(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 192 T2** 2008.02.14

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 176 870 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 192.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/11564**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 928 576.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/065028**
(86) PCT-Anmeldetag: **26.04.2000**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **02.11.2000**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.02.2002**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.02.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A01N 37/18*** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
C07K 4/00 (2006.01)
C07K 5/00 (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

299473	**26.04.1999**	**US**
459813	**13.12.1999**	**US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Applied Protein Sciences, LLC, Mountain View, Calif., US

(74) Vertreter:
Vossius & Partner, 81675 München

(72) Erfinder:
TWARDZIK, Daniel R., Bainbridge Island, WA 98110, US; PASKELL, Stefan, Bainbridge Island, WA 98110, US; FELKER, Thomas S., Vashon, WA 98070, US

(54) Bezeichnung: **TGF-ALPHA POLYPEPTIDE, FUNKTIONELLE FRAGMENTE UND VERFAHREN ZU IHRER ANWENDUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung eines Peptids, das eine Schlaufen-Peptidregion des transformierenden Wachstumsfaktor-alpha darstellt, für die Erzeugung eines Arzneimittels für die Behandlung von verschiedenen Krankheiten.

[0002] Behandlungen von mehreren Krankheiten, insbesondere im CNS, im Immunsystem und im Magen-Darm-Trakt, könnten erheblich davon profitieren, dass sich Zellen nach Verletzung oder Läsionenbildung regenerieren. In manchen Fällen beeinflusst eine spezielle Behandlung einer Krankheit die zu behandelnde Testperson oft nachteilig. Zum Beispiel resultiert die Verabreichung von chemotherapeutischen Mitteln an Individuen in einer Zerstörung von gesunden Zellen, zum Beispiel Zellen des Magen-Darm-Traktes. Etliche Behandlungs-bedingte Erkrankungen stehen mit der Wahl eines chemotherapeutischen Mittels in Zusammenhang. Solche Mittel umfassen Carmustin (BCNU), Chlorambucil (Leukeran), Cisplatin (Platinol), Cytarabin, Doxorubicin (Adriamycin), Fluoruracil (5-FU), Methoxetrat (Mexat), Taxol, CPT111, Etoposid und Plicamycin (Mithracin), welche für ihr direktes stomatotoxisches Potential (Sonis, 1993, „Oral Complications in Cancer Therapy," In: Principles and Practice of Oncology, Seiten 2385-2394, De Vitta et al., Hrsg. J.B. Lippincott, Philadelphia) und daher für das Eintreten von Mukositis bekannt sind.

[0003] Orale Mukositis kann durch die cytotoxischen Effekte von Chemotherapie und/oder Strahlentherapie auf die sich rasch teilenden Epithelzellen der Mund- und Rachenschleimhaut ausgelöst werden und wird durch Infektion mit sowohl endogener oraler Flora als auch durch opportunistische, bakterielle und Pilz-Phatogene verschlimmert. Komplikationen im Zusammenhang mit oraler Mukositis variieren in den verschiedenen betroffenen Patientenpopulationen, umfassen aber üblicherweise Schmerz, schlechte Nahrungsaufnahme mit folgender Dehydratisierung und Gewichtsverlust und systemische Infektion mit Organismen, die aus der Mundhöhle stammen. Die mit der oralen Mukositis in Zusammenhang stehenden Schmerzen können stark sein und schmerzlindernde Betäubungsmittel benötigen und die Essschwierigkeiten können dazu führen, dass Patienten vollständig parenterale Nahrung erhalten.

[0004] Derzeitige Therapien sind auf die Verminderung der Mundflora und das Ausmaß der Infektion von Mundulzerationen gerichtet. Es ist gezeigt worden, dass systemische Behandlung mit G- und GM-CSF in einem verminderten Vorkommen von oraler Mukositis resultiert, wahrscheinlich weil eine schnellere Neutrophilen-Belebung ermöglicht wird, und daher eine verbesserte Fähigkeit die Infektion zu bekämpfen, obwohl postuliert wurde, dass die CSFs eine direktere Wirkung auf die Mundschleimhaut haben können (Chi et al., 1995, J. Clin. Oncol. 13:2620-2628). In einer Studie wurde berichtet, dass GM-CSF Mukositis verschlimmert (Cartee et al., 1994, Cytokine 7:471-477). Benzydamin-Hydrochlorid, ein nicht-steroidales Arzneimittel mit schmerzstillenden und anti-mikrobiellen Eigenschaften, ist sowohl in Patienten untersucht worden, die eine Strahlentherapie durchmachen, sowie in Patienten, die intra-arterielle Chemotherapie erhielten.

[0005] Außerdem erhöhen Erkrankungen, die mit der Verarmung an Epithelzellen im Magen-Darm-Trakt im Zusammenhang stehen, oft das Risiko für verwandte Krankheiten. Solche verwandten Krankheiten umfassen die Infektion durch opportunistische Pathogene sowie auch Gewichtsverlust, der mit dem Verlust von Nahrungsaufnahme im Magen-Darm-Trakt in Zusammenhang steht. EP 0 253 325 offenbart mit Oncogenen in Verbindung stehende Peptide, d.h. ein Peptid, das aus den Resten 33 bis 50 von TGFα besteht, und ihre Verwendung für die Immunisierung.

[0006] US 4,686,283 offenbart modifizierte Fragmente von TGFα und ihre Verwendung in der Diagnose und Therapie.

[0007] US 5,240,912 offenbart Oligopeptide, die aus dem TGFα-Polypeptid stammen, d.h. ein Peptid, das aus den Resten 34 bis 50 von TGFα besteht, und ihre Verwendung in Arzneimitteln.

[0008] Die vorliegende Erfindung basiert auf der bahnbrechenden Entdeckung, dass TGFα und funktionelle TGF-α-Peptide für die Behandlung oder Vorbeugung von Gewichtsverlust in Individuen wirkungsvoll sind, die mit Gewichtsverlust in Zusammenhang stehende Funktionsstörungen oder Krankheiten aufweisen (z.B. Cachexia). Außerdem weist das Polypeptid der Erfindung mitogene und Barrierefunktions-(z.B. Schutz)-Wirkung auf Stammzellen und ihre differenzierten Abkommen aus einer Vielzahl von Geweben einschließlich des Verdauungssystems, Nervensystems und hämatopoetischen Systems auf.

[0009] Die Erfindung stellt die Verwendung eines Peptids, bestehend aus den Aminosäuren 33-50 von SEQ ID NO: 1, die eine Schleifen-Peptidregion von TGFα darstellen, bereit.

zur Behandlung oder Vorbeugung von Mukositis des Magen-Darm-Traktes, die das Resultat einer cytotoxischen oder immunsuppremierenden Therapie ist,
zur Behandlung einer entzündlichen Darmkrankheit, von Colitis oder Crohn's Krankheit des Magen-Darm-Traktes,
zur Behandlung oder Vorbeugung einer entzündlichen Reaktion einer Autoimmunerkrankung,
zur Behandlung einer neurodegenerativen Erkrankung oder zur Behandlung einer CNS-Erkrankung oder -Funktionsstörung, wobei die CNS-Erkrankung oder Funktionsstörung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus CNS-Ischämie, -Rückenmarksverletzung, multiple Sklerose und Netzhautverletzung, oder
zur Verstärkung der Blutbildung (Hämatopoese) während einer cytotoxischen oder immunsupprimierenden Therapie bereit, wobei das Arzneimittel gegebenenfalls ferner einen zweiten hämatopoetischen Wachstumsfaktor umfasst, um mehr reife hämatopoetische Vorläuferzellen zu stimulieren, wobei der zweite hämatopoetische Wachstumsfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF (Granulocyten-koloniestimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor).

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0010] Fig. 1 zeigt die Struktur des Ratten-TGFα-Polypeptid und seine 50 Aminosäuren, die in drei Schleifen angeordnet sind (SEQ ID NO: 2). Die menschliche TGFα-Sequenz wird in SEQ ID NO: 1 mit einer ähnlichen Tertiärstruktur und einer engen Sequenzhomologie bereitgestellt.

