det samme peptidet før cyclisering, men var ineffektiv når det gjelder inhibering av fibronektinbindingen.

Nylig ble et antitrombotisk peptid med en modifikasjon av RGD-sekvensen som hadde "R"-residiet alkylert, rapportert av Samanen, J. et al., J Cell Biochem (1990) Suppl 14A:A229. En oversikt på struktur/aktivitetsforhold i RGD-inneholdende peptider er blitt publisert av Ali, F.E. et al. i Proc. 11th Am. Peptide Symp., Marshall et al., ed. ESCOM Leiden 1990.

Europeisk patentsøknad, publ. nr. 341.915 publisert 15. november 1989 beskriver to grupper av peptider, den ene er linear og den andre er cyklisk, som binder blodplate GP IIb-IIIa reseptoren og dermed for å inhibere dets evne til å binde vWF, fibronektin og fibronogen-fibrin. Det er ikke tilveiebragt data som vedrører spesifisiteten av binding av disse peptidene. Gruppen av cycliske peptider inkluderer modifikasjoner av RGD-sekvensen der R er substituert med D eller L homarginin, dimetyl eller dietylarginin, lysin eller et alfa-alkylert derivat av disse residiene. Minimale cycliske strukturer omfatter bare "R" GD-sekvensen innlemmet mellom de to residiene som danner disulfidbroen.

En separat klasse av inhibitoriske peptider anvender peptid-sekvenser vist på den karboksylterminale sekvensen avledet fra gamma-kjeden til fibrinogen, dodecapeptid HHLGGAQKAGDV (Kloczewiak et al., Biochemistry (1989) 28:2915-2919; Timmons et al., (Ibid), 2919-2923 US patent 4.661.471 (ovenfor); EP-søknad 298.820). Til tross for at denne sekvensen inhiberer Fg og vWF-bindingen til GP IIb-IIIa og påfølgende blodplate-aggregasjon, er nyttheten av dette peptidet begrenset p.g.a. at det har en lav affinitet for interaksjon med blodplatereseptorene ($IC_{50} = 10-100 \mu M$).

I den senere tiden har flere grupper isolert og karakterisert en ny klasse polypeptidfaktorer med lav molekylvekt fra slangevenomer som har ekstremt høy affinitet for GP IIb-IIIa kompleks. Huang, T.-F., et al., J. Biol Chem (1987) 262:16157-16163; Huang, T.-F., et al., Biochemistry (1989) 28:661-666 rapporterer den primære strukturen til trigramin, et 72 aminosyrepeptid inneholdende RGD og 6 disulfidbroer isolert fra *Trimeresurus gramineus*. Gan, Z.-R., et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:19827-19832 rapporterer egenskapene og strukturen til echistatin, et 49 aminosyrepeptid som også inneholder RGD og 4 antatte disulfidbroer som er isolert fra *Echis carinatus*. Williams, J.A. et al., FASEB Journal

(1989) 3:A310, Abstr. No. 487m, rapporterer sekvensen og egenskapene til de beslektede peptidene elegantin, albolabrin og flavoviridin. I tillegg ble karakterisering av bitistatin rapportert av Shebuski, R. J. et al., J. Biol. Chem. (1989) 264:21550-21556; og PAI fra *Agkistrodon piscivorus piscivorus* rapportert av Chao, B. H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:8050-8054. Forholdet mellom forskjellige GP IIB-IIIa antagonister fra slangevenomer ble diskutert av Dennis, M.S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 87:2471-2475.

Innbefattet i denne gruppen av inhibitoriske peptider fra slangevenomer er alboadrin isolert fra *Trimeresurus albolabris*, elegantin isolert fra *T. elegans*, flavoviridin isolert fra *T. flavoviridis*, baktroxostatin isolert fra *Bothrops atrox*, bistatin isolert fra *Bitis arietans* rapportert av Niewiarowski, S., et al., Throms Haemostas (1989) 62:319 (Abstr. SY-XIV-5). I tillegg er applaggin blitt rensset fra *Agkistrodon p. piscivorus* og rapportert av Chao, B. et al., Throms. Haemostas (1989) 62:50 (Abstr. 120) og halysin, rensset fra *Agkistrodon halys* som ble rapportert av Huang, T. F. et al., Throms haemostas (1989) 62:48 (Abstr. 112). Alle disse peptidene viser en høy grad av sekvenshomologi. Alle peptidene rapportert opp til nå fra slangevenomer som inhiberer bindingen av adhesive proteiner til integrinreseptorer, inneholder RGD-sekvensen.

Til tross for at disse rapporterte slangevenomfaktorene er potente inhibitorer av blodplateaggregasjonen *in vitro*, så bindes disse peptidene med høy affinitet også til andre medlemmer av adhesivproteinreseptorer såsom vitronektin og fibronektinreseptorer (Knudsen, K. A. et al., Exp. Cell. Res. (1988) 179:42-49; Rucinski, B. et al., Throms Haemostas (1989) 62:50 (Abstr. 120). Denne mangelen på spesifisitet for slangevenomfaktorer for GP IIB-IIIa er et uønsket trekk ved deres terapeutiske anvendelse som inhibitorer av trombedannelsen, p.g.a. at de har potensiale for å tilveiebringe de

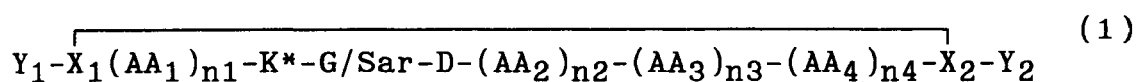
adhesive egenskapene til andre celler i vaskulaturet, spesielt adhesjonene formidlet av integriner.

En annen tilnærming utviklet for dannelsen av blodplate-
5 trombeinhibitorer har vært anvendelse av murine anti-GP IIb-
IIIa monoklonale antistoffer som blokkerer bindingen av de
adhesive proteinene for å stimulere blodplatene. Disse
monoklonale antistoffene er blitt anvendt for å forhindre
10 koronar arterioreokklusjon etter reperfusjon med en vevs-
plasminogenaktivator i hunder (Yasuda, T. et al., J. Clin.
Invest. (1988) 81:1284-1291) og forhindre cyklisk reduksjon
av strømmingen i skadede kaninkoronararterier med en høy grad
av stenose. Potensielle bivirkninger ved anvendelse av slike
15 monoklonale antistoffer i mennesker kan resultere fra deres
lengdevirkende virkninger og fra deres potensielle immunoge-
nisitet.

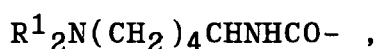
Ytterligere terapeutiske behandlingsregimer er nødvendig for
å forhindre eller i det minste mitigere uønsket trombe-
20 dannelse. Terapeutiske midler som kan blokkere eller inhi-
bere trombedannelsen ved spesifikke lokalisasjoner uten
kompromittering av hemostasen og uten å påvirke andre cellu-
lære adhesjoner, vil tilveiebringe store terapeutiske for-
deler. Disse midlene bør være potente, spesifikke for GP
25 IIb-IIIa og ikke-immunogene overfor de fleste pasientene, og
bør også være lette å administrere, stabile og økonomisk å
fremstille. Disse midlene bør virke forbigående, og kunne
virke på de tidligste stadiene av trombedannelsen uten å
interferere med lang-tidshemostasen.

30 Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en analogifrem-
gangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv spesifikk
blodplateaggregasjonsinhibitor (PAI) peptid med evne til å
inhibere bindingen av Fg eller vWF, GP IIb-IIIa med vesentlig
35 mer, det vil si at enten er prosent inhibisjon minst to
ganger høyere ved en gitt konsentrasjon av PAI eller at
konsentrasjonen av PAI som forårsaker 50% inhibisjon, er

minst to ganger mindre for Fg eller vWF/GP IIb-IIIa-bindings-
inhibisjonen enn for alternativ ligand/-reseptorbinding,
dvs. potenthet enn inhibering av bindingen av vitronektin til
vitronektinreseptoren eller fibronektin til fibronektin-
reseptoren, der PAI har formelen:



hvor K^* er et lysylresidie med formelen:

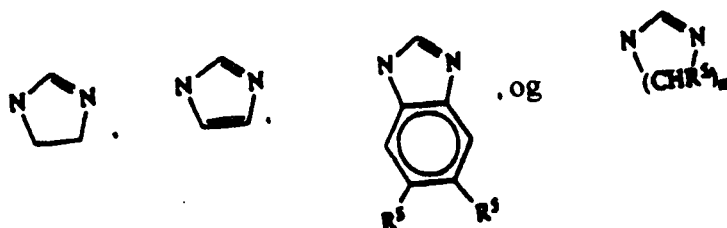


hvor hver R^1 er uavhengig H, alkyl (1-6C) eller
optil en R^1 er $R^2-C=NR^3$,

hvor R^2 er H, alkyl (1-6C) eller er en substituert
eller usubstituert fenyl eller benzylrest, eller NR^4_2 der
hver R^4 er uavhengig H eller alkyl (1-6C), og

R^3 er H, alkyl (1-6C), fenyl eller benzyl, eller

$R^2-C=NR^3$ er en rest valgt fra gruppen bestående av:



hvor m er et tall på 2-3, og hver R^5 er uavhengig H
eller alkyl (1-6C);

og der en eller to (CH_2) kan bli erstattet med O
eller S forutsatt at nevnte O eller S ikke er ved siden av et
annet heteroatom;

AA_1 er en liten, nøytral (polar eller upolar) amino-
syre, og n_1 er et tall på 0-3;

AA_2 er en nøytral, upolar, stor (aromatisk eller
uaromatisk) eller en polar aromatisk aminosyre, og n_2 er et
tall på 0-3;

AA₃ er et prolinresidie eller et modifisert prolinresidie og n₃ er et tall på 0-1;

AA₄ er en nøytral, liten aminosyre eller den N-acylerte form derav, og n₄ er et tall på 0-3;

5 hver av X₁ og X₂ er uavhengig en residie som kan danne en binding mellom X₁ og X₂ for å oppnå en cyklisk forbindelse som vist;

hver av Y₁ og Y₂ er uavhengig en ikke-interfererende substituent, eller kan være fraværende;

10 hvor en eller flere peptidbindinger eventuelt kan bli erstattet av en binding valgt fra gruppen bestående av -CH₂NH-, -CH₂S-, CH₂CH₂-, -CH=CH- (cis og trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- og -CH₂SO-;

forutsatt at dersom n₃ er 0; er enten:

- 15 1) summen av n₂ og n₄ minst 2; eller
 2) K* må være forskjellig fra Har eller K; eller
 3) X₂ må være forskjellige fra Cys (C), penicillamin (Pen), eller 2-amino-3,3-cyklopentanmetylen-3-merkaptopropionsyre (APmp); eller
 20 4) en eller flere peptidbindinger er erstattet med nevnte alternerende binding, kjennetegnet ved at den omfatter:

begynne syntesen fra den karboksy-terminale enden av nevnte peptid ved anvendelse av en aminosyre som har en alfa-aminobeskyttende gruppe, i det nevnte aminosyre er bundet til
 25 en harpiskbærer, fullføre oppstillingen av en beskyttet peptid-harpikskjede, fjerning av nevnte beskyttelsesgruppe, spaltning av nevnte peptid fra nevnte harpiks, syklisering av nevnte peptid og eventuelt rensing av nevnte peptid.

30

Forståelsen om at blodplateaggregering hovedsakelig blir oppnådd gjennom binding av fibrinogen og/eller vWF til GP IIb-IIIa på overflaten av blodplattene når blodplattene blir
 35 behandlet med hensiktsmessig stimuli, såsom ADP er viktig. Ved anvendelse av disse kriteriene, dvs. inhibisjon av binding av fibrinogen og/eller vWF til isolert reseptor og

analoge kriterier relatert til inhibisjon av binding av fibronektin (Fn) til fibronektinreseptoren (Fn/FnR-binding) og vitronektin til vitronektinreseptoren (Vn/VnR-binding), samt binding av andre faktorer, såsom Fn og Vn til GP IIB-IIIa, en spesifisitetsprofil for blodplateaggregasjonsinhibitoren (PAI) kan hurtig og hensiktsmessig bli oppnådd. Denne tilnærmelsen er blitt anvendt for å screene og karakterisere et omfattende panel av slangevenomer for tilstedeværelse eller fravær av PAI, for å karakterisere spesifisiteten til PAI identifisert fra dette panelet på deres spesifisitet til å inhibere binding til GP IIB-IIIa i forhold til inhibering av andre integriner, og å identifisere aktive peptider som er derivater av PAI.

PAI kan bli isolert fra aktiv slangevenom og fra *Echis colorata*, *Eristicophis macmahonii*; *A. hypnale*, *A. acutus*, *A. piscivorous leucostoma*, *A. piscivorus conanti*; *Bothrops asper*; *Bothrops cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussi*, *B. lansbergi*, *B. medusa*, *B. nasuta*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. schlegli*, *Crotalus atrox*, *C. basilicus*, *C. cerastes cerastes*, *C. durissus surissus*, *C. durissus totonatacus*, *C. horridus horridus*, *C. molossus molossus*, *C. ruber ruber*, *C. viridis cereberus*, *Crotalus v. helleri*, *Crotalus v. lutosus*, *Crotalus v. oreganus*, *Crotalus v. viridis*; *Lachesis mutas*; *Sistrurus catenatus tergeminus*, og *Sistrurus milarus barbouri*.

PAI i isolert form fremstilt fra, eller med aminosyresekvensene til de som er oppnådd fra *Eristicophis macmahonii* (*eristicophin*); *Bothrops cotiara* (*cotiarin*); *B. jararacussu*; *Crotalus atrox* (*crotatroxin*); *Crotalus basilicus* (*basilicin*); *C. cerastes cerastes* (*cerastin*); *C. durissus totanatacus* (*durissin*); *C. durissus durissus* (*durissin*); *C. h. horridus* (*horridin*); *Crotalus m. molossus* (*molossin*); *C. ruber ruber* (*ruberin*); *Crotalus viridis lutosus* (*lutosin*); *C. v. viridis* (*viridin*); *Crotalus v. oreganus* (*oreganin*); *Crotalus v. helleri*; *Lachesis mutas* (*lachesin*); *Sistrurus catenatus*

tergeminus (tergeminin); og *S. milarus barbouri* (barbourin) er foretrukne.

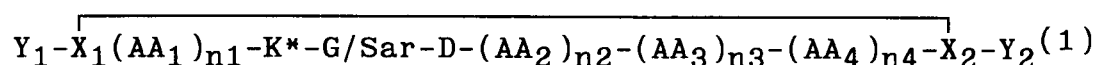
Spesielt foretrukket er eristicophin, cotiarin, crotatroxin, cerastin, durissin, horridin, ruberin, lachesin, basilicin, lutosin, molossin, oreganin, viridin, tergeminin og barbourin.

I et annet hovedaspekt er oppfinnelsen rettet mot fremstilling av en gruppe peptider eller peptid-relaterte forbindelser som generelt er blodplateaggregasjonsinhibitorer som kan inhibere bindingen av Fg eller vWF til GP IIb-IIIa ved en vesentlig høyere potenthet enn den hvor det inhiberer bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren eller fibronektin til fibronektinreseptoren. Disse peptidene er karakterisert ved å ha bindingssekvensen K*GDX istedenfor RGDX-bindingssekvensen som finnes i tidligere PAI-proteiner. Barbourin PAI isolert fra *S. milarus barbouri* er en illustrasjon på denne serie av peptider. Kortere former av dette peptidet kan derimot også bli anvendt, samt analoge sekvenser som også inneholder 1-10 aminosyreresidie-modifikasjoner andre steder i peptidkjeden, og/eller erstatning av peptidbindinger med alternative bindinger. Andre illustrerende utførelsesformer omfatter isolerte PAI-peptider med en nativ RGDX-sekvens der denne er erstattet med K*GDX. Som når det gjelder barbourin kan disse isolerte PAI være i nativ form eller være forkortede og/eller inneholde 1-10 aminosyreresidiesubstitusjon eller delesjoner, og/eller kan ha ikke-peptidbindinger substituert for peptidbindinger.

30

En annen illustrerende gruppe av utførelsesformer er peptider eller modifiserte peptider med en spesifikk PAI-aktivitet med formel:

35



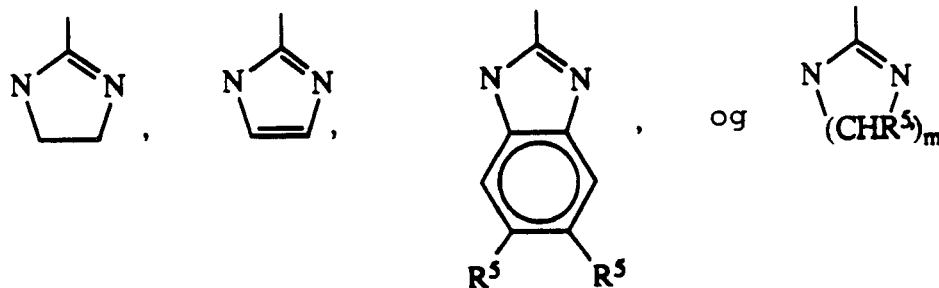
hvor K^* er en substituert eller usubstituert lysylrest med formel $R^1_2N(CH_2)_4 CHNHCO-$ som beskrevet ovenfor,

der hver R^1 er uavhengig H, alkyl (1-6C) eller mest en R^1 er $R^2-C=NR^3$,

der R^2 er H, alkyl (1-6C) eller en substituert eller usubstituert fenyl- eller benzylrest, eller NR^4_2 der hver R^4 er uavhengig H eller alkyl(1-6C), og

R^3 er H, alkyl(1-6C), fenyl eller benzyl, eller

$R^2-C=NR^3$ er en rest valgt fra gruppen bestående av:



hvor m er et tall på 2-3, og hver R^5 er uavhengig H eller alkyl(1-6C);

og der en eller to (CH_2) kan bli erstattet med O eller S forutsatt at nevnte O eller S ikke er ved siden av et annet heteroatom;

AA_1 er en liten, nøytral (polar eller upolar) aminosyre, og n_1 er et tall på 0-3;

AA_2 er en nøytral, upolar, stor (aromatisk eller ikke-aromatisk) eller en polar aromatisk aminosyre, og n_2 er et tall på 0-3;

AA₃ er en prolinrest eller en modifisert prolinrest (som definert nedenfor), og n₃ er et tall på 0-1;

5 AA₄ er en nøytral, liten aminosyre eller n-alkylert form derav, og n₄ er et tall på 0-3;

hver av X₁ og X₂ er uavhengig en rest som kan danne en binding mellom X₁ og X₂ for å oppnå en cyklisk forbindelse som vist; og

10

hver av Y₁ og Y₂ er uavhengig en ikke-interfererende substituent, eller kan være fraværende;

15 hvori en eller flere peptidbindinger eventuelt kan bli erstattet av en binding valgt fra gruppen bestående av -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH=CH- (cis og trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- og -CH₂SO-;

forutsatt at dersom n₃ er 0; enten:

20

- 1) summen av n₂ og n₄ må være minst 2; eller
- 2) K* må være forskjellig fra Har eller K; eller
- 3) X₂ må være forskjellig fra cys (C), penicillamin (Pen) eller 2-amino-3,3-cyklopentanmetylen-3-merkaptopropionsyre (APmo); eller
- 25 4) Y₁ eller Y₂ må omfatte minst en aminosyreresidie; eller
- 5) en eller flere peptidbindinger blir erstattet med nevnte alternative binding.

30

Andre aspekter av oppfinnelsen vedrører rekombinante fremgangsmåter og materialer vedrørende fremstilling av disse og andre beslektede peptider, fremgangsmåter ved in vitro fremstilling derav, farmasøytiske sammensetninger inneholdende 35 disse forbindelsene, og fremgangsmåte for å inhibere blodplateaggregasjon og trombedannelse ved anvendelse av disse forbindelsene og sammensetningene.

Kort beskrivelse av tegningene:

Fig. 1 viser inhibisjon av bindingen av fibrinogen til GP
5 I Ib-IIIa ved delvis rensede slangevenomer.

Fig. 2 viser dose-responsadhesjonsinhibisjonen av Centricon-
10 ultrafiltrater av råvenomer i både fibrinogen/GP I Ib-IIIa
og vitronektin/vitronektinreseptoranalyser.

10

Fig. 3 viser HPLC-profilen til rå PAI fra *Eristicophis macma-*
honi venom. Det skraverte området inneholder de biologisk
aktive fraksjonene.

15 Fig. 4 viser HPLC-profilen til PAI-fraksjonene fra fig. 3.
Det skraverte området inneholder de bioaktive fraksjonene.

Fig. 5 viser den analytiske HPLC-profilen til PAI fraksjonene
fra fig. 4.

20

Fig. 6 viser de fullstendige aminosyresekvensene til eristi-
cophin, barbourin, tergeminin, cerastin, ruberin, lachesin,
cotiarin, crotatroxin, horridin, lutosin, viridin, molossin,
basilicin, durissin, jararacin, cerebrin og oreganin, og
25 enzymspaltede fragmenter bestemt ved automatisert Edman-
degradering.

Fig. 7 viser HPLC-profilen til PAI oppnådd fra G-50 frak-
sjonene til rå *Sistrurus c. tergeminus* venom.

30

Fig. 8 viser HPLC-profilen til PAI fraksjonene fra fig. 7.

Fig. 9 viser aktiviteten til rensset PAI ifølge fig. 8 i
inhiberende binding i flere reseptoranalyser.

35

Fig. 10 viser HPLC-profilen til blodplateaggregasjons-
inhibitoren oppnådd fra G-50 fraksjonene til rå *Sistrurus m.*

barbouri ven. De skraverte områder inneholder de bioaktive fraksjonene.

5 Fig. 11 viser HPLC-profilen til aktive PAI-fraksjoner ifølge fig. 10.

Fig. 12 sammenligner aminosyresekvensene til et antall PAI i forhold til barbourin.

10 Fig. 13 viser HPLC-profilen til rå PAI fra Lachesis mutas venom. Skraverte områder inneholder de biologisk aktive fraksjonene.

15 Fig. 14 viser HPLC profilen til PAI-aktive fraksjoner fra fig. 13. Det skraverte området inneholder de biologisk aktive fraksjonene.

Fig. 15 viser den analytiske HPLC-profilen til PAI-fraksjonene ifølge fig. 14 fra Lachesis mutas.

20

Fig. 16 viser HPLC-profilen til rå PAI fra Crotalus viridis viridis venom. Det skraverte området inneholder de biologisk aktive fraksjonene.

25 Fig. 17 viser HPLC-profilen til PAI-fraksjonene ifølge fig. 16.

30 Fig. 18 viser dose-responsvirkningene til rensset slangevenom-peptider for inhibert fibrinogem/GP IIb-IIIa binding sammenlignet med echistatin.

35 Fig. 19 viser dose-responsvirkningene av rensede slangevenom-peptider for inhibert ADP (4 μ M) indusert human blodplate-aggregasjon i blodplateanriktet plasma (PRP), sammenlignet med echistatin.

Fig. 20 viser aktivitetsprofilen fra HPLC-fraksjonering av *C. c. cerastes* venom.

5 Fig. 21 viser resultatene av HPLC-analysen av aktive fraksjoner fra fig. 20.

Fig. 22 viser aktivitetsprofilen av HPLC-fraksjonering av PAI fra *C. ruber ruber*.

10 Fig. 23 viser aktivitetsprofilen fra en analytisk C-18-kolonne på homogent peptid oppnådd fra *C. atrox*.

Fig. 24 viser den analytiske HPLC-profilen til det homogene peptidet isolert fra *Bothrops cotiara*.

15

Fig. 25 viser dose-responsvirkningene av rensset cotiarin på inhibering av bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa og inhibering av bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren.

20

Fig. 26 viser virkningene av rensset slangevenompeptider på bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa og vitronektin til vitronektinreseptoren.

25 Fig. 27 viser resultatene av bindingsaktiviteten for analog nr. 1, [E²⁸L⁴¹C⁶⁴) barbourin (28-73) med hensyn på GP IIb-IIIa og vitronektinreseptoren.

30 Fig. 28 viser evnen som syntetisk eristicophinanalogen har til å inhibere bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa og manglende evne til å inhibere bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren.

35 Fig. 29 viser evnen som lineære og cykliske RGDW-forbindelser og lineære og cykliske KGDW-forbindelser har til å inhibere bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa.

Fig. 30 viser evnen som forskjellige KGDW-analoger har til å inhibere bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa og inhibere bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren.

5 Fig. 31 viser evnen som forskjellige native og syntetiske blodplateaggrgasjonsinhibitorer har til å inhibere koblingen av M21 melanomceller til vitronektin.

10 Fig. 32 viser evnen som RGDS og en cyklisk RGD-forbindelse har til å inhibere koblingen av M21 melanomceller til vitronektin og den manglende evnen som en cyklisk KGDW-analog har til å inhibere koblingen av M21 melanomceller til vitronektin.

15 Fig. 33 viser aktiviteten til analog nr. 60, Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH₂, for inhibering av aggregasjonen av blodplater og celleadhesjon til vitronektin.

20 Fig. 34 viser aktivitetene ifølge fig. 33 for analog 19, Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂.

Fig. 35 viser initiering av cykliske strømningsreduksjoner (CFRs) i en åpen brysthundmodell for trombose (Folts modell).

25

Fig. 36 viser virkningene av en 10 mg bolusdoseadministrering på CFRs initiert i åpen brysthundmodell for trombose (Folts modell).

30 Fig. 37 viser virkningene av en 40 mg bolusdoseadministrasjon på CFRs initiert i åpen brysthundmodell for trombose (Folts modell).

35 Fig. 38 viser full-lengde DNA sekvens kodende for aminosyresekvensen til barbourin (1-73).

Fig. 39 viser DNA-sekvensen kodende for [M-1L41]barbourin (1-73) ligert til PhoA-leadersekvens.

Fig. 40 viser DNA-sekvensen kodende for analog nr. 1 koblet til en PhoA-sekvens for ekspresjon i bakterier.

Fig. 41 viser oligonukleotider anvendt i en PCR-reaksjon for å oppnå DNA-kodende analog nr. 1. Aminosyrene inkludert i analogen per se er vist i uthevet skrift.

10

Fig. 42 viser grensesekvensen til tandemgjentakelsene av analog nr. 1-kodende DNA.

Fig. 43 viser et diagram av det forkortede barbouringenet som tandemgjentakelser.

15

Fremgangsmåter for å utføre oppfinnelsen

Oppfinnelsen tilveiebringer blodplateaggregasjonsinhibitorer (PAI) som kan bli isolert fra slangevenom som er blitt identifisert som aktiv ved en analysefremgangsmåte og forbindelser som har lignende strukturer og blir fremstilt ved anvendelse av standard in vitro teknikker, såsom fastfasepeptidsyntese eller anvendelse av rekombinante fremgangsmåter, eller kombinasjon av disse. Noen av disse inhibitorene er unikt spesifikke for inhibisjon av blodplateaggregasjon, og inhiberer ikke alternativ binding innenfor integrinfamilien. Andre har forskjellige spesifisitetsområder. Nedenfor beskrives isolering av naturlig forekommende PAI fra slangevenom; konstruksjon av inhibitorer som har vesentlig høyere potenthet når det gjelder inhibering av blodplateaggregasjonen enn inhibering av f.eks. vitronektin/vitronektinreseptorinteraksjonen ved inkorporering av en K*GD-sekvens i forhold til RGD; fremgangsmåte for fremstilling av disse peptidene; fremgangsmåte for rekombinant produksjon; antistoffer dannet mot peptidene fremstilt ifølge opp-

30

35

finnelsen; analysefremgangsmåten som muliggjør identifikasjon av slangevenomer som inneholder PAI; og administrasjon og anvendelse av PAI.

5 Med PAI menes en faktor som kan forhindre aggregasjonen av stimulerte blodplater i standardanalyser, f.eks. de som er beskrevet av Gan, Z.R., et al., og Huang, T.-F., et al., (ovenfor). I disse analysene blir vaskede blodplater kombinert med fibrinogen, Ca^{+2} og materialet som blir testet.
10 Blodplatene blir stimulert med ADP (eller andre kjente stimuleringsmidler eller kombinasjoner derav), og aggregasjon (eller mangel derpå) blir observert ved f.eks. anvendelse av et kommersielt tilgjengelig aggregometer.

15 Noen av PAI fremstilt ifølge oppfinnelsen er identifisert som spesifikke for inhibisjonen av bindingen av fibrinogen og/eller vWF til GP IIb-IIIa. Det fremgår at spesifisiteten er av forskjellig grad, og inhiberer derfor en PAI spesifikk for inhibisjon av Fg eller vWF-binding til GP IIb-IIIa denne
20 bindingen vesentlig mer enn den inhiberer bindingen av Fn til FnR, eller Vn til VnR. Med "vesentlig mer" menes at enten er prosent inhibisjon minst to ganger høyere ved en gitt konsentrasjon av PAI eller at konsentrasjonen av PAI som forårsaker 50% inhibisjon, er minst to ganger mindre for Fg eller vWF/GP
25 IIb-IIIa-bindingsinhibisjonen enn for alternativ ligand/-reseptorbinding.

30 Isolert nativt PAI og rensningsmetoder

Blodplateaggregasjonsinhibitorer (PAI) omfatter peptider med lav molekylvekt som kan bli fremstilt i isolert form, som beskrevet nedenfor, fra slangevenom som er blitt identifisert
35 som "aktivt", dvs. er blitt funnet å inneholde PAI.

Det er mulig med en enkel identifikasjon og karakterisering av tilstedeværelse av en effektiv PAI i slangevenom som selektivt inhiberer bindingen til GP IIb-IIIa i forhold til andre integriner som, f.eks. vitronektinreseptoren og fibronektinreseptoren. Ved en slik identifikasjon og eventuelt og optimalt, karakterisering, kan PAI bli isolert og rensset ved anvendelse av forskjellige standardteknikker illustrert heri og beskrevet innenfor fagområdet. En kombinasjon av separasjon basert på molekylvekt (vanlig isolering av forbindelser på < 10 kd), ionebyttekromatografi og revers fase HPLC kan bli anvendt. Andre teknikker kan også bli anvendt, men en egnet fremgangsmåte anvendbar for PAI fra et hvilket som helst aktivt slangevenom er som følger:

Omtrent 10-1000 mg venom blir løst opp i fortynnet eddiksyre og applisert på en størrelseskolonne, såsom Sephadex G-50, og eluert i det samme oppløsningsmiddelet. Fraksjonene blir analysert for aktivitet ved anvendelse av Fg/GP IIb-IIIa-bindingsanalyse ifølge oppfinnelsen, en standard blodplateaggregasjonsanalyse (PAA) eller en hvilken som helst lignende analyse som er basert på den adhesive proteinbindingsaktiviteten til GP IIb-IIIa. Alternativt kan fraksjonen på < 10 kd ifølge fraksjonen til venomet bli isolert ved anvendelse av ultrafiltrering og analysert på lignende måte.

Lav MW-fraksjon isolert ved hvilken som helst av fremgangsmåtene ble deretter applisert på en preparativ C-18 HPLC-kolonne, såsom en C-18 Delta Pak revers fase HPLC-kolonne, tilgjengelig fra Waters, preekvilibrert i 0,1% trifluoreddiksyre (TFA)/8% acetonitril. Adsorbent PAI ble deretter eluert ved anvendelse av en gradient på 8%-6% acetonitril i 0,1% TFA. Stigningen på gradienten og strømningshastigheten blir optimalisert ved anvendelse av rutinemessige prosedyrer. Aktive fraksjoner blir bestemt ved PAI eller ved reseptorbindingsfremgangsmåte. De aktive fraksjonene ble deretter

slått sammen, konsentrert og testet for homogenitet ved anvendelse av analytisk HPLC eller SDS-PAGE. Ytterligere revers-fase HPLC-gradientrensning blir anvendt helt til isolert PAI er homogen.

5

PAI fremstilt ifølge oppfinnelsen, og følgelig oppnåelig ved foregående eller andre rensingsmetoder innbefatter dem fra venomer valgt fra gruppen bestående av *Echis colorata*, *Eristicophis macmahonii*; *A. hypnale*, *A. acutus*, *A. piscivorous leucostoma*, *A. piscivorus conanti*; *Bothrops asper*;
10 *Bothrops cotiara*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. lansbergi*, *B. medusa*, *B. nasuta*, *B. neuwiedi*, *B. pradoi*, *B. schlegli*;
Crotalus atrox, *C. basilicus*, *C. cerastes cerastes*, *C. durissus durissus*, *C. durissus tononatacus*, *C. horridus*
15 *horridus*, *C. molossus molossus*, *C. ruber ruber*, *C. viridis cereberus*, *Crotalus v. helleri*, *Crotalus v. lutosus*, *Crotalus v. oreganus*, *Crotalus v. viridis*; *Lachesis mutas*; *Sistrurus catenatus tergeminus*, og *Sistrurus milarus barbouri*.

20

Foretrukket er PAI i isolert form fremstilt fra, eller med aminosyresekvensene til, de som er oppnådd fra *Eristicophis macmahonii* (*eristicofin*); *Bothrops cotiara* (*cotiarin*); *B. jararacussu*; *Crotalus atrox* (*crotatroxin*); *Crotalus basilicus* (*basilicin*); *C. cerastes cerastes* (*cerastin*); *C. durissus*
25 *totonatacus* (*durissin*); *Crotalus d. durissus* (*durissin*); *C. h. horridus* (*horridin*); *Crotalus m. molossus* (*molossin*); *C. ruber ruber* (*ruberin*); *Crotalus viridis lutosus* (*lutosin*); *C.v. viridis* (*viridin*); *Crotalus v. oreganus* (*oreganin*); *Crotalus v. helleri*; *Lachesis mutas* (*lachesin*); *Sistrurus*
30 *catenatus tergeminus* (*tergeminin*); og *S. milarus barbouri* (*barbourin*). Spesielt foretrukket er PAI spesifikk for inhibering av Fg eller vWF/GP IIb-IIIa-binding, f.eks. de fra *Sistrurus m. barbouri*.

35

Spesielt foretrukket er *eristicophin*, *cotiarin*, *crotatroksin*, *cerastin*, *durissin*, *horridin*, *ruberin*, *lachesin*, *basilicin*,

lutosin, molossin, oreganin, viridin, tergeminin og barbourin.

5 Renset PAI kan bli sekvensert ved anvendelse av standard prosedyrer og som dermed muliggjør syntese ved anvendelse av standard fastfase-teknikker (spesielt for kortere former av PAI) eller rekombinant produksjon. F.eks. kan en Applied Biosystems Sequenator bli anvendt ifølge karboksyamidometylering eller pyridyletylering av peptidet som beskrevet
10 av Huang et al., J. Biol. Chem (1987) 262:16157-16163 etterfulgt av avsaltning av prøven på en C-18 Delta Pak kolonne ved anvendelse av 0,1% TFA og acetonitril.

15 Isolert PAI med bestemt sekvens kan, når fremstilt in vitro, bli modifisert ved frekvensaltereringer som ikke ødelegger aktiviteten. Generelt vil disse modifiserte formene være forskjellige fra de native formene med 1-10, fortrinnsvis 1-4, aminosyresubstitusjoner eller vil være i forkortede former. I tillegg kan en eller flere peptidbindinger bli erstat
20 stattet med alternative bindinger som beskrevet nedenfor. Spesielt substitusjon ved erstatning av RGD med K*GD for å tilveiebringe GP I Ib-IIIa spesifisitet som beskrevet nedenfor.

25 PAI til *Sistrurus m. barbouri* er blitt renset til homogenitet og sekvensert, og betegnet "barbourin". Til forskjell fra de adhesive proteinene for GP I Ib-IIIa identifisert frem til nå og peptidene fra slangevenomene som blokkerer GP I Ib-IIIa funksjonen, inneholder barbourin ikke standard Arg-Lys-Asp
30 sekvensen til de adhesive proteinene kjent innenfor dette området. Den tilsynelatende bindingssekvensen i barbourin er Lys-Gly-Asp-(Trp). Tilstedeværelse av KGD-sekvensen i den tilsynelatende bindingsregionen til dette peptidet er spesielt overraskende i lys av observasjonen om at erstatning av
35 Lys for Arg i små syntetiske peptider basert på RDGX-sekvensen reduserer evnen som disse peptidene har til å bli bundet til integrinreseptorene (Pierschbacher et al., Proc.

Natl. Acad. Sci (USA) (1984) 81:5985-5988; Williams et al., Thromb Res (1987) 46:457-471); Huang et al., J. Biol. Chem. (1987) 262:16157-16163. Det antas at denne substitusjonen kan delvis være ansvarlig for spesifisiteten til barbourin-peptidet for inhibering av Fg og vWF-binding til GP IIB-IIIa, i motsetning til f.eks. inhibisjon av vitronektinbindingen til vitronektinreseptoren.

10

K*GDX-inneholdende peptider

"Barbourin"-peptidet er blitt vist å ha bindingssekvensen KGDX i forhold til RGDX som finnes i PAI-forbindelsene ifølge tidligere teknikk. Tilstedeværelse av KGDX i denne PAI-sekvensen ser ut til å være assosiert med en preferensiell affinitet for GP IIB-IIIa i forhold til vitronektin eller fibronektinreseptorene. Virkningen av substitusjonen av et lysylresidie for et arginin i frekvensen ser ut til å være knyttet til den økte lengden av sidekjeden sammen med opprettholdt basisitet til nitrogenet som ytterligere beskrevet nedenfor. Det ser ut som om det ikke er lysylresidiet per se som står for den økte aktiviteten og spesifisiteten, men heller området som blir tilveiebragt ved denne homologe ekstensjonen av erstattet arginin. Peptidene som inneholder K*GDX i bindingssekvensen, er vesentlig mer potente til å inhibere bindingen av Fg eller vWF til GP IIB-IIIa sammenlignet med deres evne til å inhibere bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren og binding av fibronektin til fibronektinreseptoren. Som angitt ovenfor menes "vesentlig mer" potent til inhibering av den foretrukne bindingen at prosent inhibisjon er minst to ganger større ved en gitt konsentrasjon av inhibitor eller at konsentrasjonen av PAI som forårsaker 50% inhibisjon, er minst 2-3 ganger mindre for binding av Fg eller vWF til GP IIB-IIIa enn for binding av andre ligander til andre integriner.

"Alkyl" blir hensiktsmessig definert som en lineær eller forgrenet kjede eller cyklisk heterokarbylrest med angitte antall karbonatomer såsom metyl, etyl, isopropyl, N-heksyl, 2-metylbutyl, cykloheksyl, o.l.

Benzyl- og fenylresidier representert ved R² kan være usubstituerte, eller være substituert med ikke-interfererende substituenten. Foretrukne substitusjonsmønstre er de hvori bare en substituent er bundet til den aromatiske kjernen, fortrinnsvis i 4-posisjonen. Foretrukne substituenten er elektrondonerende substituenten såsom alkyl, spesielt etyl eller metyl, eller fenyl.

Eksempler på fragmenter og/eller modifiserte former av naturlig forekommende slangevenom PAI omfatter [E²⁸,L⁴¹,C⁶⁴]barbourin (28-73) med sekvensen:

	1	46
20	ECADGLCCDQCRFLKKGTVCRVAKGDWDDTCTGQSCDCPRNGLYG	
	28	73

og [K²⁹]eristicophin (4-51) av sekvensen.

