

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-505245
(P2005-505245A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 9/08	4 B O 2 4
A 6 1 P 9/08	A 6 1 P 9/12	4 B O 6 3
A 6 1 P 9/12	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C O 8 4
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 1 5	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 88 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-573791 (P2002-573791)	(71) 出願人	503339487
(86) (22) 出願日	平成14年3月18日 (2002.3.18)		バイオラブ サナス ファーマシューティ カ リミターダ
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月17日 (2003.9.17)		ブラジル国 サンパウロ 04071-9
(86) 国際出願番号	PCT/BR2002/000041		00、プラナルト パウリスタ、ドス バ ンデイランテス アヴェニュー 5386
(87) 国際公開番号	W02002/074782	(71) 出願人	503339502
(87) 国際公開日	平成14年9月26日 (2002.9.26)		ファンダカオ デ アンパロ ア ペスキ サド エスタド デ サンパウロ - エフェ・ア・ピ・エ・エセ・ピ
(31) 優先権主張番号	P10101088-3		ブラジル国 サンパウロ 05468-9
(32) 優先日	平成13年3月19日 (2001.3.19)		01、アルト ダ ラパ、ピオ キ スト リート 1500
(33) 優先権主張国	ブラジル (BR)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バソペプチダーゼペプチド阻害剤の単離および精製方法

(57) 【要約】

本発明は、毒ヘビ毒腺、特にボスロプス・ジャララカ (Bothrops jararaca) によって分泌されたペプチドの単離および精製；かく得られたペプチド、ならびに原核生物および真核生物系における遺伝子工学技術による生産方法；かく得られた遺伝子工学作成ペプチド；化学合成による該ペプチドの生産、ならびにこの化学的プロセッシングから得られるペプチドに関する。また、本発明は、バソペプチダーゼの阻害剤としてそれを作用させ、その結果、全身動脈血圧を低下させ、局所的な血管拡張作用を示させるために、区別される医薬組成物中での、異なる手法によって得られた、および種々の手段によって生物に導入された該ペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程：

a) 1500ないし2000rpmにおける15ないし20分間の遠心によって、ボスロブス・ジャララカ毒液のプールから得られた合計800ないし1500mgの毒液を7.0ないし15mlの脱イオン水に溶解させ；上清を濾過カラム、Sephadex G-25 (25ないし80 μ , Sigma)、1.2 \times 101cmに通し；該カラムを室温にてpH5.0ないしpH6.0の30ないし50mM酢酸アンモニウム緩衝液で平衡化させ；

b) 試料を該カラムの頂部に載せ、成分を1.0ないし2.0mL/分の流速で溶出させ； 10

c) 214nmにおいて各分取分につき吸光度プロフィールを得て、該プールの組成を規定し；

d) 増強活性を示すプールの成分を、0.2ないし0.5mL/分の流速にて、0.1ないし1.0% TFA (トリフルオロ酢酸) / 水およびアセトニトリル / 水 (9 : 1) を溶媒として用い、溶媒Bの5%ないし60%のグラジエントを用いる高速液体クロマトグラフィーによって部分的に精製し；

e) ブラジキニン増強ペプチドの分子量および一次構造を質量分析 (ESMS-MS) によって測定する；

ことを含む、血管拡張および抗高血圧作用を有し、毒ヘビ毒腺 (BPP)、特にボスロブス・ジャララカによって分泌されるか、または内因的に生産される (EVASINS)、アンジオテンシン-変換酵素のカルボキシル部位につき特異性を示すバソペプチダーゼペプチド阻害剤を単離し精製する方法。 20

【請求項2】

上記工程 (d) において、214nmに設定されたUV-vis検出器および逆相カラムC-18 / Beckman (5 μ , 4.6 \times 250mm) と共にHPLC Merck-Hitachi、モデルL-6200Aを用い、試料に従ってグラジエントを変化させることを特徴とする請求項1記載の血管拡張および抗高血圧作用を有し、毒ヘビ毒腺、特にボスロブス・ジャララカによって分泌される (BPP) か、または内因的に生産される (EVASINS)、アンジオテンシン-変換酵素のカルボキシル部位につき特異性を示すバソペプチダーゼペプチド阻害剤を単離し精製する方法。 30

【請求項3】

試料を0.1%のギ酸を含む50%水 / ACNに溶解させ、注入ポンプによって5 μ L/分の一定流速下で試料を注入することによって、質量分析によって実施され、400および1600の間の質量 / 電荷比率 (m/z) を走査し、全分析プロセスの間に5秒の走査時間を用いて、データを第1の四重極 (EM-MS) で獲得し、第1の四重極において特徴付けられるごとくプロトン化イオンを呈するペプチドを選択し、続いて3 \times 10⁻³アルゴンガス圧下で衝突誘導解離 (CID) によって断片化し、次いで、第2の四重極 (ESMS-MS) を走査することによりデータを獲得することによって配列決定を行うことを特徴とするBPPのアミノ酸配列を決定する方法。 40

【請求項4】

それを、電子スプレイイオン源 (Micromass) にての正イオン化モードでマスペクトロメーターMicromass Quattro II (ES-MS-MS / Micromass) で行い、データ獲得にソフトウェアMass Lynx (Micromass) を用いることを特徴とする請求項3記載のBPPのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項5】

特徴付けおよび配列決定が、質量分析システム (LC-ESMS-MS) にカップリングされたHPLCシステムによって行い、自動インジェクター、214nmに設定されたUV-vis検出器と、逆相カラムとして全毒液成分の精製のためのC-18 / 分離グルー 50

ブ (5 μ M, 4.6 \times 250 mm) とを備えた Hewlett-Packard HPLC、モデル 1100 を用いることを特徴とする BPP のアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 6】

以下の工程：

- a) イソチオシアナイドグアニジン - フェノール - クロロホルム抽出方法により種々のポスロプス・ジャララカ組織から全 RNA を単離し；各毒ヘビ組織の 1.0 ないし 5.0 マイクログラムの全 RNA を変性アガロース電気泳動処理 (1.0 ないし 2.5 % ホルムアルデヒド) に付し、毛管現象によってナイロン膜に移し；真空オープン中にて RNA を 80 にて 1 ないし 2 時間で該膜にプロットし；
 - b) 該膜を、クロスリンカー (Cross linker) (RPN 2500 モデル - アマーシャム (Amersham)) にて 70000 J/cm² において該膜を 30 ないし 50 分間紫外光に暴露し；
 - c) 2.5 mM の K₂PO₄、pH 7.4、5 \times デンハルトの溶液、50 μ g/ml ニシン精子 DNA、および 10 % 硫酸デキストランを含有する 50 % ホルムアミド溶液中にて、プレ - ハイブリダイゼーションを 42 にて一晩または 16 時間行い；
 - d) 各々、E V A S I N S および C N P のコーディング配列につき、制限酵素 Sma I、および Sma I + BamHI で、BPP および CNP 前駆体、クローン NM87 をコードする cDNA インサートを含むクローンを消化することによって、放射性プローブの合成用の鋳型ストランドとして用いる cDNA 断片を得；
 - e) 低融点アガロースを用いるゲル電気泳動によって該インサートを得；
 - f) 続いて、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、次いでエタノール沈殿を行い；
 - g) ランダムヘキサヌクレオチドおよびポリメラーゼ (クレノウまたは T4 DNA ポリメラーゼ) の存在下、[³²P] - dCTP の取込に基づく反応において約 50 ないし 100 ng の鋳型 DNA を用いて放射性プローブを調製し；
 - h) スピン - カラム S - 200 (ファルマシア) を用いて、取り込まれなかった放射性 - 標識ヌクレオチドからプローブを分離し；
 - i) 放射性標識 cDNA プローブを用いて、プレ - ハイブリダイゼーションを 65 にて 30 ないし 45 分間行い；
 - j) 約 1.5 \times 10⁶ cpm/ml の濃度にて、放射性標識プローブをプレ - ハイブリダイゼーション培地に添加し；
 - k) 膜を高ストリンジェンシー条件で洗浄し (2 \times SSC / 0.1 % SDS 中、65 において各々 15 分間 4 回洗浄、および 0.1 \times SSC / 0.1 % SDS 中、65 にて各々 10 分間の 3 回洗浄)；
 - l) 膜の放射性シグナルの観察された強度に応じて、適当なカセット中の X - 線フィルムに膜を必要な時間暴露し；
 - m) 上記フィルムを - 80 に保持する；
- ことを含む、特にポスロプス・ジャララカの、毒ヘビ組織で発現されたこれらの分子の前駆体の cDNA を用いて推定により E V A S I N S のアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 7】

以下の工程：

- a) グアニジンイソチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出方法を用いて、B. ジャララカの脳からの全 RNA を単離し；
- b) 全 RNA 溶液を予め充填されたオリゴ - dT セルロースカラム (Gibco / BRL) に 2 回通すことによってメッセンジャー RNA を精製し；
- c) 精製されたメッセンジャー RNA の 1 つの分取分を変性アガロースゲル電気泳動 (1.0 ないし 2.5 % ホルムアルデヒド) に付し、臭化エチジウムで染色し；
- d) 該 RNA を毛管現象によってナイロン膜に移して、BPP をコードする領域に特異的なプローブでハイブリダイゼーションによるその一体性を確認し；
- e) カラム技術を用いて、cDNA ライブラリを ZAP フェージ中に構築し；
- f) 5 μ g の脳メッセンジャー RNA から得られた二本鎖 cDNA インサートを ZAP

Pファージにクローン化し；

g) これをイン・ビトロでパッケージし；力価を測定してクローニング効率を確認し；

h) 各々、クロロホルムおよびDMSOの存在下、ファージライブラリーを増幅し、分取分を -20°C および -80°C に維持する；

ことを含む、特にボスロプス・ジャララカの、毒ヘビの脳組織で発現されたこれらの分子の前駆体のcDNAを用いて、推定によりEVASINSのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項8】

以下の工程：

a) 毒腺からのBPPおよびCNPの前駆体をコードするcDNA配列に従って設計された特異的オリゴヌクレオチドを用いるPCR（ポリメラーゼ鎖反応）増幅のために、脳cDNAライブラリーの全ファージ溶解物（ $10\mu\text{l}$ ）を用い、インキュベーションを 42°C で15分間行い、続いて 4°C まで冷却し； 10

b) 酵素を供給された、 10 ピコモルの各プライマー、 2.5 UのTaqポリメラーゼ（アマーシャム）、 $200\mu\text{M}$ のdNTPおよび $1\times$ PCR緩衝液よりなる増幅反応に他の成分を添加し；

c) 各調製された反応混合物を、 94°C における 4 の変性サイクル、および引き続いて、 94°C における1分、 60°C における1分、及び 72°C における1分の35サイクルに付し；

d) アガロースゲル電気泳動によってPCR産物を分析し、臭化エチジウムで染色するまで、反応混合物を 4°C に維持し； 20

e) 通常の方法によってPCR産物をpCRscript SK+（Stratagene）プラスミドベクターにサブクローン化し、ベクターの多重クローニング部位に隣接する部位にアニールされるオリゴヌクレオチド（プライマーT3およびT7）を用いて配列決定する；

ことを含む、特にボスロプス・ジャララカの、毒ヘビの脳の組織で発現されたこれらの分子の前駆体のcDNAの推定によるEVASINSのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項9】

以下の工程：

a) 各々約50000のファージブランクを含有するプレートから調製したニトロセルロース膜を、 $6\times$ SSPE（ $1\times$ SSPE： 0.15M NaCl、 15mM NaH_2PO_4 、 $\text{pH}7$ 、 1mM EDTA）、50%ホルムアミド、0.1% SDSおよび $5\times$ デンハルト中での放射性プローブを用いるハイブリダイゼーションに 42°C にて16時間付し； 30

b) 膜を $2\times$ SSC/ 0.1% SDS中にて3回、次いで $0.1\times$ SSC/ 0.1% SDS中にて3回、各洗浄（ $1\times$ SSC： 0.15M NaCl、 15mM クエン酸ナトリウム、 $\text{pH}7$ ）につき15分間、 65°C で洗浄し；

c) オートラジオグラフィーの後、プローブによって同定されたファージブランクをDNAインサートの分析のために単離し；

d) 該インサートを分析するために、「ヘルパーファージ」を用いて行った、ベクターZAPからのファゲミドpBluescriptのイン・ビボ切出後に、その末端を配列決定する； 40

ことを含む、特にボスロプス・ジャララカの、毒ヘビ脳組織で発現されたこれらの分子の前駆体のcDNAの推定によるBPPのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項10】

各々、SmaIまたはSmaIおよびBamHI、約450bpおよび432bp、位置164ないし610および610ないし1044でクローンNM87の消化によって得られた断片を、ランダム・プライミング方法（Rediprime kit/アマーシャム）による放射性プローブ（ ^{32}P ）の合成で用いることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項 1 1】

以下の工程：

- a) イソチオシアナイドグアニジン - フェノール - クロロホルム抽出を用いて B . ジャララカ毒ヘビ単独の脳から全 RNA を単離し、次いで、既に充填したオリゴ d T セルロースカラムを 1 回通過させることによってメッセンジャー RNA を精製し；
 - b) 該調製のメッセンジャー RNA の一体化をアガロースゲル電気泳動によって確認し、続いて、B P P S および C N P 前駆体をコードする c D N A 配列に従って合成された放射性標識プローブでハイブリダイゼーションを行い；
 - c) 5 μ g のこの調製を用いて、c D N A ライブラリを通常の技術によって Z A P フォージ (S t r a t a g e n e) 中に構築し；
 - d) 該ライブラリを増幅し、最終力価を測定し、これは 9×10^9 p f u / m l 程度となるはずである；
- ことを特徴とする、毒ヘビ脳組織、特にボスロプス・ジャララカ、で発現されたこれらの前駆体分子の c D N A から推定により B P P のアミノ酸配列を決定する方法。

10

【請求項 1 2】

配列決定された D N A インサートを得ることを特徴とする請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

以下の工程：

- a) B P P および C N P 前駆体をコードする c D N A 配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用い；
 - b) 約 2 5 0 塩基対の断片を、毒ヘビ脳 c D N A ライブラリの全フォージ溶解物からクローン化し；
 - c) この c D N A インサートの完全な配列を決定し；
 - d) 高いレベルの同様が毒腺ライブラリで同定された c D N A 配列に対して見出され；
 - e) プラスミド (p B l u e s c r i p t S K +) の多重クローニング部位に隣接する領域にアニールするオリゴヌクレオチド (プライマー) (プライマー T 3 および T 7) を用い、D N A ミニ - 調整 (m i n i - p r e p s) 用の c D N A インサートを含有するプラスミドベクターのハイブリダイゼーションおよび同定、およびインサートの配列決定で用いられる放射性プローブの合成のための鋳型としてナトリウム利尿性ペプチドのコーディングセグメントを用い、約 4×10^6 の独立したクローンを分析する；
- ことを特徴とする毒ヘビ特にボスロプス・ジャララカの、脳 c D N A ライブラリ、から c D N A を増幅する方法。

20

30

【請求項 1 4】

B . ジャララカの c D N A ライブラリのハイブリダイゼーションを介するクローンの選択が、これらの生物活性ペプチドの前駆体蛋白質内の B P P 前駆体をコードする c D N A の単離を可能とすることを特徴とする請求項 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

B . ジャララカの毒液から単離された B P P と E V A S I N S との類似性によって、6 つのペプチドの式が同定される請求項 1 4 記載の方法。

40

【請求項 1 6】

6 つのペプチドの式が：

式	配列
I	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ p ⁴ a a ⁵ a a ⁶ p ⁷ p ⁸
I I	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ a a ⁴ p ⁵ a a ⁶ a a ⁷ P ⁸ P ⁹
I I I	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ a a ⁴ P ⁶ a a ⁷ a a ⁸ P ⁹ P ¹⁰
I V	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ a a ⁴ a a ⁵ a a ⁶ P ⁷ a a ⁸ a a ⁹ P ¹⁰ P ¹¹
V	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ a a ⁴ a a ⁵ a a ⁶ a a ⁷ P ⁸ a a ⁹ a a ¹⁰ P ¹¹
1 P ¹²	
V I	p p ¹ a a ¹ a a ² a a ³ a a ⁴ a a ⁵ a a ⁶ a a ⁷ a a ⁸ P ⁹ a a ¹⁰ a a

50

$1^1 P^1 2^1 P^1 3^1$

[式中、

P は常にプロリンであり、残りは常に L - アミノ酸であって、一文字記号によって表され (後記参照) *、

$p p^1$ は N - 末端であり、ピログルタミル (< E) または単純アミノ酸であってよく、これは通常塩基性ではなく；

$a a^1$ は非 - 塩基性アミノ酸であり、通常 W、S、G または N であり、

$a a^2$ は非 - 酸性アミノ酸であり、通常 P、G、W または R であり、

$a a^3$ は非 - 酸性アミノ酸であり、通常 P、A、R または W であり、

$a a^4$ は式 I については P であり、残りのオリゴペプチドについてはアミノ酸であり、通常 T、P、G、H、R、W または E であり、

$a a^5$ は式 I については通常 Q、N、P または G であり、

式 I I についての $a a^6$ 、式 I I I についての $a a^7$ 、式 I V についての $a a^8$ 、および

式 V についての $a a^9$ は非 - 塩基性アミノ酸であり、通常 Q、N、P、または G であり、

式 I についての $a a^6$ 、式 I I についての $a a^7$ 、式 I I I についての $a a^8$ 、式 I V についての $a a^9$ 、および式 V についての $a a^{10}$ は常に I または A または T であり、

*

酸性アミノ酸 D、E

塩基性アミノ酸 K、R

芳香族アミノ酸 F、W、Y

G - グリシン	N - アスパラギン
A - アラニン	Q - グルタミン
P - プロリン	D - アスパラギン酸
V - バリン	E - グルタミン酸
I - イソロイシン	K - リシン
L - ロイシン	R - アルギニン
S - セリン	F - フェニルアラニン
T - スレオニン	H - ヒスチジン
W - トリプトファン	Y - チロシン

< E - ピログルタミル]

であることを特徴とする請求項 1 4 記載の方法。

【請求項 1 7】

以下の工程：

a) 2% アニソールを含有する、ジクロロメタン (DCM) 中の 30% TFA の存在下、樹脂に結合した第 1 のアミノ酸残基から Boc 基を 30 分間で除去し；

b) 続いて、1/2% アニソール、DCM および MeOH で洗浄し、次のアミノ酸のカップリングのために；

c) DCM 中の 10% TEA または 5% DIPEA での 10 分間の処理によって、アミノ基を中和し；

d) ペプチジル - 樹脂を DCM、MeOH、DCM およびカップリングフェーズで用いられる溶媒で洗浄し；

e) ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) または 2 - (1H - ベンゾトリアゾリル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルウロンテトラフルオロボレート (TBTU)、および樹脂中のアミノ基 (アミン成分、CA) の量と比較して 3 倍モル過剰の Boc - アミノ酸 (カルボン酸成分、CC) およびカップリング剤に基づき、アシル化剤を用いる活性化によってアミノ酸をカップリングし；ニドリン定量方法を用いてカップリング反応を 2 時間モニターし；

f) 今度の残基が反応に入るまで、アミノ酸を脱保護することによって以下のサイクルを開始し、所望の配列の伸長の最後まで、プロセスをサイクルにて継続し；

g) ペプチドを樹脂から切断し、HF 処理の間に放出されるカルボケーションによって誘

導される副次的な反応に対するサプレッサーとして作用する p - クレゾールおよびジメチルスルフィド (D M S) (各々の 5 % v / v) の存在下での 0 における 6 0 ないし 9 0 分間の無水 H F での処理によってその側鎖を脱保護し ;

h) 樹脂を酢酸エチルで洗浄し、ペプチドを水中の 5 % 酢酸 (A c O H) (v / v) で抽出し、続いて、凍結乾燥して、通常アモルファス状である白色粉末を得る ;

ことを含む、血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤の固相合成方法。

【請求項 1 8】

(工程 e) において、 D I C を用いる場合、試薬 C A : C C : D I C の割合は 1 : 3 : 3 であって、 T B T U を用いる場合、 C A : C C : T B T U : D I E A の 1 : 3 : 3 : 4 であり、これらの試薬の最終濃度は 0 . 0 5 および 0 . 1 M の間にあることを特徴とする請求項 1 7 記載の血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤についての固相合成方法。

10

【請求項 1 9】

工程 (e) において、 A s n および G l n のカップリングにおいて、ヒドロキシベンゾトリアゾール (H O B t) をアシル化合物と一緒に用いて、これらのアミノ酸のニトリルの形成を防止し、 C A : C C : T B T U : H O B t ; D I E A の最終割合は 1 : 3 : 3 : 3 : 5 であることを特徴とする請求項 1 7 記載の血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤についての固相合成方法。

20

【請求項 2 0】

工程 (g) において、このアミノ酸の側鎖を保護するホルミル基の除去が、 T r p 残基を含む配列において切断と同時に起こるように、エタン - 1 , 2 - ジチオール (E D T) を添加することを特徴とする請求項 1 7 記載の血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤についての固相合成方法。

【請求項 2 1】

以下の工程 :

a) 約 2 0 分間の D M F 中の 2 0 % ピペリジン溶液での処理によって、アミン保護基 F m o c をアミノ酸から除去し、それにより、アミノ基を脱プロトン化し ;

b) 樹脂におけるアミノ酸基の量を比較して 3 モル過剰の B o c アミノ酸およびアシル化剤と共に、ジソプロピルカルボジイミド (D I C) または 2 - (1 H - ベンゾトリアゾリル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロンテトラフルオロボレート (T B T U) を含有するアシル化剤での活性化によって、アミノ酸をカップリングさせ ; 該カップリング反応は、ニドリン定性方法を用いて 2 時間続き ;

30

c) 8 5 ないし 9 5 % T F A (v / v) を用い、 H F よりも弱い酸性である培地中で切断を行い、異なるサプレッサータイプの付随的反応の混合物を約 2 時間で添加し ;

d) 樹脂と共に氷冷エチルエーテル中でペプチドを沈殿させ、 8 0 0 0 r p m において 5 分間遠心処理し、上清を捨て ;

e) 残渣をエチルエーテル中に再懸濁し、攪拌し、遠心処理し、該手法を 5 回反復し ; 洗浄および沈殿を続けて行い ;

f) 樹脂およびペプチドの混合物を真空中で乾燥し、

40

g) 水中の 5 % A c O H (v / v) でペプチドを樹脂から抽出し、次いで、

h) 濾液を凍結乾燥してアモルファス状の白色粉末を得る ;

ことを含む血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤についての固相合成方法。

【請求項 2 2】

工程 (c) において、(通常、 t e r t - ブチルタイプの) 側鎖のプロテクターの結合、ならびに樹脂に対するペプチドの結合が、 B o c 化学観察されるものよりも弱いので、切断が H F よりも弱い酸性媒体中で行われることを特徴とする請求項 2 1 記載の血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈するバソペプチダーゼペプチド阻害剤の固相合成方法。

【請求項 2 3】

50

以下の式：

A C E の C 部位に対する特異性を示さないグループ (a)：

< E K W A P

A C E の C 部位に対する特異性を示すグループ (b)：

I p p¹ a a¹ a a² a a³ P⁴ a a⁵ a a⁶ P⁷ P⁸
 I I p p¹ a a¹ a a² a a³ a a⁴ P⁵ a a⁶ a a⁷ P⁸ P⁹
 I I I p p¹ a a¹ a a² a a³ a a⁴ a a⁵ P⁶ a a⁷ a a⁸ P⁹ P¹⁰
 I V₁ p p¹ a a¹ a a² a a³ a a⁴ a a⁵ a a⁶ P⁷ a a⁸ a a⁹ P¹⁰ P¹¹
 V₁₁ P¹² p p¹ a a¹ a a² a a³ a a⁴ a a⁵ a a⁶ a a⁷ P⁸ a a⁹ a a¹⁰ P¹¹
 V I₁₁ P¹² P¹³ p p¹ a a¹ a a² a a³ a a⁴ a a⁵ a a⁶ a a⁷ a a⁸ P⁹ a a¹⁰ a