[0011] Fig. 2 zeigt eine graphische Darstellung, welche die biologische TGFα-Aktivität der drei Schleifen-Peptidregionen von TGFα (siehe Fig. 1) vergleicht, wobei Schleife A die Aminosäuren 1-21 darstellt (beginnend am N-Terminus), Schleife B die Aminosäuren 16 bis 32 darstellt und Schleife C die Aminosäuren 33 bis 50 darstellt. Nur Schleife C zeigt erhebliche TGFα-Aktivität, wie durch Zellproliferation und in einer Dosis-Reaktionsweise bestimmt wird.

[0012] Fig. 3 zeigt eine graphische Darstellung von Maus-Milzgewichten, die mit Cis-Platin (CP) entweder zu 5 µg/g oder 10 µg/g und mit TGFα bei Konzentrationen von 10 ng/g oder 50 ng/g behandelt wurden. Diese Daten zeigen, dass TGFα-Behandlung, trotz der CP-Behandlung, die Milzgewichte erheblich verminderte, eine Wiederkehr zu normalen Milzgewichten verursachte.

[0013] Fig. 4 stellt eine Zusammenfassung von histologischen Daten dar, wobei die durchschnittliche Kryptenhöhe der drei Mäusegruppen gemessen wurde. TGFα 57-Behandlung (50 ng/g) war in der Lage, den Kryptenhöhenverlust durch CP-Behandlung mehr als wiederherzustellen.

[0014] Fig. 5 zeigt eine graphische Darstellung, welche die Wirkungen von Cisplatin allein, Cisplatin und einem TGFα-Polypeptid und einem TGFα alleine auf den Gewichtsverlust von Mäusen darstellt.

[0015] Fig. 6 zeigt den Gewichtsverlust in Mäusen, welcher der Cisplatin-Verabreichung mit oder ohne gleichzeitige TGFα-Behandlung folgt. Die Graphik zeigt (von links nach rechts) die Anteile an Gewichtsverlust in der Anwesenheit von PBS alleine, TGF-α allein, Cisplatin alleine und Cisplatin + TGF-α.

[0016] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung einer Schlaufen-Peptidregion von TGF-α bereit, welche die Sequenz der Aminosäuren 33-50 von SEQ ID NO: 1 aufweist, für die Erzeugung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung von etlichen Krankheiten und Funktionsstörungen bereit.

Transformierender Wachstumsfaktor-α

[0017] TGF-α ist ein Mitglied der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Familie und interagiert mit einem oder mehreren Rezeptoren der EGF-Rezeptorfamilien. TGF-α stimuliert die endogene Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors, was in der Aktivierung von verschiedenen zellulären Funktionen resultiert, wie zum Beispiel der Stimulierung einer mitogenen oder Migrationsreaktion in einer großen Vielzahl an Zelltypen. TGF-α- und EGF-mRNAs erreichen ihre höchsten Mengen und relative Abundanz (verglichen mit der Gesamt-RNA) in der frühen postnatalen Periode und verringern sich danach, was auf eine Rolle in der embryonalen Entwicklung hindeutet. Von einer histologischen Perspektive aus gesehen wird TGF-α in zahlreichen Zelltypen und Geweben im ganzen Körper festgestellt. Die aktive Form von TGF-α stammt aus einem größeren 30-35 kD-Vorläufer und enthält 50 Aminosäuren. Menschlicher TGF-α teilt nur eine 30% strukturelle Homologie mit der 53-Aminosäurenform von EGF, umfasst aber die Konservierung von und die Abstände zwischen allen sechs Cysteinresten. TGF-α ist durch die Arten hoch konserviert. Zum Beispiel teilen die Ratten- und menschlichen Polypeptide

etwa 90% Homologie verglichen mit einer 70% Homologie, wie sie zwischen Ratten- und menschlichem EGF-Polypeptid besteht. Die Aminosäuresequenz von menschlichem TGFα wird in SEQ ID NO: 1 gezeigt. TGFα teilt die Cystein-Disulfidbrückenstrukturen mit einer Familie von Proteinen, einschließlich des Vaccinia-Wachstumsfaktors, Amphiregulin-Vorläufers, Betacellulin-Vorläufers, Heparin-bindenden EGF-ähnlichem Wachstumsfaktors, Epiregulins (nur Nager), HUS 19878, Myxomavirus-Wachstumsfaktors (MGF), Shope-Fibromavirus-Wachstumsfaktors (SFGF) und Schwannoma-abgeleitetem Wachstumsfaktors. Solche mit TGF-α verwandten Polypeptide sind in den Verfahren der Erfindung nützlich.

[0018] TGF-α ist ein säure- und ein hitzestabiles Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 5,6 kDa. Es wird als ein größeres, glycosyliertes und membrangebundenes Vorläuferprotein von 30-35 kDa Molekulargewicht synthetisiert, wobei die lösliche, aktive 5,6 kDa-Form nach spezifischer Spaltung durch eine Elastase-ähnliche Protease freigesetzt wird. TGF-α bindet im nanomolaren Bereich mit hoher Affinität und induziert Autophosphorylierung von einem oder mehreren Mitgliedern der EGF-Rezeptorfamilie (z.B. ErbB1 bis 4), um anschließende Signalwege mit den EGF-Rezeptoren zu transduzieren. TGF-α ist 50 Aminosäuren lang und hat drei Disulfidbrücken, um seine tertiäre Konfiguration zu bilden. Alle drei Disulfidbrücken werden für die Aktivität benötigt. TGF-α wird in einer Vorläuferform in Alpha-Körnchen von einigen sekretorischen Zellen gelagert. Darüber hinaus ist die primäre Aminosäuresequenz unter verschiedenen untersuchten Spezies hoch konserviert, wie zum Beispiel 92% Homologie auf dem Aminosäureniveau zwischen Menschen und Ratten-TGF-α-Polypeptiden.

[0019] Menschliches TGF-α ist ein Polypeptid von 50 Aminosäuren. Die entsprechende Rattensequenz wird in **Fig. 1** gezeigt. Das menschliche oder Ratten-TGF-α-Polypeptid kann grob in drei Schlaufenregionen eingeteilt werden, die grob (beginnend am N-Terminus) den Aminosäuren 1-21, den Aminosäuren 16-32 und den Aminosäuren 33-50 entsprechen. Wie nachstehend genauer besprochen, stellt die Erfindung ein funktionelles Fragment von TGF-α bereit, das die biologische Aktivität von TGF-α beibehält. „Funktionelles Fragment", wie es hierin verwendet wird, bedeutet ein TGF-α-Peptid, das ein Fragment oder ein modifiziertes Fragment eines Volllängen-TGF-α-Polypeptids oder verwandten Polypeptids ist, solange das Fragment etwas TGF-α-verwandte biologische Aktivität beibehält (z.B. mit einem EGF-Familienrezeptor interagiert, die Proliferation oder Migration von Stammzellen stimuliert, die zur Behandlung oder Vorbeugung von Cachexia nützlich sind). Andere biologische Aktivitäten, die mit dem Polypeptid der Erfindung in Zusammenhang stehen, umfassen zum Beispiel mitogene Effekte auf Stammzellen und ihre differenzierteren Nachkommen von verschiedenen Geweben (z.B. Epithel-Stammzellen, hämatopoetische-Stammzellen, neurale Stammzellen, Leberstammzellen, Keratinocyten-Stammzellen und aus der Bauchspeicheldrüse stammenden Stammzellen).