25	4	51
	EPCATGPCCRRCKFKRAGKVCRVAKGDWNNDYCTGKSCDCPRNPWNG	.
	4	51

I denne beskrivelsen er størrelsen på fragmentet angitt i parenteser etter navnet med tallene på aminosyrene som var innbefattet i fragmentet, og forstavellesbokstavene i parenteser og tallene angir aminosyresubstitusjoner ved de nummererte posisjonene i det native full-lengdepeptidet. For barbourinfragmentet ovenfor dekker lengden av fragmentet residene 28-73 inklusivt den native sekvensen og aminosyrene

som er opprinnelig i posisjonene 28, 41 og 64 til den nummererte native sekvensen som er blitt erstattet med Glu (E), Leu (L) og Cys (C).

5 Som ytterligere eksempler kan argininet til RGD-sekvensen som fremkommer i trigramin, elegantin, albolabrin, crotatroksin, flavoviridin, echistatin, bitistatin, viridin, molossin, lutosin, basilicin, applagin, halysin, horridin, tergeminin, lachesin, cotiarin, cereberin, jararacin, kistrin, eristico-
10 fin, bitan-a og ruberin/oreganin kan bli erstattet med et K'-residie for å tilveiebringe spesifikt aktive PAI med en foretrukket affinitet for GP IIb-IIIa. I tillegg kan forkortede former av disse peptidene, inneholdende minst 20, fortrinnsvis minst 30, og mer foretrukket minst 40 amino-
15 syrer, bli fremstilt fra det native peptidet eller i denne modifiserte formen. I tillegg, eller i alternativet, kan 1-10, fortrinnsvis 1-4 aminosyrer irrelevante for RGD/K*GD-sekvensen bli substituert eller modifisert, fortrinnsvis med konservativ aminosyresubstitusjoner. Med konservative amino-
20 syresubstitusjoner menes f.eks. substitusjon av et surt aminosyreresidie med et surt aminosyreresidie, nøytral for nøytral, basisk for basisk, osv. som ytterligere beskrevet nedenfor.

25

Y_1 og Y_2 kan være peptidekstensjoner på 0-25 aminosyre-residier og kan være i derivatisert form. Y_1 N-terminal-ekstensjonen kan f.eks. bli acetylert eller på annen måte acylert; Y_2 C-terminalekstensjonen kan bli amidert med NH_2
30 eller med et primært eller sekundært amin med formel $R-NH_2$ eller R_2NH hvori hver R er uavhengig en lavere alkyl med 1-4C såsom metyl, n-butyl eller t-butyl. Y_1 kan også være (H) eller acyl; Y kan være (OH), NH_2 eller et amin som ovenfor. Der forbindelsen med formel (1) er et enkelt cyklisk peptid,
35 er Y_1 og Y_2 fraværende.

X_1 og X_2 er vanligvis aminosyreresidier som har evne til
 cyclisering såsom f.eks. og mest foretrukket cysteinresidier
 som kan danne en disulfidring. Andre residier som kan danne
 disulfid eller andre bindinger, kan også bli anvendt - f.eks.
 5 Pen (penicillamin) -residiet beskrevet av Pierschbacher et
 al. (supra) eller Mpr (merkarptopropionyl) eller Mvl
 (merkaptovaleryl) -residiet. Andre typer for kovalente
 bindinger for cyclisering som kan bli tatt i betraktning,
 omfatter peptidbindinger som f.eks. et amid dannet mellom
 10 side-kjedeaminogruppen til et lysylresidie med en side-
 kjedekarboksylgruppe til et glutamylresidie og esterbindin-
 ger, som vil bli dannet mellom en side-kjedealkohol til et
 treoninresidie med en side-kjedekarboksyl til et aspartyl-
 residie. Et hvilket som helst kompatibelt residie som har
 15 evne til å danne peptidbindinger med det gjenværende av kje-
 den (eller modifiserte peptidbindinger som beskrevet ovenfor)
 og med evne til dannelsen av kovalent binding for å oppnå
 cyclisering, kan bli anvendt. Dette innbefatter f.eks.
 enkle cycliske peptider, hvori en peptidbinding er direkte
 20 dannet mellom NH_2 og N-terminusen og $COOH$ ved C-terminusen.

Som beskrevet ovenfor kan en eller flere av de indikerte
 peptidbindingene bli erstattet av en erstatningsbinding såsom
 $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, CH_2CH_2- , $-CH=CH-$ (cis og trans), $-COCH_2-$,
 25 $-CH(OH)CH_2-$ og $-CH_2SO-$.

I betegnelsen på aminosyreresidierne AA_1-AA_4 ovenfor har be-
 skrivelsen blitt dannet på grunnlag av en spesifiserings-
 metode hvori aminosyreresidierne generelt kan bli subklassifi-
 30 sert i fire hoved-subklasser. Denne klassifiseringen er også
 vist i diagramform nedenfor.

Surt: Residiet har en negativ ladning p.g.a. tap av H-ion
 ved fysiologisk pH, og residiet er tiltrukket ved vandig opp-
 35 løsning for å søke overflateposisjoner i konformasjonen til
 et peptid hvor det er innbefattet når peptidet er i vandig
 medium ved en fysiologisk pH.

Basisk: Residiet har en positiv ladning p.g.a. assosiasjonen med H-ionet ved en fysiologisk pH, og residiet er tiltrukket av vandig oppløsning for å søke overflateposisjoner i konformasjonen til et peptid hvor det er innbefattet når peptidet er i vandig medium ved en fysiologisk pH.

Nøytral/upolar: Residiene er ikke ladede ved fysiologisk pH, og residiet blir frastøtt ved vandig oppløsning for å søke de indre posisjonene i konformasjonen til peptidet hvori det er innbefattet når peptidet er i vandig medium. Disse residiene blir også betegnet "hydrofob" heri.

Nøytrale/polare: Residiene er ikke ladet ved en fysiologisk pH, men residiet er tiltrukket av vandig oppløsning for å søke de ytre posisjonene i konformasjonen til et peptid som det er innbefattet i når peptidet er i vandig medium.

Det er en selvfølge at det er en statistisk samling av individuelle residiemolekyler der noen molekyler er ladede og noen ikke, og det vil være en tiltrekning for eller frastøting fra et vandig medium i en større eller mindre grad. For å oppfylle definisjonen av "ladet" blir en signifikant prosentandel (minst omtrent 25%) av de individuelle molekylene ladet ved en fysiologisk pH. Tiltrekningsgraden eller frastøtningen som er nødvendig for klassifikasjon som polar eller upolar, er vilkårlig, og aminosyrer som spesifikt er betraktet i oppfinnelsen, er blitt spesifikt klassifisert som den ene eller den andre. De fleste aminosyrene som ikke er spesifikt navngitte, kan bli klassifisert på grunnlag av kjent adferd.

Aminosyreresidier kan videre bli underklassifisert som cycliske eller ikke-cykliske og aromatiske eller ikke-aromatiske, selvforklarende klassifikasjoner med hensyn på sidekjedesubstituentgruppene til residiene, og som små eller store. Residiet blir betraktet som lite dersom det inne-

holder totalt 4 karbonatomer eller mindre, inklusivt karboksylkarbonet. Små residier er selvfølgelig alltid ikke-aromatiske.

5 For de naturlig forekommende proteinaminosyrene er underklassifikasjonen ifølge foregående skjema som følger (se også diagrammet nedenfor).

Surt: Aspartinsyre og glutaminsyre;

10

basisk/ikke-cyklisk: arginin, lysin;

basisk/cyklisk: histidin;

15

nøytralt/polart/lite: glycin, serin og cystein;

nøytralt/polart/stort/ikke-aromatisk: treonin, asparagin, glutamin;

20

nøytralt/polart/stort/aromatisk: tyrosin;

nøytralt/upolart/lite: alanin;

25

nøytralt/upolart/stort/ikke-aromatisk: valin, isoleucin, leucin, metionin;

nøytralt/upolart/stort/aromatisk; fenylalanin og tryptofan.

30

Den gen-kodede aminosyren prolin som teknisk tilhører gruppen nøytral/upolar/stort/cyklisk og ikke-aromatisk, er et spesielt tilfelle p.g.a. dets kjente virkninger på den sekundære konformasjonen til peptidkjedene, og er derfor ikke innbefattet i denne definerte gruppen, men er klassifisert separat. AA₃ er betegnet som et prolinresidie eller et "modifisert prolinresidie". Prolin er som kjent en femleddet nitrogenheterocykel med en karboksylgruppe i 2-

35

posisjonen. Modifiserte prolinresidier er alle nitrogen-fem- eller seks-leddede heterocykler med karboksylgrupper i posisjon alfa til nitrogen; ytterligere heterocykliske atomer kan også bli innbefattet i ringen. Modifiserte prolinresidier innbefatter residier av pipekolinsyre (2-karboksyperidin, forkortet Pip) og tiazolidin (Thz). Prolin eller modifiserte prolinresidier har følgende formelen:



hvor en eller to av metylengruppene kan bli erstattet med NR, S eller O, og hvor et hvilket som helst ringnitrogen eventuelt kan bli substituert med en ikke-interfererende substituent såsom alkyl.

Disse vanlige oppstående aminosyrer som ikke blir kodet av den genetiske koden, omfatter f.eks. beta-alanin (beta-Ala), eller andre omega-aminosyrer, såsom 3-aminopropion-, 4-aminosmørsyrer, osv., alfa-aminoisosmørsyre (Aib), sarkosin (Sar), Ornitin (Orn), citrullin (Cit), homoarginin (Har), t-butylalanin (t-BuA), t-butylglycin (t-BuG), N-metylisoleucin (N-Melle), fenylglycin (Phg), og cykloheksylalanin (Cha), norleucin (Nle), cysteinsyre (Cya); pipekolinsyre (Pip), tiazolidin (Thz), 2-naftylalanin (2-Nal) og metioninsulfoksyd (MSO). Disse faller også hensiktsmessig inn i bestemte kategorier.

Basert på ovennevnte definisjon er Sar og beta-ala nøytral/upolar/lite;

t-BuA, t-BuG, N-Melle, Nle og Cha er nøytral/upolar/stor/ikke-aromatisk;

Har og Orn er basisk/ikke-cyklisk;

Cya er sur;

Cit, acetyl-Lys og MSO er nøytral/polar/stor/ikke-aromatisk;

5 2-Nal og Phg er nøytral/upolar/stor/aromatisk; og

Pip og Thz er modifiserte prolinresidier;

Det ovennevnte kan bli vist diagrammatisk som følger:

10

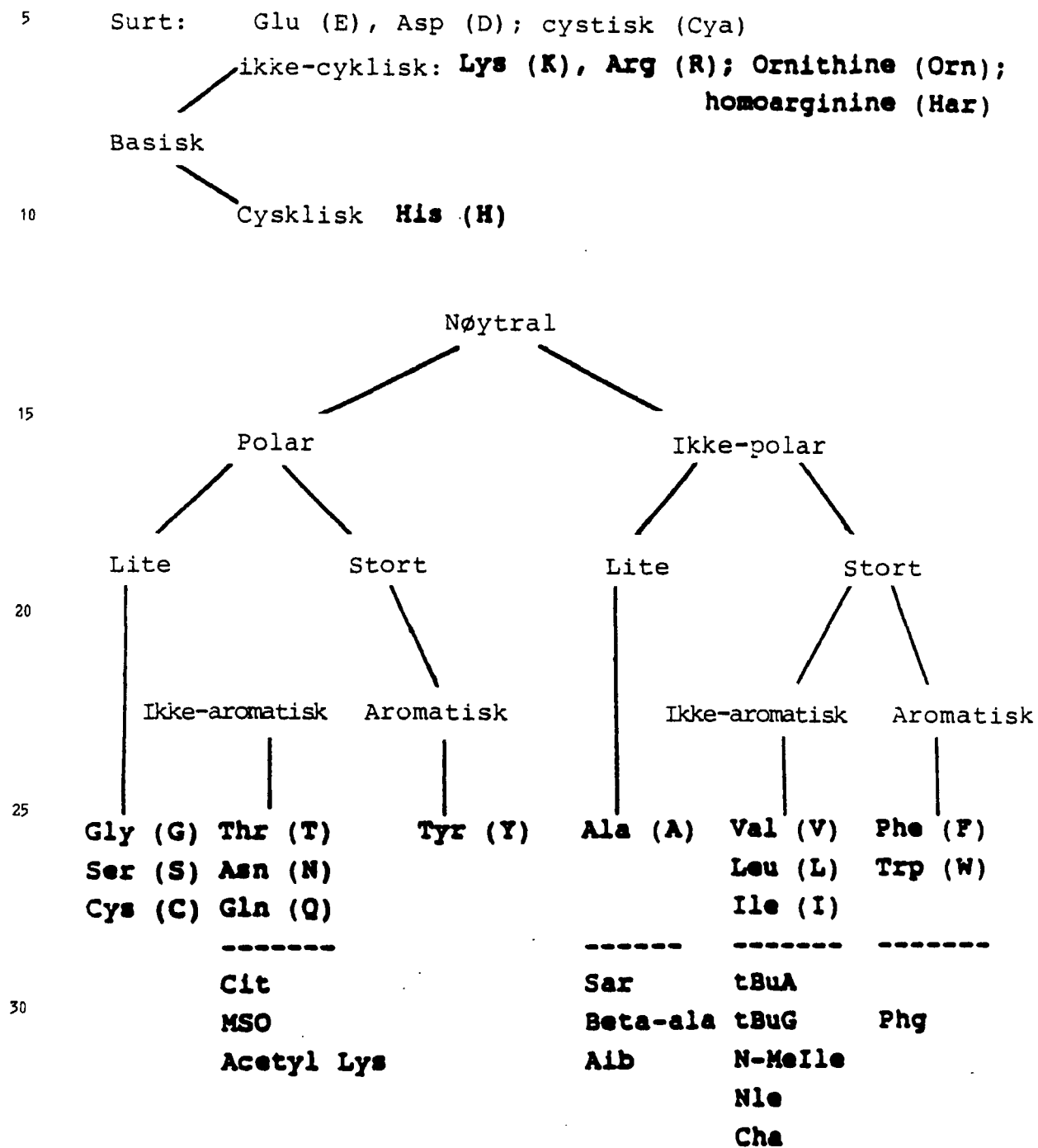
15

20

25

30

35



Aminosyreklassifikasjonsskjema

De forskjellige omega-aminosyrene er klassifisert ifølge størrelse som nøytral/upolar/lite (beta-ala, dvs., 3-aminopropinisk, 4-aminobutyrisk) eller stort (alle andre).

Andre aminosyresubstitusjoner for dem som er kodet i genet kan også bli innbefattet i peptidforbindelsene innenfor rammen av oppfinnelsen og kan bli klassifisert innenfor denne generelle sakjemaet.

I formlene som representerer valgte spesifikke utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse, vil amino- og karboksyterminale grupper, til tross for at disse ofte ikke er spesifikt vist, være i den formen som de vil være i ved fysiologiske pH-verdier, dersom ikke annet er angitt. Dermed er N-terminal H^+ og C-terminal O^- ved fysiologisk pH til stede til tross for at dette ikke nødvendigvis er spesifisert eller vist, enten i spesifikke eksempler eller i generiske formler. De basiske og sure addisjonssaltene inkludert dem som blir dannet ved ikke-fysiologiske pH-verdier, er også innbefattet i forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Dersom ikke annet er angitt, er residene i L-form, og i de generiske formlene kan de spesifiserte residene være enten L- eller D-. Peptidene ifølge oppfinnelsen har generelt 0, 1 eller 2 D-residier, fortrinnsvis 0 eller 1, mest foretrukket er 0. I de viste peptidene er hver kodet residie hvor dette er hensiktsmessig, representert ved en enkelt bokstavbetegnelse som tilsvarer trivialnavnet til aminosyren i henhold til følgende konvensjonelle liste:

<u>Aminosyre</u>	<u>1-bokstav symbol</u>
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Asparaginsyre	D

	Cystein	C
	Glutamin	Q
	Glutaminsyre	E
	Glycin	G
5	Histidin	H
	Isoleucin	I
	Leucin	L
	Lysin	K
	Metionin	M
10	Fenylalanin	F
	Prolin	P
	Serin	S
	Treonin	T
	Tryptofan	W
15	Tyrosin	Y
	Valin	V
	Pyroglutaminsyre	Z

20

Aminosyrene som ikke blir kodet genetisk, er forkortet som angitt ovenfor.

25

I de spesifikke peptidene vist heri er L-formen til et hvilket som helst aminosyreresidie som har en optisk isomer, til hensikt dersom ikke annet er indikert med en anmerkning (\dagger). P.g.a. residiene i peptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen er normalt i den naturlige L-optiske isomerformen, kan en eller to, fortrinnsvis en, aminosyre bli erstattet med optisk isomer D-form.

30

Frie funksjonelle grupper, inkludert dem ved karboksy- eller amino-terminusen, kan også bli modifisert ved amidering, acylering eller annen substitusjon, som f.eks. kan forandre oppløseligheten til forbindelsene uten å påvirke deres aktivitet.

35

Ved dannelse av amiderte peptider kan de analoge forbindelsene bli fremstilt direkte f.eks. ved anvendelse av Boc-AA_x-pMBHA-harpiksen eller Boc-AA_x-BHA-harpiksen, hvori AA_x er den valgte karboksy-terminale aminosyren til det 5
ønskede peptidet som beskrevet nedenfor. Alternativt kan peptidene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse bli kjemisk eller enzymatisk amidert etter peptidfremstillingen ved anvendelse av fremgangsmåter som er velkjente innenfor fagområdet, eller fremstilt ved standard oppløsnings-
10 fasepeptidsynteseprotokoller.

Visse utførelsesformer av novo-peptidene er foretrukne. I K*(G/Sar)D-sekvensen, er G/Sar fortrinnsvis G. AA₁ og AA₄ er fortrinnsvis Gly, Ala eller Ser; n₁ er fortrinnsvis 0-2, n₄ 15
er fortrinnsvis 1-2. Foretrukket for AA₂ er nøytrale/-upolare/aromatiske aminosyrer, spesielt tryptofan og fenylalanin, spesielt tryptofan, n₂ er fortrinnsvis 1. X₁ og X₂ er fortrinnsvis Cys, Mps eller Pen (penicillamin)-residier. Y₁ er fortrinnsvis H, acetyl eller Gly; Y₂ er 20
fortrinnsvis -NH₂ eller -A-NH₂. Også generelt foretrukket er C-terminale amiderte former av Y₂.

PAI-analogene kan omfatte peptider med følgende formler. Til tross for at alle disse har evne til å utvise cyklisk 25
form gjennom dannelse av disulfidbindinger, er disse bindingene ikke vist spesifikt, og andre cykliske former er betegnet med "cyklo".

Foretrukne peptider

30 PAI 1: E-C-A-D-G-L-C-C-D-Q-C-R-F-L-K-K-G-T-V-
C-R-V-A-K-G-D-W-N-D-D-T-C-T-G-Q-S-C-D-C-P-R-N-G-L-Y-G

PAI 2: E-E-P-C-A-T-G-P-C-C-R-R-C-K-F-K-R-A-G-
K-V-C-R-V-A-K-G-D-W-N-N-D-Y-C-T-G-K-S-C-D-C-P-R-N-P-W-N-G

35 PAI 3: G-C-G-K-G-D-W-P-C-A-NH₂;

PAI 4: G-C-K-G-D-W-P-C-A-NH₂

PAI 5: C-G-K-G-D-W-P-C-NH₂

PAI 7: C-K-G-D-W-C-A-NH₂;

	PAI 10:	C-K-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 12:	C-K-G-D-Y-P-C-NH ₂
5	PAI 13:	C-K-G-D-F-P-C-NH ₂
	PAI 14:	C-K-G-D-L-P-C-NH ₂
	PAI 15:	C-K-G-D-V-P-C-NH ₂
	PAI 16:	C-K-G-D-Y(OMe)-P-C-NH ₂
10	PAI 17:	C-K-G-D-(2-Nal)-P-C-NH ₂
	PAI 18:	C-K-G-D-(Cha)-P-C-NH ₂
	PAI 19:	Mpr-K-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 20:	Mpr-K-G-D-Y-P-C-NH ₂
15	PAI 21:	Mpr-K-G-D-F-P-C-NH ₂
	PAI 22:	Mpr-K-G-D-L-P-C-NH ₂
	PAI 23:	Mpr-K-G-D-V-P-C-NH ₂
	PAI 24:	Mpr-K-G-D-Y(OMe)-P-C-NH ₂
20	PAI 25:	Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-C-NH ₂
	PAI 26:	Mpr-K-G-D-(Cha)-P-C-NH ₂
	PAI 27:	cyclo(G-K-G-D-W-P)
	PAI 28:	cyclo(A-K-G-D-W-P)
25	PAI 29:	cyclo(D-Ala-K-G-D-W-P)
	PAI 30:	cyclo(F-K-G-D-W-P)
	PAI 31:	cyclo(beta-Ala-K-G-D-W-P)
	PAI 32:	cyclo(gamma-Abu-K-G-D-W-P)
30	PAI 33:	cyclo(R-K-G-D-W-P)
	PAI 34:	C-K-G-D-W-G-C-NH ₂
	PAI 39:	C-K-G-D-W-(Sar)-C-NH ₂
	PAI 41:	C-K-G-D-I-P-C-NH ₂

	PAI 42:	C-K-G-D-(4-Cl-Phe)-P-NH ₂
	PAI 43:	C-K-(Sar)-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 44:	C-K-G-D-(4-NO ₂ -Phe)-P-C-NH ₂
5	PAI 47:	Acetyl-C-K-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 48:	Mpr-K-G-D-W(Formyl)-P-C-NH ₂
	PAI 49:	Mvl-K-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 51:	Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH ₂
10	PAI 52:	Mpr-K-G-D-W-P-Pen [†] -NH ₂
	PAI 54:	Mpr-K-G-D [†] -W-P-Pen-NH ₂
	PAI 55:	Mpr-K-G-D-W-(Thz)-C-NH ₂
	PAI 57:	Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-Pen-NH ₂
15	PAI 58:	Mvl-K-G-D-W-P-Pen-NH ₂
	PAI 59:	Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH ₂
	PAI 60:	Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 61:	Mpr-K-G-D-W-P-C [†] -NH ₂
20	PAI 62:	Mpr-K [†] -G-D-W-P-Pen-NH ₂
	PAI 63:	Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH ₂
	PAI 64:	Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 65:	Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH ₂
25	PAI 66:	Mpr-(N ^G , N ^{G'} -ethylene-Har)-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 67:	Mpr-(N ^G , N ^{G'} -ethylene-Har)-G-D-W-P-Pen-NH
	PAI 68:	Mpr-Har-Sar-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 69:	Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH ₂
30	PAI 70:	Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH ₂
	PAI 71:	Mpr-Har-Sar-D-W-P-PenNH ₂
	PAI 72:	Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-PenNH ₂

PAI 73: Mpr-Har-G-D-W-(3,4-dehydro-Pro)-C-NH₂

PAI 75: Mpr-(fenylimidyl)-Lys)-G-D-Pen-NH₂

5

Spesielt foretrukket er peptidene med formlene:

PAI 3: G-C-G-K-G-D-W-P-C-A-NH₂;

10 PAI 4: G-C-K-G-D-W-P-C-A-NH₂;

PAI 5: C-G-K-G-D-W-P-C-NH₂;

PAI 10: C-K-G-D-W-P-C-NH₂

PAI 12: C-K-G-D-Y-P-C-NH₂

15 PAI 13: C-K-G-D-F-P-C-NH₂

PAI 19: Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂

PAI 25: Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-C-NH₂

PAI 39: C-K-G-D-W-(Sar)-C-NH₂

20 PAI 42: C-K-G-D-(4-Cl-Phe)-P-NH₂

PAI 43: C-K-(Sar)-D-W-P-C-NH₂

PAI 44: C-K-G-D-(4-NO₂-Phe)-P-C-NH₂

25 PAI 47: Acetyl-C-K-G-D-W-P-C-NH₂

PAI 48: Mpr-K-G-D-W(Formyl)-P-C-NH₂

PAI 49: Mvl-K-G-D-W-P-C-NH₂

PAI 51: Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH₂

30 PAI 52: Mpr-K-G-D-W-P-(D-Pen)-NH₂

PAI 55: Mpr-K-G-D-W-(Thz)-C-NH₂

PAI 57: Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-Pen-NH₂

PAI 58: Mvl-K-G-D-W-P-Pen-NH₂

35

- PAI 59: Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH₂
- 5 PAI 60: Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH₂
- PAI 61: Mpr-K-G-D-W-P-C[†]-NH₂
- PAI 62: Mpr-K[†]-G-D-W-P-Pen-NH₂
- PAI 63: Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂
- 10 PAI 64: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
- PAI 65: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
- PAI 66: Mpr (N^G,N^{G'}-ethylene-Har)-G-D-W-P-C-NH₂
- PAI 67: Mpr (N^G,N^{G'}-ethylene-Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂
- 15 PAI 68: Mpr-Har-Sar-D-W-P-C-NH₂
- PAI 69: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
- PAI 70: Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
- PAI 71: Mpr-Har-Sar-D-W-P-PenNH₂
- 20 PAI 72: Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-PenNH₂
- PAI 73: Mpr-Har-G-D-W-(3,4-dehydro-Pro)-C-NH₂

25

Kjemisk fremstilling av peptidene

Forbindelsene kan bli fremstilt kjemisk ved hjelp av
 30 velkjente fremgangsmåter såsom f.eks. fast-fasepeptidsyntese.
 Fremstilling forløper fra den karboksy-terminale enden av
 peptidet ved anvendelse av en alfa-aminobeskyttet aminosyre.
 t-butylkoksylkarbonyl (Boc)-beskyttende grupper kan bli
 anvendt for alle aminogruppene til tross for at andre
 35 beskyttende grupper såsom fluorenylmetyloksylkarbonyl (Fmoc)
 er egnede. F.eks. kan Boc-Gly-OH, Boc-Ala-OH, Boc-His (Tos)-
 OH, (dvs. valgte karboksy-terminale aminosyrer) bli forestret

til klormetylerede polystyrenharpiksbærere, p-metylbenz-
hydrylamin (PMBHA) eller PAM-harpikser. Polystyrenharpiks-
bæreren er fortrinnsvis en kopolymer av styren med omtrent
0,5 til 2% divinylbenzen som et kryss-bindende middel som
5 forårsaker at polystyrenpolymeren blir fullstendig uopp-
løselig i visse organiske oppløsningsmidler, se Stewart et
al., Solid-Phase Peptide Synthesis (1969), W. H. Freeman Co.,
San Francisco og Merrifield, J. Am. Soc. (1963) 85:2149-2154.
Disse og andre fremgangsmåter for fremstilling av peptidet er
10 også eksemplifisert ved US patentene 3.862.925; 3.842.067;
3.972.859; og 4.105.602.

Fremstillingen kan anvende manuelle synteseteknikker eller
bli anvendt automatisk, f.eks. en Applied BioSystems 430A
15 eller 431A Peptide Synthesizer (Foster City, California)
ifølge instruksjonene tilveiebragt i instruksjonsmanualen som
ble tilført av fremstilleren. Spaltning av peptidene fra
harpiksen kan bli utført ved anvendelse av "lav-høy" HF av-
spaltningsprotokollene som beskrevet i Lu, G.-S. et al.,
20 Int. J. Peptide & Protein Res (1987) 29:545-557. Refolding
av analogene til slangevenom PAI kan bli utført ved an-
vendelse av fremgangsmåtene beskrevet i Garsky, V. et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:4022-4026 som beskriver
fast-fasefremstilling av echistatin.

25 De cycliske peptidene som ikke har disulfidbindinger, kan
hensiktsmessig bli fremstilt ved en kombinasjon av fast-
fasesyntese og dannelse av cyclisk ringstruktur i oppløsning
ved anvendelse av de generelle fremgangsmåtene som beskrevet
30 i US patent 4.612.366 til Nutt. Lineære peptider fremstilt
på standard Merrifield harpiks, kan dermed bli spaltet fra
harpiksen med hydrazin, etterfulgt av cyclisering av det
tilsvarende acidet for å danne cycliske peptider.

35 Det er innlysende for fagfolk innenfor dette området at
mellomproduktet som blir konstruert i henhold til fore-
liggende beskrivelse i løpet av fremstillingen av fore-

liggende analoge forbindelser er i seg selv nye, og nyttige forbindelser og hører dermed inn under rammen av oppfinnelsen.

5

Rekombinant produksjon

Alternativt kan valgte forbindelser bli fremstilt ved ekspresjon av rekombinante DNA-konstruksjoner fremstilt i henhold til velkjente fremgangsmåter. Slik produksjon kan være ønskelig for å tilveiebringe store mengder eller alternative utførelsesformer av slike forbindelser. P.g.a. at peptidsekvensene er relativt korte blir den rekombinante produksjonen enklere, men produksjonen ved de rekombinante metoder er spesielt foretrukket i forhold til standard fast-fasepeptidsyntese for peptider på minst åtte aminosyre-residier.

DNA som koder for sekvensert PAI, blir fortrinnsvis fremstilt ved anvendelse av kommersielt tilgjengelige nukleinsyresyntesemetoder. Metoder for å konstruere ekspresjonssystemet for fremstilling av PAI i rekombinante verter, er også generelt kjent innenfor fagområdet.

25

Ekspresjon kan bli oppnådd i enten prokaryote eller eukaryote verter. Prokaryote er som oftest representert ved forskjellige E. coli-stammer. Andre mikrobielle stammer kan også bli anvendt, såsom bacilli, f.eks. Bacillus subtilis, forskjellige Pseudomonas-arter eller andre bakterielle stammer. I slike prokaryote systemer blir plasmidvektorer som inneholder replikasjonsseter og kontrollsekvenser avledet fra en art kompatibel med verten anvendt. F.eks. en arbeidende vektor for E. coli er pBR322 og derivatene derav. Vanlig anvendte prokaryote kontrollsekvenser som inneholder promotere for transkripsjonsinitiering, eventuelt med en operator, sammen med ribosombindings-setesekvenser, inn-

35

befatter slike vanlig anvendte promotere som beta-laktamase (penicillinase) og laktose (lac)-promotersystemer, tryptofan (trp)-promotersystemer og lambda-avledet P_L-promoter og N-gen ribosombindingssete. Derimot kan et hvilket som helst
5 promotersystem kompatibelt med prokaryoter bli anvendt.

Ekspresjonssystemene som var nyttige i eukaryote verter, omfatter promotere avledet fra hensiktsmessige eukaryote gener. En klasse promotere som er nyttige i gjær, f.eks., omfatter
10 promotere for fremstilling av glykolyttiske enzymer, .eks. de for 3-fosfoglyceratkinase. Andre gjærpromotere omfatter dem for anolasegenet eller Leu2-genet oppnådd fra YEp13.

Egnede pattedyrpromotere omfatter tidlige og sene promotere
15 fra SV40 eller andre virale promotere såsom de som var avledet fra polyomaadenovirus II, bovint papillomavirus eller apesarkomaviruser. Egnede virale og pattedyrenhancere er angitt ovenfor. Dersom planteceller blir anvendt som et ekspresjonssystem, er nopalinsyntesepromoterer f.eks.,
20 hensiktsmessig.

Ekspresjonssystemene blir konstruert ved anvendelse av velkjente restriksjons- og ligeringsknikker og transformert inn i hensiktsmessige verter.
25

Transformasjonen blir utført ved anvendelse av standard teknikker som er hensiktsmessige for slike celler. Cellene som inneholder ekspresjonssystemene, bblir dyrket under betingelser som er hensiktsmessig for produksjon av PAI, og PAI blir
30 deretter omdannet og rensset.

Antistoffer

35 Tilgjengeligheten av rensset PAI fremstilt ifølge oppfinnelsen muliggjør også fremstilling av antistoffene spesifikt immunoreaktive med disse formene av det aktive peptidet.

Sammensetninger inneholdende rensed PAI isolert fra slangevenom eller fremstilt på annen måte, kan bli anvendt for å stimulere produksjonen av antistoffer som immunoreagerer med PAI-peptidet. Standardimmunoseringsprotokoller som involverer administrering av PAI til forskjellige vertebrater, såsom kaniner, rotter, mus, sauer og kyllinger, resulterer i antisera som er immunoreaktive med det rensede peptidet. PAI kan bli hensiktsmessig konjugert til en egnet antigenisk nøytralbærer, såsom et hensiktsmessig serumalbumin eller keyhole limpet hemocyanin, for å forsterke immunogenisiteten. I tillegg kan det frie peptidet bli injisert med metylert BSA som et alternativ til konjugasjon. Videre kan antistoffutskillende celler til det immuniserte pattedyret bli udødeliggjort for å fremstille monoklonale antistoffpaneler som dretter kan bli screenet for reaktivitet med PAI.

De resulterende polyklonale eller monoklonale antistoffpreparatene er nyttige i analyser for nivåer av korresponderende PAI i biologiske prøver ved anvendelse av standard immunoanalyseprosedyrer.

25 Analyse

Identifikasjon av slangevenomutgangsmaterialet som inneholder aktivt PAI, og der PAI har kjent spesifisitet er mulig ved analysen. Analysen bygger på den observasjonen at forbindelser som blokkerer bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa in vitro også kan inhibere trombin eller ADP-indusert aggregasjon av humane blodplater og dannelsen av blodplate-tromber in vivo. Denne observasjonen danner grunnlaget for oppnåelse av potent PAI ved vurdering av evnen som testmaterialene har, til å ødelegge fibrinogen-GP IIb-IIIa-interaksjoner.

I analysen blir GP I Ib-IIIa fremstilt i rensert form f.eks. som beskrevet av Fitzgerald. L.A. et al., Anal. Biochem. (1985) 151:169-177, inkorporert heri ved referanse, som bli belat på en fast bærer såsom kuler, reagensrør eller mikro-
5 titerplater. Den belagte bæreren blir deretter kontaktet med fibrinogen og med forsøksmateriale og inkubert i tilstrekkelig tid for å muliggjøre maksimal binding av fibrinogen til immobilisert GP I Ib-IIIa. Fibrinogen ble vanligvis tilveiebragt ved en konsentrasjon på omtrent 5-50 nm, og
10 forsøksmaterialet kan om ønskelig bli tilsatt en serie fortynnings-
Vanlige inkubasjoner er 2-4 timer ved 35°C, der tiden og temperaturen er avhengig av hverandre.

Etter inkubasjonen blir oppløsningen inneholdende fibrinogen og forsøksmaterialet fjernet, og nivået av binding av fibrinogen blir målt ved kvantifisering av bundet fibrinogen til GP I Ib-IIIa. Hvilken som helst egnet måte for deteksjon kan bli anvendt, men det er hensiktsmessig å anvende merket fibrinogen, f.eks. ved anvendelse av radioaktive, fluorescerende eller biotinylerte markører. Slike fremgangsmåter
20 er velkjente og trenger ikke å bli beskrevet heri.

Vurdering av resultatene blir gjort lettere ved anvendelse av en kontrollprøve, vanligvis identisk med forsøksprøven med unntagelse av at forsøksprøven er fraværende. I dette tilfelle kan prosent inhibisjon bli beregnet ved anvendelse av mengden Fg bundet i kontrollen som grunnlag slik at

$$\% \text{ inhibisjon} = \frac{\text{kontroll-test}}{\text{kontroll}} \times 100$$

30

Andre mål på inhibisjonseffektivitet, som IC₅₀, kan også bli anvendt.
35

Analysesystemene omfatter videre karakterisering av PAI-spesifisiteten ved bindingsinhibisjonsanalyser identiske med

dem ovenfor, men substituering av andre adhesive proteiner for Fg og andre reseptorer for Fg I Ib-IIIa. Inhibisjon av bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren; fibronektin til fibronektinreseptoren; fibronektin til GP I Ib-IIIa og fibrinogen og/eller vWF til GP I Ib-IIIa kan spesielt bli vurdert. Adhesivproteinet og reseptorene for disse analysene er tilgjengelige innenfor fagområdet.

10

Andre analyser

I tillegg til plateanalysene er andre analyser for blodplateaggregasjonsinhibisjonsaktivitet og beslektede aktiviteter også tilgjengelige, som angitt ovenfor. En liste av vanlige anvendte analyser er som følger:

15

1. Plateanalyser som anvender spesifikke reseptorer beskrevet i tidligere paragrafer;
2. standardanalyser direkte anvendt på blodplateaggregasjon, såsom de som er beskrevet av Gann, Z.R., et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:19827-19832; Huang, T.F. et al., J. Biol Chem (1987) 262:16157-16163; Biochemistry (1989) 28:661-666, sitert ovenfor og inkorporert heri;
3. en in vivo-trombosemodell i hunder som beskrevet nedenfor i eksempel 1 og av Folts, J. D. et al., Circulation (1976) 54:365; og
4. effekt på celleadhesjonen ved anvendelse av S35 metionin-merkede celler som beskrevet nedenfor i eksempel 19.

20

25

30

35

Administrasjon og anvendelse

PAI fremstilt ifølge oppfinnelsen er nyttig terapeutisk for å forhindre trombedannelsen. Indikasjoner hensiktsmessige for slik behandling omfatter, uten begrensning, aterosklerose og arteriosklerose, akutt myokardial infarkt, kronisk ustabil angina, transient iskemiske angrep og slag, perifer vaskulær sykdom, arteriell trombose, preeclampsi, emboli, restenose og/eller trombose etter angioplasti, karotid endarterektomi, anastomose av vaskulære podninger og kroniske kardiovaskulære anordninger (f.eks. inn-gående katetere eller forlengende "ekstrakorporeale sirkulerende anordninger"). Disse symptomene representerer forskjellige stenotiske og okklusive vaskulære forstyrrelser antatt å være initiert av blodplate-aktiveringen på karveggene.

PAI kan bli anvendt for forhindring eller opphør av arteriell trombedannelse, i ustabil angina og arteriell emboli eller trombose, samt som behandling eller forhindring av myokardialt infarkt (MI) og mural trombedannelse post MI. For hjerte-relaterte forstyrrelser, behandling eller forhindring av transient kjemiske angrep og behandling av trombotiske slag eller slag-i-utvikling er innbefattet. PAI kan også bli anvendt for å forhindre blodplateaggregasjon, embolisering eller forbruk i ekstrakorporeale sirkulasjoner, inkludert forbedring av dyredialyse, kardiopulmonær "bypasses", hemo-perfusjoner og plasmafereser.

PAI forhindrer blodplateaggregasjon, embolisering eller forbruk assosiert med intravaskulære anordninger og administrasjonsresultater i forbedret anvendelse av intra-aortiske ballongpumper, ventrikulære assisteringsanordninger og arterielle katetere.

PAI vil også være nyttig for behandling eller forhindring av venetrombose som i dyp venetrombose, IVC, renalvene eller portalvenetrombose og lungevenetrombose.

Forskjellige forstyrrelser som involverer blodplatekonsumpsjon, såsom trombotisk trombocytopenipurpura er også blitt behandlet.

5

I tillegg kan PAI bli anvendt i mange ikke-terapeutiske anvendelser hvor det er ønskelig å hemme blodplateaggregasjonen. F.eks. kan forbedret blodplate og fullblodlagring bli oppnådd ved tilsetning av tilstrekkelige mengder av peptidene der mengden vil variere avhengig av lengden på foreslått lagringstid, lagringsbetingelser, anvendelse av det lagrede materialet, osv.

10

PAI-doseringen kan variere avhengig av ønskede virkninger og det terapeutiske oppsettet. Vanlige doseringer er mellom omtrent 0,01 og 10 mg/kg, fortrinnsvis mellom omtrent 0,01 til 0,1 mg/kg kroppsvekt. Administrasjon er fortrinnsvis parenteral, såsom intravenøs på daglig basis i opptil en uke eller opptil en eller to måneder eller mer, og dette varierer med peptidstørrelsen. Dersom peptidene er tilstrekkelig små (dvs. mindre enn omtrent 8-10 aminosyreresidier), kan andre administrasjonsveier bli anvendt, såsom intranasalt, sublingualt eller lignende.