[式中、

P は常にプロリンであり、残りは常に L - アミノ酸であって、一文字記号によって表され (後記 * 参照)、

p p¹ は N - 末端であって、ピログルタミル (< E) または単純アミノ酸であってよく、通常塩基性ではなく；

a a¹ は非 - 塩基性アミノ酸であり、通常 W、S、G または N であり、

a a² は非 - 酸性アミノ酸であり、通常 P、G、W または R であり、

a a³ は非 - 酸性アミノ酸であり、通常 P、A、R または W であり、

a a⁴ は式 I については P であって、アミノ酸であり、残りのオリゴヌクレオチドについては通常 T、P、G、H、R、W または E であり、

a a⁵ は式 I については通常 Q、N、P または G であり、

式 I I についての a a⁶、式 I I I についての a a⁷、式 I V についての a a⁸ および式 V についての a a⁹ は非 - 塩基性アミノ酸であり、通常 Q、N、P または G であり、

式 I についての a a⁶、式 I I についての a a⁷、式 I I I についての a a⁸、式 I V についての a a⁹、および式 V についての a a¹⁰ は常に I または A または T であり、

G - グリシン	N - アスパラギン
A - アラニン	Q - グルタミン
P - プロリン	D - アスパラギン酸
V - バリン	E - グルタミン酸
I - イソロイシン	K - リシン
L - ロイシン	R - アルギニン
S - セリン	F - フェニルアラニン
T - スレオニン	H - ヒスチジン
W - トリプトファン	Y - チロシン

< E - ピログルタミル]

によって特徴付けられ、

ここに、

前記表に記載したペプチドは A C E の C - 部位に対するより高い選択性を有し、これは 2 n M および 1 0 0 μ M の間の K_i 値によって特徴付けられ、他方、A C E の N - 部位については 5 0 μ M を超え；これらのペプチドは N E P の阻害剤でもあり、5 ないし 1 5 0 μ M の間の K_i 値を示し；それらの全ては摘出されたモルモット回腸に対するブラジキニンの収縮作用を増強させ、5 ないし 3 0 0 n M で変化する濃度で用いた場合、ブラジキニンの収縮効果は倍増され；1 0 および 7 0 0 n M の間の濃度で使用した場合、ブラジキニンの血圧降下効果もまた 3 0 ないし 8 0 % だけ増強され、ブラジキニン単独の効果の持続と比較した場合、5 および 1 5 倍の間の血圧降下の持続を増強させることを特徴とする抗 - 高血圧および血管拡張作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項 2 4】

10

20

30

40

50

DおよびEが酸性アミノ酸であり、KおよびRが塩基性アミノ酸であって、F、WおよびYが芳香族アミノ酸であることを特徴とする請求項23記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項25】

オリゴペプチドのカルボキシル - 末端に配列モチーフを含む一般式：



[式中、 X^1 はいずれのアミノ酸でもあり得、 X^2 は通常Iであって、N - 末端アミノ酸は通常< Eによってブロックされている]

によって表される8ないし13個のアミノ酸のペプチドであることを特徴とする請求項23記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤（グループb）。 10

【請求項26】

ACEのC - 部位に対する選択性を示し[グループ(b)]、これは、2 nMおよび100 μ Mの間の K_i 値によって特徴づけられ、他方、ACEのN - 部位についての値は50 μ Mを超えることを特徴とする請求項23および25記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項27】

NEPの阻害剤でもあり、5ないし150 μ Mの間の K_i 値を示すことを特徴とする請求項23および25記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。 20

【請求項28】

5ないし300 nMの間の濃度において、摘出されたモルモット回腸に対するブラジキニンの収縮作用を増強させ、ブラジキニンの収縮効果を倍増させることを特徴とする請求項23および25記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項29】

10ないし700 nMの間の濃度においてブラジキニンの血圧降下効果を30ないし80%増強させ、ブラジキニン単独による降下の持続と比較した場合、この血圧降下効果の持続を5倍ないし15倍増幅させることを特徴とする請求項23および25記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。 30

【請求項30】

非常に種々のリガンド：スルフォニル、カルボキシル、ホスホリルのような酸性基、またはチオールおよびオレフィン、ジチオ、アゾもしくはジアゾ化合物、アルデヒドなどのような他の基に対してコンジュゲートすることができることを特徴とする請求項23および25記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項31】

微小循環が侵された標的である場合、一般的なまたは局在する全身心血管障害で用いられることを特徴とする請求項30記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項32】 40

ヒト高血圧障害およびその結果で用いられることを特徴とする請求項31記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項33】

血管病巣および過形成で用いられることを特徴とする請求項32記載の血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項34】

リン酸 生理食塩水緩衝液、生理食塩水または他のより便宜な担体のような生理学的に許容される媒体中に希釈されたことを特徴とする医薬化合物を得るにおいて血管拡張および抗高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤。

【請求項35】 50

イン・ピトロおよびピン・ピボにおけるバソペプチダーゼペプチド阻害剤の使用。

【請求項 36】

組織微小循環における全身または局所作用についての経粘膜、非経口、または注入、特に静脈内を介するイン・ピボでのバソペプチダーゼペプチド阻害剤の使用。

【請求項 37】

約 1 μg ないし 10 mg の間で変化する、通常 0.5 mg / kg 体重の投与量におけるイン・ピボでのバソペプチダーゼペプチド阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗 - 高血圧および血管拡張作用を呈し、毒ヘビ毒腺によって分泌され (BPP)、または内因的に生産された (EVASINS (Endogenous Vasopressinase Inhibitors))、アンギオテンシン変換酵素のカルボキシル部位に特異的なバソペプチダーゼペプチド阻害剤の単離および精製方法に関する。また、本発明は、毒ヘビ毒腺によって分泌された (BPP)、または内因的に生産されたペプチド阻害剤の単離方法、およびそのアミノ酸配列の決定方法に関する。また、本発明は、毒ヘビ組織、特に、ボスロプス・ジャララカ (Bothrops jararaca、B. ジャララカ) で発現された分子の前駆体の cDNA の推定による BPP のアミノ酸配列決定方法；特にボスロプス・ジャララカからの脳 cDNA または膵臓 cDNA ライブラリー (libraries) から cDNA を増幅する方法；バソペプチダーゼペプチド阻害剤の固相合成方法；血管拡張および抗 - 高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤の使用に関する。さらに、本発明は、バソペプチダーゼに対する阻害効果の、および平滑筋、および微小循環および心血管系に対する生物学的活性の測定方法に関する。

10

20

30

【0002】

すなわち、血管拡張および抗 - 高血圧作用を呈し、毒ヘビ毒腺 (BPP)、特にボスロプス・ジャララカによって分泌されるか、または内因的に生産された (EVASINS) カルボキシル部位またはアンギオテンシン変換酵素に特異的なバソペプチダーゼペプチド阻害剤の単離および精製方法；毒ヘビ毒腺によって分泌された (BPP) または内因的に生産されたアミノ酸配列決定方法；毒ヘビ組織、特にボスロプス・ジャララカで発現された分子の前駆体の cDNA の推定による BPP のアミノ酸配列決定方法；毒ヘビ組織、特にボスロプス・ジャララカで発現された分子の前駆体の cDNA の推定による EVASINS のアミノ酸配列決定方法；ボスロプス・ジャララカからの毒ヘビ脳および / または膵臓 cDNA ライブラリーから cDNA を増幅する方法；抗 - 高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤の、血管拡張および抗 - 高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチドの固相合成方法；医薬化合物を得るための血管拡張および抗 - 高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤の使用；バソペプチダーゼに対する阻害活性の、および平滑筋に対する、および微小循環および心血管系に対する生物学的活性の測定方法に関する。

【0003】

さらに詳しくは、本発明は、毒ヘビ毒腺によって分泌された (BPP)、または特にボスロプス・ジャララカの脳において内因的に見出されるペプチドの単離に関する。本発明者は、かく得られたペプチド、ならびに原核生物および真核生物系において遺伝子工学方法によってそれらを生産する方法；かく得られた遺伝子工学作成ペプチド；化学合成による該ペプチドの生産、ならびに蛋白質分解加工から得られたペプチドに対して、内因的ペプチドについての一般的名称エバシンス (EVASINS) (内因的バソペプチダーゼ阻害剤) を提案する。本発明は、また、バソペプチダーゼに対する阻害作用を持ち、その結果、血圧を低下させる医薬化合物における前記方法によって得られたペプチドの使用、および血圧を低下させるための前記ペプチドの使用に関する。

40

【0004】

このように、本発明は、毒ヘビ毒腺によって分泌された (BPP)、またはボスロプス・ジャララカの他の組織で生産された (EVASINS)、ブラジキニン増強ペプチドして

50

知られた、心血管作用を持つペプチドに関する。

【背景技術】

【0005】

毒ヘビ毒液は、生物学的に活性な蛋白質およびペプチドの複雑な混合物よりなる。公知の特徴付けられた生物学的に活性なペプチドの内、本発明者らは、とりわけ、ブラジキニン増強ペプチド(BPP)、ナトリウム利尿因子(C-タイプのナトリウム利尿ペプチド、CNP)、サラフトキシン(SRTx)を挙げる。これらの生物活性ペプチド(ホルモン、神経ペプチド、トキシン(toxins)など)は、分子当たり1以上の生物活性ペプチドを含有する、そして、これらのペプチドの蛋白質前駆体に対する酵素の加水分解作用によって生じる。ボソルプス・ジャララカ(Bothrops jararaka)のような種々の毒ヘビの毒腺によって分泌されるトキシン類は、その作用メカニズムがアンギオテンシン変換酵素(ACE)に対するその阻害効果、アンギオテンシンIからアンギオテンシンIIの変換のブロック(高血圧)、およびブラジキニンの保持(低血圧)に関する血圧降下作用を持つ非常に多数のペプチド(BPP)を含む。

【0006】

これらのペプチドの一次構造は、2つのファミリー、互いに高度の相同性を示す、7アミノ酸残基よりも小さなこれらのペプチドおよび7アミノ酸残基よりも大きなペプチド、へのその分類を可能とする。

【0007】

この特別な分野における研究は、広く種々の適用が、トキシン、特に毒ヘビの毒液トキシンプラジキニン増強ペプチド(BPP)のような分子のいくつかの修飾(modifications)で見出すことができることを示し、そしてこのペプチドはヒトを含めた哺乳動物において抗-高血圧作用の特別な剤であり得る。

【0008】

BPPのアミノ酸配列に対して高度な相同性を有する他のブラジキニン増強ペプチドのアミノ酸配列はヘビの毒液から得られなかった。事実、これらは、分子生物学技術を用い、脳、膵臓および脾臓組織のような他の毒ヘビ組織で見出されるその前駆体のヌクレオチド配列から導かれた。その合形成態において、ボソロプス・ジャララカの毒腺から分泌されたBPPのような、これらの内因性ペプチドは、血管内皮のアンギオテンシン変換酵素(ACE)に作用し、アンギオテンシンIIの形成を防止し(高血圧)、およびブラジキニンの低血圧を防止する。

【0009】

アンギオテンシン変換酵素(ACE)は、内皮細胞の細胞質膜に主として位置する、2つの触媒部位(カルボキシ-またはC-部位、およびアミノ酸-またはN-部位)を持つペプチダーゼである。C-末端活性部位は、アンギオテンシンIおよびブラジキニンにより特異的である。BPPは、本発明に至るまではACEを阻害することによって作用し、C-またはN-部位の阻害の特異性は知られておらず、この阻害の結果は動脈血圧の低下である。

【0010】

特異的な活性部位に選択的でないACEの阻害は、カプトプリルと呼ばれる部位-指向性阻害剤の開発に導いた。

【0011】

N部位は、造血を調節する天然循環ペプチドホルモン(Ac-Ser-Asp-Lys-Pro)を代謝する。該酵素のカルボキシルドメイン(C部位)は、アンギオテンシンIのアンギオテンシンIIへの変換に対してより特異的であって、ブラジキニンを不活化させる。現在まで、記載されたBPPの全てがC部位に対してなんらかの優先性を呈し、それをより特異的な抗高血圧剤とするかは知られていなかった。

【0012】

抗-高血圧剤として作用する潜在能力を有し得る、ヘビの毒液からの多数の未知のトキシンが依然としてある。これらの分子は、ACEのC-部位を特異的に阻害できるのみなら

ず、同時に、中性エンドペプチダーゼ (NEP) およびエンドセリン変換酵素 (ECE) として血管内皮の他のペプチダーゼを阻害する。ECE は、ブラジキニン、ナトリウム利尿性ペプチド、血圧降下剤を不活化し、エンドセリン (endothelins) を生成する (高血圧)。ACE、NEP および ECE はバソペプチダーゼとして知られており、動脈血圧制御のほとんどを担う。これらの二重および/または三重阻害剤はより特異的であるのみならず、より効果的である。なぜならば、それらは動脈血圧を調節する内因性分子の代謝に作用するからである。ACE の 2 つの触媒部位の間の差は、ダイブ, V. (Dive, V.); コットン, J. (Cotton J.); イオタキス, M. A. (Yiotakis, M. A.); バシリオウ, S. (Vassiliou, S.); ジラセック, J. (Jiracek, J.); バゾ・, G. (Vazeaux, G.); ショヴェ, G. (Chauvet, G.); クニアッセ, P. (Cuniasse, P.); Corvol; RXP407 でよく規定されており、ホスフィニックペプチドは、その 2 つの活性部位の間を区別することができるアンジオテンシン I 変換酵素の優れた阻害剤である (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 13, 4330 - 4335 (1999))。

10

【0013】

血圧降下作用を呈するブラジルおよびアジア毒ヘビの毒液からのあるペプチドが既に単離され、配列決定されており (オンデッティ (Onditti) およびクッシュマン (Cushman), Ann. Rev. Biochem. 51, 293 - 308, 1982)、それらのうちの 1 つの抗高血圧効果がヒトで示されている (グラバスら (Gravas et al.)) N. Engl. J. Med. 291, 817 - 821, 1974) ことが科学文献から知られている。

20

【0014】

いくつかの BPP が、分子生物学技術を用いて、その前駆体のアミノ酸配列から導かれている (ムラヤマ等 (Murayama et al.), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1189 - 1193, 1997)。

【0015】

医薬産業は、非 - ペプチドの性質の、内因性分子といずれの化学的類似性のない新しい抗高血圧薬物を開発した。それはオモパトリラット (OMOPATRILAT) と呼ばれ、ACE および NEP 双方に対して阻害特性を呈し、高濃度の循環レニンにてラットにおいて長期抗 - 高血圧効果を示す。加えて、この物質は心臓の性能を改良し、自然発生高血圧ラット (SUR (ヒト本態性高血圧についてのモデル)) の生存を延ばす。該オモパトリラットは、臨床試験の進んだ相において、2 つの場所ペプチダーゼ ACE および NEP に対する最初の部位 - 指向性阻害剤である。

30

【0016】

オマパトリラットならびに BPP および EVASINS の間の主な差は以下の通りである：

1. BPP および EVASINS はポリペプチドの性質であり；
2. それらは、外分泌腺 (exocrine glands) によって分泌された、または脊椎動物において内因的に生産されたペプチドと同一または相同な合成分子であり；
3. ACE 阻害剤として、8 ないし 13 アミノ酸残基の BPP および EVASINS は C - 部位に対して選択性を示し、また、NEP X を阻害し；
4. それらは、主として体液および組織の蛋白質分解酵素によって分解される。

40

【0017】

1996 年 7 月 23 日に公開された米国特許第 5538999 号、および 1996 年 9 月 24 日に公開された米国特許第 5559135 号は、毒ヘビ毒腺によって分泌された阻害剤、「PCA-W-P-R-P-E-I-P-P-SQ 20881」、ACE 阻害剤が記載され、これは、結果的に、動物において動脈血圧を低下させ、高血圧の個体において動脈血圧の効果的な低下を示した。しかしながら、これらの特許は、ACE の 1 つまたは 2 つの触媒部位に対するこの阻害剤の作用の特異性を記載しておらず、また明らかに

50

していない。該特許は、動脈血圧を調節できると云う他の酵素の重要性を示さず、従って、より高い作用特異性を持つBPPに対して研究はなされてなかった。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0018】

本発明は、バソペプチダーゼに対するEVASINSの作用の特異性を示す点で前記特許とは異なり；また、本発明は、心血管系に対するその活性を持つ数ダースの分子の化学的構造の間の明瞭な関係を確立する。また、本発明は、1つの構造モチーフ(motif)およびここに提案するリーダー分子(leader molecules)の内因性起源、前記刊行物からでは予測されない特徴を確立する。

10

【0019】

本発明は、前記同様の議論を用いて、1974年6月25日に公開された米国特許第3819831号、1973年1月30日に公開された米国特許第3714140号、1974年8月27日に公開された米国特許第3832337号、1974年11月19日に公開された米国特許第3849252号、1976年3月30日に公開された米国特許第3947575号、1976年8月3日に公開された米国特許第3973006号、1988年3月15日に公開された米国特許第4731439号、1988年9月27日に公開された米国特許第4774318号、および1996年8月27日に公開された米国特許第5550127号から区別することができる。

【0020】

現存する技術的問題を解決することを目的に、抗-高血圧剤としての効果の点で優れた質の最終製品を得るために、本発明は、最初であってかつ新規な方法にて、(1)規定された構造モチーフ；(2)ACEのC-部位に対する特異性；および(3)NEPXに対する高い阻害特異性を呈するBPPおよびEVASINSを提案する。

20

【課題を解決するための手段】

【0021】

これらの新規な、バソペプチダーゼに対する阻害作用を呈する、ACEのC部位に対して特異的な抗-高血圧剤は、ブラジルの毒ヘビポスロポス・ジャララカ(Botrhrops jararaca)の毒液から単離し、配列決定されるか、またはこの毒ヘビの組織から得たもののクローニングおよびcDNA配列決定によって同定された。化学合成によっても得ることができ、天然ペプチドと同一のアミノ酸配列を含むこれらのペプチドは、ラットにおいて長期抗-高血圧作用を示す。それ自体用いられ、または前記した特徴を維持するために化学的に修飾された、天然ペプチドと同一の配列を有するこれらの合成ペプチドの使用は、心血管障害の治療において、または局所的循環作用において、特にヒトでの高血圧障害および他の心血管障害において治療剤として有用であり得る。

30

【0022】

毒液において、およびポスロポス・ジャララカの組織において見出された22のBPPを質量分析によって配列決定し、あるいはそれらの配列は、毒ヘビの組織で発現された分子の前駆体のcDNA配列から推定された。対応する合成ペプチドを、組換えACEのC-部位の、およびNEPの阻害剤として、および摘出された(isolate)モルモット回腸に対するブラジキニン収縮活性の増強剤として、およびラットにおけるブラジキニン血圧降下活性としての双方としてテストした。それらは、共に、(分泌された)BPPとして、およびEVASINS(内因性)として見出された。ACEのC部位に対する作用の特異性に従って、それらは2つの群に分けることができる：

40

【0023】

a)非-特異的。ACEのC-部位に対してははっきりとした選択性を呈しないが、摘出された(isolate)平滑筋の調製(preparation)について観察されたごとく、ならびにその血圧降下効果によって、ブラジキニンの高増強活性を呈する1つのペプチド、ペントペプチド<EKWAP(ピログルタミル(<E)-リシン(K)-トリプトファン(W)-アラニン(A)プロリン(P))。それは、(毒ヘビ毒腺か

50

ら分泌された) B P P ならびに(毒ヘビ脳組織からの、内因性の) E V A S I N S として見出された。それは、A C E の N および C 部位双方につき、 μ M 範囲の K_i 値を呈する。また、それは、低い親和性をもって、50ないし150 μ M の範囲の K_i 値にて N E P を阻害する。それは、15ないし300 n M に変化する濃度にて、摘出されたモルモット回腸に対するブラジキニンの収縮作用を増強する。また、300 n M の濃度において、ブラジキニンの血圧降下効果もまた60%だけ増強され、ブラジキニン単独の効果の持続と比較して、血圧降下効果の持続の5倍増加を示す。

【0024】

b) 特異的。これらのペプチドは、8ないし13個のアミノ酸残基(a m i n o a c i d r e s i d u e s)を含み、1000ないし1700ドルトン(D a l t o n s)の範囲の分子量を呈する。このグループにおいては、摘出モルモット回腸に対する、およびラット動脈血圧に対するブラジキニンの収縮作用の最も選択的かつ効果的な増強剤が B P P または E V A S I N S として見出された。それらは科学的に修飾され、同様な薬理学的特性を持つ他のペプチドを生じる。

10

【0025】

以下の表1は、本発明のグループb)に記載された阻害剤から誘導される合成オリゴヌクレオチドを示す。

【0026】

【表1】

式	配列
I	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ p ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ P ⁸
II	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ P ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ P ⁹
III	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ P ¹⁰
IV	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ aa ⁸ aa ⁹ P ¹⁰ P ¹¹
V	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ aa ⁹ aa ¹⁰ P ¹¹ P ¹²
VI	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ aa ¹⁰ aa ¹¹ P ¹² P ¹³

[式中、

Pは常にプロリンであり、残りは常にL-アミノ酸であって、一文字記号によって表され (後記参照)、

10

pp¹はN-末端であり、ピログルタミル (<E) または単純アミノ酸であってよく、これは通常塩基性 (non-basic) ではなく;

aa¹は非-塩基性アミノ酸であり、通常W、S、GまたはNであり、

aa²は非-酸性アミノ酸であり、通常P、G、WまたはRであり、

aa³は非-酸性アミノ酸であり、通常P、A、RまたはWであり、

aa⁴は式IについてはPであり、残りのオリゴペプチドについてはアミノ酸であり、通常T、P、G、H、R、WまたはEであり、

aa⁵は式Iについては通常Q、N、PまたはGであり、

式IIについてのaa⁶、式IIIについてのaa⁷、式IVについてのaa⁸、および式Vについてのaa⁹は非-塩基性アミノ酸であり、通常Q、N、P、またはGであり、

20

式Iについてのaa⁶、式IIについてのaa⁷、式IIIについてのaa⁸、式IVについてのaa⁹、および式Vについてのaa¹⁰は常にI、AまたはTであり、

酸性アミノ酸 D、E

塩基性アミノ酸 K、R

芳香族アミノ酸 F、W、Y

G	-	グリシン	N	-	アスパラギン
A	-	アラニン	Q	-	グルタミン
P	-	プロリン	D	-	アスパラギン酸
V	-	バリン	E	-	グルタミン酸
I	-	イソロイシン	K	-	リシン
L	-	ロイシン	R	-	アルギニン
S	-	セリン	F	-	フェニルアラニン
T	-	スレオニン	H	-	ヒスチジン
W	-	トリプトファン	Y	-	チロシン
<E	-	ピログルタミル]			

30

【0027】

グループ (b) 中特に注目されるのは、一般式:

構造式 [P X¹ X² P P]

[式中、X¹ はいずれのアミノ酸であってもよく、X² は一般にIであり、N-末端アミノ酸はブロックされており (blocked)、N-アミノ酸は一般に<Eによってブロックされている]

40

のオリゴペプチドのカルボキシ-末端モチーフを示す8ないし13個のアミノ酸のペプチドである。

【0028】

前記表1に記載したペプチドは、2 nMないし100 μMの範囲のKi値によって特徴付けられるごとくACEのC-部位に対してより高い特異性を示し、他方、ACEのN部位に対しては、これらの値は50 μMを超えていた。これらのペプチドは、5ないし150 μMの範囲のKi値を持つNEPの阻害剤でもある。これらの全ては、摘出モルモット回腸に対するブラジキニンの収縮活性を増強し、5ないし300 nMの範囲の濃度において

50

、ブラジキニンの収縮効果を倍増させる。また、ブラジキニンの血圧降下効果が、10ないし700 nMの範囲の濃度において30ないし80%だけ増強され、ブラジキニン単独と比較して、血圧降下効果の持続を5ないし15倍に増加させる。

【0029】

本発明は、以下の工程を含む、毒ヘビ毒腺 (serpent venom glands)、特にボスロプス・ジャララカの毒腺によって分泌された、抗-高血圧作用を持つバソペプチダーゼペプチド阻害剤についての単離および精製方法を最初に提案する。