[0020] Das Schleimhautepithel des Darms liegt in einem fortwährenden dynamischen Stadium vor, das als „Epithelerneuerung" bekannt ist, in welcher sich undifferenzierte Stammzellen aus einer proliferativen Kryptenzone teilen, differenzieren und an die luminale Oberfläche wandern. Wenn sie einmal endgültig differenziert sind, lösen sich Schleimhaut-Epithelzellen von den Spitzen der Zotten (Villi) ab. Der Umsatz der Krypten-Villus-Zellpopulation ist rasch und findet alle 24-72 Stunden. Der kontinuierlichen Abblätterung der Zellen an der Zotten-Spitze wird durch die andauernde Proliferation in der Krypte entgegengewirkt, sodass die reine Darmepithelmasse relativ konstant bleibt. Das rasch proliferierende Epithel des Magen-Darm-Traktes ist auf cytotoxische Arzneistoffe, die in der Krebs-Chemotherapie häufig verwendet werden, sehr empfindlich. Mit „Magen-Darm-Trakt" werden zum Beispiel die Gewebe des Mundes, Ösophagus, Magens, Dünndarms, Dickdarms, Mastdarms und Darmausgangs, gemeint. Diese „Nebenwirkung" vermindert die tolerierte Dosis solcher Arzneistoffe, da sie einen Zusammenbruch der GI-Barrierefunktion verursachen und einen septischen Zustand in einem Patienten, der schon abwehrgeschwächt ist, auswirken kann. Das kann auch zu lebensbedrohender Blutung führen. Es besteht daher im Fachgebiet ein Bedarf für die Entwicklung von Produkten und Verabreichungssystemen, welche die Reparatur und Erneuerung des Schleimhautepithels im Magen-Darm-Trakt stimulieren, um für Individuen einen Vorteil bereitzustellen, die zum Beispiel Gewichtsverlust-Störungen, die mit Chemotherapie und Strahlentherapie für Krebs in Zusammenhang stehen, sowie für Funktionsstörungen oder Krankheiten aufweisen, die mit Pathogenen wie zum Beispiel HIV in Zusammenhang stehen.

[0021] Demgemäß stellt die Erfindung die Verwendung einer Peptidregion von TGFα bereit, wobei die biologische TGF-α-Aktivität beibehalten wird, welche als pharmakologische und therapeutische Mittel nützlich sind.

[0022] Die Erfindung stellt daher die Verwendung des Peptids der Erfindung für die Erzeugung eines Arzneimittels bereit, um die Hämatopoese in Individuen zu stimulieren, die eine cytotoxische Krebs-Chemotherapie durchmachen, und um als ein zellschützendes Mittel und in den Behandlungen von Individuen zu wirken, die in Gefahr, sind Gewichtsverlusterkrankungen zu entwickeln, die mit cytotoxischer Krebs-Therapie in Zusammenhang stehen, oder die solche Gewichtsverlusterkrankungen aufweisen. Solche Krankheiten umfassen

zum Beispiel Magen-Darm(GI)-Mukositis, die ein Ergebnis der cytotoxischen Therapie sein kann. Während man nicht an eine bestimmte Theorie gebunden sein möchte, wird angenommen, dass TGF-α, durch seine mitogene Aktivität auf epitheliale GI-Stammzellen GI-Mukositis teilweise erleichtern kann.

[0023] TGFα wurde ausführlich untersucht und es wurde vor kurzem festgestellt, dass er nützlich für die Behandlung von Individuen mit neurologischen Defiziten ist. Von diesem Mechanismus wird angenommen, dass er die Proliferation und Migration von Stammzellen aus neuralem Ursprung zu jenen Stellen oder Läsionen bei einem Defizit stimuliert. Zum Beispiel ist Parkinson Krankheit durch Ruhetremor, Rigidität, Unfähigkeit Bewegung zu initiieren (Akinesia) und Langsamkeit der Bewegung (Bradykinesie) gekennzeichnet. Die motorischen Defizite stehen mit progressiver Degeneration der dopaminergen Innervation zum Nucleus accumbens und der Degeneration von noradrenergen Zellen des Locus ceruleus und serotonergen Neuronen der Raphe im Zusammenhang. Bis zu 80% der nigralen Dopaminneuronen können verloren gehen, bevor sich erhebliche motorische Defizite offenbaren. Von TGF-α wurde, wenn es in Rattenhirne infundiert wurde, gezeigt, dass es für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen nützlich ist. Intracerebroventriculare (ICV) oder intrastriatale Infusionen von TGFα induzierten neuronale Stammzellproliferation, aber degenerierende oder verletzte oder andere abnorme Zellen mussten vorhanden sein, um die Migration der neuronalen Stammzellen zu einer verletzten Stelle in einem Ausmaß, das für eine Genesung von einem damit in Zusammenhang stehenden Defizit ausreichend ist, zu erleichtern. Neuronale Stammzellen des Vorderhirns, die zu migrierenden Vorläuferzellen führen, welche die Behandlung und Genesung von einer neurologischen Defiziterkrankung beeinflussen, sind die migrierenden Zellen, welche die behandlungsbedingte Genesung von einer neuralen Defizit-Funktionsstörung (z.B. Parkinson Krankheit, Huntington Krankheit, Alzheimer Krankheit und ähnliches) beeinflussen.

[0024] Neurale Stammzellen sind im Subependym im gesamten erwachsenen Nager-CNS (Ray et al. Soc. Neurosci. 22:394.5, 1996) und im Subependyma des erwachsenen menschlichen Vorderhirns (Kirschenbaum et al., Cerebral Cortex 4:576-589, 1994) gefunden worden. Die Entdeckung, dass TGF-α die Proliferation von neuralen Stammzellen stimuliert und die Migration zu einer verletzten Stelle oder einem Defizit stimuliert, hat somit zu seiner Untersuchung für die Behandlung von neundegenerativen Funktionsstörungen (Alzheimer Krankheit, Huntington Krankheit und Parkinson Krankheit) oder traumatischen Verletzungen des CNS (z.B. Verletzung des Rückenmarks), demyelinierender Erkrankung, entzündlichen Erkrankungen des CNS, Autoimmunerkrankungen des CNS (z.B. Multiple Sklerose) und ischämischen Erkrankungen des CNS (z.B. Schlaganfall oder Gehirnattacke) geführt.

[0025] Eine CNS-Stammzelle hat das Potential, in Neuronen und Astrocyten zu differenzieren sowie auch zur Selbstreplikation und daher zur Selbsterneuerung. Sowohl neuronale als auch Gliazellen stammen aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Im CNS von Vertebraten sind pluripotente Zellen in vitro und in vivo identifiziert worden. Bestimmte Mitogene wie zum Beispiel TGF-α können die Proliferation von pluripotenten CNS-Zellen in vitro verursachen. Es ist daher möglich, solche Zellen von einem Individuum zu ernten, sie ex vivo zu behandeln um die Proliferation in Kultur zu stimulieren, und dann die Zellen wieder an das Individuum zu verabreichen. Immunhistochemische Analyse im menschlichen Gehirn unterstützt die Annahme, dass TGF-α und sein 35 kDa-Vorläufer in Neuronen und Gliazellen sowohl während der Entwicklung als auch während des Erwachsenseins weit verbreitet sind. In TGF-α-Knock-out-Mäusen, die genetisch verändert wurden, damit sie keine Expression von funktionsfähigem TGF-α aufweisen, gab es eine Abnahme der Proliferation von neuralen Vorläuferzellen im Vorderhirn-Subependym, was den Beweis erbracht hat, dass TGF-α ein proliferativer Faktor von neuralen Vorläuferzellen ist.

[0026] TGF-α wird hauptsächlich in verschiedenen Neuronen des CNS während der Entwicklung und im erwachsenen Gehirn im cerebralen Neocortex, Hippocampus und Striatum festgestellt. Es wird auch in Gliazellen festgestellt, hauptsächlich in cerebralen und cerebellaren Kortexgebieten. Northern-Blot-Analysen zeigten, dass TGF-α, aber nicht EGF (epidermaler Wachstumsfaktor) der häufigste Ligand ist, der an eine oder mehrere der EGF-Rezeptorfamilien im Gehirn bindet. TGF-α-mRNA-Mengen waren 15-170-mal höher als EGF im Cerebellum und im cerebralen Cortex. TGF-α tritt auch Keimzentren des Gehirns während der Neurogenese und Gliogenese im sich entwickelnden Gehirn auf. Im Mittelhirn überlappt die Verteilung von TGF-α mit Tyrosin-Hydroxylase-mRNA und fötalen dopaminergen Neuronen. In Kultur hat TGF-α das Überleben von Neuriten-Auswuchs von neonatalen dorsalen Ratten-Ganglionneuronen (EGF hat nicht) und das Überleben und die Differenzierung von CNS-Neuronen verstärkt. TGF-α induzierte die Proliferation von neuralen Vorläuferzellen im embryonalen murinen Mesencephalon und induzierte ferner eine wesentliche Erhöhung in der Zahl von Astroglia und Mikroglia in fötalen medialen Ratten-Septalzellen. TGF-α erhöhte die Glutaminsäure-Decarboxylaseaktivität und verminderte Cholin-Acetyltransferase-Aktivität. TGF-α hat daher als ein allgemeiner neuronaler Überlebensfaktor gewirkt, der sowohl cholinerge als auch GABAerge Neuronen beeinflusste. Außerdem ist TGF-α ein Mitogen für pluripotente Hirn-Stammzellen. Vorderhirn-Subependym enthält Nestinpositive neurale