20

Injiserbare blandinger kan bli fremstilt i konvensjonelle former, enten som flytende oppløsninger eller suspensjoner, faste former egnede for oppløsning eller suspensjon i væske før injeksjon, eller som emulsjoner. Egnede eksipienter er f.eks. vann, saltvann, dekstrose, mannitol, laktose, lecitin, albumin, natriumglutamat, cysteinhydroklorid eller lignende. I tillegg kan om ønskelig de injiserbare farmasøytiske sammensetningene inneholde mindre mengder ikke-toksiske hjelpeforbindelser såsom fuktmidler, pH-bufrende midler, o.l. Om ønskelig kan absorpsjonsfremmende preparater (f.eks. liposomer) anvendes.

30

35

Eksempel 1Analyse for blodplateadhesjonsinhibitorer fra slangevenom

5

A. Beskrivelse av analyser - plateanalyser

Renset blodplate GP IIb-IIIa reseptor ble fremstilt som beskrevet av Fitzgerald, L.A. et al., Anal. Biochem. (1985) 151:169-177. Vitronektinreseptor ble fremstilt som beskrevet
10 av Smith, J.W., J. Biol. Chem. (1988) 263:18726-18731. Etter rensing ble reseptorene lagret i 0,1% Triton X-100 ved 0,1-1,0 mg/ml.

15 Reseptorene ble belagt på veggene av 96-brønn flat-bundet ELISA-plater (Linbro EIA-Plus mikrotiterplate, Flow Laboratories) etter fortynning 1:200 med en oppløsning av 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,4, for å redusere Triton X-100 konsentrasjonen til under dets kritiske micelle-
20 konsentrasjon og tilsetning av en aliquot av 100 µl til hver brønn. Brønnene ble inkubert over natt ved 4°C og deretter utluftet til tørrhet. Ytterligere seter ble blokkert ved tilsetning av bovint serumalbumin (BSA) ved 35 mg/ml i ovennevnte buffer i 2 timer ved 30°C for å forhindre uspesifikk
25 binding. Brønnene ble deretter vasket en gang med bindingsbuffer (50 nM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mg/ml BSA).

De tilsvarende ligandene (fibrinogen, von Willebrand faktor
30 eller vitronektin) ble merket med ¹²⁵I eller konjugert til biotin ved anvendelse av kommersielt tilgjengelige reagenser og standardprotokoller. Merkede ligander ble tilsatt til de reseptor-belagte brønnene i final konsentrasjon på 10 nM (100 µl/brønn) og inkubert i 3 timer ved 30°C i nærvar eller fra-
35 var av forsøksprøver. Etter inkubasjon ble brønnene aspirert til tørrhet og bundet ligand kvantifisert.

For ^{125}I -merkede ligander blir protein oppløst ved 250 μl SDS. For biotinylerte ligander blir bundet protein detektert ved tilsetning av antibiotinantistoff konjugert til alkalifosfatase etterfulgt av tilsetning av substrat (p-nitrofenylfosfat) og bestemmelse av den optiske tettheten til hver brønn ved 405 nm. Redusert fargeutvikling eller redusert ^{125}I -innhold er observert i brønner inkubert med forsøksprøver som inhiberer bindingen av ligand til reseptor.

10

B. Bestemmelse av adhesjonsinhibisjon av rå venom

68 rå, lyofiliserte slangevenomer oppnådd fra enten Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) eller Miami Serpentarium Labs (Salt Lake City, UT) ble løst opp ved 1 mg/ml i buffer (50 nM Tris, 100 mM NaCl, 0,02% azid, 2 mM CaCl_2). 1 ml aliquoter av oppløsningene ble utsatt for ultrafiltrering gjennom Centrocon-10 (YM membran) mikrokonsentratorer (Amicon, Danvers, MA). Filtratene blandes som testprøver i reseptor/ligandanalysen ifølge paragraf A ved anvendelse av GP IIb-IIIa fibrinogensystemet og detektering av binding ved anvendelse av biotinylert fibrinogen. Resultatene er vist i tabell 1.

25

Aktiviteten er til stede i noen, men ikke alle, arter av Viperinae, men er fraværende i alle artene som er undersøkt fra Elapidae.

30

Fig. 1 viser resultatene av forskjellige fortynninger av filtratet for fire arter. Selv ved største fortynning, 25 $\mu\text{l}/0,5\text{ ml}$, viser de tre aktive venomene maksimal inhibisjon.

35

C. Bestemmelse av aktiviteten til peptider i en in vivo modell for trombose

5 Rensede peptider ble testet for deres evne til å forhindre
dannelsen av tromber i koronararterier fra hund i modellen
beskrevet av Folts (Folts, J.D. et al., Circulation (1976)
54:365. I denne modellen er strømningsreduksjoner i en inn-
snevret koronararterie blitt vist å være forårsaket av dan-
nelsen av blodplateaggregater, og midler som blokkerer bin-
10 dningen av fibrinogen til GP IIb-IIIa er blitt vist å for-
hindre disse strømningsreduksjonene (Coller, B.S. et al.,
Blood (1986) 68:783. Peptidene ble løst opp i normalt salt-
vann og administrert i en perifer vene som en enkeltbolus.

15

20

25

30

35

Tabell 1Centricon 10 rensede venommer screenet i IIb-IIIa plateanalyse

5	Elapids	Aktivitet
	Austrelaps superba (Australian Copperhead)	-
	Acanthopis antarcticus (Death Adder)	-
	Dendroaspis jamesonii (Jameson's Mamba)	-
10	Notechis scutatus (Mainland Tiger)	-
	Pseudechis colleti guttatus (Blue-bellied)	-
	Pseudechis textillis textillis (Common Brown)	-
	Oxyuranus scutellatus (Papuan Taipan)	-
15	Viperinae (True Vipers)	Aktivitet
	Atheris squamigera (Green Bush Viper)	-
	Bitis nasicornus (River Jack)	-
	Causus rhombeatus (Rhombic Night Adder)	-
20	Cerastes cerastes (Desert Horned Viper)	-
	Cerastes vipera (Sahara Horned Viper)	-
	Echis carinatus (Saw-scaled Viper)	+
	Echis colorata (Carpet Viper)	+
25	Eristicophis macmahonii (Macmahons Viper)	++
	Pseudocerastes fieldi (Persian Horned Viper)	-
	Vipera xanthina xanthina (Ottomans Viper)	-
	Vipera ammodytes (Long-nosed Viper)	-
	Vipera r. russelli (Russells Viper)	-
30	Vipera r. siamensis	-
	Vipera palaestinae (Palestine Viper)	-
35		

Tabell 1 (forts.)

5	Crotalinae (Pit Vipers)	Aktivitet
	<i>Aqkistrodon rhodostoma</i> (Malayan Pit Viper)	+
	<i>Aqkistrodon halys blomhoffi</i> (Mamushi)	+
	<i>Aqkistrodon hypnale</i> (Hump-nosed Viper)	+
10	<i>Aqkistrodon acutus</i> (Sharp-nosed Viper)	++
	<i>Aqkistrodon bilineatus</i> (Mexican Moccasin)	-
	<i>Aqkistrodon contortrix contortrix</i>	-
	<i>Aqkistrodon c. laticinctus</i>	-
	<i>Aqkistrodon c. pictigaster</i>	-
15	<i>Aqkistrodon contortrix mokasen</i> (Northern Copperhead)	-
	<i>Aqkistrodon piscivorus piscivorus</i> (Eastern Cottonmouth)	-
	<i>Aqkistrodon piscivorus leucostoma</i> (Western Cottonmouth)	+
20	<i>Aqkistrodon piscivorus conanti</i>	+
	<i>Bothrops asper</i>	+
	<i>Bothrops nummifer</i> (Jumping Viper)	-
	<i>Bothrops cotiara</i> (Cotiara)	+
25	<i>Bothrops jararacussu</i> (Jararacussu)	+
	<i>Bothrops jararaca</i> (Jararaca)	+
	<i>Bothrops lansbergi</i>	+
	<i>Bothrops alternata</i> (Urutu)	-
30	<i>Bothrops medusa</i>	+
	<i>Bothrops neuwiedi</i>	+
	<i>Bothrops nasuta</i>	+
	<i>Bothrops pradoi</i>	+

Tabell 1 (forts.)

		Aktivitet
5	<i>Bothrops schlegli</i> (Schlegels Viper)	-
	<i>Trimeresurus gramineus</i> (Formosan Green Habu)	-
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i> (Okinawa Habu)	-
	<i>Trimeresurus vagleri</i>	-
10	<i>Lachesis muta</i> (Bushmaster)	-
	<i>Crotalus durissus terrificus</i> (Tropical Rattlesnake)	-
	<i>Crotalus durissus cotenatatus</i>	-
	<i>Crotalus durissus durissus</i>	-
15	<i>Crotalus scutulatus</i> (Mojave rattlesnake)	-
	<i>Crotalus horridus horridus</i> (Timber Rattlesnake)	-
	<i>Crotalus horridus atricaudatus</i> (Canebrake RS)	-
	<i>Crotalus atrox</i> (Western Diamondback)	-
	<i>Crotalus adonanteus</i> (Eastern Diamondback)	-
20	<i>Crotalus basiliscus</i> (Mexican West-coast RS)	-
	<i>Crotalus molossus molossus</i> (Black-tailed RS)	-
	<i>Crotalus ruber ruber</i> (Red diamondback RS)	-
	<i>Crotalus cerastes cerastes</i> (Mojave sidewinder)	-
25	<i>Crotalus viridis viridis</i> (Prairie Rattlesnake)	+
	<i>Crotalus v. helleri</i> (Southern pacific RS)	+
	<i>Crotalus v. oreganus</i> (Northern pacific RS)	+
	<i>Crotalus v. cerberus</i> (Arizona black RS)	+
30	<i>Crotalus v. luteus</i> (Great Basin RS)	+
	<i>Crotalus v. concolor</i> (Midget-faded RS)	-
	<i>Sistrurus catenatus tergeminus</i> (Western massasauga)	+
	<i>Sistrurus miliaris barbouri</i> (Southeastern Pigmy Rattlesnake)	-

D. Virkninger av rensset slangevenompeptider på cellekobling til adhesive proteiner

M21 melanomceller, som uttrykker høye nivåer av vitronektinreseptoren, ble metabolsk merket med ^{35}S -metionin, og deretter tilsatt til 24-brønn-vevskulturplater belagt med vitronektin. En inkubasjonsperiode på 1 time ved 37°C ble gitt for cellekobling, og dette ble etterfulgt av en vask for å fjerne ikke-adherente celler. Etter vaskingen ble adherente celler solubilisert og supernatantene plassert i en væskescintillasjonsteller. Fraksjonen av celler som forble adherente, ble beregnet ved å dele cpm i de oppløste supernatantene med cpm i det totale celleantallet tilsatt til hver brønn. Virkningene av rensset slangevenompeptider og syntetiske, cykliske peptider på celleadhesjonen ble bestemt ved å innbefatte dem med M21-celler i løpet av inkubasjonsperioden.

20

E. Spesifisiteten til adhesjonsinhibisjonen

Ultrafiltrater fra tre arter av slangevenom, *Sistrurus m. barbouri*, *Crotalus ruber ruber* og *Crotalus basilicus* ble testet i både fibrinogen/GP IIb-IIIa og vitronektin/vitronrektinreseptoranalysene fra paragraf A. Resultatene ble vurdert ved forskjellige fortyninger. Som vist i fig. 2 inhiberer venomet fra *Sistrurus m. barbouri* fortrinnsvis bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa, og venomen til *Crotalus ruber ruber* inhiberer bindingen i begge systemene omtrent likt; og venomen fra *Crotalus basilicus* inhiberer fortrinnsvis vitronektin/vitronrektinreseptorbindingen.

I rensningene beskrevet i eksemplene 2-6 og 8-12 ble PAI-aktiviteten analysert ved anvendelse av en direkte inhibisjon av blodplateaggregasjonen. Blodplaterikt plasma (PRP) ble oppnådd fra en frisk human voluntør. Aggregasjonen ble indu-

sert ved tilsetningen av 4 μ M ADP til 0,5 ml PRP i et aggregometer (Chrono-log Corp.).

5 En tabell som viser resultatene av aminosyresammensetningsanalysen av rensede PAI ifølge eksemplene 2-6 finnes etter eksempel 6, og de som viser resultatene for eksemplene 8-11, er vist etter eksempel 8.

10 Denne analysen ble oppnådd ved en hydrolyse av peptidene ved anvendelse av 6 N HCl og analysering av hydrolysatet ved anvendelse av en Beckman 121 HCl-analysator utstyrt med et Model 126 datasystem. Cysteinsyre ble bestemt ifølge fremgangsmåten til Moore, J. Biol. Chem. (1969) 230:235-237. Tryptofan ble ikke bestemt.

Eksempel 2

Rensing av blodplateaggregasjonsinhibitor (PAI) fra Eristocophis macmahoni-venom

20 En oppløsning av 45 mg Eristocophis macmahoni-venom (Miami Serpentarium Labs, Lot No. EM23SZ) i 1,0 ml 0,5% trifluor-
25 eddiksyre (TFA) ble avkjølt på is i 20 min., sentrifugert ved 14.000 rpm i 3 min. for å fjerne uoppløselig materiale og applisert på en 39 mm x 30 cm, C-18 Delta Pak revers-fase HPLC-kolonne (Waters, Milford, MA) ekvilibrert med 5% acetonitril inneholdende 1% TFA. En gradient som løper fra 5% til
30 15% acetonitril over 5 min., (2%/min.) etterfulgt av en gradient fra 15% til 30% acetonitril over 35 min., og deretter til 50% acetonitril over 20 min., ble kjørt ved anvendelse av en Waters 600E væskechromatograf. En strømningshastighet på 1,5 ml/min. ble opprettholdt gjennom gradienten, og kolonne-
35 avløpet ble samlet opp i 2 min. fraksjoner inn i polypropylenrør.

Eluatet fra kolonnen ble registrert ved 220 nm/2,5 absorbanseenheter full skala (AUFS).

Fraksjoner ble konsentrert til det halve av deres opprinnelige volum ved anvendelse av deres Speed-Vac-konsentrator (Savant) etterfulgt av lyofilisering. Prøvene ble deretter rekonstituert i 1 ml destillert vann og aliquoter (10-50 μ l) ble analysert for deres evne til å hemme human blodplateaggregasjon i plate-rikt plasma induisert med 20 μ m ADP ved anvendelse av et fullblodaggregometer (Chrono-Log Corp., Havertown, PA).

Som vist i fig. 3 ble aktivitet funnet i fraksjoner som eluerte ved 21-25% acetonitrilkonsentrasjon. Disse fraksjonene ble deretter lyofilisert og kjørt på nytt på C-18 HPLC-kolonne ved anvendelse grunnere acetonitrilgradient som følger: De opprinnelige betingelsene besto av 8% acetonitril etterfulgt av en gradient til 25% acetonitril over 68 min. (0,25%/min.), deretter til 60% acetonitril i 10 min. Ettminutts fraksjoner ble oppsamlet, tørket og analysert på nytt for inhibitorisk aktivitet i blodplateaggregasjonen til humane blodplater som ovenfor.

Som vist i fig. 4 eluerte aktiviteten ved 24% acetonitril. De aktive fraksjonene ble deretter utsatt for analytisk HPLC med deteksjon ved 220 nm og eluerte som en enkelt symmetrisk bioaktiv komponent som vist i fig. 5. Aminosyreanalyse av det HPLC-rensede materiale viste at peptidet inneholder 49 residier inkludert 7-8 cysteiner, som angitt i tabell 2.

Forsøk på automatisert Edman-degradering av det karboksyamidometylerte peptidet tilveiebragte ikke noen detekterbar sekvens. Spaltning av dette materiale ble derfor utført ved Lys-C og Asp-N endoproteinaser som ga fragmentet som ble sekvensert og er vist i fig. 6. Denne analysen viste en sekvens på 48 residier. P.g.a. av to tryptofanresidier fremkommer fra denne frekvensanalysen som ikke ble bestemt i

aminosyresammensetningen, inneholder det intakte peptidet 51 aminosyreresidier. To Glx og et Arg-residie som mangler fra den bestemte sekvensen, var antageligvis til stede ved den blokkerte aminoterminusen til peptidet. Siden det var meget sannsynlig at et av Glx-residiene var et pyroglutamylresidie ved aminoterminusen som fører til den blokkerte naturen til det intakte peptidet, fjernet oppfinnerne denne gruppen fra det intakte, karboksyamidometylerede peptidet med enzymet pyroglutamylaminopeptidase (L-pyroglutamylpeptidhydrolase, EC 3.4.11.8, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Protokoller beskrevet av Podell og Abraham, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1978) 81:176-185 ble anvendt. Spaltning av 100 µg peptid med peptidasen i et substrat-til-enzymforhold på 100:1, etterfulgt av revers-fase HPLC-rensning av blandingen på en Waters analytisk C-18 kolonne ga materiale som var egnet for automatisert Edman degradering. Resultatene av denne analysen og oppføring av hele sekvensen til dette peptidet som ble betegnet "eristicophin", er vist i fig. 6.

Hele aminosyresekvensen til denne PAI er vist i fig. 6. Dette peptidet har RGD i bindingsregionen, og viser betraktelig homologi med echistatin.

Eksempel 3

Rensing av PAI fra *Sistrurus catenatus tergeminus*-venom

360 mg *Sistrurus c. tergeminus*-venom (Miami Serpentarium Labs, Lot No. ST6SZ) ble løst opp i 7,0 ml 0,5 M eddiksyre og applisert på en Sephadex G-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 100 cm) ekvilibrert og eluert med 0,5 M eddiksyre. Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på omtrent 25 ml/time, og 5 ml fraksjoner ble oppsamlet. 25 µl av hver av fraksjonene ble slått sammen i grupper på 10 fraksjoner (dvs.

fraksjonene 1-10, 11-20, etc.) og lyofilisert for analyse. De tørkede sammenslåtte fraksjonene ble på ny løst opp i vann og aliquoter analysert for inhibitorisk aktivitet i ADP-stimulert aggregasjon av humane blodplater. Aktive fraksjoner (31-40) ble slått sammen og lyofilisert.

Dette materialet ble løst opp i 2 ml 0,5% TFA og applisert på en 19 mm x 30 cm C-18 Delta Pak reversfase HPLC-kolonne (Waters) ekvilibrert med 8% acetonitril inneholdende 0,1% TFA. En gradient fra 8% til 30% acetonitrilkonsentrering over 30 min. og deretter til 60% acetonitril over 20 min ble kjørt ved en strømningshastighet på 18 ml/min. Eluatet fra kolonnen ble oppsamlet i propylenrør i 0,2 min. fraksjoner og registrert ved 220 nm/2.2 AUFS. Fraksjonene ble konsentrert på en Speed-Vac konsentrator (Savant), lyofilisert og analysert for antiaggregasjonsaktivitet med humane blodplater som tidligere beskrevet.

Fig. 7 viser at den PAI-inneholdende fraksjonen eluerer ved 24-25% acetonitril. Analyse av disse aktive fraksjonene ved anvendelse av HPLC med deteksjon ved 220 nm viste en symmetrisk bioaktiv komponent, som vist i fig. 8. Aminosyreanalyse av dette materiale viste et peptid med 71-72 residier, inkludert 12 cysteiner, som vist i tabell 2.

En del av det rensede peptidet ble redusert og alkylert med iodacetamid og rensert på en C-18 revers-fase HPLC-kolonne. N-terminalsekvensanalyse av dette materiale viste følgende aminosyresekvens for 23 cykluser av Edman-degradering: Glu-Ala-Gly-Glu-Glu-Cys-Asp-Cys-Gly-Ser-Pro-Ala-Asn-Pro-Cys-Cys-Asp-Ala-Ala-Thr-Cys-Lys-Leu.

Den fullstendige aminosyresekvensen til denne PAI som er betegnet "tergeminin", er vist i fig. 6.

Det rensede peptidet ble testet i de reseptor-baserte analysene beskrevet i eks. 1, paragraf 8. Konsentrasjonene av det

rene peptidet ved mindre enn 100 nm inhiberte bindingen av Fg og vWF til GP IIb-IIIa og av Vn og vWF til vitronektinreseptoren, som vist i fig. 9.

5

Eksempel 4

Rensing av blodplateaggregasjonsinhibitoren fra Sistrurus milarus barbouri-venom

10

15

20

25

200 mg Sistrurus m. barbouri-venom (Miami Serpentarium Labs., Lot No. SM13SZ) ble løst opp i 7,0 ml 0,5 M eddiksyre og applisert på en Sephadex G-50 fine kolonne (Pharmacia, 2,5 x 100 cm) ekvilibrert og eluert med 0,5 M eddiksyre. Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 26 ml/time, og 5 ml fraksjoner ble oppsamlet og analysert for antiblodplateaggregasjonsaktivitet som tidligere beskrevet. Aktive fraksjoner (41-50) ble slått sammen og lyofilisert. Dette materiale ble på ny løst opp i 2,0 ml 0,5% TFA, og applisert på den preparative C-18 HPLC-kolonnen som i eksempel 3 og eluert ved anvendelse av de samme gradientbetingelsene. 2/10-dels minutters fraksjoner fra kolonnen ble oppsamlet i polypropylenrør, konsentrert, lyofilisert og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet.

30

Fig. 10 viser aktivitetsprofilen fra denne HPLC-kolonnen. De aktive fraksjonene ble utsatt for analytisk HPLC, som viste flere fraksjoner (45-47) som var mer enn 90% homogene. Peptidet i fraksjon 46 (150 µg) ble rensert til homogenitet på en analytisk C-18 kolonne med manual oppsamling av den symmetriske toppen, som vist i fig. 11. Aminosyreanalyse av dette materiale viste et peptid på 71-72 aminosyrer, inkludert 12 cysteinresidier, som vist i tabell 2.

35

Det rensede peptidet (150 µg) ble løst opp i 300 µl reaksjonsbuffer (6 M guanidin HCl, 0,25 M Tris-HCl, 20 mM

EDTA, 20 mM ditiotreitotol (DTT), pH 7,5) i 1,5 timer ved romtemperatur for å redusere peptidet. Dette ble etterfulgt av omsetning av 3 µl 4-vinylpyridin (Aldrich) ved romtemperatur i en ytterligere time. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 200 µl 1% TFA og applisert på en analytisk C-18 HPLC-kolonne og eluert med en acetonitrilgradient i vann inneholdende 0,1% TFA, begynnende ved 8% acetonitril og løpende til 25% acetonitril i 20 min., deretter til 60% acetonitril i 10 min.

En del av dette pyridyletylerte materiale ble utsatt for N-terminal sekvensanalyse, som beskrevet ovenfor, og fullstendig proteolytisk spaltning av det reduserte og alkylerte peptidet ble utført ved anvendelse av endoproteinase-Lys-C og endoproteinase Asp-N med peptidfragmenter isolert på enten C-3 eller C-18 revers-fase HPLC-kolonne ved anvendelse av acetonitril/vann/TFA-graduenteluering. Aminosyresekvensen til N-terminusen av det intakte peptidet og isolerte proteolytiske fragmenter ble bestemt som beskrevet av Yarden, Y. et al., Nature (1986) 323:226, ved anvendelse av automatisert Edman-degradering på en gass-fasesekvensator.

Hele aminosyresekvensen til dette isolerte peptidet betegnet "barbourin" er vist i fig. 6, sammen med sekvensene for de proteolytiske fragmentene. En sammenligning av denne sekvensen med de fra andre slangevenom-adhesjonsinhibitorer er vist i fig. 12.

Eksempel 12

Rensing av PAI fra Lachesis mutas-venom

99 mg Lachesis mutas-venom (Miami Serpentarium Labs., Lot No. LM15FZ) ble løst opp i 2,0 ml 0,5% trifluoreddiksyre og ble avkjølt på is i 20 min., sentrifugert ved 14.000 rpm i 3 min.

for å fjerne uoppløselig materiale og applisert på en 3,9 mm x 30 cm, C-18 Delta Pak reversert-fase HPLC-kolonne (Waters) ekvilibrert med 5% acetonitril inneholdende 0,1% trifluoreddiksyre. En gradient fra 5% til 15% acetonitril over 5 min. og deretter til 30% over 35 min. (2%/min.) og fortsatte til 60% acetonitril over 20 min. ble kjørt. Strømnings-
hastigheten ble opprettholdt ved 1,5 ml/min., og kolonne-
eluatet ble registrert ved 220 nm/3 AUFS. 2 minutters fraksjoner ble samlet opp, konsentrert ved Speed-Vac og lyofilisert. Fraksjonene ble analysert for blodplateaggregasjons-
inhibitorisk aktivitet.

Fig. 13 viser de aktive fraksjonene som eluerte ved 18% acetonitril. Disse fraksjonene ble kjørt på nytt, på C-18 kolonnen ved anvendelse av en grunnere gradient bestående av en 40 min. gradient fra 5-28% acetonitril. Ett-minutters fraksjoner ble oppsamlet, konsentrert, lyofilisert og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet, med resultatene vist i fig. 14. Disse aktive fraksjonene ble kjørt på en analytisk C-18 kolonne, og den eluerte midttoppfraksjonen ble samlet manuelt. Det eluerte materiale som er i en enkelt symmetrisk topp, som vist i fig. 15, ble utsatt for aminosyreanalyse og viste et peptid på 72-73 aminosyrer inneholdende 12 cysteiner, som vist i tabell 2.

Hele aminosyresekvensen til denne PAI, betegnet "lachesin", er vist i fig. 6.

Eksempel 6

Rensing av PAI fra *Crotalus viridis viridis*-venom

47 mg *Crotalus viridis viridis* venom (Sigma Chemical Co., Lot No. 24F-0534) ble løst opp i 1 ml 0,5% trifluoreddiksyre, avkjølt på is i 20 min., sentrifugert ved 14.000 rpm i 3 min.

for å fjerne uoppløselig materiale, og applisert på en 3,9 mm x 30 cm C-18 Delta Pak revers-fase HPLC-kolonne (Waters) ekvilibrert med 5% acetonitril inneholdende 0,1% trifluor-
5 eddiksyre. En gradient fra 5% til 15% acetonitril over 5 min. (2%/min.) etterfulgt av en gradient fra 15% til 30% acetonitril i 35 min. og deretter til 60% acetonitril til 60 min. ble kjørt. En strømningshastighet på 1,5 ml/min. ble opprettholdt i løpet av gradienten, og kolonneeluatet ble oppsamlet i polypropylenrør i to-minutters fraksjoner.
10 Kolonneeluatet ble registrert ved 220 nm/3,0 AUFS. Fraksjoner ble konsentrert, lyofilisert og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet.

Aktive fraksjoner, vist i fig. 6 som 18-19% acetonitril, ble
15 kjørt på C-18 HPLC-kolonne ved anvendelse av en gradient på 8%-20% acetonitril over 48 min. (0,25%/min.). Fraksjoner ble konsentrert og lyofilisert og testet for aktivitet; aktive fraksjoner ble kjørt på en C-18 kolonne ved anvendelse av 8-16% acetonitril over 10. min., 16-20% acetonitril over 15
20 min. og deretter til 60% over 10 min. Eluatet ble registrert ved 220 nm med individuelle topper oppsamlet for hånd i polypropylenrør. Ny analyse av den aktive toppen på analytisk HPLC ga resultatene vist i fig. 17. Aminosyreanalyse utført på denne toppen viste et 72-73 residiepeptid inneholdende 12
25 cysteiner som vist i tabell 2. Den fullstendige aminosyresekvensen til denne PAI betegnet "viridin" er vist i fig. 6 og blir sammenlignet med det andre PAI i fig. 12.

30

35

Tabell 2Aminosyresammensetninger av rensede peptider

5	<u>Amino- syre</u>	<u>Sistrurus m. bartouri</u>	<u>Sistrurus c. tergeminus</u>	<u>Lachesis mutas</u>	<u>Crotalus v. viridis</u>	<u>Eristocophis machmahoni</u>
	Lys	4	3	4	3-4	4
	His	0	0	0-1	1	0
	Arg	4	5	7	5	7
10	Asx	11	11	10	11	7
	Thr	4	4	2	4	2
	Ser	2	2	1	2	1
	GLx	6-7	5-6	7	6	4
	Pro	4	4	5	8	5
15	Gly	9	9	9	10	5
	Ala	7	8	9	7	3
	Cys	12	12	12	12	7
	Val	2	2	0	1	2
	Met	1	1	0	0	0
20	Ile	0	0	2	1	0
	Leu	3	3	2	3	0
	Tyr	1	1	1	1	1
	Phe	1	1	1	1	1
25		71-72	71-72	72-73	74-75	40

30

35

Tabell 2, forts.Aminosyresammensetninger av rensede peptider

	<u>Amino-</u> <u>syre</u>	<u>Sistrurus</u> <u>m. bartouri</u>	<u>Sistrurus</u> <u>c. tergeminus</u>	<u>Lachesis</u> <u>mutas</u>	<u>Crotalus</u> <u>v. viridis</u>	<u>Eristocophis</u> <u>machmahoni</u>
5	Lys	4	3	4	3-4	4
	His	0	0	0-1	1	0
	Arg	4	5	7	5	7
10	Asx	11	2	10	11	7
	Thr	4	4	2	4	2
	Ser	2	2	1	2	1
	Glx	6-7	5-6	7	6	4
	Pro	4	4	5	6	5
15	Gly	9	9	9	10	5
	Ala	7	8	9	7	3
	Cys	12	12	12	12	7
	Val	2	2	0	1	2
	Met	1	1	0	0	0
20	Ile	0	0	2	1	0
	Leu	3	3	2	3	0
	Tyr	1	1	1	1	1
	Phe	1	1	1	1	1
25		71-72	71-72	72-73	74-75	40

30

35

Eksempel 7Sammenligning av rensed PAI med echistatin

5 Peptidene renses som beskrevet i eksemplene 2 og 4, eristicophin og barbourin, ble sammenlignet med 49-residuepeptidet echistatin med inhibering av fibrinogenbinding til GP IIb-IIIa, som beskrevet i eksempel 1, paragraf A. Fig. 18 viser at disse rensede PAI er 2-3 ganger potente i denne analysen
10 enn standard echistatin.

Peptider rensed til homogenitet fra *Echis carinatus*, *Sistrurus m. barbouri* og *Eristicophis macmahoni* -venomer ble sammenlignet med echistatin i ADP-stimulert blodplateaggregasjonsanalysen. Økende konsentrasjoner av rensede
15 slangevenompeptider ble tilsatt (uten preinkubering) ved de angitte konsentrasjonene (fig. 19). Slangevenompeptidene fra *Eristicophis macmahoni* og *Sistrurus m. barbouri* var minst to ganger mer potente enn echistatin, i samsvar med deres
20 potenthetsrekkefølge observert for inhiberende fibrinogenbinding til GP IIb-IIIa som angitt ovenfor.

Eksempel 8Rensing av PAI fra *Crotalus cerastes cerastes* -venom

1 g *Crotalus c. cerastes*-venom (Miami Serpentarium Labs, Lot
30 No. CE4SZ) ble oppløst i 7,0 ml eddiksyre og applisert på en Sephadex G-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 100 cm) ekvilibrert og eluert med 0,5 M eddiksyre. Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 25 ml/time med 5 ml fraksjoner oppsamlet i polypropylenrør. Aliquoter av disse fraksjonene
35 ble analysert for aggregasjonsaktivitetsinhibitorisk aktivitet som tidligere beskrevet. Aktive fraksjoner (71-80) ble slått sammen og lyofilisert. Det tørkede materiale ble re-

suspendert i 2,0 ml 0,5% TFA, uopløselig materiale ble fjernet ved sentrifugering og applisert på den preparative C-18 Waters HPLC-kolonnnnnnnnen som beskrevet i eksempel 3 og eluert ved anvendelse av betingelsene for gradienteluering
5 beskrevet i eksempel 3. Fraksjoner fra kolonnen ble slått sammen i polypropylenrør, konsentrert og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet. Fig. 20 viser aktivitetsprofilen fra denne HPLC-fraksjoneringen.

10 Aktive fraksjoner med blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet ble slått sammen og lyofilisert og kjørt på nytt på den preparative C-18 HPLC-kolonnen eluert med samme gradient. Fraksjoner ble slått sammen pr. hånd i polypropylenrør og på ny analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet
15 som før. Aktive fraksjoner ble analysert på en analytisk C-18 kolonne ved anvendelse av betingelsene beskrevet i eksempel 4, og homogene fraksjoner ble slått sammen og lyofilisert. Analytisk HPLC-analyse av dette materiale er vist i fig. 21.

20 Renset peptid ble utsatt for aminosyreanalyse som viste at det var et peptid på 73-74 aminosyrer inneholdende 12 cysteinresidier, som vist i tabell 3.

25 Renset peptid (450 µg) ble løst opp i 750 µl reaksjonsbuffer (6 M guanidin-HCl, 0,25 M Tris-HCl), 20 mM EDTA, 20 mM ditioneitol (DTT), pH 7,50) i 1,5 timer ved romtemperatur for fullstendig å redusere peptidet etterfulgt av omsetning ved romtemperatur i 1 time med overskudd iodacetamid (Fluka, 16
30 mg). Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 500 µl 1% TFA og applisert på en analytisk C-18 HPLC-kolonne og eluert med en gradient av acetonitril fra 8% til 25% i 20 min., deretter til 60% acetonitril i 10 min. Den UV-absorberende toppen ble samlet for hånd i 1,5 ml eppendorf-rlr og tørket.

35 En porsjon av dette karboksyamidometylerte peptidet ble utsatt for N-terminal sekvensanalyse. Fullstendig proteoly-

tisk spaltning av karboksyamidometylert peptid ble utført ved
anvendelse av endoproteinase Lys-C og endoproteinase Asp-N-
peptidfragmentene fra disse spaltningene ble isolert på enten
C-3 eller C-18 revers-fase HPLC-kolonner ved anvendelse av
5 acetonitril/vann/TFA-gradientelueringsbetingelser. Amino-
syresekvensen ble bestemt som beskrevet i eksempel 4. Hele
aminosyresekvensen bestemt for "cerastin" er vist i fig. 6,
og er sammenlignet med den til andre PAI i fig. 12.

10

15

20

25

30

35

T a b e l l e 3

Aminosyresammensetninger						
Aminosyre	Crotalus c. cerastes	Crotalus atrox	Crotalus d. durissus	Crotalis d. totonatacus	Crotalus h. horridus	Bothriops cotiarae
Lys	3	3	3	3	4	3
Hus	0	0	0	0	0-1	0
Arg	5	5	5	5	4	8
Asx	11	10	12	12	10	10
Thr	5	4	4	4	3	2
Ser	1	2	2	2	2	1
Glx	7	6	5-6	5-6	6	8
Pro	5	6,7	4-5	5	7	6
Gly	9	8	10	10	8	8
Ala	7	6	8	8	8	9
Cys	12	12	12	12	10	12
Val	2	2	1	1	3	0
Met	1	0	0	0	1	0
Ile	0	1	1	1	0	1
Leu	3	3	3	3	2-3	2
Tyr	1	1	1	1	1	0
Phe	1	1	1	1	1	2
Trp	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	73-74	70-71	72-74	73-74	70-72	72

Eksempel 95 Rensing av PAI fra Crotalus ruber ruber venom

1 g Crotalus ruber ruber -venom (Miami Serpentarium Labs, Lot
No. CF17SZ) ble løst opp i 8 ml 0,5 M eddiksyre og applisert
på en Sephadex G-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 100 cm)
10 ekvilibrert ved romtemperatur og eluert med 0,5 eddiksyre.
Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 25 ml/time
med 5 ml fraksjoner samlet i polypropylenrør. Aliquoter av
fraksjoner ble analysert for blodplateaggregasjonsinhibitor-
aktivitet som beskrevet. Aktive fraksjoner (61-70) ble slått
15 sammen og lyofilisert. Det tørkede materialet ble resuspen-
dert i 2,0 ml 0,5% TFA. Uoppløselig materiale ble fjernet
ved sentrifugering og applisert på en preparativ C-18 Water
HPLC-kolonne som beskrevet og eluert ved anvendelse av
gradientbetingelsene beskrevet i eksempel 3. Fraksjonene
20 samlet i polypropylenrør ble konsentrert på en Speed-Vac
konsentrator og analysert for blodplateaggregasjons-
inhibitorisk aktivitet.

Fig. 22 viser aktivitetsprofilen etter denne HPLC-fraksjone-
25 ringen. Individuelle aktive fraksjoner ble lyofilisert.
Fraksjonene 49 og 50 ble slått sammen og applisert på den
analytiske C-18 reversfasekolonnen og eluert ved anvendelse
av betingelsene beskrevet i eksempel 4 som besto av en
acetonitrilgradient som ble kjørt fra 8% acetonitril til 25%
30 i 20 min. etterfulgt i 10 min. til 69% acetonitril for å
tilveiebringe homogent peptid som vi har kalt "ruberin".
Automatisert Edman-degradering av karboksyamidometylert
peptid gir sekvensen vist i fig. 6.

Eksempel 105 Rensing av PAI fra Crotalus atrox

1 g Crotalus atrox -venom (Miami Serpentarium Labs, Lot No. CX16AZ) ble løst opp i 10 ml 0,5 M eddiksyre og applisert på en Sephadex G-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 110 cm) ekvilibrert og kjørt ved romtemperatur med 0,5 M eddiksyre. 10 Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 25 ml/time med 5 ml fraksjoner samlet i polypropylenrøret. Aliquoter av fraksjonene ble analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet som tidligere beskrevet. Aktive fraksjoner (81-100) ble slått sammen og lyofilisert. Det tørkede 15 materiale ble løst opp i 2,0 ml 0,5% TFA og applisert på den preparative C-18 HPLC-kolonnen og kjørt som beskrevet i eksempel 3. Fraksjonene fra kolonnen ble oppsamlet i polypropylenrør, konsentrert på en Speed-Vac konsentrator og 20 analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet som før. Aktive fraksjoner ble kjørt på nytt på den analytiske C-18 kolonnen for å tilveiebringe homogent peptid (fig. 23). Aminosyreanalyse av dette materiale viste at peptidet inneholder 72 aminosyrer inkludert 12 cysteinresidier, som vist i 25 tabell 3. Aminosyresekvensen til det isolerte peptidet, crotatroksin, er vist i fig. 6.

30 Eksempel 11Rensing av PAI fra Bothrops cotiara

680 mg Bothrops cotiara -venom (Miami Serpentarium Labs, Lot nr. B05SZ) ble oppløst i 10 ml 0,5 M eddiksyre og applisert 35 på en Sephadex G-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 110 cm) ekvilibrert og eluert med 0,5 M eddiksyre. Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 25 ml/time med 5 ml fraksjoner oppsamlet i polypropylenrør. Aliquoter av fraksjonene

ble analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet som tidligere beskrevet. Aktive fraksjoner (71-90) ble slått sammen og lyofilisert. Tørket materiale ble resuspendert i 2,0 ml 0,5% TFA og applisert på Waters preparative C-18 revers-fasekolonnen. Kolonnen ble eluert ved anvendelse av betingelsene beskrevet i eksempel 3. Fraksjonene ble oppsamlet i polypropylenrør, konsentrert på en Speed-Vac konsentrator og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet. Aktive fraksjoner ble individuelt lyofilisert. Flere toppfraksjoner ble kjørt på nytt på den analytiske C-18 kolonnen som beskrevet i eksempel 4. Den analytiske HPLC-profilen til det homogene peptidet er vist i fig. 4. Aminosyreanalyse av dette materialet viser at dette peptidet inneholder 72 aminosyrer inkludert 12 cysteinresidier, som vist i tabell 3. Den fullstendige aminosyresekvensen til dette peptidet som er betegnet "cotiarin", er vist i figurene 6 og 12.