A - ボスロプス・ジャララカのヘビ毒からのBPPの単離および精製：

- ボスロプス・ジャララカの毒液プール (pool) から得られた合計800ないし1500 mgの毒液を7.0ないし15 mlの脱イオン水に溶解させ、1500ないし2000 rpmにて15ないし30分間遠心分離処理を行った (centrifug)；上清を取り出し、1.2 x 10¹ cmのセファデックス (Sephadex) G-25 Mゲル濾過カラム (25 - 80 μ, シグマ (Sigma)) に適用した；カラムを室温にて酢酸アンモニウム緩衝液 (30ないし50 mM, pH 5.0ないし6.0) で平衡化した。試料をカラムの頂部に加え、1.0ないし2.0 mL / 分の流速にて成分を溶出させた。モルモット回腸に対するブラジキニン増強活性に基づき、214 nmにおける各分取分 (aliquot) についての吸光度プロフィールによりプールの構成を規定した。

【0030】

B - ブラジキニン増強活性を示すプール成分の部分的単離：

- 高速液体クロマトグラフィー - HPLC

ブラジキニン増強活性を示す、工程Aで得られたプールの成分を、214 nmに設定されたUV-vis検出器を備えた高速液体クロマトグラフィー - HPLC (メルク - ヒタチ (Merck - Hitachi) モデルL-6200A)、および逆相カラムC-18 / ベックマン (Beckman) (5 μ, 4.6 x 250 mm) によって部分的に単離した。溶媒Aは水中0.5ないし1% TFA (トリフルオロ酢酸) であり、溶媒Bは5%ないし60%のアセトニトリル (ACN) のグラジエント (gradient) であり、流速は0.2ないし0.5 mL / 分であった。用いたグラジエントは試料に応じて変化させた。214 nmにおける吸光度ピークを手動で収集することによってペプチドを得た。

【0031】

C - 質量分析によるブラジキニン増強ペプチドの分子量および一次構造の決定 (ES-MS-MS)

本発明のもう1つの態様は、電子スプレイイオン源 (Micromass)、およびデータ獲得のために用いるマス・ライニクス (Mass Lynx) ソフトウェア (マイクロマス) を備えた、正イオン化モードの、マイクロマス・クアットロ (Micromass Quattro) II 質量分析計 (ESMS-MS / Micromass) で行う質量分析によって、毒ヘビ毒液、より具体的にはボスロプス・ジャララカから精製されたBPPのアミノ酸配列決定方法に関する。試料を0.1%ギ酸を含む50%水 / ACNに溶解させ、注入ポンプによって、5 μL / 分の一定流速で注入した。全分析プロセスの間、5秒の走査時間にて、400および1600の間の質量 / 電荷 (m/z) 比を走査することによって、第1の四重極 (ESMS) でデータを獲得した。配列決定は、第1の四重極で特徴付けしてプロトン化イオンを呈する選択されたペプチドについて行い、続いて、3 x 10⁻³ のアルゴン圧力にて誘導乖離衝突 (IDC (induced dissociation collision)) によって断片化し、最後に、第2の四重極 (ESMS-MS) で走査することによってデータを獲得した。ソフトウェア・マスリニクス (Mass Lynx) (Micromass) をデータ獲得に用いた。機械のパラメーターは、標準として合成ブラジキニンを用いて最適化した。

全毒液成分の単離のために、自動インジェクター、214 nmに設定されたUV-vis検出器、および逆相カラムC-18 / ザ・セパレーションズ・グループ (The Separations Group) (4.6 x 250 mm / 5 μ) を備えたヒューレット・パカード (Hewlett-Packard) HPLCモデル1100を用い、質量分

析システムにカップリングさせた H P L C システム (L C - E S M S - M S) で特徴付けおよび配列決定も行った。用いた溶媒は溶媒 A : 0 . 1 % T F A / 水、溶媒 B : 1 0 % A / A C N 溶媒であり、流速は 0 . 6 m L / 分であった。用いたグラジエントは、

t = 0 ないし 5 分 : 0 % B

t = 5 ないし 6 5 分 : 0 ないし 6 0 % B

t = 6 5 ないし 7 0 分 : 6 0 ないし 1 0 0 % B

t = 7 0 ないし 7 5 分 : 1 0 0 % B

t = 7 5 ないし 8 0 分 : 1 0 0 ないし 0 % B

であった。

【 0 0 3 2 】

H P L C で用いた 6 0 0 μ L / 分の流れのうち、2 0 μ l を質量分析計に自動注入し、残りの 5 8 0 μ l を U V - v i s 検出器に供給した。

【 0 0 3 3 】

質量分析はイオン電子スプレイ源 (M i c r o m a s s) を備えた、正イオン化モードの、マイクロマス・クアットロ (M i c r o m a s s Q u a t t r o) I I (E S M S - M S / M i c r o m a s s) 質量分析計で行った。特徴づけおよび配列決定のデータの獲得は、この目的で作ったソフトウェア、マス・リニックス (M a s s L y n x) ソフトウェア (M i c r o m a s s) によって行った。

【 0 0 3 4 】

- 本発明のもう 1 つの態様は、以下の工程を経る、毒ヘビ組織、特にボスロポス・ジャララカで発現された分子の前駆体の c D N A 配列の推定による B P P のアミノ酸配列の決定である。

- 単一の B . ジャララカ種の脳からの全 R N A を、グアニジンイソチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出方法によって単離し、予め充填したオリゴ - d T セルロースカラムに全 R N A 溶液を二回通すことによってメッセンジャー (m e s s e n g e r) R N A を精製した。精製された m R N A の完全性 (i n t e g r i t y) を、アガロースゲル電気泳動、続いて、ノーゼンブロットアッセイ (N o r t h e r n b l o t a s s a y s) によって以前に同定された B P P および C N P の前駆体をコードする配列よりなる放射性プローブでのハイブリダイゼーション (h y b r i d i z a t i o n) によってチェックした。Z A P フェージ (ストラタジーン (S t r a t a g e n e)) における c D N A ライブラリーの調製は、慣用的かつ通常の方法によって、製造業者の指示に従い、5 μ g のこの試料を用いて行った。組換えフェージの最初のパッケージング (p a c k a g i n g) により、1 % 未満の非 - 組換えクローンと共に約 2×10^5 p f u / m L の力価を生じた。このライブラリーを直ちに増幅し、最終力価は約 9×10^9 p f u / m L であった。

【 0 0 3 5 】

F - P C R 増幅 (ポリメラーゼ鎖反応) :

- 最初のアプローチの目標は、B P P および C N P の前駆体をコードする c D N A 配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用い、P C R によって、B . ジャララカ脳 c D N A ライブラリーから注目する c D N A を増幅することであった。反応は本明細書中に記載する材料および方法で行い、毒ヘビ脳 c D N A ライブラリーからの全フェージ溶解物から約 2 5 0 塩基対 1 断片をクローンできるに過ぎなかった (毒ヘビ脳ライブラリーからのいずれの他の断片の増幅もなかった) 。この c D N A インサートの完全な配列決定は、毒腺ライブラリーから同定された c D N A 配列に対して、ナトリウム利尿性ペプチドに先行するセグメントにおける数個のヌクレオチド (1 2 塩基) といくつかの点突然変異 (置換された 4 つの残基) の挿入を除き、非常に高度な同様性を示した。そして、これら置換された 4 つの残基の 3 つがサイレント (s i l e n t) であり (同一アミノ酸残基をコードする) 、4 つめは「保存的」 (c o n s e r v a t i v e) (同一化学的特徴を持つアミノ酸についての置換) であった。用いた反応条件、および / またはポリメラーゼおよびオリゴヌクレオチドを変化させる多数の増幅試みにもかかわらず、調べたライブラリーのいずれからも

10

20

30

40

50

他の断片をクローン化させることができなかった。

【0036】

- 13陽性クローンを同定するのを可能としたハイブリダイゼーション実験で用いる放射性プローブの合成のための鋳型としてのナトリウム利尿性ペプチドをコードするセグメントを用い、約 5×10^6 クローンを独立して分析した。cDNAインサートを含むプラスミドベクターをDNAのミニ-調製(mini-preparations)によって回収(recover)し、次いで、プラスミドベクター(pBluescript SK+)の多重クローニング部位(市販のプライマーT3およびT7)に隣接する配列にアニール(anneal)するオリゴヌクレオチドを用いて配列決定した。

【0037】

- B.ジャララカ(jararaca)の脳からのcDNAライブラリーのハイブリダイゼーションによるクローン選択は、BPPおよびCNPに対する前駆体をコードするcDNAの単離を可能とした(図1)。ボスロポス・ジャララカの毒液から単離されたBPPに対する類似性によって、7つのペプチドが同定され、その配列は表1にリストする。これらの配列に基づく、毒液ペプチドと同一の薬理学的特性、ならびにECAおよびNEPの阻害を対するペプチドを合成した。

【0038】

図1は、対応するcDNA配列から推定された、ボスロポス・ジャララカ脳からのEVASINS前駆体の一次配列を示す。ヌクレオチドについての略語は以下の通りである：A - アデノシン；C - シチジン；G - グアノシン；T - チミジン。CNP - タイプCのナトリウム利尿性ペプチド。ボスロポス・ジャララカ脳からのcDNAライブラリーから単離されたEVASINSおよびCNPの前駆体蛋白質をコードするcDNAのヌクレオチド配列、および推定アミノ酸配列。EVASINSのアミノ酸配列に下線を施し、CNPの配列は太文字で示す(なお、図1の配列は配列1、推定アミノ酸配列は配列2とした)。

【0039】

本発明のもう1つの態様は、2つの特別な方法を用いる、固相でのペプチドの合成方法である。

A - アミノ基用の一時的保護基としてのtert-ブチルオキシカルボニル基(Boc)およびアミノ酸反応性側鎖のほとんどの保護のためのベンジル誘導体(Bzl)の使用

- この合成方法における最初の工程は、樹脂に結合した第1のアミノ酸残基からBoc基を除去することである。

【0040】

Boc基の除去は、2%アニソールを含有するジクロロメタン(DCM)中の30%TFA中、30分間で起こる。次いで、樹脂を、順次、0.5%アニソールを含有するイソプロパノール、DCMおよびMeOHで洗浄する。次のアミノ酸カップリングのために、アミノ基をDCM中のTEA10%またはDIPEA5%での10分間の処理によって脱プロトン化する。次いで、ペプチジル-樹脂をDCM、MeOH、DCMおよびカップリングのために用いる溶媒で洗浄する。

【0041】

アミノ酸のカップリングは活性化相で出発し、通常、カップリング剤：ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)または2-(1H-ベンゾトリアゾリル)-1,1,3,3-テトラメチルリロンテトラフルオロボレート(TBTU、2-(1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluronetetrafluoroborate)で達成される。通常、Boc-アミノ酸(カルボキシル成分、CC)およびカップリング剤を、樹脂中のアミノ基(アミン成分、CA)の量と比較して、3倍モル過剰で用いる。

【0042】

- DICを用いる場合、試薬CA:CC:DICの割合は1:3:3である。TBTU

10

20

30

40

50

を用いる場合、試薬 CA : CC : TBTU : DIEA の割合は 1 : 3 : 3 : 4 である。これらの試薬の最終濃度は 0.05 および 0.1 M の間である。

【0043】

- Asn (アスパラギン) または Gln (グルタミン) をカップリングさせる場合、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) をカップリング剤とともに用いて、これらのアミノ酸からのニトリルの形成を妨げる。これらのカップリングでは、試薬 CA : CC : TBTU : HOBt : DIEA の最終割合は 1 : 3 : 3 : 3 : 5 である。通常 2 時間を要するカップリング反応はニドリン定性方法 (ninhydrin qualitative method) を用いてモニターし、ここに、ペプチジル - 樹脂の青色染色は不完全なカップリングを示す。この場合、一般には、再度カップリングを行い、以前のカップリング反応で用いた溶媒および / またはカップリング剤それ自体を変更する。カップリングフェーズが終了すれば、次の残基がカップリングされるまで、次のサイクルをアミノ基の脱保護で開始させる。所望の配列の延長の最後まで、プロセスをサイクル的に継続させる。

10

【0044】

合成方法の最後に、ペプチドを樹脂から切断し、HF 処理の間に放出されたカルボケーションによって誘導された付随的反応についてのサプレッサー (抑制剤: suppressors) として作用する p - クレゾールおよびジメチルスルフィド (DMS) (各々 5%、v/v) の存在下にて、0 での 60 ないし 90 分間の無水 HF での処理によって、単一工程でその側鎖を脱保護する。ペプチド配列が Trp 残基を含む場合、エタノール - 1, 2 - ジチオール (EDT) を添加して、切断と同時にこのアミノ酸の側鎖を保護するホルミル基を除去する。EDT を他のサプレッサーとして (各々 5%、v/v) 同一割合で用いる。切断の後、樹脂を酢酸エチルで洗浄し、水中の 5% (v/v) 酢酸で樹脂を洗浄することによってペプチドを溶出させ、凍結乾燥する。一般的にアモルファス状の白色粉末が得られる。

20

【0045】

B - 塩基 - 不安定保護基 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) および tert - ブチル誘導體 (tBu) の使用
- 前述の方法とは異なり、この場合、アミノ基保護基 Fmoc を用い、DMF 中での約 20 分間の 20% ピペリジン溶液での処理によってアミノ酸から除去する。この処理により、次のカップリング工程のためにアミノ基が脱プロトン化される。カップリング方法は Boc 化学 (the Boc chemistry's) と同一であり、最終切断は弱酸溶液を用いて行われる。なぜならば、双方の保護基が (一般に、tert - ブチルタイプの) 側鎖に結合し、樹脂に結合したペプチドは Boc 化学におけるよりも不安定だからである。通常、85 ないし 95% TFA (v/v) の付随的反応の異なるサプレッサーの混合物で樹脂を約 2 時間処理する。この処理の後、ペプチドを氷冷エチルエーテル中にて樹脂とともに沈殿させ、2,500 g のスピードにて 5 分間遠心処理する。上清を捨て、ペレットをエチルエーテルに再懸濁させ、攪拌し、遠心処理する。該手法を 5 回繰り返し、樹脂 / ペプチド混合物を真空下で乾燥する。最後に、ペプチドを水中 5% AcOH (v/v) で樹脂から取り出し、濾過する。濾過した溶液を、アモルファス状白色粉末が得られるまで凍結乾燥する。

30

40

【0046】

双方の方法 A および B は以下の文献に基づく:

- 1 - バラニー, G. (Barany, G.) およびメリフィールド, R. B. (Merrifield, R. B.)、(グロス, E. (Gross, E.) およびメインホーファー, J. (Meinhof, J.) 編) (1980), 「ペプチド類」 (The Peptides): Analysis, Synthesis & Biology, II 巻, 1, Academic Press, New York,
- 2 - スチュワート, J. M. (Stewart, J. M.) およびヤング, J. D. (Young, J. D.) (1984), 「固相でのペプチド類の合成」 (Solid Phase Peptide Synthesis), Pierce Chemical C

50

ompany, Rockford,

3 - フィールズ, G. B. (Fields, G. B. (1997), *Methods in Enzymology*, Academic Press, California; 3 - アセルトン, E. (Atherton, E.) およびシェパード R. C. (Sheppard, R. C.) (1989), 「固相でのペプチドの合成」(Solid Phase Peptide Synthesis): A Practical Approach, I. L. R. Press, Oxford,

4 - フィールズ, G. B. (Fields, G. B.) およびノーブル, R. L. (Noble, R. L.) (1990) *Int. J. Pep. Prot. Res.* 35, 161.

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0047】

本発明に記載した方法に従い、ブラジキニンによって引き起こされた平滑筋に対するその収縮活性によってテストし、実施例5に示したごとく摘出されたモルモット回腸の調製を用いて測定して、ブラジキニン増強活性を呈する単離されたペプチドのプールが得られる。

【0048】

ブラジキニン増強活性を測定するために、摘出モルモット回腸に対するブラジキニンの効果のlog-用量応答曲線をプロットした。

【0049】

ブラジキニン増強活性の血圧降下効果は、エチルエーテルで麻酔した正常血圧および高血圧(SHR)オスおよびメスのウイスター(Wistar)ラットでテストした。

20

【0050】

本発明においては、特に注目するペプチドは天然抗-高血圧ペプチドである。これらは、結局は、それ自体、または他の物質と組み合わせて用いるであろう。これらの合成分子はスルホニル、カルボキシルおよびホスホリルのような酸性基、またはチオール、オレフィン、ジチオ、アゾもしくはジアゾ化合物、アルデヒドおよび同様の化合物のような他の基のような種々のリガンド(ligand)にコンジュゲート(conjugate)させることができる。

【0051】

特異的リガンド(ペプチドアプタマー(peptide aptamers))に結合したBPPを用いて、酵素および受容体のごとき標的蛋白質を同定することができる。例えば、特異的細胞は、これらの修飾されたBPPによって認識または影響され得る標的蛋白質を表すことができる。かくして、BPPにコンジュゲートした特異的リガンドの使用は、これらの分子を、選択的に、特異的標的蛋白質を保有する細胞へと駆動(drive)させることができる。これらのリガンドは、例えば、メチレンブルー、クリスタルバイオレット、アスピリン、サッカリン等であり得る。

30

【0052】

これらに加えて、ステロイド、低密度リポ蛋白質、成長因子、ウイルス蛋白質等のごときいくつかの他の化合物をリガンドとして用いることができる。そのようなリガンドを含有する化合物は、それがどこに位置しようとも、それらを抗原として認識する免疫グロブリンまたはその断片によって選択的に同定され得る。注目する免疫グロブリンはIgA、IgD、IgM、IgEおよびIgGのサブタイプのいくつかである。免疫グロブリンは、いずれかの源(source)から、特にマウスおよびヒトから誘導することができる。免疫グロブリンは形質転換リンパ球(transformed lymphocytes)のようなハイブリドーマーから誘導することができるか、または組換えDNA法によって誘導することができる。

40

【0053】

特に、マウス免疫グロブリンの可変部分をヒト免疫グロブリンに連結させて、低い免疫原性を持つキメラ免疫グロブリンを形成することができる。Fab断片、F(ab')₂、

50

F V 部位等の使用のみが必要であろう。

【0054】

リガンドを問題のトキシンにカップリングさせて、それを、細胞に進入させ、内部の標的蛋白質 (target protein(s)) を同定するのを助けることができる。ジスルフィド結合を用いて、それが細胞内部で減少するにつれリガンドからトキシンを放出させることができる。

【0055】

問題の化合物はイン・ビボ (in vivo) およびイン・ビトロ (in vitro) で用いることができる。イン・ビボの使用では、化合物 (compound) は経粘膜、非経口、または注入により、特に静脈内投与することができる。用量は、恐らく、約 1 μg ないし 10 mg 程度で変化させ、通常 0.5 mg / kg 体重である。

【0056】

投与の手段、天然由来のトキシンまたはその修飾形態と同一のアミノ酸配列を呈する使用合成トキシンに応じ、化合物は、結局は、非常に低い用量で用いることができる。化合物は、結局は、リン酸 - 生理食塩水緩衝液 (phosphate-saline buffer)、生理食塩水溶液または他のより利用しやすい溶液のような生理学的に許容される媒体中に希釈することができる。

【0057】

これらの化合物は、結局は、慢性または急性心血管障害の場合に用いることができ、ここに、微小循環が治療の標的であろう。特に、これらの化合物は、結局は、ヒト高血圧障害および血管病巣、過形成等を引き起こすもののようなその結果で用いることができる。可能な推奨される使用は、急性肺浮腫の場合であろう。それらは、結局は、修飾されてもまたは未修飾のままでもよく、これらのトキシンの同定、または標的蛋白質 (酵素、受容体等) とこれらのトキシンとの相互作用が有用であり得る病理生理学診断のために未修飾形態で用いることができる。

【0058】

本発明における B P P および E V A S I N S は心血管病理学で用いられる。

【0059】

本発明で提示される革新は、一般に、20 未満の既知の B P P に、天然 B P P および E V A S I N S と同一のアミノ酸配列を持つ数ダースの他の合成ペプチド、またはここに規定する構造的モチーフを呈するその化学的修飾されたホモログ (homologues) を添加すること、ならびにアンギオテンシン変換酵素 (ACE) のカルボキシル部位に対する、および N E P および E C E に対するそれらの阻害活性を介してそれらの生物学的作用を特徴付けることよりなる。

【0060】

これらの特徴を持つペプチドは、総括的に、B P P (ブラジキニン増強ペプチド) および E V A S I N S (内因性バソペプチダーゼ阻害剤) として命名されるであろう。本発明からの B P P および E V A S I N S は、毒腺によって分泌されるペプチド、およびボスロポス・ジャララカの内因性組織で生産されたペプチドに対応する。

【0061】

B P P の配列は質量分析によって測定し; E V A S I N S の配列は、毒ヘビ、特にボスロポス・ジャララカで発現された分子の前駆体をコードする c D N A のヌクレオチド配列の推定によって決定した。

【実施例 1】

【0062】

- ブラジキニン増強活性を示すプール成分の部分的単離

- 高速液体クロマトグラフィー - H P L C

ブラジキニン増強活性を呈するペプチドプールの成分を、0.2 ないし 0.5 mL / 分の流速にて、水中の 0.5 % T F A (トリフルオロ酢酸)、および 5 % ないし 60 % のアセトニトリル (A C N) のグラジエントにおいて、逆相カラム: C - 18 / ベックマン (B

e c k m a n) (4 . 6 × 2 5 0 m m / 5 μ 樹脂) を備えた、高速液体クロマトグラフィー - H P L C メルク - ヒタチ (M e r c k - H i t a c h i) モデル L - 6 2 0 0 A 、 2 1 4 n m に設定した U V - v i s ディテクターによって部分的に単離した。用いたグラジエントは試料に従って変化させた。ペプチドは、214 nm における吸光度ピークの形状に従って溶出物を手動で分画することによって得た。

【 0 0 6 3 】

ブラジル毒ヘビボスロポス・ジャララカの毒液からの抗 - 高血圧ペプチドの精製

ブタタン研究所 (I n s t i t u t o B u t a n t a n) の毒液部門 (V e n o m S e c t i o n) によって供給されたボスロポス・ジャララカの毒液プールから得られた全毒液 (1 2 0 0 m g) を 1 0 m L の脱イオン水に溶解させ、800 g にて30分間遠心処理した。上清を収集し、セファデックス (S e p h a d e x) G - 2 5 (2 5 - 8 0 μ , シグマ (S i g m a)) ゲル濾過カラム (1 . 2 × 1 0 1 c m) に負荷 (l o a d) した。カラムを、室温にて、30 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (p H 5 . 5) で平衡化した。試料をカラムの頂部に負荷し、1.2 mL / 分の流速にて成分を溶出させた。214 nm における各分取分の吸光度プロフィールはプールの構成を規定した。

【 0 0 6 4 】

高速液体クロマトグラフィー - H P L C

用いた H P L C 装置は、0.5 mL / 分の流速での、0.5 % T F A (トリフルオロ酢酸) 、 および 5 % および 6 0 % のアセトニトリル (A C N) のグラジエントにおける、ブラジキニン増強活性を持つプールの部分的単離のための、逆相カラム : C - 1 8 / ベックマン (B e c k m a n (4 . 6 × 2 5 0 m m / 5 μ 樹脂) を備えた、メルク - ヒタチ (M e r c k H i t a c h i) モデル L - 6 2 0 0 A U V v i s 検出器であった。

【 実施例 2 】

【 0 0 6 5 】

質量分析によるブラジキニン増強ペプチドの分子量および一次構造の決定

質量分析実験は、電子スプレイイオン源 (M i c r o m a s s) を備えた正イオン化モードのマイクロマス - クアットロ (M i c r o m a s s Q u a t t r o) I I 質量分析計 (E S M S - M S / M i c r o m a s s) で行った。データ獲得のためにマス・リンクス (M a s s L y n x) ソフトウェアを用いた。