Stammzellen und ihre Nachkommen, die konstitutiv proliferierende Epithelzellenvorläufer sind. Eine „Knockout"-Maus, die gentechnologisch erzeugt wurde, um das Gen für TGF-α zu entfernen, zeigte eine Reduktion in neuronalen Vorläuferzellen im Subependym und eine Reduktion der neuronalen Vorläufer, die zum Riechkolben wandern. In vitro unterstützte TGF-α die Aufnahme von Dopamin in dopaminerge Neuronen von Rattenföten in einer Dosis-abhängigen und Zeitabhängigen Weise. TGF-α unterstützte selektiv das Überleben von dopaminergen Zellen, erhöhte die Neuritenlänge, Verzweigungszahl und die Somagebiete von Tyrosin-Hydroxylase immunpositiven Zellen. Die Mengen an TGF-α waren in ventrikulärer cerebrospinaler Flüssigkeit bei juvenilem Parkinsonismus und der Parkinson Krankheit erhöht und können eine kompensatorische Reaktion auf die Neurodegeneration darstellen. Ferner hat TGF-α eine striatale neronale Degeneration in einem Tiermodell der Huntington Krankheit verhindert.

Nucleinsäuren und Vektoren

[0027] Polynucleotide oder Nucleinsäuresequenzen beziehen sich auf eine polymere Form von Nucleotiden. In manchen Fällen bezieht sich ein Polynucleotid auf eine Sequenz, die nicht an eine der codierende unmittelbar Sequenzen angrenzen, an die sie (eine am 5'-Ende und eine am 3'-Ende) im natürlich vorkommenden Genom des Organismus unmittelbar angrenzen, von welchem es stammt. Der Begriff umfasst daher zum Beispiel eine rekombinante DNA, die in einen Vektor; in ein autonom replizierendes Plasmid oder Virus; oder in die genomische DNA eines Prokaryonten oder Eukaryonten eingebaut ist oder die als ein separates Molekül (z.B. eine cDNA) unabhängig von anderen Sequenzen besteht. Die Nucleotide können Ribonucleotide, Desoxyribonucleotide oder modifizierte Formen von einem dieser Nucleotide sein. Außerdem kann die bei der Herstellung einer Polypeptidkette beteiligte Polynucleotidsequenz Regionen, die der codierenden Region vorausgehen oder ihr folgen (Leader und Trailer), sowie intervenierende Sequenzen (Introns) zwischen einzelnen codierenden Segmenten (Exons), abhängig von der Quelle der Polynucleotidsequenz umfassen.

[0028] Der Begriff Polynucleotid(e) bezieht sich im Allgemeinen auf jedes Polyribonucleotid oder Polydesoxyribonucleotid, das eine nicht-modifizierte RNA oder DNA oder eine modifizierte RNA oder DNA sein kann. Zum Beispiel beziehen sich hierin verwendete Polynucleotide unter anderem auf einzel- und doppelsträngige DNA, DNA, die ein Gemisch aus einzel- und doppelsträngigen Regionen ist, einzel- und doppelsträngiger RNA und RNA, die ein Gemisch aus einzel- und doppelsträngige Regionen ist, Hybridmoleküle, umfassend DNA und RNA, die einzelsträngig oder überlichererweise doppelsträngig oder ein Gemisch aus einzel- und doppelsträngigen Regionen sein können.

[0029] Außerdem können die Polynucleotide oder Nucleinsäuresequenzen ein oder mehrere modifizierte Basen enthalten. DNAs oder RNAs mit Rückgraten, die zur Stabilität oder aus anderen Gründen modifiziert sind, sind „Polynucleotide", so wie dieser Begriff hierin gedacht ist. Darüber hinaus sind DNAs oder RNAs, die ungewöhnliche Basen wie zum Beispiel Inosin, oder modifizierte Basen wie zum Beispiel tritiummarkierte Basen, um nur zwei Beispiel zu nennen, umfassen Polynucleotide, wie der Begriff hierin verwendet wird.

[0030] Nucleinsäuresequenzen, die ein Fusionsprotein codieren (z.B. ein TGF-α-Polypeptid und ein anders Polypeptid wie zum Beispiel eine Zielsequenz) können erzeugt werden und können funktionell mit Expressions-Kontrollsequenzen verbunden werden. „Funktionell verbunden" bezieht sich auf ein Nebeneinanderstellen, wobei die so beschriebenen Komponenten in einer Beziehung stehen, die ihnen erlaubt, in ihrer bestimmungsgemäßen Weise zu funktionieren. Zum Beispiel ist eine codierende Sequenz mit einer anderen Codierungssequenz „funktionell verbunden", wenn RNA-Polymerase die beiden Codierungssequenzen in eine einzelne mRNA transkribiert, die dann in ein einzelnes Polypeptid translatiert wird, das Aminosäuren aufweist, die aus beiden Codierungsequenzen stammen. Die Codierungssequenzen müssen nicht aneinander angrenzend sein, solange die exprimierten Sequenzen letztendlich prozessiert werden, um das gewünschte Protein zu erzeugen. Eine Expressions-Kontrollsequenz, die mit einer Codierungsequenz funktionell verbunden ist, wird so ligiert, dass die Expression der Codierungsequenz unter Bedingungen erzielt wird, die mit den Expressions-Kontrollsequenzen kompatibel sind. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Expressions-Kontrollsequenzen" auf Nucleinsäuresequenzen, welche die Expression einer Nucleinsäuresequenz regulieren, mit der sie funktionell verbunden sind. Expressions-Kontrollsequenzen werden mit einer Nucleinsäuresequenz funktionell verbunden, wenn die Expressions-Kontrollsequenzen die Transkription und wo angebracht die Translation der Nucleinsäuresequenz kontrollieren und regulieren. Die Expressions-Kontrollsequenzen können daher geeignete Promotoren, Enhancer, Transkriptions-Terminatoren, ein Startcodon (d.h. ATG) vor einem Protein-codierenden Gen, Spleiß-Signale von Introns, die Beibehaltung des korrekten Leserahmens des Gens, um korrekte Translation der mRNA zu erlauben, und Stopp-Codons umfassen. Der Begriff „Kontrollsequenzen" soll mindestens Komponenten umfassen, deren Anwesenheit die Expression beeinflussen kann, und kann auch zusätzliche Komponenten umfassen, deren Anwesenheit vorteilhaft ist, zum Beispiel Leadersequenzen

und Fusionspartnersequenzen. Expressionskontrollsequenzen können einen Promotor umfassen.

[0031] Mit „Promotor" wird eine minimale Sequenz gemeint, die für die direkte Transkription ausreichend ist. Auch einbezogen sind jene Promotorelemente, die ausreichend sind, um Promotor-abhängige Genexpression für Zelltyp-spezifische, Gewebe-spezifische Signale oder Mittel kontrollierbar zu machen oder durch externe Signale oder Mittel induzierbar zu machen; solche Elemente können in den 5' oder 3'-Regionen der Polynucleotidsequenz liegen. Wenn in bakteriellen Systemen cloniert wird, können induzierbare Promotoren wie zum Beispiel pL des Bakteriophagen, plac, ptrp, ptac (ptrp-lac-Hybridpromotor) und ähnliches verwendet werden. Wenn in Säuger-Zellsystemen cloniert wird, können Promotoren verwendet werden, die aus dem Genom von Säugerzellen (z.B. Metallothionein-Promotor) oder von Säugerviren (z.B. die lange terminale Wiederholung des Retrovirus; der späte Adenoviruspromotor; der 7,5K-Vacciniaviruspromotor) stammen. Promotoren, die durch rekombinante DNA oder synthetische Techniken erzeugt werden, können auch verwendet werden, um für die Transkription der Nucleinsäuresequenzen zu sorgen.