Renset peptid ble testet i reseptoranalysen beskrevet i eksempel 1. De opprinnelige bestemmelsene viste at lave konsentrasjoner av cotiarin (1-4 nM) selektivt inhiberer vitronektinbindingen til vitronektinreseptoren, mens de samme konsentrasjonene hadde signifikant lavere inhiberende aktivitet i binding av fibrinogen til GP IIb-IIIa som vist i fig. 25, men påfølgende eksperimenter kunne ikke verifisere dette resultatet.

Eksempel 12

Rensing av PAI fra *Crotalus viridis lutosus*

A. 1 g *Crotalus viridis lutosus* -venom (Miami Serpentarium Labs, Lot No. CL18SZ) ble oppløst i 8 ml 0,5 M eddiksyre og applisert på en Sephadex C-50 fine-kolonne (Pharmacia, 2,5 x 110 cm) som ble ekvilibrert og eluert med 0,5 M eddiksyre.

Kolonnen ble kjørt ved en strømningshastighet på 25 ml/time, og 5 ml fraksjoner ble oppsamlet i polypropylenrør. Aliquoter av fraksjonene ble analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet. Fraksjonene (71-100) ble slått sammen og lyofilisert. Tørket materiale ble resuspendert i 2,0 ml 0,5% TFA. Uoppløselig materiale ble fjernet ved sentrifugering og applisert på preparativ C-18 Waters reversfasekolonne og eluert ved anvendelse av gradientelueringsbetingelsene beskrevet i eksempel 3. Fraksjonene fra kolonnen ble oppsamlet i polypropylenrør, konsentrert på en Speed-Vac konsentrator og analysert for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet. Aktive fraksjoner ble lyofilisert i deres individuelle rør. Fraksjoner med toppaktivitet ble kjørt på nytt på Waters analytiske C-18 kolonnen ved anvendelse av acetonitrilgradienten beskrevet i eksempel 4. Fraksjonene ble samlet pr. hånd i 1,5 ml Eppendorf-rør. Homogene fraksjoner ble slått sammen og lyofilisert. Analytisk HPLC av dette materiale viste en enkelt symmetrisk topp. Hele aminosyresekvensen til dette peptidet som er betegnet "lutosin", er vist i figurene 6 og 12.

B. På en lignende måte som den som er beskrevet i paragraf A ble PAI fra *B. jararacussu*, *C. basilicus*, *C. durissus durissus*, *C.v. oreganus*, *C. h. horridus*, *C. v. helleri*, *C. durissus totonactus* og fra *C. m. molossus* isolert og rensset. Aminosyresammensetningene til flere av disse peptidene er vist i tabell 3. Aminosyresekvensene til PAI fra *C.h. horridus*, *C. basilicus*, *C.m. molossus*, *C.v. oreganus* og *C. d. durissus*, betegnet horridin, basilicin, molossin, oreganin og durissin, er vist i fig. 6. Reseptorbindingsdata for rensede peptider ifølge eksemplene 1-12 er vist i fig. 26.

I eksemplene 13-16 nedenfor ble peptidene syntetisert ved fast-faseteknikker på en Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer ved anvendelse av t-Boc aminosyrer aktivert som

HOBt aktive estere i henhold til instruksjonene fra forhandleren, som i korthet er som følger for fremstilling av
 5 Boc-AA1AA(n-1)-AA(n)-O-PAM-polystyrenharpiks.

Halvt mmol av valgt Boc-AA(n)-O-PAM-polystyrenharpiks blir behandlet ifølge følgende skjema for inkorporering av Boc-AA(n-1)-OH:

10

- 1) TFA-avspaltning: 30% TFA i DCD, 3 min., 50% TFA i DCM, 16 min.
- 2) Vaskinger og nøytraliseringer: DCM-vaskinger (5X), 3 min., 5% DIEA i DCM, 2 min., 5% DIEA i NMP, 2 min. NMP vask (6X), 5 min.
- 3) Kobling: 4 ekvivalenter Boc-AA-HOBt-ester i NMP (preaktivert 55 min.), 38 min., DMSO for å danne 15% DMSO/85% NMP, 16 min., 3,8 ekv. DIEA, 5 min.
- 4) Vask og harpiksprøve: NMP vask, 3 min.
- 5) Capping: 10% eddiksyreanhydrid, 5% DIEA i NMP, 8 min.
- 6) DCM-vaskinger (6X) 4 min.

25

30

Eksempel 13

Fremstilling av analog nr. 1 [E²⁸L⁴¹C⁶⁴]barbourin (28-73):

E-C-A-D-G-L-C-C-D-Q-C-R-F-L-K-K-G-T-V-C-R-V-A-K-G-D-W-N-D-D-T-C-T-G-Q-S-C-D-C-P-R-N-G-L-Y-G

35

Halvt mmol PAM-Gly harpiks (0,6 mekv./g, Applied Biosystems, Foster City, CA) ble utsatt for fremgangsmåte A med de nødvendige aminosyrene (introdusert i rekkefølge). Boc-

beskyttede aminosyrer hadde følgende side-kjedebeskyttelse: Arg(Tos), Asp(OcHex), Cys(4-MeBzl), Glu(OcHex), Lys(Cl-Z), Thr(OBzl), Trp(CHO) og Tyr(Br-Z). Etter oppstilling av den fullstendige beskyttede peptid-harpikskjeden ble den amino-terminale Boc-gruppen fjernet med TFA og harpiksen tørket som denne TFA-saltform. Harpiksen (1,3 g) ble utsatt for "lav-høy" HF avspaltningsprotokoller etterfulgt av fjerning av HF "i vakuum". Den tørkede peptid-harpiksblendingen ble overført til en frittet trakt (grov) med etyleter og ble basket flere ganger med alternerende vaskinger med eter og kloroform for å fjerne det meste av de organiske beskyttelsesgruppene og midlene anvendt i avspaltningen.

Peptidblandingen ble overført til 2 L 0,4% eddiksyre og pH justert til 7,99 med konsentrert NH_4OH . Harpiksen ble filtrert fra denne oppløsningen, og oppløsningen ble latt stå ved 4°C uten omrøring i 20 timer. Dette ble etterfulgt av oppvarming av oppløsningen til romtemperatur og lagring i tre nye dager uten omrøring. Det precipiterte materiale ble fjernet ved filtrering, og supernatanten pH-justert til 3,0 med eddiksyre og lyofilisert.

Råmaterialet ble løst opp i 8,0 ml 0,5 M eddiksyre og applisert på en Sephadex G-50 fine-kolonne (2,5 x 100 cm) ekvilibrert med 0,5 M eddiksyre. Kolonnen ble kjørt ved 20 ml/t og fraksjonene (4 ml) ble oppsamlet i polypropylenrør. Aliquoter av fraksjonene ble tørket, resuspendert i vann og testet for blodplateaggregasjonsinhibitorisk aktivitet som tidligere beskrevet. Aktive fraksjoner (71-90) ble slått sammen og lyofilisert.

Tørket materiale (66 mg) ble løst opp på ny i 2,0 ml 0,1 M eddiksyre og applisert på Waters preparative C-18 kolonne ekvilibrert med 8% acetonitril inneholdende 0,1% TFA. En gradient fra 8% acetonitril til 20% i 10 min. etterfulgt av en sakte gradient til 30% acetonitril i 40 min. ble utført. Kolonnen ble eluert ved 18 ml/min., og fraksjonene (12 sek.)

ble oppsamlet i polypropylenrør. Fraksjonene ble konsentrert på en Speed-Vac konsentrator til 1,0 ml volum, og 10 µl aliquoter ble undersøkt i blodplateaggregasjonsanalysen.

Aktive fraksjoner (29-32) ble individuelt lyofilisert og analysert på den analytiske C-18 HPLC-kolonnen med en 8-30% acetonitrilgradient. Fraksjonene 29 og 30 ble slått sammen og applisert på den analytiske kolonnen i 1,0 ml 0,5% TFA. Hovedtoppen ble samlet manuelt og lyofilisert for tilveiebringelse av 1,6 mg rent peptid.

Aminosyreanalyse av dette materiale bekreftet identiteten til peptidet. Analyse av dette materialet for dets evne til å inhibere bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa og vitronektin til VnR er vist i figurene 26 og 27. Disse data demonstrerer den høye affiniteten til denne analogen for GP IIb-IIIa og den relative mangelen på affinitet ved VnR for konsentrasjonene opptil 1 µM.

Eksempel 14

Fremstilling av analog nr. 2, [K²⁹]eristicophin (4-51): E-E-P-C-A-T-G-P-C-C-R-R-C-K-F-K-R-A-G-K-V-C-R-V-A-K-G-D-W-N-N-D-Y-C-T-G-K-S-C-D-C-P-R-N-P-W-N-G

Halvt mmol PAM-Gly harpiks (0,6 mekv./g, Applied Biosystems, Foster City, CA) ble utsatt for fremgangsmåte A med de nødvendige aminosyrene (introdusert i rekkefølge). Boc-aminosyrer hadde følgende side-kjedebeskyttelse: Arg(Tos), Asp(OcHex), Cys(4-MeBzl), Glu(O-cHex), Lys(Cl-Z), Ser(OBzl), Thr(OBzl), Trp(CHO) og Tyr (Br-Z). Spaltnings, refolding og rensning av dette peptidet var identisk med de tidligere eksemplene. Data for reseptorbinding for denne analogen er vist i figurene 26 og 28.

Eksempel 15

5

Fremstilling av analog nr. 3: G-C-G-K-G-D-W-P-C-A-NH₂

10

15

20

Halvt mmol pMBHA-harpiks (0,72 mekv./g, Applied Biosystems, Foster City, CA) ble utsatt for fremgangsmåte A med de nødvendige aminosyrene (innført i rekkefølge). Boc-beskyttede aminosyrer hadde følgende side-kjedebeskyttelse: Asp(O-cHex), Cys(4-MeBzl) og Lys(Cl-Z). Etter fullført oppstilling av den beskyttede peptid-harpiksen ble den aminoterminale Boc-gruppen fjernet med TFA, og harpiksen ble tørket som TFA-saltform. Harpiksen (1,54 g) ble behandlet med vannfri hydrogenfluorid (HF) inneholdende 10% anisol, 2% etylmetylsulfid i 30 min. ved -10°C og ytterligere 30 min. ved 0°C. HF ble fjernet i vakuum, og peptid/harpiksblandingen ble suspendert i dietyleter etterfulgt av alternerende vaskinger med kloroform og eter 3X. Etter en siste etervask ble peptidet ekstrahert fra harpiksen med 2,0 M eddiksyre, fortynnet med destillert vann og lyofilisert.

25

30

35

Råpeptidet (370 mg) ble løst opp i deoksygenert 10 mM NH₄OAc, pH 8, til 0,5 mg/ml og oksydert ved dråpevis tilsetning av et lite overskudd 0,01 M kaliumferricyanid (K₃Fe(CN)₆)-oppløsning, omrørt i ytterligere 20 min. og justert ved pH med eddiksyre. Peptidoppløsningen ble behandlet med Dowex AG3x4 anion-bytteharpiks i 15 min. med omrøring, og harpiksen filtrert, fortynnet med H₂O og lyofilisert for å tilveiebringe det rå, cycliserte peptidet. Det rå, cycliserte peptidet (392 mg) ble rensset ved avsaltning på Sephadex G-25F ved anvendelse av 0,5 M eddiksyre som elueringsmiddel, etterfulgt av ione-bytte-kromatografi på CM-Sepharose (Pharmacia) ved anvendelse av en elueringsgradient dannet ved tilsetning av 100 mM NH₄OAc til en oppløsning av 10 mM NH₄OAc, pH 4,5. Fraksjoner som hadde en minimum renhet på 90% ved HPLC-analyse, ble slått sammen og lyofilisert fra H₂O flere ganger for tilveiebrinelse av 175 mg. Den endelige rensingen besto

av preparativ HPLC-rensing på en Water C-18 revers-
fasekolonne med en acetonitril/vann/TFA-gradient for tilveie-
bringelse av det rensede peptidet. Data for reseptorbinding
5 for denne analogen er vist i figurene 26, 29 og 30.

10 Eksempel 16

Fremstilling av ytterligere analoger

De følgende analogene ble fremstilt i de fleste tilfellene på
en måte som ligner den som er beskrevet i eksempel 15. Analog
15 60, vist nedenfor, ble fremstilt i oppløsning via guanidering
av sidekjeden til lysinresten til analog nr. 19 ved an-
vendelse av fremgangsmåten til Bajusz, S. et al., FEBS Letts
(1980) 110:85-87.

20 1 mg analog nr. 19 ble omsatt med 1 mg 1-amidino-3,5-
dimetylpyrazolnitrat (Aldrich) i 1 ml absolutt etanol i nær-
vær av diisopropyletylamin (DIEA) ved romtemperatur i 4
dager. Produktanalog 60 ble rensset fra overskudd reagens og
25 utgangsmaterialene ved revers-fase HPLC på en C-18 kolonne
ved anvendelse av en gradient av acetonitril i 0,1% trifluor-
eddiksyre. 900 µg av dette materialet ble isolert i rensset
form.

30

- Nr. 4 G-C-K-G-D-W-P-C-A-NH₂
5 C-G-K-G-D-W-P-C-NH₂
6 G-C-G-K-G-D-W-C-A-NH₂
35 7 G-C-K-G-D-W-C-A-NH₂
8 Acetyl-C-K-G-D-C-NH₂
9 Mpr-K-G-D-Pen-NH₂
10 C-K-G-D-W-P-C-NH₂
11 Acetyl-C-R-G-D-Pen-NH₂

- Nr. 12 C-K-G-D-Y-P-C-NH₂
 13 C-K-G-D-F-P-C-NH₂
 5 19 Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂
 34 C-K-G-D-W-G-C-NH₂
 35 C-K-G-E-W-P-C-NH₂
 36 C-Orn-G-D-W-P-C-NH₂
 37: C-K-A-D-W-P-C-NH₂
 10 38: C-K-A[†]-D-W-P-C-NH₂
 39: C-K-G-D-W-(Sar)-C-NH₂
 40: C-K(Formyl)-G-D-W-P-C-NH₂
 41: C-K-G-D-I-P-C-NH₂
 42: C-K-G-D-(4-Cl-Phe)-P-NH₂
 15 43: C-K-(Sar)-D-W-P-C-NH₂
 44: C-K-G-D-(4-NO₂-Phe)-P-C-NH₂
 45: C-K-G-D-(NMePhe)-P-C-NH₂
 46: C-H-G-D-W-P-C-NH₂
 47: Acetyl-C-K-G-D-W-P-C-NH₂
 20 48: Mpr-K-G-D-W(Formyl)-P-C-NH₂
 49: Mvl-K-G-D-W-P-C-NH₂
 50: Mpr-K-G-D-W[†]-P-Pen-NH₂
 51: Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH₂
 52: Mpr-K-G-D-W-P-Pen[†]-NH₂
 25 53: Mpr-K-G-D-W-P[†]-Pen-NH₂
 54: Mpr-K-G-D[†]-W-P-Pen-NH₂
 55: Mpr-K-G-D-W-(Thz)-C-NH₂
 56: Mpr-K-G-D-H(2,4-DNP)-P-C-NH₂
 57: Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-Pen-NH₂
 58: Mvl-K-G-D-W-P-Pen-NH₂
 30 59: Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH₂
 60: Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH₂
 61: Mpr-K-G-D-W-P-C[†]-NH₂
 62: Mpr-(D-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 63: Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 35 64: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
 65: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 66: Mpr-(N^G,N^{G'}-ethylene-Har)-G-D-W-P-C-NH₂
 67: Mpr-(N^G,N^{G'}-ethylene-Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂

- Nr. 68: Mpr-Har-Sar-D-W-P-C-NH₂
 5 69: Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 70: Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
 71: Mpr-Har-Sar-D-W-P-PenNH₂
 72: Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-PenNH₂
 73: Mpr-Har-G-D-W-(3,4-dehydro P)-C-NH₂

15 Eksempel 17

PAI-aktivitet til peptidene

Når analysert i den standard aggregasjonsinhibisjonsanalysen
 20 beskrevet ovenfor, hadde analogene nr. 3-5 IC₅₀-verdier på 5
 µM for evnen til å inhibere ADP-indusert human blodplate-
 aggregasjon. Analog nr. 6 har derimot en IC₅₀ på mer enn 200
 µM og analog nr. 7, 100 µM. IC₅₀-vrdiene for analogene
 ifølge oppfinnelsen i denne analysen er som følger:

<u>Analog</u>	<u>Sekvens</u>	<u>Appr. IC₅₀(µM)</u>
3	G-C-G-K-G-D-W-P-C-A-NH ₂	5
4	G-C-K-G-D-W-P-C-A-NH ₂	5
5	C-G-K-G-D-W-P-C-NH ₂	5
30 6	G-C-G-K-G-D-W-C-A-NH ₂	>200
7	G-C-K-G-D-W-C-A-NH ₂	100
8	Acetyl-C-K-G-D-C-NH ₂	200
9	Mpr-K-G-D-Pen-NH ₂	25
10	C-K-G-D-W-P-C-NH ₂	5
35 11	Acetyl-C-R-G-D-Pen-NH ₂	5
12	C-K-G-D-Y-P-C-NH ₂	12
13	C-K-G-D-F-P-C-NH ₂	20
19	Mpr-K-G-D-W-P-C-NH ₂	1
34	C-K-G-D-W-G-C-NH ₂	100
35	C-K-G-E-W-P-C-NH ₂	>300

36	C-Orn-G-D-W-P-C-NH ₂	150-200
37	C-K-A-D-W-P-C-NH ₂	100
38	C-K-A [†] -D-W-P-C-NH ₂	>200
39	C-K-G-D-W-(Sar)-C-NH ₂	5
40	C-K(Formyl)-G-D-W-P-C-NH ₂	>200
41	C-K-G-D-I-P-C-NH ₂	100
42	C-K-G-D-(4-Cl-Phe)-P-NH ₂	20
43	C-K-(Sar)-D-W-P-C-NH ₂	50
44	C-K-G-D-(4-NO ₂ -Phe)-P-C-NH ₂	75
45	C-K-G-D-(NMePhe)-P-C-NH ₂	>200
46	C-H-G-D-W-P-C-NH ₂	200
47	Acetyl-C-K-G-D-W-P-C-NH ₂	2.5
48	Mpr-K-G-D-W(Formyl)-P-C-NH ₂	1
49	Mvl-K-G-D-W-P-C-NH ₂	1.5
50	Mpr-K-G-D-W [†] -P-Pen-NH ₂	>200
51	Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH ₂	0.75
52	Mpr-K-G-D-W-P-Pen [†] -NH ₂	5
53	Mpr-K-G-D-W-P [†] -Pen-NH ₂	>200
54	Mpr-K-G-D [†] -W-P-Pen-NH ₂	>100
55	Mpr-K-G-D-W-(Thz)-C-NH ₂	2
56	Mpr-K-G-D-H(2,4-DNP)-P-C-NH ₂	5
57	Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-Pen-NH ₂	1
58	Mvl-K-G-D-W-P-Pen-NH ₂	1
59	Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH ₂	1
60	Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH ₂	0.15
61	Mpr-K-G-D-W-P-C [†] -NH ₂	15
62	Mpr-K [†] -G-D-W-P-Pen-NH ₂	2.5
63	Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH ₂	0.10
64	Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH ₂	0.25
68	Mpr-Har-Sar-D-W-P-C-NH ₂	3.0
69	Mpr-(Acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH ₂	0.5
70	Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH ₂	0.5
71:	Mpr-Har-Sar-D-W-P-PenNH ₂	2.5
72:	Mpr-(Phenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-PenNH ₂	0.5

Eksempel 18Aktiviteten til lineære mot cycliske peptider

Når testet for inhibisjon av fibrogenbinding til GP IIb-IIIa i plateanalysen, var lineær RGDW-NH₂ meget lik i aktivitet som cyclisk GCGRGDWPCA-NH₂ (fig. 29). I kontrast til dette var lineær KGDW-NH₂ mye mindre potent enn cyclisk GCGKGDWPCA-NH₂ (fig. 29). For KGDW-forbindelsene, men ikke RGDW-forbindelsene, resulterte cyclisering i en markert økning i evnen som peptidet hadde til å inhibere bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa.

Eksempel 19Resultater av platebindingsanalyser for syntetiske peptider

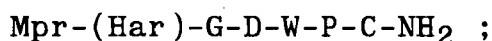
Peptidene fremstilt i eksempel 17, i tillegg til å bli vurdert for deres evne til å inhibere blodplateaggregasjon direkte, ble også testet i blodplateanalysene ifølge oppfinnelsen som beskrevet ovenfor. Resultatene for analogene 4-8 er vist i fig. 30. Som angitt i figuren har disse analogene forskjellige evner, i varierende grad, når det gjelder inhibering av bindingen av fibrinogen til GP IIb-IIIa sammenlignet med vitronektin til vitronektinreseptoren. Analog nr. 4 ser blant denne gruppen ut til å ha det høyeste differensialet. Analog nr. 7 og nr. 5 på den annen side er også meget spesifikke, og har utmerkede blodplateaggregasjonsinhibisjonsaktiviteter.

Eksempel 20Virksomheter av rensede peptider på celleadhesjon

M21 melanomceller ble merket med ^{35}S -metionin og deretter tilsatt til vitronektin-belagte plater i nærvær av de angitte konsentrasjonene av de rensede slangevenompeptidene. Cellekoblingen ble målt ved oppløsning av cellene gjenværende etter en inkubasjon og vask, som beskrevet i seksjon C, på side 40. Som vist i fig. 31 hadde hverken barbourin eller peptid 1 (forkortet barbourin) en signifikant virkning på celleadhesjonen til vitronektin, til tross for at begge er potente inhibitorer av blodplateaggregasjonen som vist i eksemplene 2 og 3. I kontrast til dette var cotiarin som er en potent inhibitor for vitronektinbinding til vitronektinreseptoren meget potent når det gjelder inhibering av cellekobling til vitronektin. I et lignende eksperiment ble peptid nr. 3, peptid nr. 3 med K erstattet av R (CGCRGDWPCA-NH₂) og RGDS undersøkt på M21 cellekobling til vitronektin. Som vist i fig. 32 er RGDS og CGCRGDWPCA-NH₂ potente inhibitorer av cellekobling mens CGCRGDWPCA-NH₂ ikke var effektiv opp til 60 μM .

Eksempel 21Sammenlignings av analogene 60 og 10

Analogene 60 og 19 beskrevet ovenfor er peptider ifølge oppfinnelsen inneholdende sekvensen K*GDX og er identiske med unntagelse av innbefatningen av K*. Analog 60 har formelen:



analog 19 har formelen:

Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂ .

Disse analogene ble testet ved standard blodplateaggregasjonsinhibisjonsanalyser og anvendelse av celleadhesjonsanalysen ifølge eksempel 20 ovenfor. Resultatene er vist i figurene 33 og 34. Som vist i fig. 33 er analog nr. 60 effektiv ved meget små konsentrasjoner når det gjelder inhibering av blodplateaggregasjon, og er relativt mindre effektiv når det gjelder forhindring av celleadhesjon til vitronektin. Fig. 34 viser at analog nr. 19 har god blodplateaggregasjonsinhibisjonsaktivitet samt spesifisitet, men er mindre aktiv i blodplateaggregasjonsinhibisjonsanalysen enn analog nr. 60 motparten. Analog nr. 60 har en IC₅₀ for blodplateaggregasjon på omtrent 0,15 nM; analog nr. 19 har en IC₅₀ på omtrent 1 nM.

Eksempel 22

Folt's modell for trombose i coronararterie fra hund

A. Initiering av cykliske strømningsreduksjoner (CFRs) i åpen bryst hund. En stopper plassert på venstre anteriorgående (LAD) koronararterie til en 20 kg hund ble utført som tidligere beskrevet. Fasiske og gjennomsnittlige blodstrømninger målt av en elektromagnetisk (EM) utstrømningsprobe og Doppler-strømningsprobe er vist i fig. 35.

B. Virkning av cyklisk CGCRGDWPCA-NH₂ (analog nr. 3) på CFR i åpen bryst hund. En dose på 10 mg av dette peptidet ble infusert inn i perifervenene i hunden. Blodstrømningsmønstrene i LAD som beskrevet ovenfor, er vist i fig. 36. Den delvise ablasjon av CFR som vist i den reduserte stigningen av strømningsreduksjonene bør legges merke til. Det er

også å bemerke at strømmingen ikke er redusert i samme grad som i kontroll (A).

C. En andre infusjon av 40 mg analog nr. 3 ble gitt inn i en perifervene. Som vist i fig. 37 indikerer den fullstendige ablasjon av CFR at fullstendig strømming er blitt gjenopprettet i LAD.

Eksempel 23

Konstruksjon av ekspresjonsvektorer for barbourinpeptider

Et gen kodende for full lengde [L⁴¹] barbourinpeptid (1-73) ble oppstilt fra syntetiske oligonukleotider som vist i fig. 38, som ble kinasebehandlet, sammensmeltet og ligert inn i ECoRI-HindIII-spaltet M13mp18 ved anvendelse av standard prosedyrer. Det bakterielle alkaliske fosfatasegen (phoA)-signalsekvensen (Watson, M.E., Nucleic Acids Research (1984) 12:5145) ble tilsatt til barbourinkonstruksjonen ved liggering av syntetiske oligonukleotider inn i EcoRI/NcoI-setene til [L⁴¹] barbourin (1-73)-konstruksjonen som vist i fig. 39. Nukleotidsekvensene til alle konstruksjoner ble verifisert ved Sanger-dideoksykjedetermineringsmetoden.

En forkortet versjon av dette peptidet ble også konstruert fra syntetiske oligonukleotider som bare koder for aminosyrene 28-73 av fullengdemolekylet. To endringer, Q²⁸ til E²⁸ og A⁶⁴ til C⁶⁴, ble introdusert ved anvendelse av seterettet mutagenese som beskrevet av Kunkel et al., Meth. Enzymol. (1987) 154:367. phoA-signalsekvensen ble tilsatt til den forkortede versjonen som beskrevet ovenfor (fig. 40). I tillegg ble signalsekvensen for E. coli varme-stabil enterotoksin II (Picken, R. W. et al., Infect. Immun. (1983) 42:269) tilsatt til den forkortede versjon ved anvendelse av syntetiske oligonukleotider med EcoRI og NcoI kompatible

ender. Alle bakterielle sekresjonskonstruksjoner ble subklonet inn i den bakterielle ekspresjonsvektoren pPROK-1 (Brosius, J., *Gene* (1984) 27:151, *ibid*:161), tilgjengelig kommersielt fra CLONTECH Lab., Inc., ved anvendelse av EcoRI og HindIII restriksjonsendonukleaser.

Et gen kodende for tandemgjentakelser av det ønskede tittelpeptidet ble fremstilt ved anvendelse av polymerasekjedereaksjonen (PCR) for å fremstille multimeriseringsenheten fra full-lengde barbourinpeptid 1-73 inneholdende L41 og C64.

Fig. 41 viser oligonukleotidene anvendt for PCR-syntesen. PCR-reaksjonen ble utført ifølge fremgangsmåten til Saiki, R.K. et al., *Science* (1988) 239:487. Den resulterende polymergrensen inneholder metioniner ved hvilke som helst ende av sekvensen som vist i fig. 42 og tilveiebringer ønskelige restriksjonssteder for konstruksjonen.

Tandem-gjentakelser blir utført fra de individuelle multimerdannende komponentene ved f.eks. ligering av et EcoRI-BamHI fragment til et BglII/HindIII fragment i en M13mp18 vektor spaltet med EcoRI/HindIII for å danne en dimer. Den resulterende dimeren blir spaltet ut med EcoRI BamHI og ligert til et BglII/HindIII fragment for å fremstille en trimer, og videre helt til den ønskede størrelsen blir oppnådd. Denne konstruksjonen er vist i diagrammet i fig. 43.

Multimeren ble deretter ligert inn i *E. coli* vektor pKK233-2, Amann, E. et al., *Gene* (1985) 40:183, tilgjengelig fra Clontech, ved spaltning av vektoren med NcoI/HindIII og ligering av et monomersubfragment av NcoI/BamHI og multimer-subfragmenter av BglII/HindIII.

For ekspresjon som et fusjonsprotein ble ovennevnte spaltede vektor anvendt sammen med et NcoI/EcoRI-subfragment inneholdende en noe modifisert amino-terminal del (aminosyrene 1-72) av kloramfenikolacetyltransferasegenet (Chang, C.N. et

al., Gene (1987) 55:189) og EcoRI/HingIII-subfragmenter av multimerkonstruksjoner.

Eksempel 24

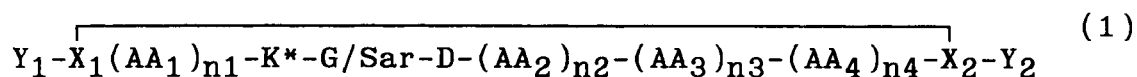
Ekspresjon av rekombinante gener

Proteinekspresjon fra alle de rekombinante plasmidene beskrevet ovenfor blir innført ifølge Kanamari et al., Gene (1988) 66:295 etter transfeksjon inn i hensiktsmessige E. coli-vertstammer. Produktene blir karakterisert ved natrium-dodecylsulfatpolyakrylamidgel-elektroforese og ved deres evne til å inhibere ADP-indusert blodplateaggregasjon i plate-rikt plasma. Etter rensing blir multimeriske proteiner omdannet til monomerenheter med cyanogenbromidspaltning og produktene analysert som ovenfor.

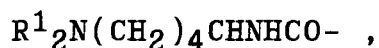
P a t e n t k r a v

1.

Analogifremgangsmåte for fremstilling av en terapeutisk aktiv spesifikk blodplateaggregasjonsinhibitor (PAI) peptid med evne til å inhibere bindingen av Fg eller vWF, GP IIb-IIIa med vesentlig mer, det vil si at enten er prosent inhibisjon minst to ganger høyere ved en gitt konsentrasjon av PAI eller at konsentrasjonen av PAI som forårsaker 50% inhibisjon, er minst to ganger mindre for Fg eller vWF/GP IIb-IIIa-bindingsinhibisjonen enn for alternativ ligand/-reseptorbinding, dvs. potensitet enn inhibering av bindingen av vitronektin til vitronektinreseptoren eller fibronektin til fibronektinreseptoren, der PAI har formelen:



hvor K* er et lysylresidie med formelen:

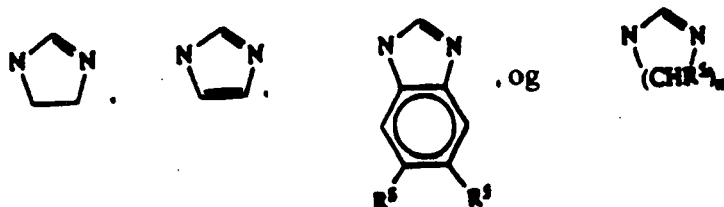


hvor hver R¹ er uavhengig H, alkyl (1-6C) eller optil en R¹ er R²-C=NR³ ,

hvor R² er H, alkyl (1-6C) eller er en substituert eller usubstituert fenyl eller benzylrest, eller NR⁴₂ der hver R⁴ er uavhengig H eller alkyl (1-6C), og

R³ er H, alkyl (1-6C), fenyl eller benzyl, eller

R²-C=NR³ er en rest valgt fra gruppen bestående av:



35

hvor m er et tall på 2-3, og hver R^5 er uavhengig H eller alkyl (1-6C);

og der en eller to (CH_2) kan bli erstattet med O eller S forutsatt at nevnte O eller S ikke er ved siden av et annet heteroatom;

AA_1 er en liten, nøytral (polar eller upolar) aminosyre, og n_1 er et tall på 0-3;

AA_2 er en nøytral, upolar, stor (aromatisk eller uaromatisk) eller en polar aromatisk aminosyre, og n_2 er et tall på 0-3;

AA_3 er et prolinresidie eller et modifisert prolinresidie og n_3 er et tall på 0-1;

AA_4 er en nøytral, liten aminosyre eller den N-acylerte form derav, og n_4 er et tall på 0-3;

hver av X_1 og X_2 er uavhengig en residie som kan danne en binding mellom X_1 og X_2 for å oppnå en cyklisk forbindelse som vist;

hver av Y_1 og Y_2 er uavhengig en ikke-interfererende substituent, eller kan være fraværende;

hvor en eller flere peptidbindinger eventuelt kan bli erstattet av en binding valgt fra gruppen bestående av $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, CH_2CH_2- , $-CH=CH-$ (cis og trans), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ og $-CH_2SO-$;

forutsatt at dersom n_3 er 0; er enten:

- 1) summen av n_2 og n_4 minst 2; eller
- 2) K^* må være forskjellig fra Har eller K; eller
- 3) X_2 må være forskjellige fra Cys (C), penicillamin (Pen), eller 2-amino-3,3-cyklopentanmetylen-3-merkaptopropionsyre (APmp); eller
- 4) en eller flere peptidbindinger er erstattet med nevnte alternerende binding, karakterisert ved at den omfatter:

begynne syntesen fra den karboksy-terminale enden av nevnte peptid ved anvendelse av en aminosyre som har en alfa-aminobeskyttende gruppe, i det nevnte aminosyre er bundet til en harpiskbærer, fullføre oppstillingen av en beskyttet peptid-harpikskjede, fjerning av nevnte beskyttelsesgruppe,

spaltning av nevnte peptid fra nevnte harpiks, syklisering av nevnte peptid og eventuelt rensing av nevnte peptid.

2.

5 Analogifremgangsmåte ifølge krav 1, hvor Y_1 er H, acyl eller en peptidrest eller derivatisert form derav eller er fraværende og/eller

Y_2 er OH, NH_2 eller en peptidrest eller en derivatisert form derav eller er fraværende; og/eller

10 hvori X_1 og X_2 blir valgt fra gruppen bestående av cystein (C), merkaptopropionyl (Mpr) og penicillamin (Pen); og/eller hvori AA_1 er G og n_1 er 0 eller 1; og/eller

hvori AA_2 velges fra gruppen bestående av gruppen W, F, L, Y og V; og/eller

15 hvori AA_2 er W; og/eller hvori K^* er K, Har, acetimidyl-Lys eller fenylimidyl-Lys; og/eller

hvori forbindelsen med formel 1 velges fra gruppen bestående av

PAI 3: G-C-G-K-G-D-W-P-C-A-NH₂
 20 PAI 4: G-C-K-G-D-W-P-C-A-NH₂
 PAI 5: C-G-K-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 10: C-K-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 12: C-K-G-D-Y-P-C-NH₂
 PAI 13: C-K-G-D-F-D-C-NH₂
 25 PAI 19: Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 25: Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-C-NH₂
 PAI 34: C-K-G-D-W-G-C-NH₂
 PAI 39: C-K-G-D-W-(Sar)-C-NH₂
 PAI 42: C-K-G-D-(4-Cl-Phe)-P-NH₂
 30 PAI 43: C-K-(Sar)-D-W-P-C-NH₂
 PAI 44: C-K-G-D-(4-NO₂-Phe)-P-C-NH₂
 PAI 47: Acetyl-C-K-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 48: Mpr-K-G-D-W(formyl)-P-C-NH₂
 PAI 49: Mvl-K-G-D-W-P-C-NH₂
 35 PAI 51: Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 52: Mpr-K-G-D-W-Pen[†]-NH₂.
 PAI 55: Mpr-K-G-D-W-(Thz)-C-NH₂

- PAI 57: Mpr-K-G-D-(2-Nal)-P-Pen-NH₂
 PAI 58: Mvl-K-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 59: Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH₂
 PAI 60: Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH₂
 5 PAI 61: Mpr-K-G-D-W-P-C†-NH₂
 PAI 62: Mpr-K†-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 63: Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 64: Mpr-(acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 65: Mpr-(acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 10 PAI 66: Mpr-(N^G,N^{G'}-etylen-Har)-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 67: Mpr (N^G,N^{G'}-etylen-Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 68: Mpr-Har-Sar-D-W-P-C-NH₂
 PAI 70: Mpr-(fenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂
 PAI 71: Mpr-Har-Sar-D-W-P-Pen-NH₂
 15 PAI 72: Mpr-(fenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂
 PAI 73: Mpr-Har-G-D-W-(3,4-dehydro-P)-C-NH₂
 Mpr-K-G-D-Y(OMe)-P-C-NH₂
 Mpr-K-G-D†-W-P-Pen-NH₂

20 eller sykliske former derav, k a r a k t e r i -
 s e r t v e d a t det anvendes samme substituerte
 utgangsmateriale.

3.

25 Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
 sjonsinhibitoren er

Mpr-K-G-D-W-P-C-NH₂, k a r a k t e r i s e r t v e d
 at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

4.

30 Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
 sjonsinhibitoren er

Mpr-K-G-D-W(formyl)-P-C-NH₂, k a r a k t e r i s e r t
 v e d a t det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

5.

35 Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
 sjonsinhibitoren er

Mvl-K-G-D-W-P-C-NH₂, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

6.

5 Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-K-G-D-W-P-Pen-NH₂, k a r a k t e r i s e r t v e d
at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

10 7.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-(Har)-G-D-W-P-C-NH₂, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

15

8.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

20 Mpr-K-G-D-W-(Pip)-Pen-NH₂, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

9.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

25 Mpr-(Har)-G-D-W-P-Pen-NH₂, k a r a k t e r i s e r t
v e d at det anvendes samme substituerte utgangsmateriale.

10.

30 Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-(acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂, k a r a k t e r i s e r t
s e r t v e d at det anvendes samme substituerte
utgangsmateriale.

35 11.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-(acetimidyl-Lys)-G-D-W-P-Pen-NH₂, k a r a k t e r i-
s e r t v e d a t d e t a n v e n d e s s a m m e s u b s t i t u e r t e
u t g a n g s m a t e r i a l e .

5 12.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-(fenylimidyl-Lys)-G-D-W-P-C-NH₂, k a r a k t e r i-
s e r t v e d a t d e t a n v e n d e s s a m m e s u b s t i t u e r t e
10 u t g a n g s m a t e r i a l e .

13.

Analogifremgangsmåte ifølge krav 2, hvor blodplateaggrega-
sjonsinhibitoren er

Mpr-Har-G-D-W-(3,4-dehydro-Pro)-C-NH₂, k a r a k t e r i-
s e r t v e d a t d e t a n v e n d e s s a m m e s u b s t i t u e r t e
15 u t g a n g s m a t e r i a l e .