【 0 0 6 6 】

質量分析計のパラメーターは標準として合成ブラジキニンを用いて最適化した。

【 0 0 6 7 】

試料を 5 0 % A C N / 水 および 0 . 1 % ギ酸に溶解させ、注入ポンプによって、0.5 μ L / 分の一定流速にて注入した。データは、全分析手法の間、5 秒の走査時間を用い、400 および 1600 の間の質量 / 電荷比 (m / z) を走査することによって、第 1 の四重極 (E S M S) で獲得した。

【 0 0 6 8 】

第 1 の四重極で特徴付けしたプロトン化イオンにてペプチドを配列決定し、 3×10^{-3} のアルゴンガス圧力で誘導解離の衝突 (C I D : i n d u c e d d i s s o c i a t i o n) によって断片化し、最後に、第 2 の四重極 (E S M S - M S) で走査することによってデータを獲得した。

【 0 0 6 9 】

質量分析計にカップリングさせた H P L C システム (L C - E S M S - M S)

用いた H P L C システムは、全毒液からの成分を単離するための、自動インジェクター、214 nm に設定された U V - v i s 検出器と、逆相カラム : C - 1 8 / ベックマン (B e c k m a n) (4 . 6 × 2 5 0 m m / 5 μ 樹脂) とを備えたヒューレット - パッカー (H e w l e t t - P a c k a r d) モデル 1 1 0 0 であった。

- 溶媒 A : 0 . 1 % T F A / 水

- 溶媒 B : 0 . 6 m L / 分の流速での 1 0 % 溶媒 A / A C N

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

用いたグラジエントは：

t = 0 ないし 5 分：0 % B
 t = 5 ないし 6 5 分：0 % ないし 6 0 % B
 t = 6 5 ないし 7 0 分：6 0 % ないし 1 0 0 % B
 t = 7 0 ないし 7 5 分：1 0 0 % B
 t = 7 5 ないし 8 0 分：1 0 0 % ないし 0 % B

であった。

【0071】

HPLC 液速は 600 μ l / 分であり、そのうち 20 μ l は質量分析計に自動注入し、他方、残りの 580 μ l は UV - vis デテクターに送った。

10

【0072】

質量分析は、マイクロマス・クアットロ (Micromass Quattro) 質量分析計 (Micromass) で行った。配列決定および特徴付けのデータは、特にこの目的のために開発されたソフトウェアを用いて獲得した。

【実施例 3】

【0073】

固相におけるペプチドの合成

ペプチド合成では 2 つの方法 (strategy) を用いた。

【0074】

より伝統的な方法である第 1 のものは、アミノ酸のほとんどの反応性側鎖の保護のために、アミノ基およびベンジル誘導体 (Bzl) 用の一時的保護基として tert - ブチルオキシカルボニル基 (Boc) を用いる。

20

【0075】

第 2 の、最も最近の方法は、塩基不安定な保護基 9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) および tert - ブチル誘導体 (tBu) との間を交互に行う (alternate)。

【0076】

a) Boc / Bzl 方法 - この方法における最初の工程は、樹脂に結合した第 1 のアミノ酸残基からの Boc 基の除去である。

【0077】

Boc 基の除去は、2 % アニソールを含有するジクロロメタン (DCM) 中の 30 % TFA 中にて 30 分間で起こる。樹脂を、0.5 % アニソール、DCM および MeOH を含有するイソプロパノールで洗浄する。次のアミノ酸のカップリングのために、アミノ基を DCM 中の 10 % TEA または 5 % DIPEA で 10 分間脱プロトン化 (中和) する。次いで、ペプチジル - 樹脂を DCM、MeOH、DCM およびカップリングフェーズ (phase) で用いるべき溶媒で洗浄する。

30

【0078】

アミノ酸のカップリングは活性化相で、通常、カップリング剤、ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) または 2 - (1H - ベンゾトリアゾイル) - 1, 1, 3, 3 - テトラメチルルロンテトラフルオロボレート (TBTU)、を伴い、開始する。通常、BOC - アミノ酸 (カルボキシル成分、CC) およびカップリング剤を、樹脂中のアミノ基 (アミン成分、CA) の量と比較して、3 倍モル過剰で用いる。

40

【0079】

DIC を用いる場合、試薬 CA : CC : DIC の割合は 1 : 3 : 3 である。TBTU を用いる場合、試薬 CA : CC : TBTU : DIEA の割合は 1 : 3 : 3 : 4 である。

【0080】

これらの試薬の最終濃度は 0.05 および 0.1 M の間である。Asn (アスパラギン) または Glu (グルタミン) をカップリングさせる場合、ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) をカップリング剤と共に用いて、これらのアミノ酸からのニトリルの形成を妨げる。

50

【0081】

これらのカップリングでは、試薬CA:CC:TBTU:HOBt:DIEAの最終割合が1:3:3:3:5である。通常2時間を要するカップリング反応はニドリン定性方法を用いてモニターされ、ペプチジル-樹脂の青色染色は不完全なカップリングを示す。この場合、一般に、以前のカップリングで用いた溶媒および/またはカップリング剤を変更し、再度カップリングを行う。

【0082】

カップリングフェーズが終了すれば、次の残基がカップリングされるまで、アミノ基を脱保護して次のサイクルを開始する。所望の配列の延長の最後まで、該プロセスをサイクル的に行う。

【0083】

- 合成手法の最後に、ペプチドを樹脂から切断し、HF処理の間に放出されるカルボケーションによって誘導される付随的応用のサプレッサーとして作用するp-クレゾールおよびジメチルスルフィド(DMS)(各々5%、v/v)の存在下にて、0 における60ないし90分間の無水HFでの処理によって、単一工程でその側鎖を脱保護する。

【0084】

ペプチド配列がTrp残基を含む場合、エタノール-1,2-ジチオール(EDT)を添加して、切断と同時にこのアミノ酸の側鎖を保護するホルミル基を除去する。EDTは他のサプレッサーと同一の割合で用いる(各々5%v/v)。切断の後、樹脂を酢酸エチルで洗浄し、樹脂を水中の5%(v/v)酢酸で洗浄することによってペプチドを溶出させ、凍結乾燥する。一般にアモルファス状の白色粉末が得られる。

【0085】

b) Fmoc/tBu方法

- 以前の方法とは異なり、アミノ基保護基のFmocを用い、これは、約20分間のDMF中の20%ピペリジン溶液での処理によってアミノ酸から除去される。この処理により、次のカップリング工程のために、アミノ基が脱プロトン化される。カップリング方法はBoc化学と同一であり、最終切断は弱酸溶液を用いて行われる。なぜならば、(一般に、tert-ブチルタイプの)側鎖に結合した保護基および樹脂に結合したペプチドの双方はBoc化学よりも不安定だからである。通常、樹脂を85ないし95%TFA(v/v)および付随反応の異なるサプレッサーの混合物で約2時間処理する。この処理の後、ペプチドを氷冷エチルエーテル中にて樹脂で沈殿させ、2,500gにて5分間遠心処理する。上清を捨て、ペレットを再度エチルエーテルに懸濁させ、攪拌し、遠心処理する。該手法を5回繰り返し、樹脂およびペプチド混合物を真空下で乾燥する。最後に、ペプチドを水中の5%AcOH(v/v)で樹脂から放出させ、濾過する。濾過した溶液を、アモルファス状白色粉末が得られるまで凍結乾燥する。

【0086】

1 - アセルトン, E. (Atherton, E.) およびシェパード, R. C. (Sheppard, R. C.) (1989), *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, I. L. R. Press, Oxford

2 - フィールズ, G. B. (Fields, G. B.) およびノーブル, R. L. (Noble, R. L.) (1990) *Int. J. Pep. Prot. Res.* 35, 161

【実施例4】

【0087】

BPPの前駆体をコードするcDNAから推定されるペプチド配列

ノーザンブロットアッセイ(Northern blot assays)

グアニジンイソチオシアネート-フェノール-クロロホルムでの抽出方法を用い、ボスロプス・ジャララカのいくつかの組織からの全RNAを単離した。この毒ヘビの組織の各々からの10マイクログラムの全RNAを、変性アガロースゲル電気泳動(1.7%ホルム

10

20

30

40

50

アルデヒド)によって分離し、毛管現象によってナイロン膜に移した。真空 - オープン中、80℃にて1時間でRNAを膜にブロット (blot) し、続いて、70000 μJ/cm² においてクロスリンカー (Crosslinker) モデル RPN 2500 - アマーシャム (Amersham)) 中で5分間のUV処理を行った。

【0088】

50%ホルムアミド、2.5 mM K₂PO₄、5×デンハルトの溶液 (Denhardt's solution)、50 μg/mL ニシン精子DNAおよび10%デキストラン硫酸 (dextran sulfate) を含有する緩衝液中、膜を42℃にて一晚 (約16時間) プレ - ハイブリダイズ (pre-hybridized) させた。

【0089】

放射性プローブの合成用の鋳型 (templates) として用いる cDNA 断片は、適当な制限酵素 (各々、BPP および CNP をコードする配列では、SmaI または SmaI + BamHI) を用いる、BPP および CNP をコードする cDNA インサートを含むクローン (クローン NM87, ムラヤマら (Murayama et al), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1189 - 1193, 1997) の応用 (digestion) によって得られた。

【0090】

切り出したインサートを低融点アガロースゲル電気泳動によって分離し、フェノール/クロロホルム抽出、続いてのエタノール沈殿 (ethanol precipitation) によってDNAを回収した。

【0091】

ランダムヘキサヌクレオチドおよびポリメラーゼ (クレノウまたは T4 DNA ポリメラーゼ) の存在下での [3²P] - dCTP の取込に基づき、レディプライムキット (RediPrime kit) (アマーシャム (Amersham)) の製造業者の指示に従い、各反応につき、前記したごとく得られた約 25 ng の鋳型 DNA を用い、放射性プローブを調製した。逆モレキュラーシールカラム (「スピンカラム (スピン カラムズ: spin columns) S-200」, ファルマシア (Pharmacia)) にて、取り込まれなかった放射性ヌクレオチドをプローブから分離した。

【0092】

約 1.5 × 10⁶ cpm/mL の濃度にて放射性プローブをプレ - ハイブリダイゼーション溶液に添加した後、放射性プローブとのハイブリダイゼーション (hybridization) を42℃にて16時間行った。

【0093】

最後に、膜を厳しい条件 (high stringency conditions) で洗浄した。すなわち、2×SSC; 0.1% SDS 溶液で65℃にて各々15分間4回洗浄し、次いで、0.1×SSC; 0.1% SDS 溶液中にて65℃にて3回洗浄した。各膜で観察された放射性シグナルの強度に基づき、適当なカセット中、膜を適当な時間 X - 線フィルム (LS - コダック (Kodak)) に暴露した。より弱いシグナルの良好な検出のために、カセットはスクリーン、フィルムおよび膜の対を含み、-80℃に維持された。

【0094】

メッセンジャーRNAの精製およびB. ジャララカの脳からのcDNAライブラリーの調製

B. ジャララカの脳からの全RNAを、グアニジンイソチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出方法を用いて単離した。

【0095】

予め充填したオリゴ - dT セルロースカラム (ジブコ・ビー・エル) (Gibco BRL) に全RNA溶液を2回通すことによって、メッセンジャーRNAを精製した。精製されたメッセンジャーRNAの1つの分取分を変性アガロースゲル電気泳動 (1.7%ホルムアルデヒド含有) に付し、続いて、臭化エチジウムで染色した。RNAを毛管現象によ

10

20

30

40

50

ってナイロン膜に移して、BPPをコードする配列に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションを介して試料の完全性を確認した。ZAPファージにおけるcDNAライブラリーの調製は、ストラタジーン(Stratagene)(ラ・ジョラ(La Jolla), CA)からのcDNA調製キットを用いて行った。5 µgの脳メッセンジャーRNAから得られた二本鎖cDNAインサートのZAPファージへのクローニングの後、これらをイン・ピトロでパッケージし、力価を測定して、クローニング効率を確認した。このファージライブラリーを増幅し、各々、クロロホルムおよびDMSOの存在下にて、ファージを-20 °Cおよび-80 °Cで貯蔵した。

【0096】

全ファージ溶解物からのcDNAの増幅

脳cDNAライブラリーで得られた10 µlの全ファージ溶解物を用い、PCR(ポリメラーゼ鎖反応)増幅を、毒腺からのBPPおよびCNPの前駆体をコードするcDNAの配列に由来する特異的オリゴヌクレオチドを用いて行った。ファージ溶解物をまず100 °Cにて5分間インキュベート(incubate)し、次いで、4 °Cまで冷却し、最後に、該酵素を補給した、10ピコモルの各プライマー、2.5 UのTaqポリメラーゼ(アマーシャム(Amersham))、200 µM dNTPおよび1×PCR緩衝液よりなる増幅反応の他の成分に添加した。かく調製された反応を、次いで、4分間の94 °Cにおける変性サイクルに、次いで、94 °Cにおける1分、60 °Cにおける1分、72 °Cにおける1分の35のさらなるサイクルに付した。引き続き、臭化エチジウムでの染色の後、PCR産物がアガロースゲル電気泳動によって分析されるまで、反応を4 °Cに維持した。毒腺からのcDNA配列に基づき、予測されるサイズのPCR産物を、製造業者の指示に従い、(通常の方法による)、プラスミドベクターpCRscript SK+(ストラタジーン(Stratagene))にサブクローン化し、ベクターの多重クローニング部位の隣接領域にアニールするオリゴヌクレオチド(プライマーT3およびT7)を用いて配列決定した。

【0097】

BPPの前駆体をコードするクローンの選択および同定
Sma IまたはSma IおよびBam HIでのクローンNM87の消化(digestion)(各々、約450 bpおよび432 bp、位置164ないし610および610ないし1044)によって得られた断片を、ランダムプライマー方法(レディプライムキット(Rediprime kit)/アマーシャム)を用いる放射性プローブ(³²P)の合成用の鋳型として用いた。

【0098】

各々約50000のファージプラーク(phage plaques)を含むプレート(plates)から調製されたニトロセルロース膜(シュライヘル(Schleicher)およびシュエル(Schuell))を、42 °Cにおける16時間の、6×SSPE(1×SSPE:0.15M NaCl, 15mM NaH₂PO₄, pH7, 1mM EDTA)、50%ホルムアミド、0.1%SDSおよび5×デンハルト(Denhardt)中での放射性プローブとのハイブリダイゼーションに付した。次いで、膜を各々65 °Cにて15分間、2×SSC/0.1%SDS中で2回洗浄し、次いで、0.1×SSC/0.1%SDS中で3回洗浄した(1×SSC:0.15M NaCl, 15mMクエン酸ナトリウム, pH7)。陽性ファージプラークをオートラジオグラフィによって同定し、DNAインサートの分析のために単離した。製造業者の指示に従い、ベクターZAPからのファゲミドpBluescriptのイン・ピボ切出を「ヘルパーファージ(helper phage)を用いて行い、インサートの末端を配列決定した。

【0099】

DNAインサートの配列決定

製造業者の指示に従い、キット・ビッグダイ(Kit Big Dye)(パーキン・エルマー)を用いるジデオキシ-ヌクレオチドでの鎖停止方法、続いて、ABI310自動

10

20

30

40

50

シーケンサーでの、その製造者の説明に従って行った分析に従い、配列決定反応を行った。

【0100】

単一の B . ジャジャラカ種の脳からの全 RNA をグアニジンイソチオシアネート - フェノール - クロロホルム抽出方法によって単離し、予め充填したオリゴ - d T セルロースカラムに全 RNA 溶液を一回通すことによってメッセンジャー RNA を精製した。試料の精製された mRNA の完全性をアガロースゲル電気泳動、続いての (ノーザンプロットアッセイによって同定された) B P P および C N P の前駆体をコードする c D N A から合成された放射性試料とのハイブリダイゼーションによってチェックした。

【0101】

Z A P ファージ (ストラタジーン (S t r a t a g e n e)) における c D N A ライブラリーの調製は、製造業者の支持に従い、5 μ g のこの試料を用いる慣用的かつ通常の方法によって行った。

【0102】

得られた組換えファージの最初のパッケージングにより、約 2×10^5 p f u / m L の力価が生じ、非 - 組換えクローンは 1 % 未満であった。このライブラリーを直ちに増幅し、最終力価は約 9×10^9 p f u / m L であった。

【0103】

P C R (ポリメラーゼ鎖反応) 増幅

用いた最初のアプローチの目標は、B P P および C N P の前駆体をコードする c D N A 配列に特異的なオリゴヌクレオチドを用いて、P C R により B . ジャララカ脳 c D N A ライブラリーから注目する c D N A を増幅させることであった。反応は本明細書中に記載した材料および方法で行った。約 250 塩基対の 1 つの断片のみが、脳 c D N A ライブラリーを含む全ファージ溶解物からクローン化された (毒ヘビ脳または膵臓ライブラリーからのいずれの他の断片の増幅もなかった) 。この c D N A インサートの完全な配列決定は、ナトリウム利尿性ペプチド、およびその内 3 つがサイレントであり (同一のアミノ酸残基をコードする) 、4 番目が「保存されている」 (同一の化学的特徴を持つアミノ酸についての置換) いくつかの点突然変異 (4 残基置換) に先行するセグメントにおける数個のヌクレオチド (12 塩基) の挿入を除き、毒腺ライブラリーで同定された c D N A 配列との非常に高度な同様性を示した。用いた反応条件および / またはポリメラーゼおよびオリゴヌクレオチドを変化させる多数の増幅の試みにも拘わらず、調べたライブラリーのいずれからも他の断片をクローン化することができなかった。

【0104】

13 の陽性クローンを同定するのを可能としたハイブリダイゼーション実験で用いた放射性プローブの合成のための鋳型としてナトリウム利尿性ペプチドをコードするセグメントを用い、約 5×10^6 クローンを独立して分析した。c D N A インサートを含むプラスミドベクターを DNA のミニ - 調製によって回収し、プラスミドベクター (p B l u e s c r i p t S K +) 多重クローニング部位の隣接領域にアニールするオリゴヌクレオチド (市販のプライマー T 3 および T 7) を用いて配列決定した。

【0105】

B . ジャララカの脳からの c D N A ライブラリーのハイブリダイゼーションによるクローンのスクリーニングは、これらのペプチドについての前駆体蛋白質の一部としての B P P をコードする c D N A の単離を可能とした (図 1) 。ボスロプス・ジャララカの毒液から単離された B P P との類似性によって、7 つのペプチド (表 1 中のものの中にリストされた配列) を同定した。これらの配列に基づき、毒液ペプチドと同一の薬理学的特性、ならびに E C A および N E P の阻害を呈するペプチドを合成した。

【実施例 5】

【0106】

B P P および E V A S I N S のブラジキニン増強活性のテスト

モルモット回腸に対する生物学的アッセイ (a s s a y)

10

20

30

40

50

単離されたペプチドのプールの増強活性を、平滑筋に対するブラジキニンの収縮活性につきテストし、摘出されたモルモット回腸の調製を用いて測定した。体重が160および180gの間であるメスのモルモットを用いた。アッセイを開始する前、回腸をタイロード (TYRODE) 溶液中に37℃にて30分間保持した。1.5ないし2.0cmと測定される提出回腸セグメントの端部の1つを、毛管現象を介する一定の酸素バブリング下37℃のタイロード (TYRODE) 生理学的溶液を含有する5mLの容量を持つガラス容器の底部に位置するセミ-リング (semi-ring) に結んだ。回腸セグメントの他の末端は、以前にキャリブレートされた登録アーム (calibrated registering arm) に結んだ。アームに対する張力は1gであり、回腸の収縮はREC101レコーダー (ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech)) によって記録した。 10

【0107】

試料は使用時に脱イオン水中で調製し、生物学的調整で用いる容量は0.2mLを超えなかった。

【0108】

試料のブラジキニン増強効果を決定するために、回腸に対するブラジキニンの効果のlog-用量曲線をプロットした。摘出モルモット回腸の収縮を測定することによってブラジキニン活性を決定し、増強活性は、標準用量のブラジキニンに対する組織応答の増加の関数として表した。

【0109】

単一用量のブラジキニンの添加の前に、プールおよび画分を個々にアッセイし、30秒間添加した。log用量-効果曲線の直線部分に測定された応答を内挿し、標準用量のブラジキニンに対する組織応答の上昇の関数として増強活性が与えられた。タイロード溶液：20mLのストック溶液I、40mLの溶液II、1mLのジフェニドラミン溶液 (1mg/mL)、1mLのアトロピン溶液 (1mg/mL)、5.60mM D-グルコースおよび1Lまでの水。 20

【0110】

この実験で用いた全ての試薬は分析グレードであった。

【実施例6】

【0111】

全身血液循環および微小循環に対する効果

ブラジキニンの血圧降下増強活性効果を、エチルエーテルで麻酔した正常血圧および高血圧オスおよびメスのウィスター (Wistar) ラットでテストした；カニューレを薬物投与のために大腿静脈に導入し、血圧記録のために大腿動脈に導入した。グルド (Gould) ポリグラフを、スタサム・グルド (Stattham Gould) 生理学的トランスジューサーにカップリングさせて用いた。圧力ベースラインによって境界が定まる領域を積分し、それらを対照実験で得られた値と比較することによって、動脈圧変動値を得た。トキシシン効果のテストは、腸間膜循環を用いる生存中顕微鏡観察によって正常血圧および高血圧ラットで行った。動物を麻酔し、その体温を加熱したプレートによって維持し、他方、腸間膜をそれを横断して照射し、テレビカメラに結合したレンズを介して観察した。これらの動物の脈管 (vase) 直径をマイクロメーターのネジで測定した。テストした物質は、一定流速のペリスタポンプによって投与するか、またはボーラス注射 (injected in bolus) した。 40

【実施例7】

【0112】

BPPによるACE阻害の測定のための酵素アッセイ

ただ1つの機能的活性部位を含む野生型ヒト・アンジオテンシン変換酵素 (ACE) および2つの突然変異体を、チャイニーズハムスター卵巣細胞のACEコードcDNAでの安定なトランスフェクションを介して得た。2つのACE突然変異体は、リシン残基による亜鉛結合ヒスチジン残基の置換によって不活化された、触媒部位、N-またはC-末端の 50

1つを呈する全長蛋白質として発現された。

【0113】

200 mM NaCl および 10 μ M ZnCl₂ を含有する 50 mM の pH6.8 の HEPES 緩衝液中にて、酵素アッセイを基質 Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH を用いて 25 で行った。フルオリメーター・フルオロライト (Fluorolite) 10000 (ダイナテック (Dynatech)) にて、390 nm 発光波長における蛍光の上昇、および ACE による基質の切断 (S = Km, 40 μ M) によって引き起こされた 340 nm における励起を測定することによって、反応を継続的にモニターした。基質の添加 90 分前に、ブラジキニン増強ペプチド (BPP) (阻害剤) を酵素と共にプレ-インキュベートした。

10

【実施例 8】

【0114】

イン・ビボにおける BPP の効果 動脈血圧および微小循環の特徴付け
加熱されたプレートによって 36.5 および 37 の間に体温を維持しつつ、体重が 180 および 220 g の間のウイスターオス・ラットをペントバルビタールナトリウム (ハイプノール (Hypnol) (登録商標) クリスタリア (Crystalia), 50 mg/kg 体重, 腹腔内) で麻酔した。気管切開の後、動物の通気を、標準的な条件下にて、以下のごとく、機械的ベンティレーター (ハーバード (Harvard) げっ歯類ベンティレーター, モデル 683, ハーバード・アパレータス (Harvard Apparatus), サウス・ナティック (South Natick, マサチューセッツ州 米国) によって制御した: 頻度: 57 ないし 65 吸息/分; 通過容量: 2 ないし 2.5 mL; 吸息された酸素分率: 0.25 ないし 0.40。各々、動脈血圧の連続的モニタリングのために (ティエスイー・システム・テクニカル・アンド・シーエイチエム・サイエンティフィック・イクイップメント・ゲーエムベーハー (TSE System Technical & CHM Scientific Equipment GmbH)、および液体の投与のために、カニユーレを右頸動脈および頸静脈に導入した (PE-50 カテーテル, 58 mm ID, ポルテックス (Portex), ハイセ (Hythe), UK)。腸間膜床 (mesenteric bed) を露出させた。腹部領域の三分割の後、皮膚を切り (rupture)、白質線の切開を介して腸間膜に到達した。温度が制御されたプレートの透明領域で腸間膜を露出させ、これを顕微鏡のステージ (charriot) 上に置いた。プレートの温度は 37 に維持した。露出した組織を湿潤に維持し、37 の 1%ゼラチンを含むリンガー-ロック (Ringer-Locke) 溶液 (pH 7.2 ないし 7.4) (154 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 2 mM CaCl₂ · 2H₂O; 6 mM NaHCO₃; 5 mM グルコース) での灌流によって加熱した。