[0032] Eine Nucleinsäuresequenz, umfassend zum Beispiel ein Polynucleotid, das ein Fusionsprotein codiert, kann in einen rekombinanten Expressionsvektor inseriert werden. Ein rekombinanter Expressionsvektor bezieht sich im Allgemeinen auf ein Plasmid, Virus oder anderes im Fachgebiet bekanntes Vehikel, das durch Insertion oder Einführen von Nucleinsäuresequenzen manipuliert worden ist. Zum Beispiel umfasst ein rekombinanter Expressionsvektor eine Polynucleotidsequenz, die ein TGF-α-Polypeptid, das eine Sequenz aufweist, wie sie in SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 oder 6 dargelegt ist, oder ein Fragment davon (wie nachstehend genauer beschrieben) codiert.

[0033] Der Expressionsvektor enthält üblicherweise einen Replikationsursprung, einen Promotor sowie spezifische Gene, welche die phänotypische Selektion der transformierten Zellen ermöglichen. Geeignete Vektoren umfassen, sind aber nicht beschränkt auf den auf T7-basierenden Expressionsvektor zur Expression in Bakterien (Rosenberg, et al., Gene 56:125, 1987), den pMSXND-Expressionsvektor zur Expression in Säugerzellen (Lee und Nathans, J. Biol. Chem. 263:3521, 1988), vom Baculovirus abstammende Vektoren zur Expression in Insektenzellen, Blumenkohl-Mosaik-Virus, CaMV; Tabak-Mosaik-Virus, TMV. Die Nucleinsäuresequenzen können auch eine Lokalisierungssequenz umfassen, um den Indikator durch Fusion an geeignete Organellen-Zielsignale oder lokalisierte Wirtsproteine zu bestimmten zellulären Stellen zu dirigieren. Zum Beispiel kann ein Polynucleotid, das eine Lokalisierungssequenz oder eine Signalsequenz codiert, als ein Repressor verwendet werden und daher an den 5'-Terminus eines Polynucleotids ligiert oder fusioniert werden, der ein Polypeptid oder ein Polypeptidfragment so codiert, dass das Lokalisierungs- oder Signalpeptid am aminoterminalen Ende eines daraus resultierenden Polypeptids liegt. Die Konstruktion von Expressionsvektoren und die Expression von Genen in transfizierten Zellen umfassen die Verwendung von molekularen Clonierungstechniken, die im Fachgebiet auch gut bekannt sind. (Siehe zum Beispiel Sambrook et al., Molecular Cloning – A Laborstory Manual, Cold Spring Harbor Laborstory, Cold Spring Harbor, NY, 1989 und Current Protocols in Molecular Biology, M. Ausubel et al., Hrsg. (Current Protocols, ein Gemeinschaftsunternehmen zwischen Greene Publishing Associates, Inc. und John Wiley & Sons, Inc., neueste Ergänzung)). Diese Verfahren umfassen rekombinate in vitro-DNA-Techniken, synthetische Techniken und in vivo Rekombination/genetische Rekombination. (Siehe auch Maniatis, et al., Molecular Cloning A Laborstory Manual, Cold Spring Harbor Laborstory, N.Y., 1989).

[0034] In Hefe können etliche Vektoren verwendet werden, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten. Für eine Zusammenfassung siehe Current Protocols in Molecular Biology, Bd. 2, Hrg. Ausubel, et al., Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Kap. 13, 1988; Grant, et al., „Expression and Secretion Vectors for Yeast," in Methods in Enzymology, Hrsg. Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y. Bd. 153, Seiten 516-544, 1987; Glover, DNA Cloning, Bd. II, IRL Press, Wash., D.C., Kap. 3, 1986; und Bitter, "Heterologous Gene Expression in Yeast", Methods in Enzymology, Hrsg. Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y., Bd. 152, Seiten 673-684, 1987; und The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Hrsg. Strathern et al., Cold Spring Harbor Press, Bd. I und II, 1982. Ein konstitutiver Hefepromotor wie zum Beispiel ADH oder LEU2 oder ein induzierbarer Promotor wie zum Beispiel GAL kann verwendet werden ("Clonierung in Hefe", Kap. 3, R. Rothstein In: DNA Cloning B. 11, A Practical Approach, Hrg. DM Glover, IRL Press, Wash., D.C., 1986). Alternativ können Vektoren verwendet werden, welche die Integration von fremden DNA-Sequenzen in das Hefe-Chromosom fördern.

[0035] Ein alternatives Expressionssystem, das verwendet werden könnte, um das funktionelle Fragment des TGF-α-Polypeptids der Erfindung zu exprimieren, ist in ein Insektensystem. In einem solchen System wird Kernpolyedervirus von Autographs californica (AcNPV) als ein Vektor verwendet, um fremde DNA oder mutierte Polynucleotidsequenzen zu exprimieren. Das Virus wächst in Spodoptera frugiperda-Zellen. Die Sequenz,

die das Polypeptid der Erfindung codiert, kann in nicht-essentielle Regionen (zum Beispiel das Polyhedringen) des Virus cloniert werden und unter die Kontrolle eines AcNPV-Promotors gestellt werden (zum Beispiel des Polyhedrinpromotors). Erfolgreiche Insertion der Sequenzen, die das Polypeptid der Erfindung codieren, wird in einer Inaktivierung des Polyhedringens und der Produktion von nicht eingeschlossenem rekombinantem Virus resultieren (d.h. Virus, dem die proteinöse Hülle fehlt, die durch das Polyhedringen codiert wird). Diese rekombinanten Viren werden dann verwendet, um S. frugiperda-Zellen zu infizieren, in welchen das inserierte Gen exprimiert wird, siehe Smith, et al., J. Virol. 46:584, 1983; Smith, U,S, Patent Nr. 4,215,051.

[0036] Die Vektoren können verwendet werden, um eine Wirtszelle zu transformieren. Mit Transformieren oder Transformation ist eine permanente oder transiente genetische Veränderung gemeint, die in einer Zelle nach dem Einführen von neuer DNA (d.h. DNA, die exogen für die Zelle ist) induziert wird. Wenn die Zelle eine Säugerzelle ist, wird eine permanente genetische Veränderung im Allgemeinen durch Einführen der DNA in das Genom der Zelle erreicht.

[0037] Eine transformierte Zelle oder Wirtszelle bezieht sich im Allgemeinen auf eine Zelle (z.B. prokaryontisch oder eukaryontisch), in welche (oder in einen Vorfahren derer) mittels rekombinanter DNA-Techniken ein Polynucleotidmolekül eingeführt worden ist, das ein TGF-α-Polypeptid oder ein funktionelles Fragment davon codiert (z.B. ein funktionelles Fragment, wie es in SEQ ID NO: 4, wie nachstehend beschrieben, dargelegt wird).

[0038] Die Transformation einer Wirtszelle mit rekombinanter DNA kann durch herkömmliche Techniken, die Fachleuten gut bekannt sind, durchgeführt werden. Wenn der Wirt prokaryontisch ist, wie zum Beispiel E. coli, können kompetente Zellen, die im Stande sind DNA aufzunehmen, aus Zellen erzeugt werden, die nach einer exponentiellen Wachstumsphase geerntet werden, und anschließend durch das $CaCl_2$-Verfahren durch Abläufe, die im Fachgebiet gut bekannt sind, behandelt werden. Alternativ kann $MgCl_2$ oder RbCl verwendet werden. Die Transformation kann auch nach der Bildung eines Protoplasten aus der Wirtszelle oder durch Elektroporation durchgeführt werden.

[0039] Wenn der Wirt ein Eukaryont ist, umfassen die Verfahren der Transfektion oder Transformation mit DNA Calcium-Phosphat-Co-Präzipitate, herkömmliche mechanische Verfahren wie zum Beispiel Mikroinjektion, Elektroporation, Insertion eines Plasmids, das von Liposomen umhüllt ist, oder Virus-Vektoren und es können auch andere im Fachgebiet bekannte verwendet werden. Eukaryontische Zellen können auch mit DNA-Sequenzen, die ein TGF-α-Polypeptidfragment codieren, und einem zweiten fremden DNA-Molekül co-transfiziert werden, das einen selektierbaren Marker codiert, wie zum Beispiel das Herpes simplex-Thymidinkinasegen. Ein anderes Verfahren ist die Verwendung eines eukaryontischen viralen Vektors wie zum Beispiel Affenvirus 40 (SV 40) oder Rinder-Papillom-Virus, um eukaryontische Zellen transient zu infizieren oder zu transformieren und das Protein zu exprimieren, (Eukaryotic Viral Vektors, Cold Spring Harbor Laborstory, Gluzman Hrg., 1982). Üblicherweise wird ein eukaryontischer Wirt als die Wirtszelle genützt werden. Die eukaryontische Zelle kann eine Hefezelle (z.B. Saccharomyces cerevisiae), eine Insektenzelle (z.B. Drosophila sp.) oder kann eine Säugerzelle, einschließlich einer menschlichen Zelle, sein.