20

25

30

35

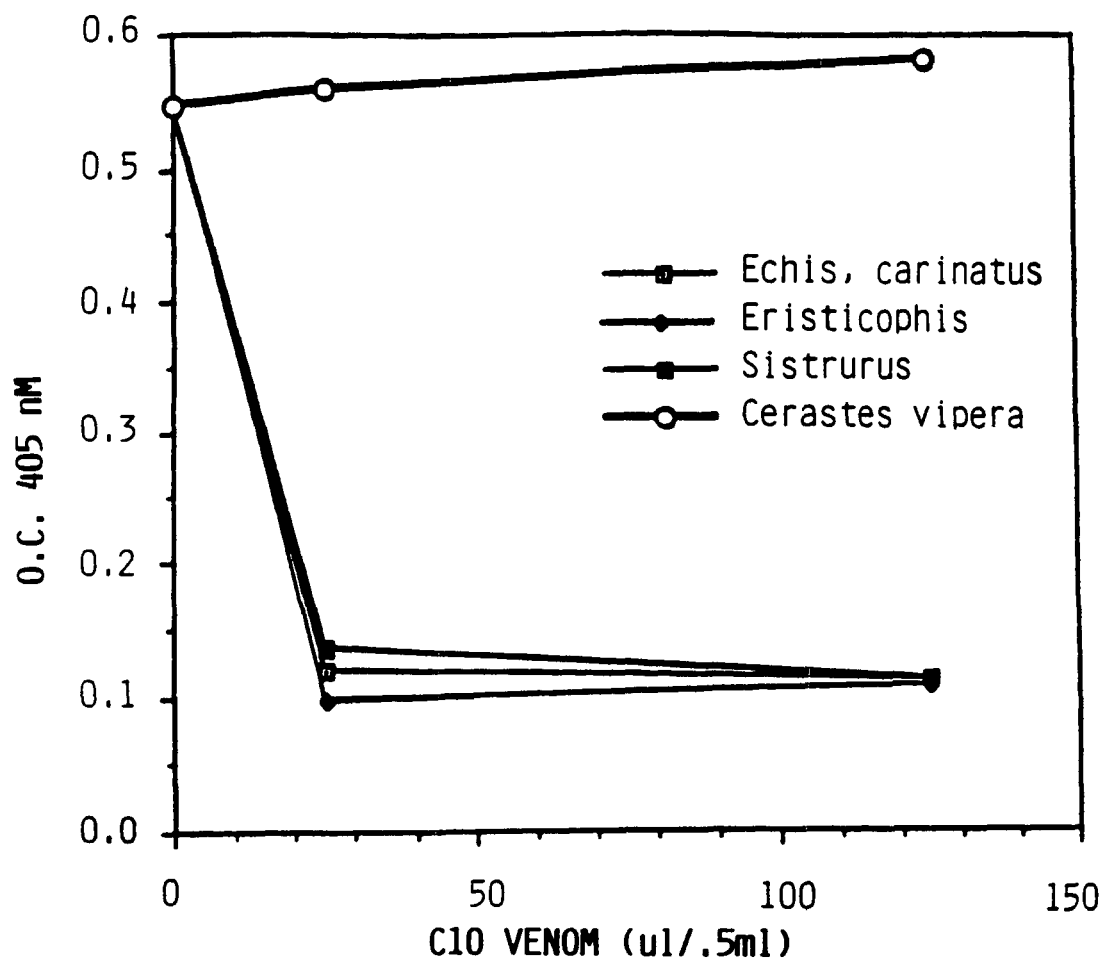


FIG. I

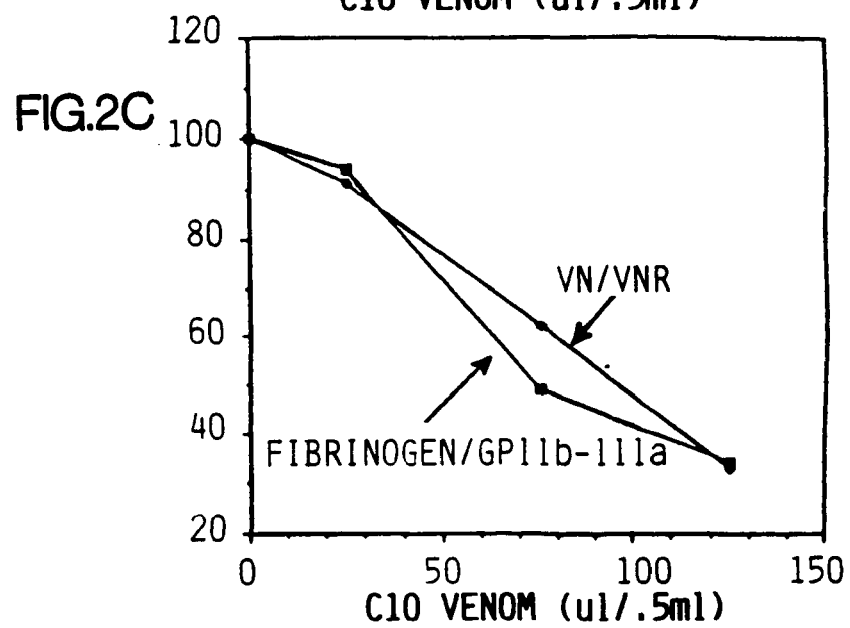
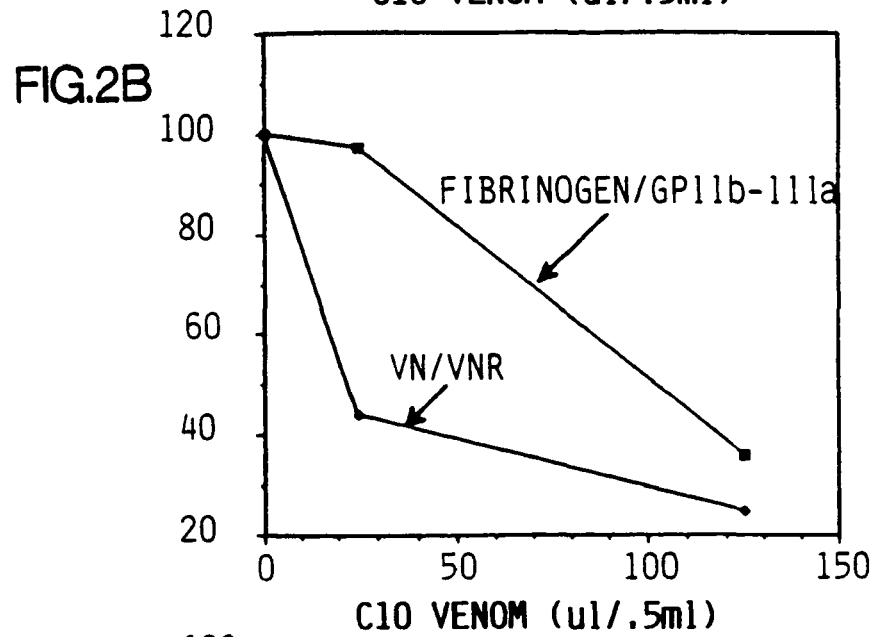
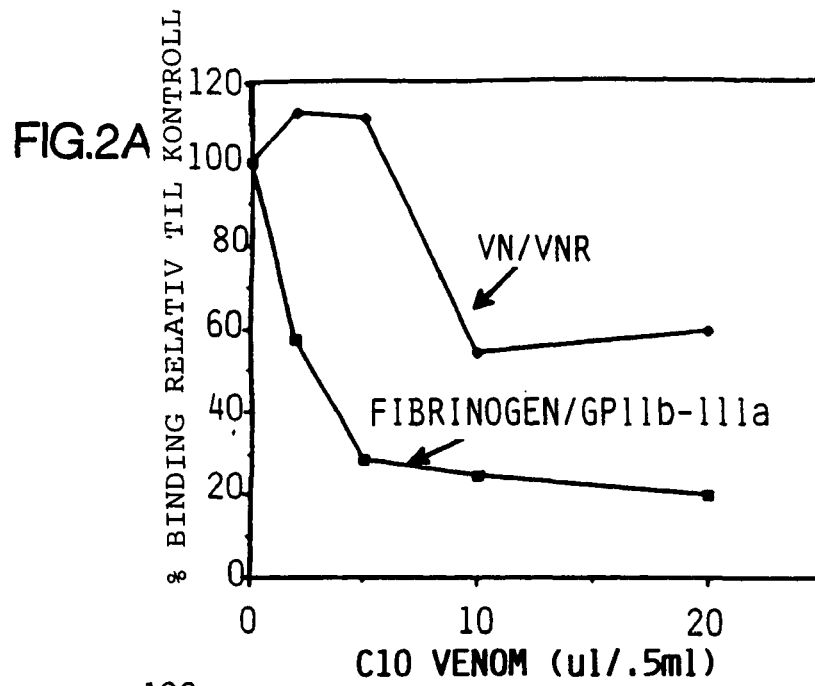
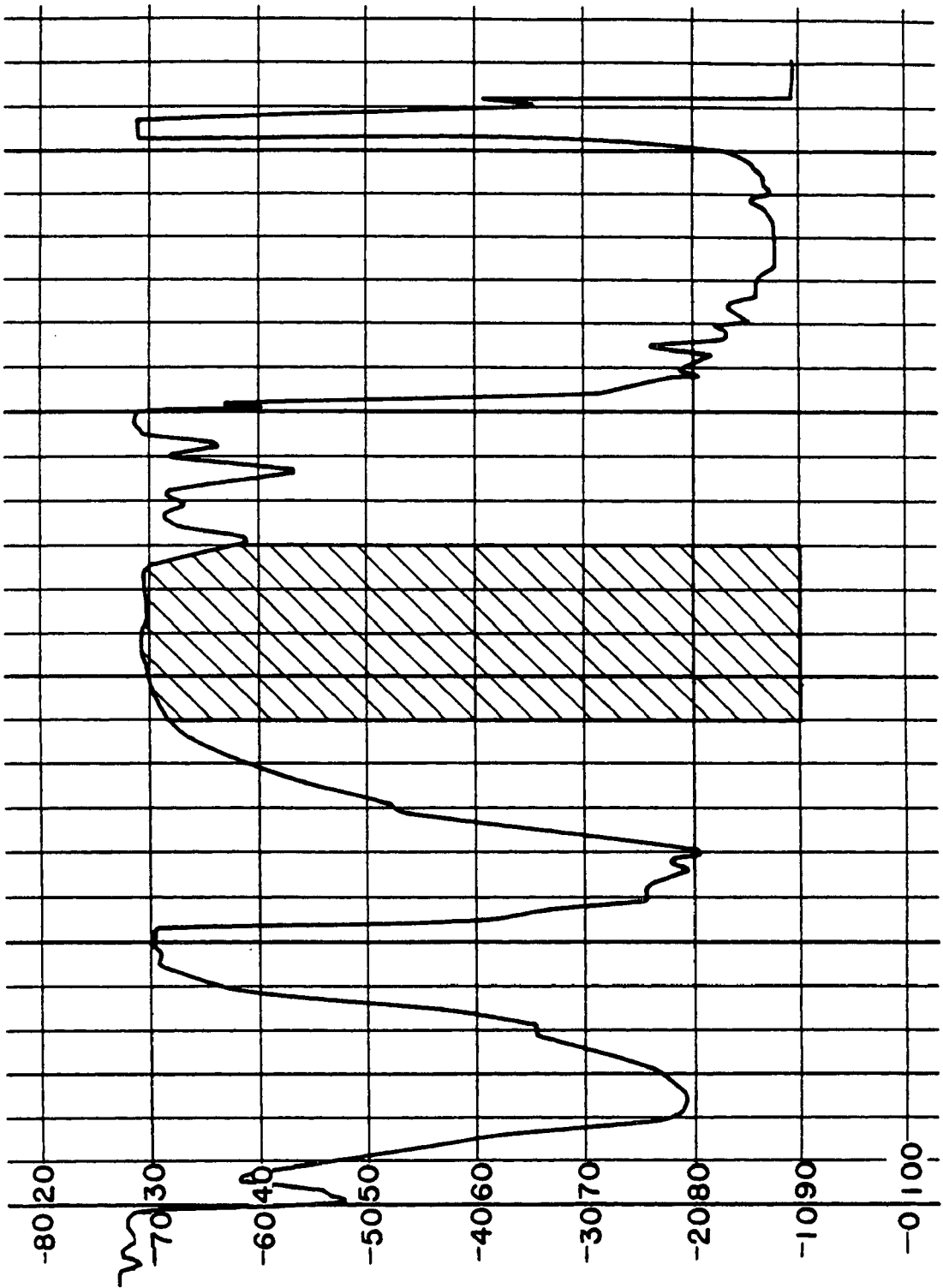


FIG. 3



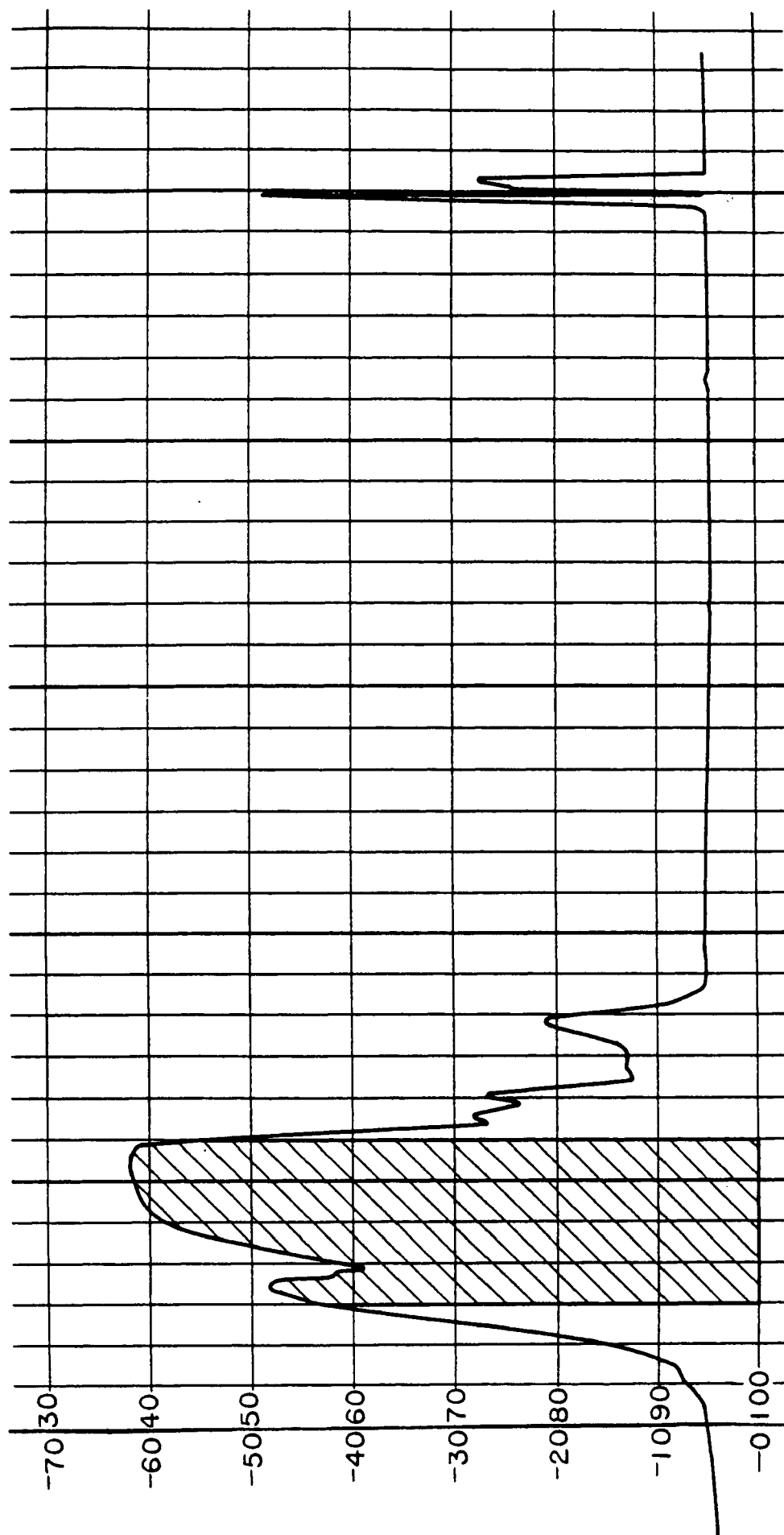


FIG. 4

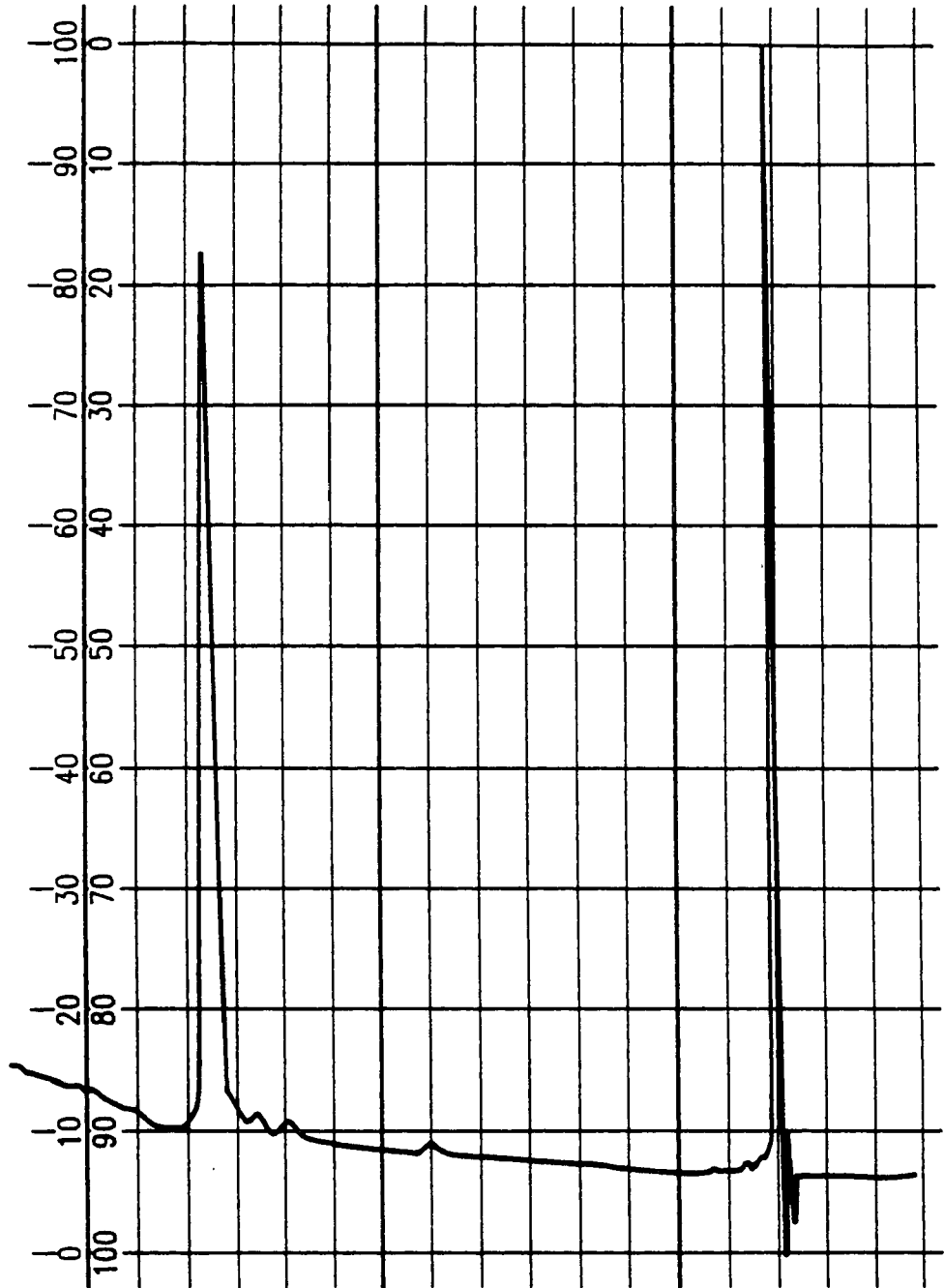
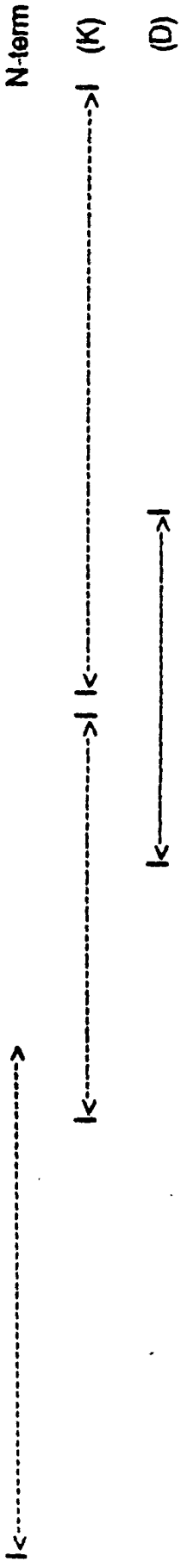


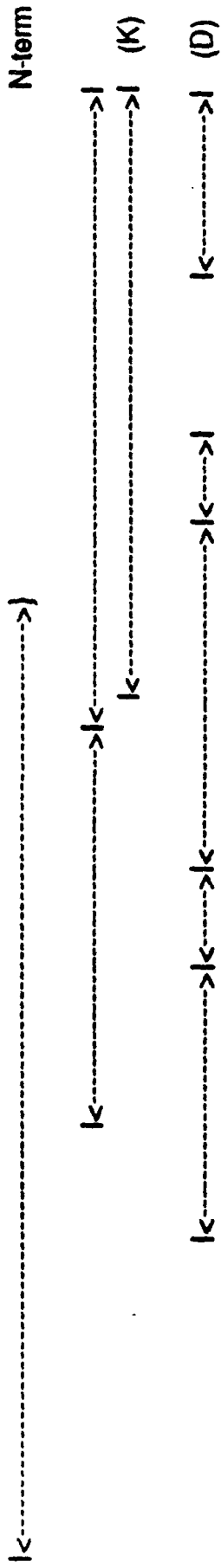
FIG. 5

FIG. 6-2

Tergeminin
EAGEECDGSPANPCDDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRCFMKKGTVCRVARGDWNDTCTGQSADCP RNGLYG



Cerastin
EAGEECDGTPENPCDDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRCFMKKGTVCRVARGDWNDTCTGQSADCP RNGLYG



Ruberin
EAGIECDGSL ENPCDDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCRCFKKGTVC RPARGDWNDTCTGQSADCP RNGLYG



FIG.6-4

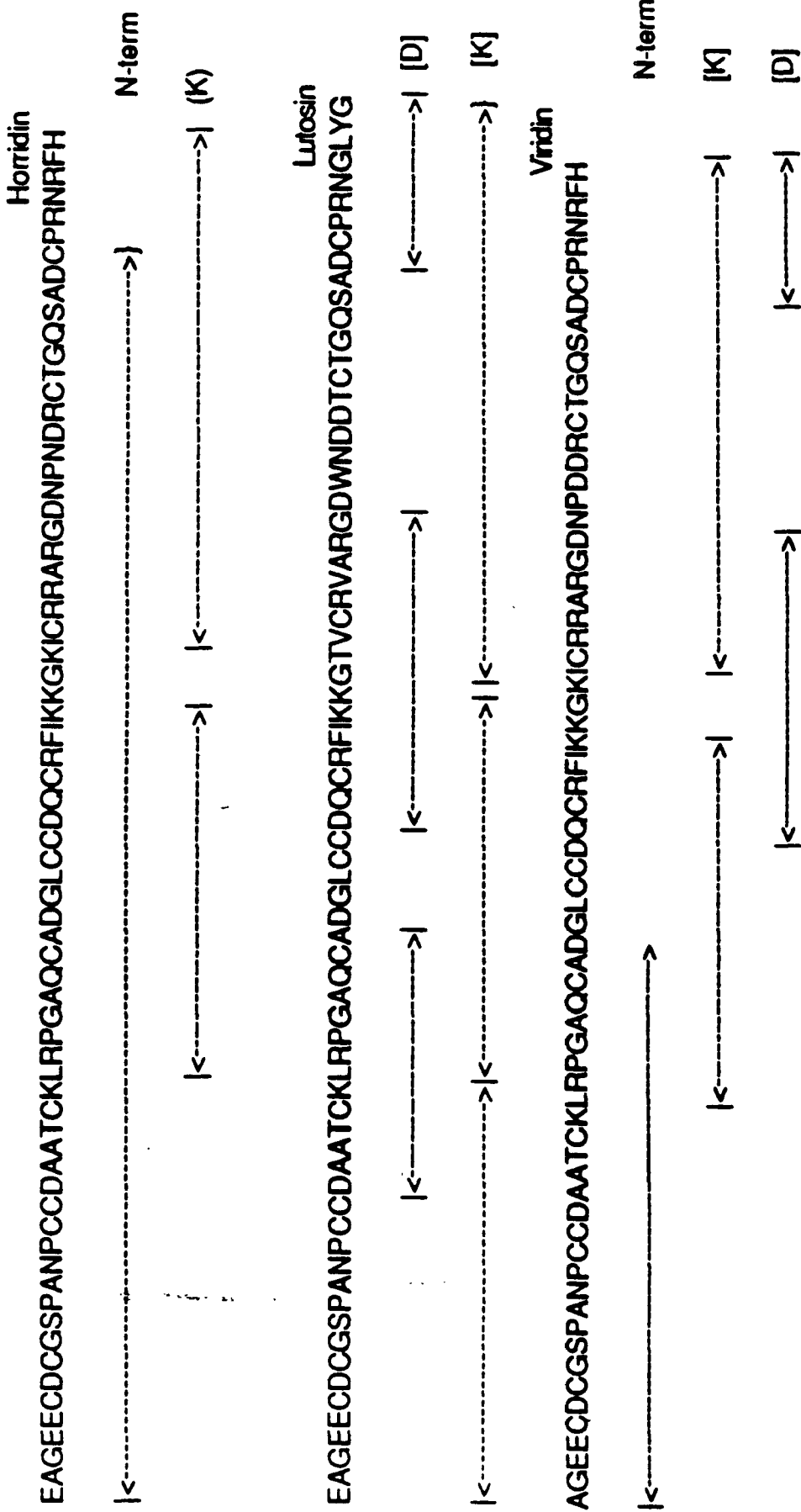
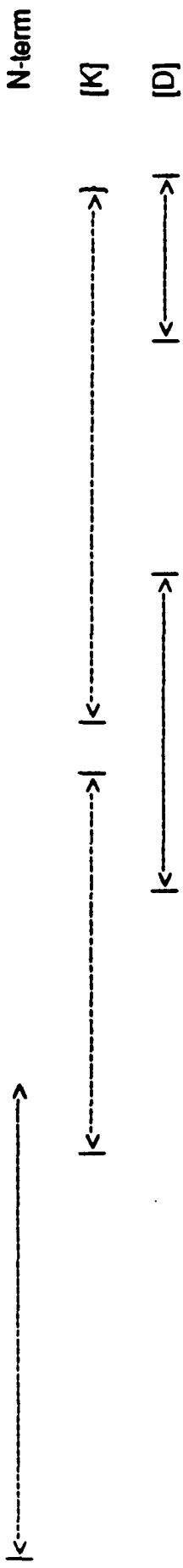
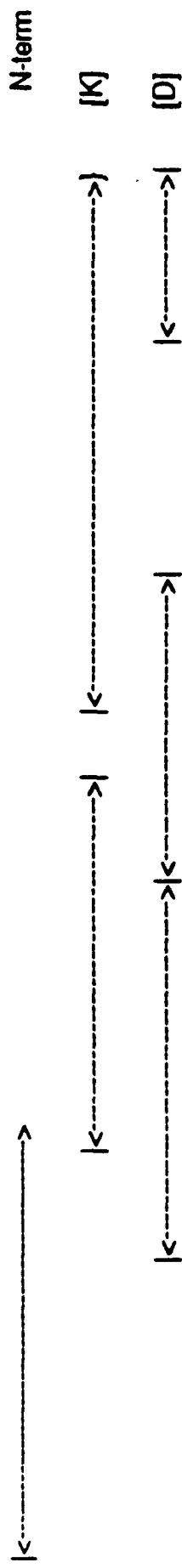


FIG. 6-5

Mobassin
EAGIECDGSPENPCCDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCQRFIKKGKICRRARGDNPDDRCTGQSADCPNRFHA



Basilicin
AGEECDGSPANPCCDAATCKLRPGAQCAEGLCCDQCQRFIKKGKICRRARGDNPDDRCTGQSADCPNRFHA



Durissin
AGEECDGSPANPCCDAATCKLRPGAQCADGLCCDQCQRFIKKGTVCRPARGDWDDTCTGQSADCPNRLYG

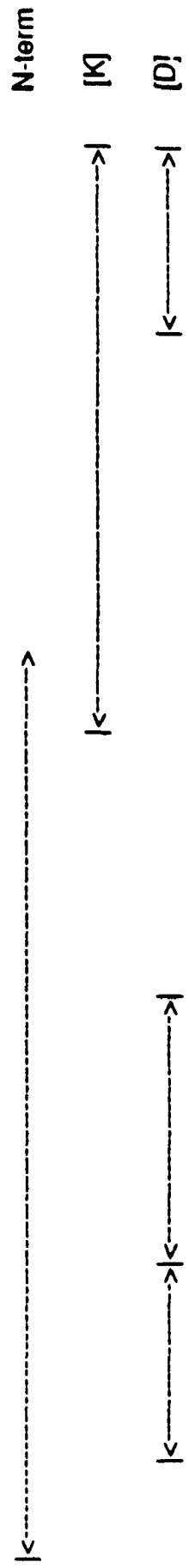


FIG. 6-6

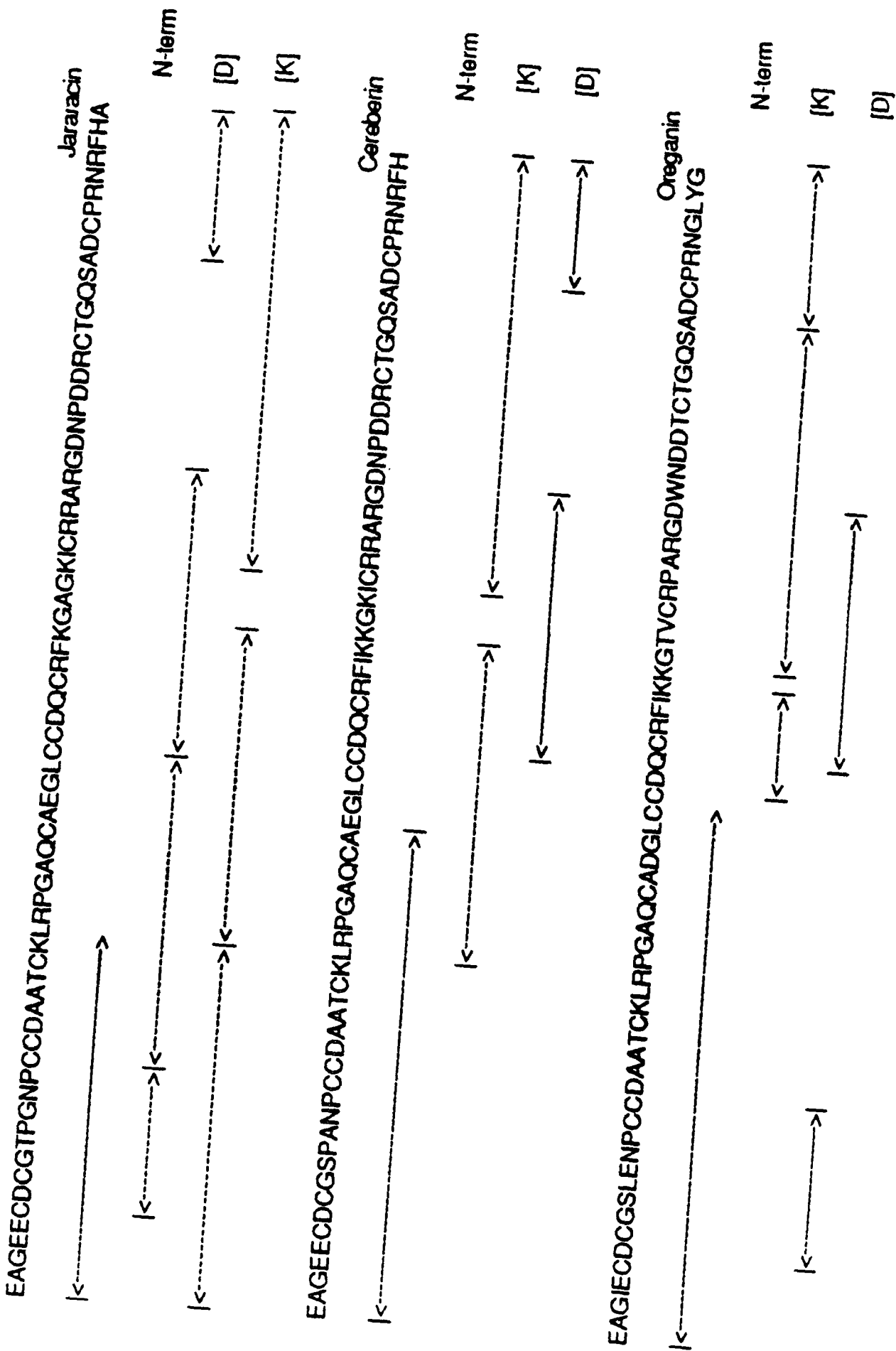
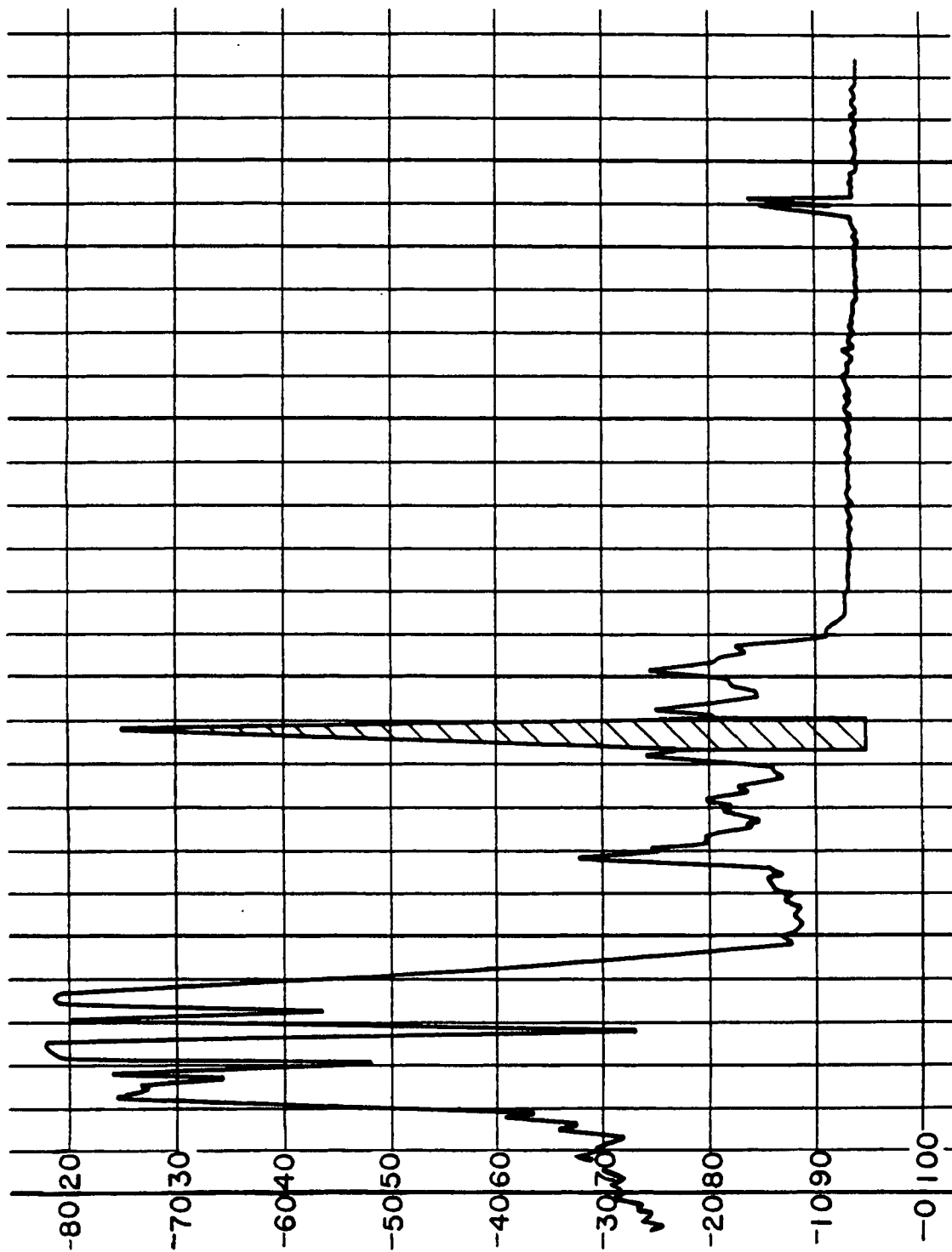