20

30

【0115】

顕微鏡で得られた像をコンピューターおよび/または TV モニターに同時または同時でなく伝達する着色像投影カメラ (JVC-TKC 6000) に連結させた光学顕微鏡 (アキオスコープ-カール・ツァイス (Akioskop-Carl Zeiss, ドイツ国) を用い、その部位 (in site) での腸間膜微小循環の実験を行った。像解析ソフトウエア、MS ウィンドウズ コンパチブル (コントロール・カーエス (Kontron KS) 300, コントロン・ビルド・アナリゼ-ゲーエムベーハー (Kontron Build Analyse-GMBH), ドイツ国) をコンピューターにインストールし、固定された時間間隔におけるストアされた像の定量的測定を可能とした。実験の全コースを記録できるビデオテープレコーダーを TV モニターに連結する。

40

【0116】

かくして、実験の間に可視化された像を、コンピューターモニター上の固定像を介して定量的に評価することができ、同時に、TV モニター上で観察された実験のコースは、後の解析のためにビデオテープレコーダーによってストアすることができる。

【0117】

50

光学顕微鏡は、レンズおよび投影カメラの間に位置する増幅レンズ（オプトバル（Optovar））のシステムを有する。モニターに伝達された像はレンズ、増幅レンズおよび投影レンズによって決定される倍率に由来する。本明細書中に記載する実験において、コンピューターモニターにおける倍率は860倍であり、TVモニターでは1530倍であった。

【0118】

微小循環血管（直径15および30 μm の間）における赤血球細胞速度の決定は、ボーダース・アンド・グランジャー（Borders & Granger）（1984）によって記載され、デービス（Davis）（1987）によって考えられた測光方法によって行った。光学顕微鏡のアイピースおよび生存中顕微鏡観察器具の像投影カメラの間にインストールされた光学ドップラー速度計（マイクロサーキュレーション・リサーチ・インスティテュート（Microcirculation Research Institute）、（テキサス・エイ・アンド・エム・カレッジ・オブ・メディスン（Texas A & M College of Medicine））を介して、血流をその場でコンピューターモニターで測定した。該器具は2つのセンサー（平面フォトダイオードおよび低キャパシタンス）よりなり、これは、コンピューターモニターでの観察下で血管の像の中心に置く。それらの間の確立された既知の距離におけるセンサーは、赤血球細胞の通過によって生じた光強度の変化を検出することができ、変化を電圧シグナルに変換し、これは、それらの細胞の速度に比例する。

10

【0119】

該センサーは、血管の直径、および血流の中心における赤血球細胞の速度を測定する。

20

【0120】

実験プロトコル

外科的手法

- 微小循環網目および血圧の安定化のための10分間

BPPまたは等容量の滅菌生理食塩水（10分間で5 mL）の投与。BPPまたは生理食塩水の投与直後に、ブラジキニンのボーラス注射（3 μg / 300 μl ）。

【図面の簡単な説明】

【0121】

【図1】対応するcDNA配列から推定された、ボスロポス・ジャララカ（Bothrops jararaca）脳からのEVASINS前駆体の一次配列を示す図である。

30

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
26 September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/074782 A2

- (51) International Patent Classification: C07K
(BR) POLISELLI FARSKY, Sandra, Helena [BR/BR]; Centro de Toxicologia Aplicada "Cau/Cepi", 1500 Vital Brasil Av., Butantã, São Paulo 05503-900 (BR). PALMA, Mario, Sergio [BR/BR]; Centro de Toxicologia Aplicada "Cau/Cepi", 1500 Vital Brasil Av., Butantã, São Paulo 05503-900 (BR).
- (21) International Application Number: PCT/BR02/00041
- (22) International Filing Date: 18 March 2002 (18.03.2002)
- (25) Filing Language: English
(74) Agent: LLC INFO CONNECTION LTDA.; 60 Hermenegarda St., RM 403, Méier, 20710-010 Rio de Janeiro (BR).
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: P10101088-3 19 March 2001 (19.03.2001) BR
(81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (71) Applicants (for all designated States except US): BIOLAB SANUS FARMACÊUTICA LTDA. [BR/BR]; 5386 Dos Bandeirantes Av., Planalto Paulista, São Paulo 04071-900 (BR). FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP [BR/BR]; 1500 Pio XI St., Alto Da Lapa, São Paulo 05468-901 (BR).
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MARTINS DE CAMARGO, Antônio, Carlos [BR/BR]; 55 Mário Ferraz St. Km. 11, Jardim Europa, São Paulo 01453-010 (BR). CALHETA VIEIRA PORTARO, Fernanda [BR/BR]; Centro de Toxicologia Aplicada "Cau/Cepi", 1500 Vital Brasil Av., Butantã, São Paulo 05503-900 (BR). FERRAGINI MURBACK, Alessandra [BR/BR]; Centro de Toxicologia Aplicada "Cau/Cepi", 1500 Vital Brasil Av., Butantã, São Paulo 05503-900 (BR). ALVES IANZER, Danielle [BR/BR]; Centro de Toxicologia Aplicada "Cau/Cepi", 1500 Vital Brasil Av., Butantã, São Paulo 05503-900
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/074782 A2

(54) Title: ISOLATION AND PURIFICATION PROCEDURE OF VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS

(57) Abstract: The present invention patent refers to the isolation and purification of peptides secreted by serpent venom glands, specifically *Rhithrops jararaca*, to the peptide thus obtained, as well as to the production procedures by genetic engineering techniques in prokaryotic and eukaryotic systems; to the engineered peptide thus obtained; to the production of said peptide by chemical synthesis, as well as to the peptide resulting from this chemical processing. It also refers to the utilization of said peptides, obtained by different procedures, in distinct pharmaceutical compositions, and introduced into the organism by a variety of means, in order for them to act as inhibitors of vaso-peptidases, and consequently reduce systemic arterial blood pressure, and show local vasodilating action.

WO 02/074782

PCT/BR02/00041

1

"ISOLATION AND PURIFICATION PROCEDURE OF VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS, SPECIFIC FOR THE CARBOXYLIC SITE OF THE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME, SECRETED BY SERPENT VENOM GLANDS (BPPs), PARTICULARLY *Bothrops jararaca*, OR PRODUCED ENDOGENOUSLY (EVASINS), PRESENTING VASODILATOR AND ANTI-HYPERTENSIVE ACTION; PROCEDURE FOR THE AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATION OF PEPTIDE INHIBITORS SECRETED BY SERPENT VENOM GLANDS (BPPs), OR ENDOGENOUSLY PRODUCED (EVASINS); AMINO ACID SEQUENCING PROCEDURE OF THE BPPs BY DEDUCTION OF THE cDNA OF THE PRECURSORS OF THESE MOLECULES EXPRESSED IN SERPENT TISSUES, PARTICULARLY *Bothrops jararaca*; AMINO ACID SEQUENCE DETERMINATION PROCEDURE OF THE EVASINS BY DEDUCTION OF THE cDNA OF THE PRECURSORS OF THESE MOLECULES EXPRESSED IN SERPENT TISSUES, PARTICULARLY *Bothrops jararaca*; cDNA AMPLIFICATION PROCEDURE FROM SERPENT BRAIN AND/OR PANCREAS cDNA LIBRARIES, PARTICULARLY FROM *Bothrops jararaca*; SOLID PHASE SYNTHESIS PROCEDURE OF VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS WITH VASODILATOR AND ANTI-HYPERTENSIVE ACTION, OF VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS WITH ANTI-HYPERTENSIVE ACTION; USE OF VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS WITH VASODILATOR AND ANTI-HYPERTENSIVE ACTION TO OBTAIN PHARMACEUTICAL COMPOUNDS; DETERMINATION PROCEDURE OF THE INHIBITORY ACTIVITY ON VASOPEPTIDASES AND OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY ON SMOOTH MUSCLE, AND ON THE MICROCIRCULATORY AND CARDIOVASCULAR SYSTEMS."

The invention refers to the isolation and purification procedures of vasopectidase peptide inhibitors, specific for the carboxylic site of the angiotensin converting enzyme, secreted by serpent venom glands (BPPs), or endogenously produced (EVASINS), presenting anti-hypertensive and vasodilator actions. It also refers to the isolation and determination procedures of the amino acid sequence of the peptide inhibitors secreted by serpent venom glands (BPPs), or endogenously produced (EVASINS). It

also refers to the amino acid sequence determination procedure of BPPs by deduction of the cDNA of the precursors of these molecules, expressed in serpent tissues, particularly *Bothrops jararaca*; to the
5 amplification procedure of the cDNA from brain or pancreas cDNA libraries, particularly from *Bothrops jararaca*; to the solid phase synthesis procedure of vasopeptidase peptide inhibitors; to the use of vasopeptidase peptide inhibitors with vasodilator and anti-hypertensive action. It further
10 refers to the determination procedure of the inhibitory activity on vasopeptidases, and of the biological activities on smooth muscle, and on the microcirculatory and the cardiovascular systems.

Specifically, the invention refers to the isolation of
15 the peptides secreted by serpent venom glands (BPPs), or found endogenously, particularly in the brain of *Bothrops jararaca*. We suggest the generic name EVASINS (endogenous vasopeptidases inhibitors) for the endogenous peptides; to the peptides thus obtained, as well as to the procedure of
20 producing them by genetic engineering methods in prokaryote and eukaryote systems; to the engineered peptides thus obtained; to the production of said peptides by chemical synthesis as well as to the peptides resulting from the proteolytic processing. It also refers to the use of the
25 peptides obtained by the referred procedures in pharmaceutical compounds with inhibitory action on vasopeptidases, and consequently lowering blood pressure, and the use of the referred peptides to lower blood pressure.

30 Thus the invention refers to peptides with cardiovascular action, known as bradykinin potentiating peptides, secreted by serpent venom glands (BPPs), or produced in other tissues of *Bothrops jararaca* (EVASINS).

WO 02/074782

3

PCT/BR02/00041

The serpent venom is composed of a complex mixture of biologically active proteins and peptides. Among known, characterized biologically active peptides, we list bradykinin potentiating peptides (BPPs), natriuretic factors (C-type natriuretic peptides, CNP), saraphotoxins (SRTx), among others. These bioactive peptides (hormones, neuropeptides, toxins, etc.) are generated by the hydrolytic action of enzymes on the proteic precursors of these peptides, which contain one or more bioactive peptides per molecule. Toxins secreted by the venom glands of various serpents, such as *Bothrops jararaca*, contain a large number of peptides with hypotensive action (BPPs), whose mechanism of action is related to its inhibitory effect on the angiotensin-converting enzyme (ACE), blocking the conversion of angiotensin I into angiotensin II (hypertensive), and preserving bradykinin (hypotensive).

The primary structure of these peptides allows their classification into two families: those peptides smaller than 7 amino acid residues, and those larger than 7 amino acid residues, showing a high degree of homology among them.

Research in this specific field showed that a large variety of applications can be found for toxins, particularly the venom toxins of serpents, or the modifications of some of these molecules, such as the bradykinin potentiating peptides (BPPs), which can be specific agents of anti-hypertensive action in mammals, including man.

The amino acid sequence of other bradykinin potentiating peptides, having high degree of homology with the amino acid sequence of BPPs, were not obtained from the venom of snakes. In fact, these were deducted from the nucleotide sequences of their precursors found in other serpent tissues, such as the brain, pancreas and spleen

WO 02/074782

PCT/BR02/00041

4

tissue, using molecular biology techniques. These endogenous peptides, in their synthetic form, like the BPPs secreted from the venom gland of the *Bothrops jararaca*, acting on the angiotensin converting enzyme (ACE) of the vascular endothelium, preventing the formation of angiotensin II (hypertensive) and preserving the hypotensive action of bradykinin.

The angiotensin converting enzyme (ACE) is a peptidase with two catalytic sites (carboxy- or C-site, and amino- or N-site), which are mainly located to the cytoplasmic membrane of endothelial cells. The C-terminal active site is more specific for angiotensin I and bradykinin. The BPPs act by inhibiting the ACE and, up to this invention, the specificity of the inhibition of the C- or N-sites was unknown, and the result of this inhibition is the reduction of arterial blood pressure.

Inhibition of the ACE, not selective for a specific active sites, led to the development of the site-directed inhibitor called captopril.

The N site metabolizes the natural circulating peptide hormone (Ac - Ser - Asp - Lys - Pro), which regulates hematopoiesis. The carboxylic domain of the enzyme (C site) is more specific for conversion of angiotensin I into angiotensin II and inactivates bradykinin. Up to this moment, it was not known whether all the described BPPs presented any preference for the C site, turning them into more specific antihypertensive agents.

There still are a number of unknown toxins from the venoms of snakes, which may have the potential to act as anti-hypertensive agents. These molecules may not only inhibit specifically the C-site of the ACE, but even, and simultaneously, inhibit other peptidases of the vascular

endothelium, as the neutral endopeptidase (NEP) and the endothelin converting enzyme (ECE). The ECE inactivates bradykinin, natriuretic peptides, hypotensive agents, and generates endothelins (hypertensive). The ACE, NEP and ECE
5 are known as vasopeptidases, and are responsible for most of the arterial blood pressure control. These double and/or triple inhibitors are not only more specific, but also more efficient because they act on the metabolism of endogenous molecules regulating the arterial blood pressure. The
10 distinction between the two catalytic sites of the ACE has been well-defined in: Dive, V.; Cotton J.; Yiotakis, M. A.; Vassiliou, S.; Jiracek, J.; Vazeaux, G.; Chauvet, G.; Cuniasse, P.; Corvol; *RXP 407, a phosphinic peptide, is a potent inhibitor of angiotensin I converting enzyme able to*
15 *differentiate between its two active sites.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 13, 4330-4335, (1999).

It is known from the scientific literature that some peptides from the venom of Brazilian and Asian serpents, presenting hypotensive action, have already been
20 isolated and sequenced (Ondetti & Cushman, Ann.Rev.Biochem. 51, 293 - 308, 1982), and that the antihypertensive efficiency of one of them has been demonstrated in humans (Gravas et al. N. Engl. J. Med. 291, 817 - 821, 1974).

Several BPPs have been deduced from the amino acid
25 sequences of their precursors using molecular biology techniques (Murayama et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 1189 - 1193, 1997).

The pharmaceutical industry developed a new antihypertensive drug of non-peptidic nature and without
30 any chemical analogies with endogenous molecules. It was called OMOPATRILAT, displaying inhibition properties for both the ACE and the NEP, presenting long-term antihypertensive efficiency in rats with high concentration of circulating renin. Besides, this substance improves cardiac

WO 02/074782

6

PCT/BR02/00041

performance, prolonging the survival of spontaneously hypertensive rats, SUR, a model for human essential hypertension. The OMAPATRILAT is the first site-directed inhibitor for two vasopeptidases, the ACE and NEP, in advanced phase of clinical trials.

The major differences between the OMAPATRILAT and the BPPs and EVASINS are:

- 1- the BPPs and EVASINS are of polypeptidic nature;
- 2- they are synthetic molecules identical or homolog to peptides secreted by exocrine glands, or endogenously produced in vertebrates;
- 3- as ACE inhibitors, the BPPs and EVASINS of 8 to 13 amino acid residues show preference for the C-site, and also inhibit the NEP X;
- 4- they are degraded mainly by humoral and tissue proteolytic enzymes;

The US 55389991 patent, published July 23rd, 1996, and the US 5559135 patent, published September 24th, 1996, describe the inhibitor secreted by serpent venom glands - FCA-W-P-R-P-E-I-P-P- SQ 20881 - an ACE inhibitor, which consequently reduces the arterial blood pressure in animals, and which showed efficient reduction of arterial blood pressure in hypertensive individuals. However, these patents do not describe or reveal the specificity of action of this inhibitor on one or the two catalytic sites of the ACE. The patents do not show either the importance of other enzymes capable of regulating the arterial blood pressure, therefore no research was done on BPPs with higher specificity of action.

The present invention differs from the aforementioned patents by demonstrating specificity of action of the EVASINS on vasopeptidases; it also establishes a clear relationship between the chemical structures of several dozens of these molecules with their activity on the

WO 02/074782

7

PCT/BR02/00041

cardiovascular system. This invention also establishes one structural motif and the endogenous origin of the leader molecules proposed here, features not predicted in the references quoted above.

5 The same arguments mentioned above can be used do differentiate the present invention from the USPTO patents US 3819831, published June 25th, 1974, US 3714140, published January 30th, 1973, US 3832337, published August 27th, 1974, US 3849252, published November 19th, 1974, US 10 3947575, published March 30th, 1976, US 3973006, published August 3rd, 1976, US 4731439, published March 15th, 1988, US 4774318, published September 27th, 1988, and US 5550127, published August 27th, 1996.

Aiming at solving the existing technical problems, 15 in order to obtain a final product of superior quality in terms of efficiency as anti-hypertensive agents, the present invention proposes, for the first time and in a novel manner, BPPs and EVASINS, presenting: (1) a defined structural motif; (2) specificity for the C-site of the 20 ACE; and (3) high inhibitory specificity for the NEP X.

These novel specific anti-hypertensive agents for the C site of the ACE, presenting inhibitory action on vasopeptidase were isolated and sequenced from the venom of the Brazilian serpent *Bothrops jararaca*, or identified by 25 cloning and cDNA sequencing, obtained from the tissues of this serpent. These peptides, which can also be obtained by chemical synthesis, and which contain the same amino acid sequence as the natural peptides, show long-term anti-hypertensive action in rats. The use of these synthetic 30 peptides, which have the same sequence as the natural peptides, used as such, or chemically modified in order to maintain the characteristics described above, can be useful as therapeutic agents in the treatment of cardiovascular disorders or in local circulatory actions, particularly in

WO 02/074782

8

PCT/BR02/00041

hypertensive disorders in humans and other cardiovascular disorders.

Twenty-two (22) BPPs found in the venom and in tissues of *Bothrops jararaca*, were sequenced by mass spectrometry, or their sequences were deduced from cDNA sequences of the precursors of those molecules expressed in the tissues of the serpent. The corresponding synthetic peptides were tested as inhibitors of the C-site of the recombinant ACE and of NEP, and also both as potentiating agents of the bradykinin contractile activity on isolated guinea pig ileum, and as bradykinin hypotensive activity in rats. They were found both as BPPs (secreted) and as EVASINS (endogenous). They can be divided in two groups according to the specificity of action on the C site of the

15 ACE:

a) non-specific. One peptide, the pentapeptide <E K W A P (Pyroglutamyl(<E)-Lysine(K)- tryptophane(W)- Alanine(A)- Proline (P), which, although not presenting a defined selectivity for the C-site of the ACE, presents high potentiating activity of bradykinin, as observed on the preparation of isolated smooth muscle as well as by its hypotensive effect. It was found as BPP (secreted from the serpent venom glands) as well as EVASINS (endogenous, from the serpent brain tissue). It presents K_i values in the μM range, for both the N and C sites of the ACE. It also inhibits, with low affinity, the NEP with K_i values ranging from 50-150 μM . It potentiates the contractile action of bradykinin on isolated guinea pig ileum with concentrations that vary from 15-300 nM. The hypotensive effect of bradykinin was also potentiated by 60% in concentrations of 300 nM, showing a 5-fold (five) increase in the duration of the hypotensive effect, when compared to the duration of the effect of bradykinin alone.

b) specific. These peptides present molecular masses ranging from 1000 to 1700 Daltons, containing 8 to 13 amino acid residues. In this group, the most selective and effective potentiators of the contractile action of the bradykinin on isolated guinea pig ileum and on rat arterial blood pressure, were found as BPPs or EVASINS. They were chemically modified generating other peptides with similar pharmacological properties.

The table 1 below presents the synthetic oligonucleotides derived from the inhibitors described in group b) for this present invention:

Table 1

Formula Sequences

I	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ P ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ P ⁸
II	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ P ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ P ⁹
III	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ P ¹⁰
IV	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ aa ⁸ aa ⁹ P ¹⁰ P ¹¹
V	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ aa ⁹ aa ¹⁰ P ¹¹ P ¹²
VI	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ aa ¹⁰ aa ¹¹ P ¹² P ¹³

Where:

P is always proline. All others are always L-amino acids and are presented in the one-letter-code (see below). pp¹ is the N-terminal and can be also pyroglutamyl (<E) or any other simple amino acid, generally non-basic. aa³ is a non-basic amino acid, generally W, S, G or N; aa² is a non-acid amino acid, generally P, G, W or R; aa³ is a non-acid amino acid, generally P, A, R or W; aa⁴ is P for formula I and it is generally the amino acid T, P, G, H, R, W or E for all other oligopeptides;

WO 02/074782

10

PCT/BR02/00041

aa⁵ is generally Q, N, P, or G for formula I;
 aa⁶ for formula II, aa⁷ for formula III, aa⁸ for formula IV
 and aa⁹ for formula V are non-basic amino acids,
 generally Q, N, P, or G.

- 5 aa⁶ for formula I, aa⁷ for formula II, aa⁸ for formula III,
 aa⁹ for formula IV and aa¹⁰ for formula V are always I, A
 or T.

 Acid amino acids - D, E

- 10 Basic amino acids - K, R

Aromatic amino acids - F, W, Y

- | | | |
|----|-------------------|-----------------|
| | G-glycine | N-asparagine |
| | A-alanine | Q-glutamine |
| 15 | P-proline | D-aspartic acid |
| | V-valine | E-glutamic acid |
| | I-isoleucine | K-lysine |
| | L-leucine | R-arginine |
| | S-serine | F-phenylalanine |
| 20 | T-threonine | H-histidine |
| | W-tryptophan | Y-tyrosine |
| | <E- pyroglutamine | |

- Of particular interest in group (b) are the peptides
 of 8 to 13 amino acids presenting their general formula the
 25 carboxy-terminal motif of the oligopeptide:

STRUCTURAL FORMULA [P X¹ X² P P]

where X¹ can be any amino acid and X² is generally I, and
 the N-terminal amino acid is blocked, generally by <E.

- The peptides described in the above table show
 30 higher selectivity for the C-site of the ACE as
 characterized by the K_i values, ranging from 2 nM to 100
 μM, while for the N site of the ACE these values were above

WO 02/074782

11

PCT/BR02/00041

50 μM . These peptides are also inhibitors of NEP with K_i values ranging from 5 to 150 μM . All of them potentiate the contractile activity of bradykinin on the isolated guinea pig ileum, doubling the contractile effect of bradykinin, in concentrations varying from 5 to 300 nM. The hypotensive effect of bradykinin was also potentiated by 30-80% in concentrations varying from 10-700 nM, increasing the duration of this hypotensive effect from 5 to 15 fold, as compared to bradykinin alone.

10 The present invention proposes for the first time: an isolation and purification procedure for vasopeptidase peptide inhibitors with anti-hypertensive action, secreted by serpent venom glands, particularly *Bothrops jararaca*, comprising the following steps:

15 A - ISOLATION AND PURIFICATION OF BPPs FROM THE VENOM OF *Bothrops jararaca*:

- 800 to 1500 mg of total venom obtained from a venom pool of *Bothrops jararaca* were dissolved in 7.0 to 15 ml of deionized water and centrifuged at 1500 to 2000 rpm for 15 to 30 minutes; the supernatant was removed and applied to a 1.2 x 101 cm Sephadex G-25 M gel filtration column (25-80 μ , Sigma); the column was equilibrated with ammonium acetate buffer (30 to 50 mM, pH 5.0 to 6.0) at room temperature. The sample was added to the top of the column and the components were eluted at a flow rate of 1.0 to 2.0 mL/min. The absorbance profile for each aliquot at 214 nm defined the constitution of the pools, based on the bradykinin potentiating activity on guinea pig ileum.