[0040] Eukaryontische Systeme und Säuger-Expressionssysteme erlauben, dass bei exprimierten Säugerproteinen Modifikationen nach der Translation stattfinden. Eukaryontische Zellen, welche die zelluläre Maschinerie zur Prozessierung des primären Transkripts, Glycosylierung, Phosphorylierung und vorteilhafterweise Sekretion des Genproduktes besitzen, sollten verwendet werden. Solche Wirts-Zelllinien können umfassen, sind aber nicht beschränkt auf CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, Jurkat, HEK-293 und WI38.

[0041] Säuger-Zellsysteme, die rekombinante Viren oder virale Elemente nützen, um die Expression zu lenken, können erzeugt werden. Wenn zum Beispiel Adenovirus-Expressionsvektoren verwendet werden, kann ein Polynucleotid, das ein TGF-α-Polypeptid oder ein Fragment davon codiert, an einen Adenovirus-Transkriptions/Translations-Kontrollkomplex ligiert werden, z. B. den späten Promotor und die dreiteilige Leadersequenz. Diese chimäre Sequenz kann durch in vitro oder in vivo Rekombination in das Adenovirusgenom inseriert werden. Insertion in eine nicht-essentielle Region des viralen Genoms (z.B. Region E1 oder E3) wird in einem rekombinanten Virus resultieren, das lebensfähig und im Stande ist ein TGF-α-Polypeptid oder ein Fragment davon in infizierten Wirten zu exprimieren (z.B. siehe Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3655-3659, 1984). Alternativ kann der 7,5K-Promotor des Vaccinia-Virus verwendet werden (z.B. siehe Mackett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:7415-7419, 1982; Mackett, et al., J. Virol. 49:857-864, 1984; Panicali, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:4927-4931, 1982). Von besonderem Interesse sind Vektoren, die auf Rinder-Papillom-Virus basieren, welche die Fähigkeit haben, als extrachromosomale Elemente zu replizieren (Sarver, et al., Mol. Cell Biol. 1:486, 1981). Kurz nach dem Eintreten dieser DNA in Mauszellen repliziert das

Plasmid etwa zu 100 bis 200 Kopien pro Zelle. Die Transkription der inserierten cDNA benötigt keine Integration des Plasmids in das Wirts-Chromosom und ergibt dadurch hohe Expressionsmengen. Diese Vektoren können für stabile Expression verwendet werden, indem ein selektierbarer Marker in das Plasmid aufgenommen wird, wie zum Beispiel das neo-Gen. Hohe Expressionsmengen können auch unter Verwendung von induzierbaren Promotoren erzielt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf den Metallothionein IIA-Promotor und Hitzeschock-Promotoren.

[0042] Für Langzeit-Produktion mit hohem Ertrag an rekombinanten Proteinen wird eine stabile Expression bevorzugt. Wirtszellen können, eher als dass Expressionsvektoren verwendet werden, die virale Replikationsursprünge enthalten, mit der cDNA, die ein TGF-α-Polypeptid oder ein funktionelles Fragment davon, das durch geeignete Expressions-Kontrollelemente (z.B. Promoter, Enhancer, Sequenzen, Transkriptionsterminatoren, Polyadenylierungsstellen usw.) kontrolliert wird, und einen selektierbaren Marker codiert, transformiert werden. Der selektierbare Marker in dem rekombinanten Vektor verleiht Resistenz gegen die Selektion und ermöglicht Zellen das Plasmid stabil in ihre Chromosomen zu integrieren und zu vermehren, um Foci zu bilden, die dann cloniert und in Zelllinien expandiert werden können. Nach dem Einführen von fremder DNA kann so hergestellten Zellen zum Beispiel ermöglicht werden, für 1-2 Tage in einem angereicherten Medium zu wachsen, und sie werden dann in ein selektives Medium überführt. Etliche Selektionssysteme können verwendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf das Thymidinkinasegen des Herpes simplex-Virus (Wigler, et al., Cell, 11:223, 1977), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferasegen (Szybalka & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026, 1962) und Adenin-Phosphoribosyltransferasegen (Lowy, et al., Cell, 22:817, 1980), die in tk-, hgprt- bzw. aprt-Zellen eingesetzt werden können. Es kann auch anti-Metabolit-Resistenz als die Basis der Selektion auf dhfr verwendet werden, die Resistenz gegen Methotrexat verleiht (Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980; O'Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8:1527, 1981); gpt, das Resistenz gegen Mycophenolsäure verleiht (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072, 1981); neo, das Resistenz gegen Aminoglycosid G-418 verleiht (Colberre-Garapin, et al., J. Mol. Biol. 150:1, 1981); und hygro, das Resistenz gegen Hygromycin verleiht (Santerre, et al., Gene 30:147, 1984). In letzter Zeit sind zusätzliche selektierbare Gene beschrieben worden, nämlich trpB, welches es Zellen ermöglicht, Idol anstatt von Tryptophan zu verwenden; hisD, welches es Zellen ermöglicht, Histinol anstatt von Histidin zu verwenden (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047, 1988); und ODC (Ornithin-Decarboxylase), welche Resistenz gegen den Ornithin-Decarboxylase-Inhibitor, 2-(Difluormethyl)-DL-Ornithin, DFMO verleiht (McConlogue L., In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laborstory, Hrg. 1987).

[0043] Der Begriff „Primer", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Oligonucleotid, ob natürlich oder synthetisch, das im Stande ist, als ein Initiationspunkt der Synthese zu agieren, wenn es unter Bedingungen gestellt wird, in welchen Primer-Verlängerung initiiert wird oder möglich ist. Die Synthese eines Primer-Verlängerunsproduktes, das mit einem Nucleinsäurestrang komplementär ist, wird in der Anwesenheit von Nucleosid-Triphosphaten und einer Polymerase in einem geeigneten Puffer bei einer geeigneten Temperatur initiiert.

Proteine und Polypeptide

[0044] Ein Polypeptid oder Protein verweist auf ein Polymer, in welchem die Monomere Aminosäurereste sind, die miteinander über Amidbindung verbunden sind. Wenn die Aminosäuren alpha-Aminosäuren sind, kann entweder das optische L-Isomer oder das optische D-Isomer verwendet werden, wobei die L-Isomere typisch sind. Das TGF-α-Peptid, das in der Erfindung verwendet wird, soll eine Aminosäuresequenz umfassen, einschließlich modifizierter Sequenzen wie zum Beispiel Glycoproteine, die TGF-α-Aktivität zeigen. Außerdem wird das Polypeptid der Erfindung ein oder mehrere funktionelle Eigenschaften aufweisen, die mit TGF-α in Zusammenhang stehen, einschließlich zum Beispiel der Fähigkeit mit einem EGF-Familienrezeptormitglied zu interagieren, die Proliferation oder Migration von Stammzellen zu stimulieren oder Cachexie zu behandeln oder vorzubeugen.

[0045] Modifikationen und Substitutionen sind nicht auf den Austausch von Aminosäuren beschränkt. Für eine Vielzahl von Zwecken wie zum Beispiel erhöhte Stabilität, Löslichkeit oder Konfigurations-Angelegenheiten wird ein Fachmann die Notwendigkeit erkennen andere Modifikationen (durch Deletion, Austausch oder Addition) einzuführen. Beispiele solcher anderer Modifikationen umfassen den Einbau von seltenen Aminosäuren, Dextra-Aminosäuren, Glycosylierungsstellen, Cytosin für spezifische Disulfidbrückenbindung. Die modifizierten Peptide können chemisch synthetisiert werden oder ein isoliertes Gen kann ortsspezifisch mutagenisiert werden oder ein synthetisches Gen kann synthetisiert und in Bakterien, Hefe, Baculovirus, Gewebekultur und so weiter exprimiert werden.