FIG. 7



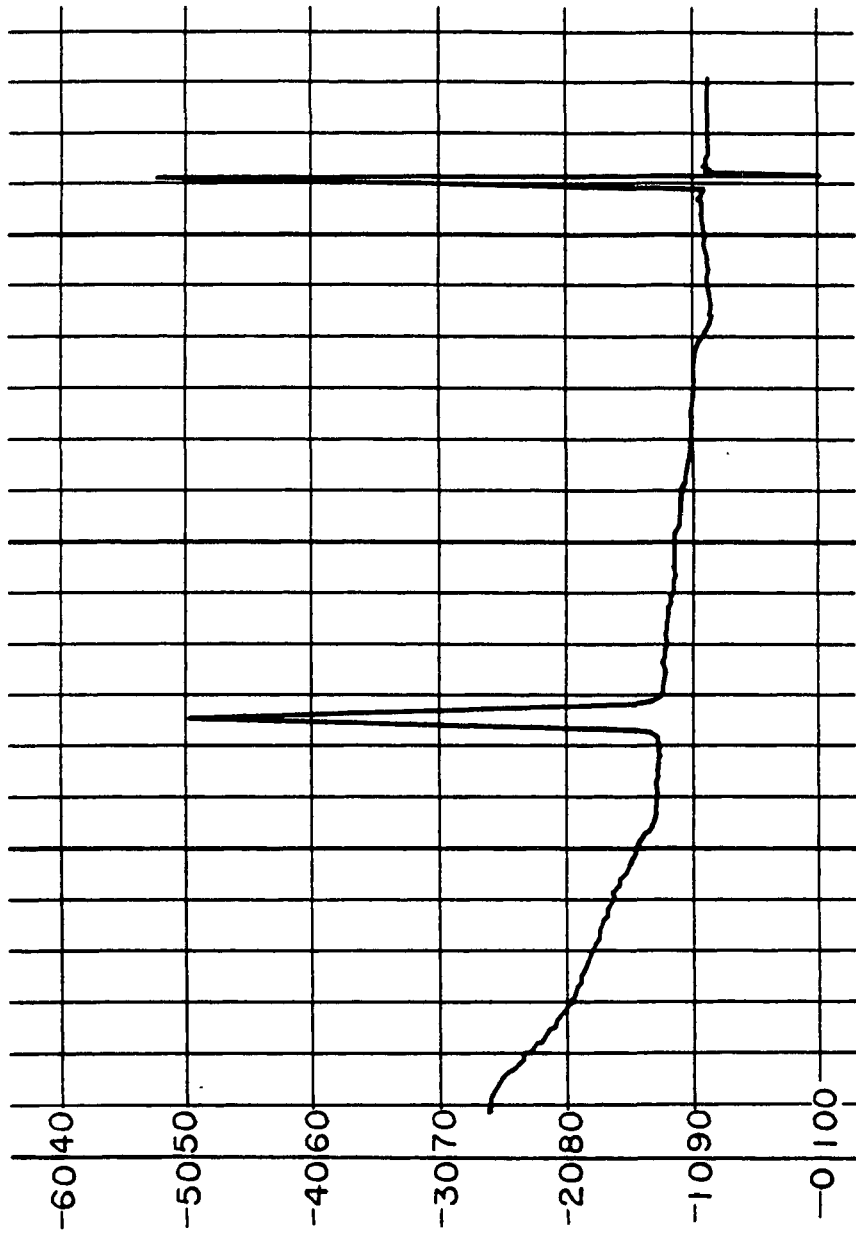
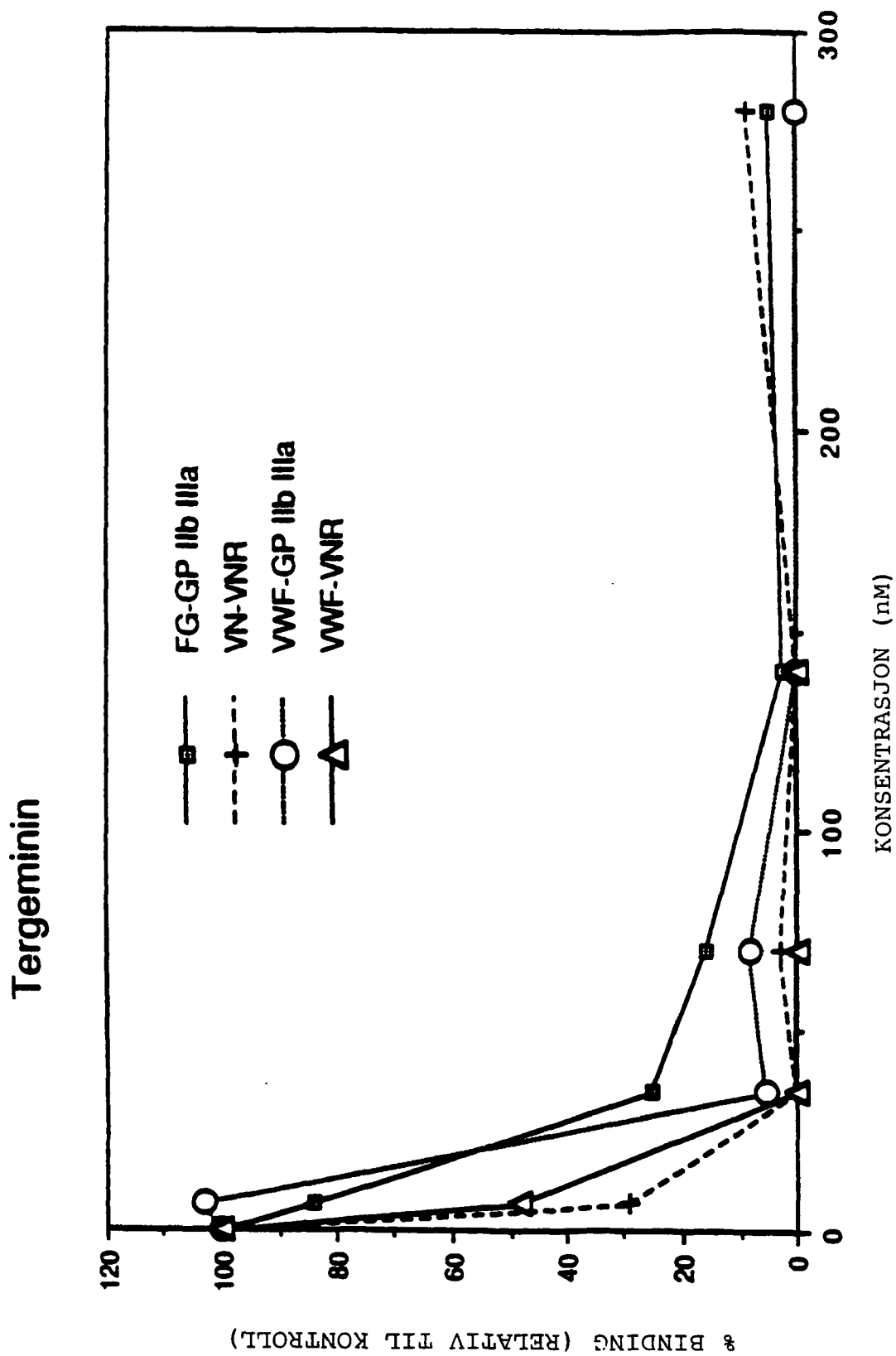


FIG. 8



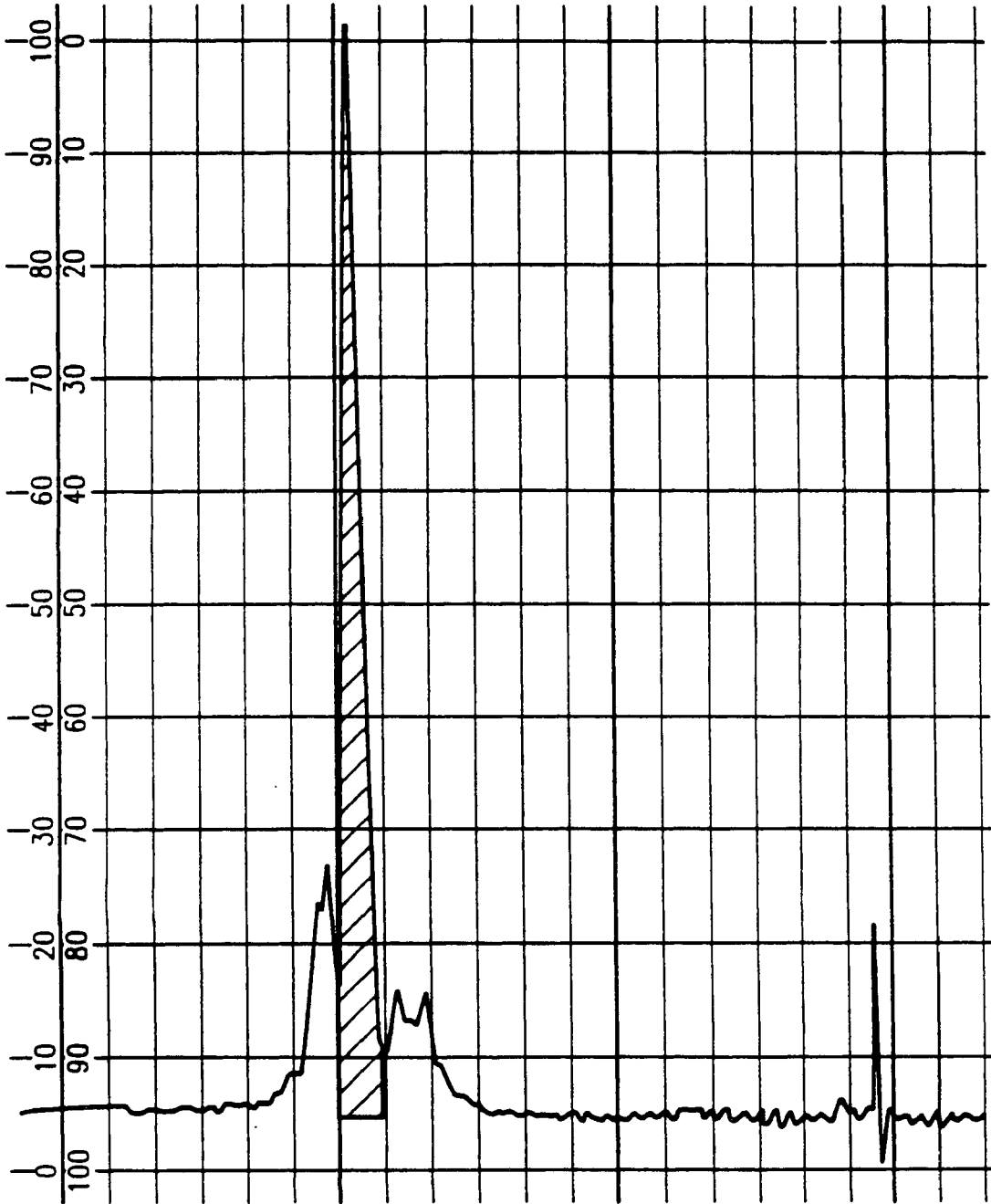


FIG. 10

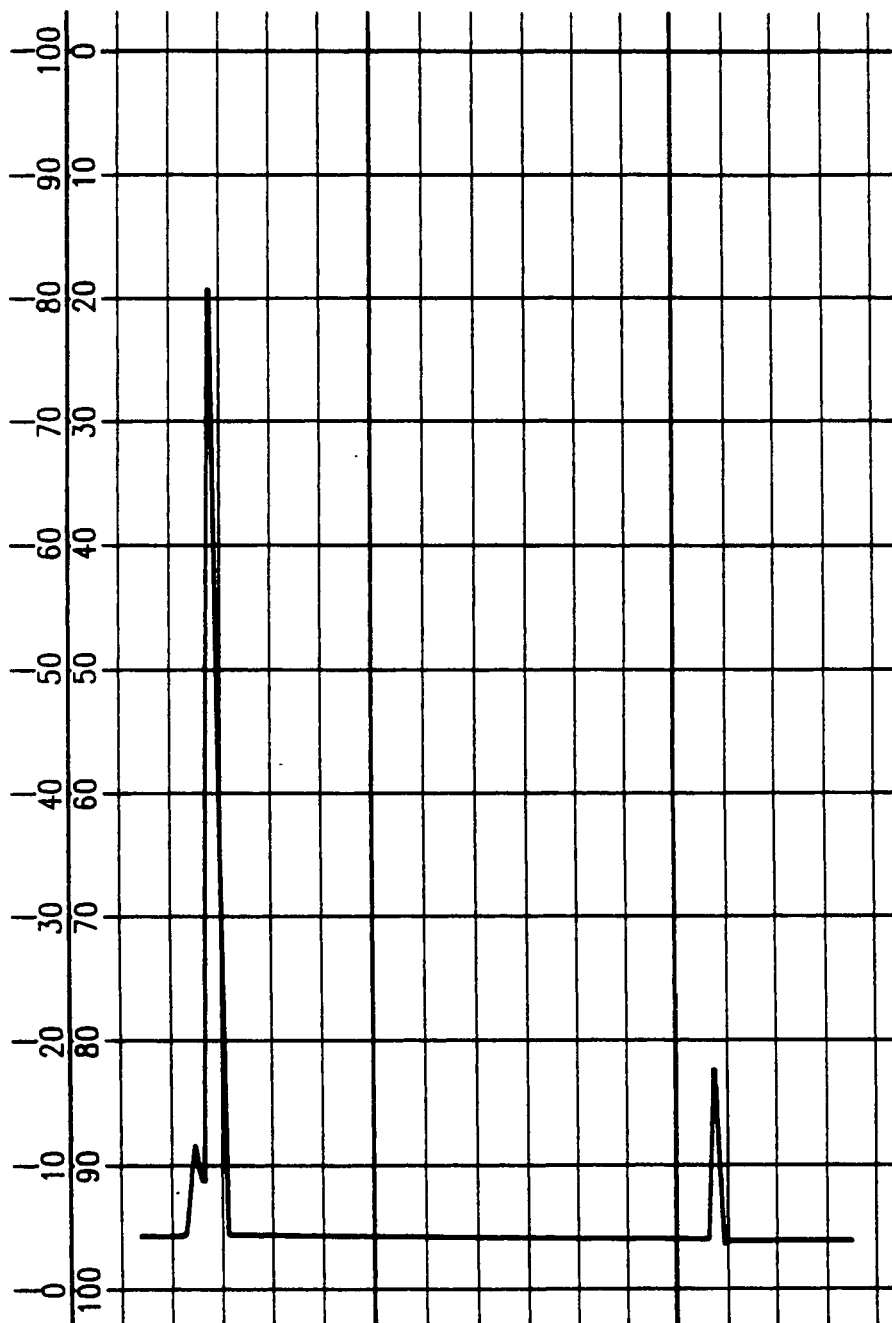
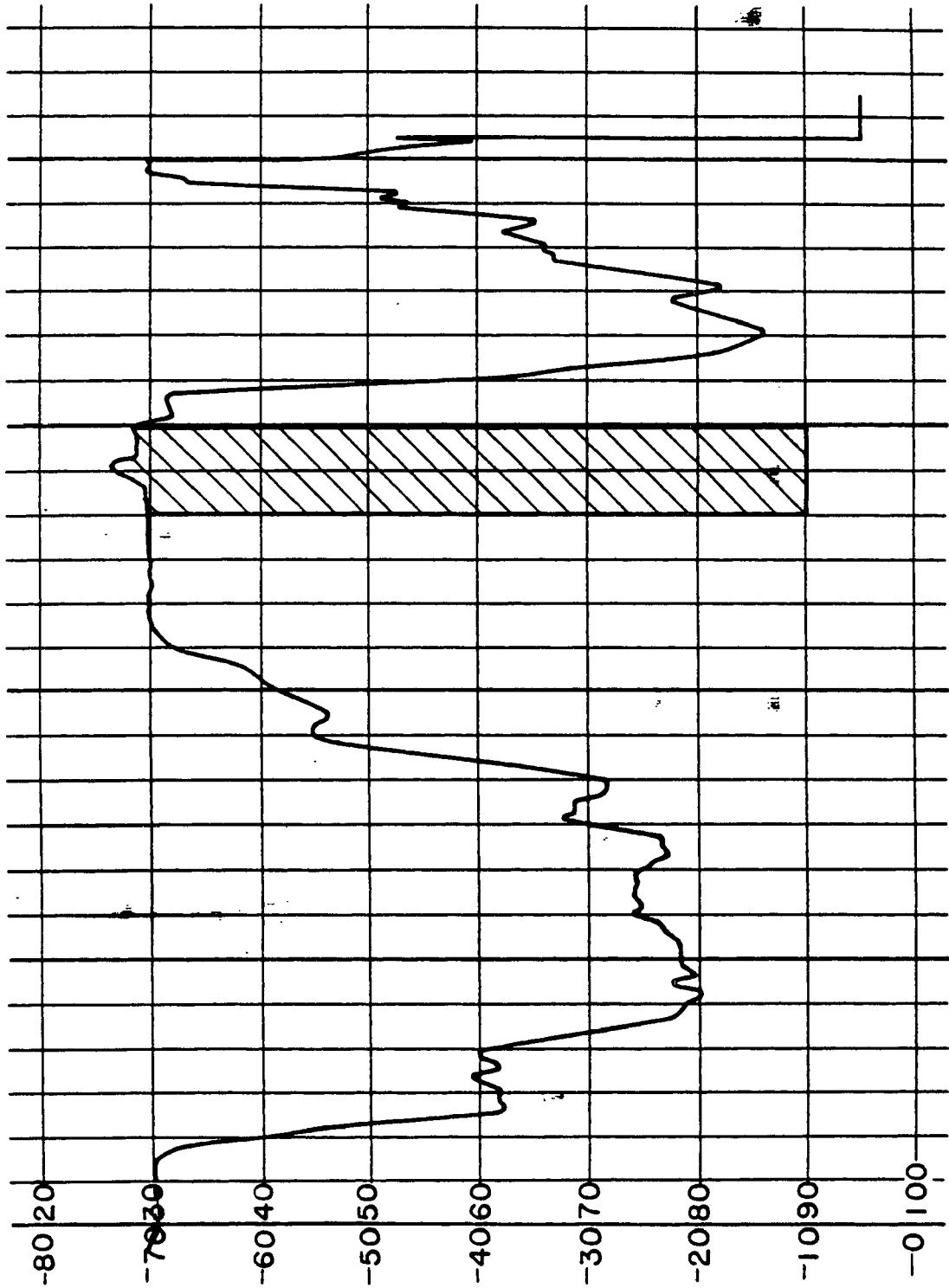


FIG. II

FIG. 13



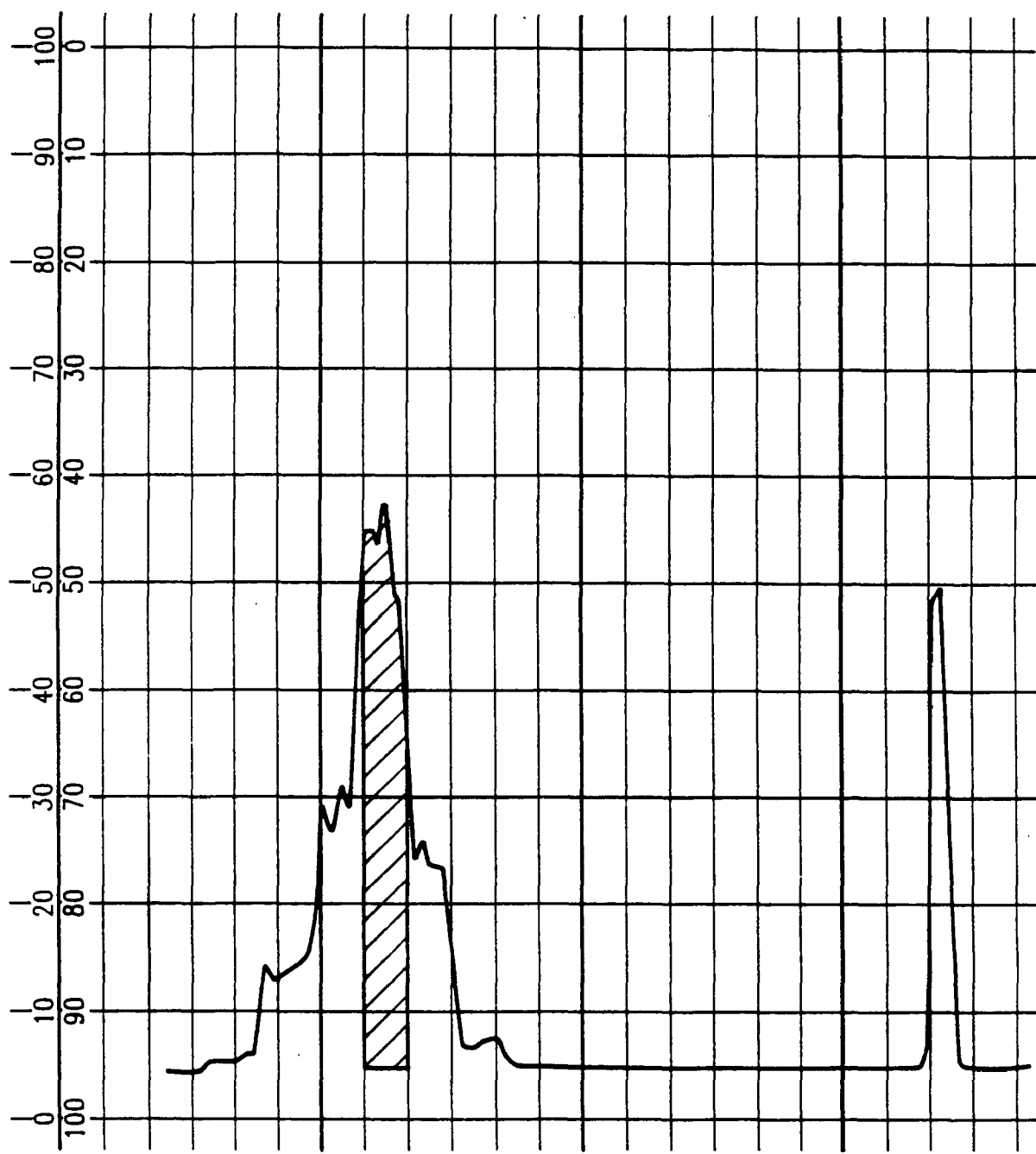


FIG. 14

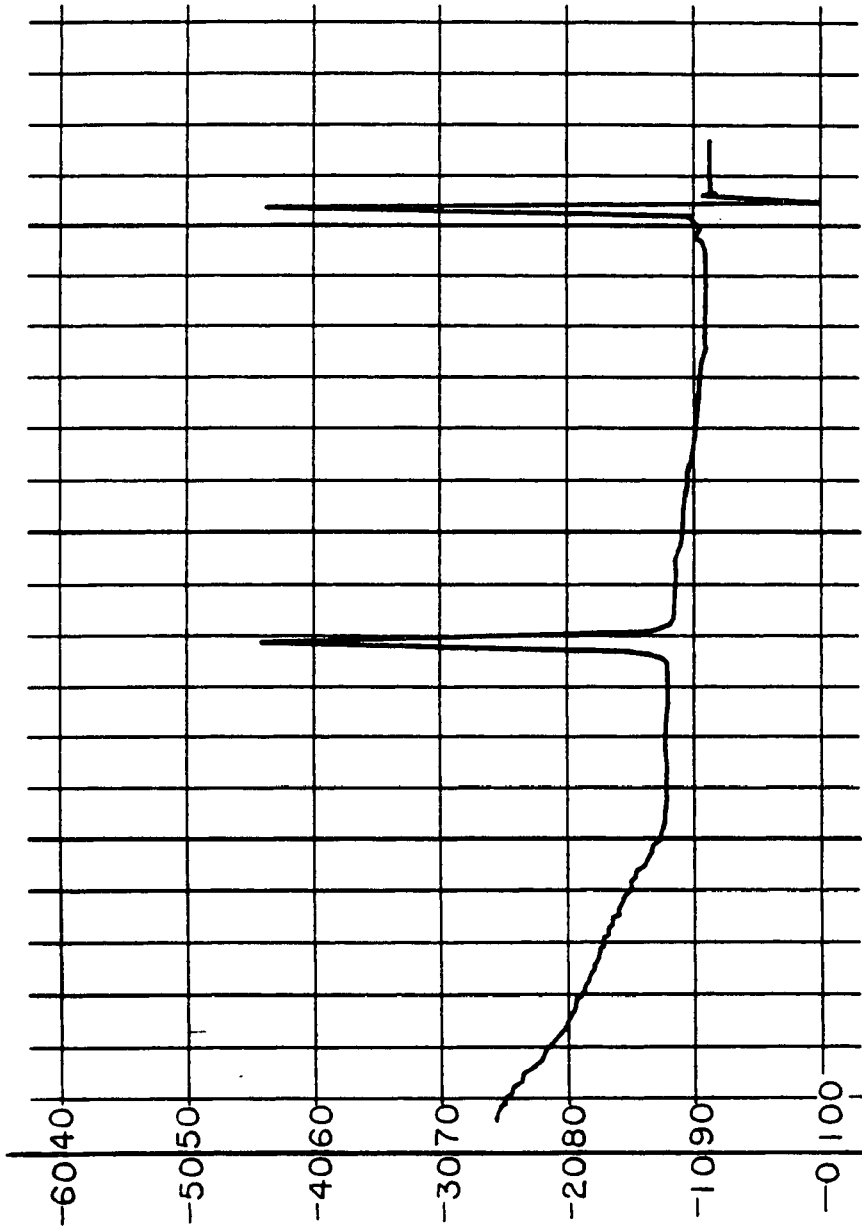


FIG. 15

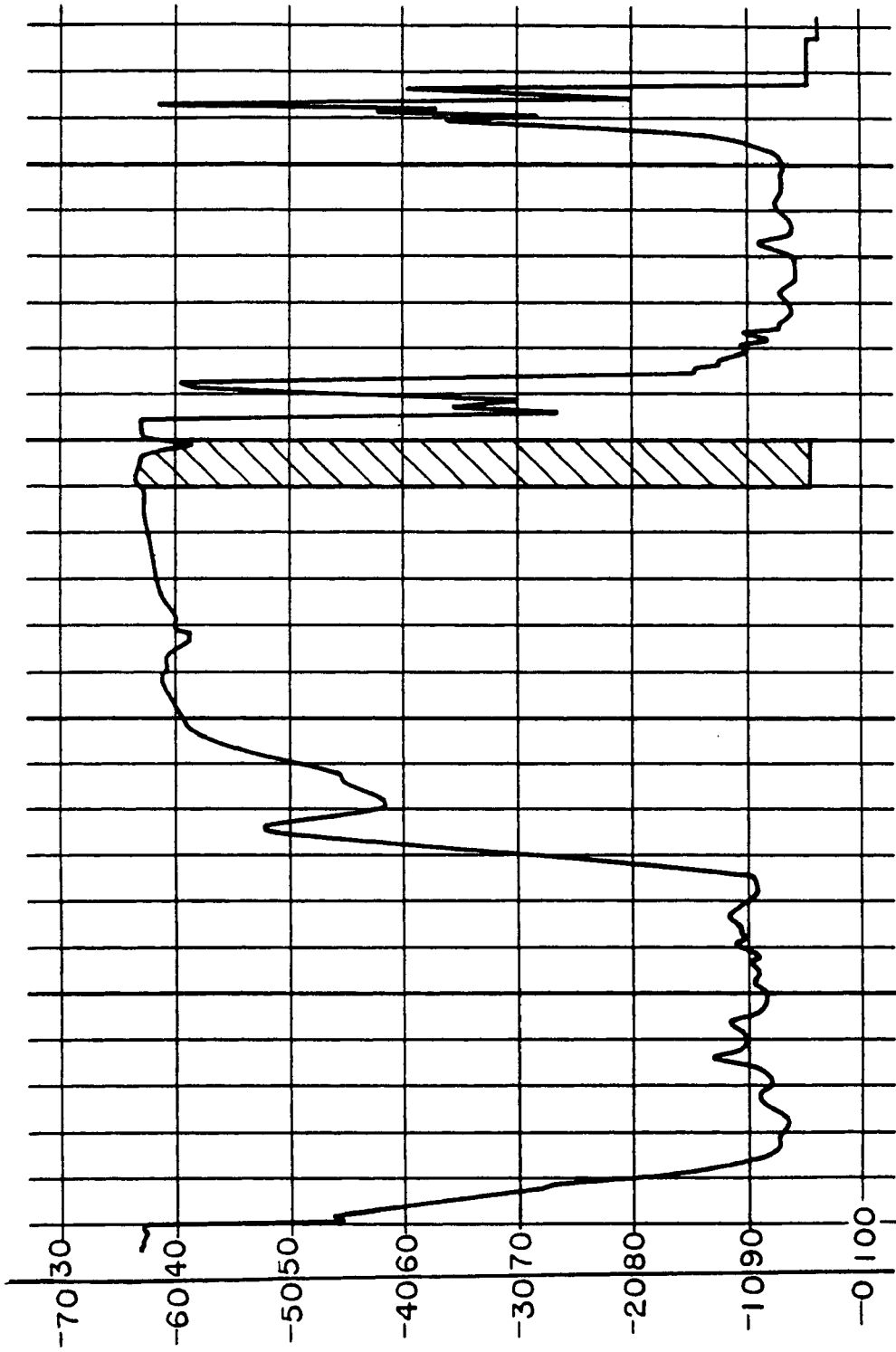


FIG. 16

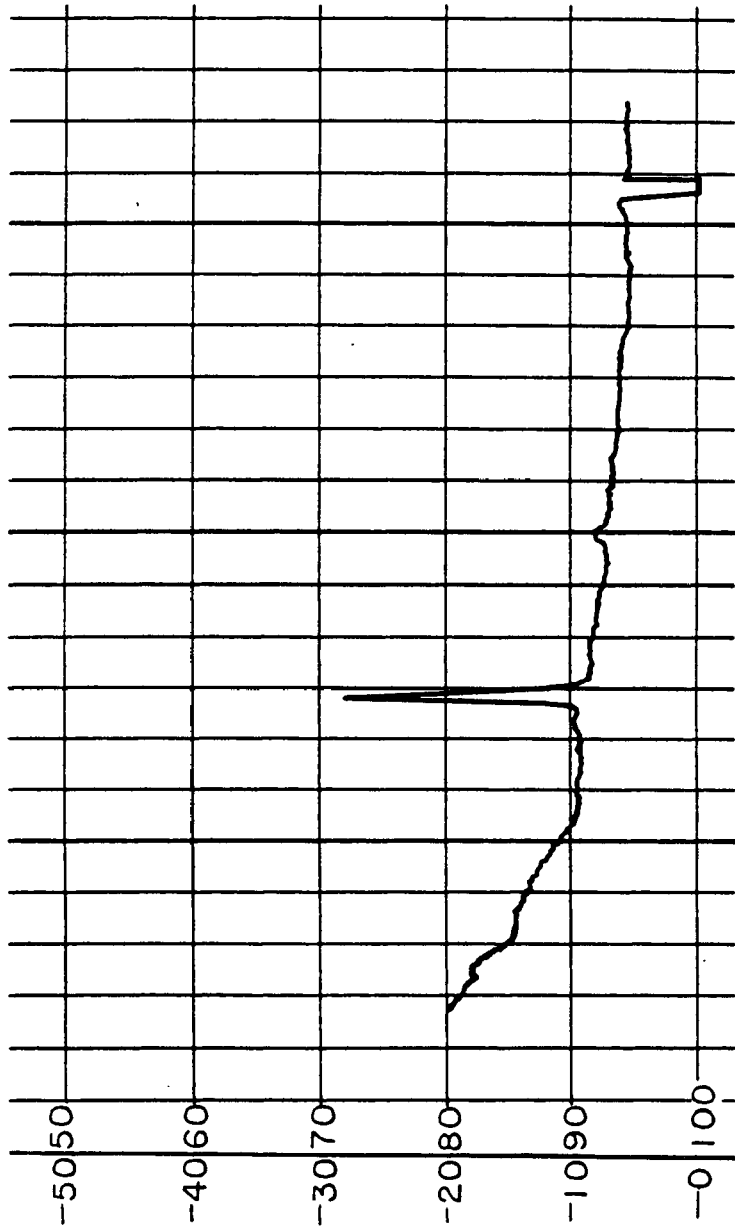
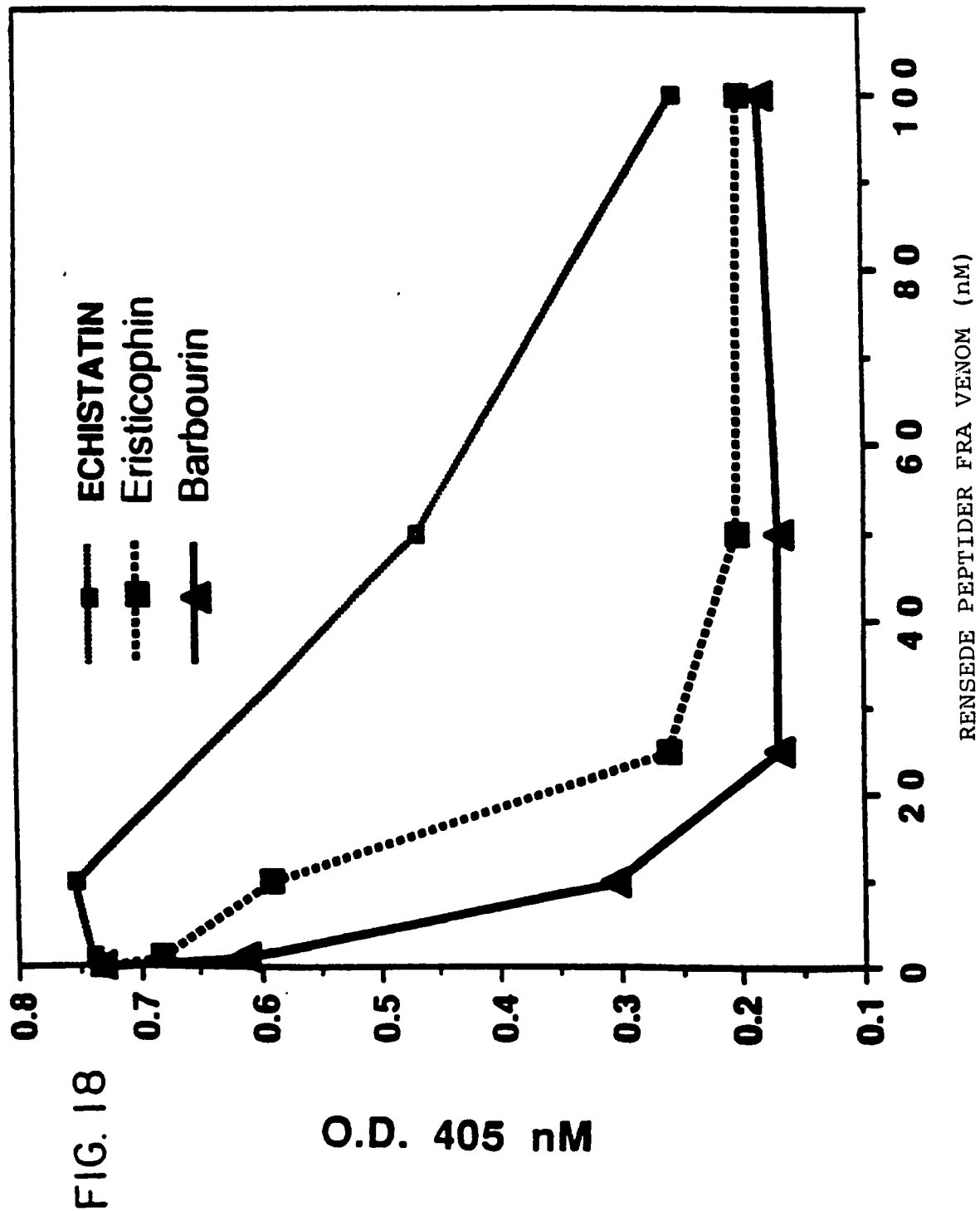
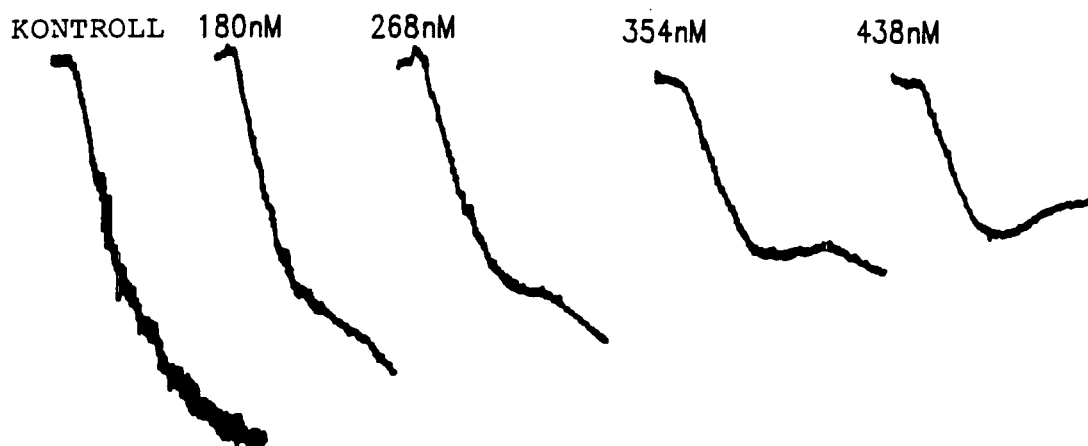


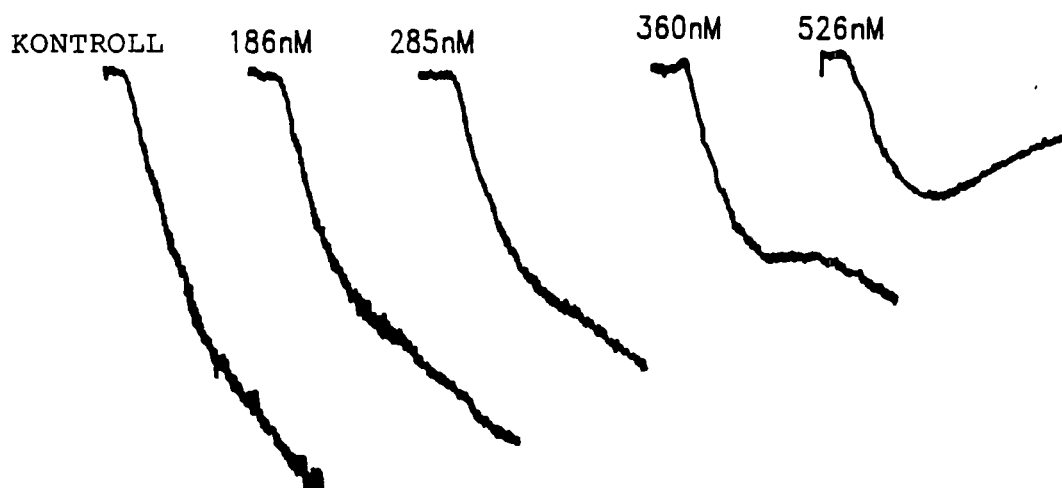
FIG. 17



SISTRURUS M. BARBOURI PAI (BARBOURIN)



ERISTICOPHIS MACMAHONI PAI (ERISTICOPHIN)



ECHIS CARINATUS PAI (ECHISTATIN)