30 B - PARTIAL ISOLATION OF THE POOL COMPONENTS SHOWING BRADYKININ POTENTIATING ACTIVITY:

- High performance liquid chromatography - HPLC

WO 02/074782

12

PCT/BR02/00041

The components of the pools obtained in step A, showing bradykinin potentiating activity, were partially isolated by high performance liquid chromatography - HPLC (Merck-Hitachi model L-6200A), with the UV-vis detector set at 214 nm, and the reverse-phase column C-18/Beckman (5 μ , 4.6 x 250 mm). Solvent A was 0.5 to 1 % TFA (trifluoroacetic acid) in H₂O, and solvent B was a 5% to 60 % gradient of acetonitrile (ACN), at a flow rate of 0.2 to 0.5 mL/min. The gradients used varied with the sample. The peptides were obtained by manual collection of the absorbance peaks at 214 nm.

C - DETERMINATION OF THE MOLECULAR MASS AND OF THE PRIMARY STRUCTURE OF THE BRADYKININ POTENTIATING PEPTIDES BY MASS SPECTROMETRY (ES-MS-MS).

Another aspect of the invention is related to the procedure for the amino acid sequence determination of the BPPs purified from serpent venom, more specifically *Bothrops jararaca*, by mass spectrometry performed in the Micromass Quattro II mass spectrometer (ESMS-MS / Micromass), in the positive ionization mode, with an electrospray ion source (Micromass), and the Mass Lynx software (Micromass) used for data acquisition. The samples were dissolved in 50% H₂O/ACN with 0.1% formic acid, and injected with a constant flow of 5 μ L/min, by means of an injection pump. The data were acquired in the first quadrupole (ESMS), by scanning the ratio mass/charge (m/z) between 400 and 1600 with a scanning time of 5 seconds during the whole analysis process. Sequencing was performed on selected peptide, displaying a protonated ion, as characterized in the first quadrupole, followed by fragmentation by induced dissociation collision (IDC) with a pressure of

argonium of 3×10^{-3} , and finally, the data were
acquired by scanning at the second quadrupole (ESMS-
MS). The software Mass Lynx (Micromass) was used for
data acquisition. The machine's parameters were
5 optimized using synthetic bradykinin as a standard.
Characterization and sequencing can also be performed
with the HPLC system coupled to the mass spectrometry
system (LC-ESMS-MS), using the Hewlett-Packard HPLC
model 1100 with an automatic injector, the UV-vis
10 detector set at 214 nm, and the reverse-phase column
C-18/The Separations Group (4.6 x 250 mm/5 μ), for the
isolation of total venom components. Solvents used
were: Solvent A: 0,1% TFA/H₂O - Solvent B: 10% A/ACN
solvent, with a flow rate of 0.6 mL/min. The gradient
15 used was:
t = 0 - 5 min: 0% B
t = 5 - 65 min: 0 - 60% B
t = 65 - 70 min: 60 - 100% B
t = 70 - 75 min: 100% B
20 t = 75 - 80 min: 100 - 0% B
Out of the 600 μ L/min flow used in the HPLC, 20
 μ L were automatically injected into the mass
spectrometer, and the remaining 580 μ L went to the UV-
vis detector.
25 Mass spectrometry was accomplished in a Micromass
Quattro II (ESMS - MS/Micromass) mass spectrometer in
the positive ionization mode with an ion electrospray
source (Micromass). The acquisition of the
characterization and sequencing data was performed by
30 means of a software created to this end, the Mass Lynx
software (Micromass).

- 5 - Another aspect of this invention is the determination of the amino acid sequence of the BPPs by deduction of the cDNA sequence of the precursors of these molecules expressed in serpent tissues, specifically *Bothrops jararaca*, through the following steps:
- 10 - Total RNA from the brain of a single *B. jararaca* specimen was isolated by the guanidine isothiocyanate - phenol - chloroform extraction method, and the messenger RNA was purified by passing the total RNA solution twice through a pre-packed oligo-dT cellulose column. The integrity of the purified mRNA was checked by agarose gel electrophoresis followed by hybridization with radioactive probes, composed of
- 15 sequences encoding the precursor of the BPPs and the CNP, previously identified by Northern blot assays. Preparation of the cDNA library in λ ZAP phages (Stratagene) was carried out using 5 μ g of this sample, following the manufacturer's instructions by common and usual methods. The initial packaging of the recombinant phages generated a titer of approximately
- 20 2×10^5 pfu/mL, with less than 1% of non-recombinant clones. This library was immediately amplified, with a final titer of approximately 9×10^9 pfu/mL.
- 25 F - PCR AMPLIFICATION (Polymerase Chain Reaction):
- 30 - The goal of the initial approach was to amplify the cDNA of interest from *B. jararaca* brain cDNA libraries by PCR, using oligonucleotides specific for the cDNA sequence encoding the precursor of the BPPs and the CNP. The reactions were carried out with materials and methods described here and it was possible to clone only one fragment of approximately 250 base pairs from the total phage lysate from the serpent brain cDNA

library (there was no amplification of any other fragment from the serpent brain library). Complete sequencing of this cDNA insert showed a very high degree of similarity with the cDNA sequence identified from the venom gland library, except for the insertion of a few nucleotides (12 bases) in the segment that precedes the natriuretic peptide and some point mutations (4 residues substituted), of which three are silent (encoding the same amino acid residue) and the fourth was "conservative" (a substitution for an amino acid with the same chemical characteristics). In spite of the numerous amplification attempts, changing reaction conditions, and/or the polymerase and oligonucleotide used, it was not possible to clone other fragments from any of the libraries studied.

- Approximately 5×10^6 clones were independently analyzed using the segment encoding the natriuretic peptide as a template for the synthesis of radioactive probes used for the hybridization experiments, which made it possible to identify only 13 positive clones. The plasmid vectors containing the cDNA inserts were recovered by mini-preparations of DNA and then sequenced using oligonucleotides, which anneal to sequences adjacent to the plasmid vector's (pBluescript SK+) multiple cloning site (commercial primers T3 and T7).

- Clone selection by hybridization of the cDNA library from the brain of *B. jararaca* allowed the isolation of a cDNA encoding the precursor for the BPPs and the CNP. (Figure 1). By analogy to the BPPs isolated from the venom of *Bothrops jararaca*, 7 peptides were identified, whose sequences are listed among those in table 1). Based on these sequences, peptides were synthesized that presented the same pharmacological

WO 02/074782

16

PCT/BR02/00041

properties as the venom peptides, as well as inhibition of ECA and NEP.

Figure 1 shows the primary sequence of the EVASINS precursor from *Bothrops jararaca* brain, deduced from the corresponding cDNA sequence. Abbreviations for the nucleotides: A-adenosine; C-cytidine; G-guanosine; T-thymidine. CNP- **Type C** natriuretic peptide. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor protein of the EVASINS and CNP, isolated from the cDNA library from *Bothrops jararaca* brain, and the deduced amino acid sequence. The amino acid sequences of the EVASINS are underlined and the CNP sequence is shown in bold.

Another aspect of the invention is the procedure for the synthesis of the peptides in solid phase, using two specific strategies:

A - Use of the **tert-butyloxycarbonyl group (Boc)** as a temporary protector for the amino group and of **benzyl derivatives (Bzl)** for the protection of most of the amino acid reactive side chains.

- The first step in this synthesis strategy is to remove the Boc group from the first amino acid residue, bound to the resin.

Removal of the Boc group occurs in 30% TFA in dichloromethane (DCM), containing 2% anisole, for 30 min. The resin is then washed successively with isopropanol containing 0.5% anisole, DCM and MeOH. For the next amino acid coupling, the amino group is deprotonated by treatment with TEA 10% or DIPEA 5% in DCM for 10 min. The peptidyl-resin is then washed with DCM, MeOH, DCM and with the solvent used for the coupling.

Coupling of the amino acid starts with an activation phase, usually accomplished with coupling agents: diisopropylcarbodiimide (DIC) or 2-(1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU). Usually

WO 02/074782

17

PCT/BR02/00041

the Boc-amino acid (carboxylic component, CC) and the coupling agent are used in a 3-fold molar excess, as compared to the amount of amino groups (amine component, CA) in the resin.

5 - When DIC is used, the proportion of the reagents CA:CC:DIC is 1:3:3. When TBTU is used, the proportion of the reagents CA:CC:TBTU:DIEA is 1:3:3:4. Final concentration of these reagents is between 0.05 and 0.1 M.

10 - When coupling Asn (asparagine) or Gln (glutamine), hydroxibenzotriazol (HOBt) is used with the coupling agent to prevent formation of nitrile from these amino acids. For these couplings the final proportion of the reagents CA:CC:TBTU:HOBt:DIEA is 1:3:3:3:5. The coupling reaction, which normally takes 2 hours, is monitored using the
15 ninhydrine qualitative method, in which a blue staining of the peptidyl-resin is indicative of incomplete coupling. In this case, recoupling is generally performed changing the solvent used in the previous coupling reaction and/or the coupling agent itself. When the coupling phase is finished,
20 the next cycle is initiated with the deprotection of the amino group until the next residue is coupled. The process continues in cycles until the end of the elongation of the desired sequence.

25 At the end of the synthesis procedure, the peptide is cleaved from the resin, and its side chains are deprotected in a single step by treatment with anhydrous HF at 0° C for 60-90 min in the presence of p-cresol and dimethylsulfide (DMS) (5%, v/v of each) which act as suppressors for
30 collateral reactions induced by carbocations released during the HF treatment. When the peptide sequences contain Trp residues, ethanol-1,2-dithiol (EDT) is added to remove the formyl group that protects the side chain of this amino acid simultaneously to the cleavage. EDT is used in the same proportion as the other suppressors (5% v/v, of each).

After cleavage, the resin is washed with ethyl acetate and the peptide is eluted by washing the resin with 5% (v/v) acetic acid in water, and lyophilized. A white powder is obtained, generally amorphous.

5 B - Use of the base-labile protector 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) and tert-butyl derivatives (tBu).

- Differently from the previous strategy, in this case the amino group protector Fmoc is used, and removed from 10 the amino acid by treatment with a 20% piperidine solution in DMF for about 20 min. This treatment deprotonates the amino groups for the forthcoming coupling step. The coupling methods are the same as the Boc chemistry's and the final cleavage is performed using a weaker acid 15 solution, because both the protector's bond to the side chains (generally of the tert-butylic type) and the peptide's bond to the resin are more labile than in the Boc chemistry's. Usually, the resin is treated with 85-95% TFA (v/v) and a mixture of different suppressors of collateral 20 reactions for about 2 h. After this treatment, the peptide is precipitated with the resin in ice-cold ethylic ether, and centrifuged at a speed of 2,500g for 5 min. The supernatant is discarded and the pellet is resuspended in ethylic ether, vortexed and centrifuged. The procedure is 25 repeated 5 times and the resin/peptide mixture is dried under vacuum. Finally, the peptide is removed from the resin with 5% AcOH in water (v/v) and filtered. The filtered solution is lyophilized until an amorphous white powder is obtained.

30 Both strategies A and B are based on the following references: 1-Barany, G. & Merrifield, R.B. (Gross, E. & Meinhof, J., Eds.) (1980), *The Peptides: Analysis, Synthesis and Biology*, vol. II, 1, Academic Press, New York. 2- Stewart, J.M. & Young, J.D. (1984), *Solid Phase*

WO 02/074782

19

PCT/BR02/00041

Peptide Synthesis, Pierce Chemical Company, Rockford. 3-
Fields, G.B. (1997), *Methods in Enzymology*, Academic Press,
California; 3- Atherton, E. & Sheppard, R.C. (1989), *Solid
Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, I.L.R.
5 Press, Oxford. 4- Fields, G.B. & Noble, R.L. (1990) *Int. J.
Pep. Prot. Res.* 35, 161.

Following the methods described in this invention, a
pool of isolated peptides is obtained, presenting
bradykinin potentiating activity, as tested by its
10 contractile activity on smooth muscle, caused by
bradykinin, and measured using a preparation of isolated
guinea pig ileum, as shown in Example 5.

To determine the bradykinin potentiating activity, a
log-dose response curve of the effect of bradykinin on the
15 isolated guinea pig ileum was plotted.

The hypotensive effect of the bradykinin potentiating
activity was tested in normotensive and hypertensive (SHR)
male and female Wistar rats, anesthetized with ethylic
ether.

20 In the present invention, the peptides of particular
interest are natural anti-hypertensive peptides. These will
eventually be used as such, or in association with other
substances. These synthetic molecules can be conjugated to
a variety of ligands, such as acid groups, like sulfonyl,
25 carboxyl and phosphoryl, or other groups, such as thiols,
olefins, dithio, azo or diazo compounds, aldehydes and
similar compounds.

BPPs bound to specific ligands (peptide aptamers), can
be used to identify target proteins, such as enzymes and
30 receptors. For example, specific cells can present target
proteins that may be recognized or affected by these
modified BPPs. Thus, the use of specific ligands conjugated
to the BPPs can drive these molecules preferentially to the
cells that possess the specific target proteins. These

WO 02/074782

20

PCT/BR02/00041

ligands can be, for example, methylene blue, crystal violet, aspirin, saccharin or others.

In addition to these, several other compounds can be used as ligands, such as steroids, low density lipoproteins, growth factors, viral proteins, etc. Compounds containing such ligands may be preferentially identified by immunoglobulins or their fragments, recognizing them as antigens, wherever they are located. The immunoglobulins of interest are some of the subtypes of IgA, IgD, IgM, IgE and IgG. Immunoglobulins can be derived from any source, particularly from mice and humans. The immunoglobulins can be derived from hybridomas, such as transformed lymphocytes, or obtained by recombinant DNA methods.

Particularly, the variable part of the mice immunoglobulin can be linked to the human immunoglobulin, to form a chimeric immunoglobulin with low immunogenicity. Only the use of the Fab fragments, F(ab')₂, Fv, or similar, would be necessary.

Ligands can be coupled to the toxins in question, in order to help them enter the cells and identify the target protein(s) inside. Disulfide bonds can be used to release the toxins from the ligands as they are reduced inside the cell.

The compounds in question can be used *in vivo* and *in vitro*. For the *in vivo* use the compounds can be administered trans-mucosa, parenterally, or by injection, particularly intravenously. The dosage will possibly vary from around 1 µg to 10 mg, usually 0,5 mg/kg of body weight.

Depending on the means of administration and the synthetic toxin used, presenting the same amino acid sequence as the naturally occurring toxin, or a modified form, the compound may eventually be used at a very low

dosage. The compound may eventually be diluted in a physiologically acceptable medium, such as a phosphate-saline buffer, saline solution or other more convenient solution.

- 5 These compounds may eventually be used in cases of chronic or acute cardiovascular disturbances, in which the micro-circulation would be the target of the treatment. In particular, these compounds may eventually be used in human hypertensive disturbances and their consequences, such as
- 10 those causing vascular lesions, hyperplasia, etc. A possible recommended use might be in cases of acute pulmonary edema. They may eventually be used in modified or unmodified form, for pathophysiological diagnosis, where the identification or interaction of these toxins with the
- 15 target proteins (enzymes, receptors, etc.) can be useful.

The BPPs and EVASINS in this invention are used in cardiovascular pathologies.

- The innovations presented in this invention, in general terms, consist in adding to the less than 20 known
- 20 BPPs, dozens of other synthetic peptides with amino acid sequences identical to the natural BPPs and EVASINS, or their chemically modified homologues, which present structural motifs defined here, as well as in characterizing their biological actions through their
- 25 inhibitory activity on the carboxylic site of the angiotensin converting enzyme (ACE) and also on NEP and ECE.

- The peptides with these characteristics will be generically designated as BPPs (bradykinin potentiating
- 30 peptides) and EVASINS (endogenous vasopeptidase inhibitors). The BPPs and EVASINS from this invention correspond to the peptides secreted by the venom gland and to peptides produced in endogenous tissues of *Bothrops jararaca*.

WO 02/074782

22

PCT/BR02/00041

The sequences of the BPPs were determined by mass spectrometry; the sequences of the EVASINS were determined by deduction of the nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursors of these molecules, expressed in 5 serpents, specifically *Bothrops jararaca*.

EXAMPLES

Example 1:

- PARTIAL ISOLATION OF THE POOL COMPONENTS SHOWING BRADYKININ POTENTIATING ACTIVITY:

10 - High performance liquid chromatography - HPLC

The components of the peptide pools displaying bradykinin potentiating activity were partially isolated by high performance liquid chromatography - HPLC Merck-Hitachi model L-6200A, UV-vis detector set at 214 nm, with a 15 reverse phase column: C-18 / Beckman (4.6 x 250 mm/5µ resin) in 0.5% TFA (trifluoroacetic acid) in H₂O, and a 5% to 60% gradient of acetonitrile (ACN) at a flow rate of 0.2 to 0.5 mL/min. The gradients used varied according to the sample. The peptides were obtained by manually 20 fractionating the eluate according to the shape of the absorbance peaks at 214 nm.

Purification of the anti-hypertensive peptides from the venom of the Brazilian serpent *Bothrops jararaca*.

The total venom, obtained from a venom pool of *Bothrops jararaca* (1200 mg) supplied by the Venom Section of Instituto Butantan, was dissolved in 10 mL of deionized water and centrifuged at 800g for 30 min. The supernatant was collected and loaded onto a Sephadex G-25 (25-80 µ, Sigma) gel filtration column (1.2 x 101 cm). The column was 25 equilibrated with 30 mM ammonium acetate buffer, pH 5.5 at room temperature. The sample was loaded onto the top of the column and the components were eluted with a flow rate of 1.2 mL/min. The absorbance profile of each aliquot, at 214 nm, defined the constitution of the pools. 30

WO 02/074782

23

PCT/BR02/00041

High performance liquid chromatography - HPLC

The HPLC equipment used was a Merck-Hitachi, model L-6200A UV vis detector set at 214 nm, with a reverse phase column: C-18 / Beckman (4.6 x 250 mm/5 μ resin) for the partial isolation of the pools with bradykinin potentiating activity, in 0.5% TFA (trifluoroacetic acid), and a 5% to 60% gradient of acetonitrile (ACN) at a flow rate of 0.5 mL/min.

Example 2:**10 DETERMINATION OF THE MOLECULAR MASS AND OF THE PRIMARY STRUCTURE OF THE BRADYKININ POTENTIATING PEPTIDES BY MASS SPECTROMETRY**

The Mass spectrometry experiments were performed in a Micromass Quattro II mass spectrometer (ESMS-MS/Micromass) in the positive ionization mode with an electrospray ion source (Micromass). The Mass Lynx software was used for data acquisition.

The mass spectrometer's parameters were optimized using synthetic bradykinin as a standard.

20 The samples were dissolved in 50% ACN/H₂O and 0.1% formic acid, and injected at a constant flow rate of 0.5 μ L/min, by means of an injection pump. The data were acquired at the first quadrupole (ESMS), by scanning of the mass/charge ratio (m/z) between 400 and 1600 using a scanning time of 5 seconds during the whole analysis procedure.

30 The peptide, with protonated ion as characterized at the first quadrupole, was sequenced and fragmented by collision of induced dissociation (CID) with a pressure of argonium gas of 3×10^{-3} , and, finally, the data were acquired by scanning at the second quadrupole (ESMS-MS).

HPLC system coupled to the mass spectrometer (LC-ESMS-MS).

WO 02/074782

24

PCT/BR02/00041

The HPLC system used was a Hewlett-Packard model 1100, with automatic injector, UV-vis detector set at 214 nm, with a reverse phase column: C-18 / Beckman (4.6 x 250 mm/5 μ resin) for the isolation of components from total venom.

- 5 - Solvent A: 0.1% TFA/H₂O
- Solvent B: 10% solvent A/ACN, with a flow rate of 0.6 mL/min.

The gradient used was:

- t = 0 - 5 min: 0% B
10 t = 5 - 65 min: 0% - 60% B
t = 65 - 70 min: 60% - 100% B
t = 70 - 75 min: 100% B
t = 75 - 80 min: 100% - 0% B

- 15 The HPLC flow rate was 600 μ L/min, out of which 20 μ l were automatically injected into the mass spectrometer, while the remaining 580 μ l were sent to the UV-vis detector.

- 20 Mass spectrometry was carried out in a Micromass Quattro mass spectrometer (Micromass). Sequencing and characterization data were acquired using a software specially developed for this end.

Example 3:

Synthesis of peptides in solid phase

Two strategies were used for peptide synthesis.

- 25 The first, more traditional strategy, uses the tert-butyloxycarbonyl group (Boc) as a temporary protector for the amino group and benzyl derivatives (Bzl), for the protection of most of the reactive side chains of the amino acids.

- 30 The second and most recent strategy alternates between the base labile protector 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) and tert-butyl derivatives (tBu).

WO 02/074782

25

PCT/BR02/00041

a) **The Boc/Bzl strategy** - The first step in this strategy is the removal of the Boc group from the first amino acid residue bound to the resin.

5 Removal of the Boc group occurs in 30% TFA in dichloromethane (DCM), containing 2% anisole, for 30 min. The resin is washed with isopropanol containing 0.5% anisole, DCM and MeOH. For the coupling of the forthcoming amino acid, the amino group is deprotonated (neutralized) with 10% TEA or 5% DIPEA in DCM for 10 min. The peptidyl-
10 resin is then washed with DCM, MeOH, DCM and the solvent to be used in the coupling phase.

Coupling of the amino acid starts with an activation phase, usually accomplished with coupling agents: diisopropylcarbodiimide (DIC) or 2- (1H- benzotriazolyl)-
15 1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluorborate (TBTU). Usually the Boc-amino acid (carboxylic component, CC) and the coupling agent are used in a 3-fold molar excess, as compared to the amount of amino groups (amine component, CA) in the resin.

20 When DIC is used, the proportion of the reagents CA:CC:DIC is 1:3:3. When TBTU is used, the proportion of the reagents CA:CC:TBTU:DIEA is 1:3:3:4.

Final concentration of these reagents is between 0.05 and 0.1 M. When coupling Asn (asparagine) or Gln
25 (glutamine), hydroxibenzotriazol (HOBT) is used with the coupling agent, to prevent the formation of nitrile from these amino acids.

For these couplings the final proportion of the reagents CA:CC:TBTU:HOBT:DIEA is 1:3:3:3:5. The coupling reaction,
30 which normally takes 2 hours, is monitored using the ninidrine qualitative method and a blue staining of the peptidyl-resin is indicative of incomplete coupling. In this case, recoupling is generally performed changing the

WO 02/074782

26

PCT/BR02/00041

solvent used for the previous coupling and/or the coupling agent.

When the coupling phase is finished, the next cycle is initiated with the deprotection of the amino group until the next residue is coupled. The process goes on cyclically until the end of the elongation of the desired sequence.

- At the end of the synthesis procedure, the peptide is cleaved from the resin and its side chains are deprotected in a single step by treatment with anhydrous HF at 0°C for 60-90 min in the presence of p-cresol and dimethylsulfide (DMS) (5%, v/v each) which act as suppressors for collateral reactions induced by carbocations released during the HF treatment.

When the peptide sequences contain Trp residues, ethanol-1,2-dithiol (EDT) is added to remove the formyl group that protects the side chain of this amino acid simultaneously with the cleavage. EDT is used at the same proportion as the other suppressors (5% v/v, each). After cleavage, the resin is washed with ethyl acetate and the peptide is eluted by washing the resin with 5% (v/v) acetic acid in water, and lyophilized. A white powder is obtained, generally amorphous.

b) The Fmoc/tBu strategy

- Differently from the previous strategy, the amino group protector Fmoc is used, which is removed from the amino acid by treatment with a 20% piperidine solution in DMF for about 20 min. This treatment deprotonates the amino groups for the next coupling step. The coupling methods are the same as the Boc chemistry's and the final cleavage is performed using a weaker acid solution because both the protector's bond to the side chains (generally of the tert-butylic type) and the peptide's bond to the resin are more labile than the Boc chemistry's. Usually, the resin is treated with 85-95%

WO 02/074782

27

PCT/BR02/00041

TFA (v/v) and a mixture of different suppressors of collateral reactions for about 2 h. After this treatment, the peptide is precipitated with the resin in ice-cold ethylic ether, and centrifuged at 2,500g for 5 min. The supernatant is discarded and the pellet is resuspended in ethylic ether, vortexed and centrifuged. The procedure is repeated 5 times and the resin and peptide mixture is dried under vacuum. In the end, the peptide is released from the resin with 5% AcOH in water (v/v) and filtered. The filtered solution is lyophilized until an amorphous white powder is obtained.