[0046] Chemische Festphasen-Peptidsynthese-Verfahren können verwendet werden, um das Peptid der Er-

findung zu synthetisieren. Solche Verfahren sind im Fachgebiet seit den frühen Sechziger-Jahren bekannt (Merrifield, R.B., J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154 (1963) (siehe auch Stewart, J. M. und Young, J. D., Solid Phase Peptid Synthesis, 2. Aufl. Pierce Chemical Co., Rockford, III., Seite 11-12)) und sind vor kurzem in im Handel erhältlichen Labor-Peptiddesigns und Syntesekits (Cambridge Research Biochemicals) angewandt worden. Für solche im Handel erhältlichen Laborkits wurden im Allgemeinen die Lehren von H. M. Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 3998 (1984) angewandt und sie stellen das Synthetisieren von Peptiden auf den Spitzen einer Vielzahl von „Stäben" oder „Nadeln" bereit, von denen alle mit einer einzelnen Platte verbunden sind. Wenn ein solches System verwendet wird, wird eine Platte von Stäben oder Nadeln umgedreht und in eine zweite Platte mit entsprechenden Vertiefungen oder Behältern eingeführt, die Lösungen zum Anheften oder Verankern von geeigneten Aminosäuren an die Spitzen der Nadeln oder Stäbe enthalten. Durch Wiederholen eines solchen Verfahrensschritt, d.h. Umdrehen und Einführen der Spitzen der Stäbe und Nadeln in entsprechende Lösungen, werden Aminosäuren in gewünschte Peptide aufgebaut. Außerdem sind etliche der verfügbaren FMOC-Peptid-Synthesesysteme erhältlich. Zum Beispiel kann der Zusammenbau eines Polypeptids auf einem festen Träger unter Verwendung eines automatisierten Peptidsynthesegeräts Modell 431A von Applied Biosystems, Inc. durchgeführt werden. Ein bevorzugtes Mittel zum Synthetisieren eines Peptids von 18 Aminosäuren Länge wird durch direkte Peptidsynthese durchgeführt, im Allgemeinen beginnend mit der N-terminalen Aminosäure und dem Hinzufügen von Aminosäuren in der C-terminalen Richtung. TGF-α ist unter Verwendung von rekombinanten Techniken hergestellt worden und ist als ein Laborreagens im Handel erhältlich.

[0047] Das funktionelle Peptid der Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass ein Schleifenpeptid von TGF-α eine biologische TGF-α-Aktivität zeigt und daher multipotente CNS-Vorläuferzellen stimuliert, damit sie sich teilen und durch das Gehirn wandern. Diese Aktivität deutet darauf hin, dass das Schleifenpeptid bei der Behandlung von neurologischen Defiziten wirksam ist, die durch ein große Vielzahl an Erkrankungen und Verletzungen hervorgerufen werden, von denen jede in einem, neurologischen Defizit in einem spezifischen Gebiet des Gehirns oder einer spezifischen Art von Neuronen resultiert. Diese umfassen degenerative Erkrankungen, einschließlich der weiter verbreiteten Alzheimer Krankheit (AD), Parkinson Krankheit (PD) und Huntington Krankheit (HD) und der weniger verbreiteten Pick-Krankheit, progressiven supranuclearen Paralyse, striatonigralen Degeneration, corticobasalen Degeneration, olivopontocerebellaren Atrophie, Leigh-Krankheit, frühkindlichen nekrotisierenden Encephalomyelopathy, Hunter-Krankheit, Mucopolysaccharidose, verschiedene Leukodystrophien (wie zum Beispiel Krabbe Krankheit, Pelizaeus-Merzbacher-Kranheit und ähnlichen, amaurotischem (familiärer) Idiotismus, Kuf-Krankheit, Spielmager-Vogt-Krankheit, Tay-Sachs-Krankheit, Batten-Krankheit, Jansky-Bielschowsky-Krankheit, Reye's-Krankheit, cerebraler Ataxie, chronischem Alkoholismus, Beriberi, Hallervorden-Spatz-Syndrom, cerebellarer Degeneration und ähnlichem.

[0048] Weiterhin können Verletzungen (traumatisch oder neurotoxisch), die den Verlust von neuronaler Funktion verursachen, durch das funktionelle Peptid behandelt werden. Solche Verletzungen umfassen zum Beispiel Schusswunden, Verletzungen, die durch Gewalt verursacht wurden, Penetrationsverletzungen, Verletzungen, die durch eine Operation verursacht wurden (z.B. Tumorentfernung, Abzessentfernung, Epilepsie-Läsionenentfernung), Vergiftung (z.B. Kohlenmonoxid), Baby-Schütteltrauma („shaken baby syndrom"), nachteilige Reaktionen auf medikamentöse Behandlung, Überdosis an Drogen, und post-traumatische Encephalopathie. Ischämie kann ferner aufgrund der Unterbrechung der Durchblutung oder Sauerstoffzufuhr zu CNS-Verletzungen führen, was Neuronen oder Gliazellen töten oder verletzen kann (z.B. verleiht TGF-α Schutz vor Ischämie in einem Schweine-Magen-Darm-Modell und ein Familienmitglied, Heparin-bindender EGF, verleiht Schutz vor Ischämie in einem Ratten-Schlaganfallmodell). Solche Verletzungen können durch Verabreichung des funktionellen Peptids behandelt werden und umfassen zum Beispiel Verletzungen, die durch Schlaganfall, Anoxie, Hypoxie, teilweises Ertrinken, Myoclonus, schwere Rauchinhalation, Dystonie und erworbenen Wasserkopf verursacht wurden. Entwicklungsstörungen, die durch das funktionelle Peptid behandelt werden können, umfassen zum Beispiel Schizophrenie bestimmte Formen von schwerer geistiger Retardation, cerebrale Lähmung, congenitalen Hydrocephalus, schweren Autismus, Down-Syndrom, LHRH/Hypothalmische Störung und Spina bifida. Das funktionelle Peptid kann ferner verwendet werden, um Funktionsstörungen zu behandeln, welche die Sicht beeinträchtigen, die durch den Verlust oder das Fehlen von Retinazellen verursacht werden, und umfassen zum Beispiel diabetische Retiopathie, schwere Retinaablösung (mit Glaukom in Zusammenhang stehend), traumatische Verletzungen der Retina, retinale vaskuläre Occlusion, Makuladegeneration, Atrophie des optischen Nervs und andere degenerative Erkrankungen der Retina. Verletzungen des Rückenmarks können durch die funktionellen Peptide behandelt werden. Beispiele von Rückenmarksverletzungen sind Post-Polio-Syndrom, amyotrophische Lateralesklerose, traumatische Verletzung, operative Verletzung und paralytische Erkrankungen. Demyelierende Autoimmunerkrankungen können durch Verabreichung der funktionellen Peptide behandelt werden und umfassen zum Beispiel multiple Sklerose. Schließlich kann das funktionelle Peptid verwendet werden, um neurologische Defizite zu behandeln, die durch Infektion von ent-

zündlichen Erkrankungen verursacht wurden, einschließlich zum Beispiel Creutzfeld-Jakob-Erkrankung und anderer langsamer infektiöser Viruserkrankungen des CNS, AIDS, Enzephalopathie, post-encephalitischem Parkinsonismus, viraler Encephalitis, bakterieller Meningitis oder anderen CNS-Effekten von infektiösen Krankheiten.

[0049] Mit „funktionell", wie es im Zusammenhang mit dem Peptid der Erfindung verwendet wird, ist gemeint, dass das Peptid TGF-α-Aktivitat aufweist. Diese biologische Aktivität steht mit dem Peptid, wie es beansprucht wird, und den für TGF-α erhältlichen Daten in Zusammenhang.