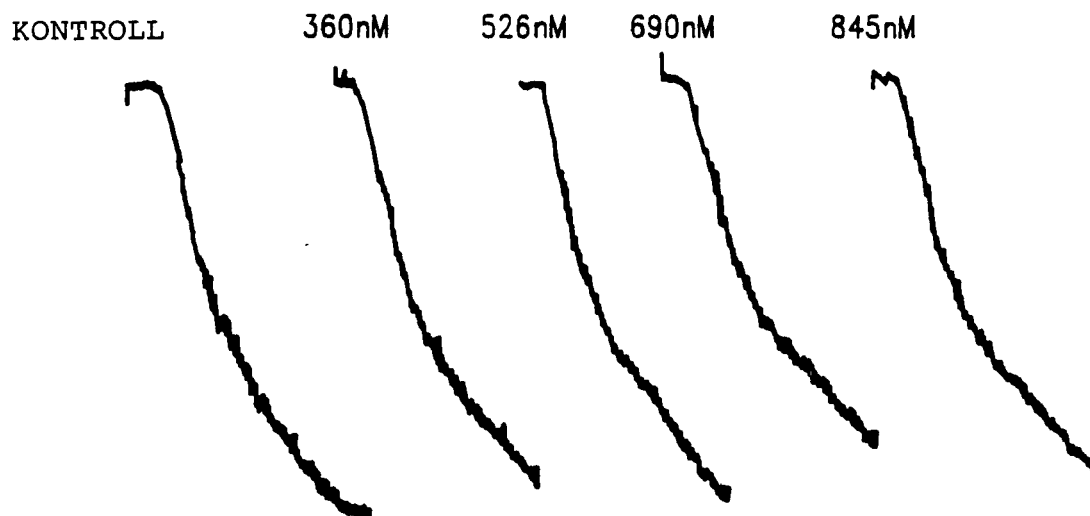


FIG. 19

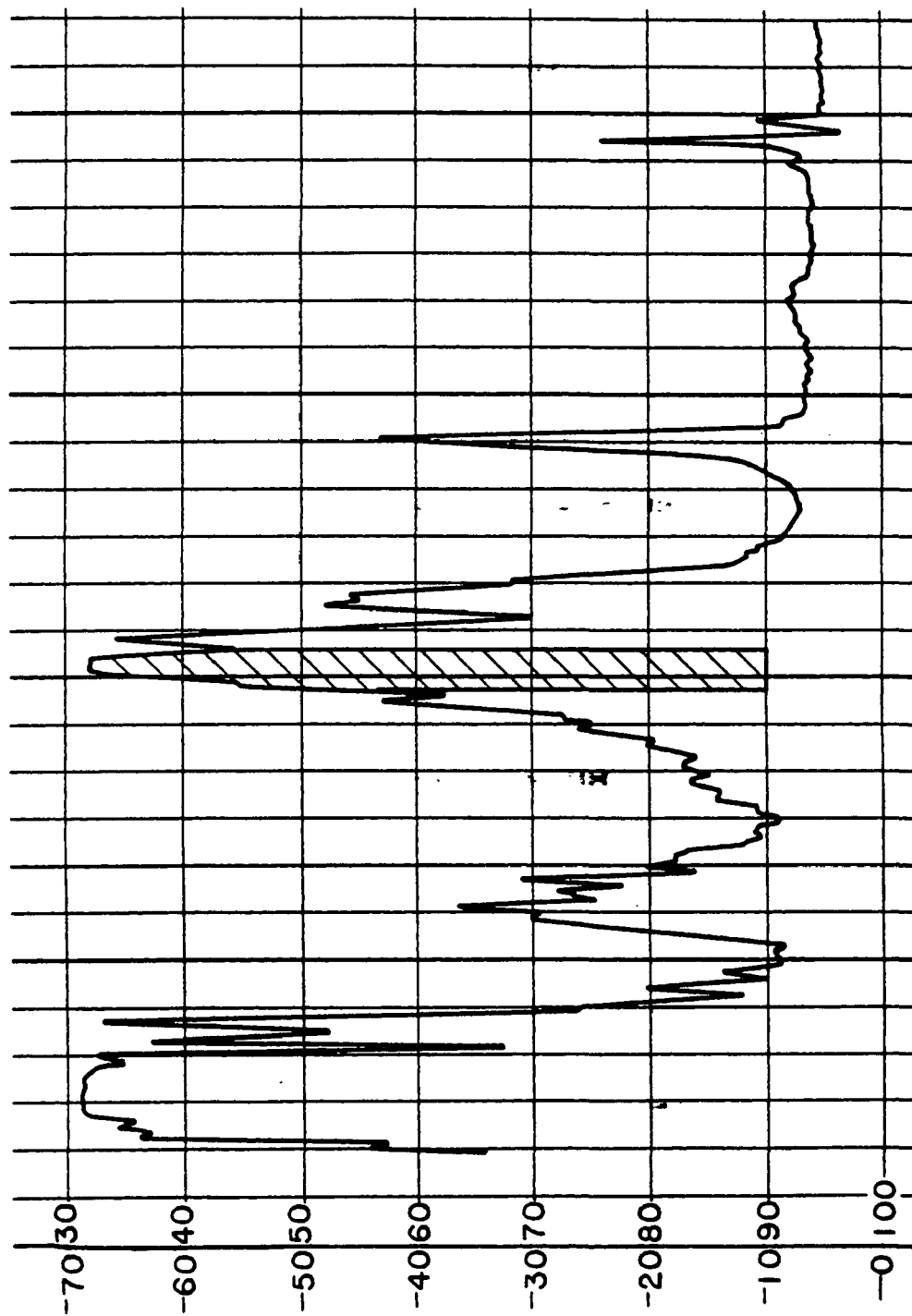


FIG. 20

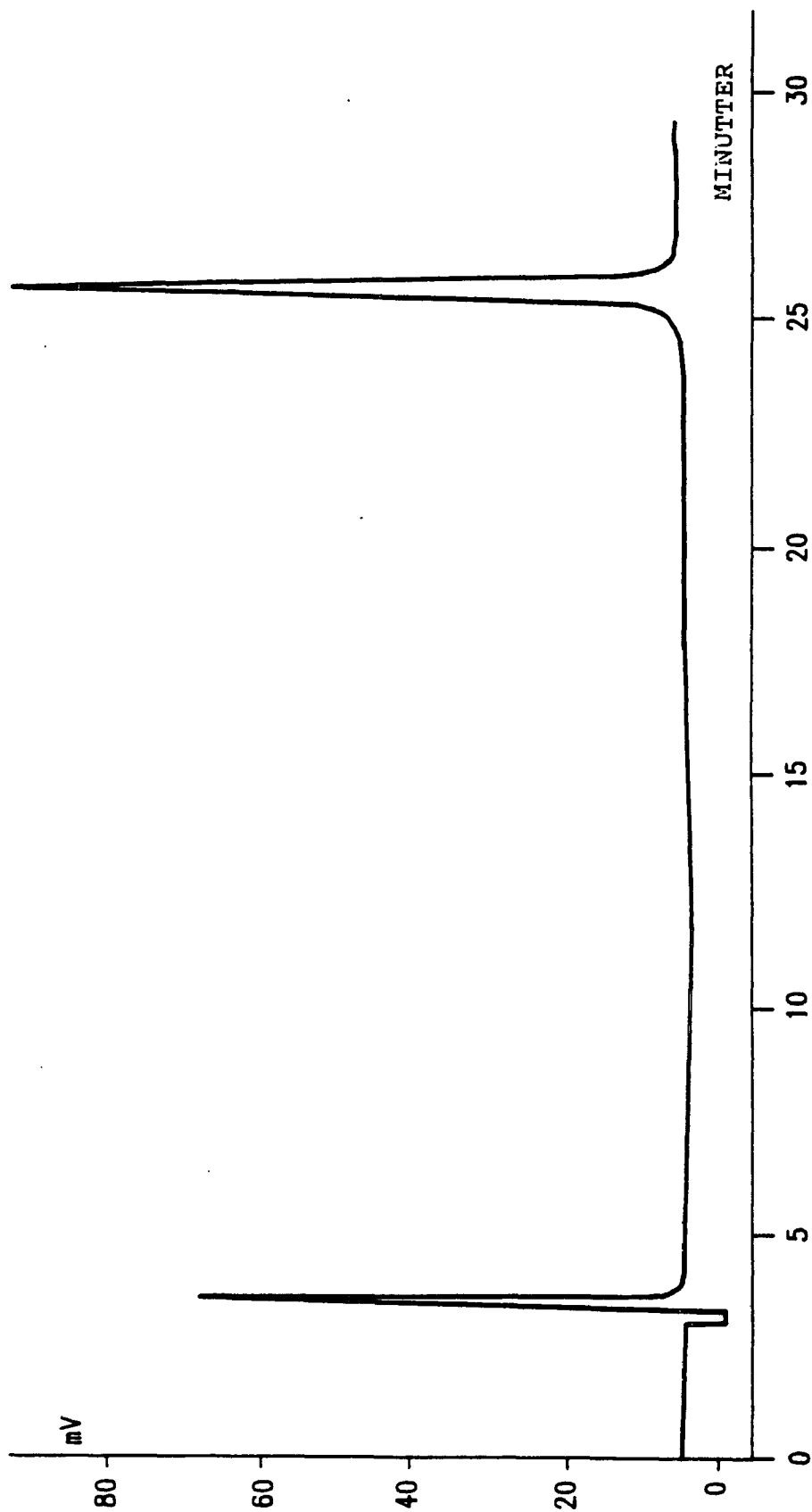


FIG. 21

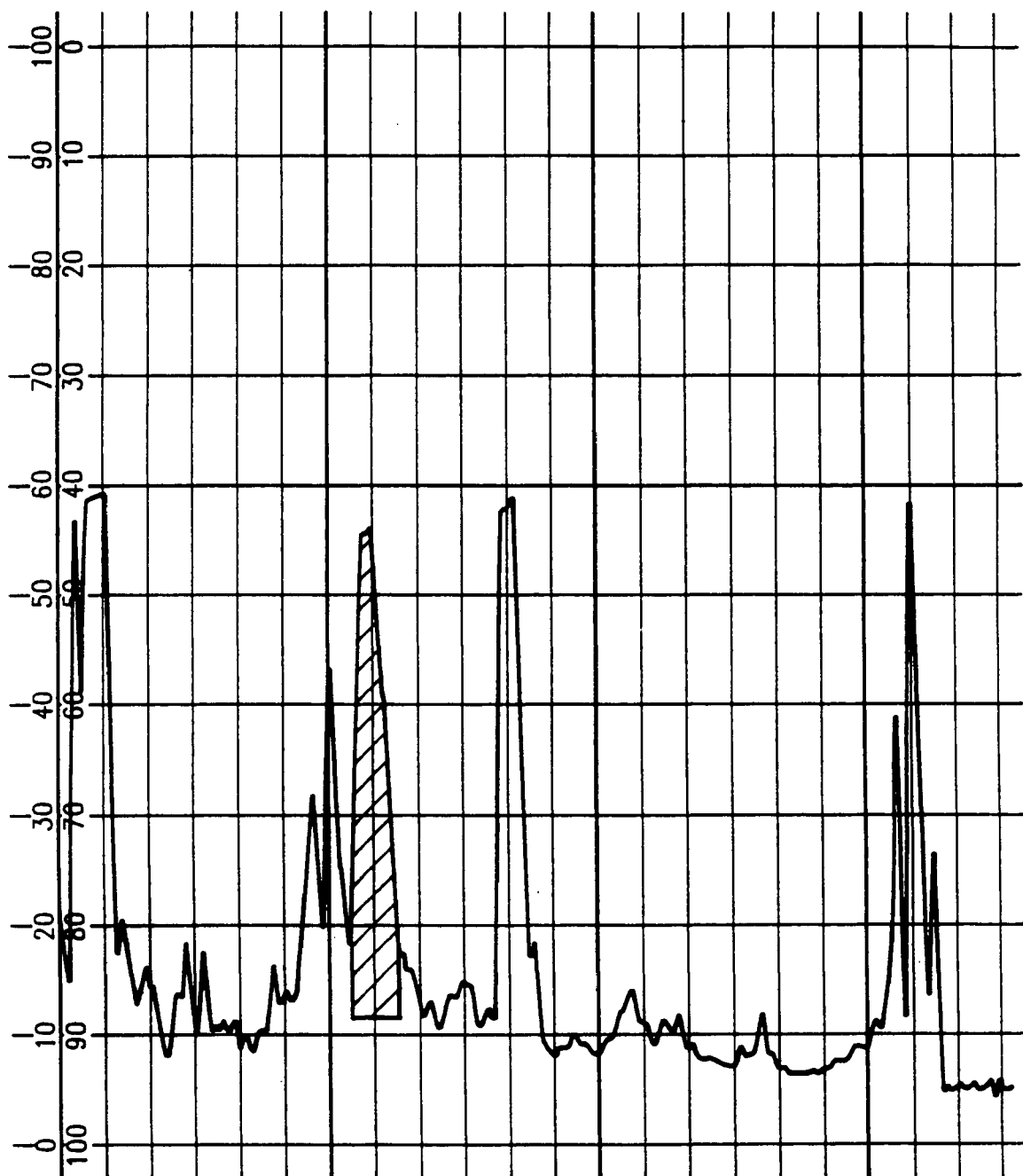


FIG. 22

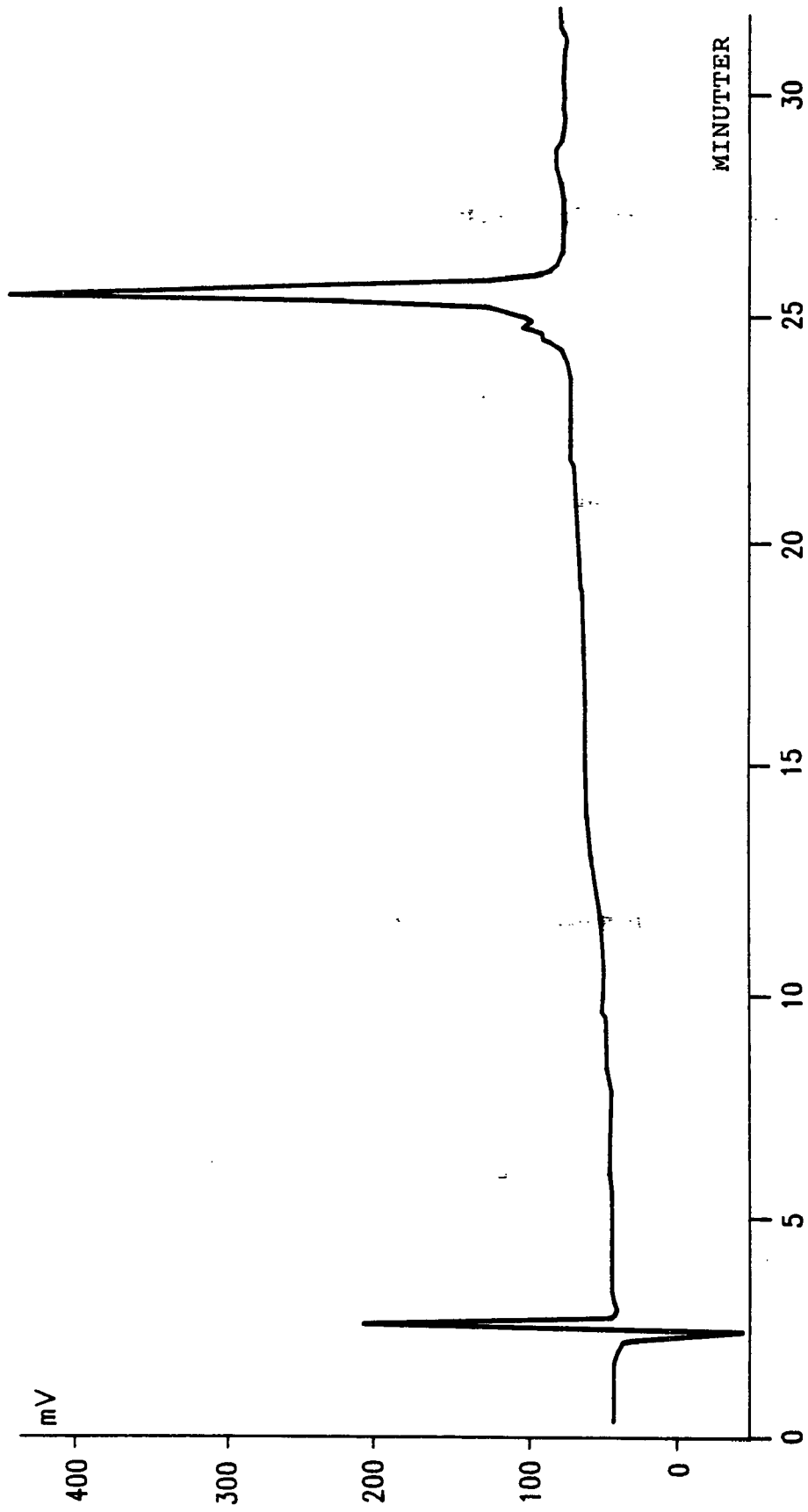


FIG. 23

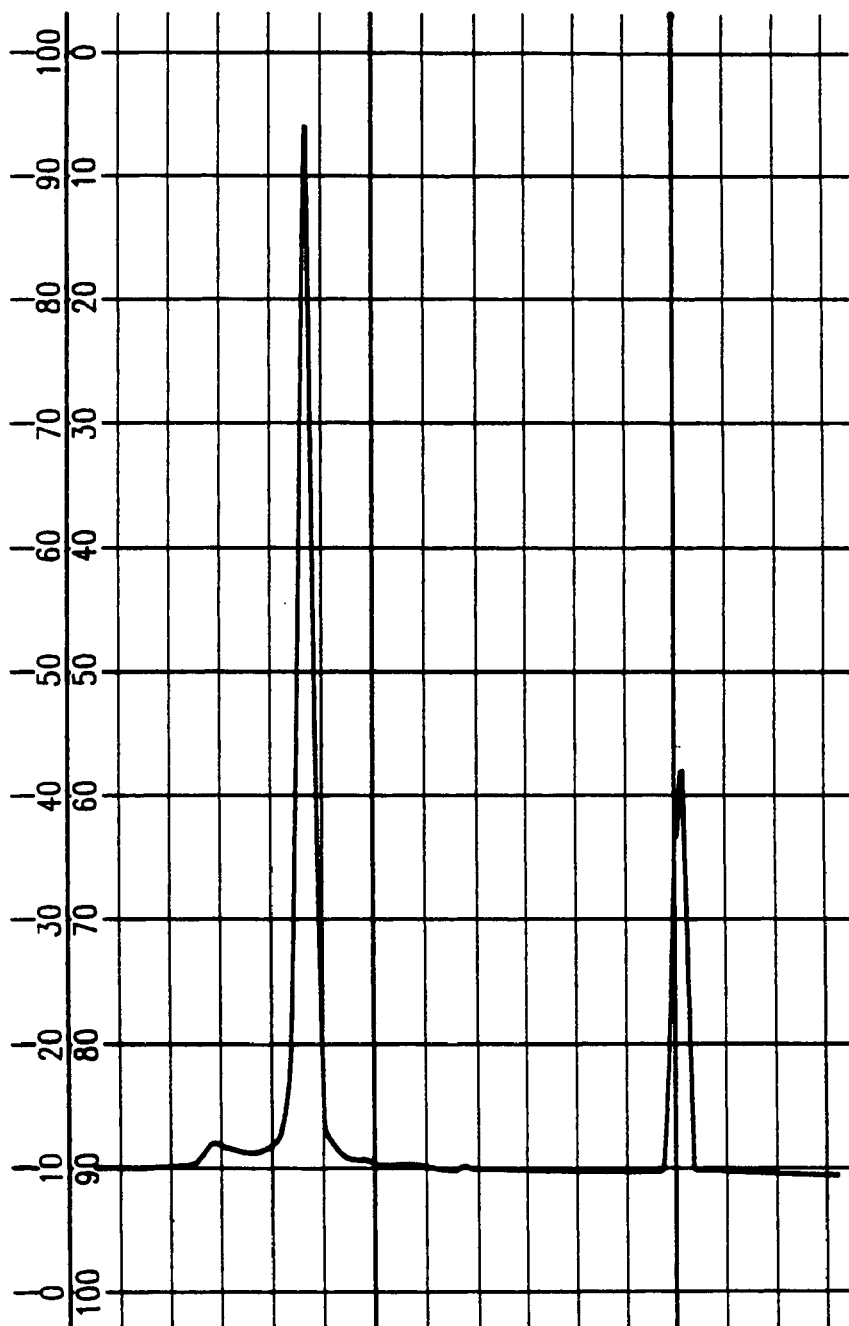


FIG. 24

Cotiarin

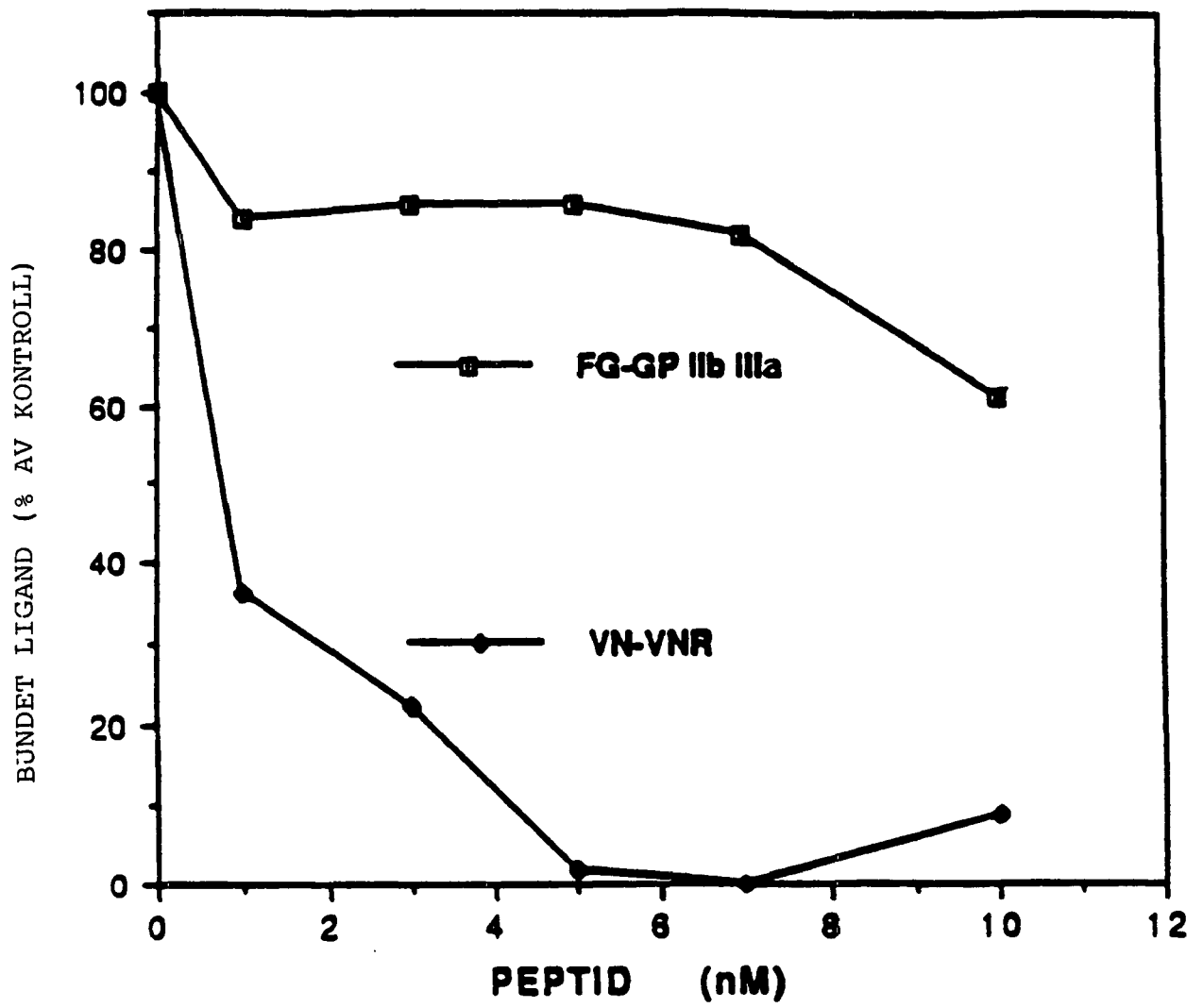


FIG. 25

FIG. 26

	<u>Fibrinogen/ GPUB-IIIa</u> 10nm*	<u>Vitresectin/ YnR</u> >100nm
Barbourin	16	16
Tergeminin	10	>120
Forkortet Sist. m. barbouri. (Analog 1)		
Crotalus v. helleri	20	25
Cerastin	2	2
Ruberin	10	10
Crotalus atrox	5	5
Crotalus d. totonacus	1-2	5
Crotalus v. lutosus	5	5
Bothrups jararacussu	25	5
Cotiarin	>10	1
Eristicophin	25	25
Syntetisk "Eristicophin" w/ KGDW(Analog 2)	40	>150
Cyklisk CCGKGDWPCA-NH2 (Analog 3)	900	>20,000

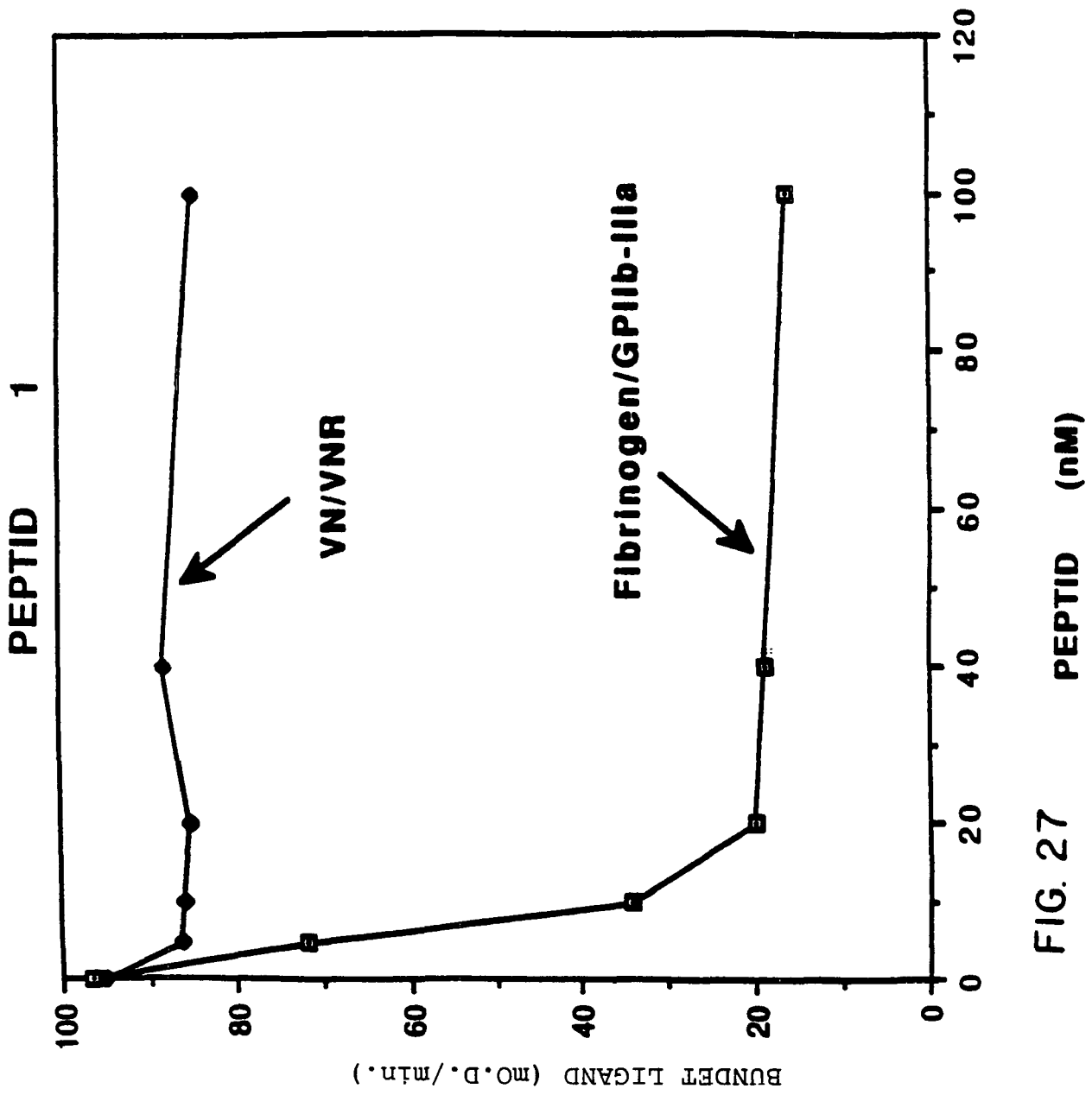


FIG. 27

PEPTID (nM)

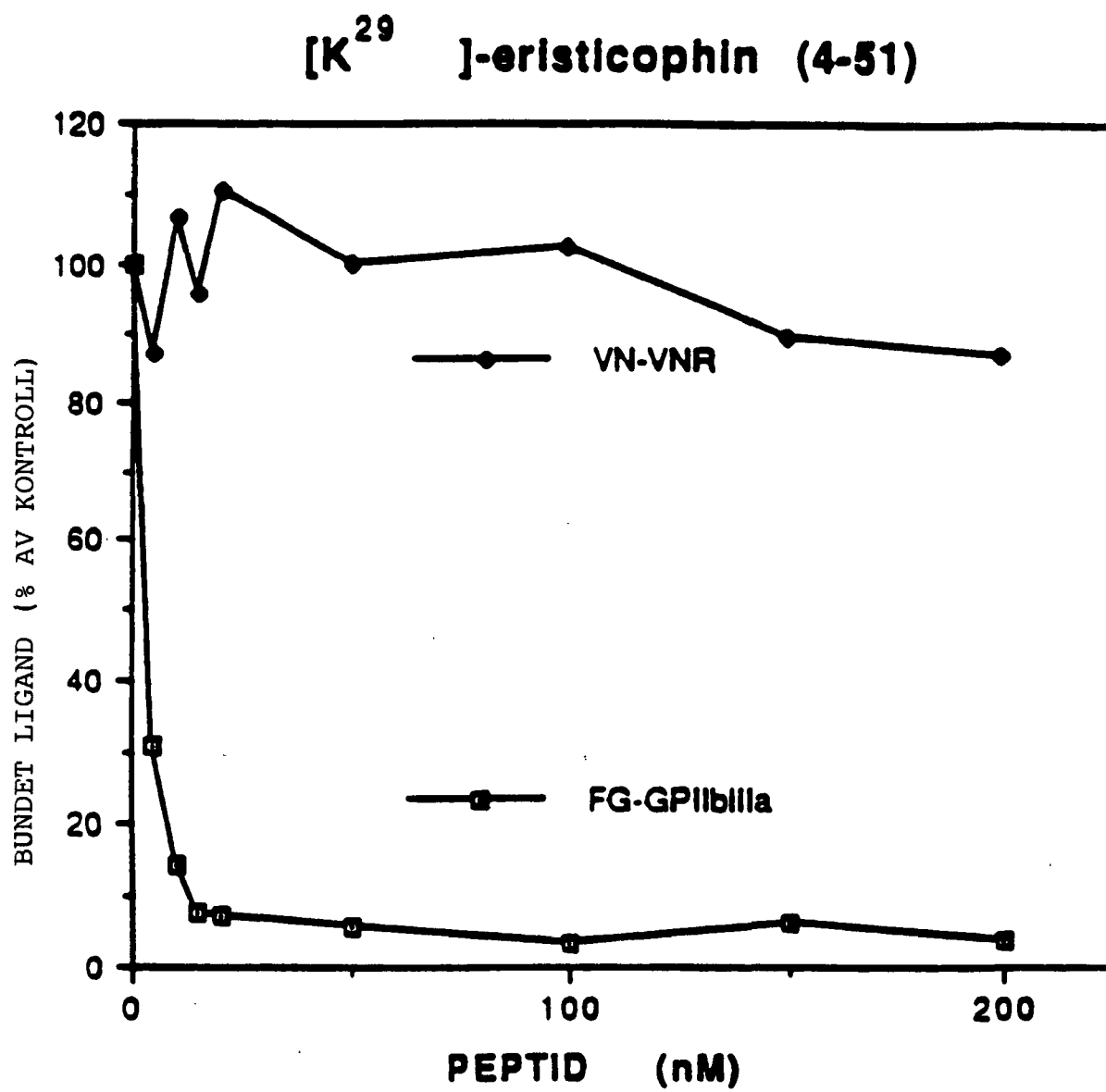


FIG. 28

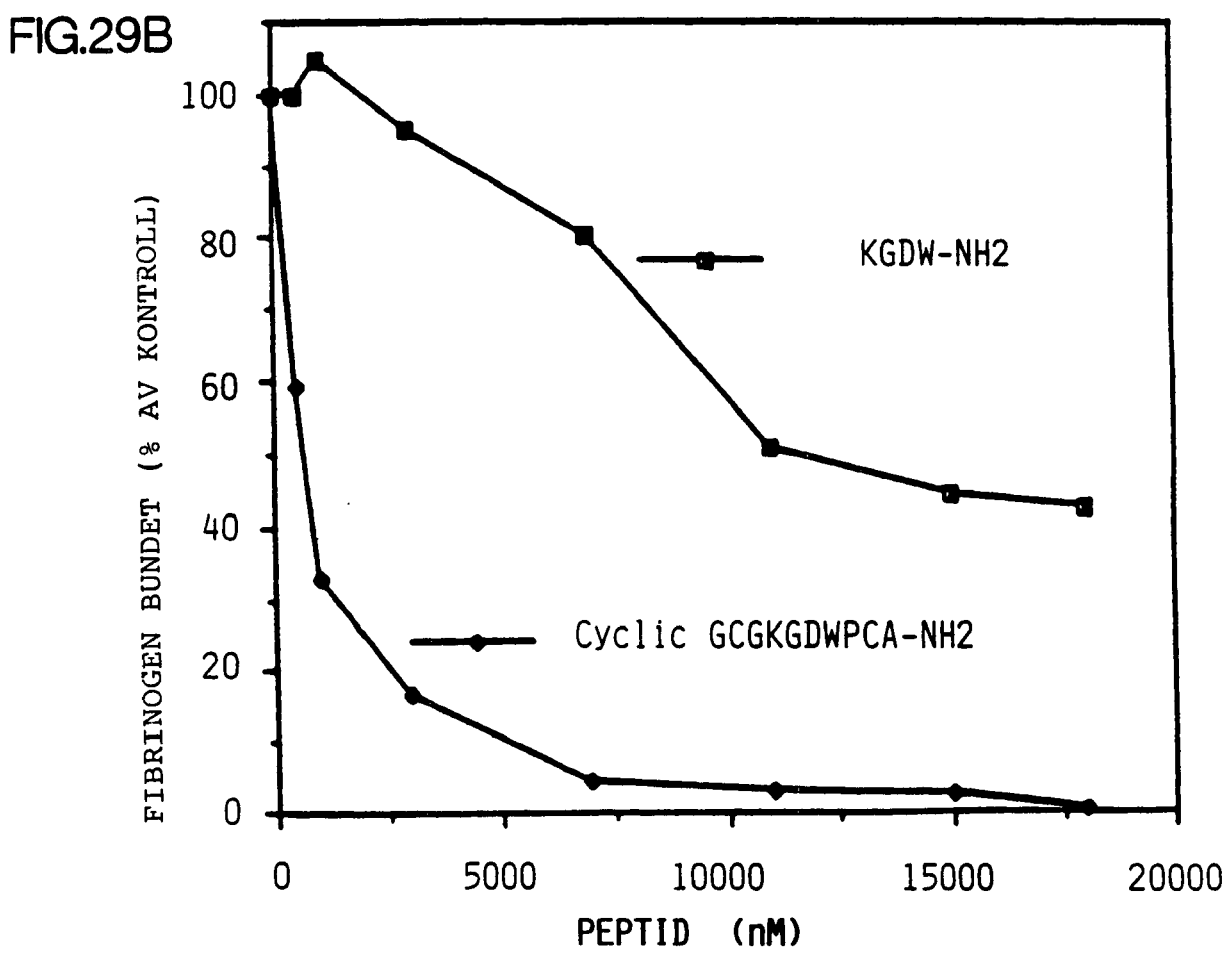
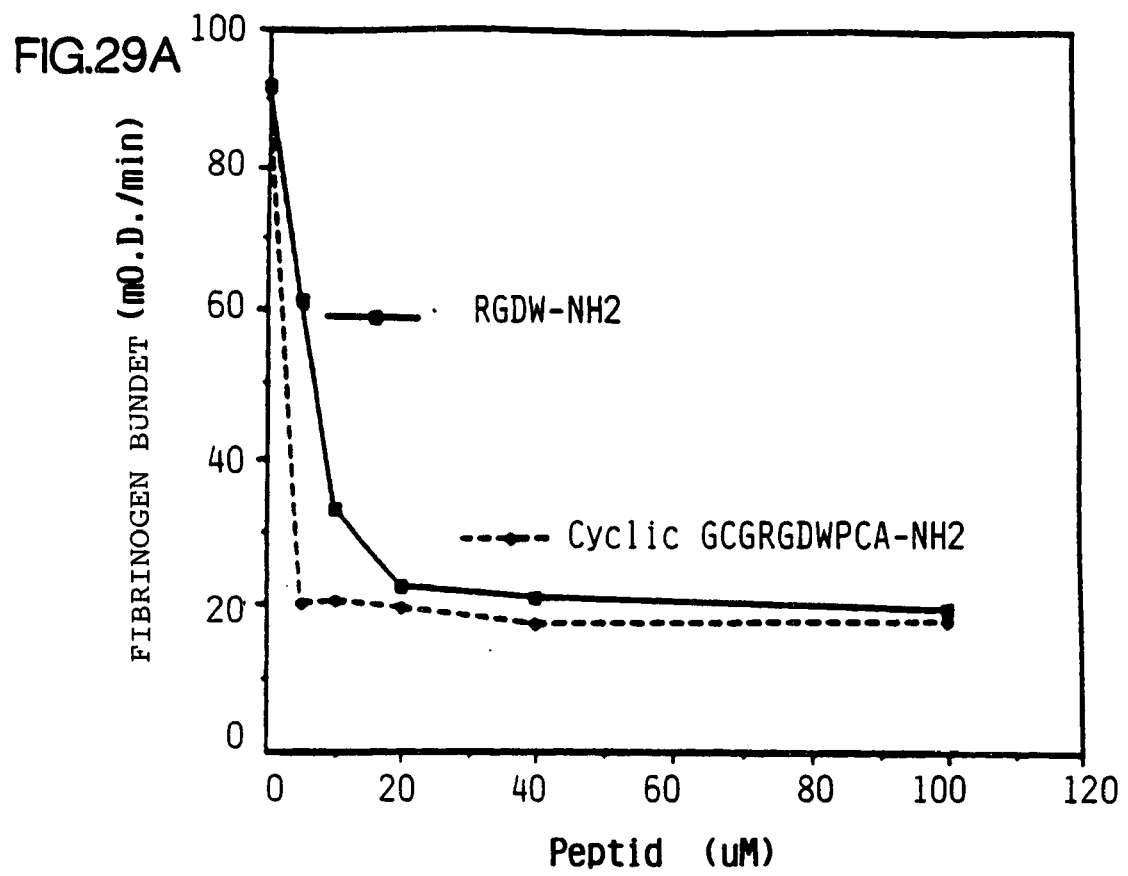


FIG.30A

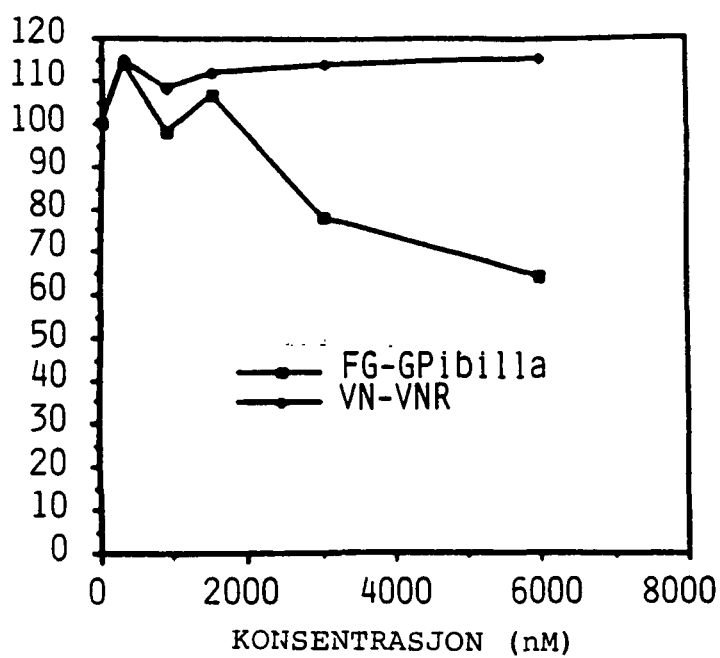


FIG.30B

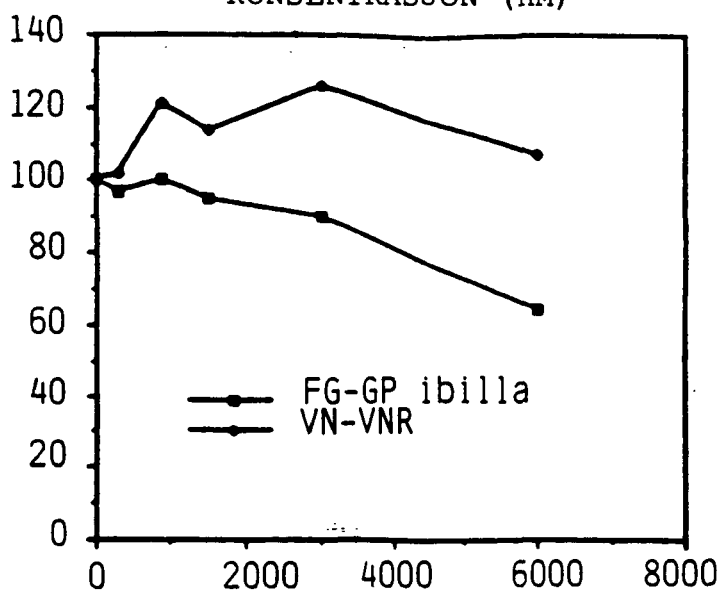
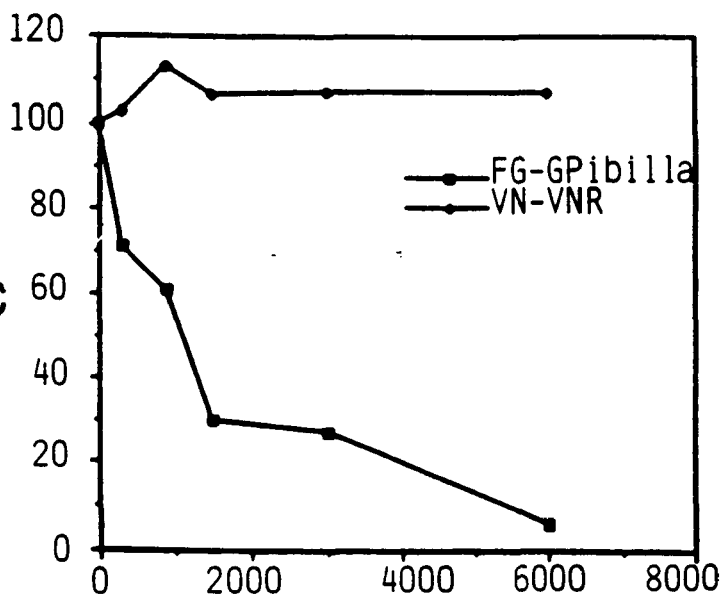