1- Atherton, E. & Sheppard, R.C. (1989), *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, J.L.R. Press, Oxford.

15 2- Fields, G.B. & Noble, R.L. (1990) *Int. J. Pep. Prot. Res.* 35, 161.

Example 4:

Peptide sequences deduced from the cDNA encoding the precursors of the BPPs.

20 **Northern blot assays**

Total RNA from several tissues of *Bothrops jararaca* was isolated using the extraction method with guanidine isothiocyanate - phenol - chloroform. Ten micrograms of total RNA from each of the serpent's tissues were separated by denaturing agarose gel electrophoresis (1.7% formaldehyde), and transferred by capillarity to nylon membranes. The RNA was blotted to the membrane at 80°C in a vacuum-oven for 1 hour followed by UV treatment in a Crosslinker (model RPN 2500 - Amersham), at 70.000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ for 5 minutes.

The membranes were pre-hybridized at 42°C, over night (approximately 16 hours), in a buffer containing 50% formamide, 2.5 mM K_2PO_4 , 5 X Denhardt's solution, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ herring sperm DNA and 10% dextran sulfate.

WO 02/074782

28

PCT/BR02/00041

The cDNA fragments used as templates for the synthesis of radioactive probes were obtained by digestion of the clone containing the cDNA insert encoding the BPPs and CNP (clone NM87, Murayama *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 5 94, 1189-1193, 1997), with the appropriate restriction enzymes (Sma I or Sma I + Bam HI, for the sequences encoding the BPPs and the CNP, respectively).

The excised inserts were separated by low melting agarose gel electrophoresis and the DNA was recovered by 10 phenol/chloroform extraction followed by ethanol precipitation.

The radioactive probes were prepared using approximately 25 ng of template DNA, obtained as described above, for each reaction, following the instructions of the 15 manufacturer of the RediPrime kit (Amersham), based on the incorporation of α [³²P]-dCTP in the presence of random hexanucleotides and polymerase (Klenow or T4 DNA polymerase). The non-incorporated radioactive nucleotides were separated from the probe in inverse molecular sieve 20 columns ("spin columns S-200" Pharmacia).

Hybridizations with the radioactive probes were carried out at 42°C, for 16 hours, after adding the radioactive probe to the pre-hybridization solution at a concentration of approximately 1.5×10^6 cpm/mL.

25 Finally, the membranes were washed at high stringency conditions, i.e., washed four times at 65°C with a 2X SSC; 0.1% SDS solution for 15 minutes each, and three times at 65°C in a 0.1X SSC; 0.1% SDS solution. The membranes were exposed to X-rays films (LS - Kodak) in appropriate 30 cassettes, for the appropriate time, depending on the strength of the radioactive signal observed for each membrane. For a better detection of the weaker signals, the cassettes, contained a pair of screens, the film and the membrane, and were kept at ~ 80°C.

Purification of the messenger RNA and preparation of the cDNA library from *B. jararaca* brain

Total RNA from the brain of *B. jararaca* was isolated using the guanidine isothiocyanate - phenol - chloroform extraction method.

The messenger RNA was purified by passing the total RNA solution twice through a pre-packed oligo-dT cellulose column (GibcoBRL). One aliquot of the purified messenger RNA was submitted to denaturing agarose gel electrophoresis (containing 1.7% formaldehyde) followed by staining with ethidium bromide. The RNA was transferred by capillarity to nylon membranes to confirm the integrity of the samples through hybridizations with probes specific for the sequences encoding the BPPs. The preparation of the cDNA library in λ ZAP phages was carried out using a cDNA preparation kit from Stratagene (La Jolla, CA). After cloning the double stranded cDNA inserts, obtained from 5 μ g of brain messenger RNA into the λ ZAP phages, these were packaged *in vitro* and titered to verify the cloning efficiency. This phage library was amplified and the aliquots were stored at -20°C and -80°C , in the presence of chloroform and DMSO, respectively.

Amplification of the cDNA from the total phage lysate

Using 10 μ l of the total phage lysate obtained for the brain cDNA library, PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification was carried out using specific oligonucleotides, derived from the sequence of the cDNA encoding the precursor of the BPPs and the CNP from the venom gland. The phage lysate was initially incubated at 100°C for 5 minutes, then cooled down to 4°C and, finally, added to the other components of the amplification reaction, composed of 10 pmol of each primer, 2.5 U of Taq polymerase (Amersham), 200 μM dNTPs and 1X PCR buffer,

WO 02/074782

30

PCT/BR02/00041

supplied with the enzyme. The reactions thus prepared were then submitted to a denaturing cycle at 94°C for 4°C and, then, to 35 more cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C. Subsequently, the reactions were kept at 4°C until the PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis, after staining with ethidium bromide. The PCR products of the expected size, based on the cDNA sequence from the venom gland, were subcloned in a plasmid vector pCRscript SK+ (Stratagene), following the manufacturer's instructions (by usual methods), and sequenced using oligonucleotides that anneals to adjacent regions of the vector's multiple cloning site (primers T3 and T7).

Selection and identification of the clone encoding the precursor of the BPPs:

The fragments obtained by digestion of clone NM87 with Sma I or Sma I and Bam HI (approximately 450 bp and 432 bp, positions 164 - 610 and 610 - 1044, respectively) were used as templates for the synthesis of radioactive probes ($\alpha^{32}\text{P}$) using the random primer method (Rediprime kit/Amersham). The nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell) prepared from plates containing approximately 50 thousand phage plaques each, were submitted to hybridization with the radioactive probes in 6X SSPE (1X SSPE: 0.15 M NaCl, 15 mM NaH_2PO_4 , pH 7, 1 mM EDTA), 50% formamide, 0.1% SDS and 5X Denhardt's at 42°C for 16 hours. The membranes were then washed twice in 2X SSC/0.1% SDS and three times in 0.1X SSC/0.1% SDS, at 65°C, for 15 minutes each (1X SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7).

Positive phage plaques were identified by autoradiography and were isolated for the analysis of the DNA insert. In vivo excision of the phagemid pBluescript from the vector λ ZAP was carried out using the "helper phage", following the

instructions of the manufacturer, and the extremities of the insert were sequenced.

Sequencing of the DNA inserts:

The sequencing reactions were carried out following the chain termination method with dideoxy-nucleotides, using the kit Big Dye (Perkin Elmer), followed by the analysis in the ABI 310 automatic sequencer, following the manufacturer's instructions.

Total RNA from the brain of a single *B. jararaca* specimen was isolated by the guanidine isothiocyanate - phenol - chloroform extraction method, and the messenger RNA was purified by passing the total RNA solution once through a pre-packed oligo-dT cellulose column. The integrity of the purified mRNA of the sample was checked by agarose gel electrophoresis followed by hybridization with radioactive samples synthesized from de cDNA encoding the precursor of the BPPs and the CNP (identified by Northern blot assays).

Preparation of the cDNA library in λ ZAP phages (Stratagene) was carried out by common and usual methods using 5 μ g of this sample, following the manufacturer's instructions.

The initial packaging of the recombinant phages obtained generated a titer of approximately 2×10^5 pfu/mL, with less than 1% of non-recombinant clones. This library was immediately amplified, with a final titer of approximately 9×10^9 pfu/mL.

PCR (Polymerase Chain reaction) amplification

The goal of the initial approach used was to amplify the cDNA of interest from *B. jararaca* brain cDNA library by PCR, using oligonucleotides specific for the cDNA sequence encoding the precursor of the BPPs and the CNP. The reactions were carried out with materials and methods described herein. Only one fragment of approximately 250

base pairs was cloned from the total phage lysate containing the brain cDNA library (there was no amplification of any other fragment from the serpent brain or pancreas library). Complete sequencing of this cDNA insert showed a very high degree of similarity with the cDNA sequence identified in the venom gland library, except for the insertion of a few nucleotides (12 bases) in the segment that precedes the natriuretic peptide and some point mutations (4 residues substituted), of which three are silent (encoding the same amino acid residue) and the fourth was "conservative" (a substitution for an amino acid with the same chemical characteristics). In spite of the numerous amplification attempts changing reaction conditions and/or the polymerase and oligonucleotide used, it was not possible to clone other fragments from any of the libraries studied.

Approximately 5×10^6 clones were independently analyzed using the segment encoding the natriuretic peptide as a template for the synthesis of radioactive probes used for the hybridization experiments, which made it possible to identify 13 positive clones. The plasmid vectors containing the cDNA inserts were recovered by mini-preparations of DNA and sequenced using oligonucleotides that anneal to adjacent regions of the plasmid vector's (pBluescript SK+) multiple cloning site (commercial primers T3 and T7).

Screening of clones by hybridization of the cDNA library from the brain of *B. jararaca* allowed the isolation of a cDNA encoding the BPPs as part of a precursor protein for these peptides (figure 1). Seven peptides (the sequences of which are listed among those in table 1) were identified by analogy with the BPPs isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. Based on these sequences, peptides were synthesized that presented the same pharmacological

properties as the venom peptides, as well as inhibition of ECA and NEP.

Example 5:

5 **Testing the bradykinin potentiating activity of the BPPs and EVASINS:**

Biological assay on guinea pig ileum:

The potentiating activity of the pools of isolated peptides was tested on the contractile activity of bradykinin on smooth muscle, measured using a preparation of isolated guinea pig ileum. Female guinea pigs with a body weight between 160 and 180 g were used. Before starting the assays, the ileum was kept in TYRODE solution at 37°C for 30 min. One of the ends of the isolated ileum segment, measuring 1.5 to 2.0 cm, was tied to a semi-ring located at the bottom of a glass container with a capacity of 5 mL, containing the TYRODE physiological solution at 37°C under constant oxygen bubbling through a capillary. The other extremity of the ileum segment was tied to a previously calibrated registering arm. The tension on the arm was of 1 g, and the ileum contractions were recorded by an REC101 recorder (Pharmacia Biotech).

The samples were prepared in deionized water at the time of use, and the volume used for the biological preparation did not exceed 0.2 mL.

25 In order to determine the bradykinin potentiating effect of the samples, a log-dose curve of the effect of bradykinin on the ileum was plotted. Bradykinin activity was determined by measuring the contractions of the isolated guinea pig ileum, and the potentiating activity was expressed as a function of the increase in tissue response to a standard dose of bradykinin.

30 Pools and fractions were assayed individually and were added 30 seconds before the addition of a simple dose of bradykinin. The measured response was interpolated in the

WO 02/074782

34

PCT/BR02/00041

linear section of the log dose-effect curve, giving the potentiating activity as a function of the raise in tissue response to a standard dose of bradykinin. TYRODE solution: 20 mL of stock solution I, 40 mL of the solution II, 1 mL of difenidramine solution (1 mg/mL), 1 mL of atropine solution (1 mg/mL), 5.60 mM D-glucose and H₂O to 1 L.

All reagents used in this experiment were of analytic grade.

Example 6:

10 **Effect on the systemic blood circulation and microcirculation**

The hypotensive potentiating activity effect of bradykinin was tested in normotensive and hypertensive male and female Wistar rats, anesthetized with ethylic ether; a cannulae was introduced in the femoral vein for drug administration and in the femoral artery for blood pressure recording. A Gould polygraph was used coupled to a Statham Gould physiological transducer. The arterial pressure variation values were obtained by integration of the areas delimited by the pressure base line, and by comparing them with the values obtained in the control experiment. Toxin effect tests were carried out in normotensive and hypertensive rats by intra-vital microscopy using the mesenteric circulation. The animals were anesthetized, and their body temperature maintained by a heated plate, while the mesentery was trans-illuminated and observed through lenses coupled to a television camera. The vase diameters of these animals were measured with a micrometric screw. Tested substances were administered by a constant flow peristaltic pump or injected *in bolus*.

Example 7

Enzymatic assays for the determination of ACE inhibition by the BPPs.

WO 02/074782

35

PCT/BR02/00041

The wild-type human angiotensin converting enzyme (ACE) and two mutants, containing only one functional active site, were obtained through stable transfection of chinese hamster ovary cells with the ACE encoding cDNA. The
5 two ACE mutants were expressed as full-length proteins, presenting one of the catalytic sites, N- or C- terminal, inactivated by substitution of the zinc binding histidine residues by lysine residues.

The enzymatic assays were carried out at 25°C with the
10 substrate Mca-Ala-Ser-Asp-Lys-DpaOH, in a 50 mM Hepes buffer, pH 6.8, containing 200 mM NaCl and 10 μ M ZnCl₂. The reactions were continuously monitored by determining the raise in fluorescence at 390 nm emission wave length, and excitation at 340 nm, caused by the cleavage of the
15 substrate (S = Km, 40 μ M) by ACE, in a fluorimeter Fluorolite 10000 (Dynatech). The bradykinin potentiating peptides (BPPs) (inhibitors, were pre-incubated with the enzyme 90 min before the addition of the substrate.

Example 8:

20 **Characterization of the effect of the BPPs *in vivo* - arterial blood pressure and microcirculation**

Wistar male rats with a body weight between 180 and 220 g were anesthetized with sodic pentobarbital (Hypnol® Cristalia, 50 mg/kg of body weight, intraperitoneally),
25 while the body temperature was maintained between 36.5°C and 37°C by a heated plate. After tracheotomy, the ventilation of the animals was controlled by a mechanical ventilator (Harvard Rodent Ventilator, model 683, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, USA), under standard
30 conditions, as follows: frequency: 57-65 inspirations/min; passing volume: 2-2.5 mL; inspired oxygen fraction: 0.25-0.40. Cannulae were introduced in the right carotid artery and the jugular vein (PE-50 catheters, 58 mm ID, Portex, Hythe, UK) for the continuous monitoring of the arterial

blood pressure (TSE System Technical & CHM Scientific Equipment GMBH), and for the administration of liquids, respectively. The mesenteric bed was exposed. After trichotomy of the abdominal region, the skin was ruptured and the mesentery was reached through an incision at the alba line. The mesentery was exposed under controlled temperature on the transparent area of the plate, which was placed on the microscope charriot. The temperature of the plate was kept at 37°C. The exposed tissue was kept moist and heated by perfusion with Ringer-Locke solution, pH 7.2-7.4 containing 1% gelatin (154 mM NaCl; 5.6 mM KCl; 2 mM CaCl₂·2H₂O; 6 mM NaHCO₃; 5 mM glucose) at 37°C.

The study of mesenteric microcirculation *in situ* was carried out using an optical microscope (Akioskop-Carl Zeiss, Germany) coupled to a colored image projection camera (JVC-TKC 6000), which transmits, simultaneously or not, the images obtained in the microscope to a computer and/or to a TV monitor. Image analysis software, MS Windows compatible, (Kontron KS 300, Kontron Bild Analyse-GMBH, Germany), is installed in the computer allowing quantitative measurements of the stored images at fixed time intervals. A video tape recorder capable of recording the entire course of the experiment is connected to the TV monitor.

Thus, the images visualized during the experiment can be quantitatively evaluated through the fixed image on the computer's monitor, and at the same time the course of the experiment observed on the TV monitor can be stored by the video tape recorder for later analysis.

The optical microscope has a system of amplifying lenses (Optovar), localized between the lenses and the projection camera. The image transmitted to the monitors results from magnifications determined by the lenses, amplifying lenses and projection camera. In the studies

WO 02/074782

37

PCT/BR02/00041

described here, magnification on the computer monitor was of 660 times and on the TV monitor, of 1530 times.

Determination of the red blood cells speed in the microcirculatory vessels (diameters between 15 and 30 μm) was carried out by the photometric method described by BORDERS & GRANGER (1984) and complemented by Davis (1987). Through an optical doppler velocimeter (Microcirculation Research Institute, Texas A&M College of Medicine), installed between the eye piece of the optical microscope and the image projection camera of the intravital microscopy equipment, the blood flow was determined *in situ* on the computer monitor. The equipment is composed of two sensors (Planar photodiodes and low capacitance), which are placed at the center of the image of the vessel under observation on the computer monitor. The sensors, at an established and known distance between them, are capable of detecting alterations in the light intensity produced by the passage of red blood cells and transform them into voltage signals, which are proportional to the speed of those cells.

The sensors determine the diameter of the vessel and the speed of the red blood cells at the center of the blood flow.

Experimental protocols

25 Surgical procedures

- 10 minutes for stabilization of the microcirculatory net and blood pressure.
- Administration of BPPs or equivalent volume of sterile saline solution (5 mL in 10 minutes). Immediately after administration of BPPs or saline solution, injection of bradykinin *in bolus* (3 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$).

CLAIMS

- 1- Procedure for the isolation and purification of vasopeptidase peptide inhibitors, showing specificity for the carboxyl site of the angiotensin-converting enzyme, secreted by serpent venom glands (BPPs), particularly *BOTHROPS JARARACA*, or produced endogenously (EVASINS), having vasodilating and anti-hypertensive action, consisting of the following steps:
- a) 800-1500 mg of total venom, obtained from a pool of *B. jararaca* venom are dissolved in 7.0-15 ml deionized water followed by centrifugation at 1500-2000 rpm for 15 to 20 minutes; the supernatant is passed through a gel-filtration column, Sephadex G-25 (25-80 μ , Sigma), 1.2 x 101 cm; the column is equilibrated with 30-50 mM ammonium-acetate buffer, pH 5.0 to pH 6.0, at room temperature;
 - b) the sample is to the top of the column and the components are eluted at a flow rate of 1.0 to 2.0 mL/min;
 - c) the absorbance profile is obtained for each aliquot at 214 nm in order to define the constitution of the pools
 - d) the components of the pools showing potentiating activity are partially purified by high performance liquid chromatography, for which 0.1 to 1.0 % TFA (trifluoro acid)/ H₂O and acetonitrile/H₂O (9:1) are used as solvents, and a gradient of 5% to 60% of solvent B, with a flow rate of 0.2 to 0.5 mL/min.
 - e) the molecular mass and the primary structure of the bradykinin potentiating peptides are determined by mass spectrometry (ESMS-MS)
- 2- Procedure for the isolation and purification of vasopeptidase peptide inhibitors, showing specificity for the carboxyl site of the angiotensin-converting enzyme, secreted by serpent venom glands (BPPs), particularly *BOTHROPS JARARACA*, or produced endogenously (EVASINS),

WO 02/074782

39

PCT/BR02/00041

having vasodilating and anti-hypertensive action, according to claim 1, characterized by the fact that in step (d) the HPLC Merck-Hitachi, model L-6200A is used, with the UV-vis detector set at 214 nm, and the reverse-phase column C-18/Beckman (5 μ , 4.6 x 250 mm). The gradients varied according to the sample.

3 - Procedure for the amino acid sequence determination of the BPPs, characterized by the fact that it was performed by mass spectrometry analysis, by dissolving the samples in 50% H₂O/ACN with 0.1% of formic acid and injecting them under constant flow of 5 μ L/min by means of an injection pump. The data are acquired at the first quadrupole (EM-MS), scanning the mass/charge ratio (m/z) between 400 and 1600, using a scanning time of 5 seconds during the whole analysis process. The sequencing is performed by selecting the peptide displaying a protonated ion, as characterized at the first quadrupole, followed by fragmentation by collision induced dissociation (CID) under 3 x 10⁻³ argonium gas pressure, and data acquisition by scanning the second quadrupole (ESMS-MS).

4- Procedure for the amino acid sequence determination of the BPPs, according to claim 3, characterized by the fact that it is performed in a mass spectrometer Micromass Quattro II (ES-MS-MS/Micromass) in the positive ionization mode with the electrospray ion source (Micromass) and the software Mass Lynx (Micromass) is used for data acquisition.

5 - Procedure for the amino acid sequence determination of the BPPs, characterized by the fact that the characterization and the sequencing can be performed by the HPLC system, coupled to a mass spectrometry system (LC-

WO 02/074782

40

PCT/BR02/00041

ESMS-MS), where the Hewlett-Packard HPLC, model 1100 is used, equipped with an automatic injector, a UV/vis detector set at 214 nm. The reverse-phase column is a C-18/The Separations Group (5 μ m, 4.6 x 250 mm) for the purification of total venom components.

6 - Procedure for the amino acid sequence determination of the EVASINS by deduction using the cDNA of the precursors of these molecules expressed in serpent tissues, specifically of *Bothrops jararaca*, consisting of the following steps:

a) Isolation of total RNA from various *B. jararaca* tissues employing the isothiocyanide guanidine-phenol-chloroform extraction method; 1.0 to 5.0 micrograms of total RNA of each serpent tissue are submitted to denaturing agarose electrophoresis (1.0 to 2.5% formaldehyde), and transferred by capillarity to nylon membranes; the RNA is blotted to the membrane in a vacuum-oven at 80 °C for 1-2 hours.

b) the membrane is exposed to UV light at 70.000 J/cm² in a Crosslinker (RPN 2500 model - Amersham) for 30 to 50 minutes.

c) pre-hybridization is performed at 42°C overnight, or for 16 hours, in a 50% formamide solution, containing 2.5 mM K₂PO₄, pH 7.4, 5X Denhardt's solution, 50 μ g/ml herring sperm DNA, and 10% dextran sulfate

d) cDNA fragments, used as template strands for the synthesis of the radioactive probes, are obtained by digestion of the clone containing the cDNA insert coding for the BPPs and CNP precursor, clone NM87, with the restriction enzymes SmaI, and SmaI + BamHI, for the coding sequences of EVASINS and CNP, respectively

e) the inserts are obtained by gel electrophoresis, using low melting point agarose,

WO 02/074782

41

PCT/BR02/00041

- f) followed by extraction with phenol and chloroform, and ethanol precipitation.
- g) radioactive probes are prepared using approximately 50-100 ng of template DNA in a reaction based on the incorporation of α [32 P]-dCTP in the presence of random hexanucleotides and polymerase (Klenow or T4 DNA polymerase).
- 5 h) spin-columns S-200 from Pharmacia are used to separate the probes from non-incorporated radioactive-labeled nucleotides
- 10 i) pre-hybridizations are performed at 65°C, for 30 to 45 minutes using the radioactive labeled cDNA probes,
- j) and the radioactive labeled probes are added to the pre-hybridization medium at a concentration of approximately
- 15 1.5×10^6 cpm/ml.
- k) membranes are washed at high stringency conditions (4 washes at 65°C in 2 X SSC/0.1% SDS for 15 min each, and 3 washes at 65°C in 0.1 X SSC/0.1% SDS for 10 min each;
- l) membranes are exposed to X-ray films in appropriate cassettes and for the time needed, depending on the
- 20 observed intensity of the radioactive signal of the membrane;
- m) the films are kept at -80°C.

7 - Procedure for the amino acid sequence determination of the EVASINS by deduction, using the cDNA of the precursors of these molecules expressed in serpent brain tissues, specifically of *Bothrops jararaca*, consisting of the following steps:

25

- a) Total RNA from *B. jararaca* brain is isolated using the guanidin isothiocyanate-phenol-chloroform extraction method,
- 30 b) messenger RNA is purified by passing total RNA solution twice through a pre-packed oligo-dT cellulose column (Gibco/BRL).

WO 02/074782

42

PCT/BR02/00041

- c) One aliquot of the purified messenger RNA is submitted to denaturing agarose gel electrophoresis (1.0-2.5% formaldehyde) and stained with ethidium bromide
- d) the RNA is transferred by capillarity to nylon membranes to confirm its integrity by hybridizations with probes specific for the region coding for the BPPs;
- e) the cDNA library is constructed in λ ZAP phages using common techniques;
- f) the double stranded cDNA inserts, obtained from 5 μ g of brain messenger RNA are cloned into λ ZAP phages;
- g) which are packaged *in vitro*; the titer is determined to verify the cloning efficiency;
- h) the phage library is amplified and aliquots are kept at -20°C and -80°C, in the presence of chloroform and DMSO, respectively.