FIG.30C



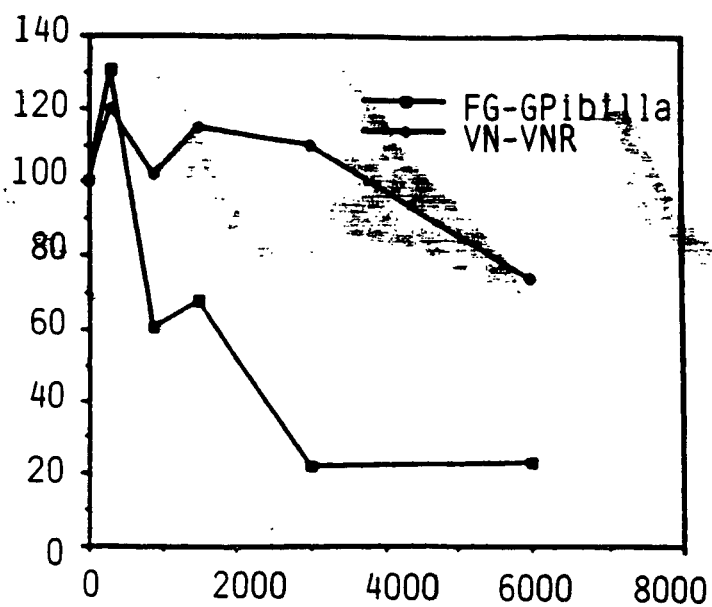


FIG.30D

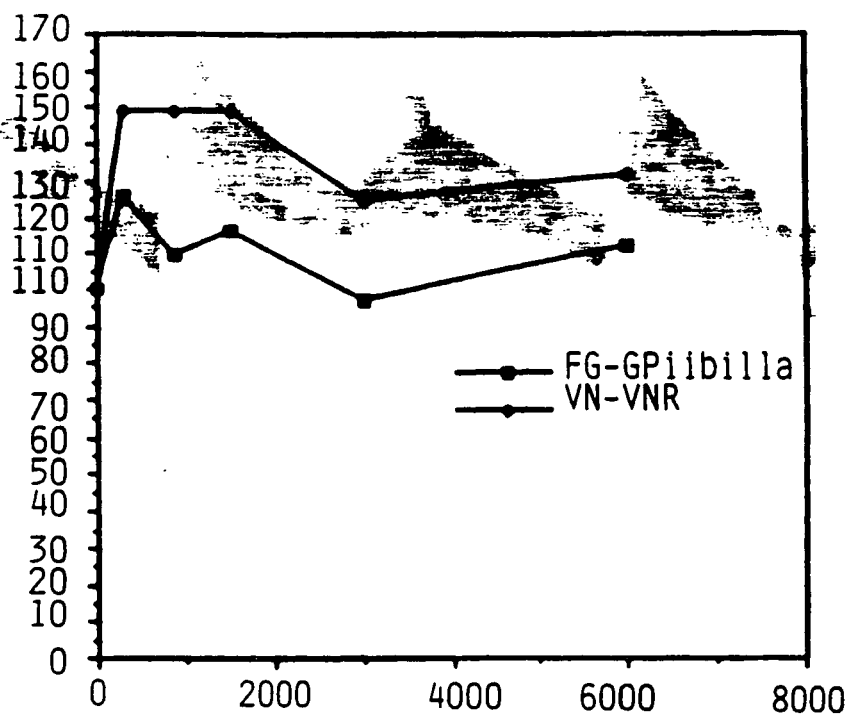


FIG.30E

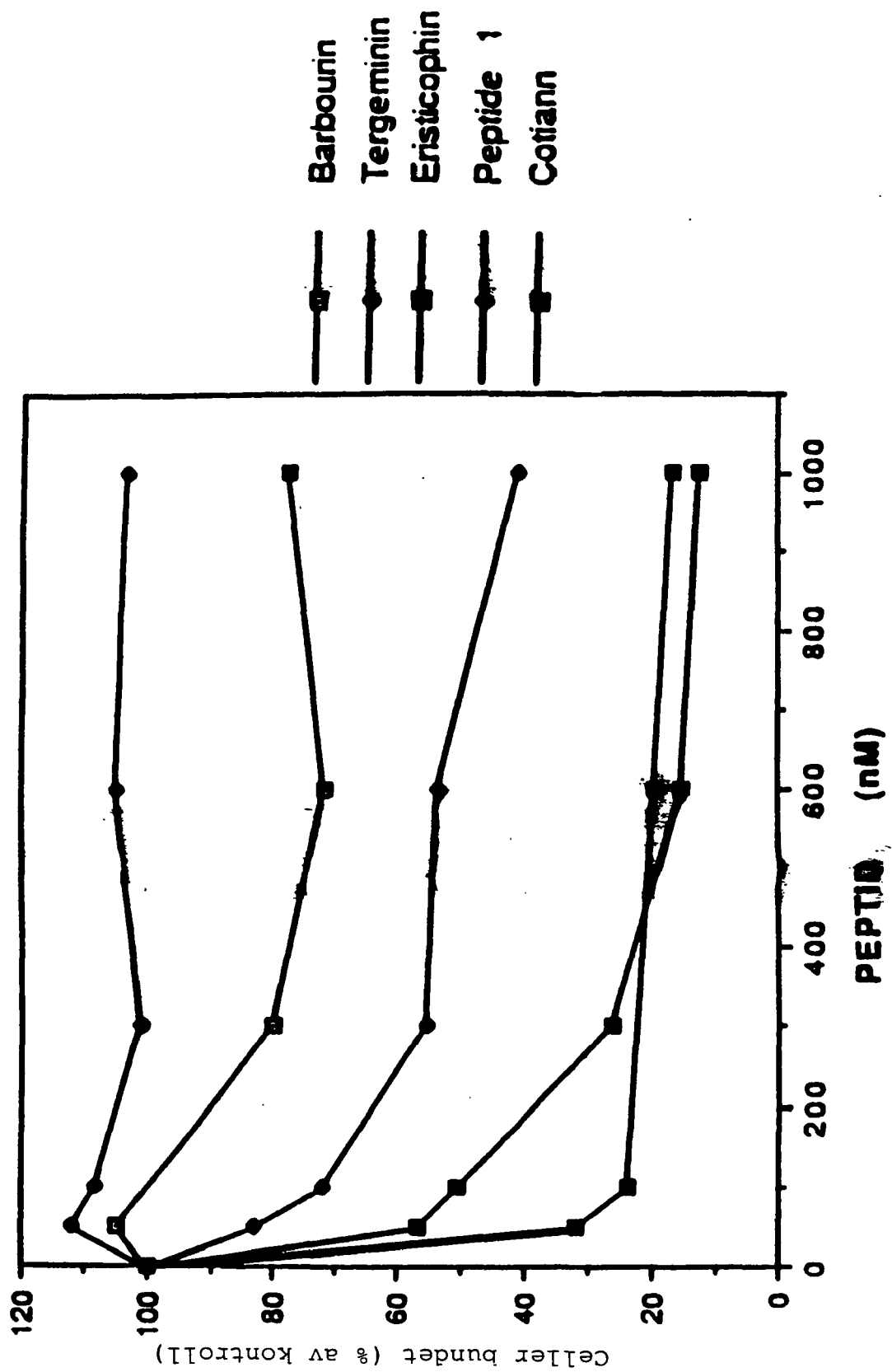


FIG. 51

ADHESJON AV M21 CELLER TIL VITRONEKTIN

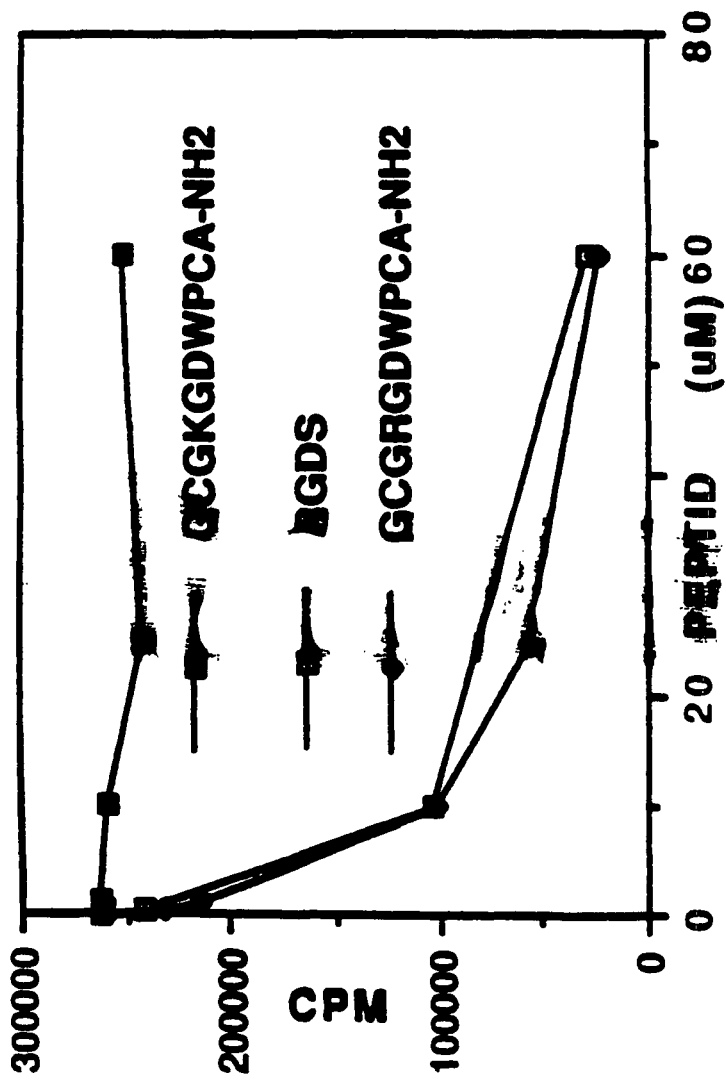


FIG. 32

ANALOG 60.

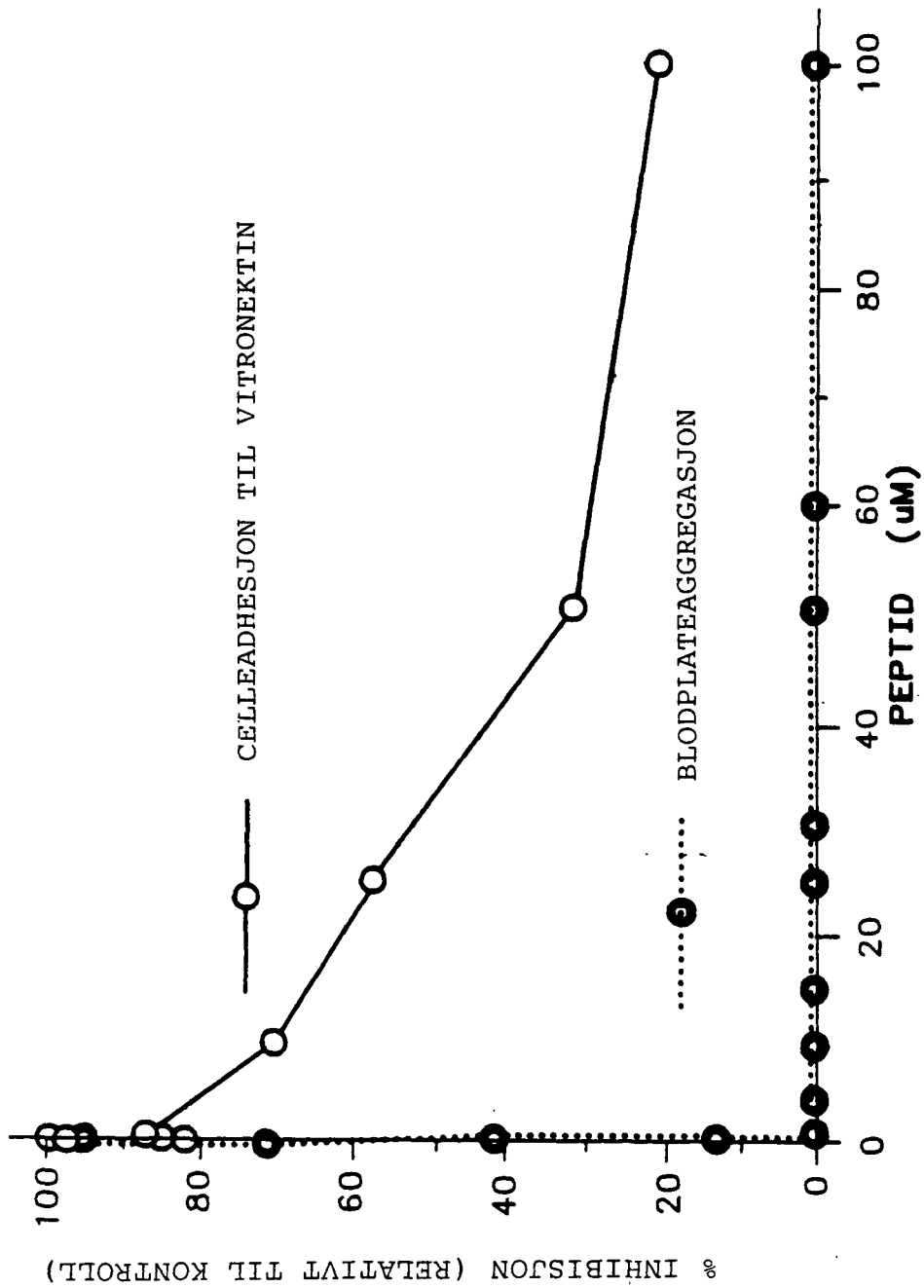
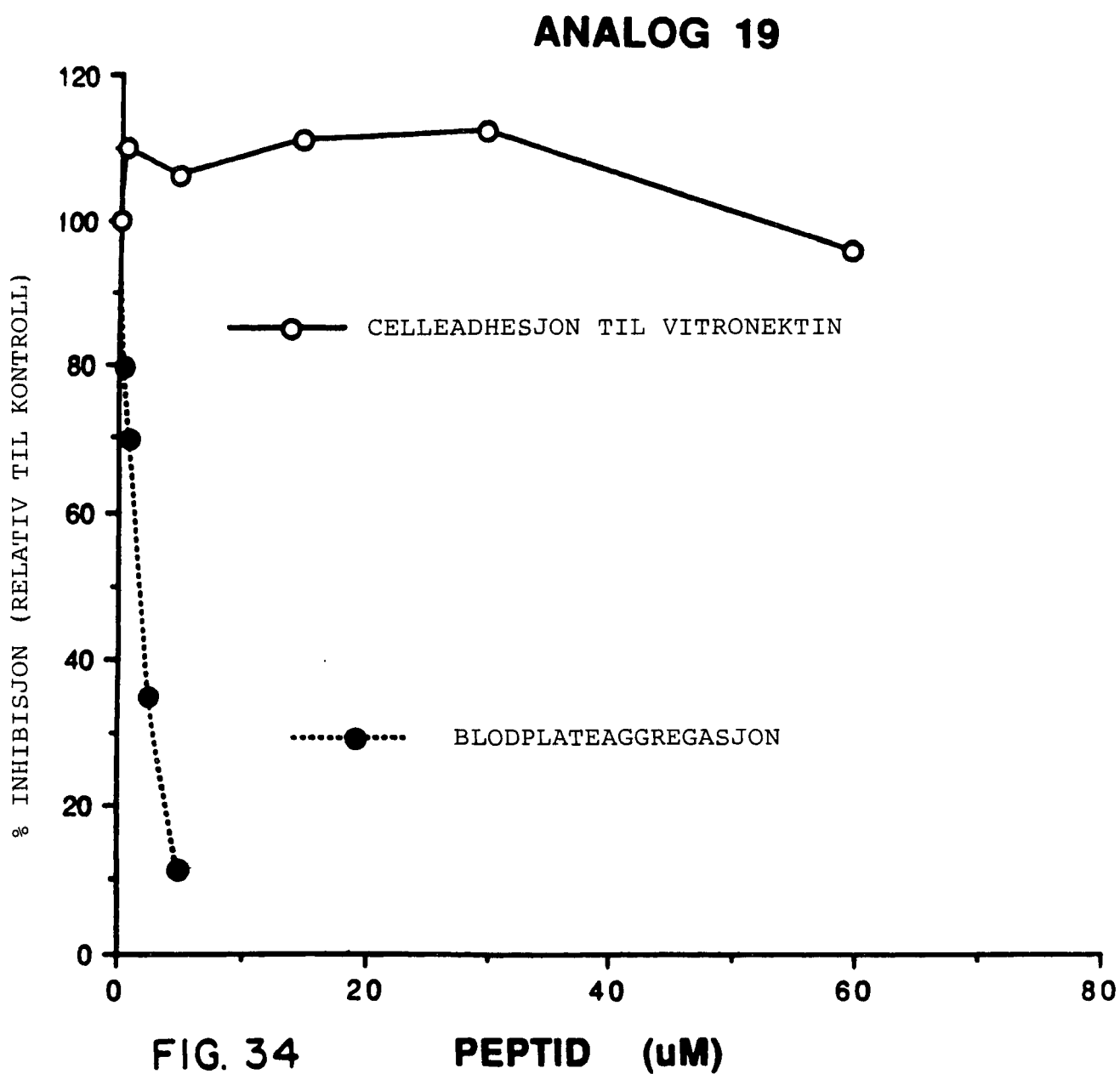


FIG. 33



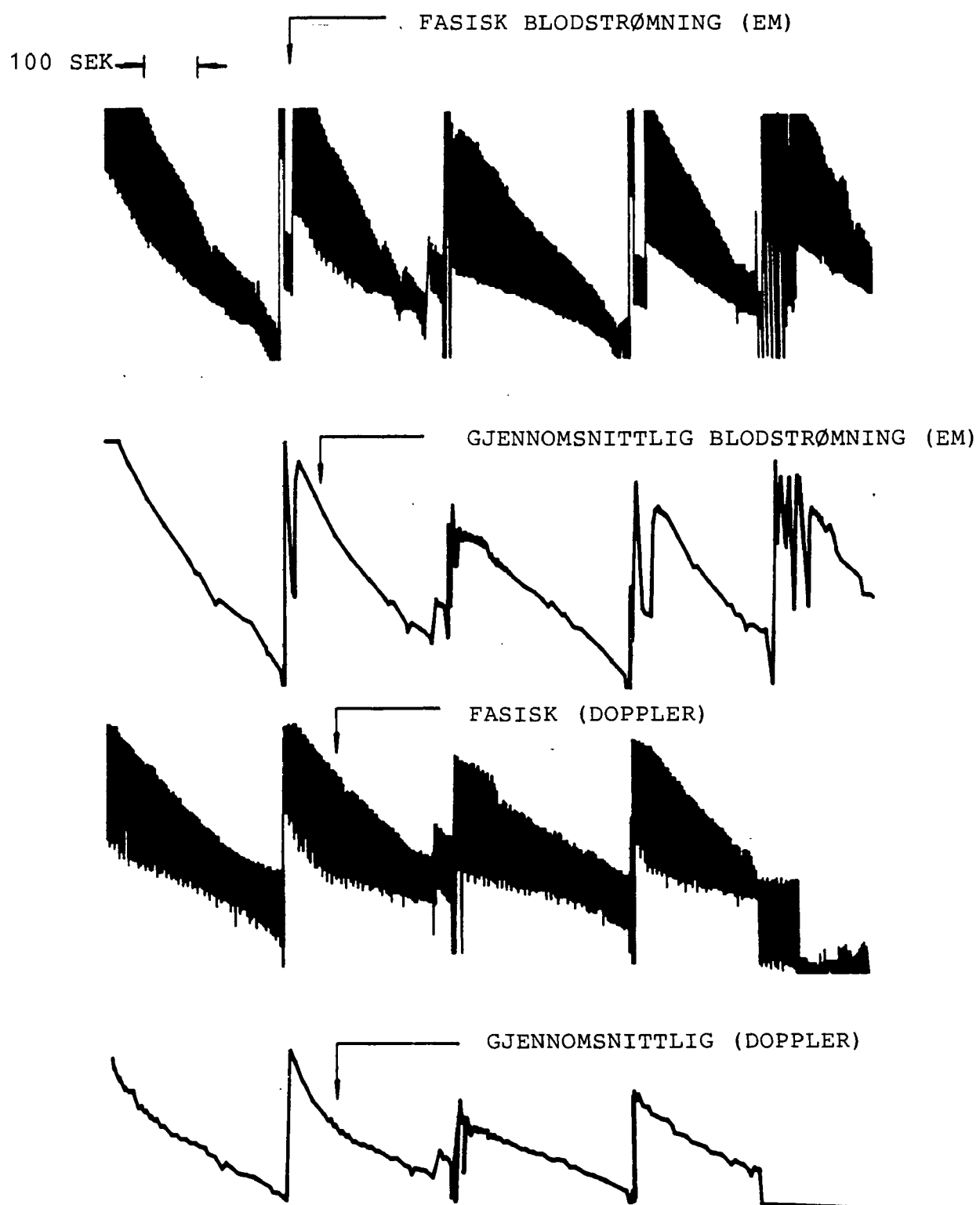


FIG. 35

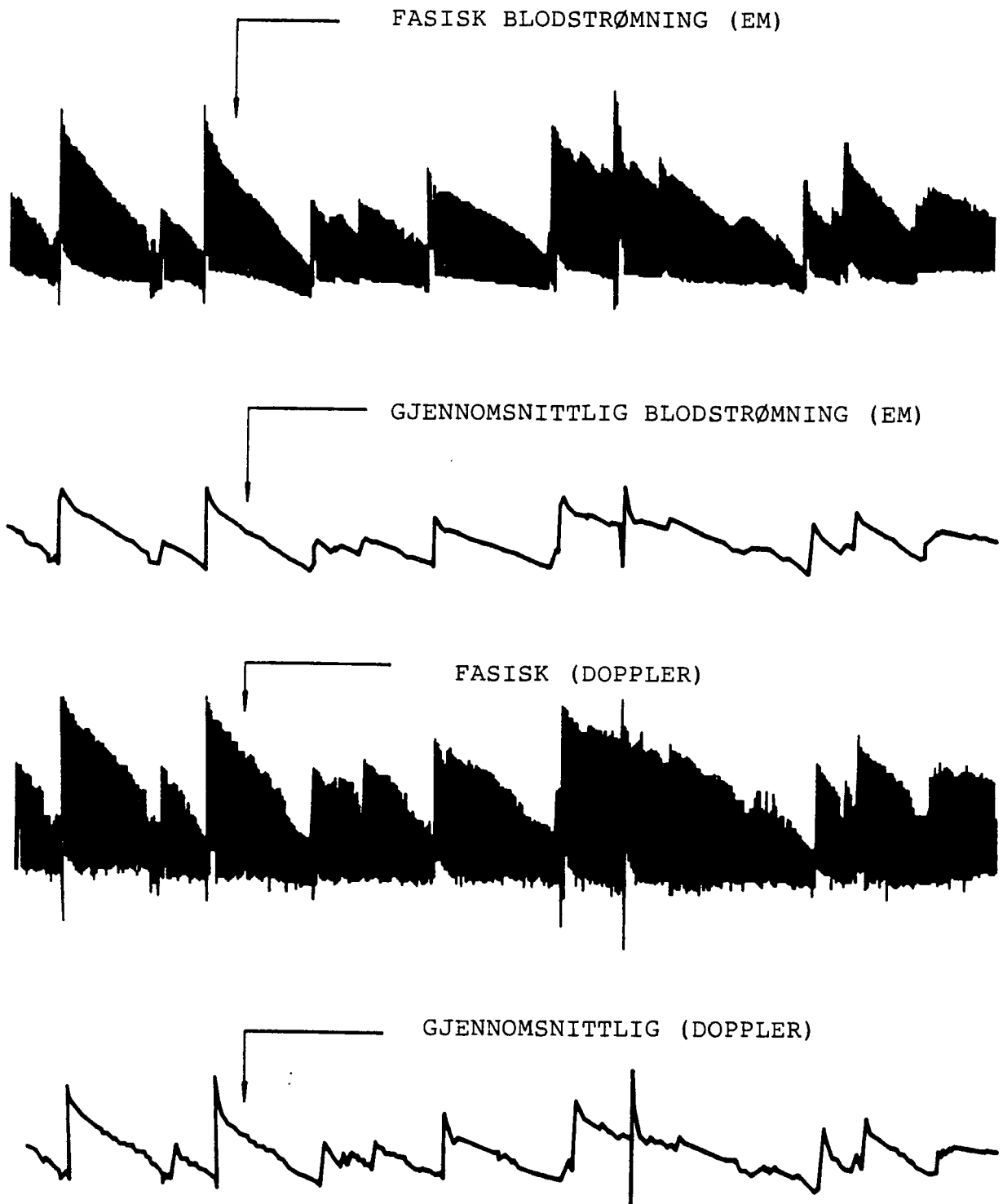


FIG. 36

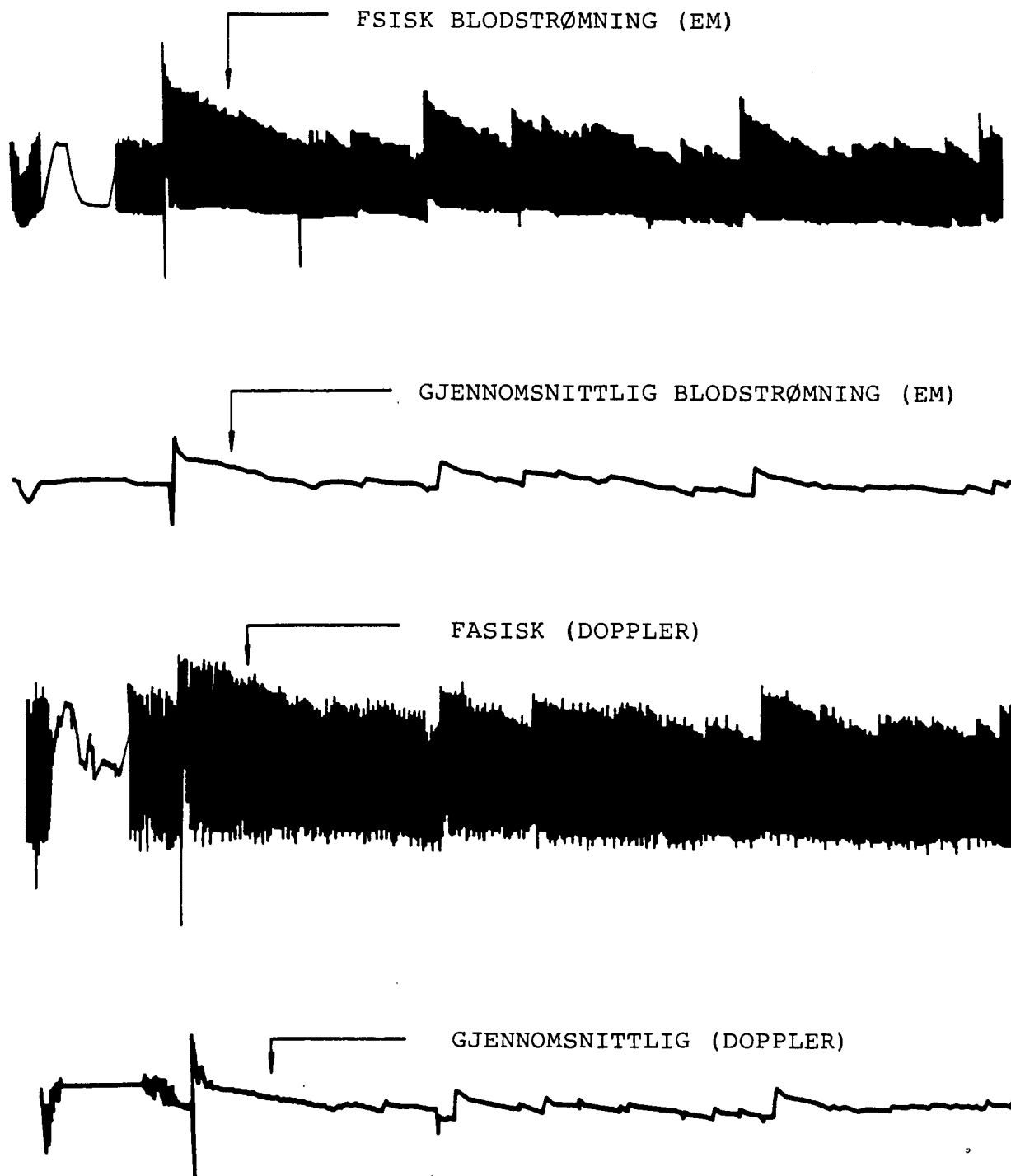


FIG. 37

Barbourin(1-73)

M E A G E E C D C G S P E
 AAT.TCC.ATG.GAA.GCT.GGT.GAA.GAA.TGC.GAC.TGC.GGT.TGT.CCG.GAA
 ^Eco R1 ^Nco 1

N P C C D A A T C K L R P G A
 AAC.CCG.TGT.TGC.GAC.GCA.GCG.ACT.TGC.AAA.CTG.CGT.CCG.GGC.GCT

Q C A D G L C C D Q C R F L K
 CAG.TGC.GCA.GAC.GGT.CTG.TGC.TGT.GAT.CAG.TGC.CGT.TTC.CTG.AAA

K G T V C R V A K G D W N D D
 AAG.GGT.ACT.GTT.TGC.CGT.GTA.GCT.AAA.GGC.GAC.TGG.AAC.GAC.GAT

T C T G Q S A D C P R N G L Y
 ACT.TGC.ACT.GGT.CAG.TCT.TGT.GAC.TGC.CCG.CGT.AAC.GGC.CTG.TAC

G
 GGT.TGA.A....HindIII

FIG. 38

PhoA/M⁻¹,L⁴¹ Barbourin₍₁₋₇₃₎

Pho A:

 M K Q S T I A L A
R1.....AA.TTC.ATG.AAA.CAA.AGC.ACT.ATT.GCA.CTG.GCA

 L L P L L F T P V T K A
CTC.TTA.CCG.TTA.CTG.TTC.ACC.CCT.GTG.ACC.AAA.GCC/ (splice site)

Barbourin:

 M E A G E E C D C G S P E N P
ATG.GAA.GCT.GGT.GAA.GAA.TGC.GAC.TGC.GGT.TGT.CCG.GAA.AAC.CCG

 C C D A A T C K L R P G A Q C
TGT.TGC.GAC.GCA.GCG.ACT.TGC.AAA.CTG.CGT.CCG.GGC.GCT.CAG.TGC

 A D G L C C D Q C R F L K K G
GCA.GAC.GGT.CTG.TGC.TGT.GAT.CAG.TGC.CGT.TTC.CTG.AAA.AAG.GGT

 T V C R V A K G D W N D D T C
ACT.GTT.TGC.CGT.GTA.GCT.AAA.GGC.GAC.TGG.AAC.GAC.GAT.ACT.TGC

 T G Q S A D C P R N G L Y G
ACT.GGT.CAG.TCT.GCT.GAC.TGC.CCG.CGT.AAC.GGC.CTG.TAC.GGT

TGA.A....HindIII

FIG. 39

PhoA/E²⁸, L⁴¹, C⁶⁴ Barbourin(28-73)

Pho A:

M K Q S T I A L A
 Eco R1.....AA.TTC.ATG.AAA.CAA.AGC.ACT.ATT.GCA.CTG.GCA

L L P L L F T P V T K A
 CTT.TTA.CCG.TTA.CTG.TTC.ACC.CCT.GTG.ACC.AAA.GCC/

Forkortet barbourin

E C A D G L C C D Q C R F
 GAA.TGC.GCA.GAC.GGT.CTG.TGC.TGT.GAT.CAG.TGC.CGT.TTC

L K K G T V C R V A K G D W N
 CTG.AAA.AAG.GGT.ACT.GTT.TGC.CGT.GTA.GCT.AAA.GGC.GAC.TGG.AAC

D D T C T G Q S C D C P R N G
 GAC.GAT.ACT.TGC.ACT.GGT.CAG.TCT.TGT.GAC.TGC.CCG.CGT.AAC.GGC

L Y G
 CTG.TAC.GGT.TGA.A...HindIII

FIG. 40

5' oligonucleotid

EcoRI BglII NcoI MstII
5' AAA GAA TTC CTA GAT CTC GAC GAA GCC ATG GAA TGC GCA GAC GGT CTG TGC 3'
D L D E A M E C A D G L C

3' oligonucleotid

BamHI HindIII FIG. 41
5' CGT ACC GGC CTG TAC GGT ATG GAT CCA TAA CGT TCC C 3'
R N G L Y G M D P Oe
3' GCA TGG CCG GAC ATG CCA TAC CTA GGT ATT GCA AGG G 5'

- Oligonukleotid anvendt i polymerase-kjedereaksjonen

Polymerrensesekvens

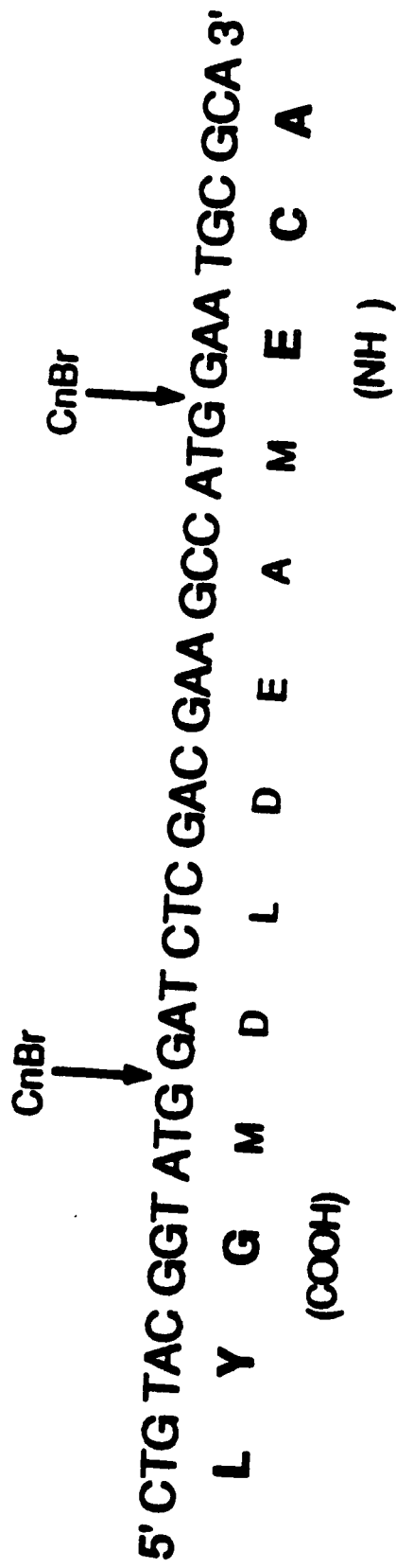


FIG. 42

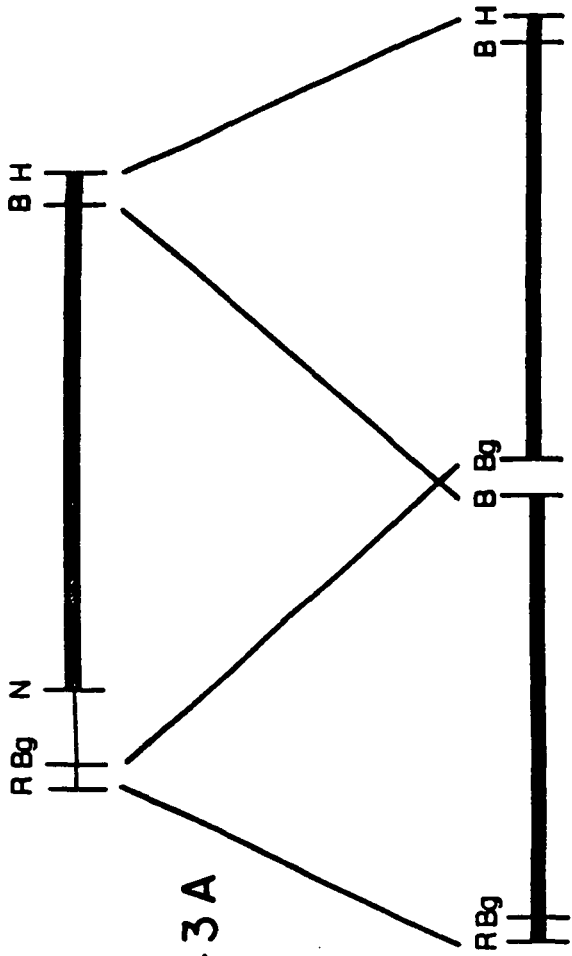


FIG. 43A

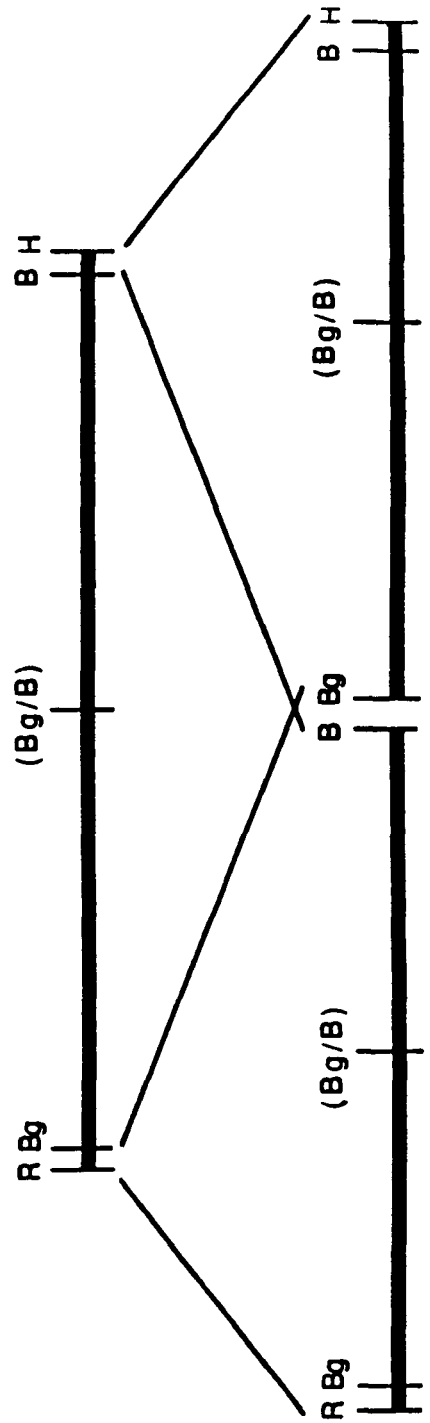


FIG. 43B