8 - Procedure for the amino acid sequence determination of the EVASINS by deduction of the cDNA of the precursors of these molecules expressed in serpent brain tissues, specifically of *Bothrops jararaca*, consisting of the following steps:

- a) total phage lysate (10 μ l) from the brain cDNA library was employed for PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification, using specific oligonucleotides, designed according to the cDNA sequence coding for the precursor of the BPPs and CNP from the venom gland. Incubation is at 42°C for 15 minutes, followed by cooling at 4°C;
- b) the other components are added to the amplification reaction, consisting of 10 pmol of each primer, 2.5 U of Taq polymerase (Amersham), 200 μ M dNTPs and 1X PCR buffer, supplied with the enzyme;
- c) reactions mixes, thus prepared, are submitted to a denaturing cycle at 94°C for 4°C and, subsequently, to 35

WO 02/074782

43

PCT/BR02/00041

additional cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 1 min at 72°C;

d) the reaction mixes are kept at 4°C until the PCR products are analysed by agarose gel electrophoresis, and stained with ethidium bromide;

5 e) the PCR products are subcloned into the pCRscript SK+ (Stratagene) plasmid vector by usual methods, and are sequenced using oligonucleotides which anneal to sites adjacent to the vector's multiple cloning site (primers T3
10 and T7).

9 - Procedure for the amino acid sequence determination of the BPPs by deduction of the cDNA of the precursors of these molecules expressed in serpent brain tissues, specifically of *Bothrops jararaca*, consisting of the
15 following steps:

a) Nitrocellulose membranes prepared from plates containing approximately 50 thousand phage plaques each, are submitted to hybridization with radioactive probes in 6X SSPE (1X SSPE: 0.15 M NaCl, 15 mM NaH₂PO₄, pH 7, 1mM EDTA), 50%
20 formamide, 0.1% SDS and 5X Denhardt's at 42°C for 16 hours;

b) The membranes are washed twice in 2X SSC/0.1% SDS and three times in 0.1X SSC/0.1% SDS, at 65°C, for 15 minutes each wash (1X SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM sodium citrate, pH
7);

25 c) After autoradiography phage plaques identified by the probes are isolated for the analysis of the DNA insert;

d) In order to analyse the inserts, their ends are sequenced after *in vivo* excision of the phagemid pBluescript from the vector λ ZAP, performed using the
30 "helper phage".

10 - Procedure according to claim 9, characterized by the fact that fragments obtained by digestion of clone NM87 with SmaI or SmaI and BamHI, approximately 450 bp and 432 bp, positions 164-610 and 610-1044, respectively, are used
5 for the synthesis of radioactive probes (α ³² P) by the random-priming method (Rediprime kit/Amersham).

11 - Procedure to determine the amino acid sequence of the BPPs by deducing from the cDNA of these precursor molecules, expressed in serpent brain tissue, specifically
10 *Bothrops jararaca*, characterized by the fact that they comprise the following steps:

a) Total RNA is isolated from the brain of a sole *B. jararaca* serpent, employing the isothiocyanide guanidine-phenol-chloroform extraction method, and the messenger RNA
15 is purified by one passage through the ready-packed oligo dT-cellulose column;

b) the integrity of the messenger RNAs of the preparation is verified by agarose gel eletrophoresis, followed by hybridization with the radiolabeled probes, synthesized
20 according to the cDNA sequence coding for the BPPs and CNP precursor;

c) a cDNA library is constructed by common techniques in λ ZAP phages (Stratagene), using 5 μ g of this preparation,

d) the library is amplified, and the final titer
25 determined, which should be around 9×10^9 pfu/ml.

12 - Procedure according to claim 11, characterized by the fact of obtaining sequenced DNA inserts.

13 - Procedure of amplifying the cDNA from serpent brain cDNA libraries, specially *Bothrops jararaca*, characterized
30 by the following steps:

- a) oligonucleotides specific for the cDNA sequence coding for the BPPs and CNP precursor are used;
- b) a fragment of approximately 250 base pairs is cloned from the total phage lysate of the serpent brain cDNA library;
- 5 c) complete sequence of this cDNA insert is determined;
- d) a high level of similarity is found to the cDNA sequence identified in the venom gland library;
- e) approximately 4×10^6 independent clones are analysed, employing a coding segment of the natriuretic peptide as a template for the synthesis of radioactive probes used in hybridizations and identification of the plasmid vectors containing the cDNA inserts for the DNA mini-preps, and the sequencing of the inserts, using
- 10 oligonucleotides (primers) which anneal to the regions adjacent to the multiple cloning site of the plasmid (pBluescript SK+) (primers T3 and T7).
- 15

14 - Procedure according to claim 13 characterized by the fact that the selection of clones through hybridization of the cDNA library of the *B. jararaca* brain allows the isolation of a cDNA coding for the BPPs precursor within the precursor protein of these bioactive peptides.

20

15 - Procedure according to claim 14 characterized by the fact that by analogy to the EVASINS with the BPPs isolated from the venom of *B. jararaca*, six (6) peptide formulas are identified.

25

WO 02/074782

46

PCT/BR02/00041

16 - Procedure according to claim 14 characterized by the fact that the six (6) peptide formulas are:

Formulas	Sequences
I	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ P ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ P ⁸
5 II	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ P ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ P ⁹
III	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ P ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ P ¹⁰
IV	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ P ⁷ aa ⁸ aa ⁹ P ¹⁰ P ¹¹
V	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ P ⁸ aa ⁹ aa ¹⁰ P ¹¹ P ¹²
VI	pp ¹ aa ¹ aa ² aa ³ aa ⁴ aa ⁵ aa ⁶ aa ⁷ aa ⁸ P ⁹ aa ¹⁰ aa ¹¹ P ¹² P ¹³

10 where:

P is always proline. The remaining are always L-amino acids, and are presented by the one-letter code (see below)*.

15 pp¹ is the N-terminus, and may be pyroglutamyl (<E) or a simple amino acid, usually not basic;

aa¹ is a non-basic amino acid, usually W, S, G or N

aa² is a non-acid amino acid, usually P, G, W or R;

aa³ is a non-acid amino acid, usually P, A, R or W

20 aa⁴ is P for formula I, and is an amino acid, usually T, P, G, H, R, W or E for the remaining oligopeptides;

aa⁵ is usually Q, N, P, or G for formula I;

aa⁶ for formula II, aa⁷ for formula III, aa⁸ for formula IV,

and aa⁹ for formula V is a non-basic amino acid, usually Q, N, P, or G.

25 aa⁶ for formula I, aa⁷ for formula II, aa⁸ for formula III, aa⁹ for formula IV, and aa¹⁰ for formula V are always I or A or T.

*

acid amino acids D, E

30 basic amino acids K, R

WO 02/074782

47

PCT/BR02/00041

Aromatic amino acids F, W, Y

G-glycine	N-asparagine
A-alanine	Q-glutamine
5 P-proline	D- aspartic acid
V-valine	E- glutamic acid
I-isoleucine	K-lysine
L-leucine	R-arginine
S-serine	F-phenylalanine
10 T-threonine	H-histidine
W-tryptophane	Y-tyrosine

<E- pyroglutamyl

17 - **Solid-phase synthesis procedure of vasopeptidase peptide inhibitors exhibiting vasodilating and anti-hypertensive action**, consisting of the following steps:

- a) the Boc group from the first amino acid residue bound to resin is removed in the presence of 30% TFA in dichloromethane (DCM), containing 2% anisole, during 30 min.
- b) a wash with 1/2% anisole, DCM and MeOH follows. For the
20 coupling of the next amino acid,
- c) the amino group is neutralized by treatment with 10% TEA or 5% DIPEA in DCM for 10 min;
- d) the peptidyl-resin is washed with DCM, MeOH, DCM and the solvent that will be used in the coupling phase;
- 25 e) the amino acid is coupled by activation using acylating agents based on diisopropylcarbodiimide (DIC) or 2- (1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethylurone tetrafluoroborate (TBTU), and a 3-fold molar excess of the Boc-amino acid

(carboxylic component, CC) and of the coupling agent, as compared to the amount of amino groups (amine component, CA) in the resin; the coupling reaction is monitored for 2 hours, using the ninidrine quantitative method;

5 f) the following cycle is initiated by deprotecting the amino acid until the forthcoming residue enters the reaction, and the process continues in cycles until the end of the elongation of the desired sequence;

10 g) the peptide is cleaved from the resin, and its side chains are deprotected by treatment with anhydrous HF at 0° C for 60-90 min in the presence of p-cresol and dimethylsulfide (DMS) (5%, v/v of each) which act as suppressors for collateral reactions induced by carbocations released during the HF treatment;

15 h) the resin is washed with ethyl acetate and the peptide is extracted with 5% acetic acid (AcOH) in water (v/v), followed by lyophilization in order to obtain a white powder, which is usually amorphous.

18- Solid-phase synthesis procedure for the vasopeptidase
20 peptide inhibitors exhibiting vasodilating and anti-hypertensive action, according to claim 17, characterized by the fact that in step (e) the proportion of the reagents CA:CC:DIC be 1:3:3, when DIC is used, and 1:3:3:4 of CA:CC:TBTU:DIEA, when TBTU is used. The final concentration
25 of these reagents lies between 0.05 and 0.1 M.

19 - Solid-phase synthesis procedure for the vasopeptidase
peptide inhibitors exhibiting vasodilating and anti-
hypertensive action, according to claim 17, characterized
by the fact that in step (e) hydroxybenzotriazol (HOBT) is
30 used together with the acylating compound in the coupling of Asn and Gln, in order to prevent the formation of nitril

WO 02/074782

49

PCT/BR02/00041

of these amino acids. The final proportion of CA:CC:TBTU:HOBt:DIEA is 1:3:3:3:5.

20 - Solid-phase synthesis procedure for the vasopeptidase peptide inhibitors exhibiting vasodilating and anti-hypertensive action, according to claim 17, characterized by the fact that in step (g) ethane-1,2-dithiol (EDT) is added, such that the removal of the formyl group, which protects the side chain of this amino acid, occurs simultaneously to the cleavage in sequences containing Trp residues.

21- Solid-phase synthesis procedure for the vasopeptidase peptide inhibitors exhibiting vasodilating and anti-hypertensive action, consisting of the following steps:

- 15 a) the aminic protection group Emoc is removed from the amino acid, by treatment with 20% piperidine solution in DMF during approximately 20 minutes, thereby deprotonating the amino groups;
- 20 b) the amino acid is couple by activation with acylating agents containing diisopropylcarbodiimide (DIC) or 2- (1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tetramethylurone tetrafluorborate (TBTU), with a 3 molar excess of the Boc amino acid and the acylating agent, as compared to the amount of amino groups at the resin; the coupling reaction followed during 2 hours using the ninidrine qualitative method;
- 25 c) cleavage is performed in a medium, which is weaker acidic than HF, using 85-95% TFA (v/v), and a mixture of different suppressor types of collateral reactions is added for approximately 2 hours;
- 30 d) the peptide is precipitated in ice-cold ethyl-ether together with the resin and centrifuged at 8000 rpm for 5 minutes. The supernatant is discarded;

WO 02/074782

50

PCT/BR02/00041

- e) the residue is resuspended in ethyl-ether, vortexed and centrifuged, and the procedure are repeated 5 times; a wash and a precipitation follows;
- f) the mixture of resin and peptide is dried in vacuum, and
- 5 g) the peptide is extracted from the resin with 5% AcOH in water v/v), and
- h) the filtrate is lyophilized to obtain an amorphous white powder.

22 - Solid-phase synthesis procedure of the vasopeptidase peptide inhibitors exhibiting vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 21, characterized by the fact that in step (c) the cleavage is performed in a weaker acidic medium than HF, because the binding of the protectors of the side chains (usually of the tert-butylic type), as well as the binding of the peptide to the resin, is weaker than the one observed in the Boc chemistry.

23 - VASOPEPTIDASES PEPTIDE INHIBITORS with anti-hypertensive and vasodilating action, characterized by the following formula:

20 Group (a) showing no specificity for the C site of ACE:

<E K W A P

Group (b) showing specificity for the C site of ACE:

- I pp¹aa¹aa²aa³P⁴aa⁵aa⁶P⁷P⁸
- II pp¹aa¹aa²aa³aa⁴P⁵aa⁶aa⁷P⁸P⁹
- 25 III pp¹aa¹aa²aa³aa⁴aa⁵P⁶aa⁷aa⁸P⁹P¹⁰
- IV pp¹aa¹aa²aa³aa⁴aa⁵aa⁶P⁷aa⁸aa⁹P¹⁰P¹¹
- V pp¹aa¹aa²aa³aa⁴aa⁵aa⁶aa⁷P⁸aa⁹aa¹⁰P¹¹P¹²
- VI pp¹aa¹aa²aa³aa⁴aa⁵aa⁶aa⁷aa⁸P⁹aa¹⁰aa¹¹P¹²P¹³

where:

- 30 P is always proline. The remaining are always L-amino acids and are presented in the one-letter code (see below*).
- pp¹ is the N-terminus, and may be pyroglutamyl (<E) or a simple amino acid, usually not basic;

WO 02/074782

51

PCT/BR02/00041

- aa¹ is a non-basic amino acid, usually W, S, G or N
 aa² is a non-acid amino acid, usually P, G, W or R;
 aa³ is a non-acid amino acid, usually P, A, R or W
 aa⁴ is P for formula I, and is an amino acid, usually T,
 5 P, G, H, R, W or E for the remaining oligopeptides;
 aa⁵ is usually Q, N, P, or G for formula I;
 aa⁶ for formula II, aa⁷ for formula III, aa⁸ for formula IV,
 and aa⁹ for formula V is a non-basic amino acid, usually Q,
 N, P, or G.
 10 aa⁶ for formula I, aa⁷ for formula II, aa⁸ for formula III,
 aa⁹ for formula IV, and aa¹⁰ for formula V are always I or A
 or T.

G-glycine	N-asparagine
A-alanine	Q-glutamine
15 P-proline	D- aspartic acid
V-valine	E- glutamic acid
I-isoleucine	K-lysine
L-leucine	R-arginine
S-serine	F-phenylalanine
20 T-threonin	H-histidine
W-tryptophane	Y-tyrosine
<E- pyroglutamyl	

In which:

- The peptides described in the above Table have higher
 25 selectivity for the C-site of ACE, which is characterized
 by the K_i values between 2 nM and 100 μM, while the values
 where above 50 μM for the N-site of the ACE; these peptides
 are also inhibitors of NEP, showing K_i values between 5-150
 μM; all of them potentiate the contractile action of
 30 bradykinin on isolated guinea-pig ileum, doubling the
 contractile effect of bradykinin, when used in
 concentrations varying from 5-300 nM; the hypotensive
 effect of bradykinin was also potentiated by 30 to 80%,
 when concentrations between 10 and 700 nM were used,
 35 amplifying the duration of the hypotension between 5 and 15

WO 02/074782

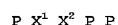
52

PCT/BR02/00041

fold, when compared to the duration of the effect of bradykinin alone.

24 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 23, characterized by the fact that D and E are acidic amino acids, K and R are basic amino acids, and F, W, and Y are aromatic amino acids.

25 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 23 (group b), characterized by the fact that they are peptides of 8 - 13 amino acids presenting a general formula, which contains the sequence motif at the carboxyl-terminus of the oligopeptide:



where X^1 can be any amino acid and X^2 usually is I, and the N-terminal amino acid is blocked, usually by <E.

26 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claims 23 and 25, characterized by the fact that they show higher selectivity for the C-site of ACE [group (b)], which are characterized by K_i values between 2 nM a 100 μ M, while the values for the N-site of ACE are above 50 μ M.

27 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claims 23 and 25, characterized by the fact that they are also inhibitors of NEP, showing K_i values between 5-150 μ M.

WO 02/074782

53

PCT/BR02/00041

28- VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claims 23 and 25, characterized by the fact that they potentiate the contractile action of bradykinin on isolated guinea-pig ileum, doubling the contractile effect of bradykinin, in concentrations between 5-300 nM.

29- VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claims 23 and 25, characterized by the fact that they potentiate the hypotensive effect of bradykinin by 30-80% in concentrations between 10-700nM, amplifying the duration of this hypotension by 5- to 15-fold when compared to the duration of the effect by bradykinin alone.

30 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claims 23 and 25, characterized by the fact that they can be conjugated to a vast variety of ligands: acid groups like sulfonyl, carboxyl, phosphoryl, or other groups like thiols and olefines, dithio, azo or diazo compounds, aldehyds or alike.

31- VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 30, characterized by the fact that they are used in systemic cardiovascular disorders, in general or localized, where microcirculation is the affected target.

32 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 31, characterized by the fact that they are used in human hypertensive disorders and their consequences.

WO 02/074782

54

PCT/BR02/00041

- 33 - VASOPEPTIDASES PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action, according to claim 32, characterized by the fact that they are used in vascular lesions and hyperplasias.
- 5 34 - VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS with vasodilation and anti-hypertensive action in obtaining pharmaceutical compounds characterized by the fact that diluted in physiogogically acceptable medium, like phosphate-saline buffer, saline solution or other more convenient carriers.
- 10 35 - Utilization of VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS in vitro and in vivo.
- 36 - Utilization of the VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS in vivo, via trans-mucosa, parenterally, or by injection, particularly intravenously for systemic action or localized
15 action in tissue microcirculation.
- 37 - Utilization of the VASOPEPTIDASE PEPTIDE INHIBITORS in vivo, in dosages varying between approximately 1 μ g to 10 mg, usually 0.5 mg/kg of body weight.

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 9/99	A 6 1 P 43/00	1 1 6
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 N 9/99	
G 0 1 N 27/447	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 27/62	G 0 1 N 27/62	L
G 0 1 N 30/34	G 0 1 N 27/62	V
G 0 1 N 30/46	G 0 1 N 30/34	E
G 0 1 N 30/48	G 0 1 N 30/46	A
G 0 1 N 30/72	G 0 1 N 30/48	G
G 0 1 N 30/88	G 0 1 N 30/72	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 30/88	J
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/60	G 0 1 N 33/566	
// C 0 7 K 1/10	G 0 1 N 33/60	A
C 0 7 K 7/06	G 0 1 N 27/26	3 1 5 F
C 0 7 K 7/08	A 6 1 K 37/02	
	C 0 7 K 1/10	
	C 0 7 K 7/06	
	C 0 7 K 7/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, S D, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ウィンドウズ

- (71) 出願人 503339546
 マーティンズ デ カマルゴ、アントニオ、カルロス
 ブラジル国 サンパウロ 0 1 4 5 3 - 0 1 0、ヤルディム ヨーロッパ、マリオ フェラッツ
 ストリート 5 5、ルーム 1 1
- (74) 代理人 100060690
 弁理士 瀧野 秀雄
- (74) 代理人 100097858
 弁理士 越智 浩史
- (72) 発明者 マーティンズ デ カマルゴ、アントニオ、カルロス
 ブラジル国 サンパウロ 0 1 4 5 3 - 0 1 0、ヤルディム ヨーロッパ、マリオ フェラッツ
 ストリート 5 5、ルーム 1 1
- (72) 発明者 カルヘタ ヴィエイラ ポルタロ、フェルナンダ
 ブラジル国 サンパウロ 0 5 5 0 3 - 9 0 0、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニュー
 1 5 0 0、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カット/セプリ”
- (72) 発明者 フェラジーニ ムーバック、アレサンドラ
 ブラジル国 サンパウロ 0 5 5 0 3 - 9 0 0、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニュー
 1 5 0 0、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カット/セプリ”
- (72) 発明者 アルベス イアンザー、ダニエル
 ブラジル国 サンパウロ 0 5 5 0 3 - 9 0 0、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニュー

- 1500、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カッタ/セプリ”
 (72)発明者 ポリセリ ファースキー、サンドラ、ヘレナ
 ブラジル国 サンパウロ 05503-900、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニユー
 1500、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カッタ/セプリ”
 (72)発明者 パルマ、マリオ、セルジオ
 ブラジル国 サンパウロ 05503-900、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニユー
 1500、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カッタ/セプリ”
 (72)発明者 ミリアン、アケミ、フルイエ、ハヤシ
 ブラジル国 サンパウロ 05503-900、ブタンタン、ヴィタル ブラジル アヴェニユー
 1500、セントロ デ トキシコロジア アプリカーダ “カッタ/セプリ”
 F ターム(参考) 2G045 BA11 BB03 CB17 CB26 DA36 FA16 FA36 FB01 FB02 FB05
 FB06 FB09 JA01
 4B024 AA01 AA11 AA20 BA80 CA04 CA09 HA14
 4B063 QA13 QQ42 QR55 QS34
 4C084 AA02 AA06 BA01 BA08 BA17 BA18 BA19 BA21 DC32 DC40
 MA55 MA56 MA66 NA14 ZA39 ZA42 ZC16 ZC17 ZC20
 4H045 AA30 BA15 BA16 CA50 DA57 EA23 FA33

专利名称(译)	分离和纯化血管肽酶抑制剂的方法		
公开(公告)号	JP2005505245A	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2002573791	申请日	2002-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	生物实验萨纽斯药物有限公司 范颂达喀尔安妮帕罗奥猿爱萨德埃斯塔德圣保罗影响APIE Essey针 马丁斯德卡马戈安东尼奥·卡洛斯		
申请(专利权)人(译)	生物实验室Sanasu制药王者LTDA Fandakao德安帕罗一个Pesukisa德斯卡德圣保罗 - 效果 - 一针-ET-Essey针 马丁斯德卡马乔, 安东尼奥·卡洛斯·		
[标]发明人	マーティンズデカマルゴアントニオカルロス カルヘタヴィエイラポルタロフェルナンダ フェラジーニムーバックアレサンドラ アルベスイアンザーダニエル ポリセリファースキーサンドラヘレナ パルママリオセルジオ ミリアンアケミフルイエハヤシ		
发明人	マーティンズ デカマルゴ、アントニオ、カルロス カルヘタ ヴィエイラ ポルタロ、フェルナンダ フェラジーニ ムーバック、アレサンドラ アルベス イアンザー、ダニエル ポリセリ ファースキー、サンドラ、ヘレナ パルマ、マリオ、セルジオ ミリアン、アケミ、フルイエ、ハヤシ		
IPC分类号	G01N27/62 A61K38/00 A61P9/08 A61P9/12 A61P43/00 B01J20/281 C07K1/10 C07K7/06 C07K7/08 C12N9/64 C12N9/99 C12N15/09 C12Q1/68 G01N27/447 G01N30/34 G01N30/46 G01N30/72 G01N30 /88 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/60 G01N30/48		
CPC分类号	C12N9/6418 A61K38/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61P9/08 A61P9/12 A61P43/00.111 A61P43/00.115 A61P43/00.116 C12N9/99 C12Q1/68.A G01N27/62.L G01N27/62.V G01N30/34.E G01N30/46.A G01N30/48.G G01N30/72.C G01N30/88.J G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/60.A G01N27/26.315.F A61K37/02 C07K1/10 C07K7 /06 C07K7/08		
F-TERM分类号	2G045/BA11 2G045/BB03 2G045/CB17 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA36 2G045 /FB01 2G045/FB02 2G045/FB05 2G045/FB06 2G045/FB09 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B063/QA13 4B063/QQ42 4B063 /QR55 4B063/QS34 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA21 4C084/DC32 4C084/DC40 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA66 4C084 /NA14 4C084/ZA39 4C084/ZA42 4C084/ZC16 4C084/ZC17 4C084/ZC20 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/CA50 4H045/DA57 4H045/EA23 4H045/FA33		
代理人(译)	泷野秀雄 越智浩		
优先权	PI0101088 2001-03-19 BR		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本发明中，蝾蛇毒腺，特别是通过Bosuropusu-Jararaca (矛头jararaca) 分泌肽的分离和纯化;核;根据由此获得的肽和在原核和真核系统的遗传工程技术制造方法中，获得的基因工程肽;通过化学合成制备所述肽，以及从该化学处理获得的肽。此外，本发明是充当其作为血管肽酶的抑制剂，从而降低全身动脉血压，为了显示局部血管舒张作用，在不同的药物组合物，不同使用通过手段获得的所述肽并通过各种方法引入生物体中。