[0050] Im Allgemeinen werden die Begriffe „behandeln", „Behandlung" und ähnliche hierin mit der Bedeutung verwendet, dass sie ein Individuum, Gewebe oder eine Zelle beeinflussen, um den gewünschten pharmakologischen und/oder physiologischen Effekt zu erhalten. Der Effekt kann im Hinblick auf vollständige oder teilweise Prävention einer Krankheit oder Funktionsstörung oder eines Zeichens oder Symptoms davon prophylaktisch sein und/oder kann im Hinblick auf eine teilweise oder vollständige Heilung einer Funktionsstörung oder Krankheit und/oder schädlichen Wirkung, die der Funktionsstörung oder der Krankheit zuzuschreiben ist, therapeutisch sein. „Behandlung", wie hierin verwendet, deckt jede Behandlung oder Prävention oder Hemmung einer Funktionsstörung oder einer Krankheit in einem Individuum ab. Das Individuum kann ein Wirbelloser oder ein Vertebrat, ein Säuger und insbesondere ein Mensch sein und umfasst beispielsweise: (a) Verhinderung des Auftretens der Krankheit oder Funktionsstörung in einem Individuum, das für die Krankheit oder Funktionsstörung prädisponiert sein kann, aber noch nicht damit diagnostiziert wurde; (b) Hemmung der Krankheit oder Funktionsstörung, d.h. Anhalten ihres Fortschreitens; oder (c) Erleichtern oder Verbessern der Krankheit oder Funktionsstörung, d.h. Regression auslösend.

[0051] Die Erfindung stellt die Verwendung eines Peptids bereit, bestehend aus den Aminosäuren 33 bis 50 der SEQ ID NO: 1, die eine Schleifen-Peptidregion von TGF-α darstellen und biologische TGF-α-Aktivität beibehalten, für die Erzeugung eines Arzneimittels,
für die Modulation von Gewichtsverlust, der mit Krankheit und Funktionsstörungen des Magen-Darm-Traktes in Zusammenhang steht, zum Beispiel jenen, die mit viralen Infektionen und Chemotherapie in Zusammenhang stehen,
zur Behandlung einer neurodegenerativen Krankheit,
zur Behandlung einer CNS-Krankheit oder -Funktionsstörung, wobei die CNS-Krankheit oder -Funktionsstörung CNS-Ischämie, Rückenmarksverletzung, MS und Verletzung der Retina einschließt,
zur Behandlung oder Vorbeugung von Mukositis im Magen-Darm-Trakt, die durch cytotoxische oder immunsuppressive Therapie verursacht wurde, zur Behandlung von entzündlicher Darmkrankheit, Colitis und Crohn's Krankheit des Magen-Darm-Traktes oder
zur Behandlung einer entzündlichen Reaktion einer Autoimmunkrankheit. Vorzugsweise umfasst die Autoimmunkrankheit Typ II (jugendlichen)-Diabetes, rheumatische Arthritis, Lupus, mit HIV in Zusammenhang stehende Störungen (z.B. AIDS) und multiple Sklerose.

[0052] Die Erfindung stellt auch die Verwendung eines Peptids, das aus den Aminosäuren 33 bis 50 von SEQ ID NO: 1 besteht, das eine Schleifen-Peptidregion von TGFα darstellt und biologische TGF-α-Aktivität beibehält, für die Herstellung eines Arzneimittels zur Erhöhung der Hämatopoese während cytotoxischer oder immunsuppressiver Therapie bereit. Vorzugsweise umfasst das Arzneimittel ferner ein zweites hämatopoetisches Wachstumsfaktormittel, um reifere hämatopoetische Vorläuferzellen zu stimulieren, wobei der zweite hämatopoetische Wachtumsfaktor Erythropoetin, Thrombopoetin, G-CSF (Granulocyten-koloniestimulierenden Faktor) und GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen-koloniestimulierenden Faktor) umfasst.

Gentherapie und Gentransfer

[0053] Das in der Erfindung verwendete TGF-α-Peptid kann für die Verabreichung an ein Individuum durch ein Nucleinsäure-Expressionssystem ex vivo oder in vivo geeignet sein. Eine Vielzahl an Transfektionstechniken sind gegenwärtig erhältlich und werden verwendet, um DNA in vitro in Zellen zu transferieren; einschließlich Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitation, DEAE-Dextran-Transfektion, Elektroporation, Liposomen vermitteltem DNA-Transfer oder Transduktion mit rekombinanten viralen Vektoren. Solche ex vivo-Behandlungsprotokolle sind verwendet worden, um DNA in eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen zu überführen, einschließlich Epithelzellen (U,S,-Patent Nr. 4,868,116; Morgan und Mulligan WO87/00201; Morgan et al., 1987 Science 237:1476-1479; Morgan und Mulligan, U,S,-Patent Nr. 4,980,286), Endothelzellen (WO89/05345), Hepatocyten (WO89/07136; Wolff et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3344-3348; Ledley et al., 1987 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5335-5339; Wilson und Mulligan, WO89/07136; Wilson et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8437-8441), Fibroblasten (Palmer et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:1055-1059;

Anson et al., 1987, Mol. Biol. Med. 4:11-20; Rosenberg et al.,1988, Science 242:1575-1578; Naughton & Naughton, U,S,-Patent Nr. 4,963,489), Lymphocyten (Anderson et al., U,S,-Patent Nr. 5,399,346; Blesse, R. M. et al., 1995, Science 270:475-480) und hämatopoetischer Stammzellen (Lim, B. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8892-8896; Anderson et al., U,S,-Patent Nr. 5,399,346). Eine Zusammenfassung von typischen Protokollen, Methoden und Vektoren ist in "The Development of Human Gene Therapy" Hrg. Theodore Friedmann, Cold Spring Harbor Laborstory Press, New York, 1999, bereitgestellt, deren Offenbarung hierin einbezogen ist.

[0054] Direkter in vivo-Gentransfer ist vor kurzem mit Rezepturen von DNA, die in Liposomen (Ledley et al., 1987, J. Pediatrics 110:1); oder in Proteoliposomen eingeschlossen war, die virale Hüllerezeptorproteine enthielten (Nicolau et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1068); und DNA, gekoppelt an einen Polylysin-Glycoprotein-Trägerkomplex, versucht worden. Außerdem sind „Genkanonen" für Genverabreichung in Zellen verwendet worden (Australisches Patent Nr. 9068389). Nackte DNA oder DNA, die mit Liposomen assoziiert ist, kann in flüssige Trägerlösungen zur Injektion in interstitielle Räume zum Transfer von DNA in Zellen formuliert werden (Feiger, WO90/11092).

[0055] Wie vorstehend beschrieben, können Polynucleotisequenzen, die ein TGF-α-Polypeptid oder ein funktionsfähiges Peptidfragment codieren, in Vektoren cloniert werden, die für die Verabreichung in Wirtszellen für die Expression geeignet sind. Insbesondere sind retrovirale Vektoren, welche die Polypeptide der Erfindung enthalten, besonders für die Verabreichung von Polynucleotiden an Zellen für Gentherapie geeignet. Gegenwärtige Strategien für Gentherapie werden in "The Development of Human Gene Therapy" Hrg. Theodore Friedmann, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1999, zusammengefasst.

[0056] Verabreichung eines Polypeptids von Interesse kann in vivo durch Verabreichung der Vektoren an ein einzelnes Individuum erzielt werden, üblicherweise durch systemische Verabreichung (z.B. intravenöse, intraperitoneale, intramuskuläre, subdermale oder intracraniale Infusion). Alternativ können die Vektoren verwendet werden, um Polynucleotide an Zellen ex vivo zu verabreichen, z.B. an Zellen, die einem einzelnen Patienten entnommen wurden (z.B. tumorinfiltrierende Lymphocyten, Knochenmarksaspirate, Gewebebiopsie), oder durch hämatopoetische Stammzellen von universellen Spenden, gefolgt von der Wiedereinpflanzung der Zellen in einen Patienten, üblicherweise nach Selektion auf Zellen, die das Polynucleotid eingebaut haben.

[0057] Die Vektoren können für Gentherapie verwendet werden, um das Auftreten von Gewichtsverlust und damit in Zusammenhang stehenden Funktionsstörungen, die aus bestimmten Krankheiten resultieren (z.B. Krebs), oder viralen Erkrankungen (z.B. AIDS, Mononucleose, Herpesvirusinfektion, Cytomegalievirus-Infektion, Papillomvirus-Infektion) zu vermindern oder das Genom von ausgewählten Zelltypen eines Patienten für irgendeinen therapeutischen Nutzen zu modifizieren.

[0058] Der Vektor kann verwendet werden, um Polynucleotide in eine Vielzahl an Zellen und Geweben einzuführen, einschließlich Myeloidzellen, Knochenmarkszellen, Lymphocyten, Hepatocyten, Fibroblasten, Lungenzellen, Epithelzellen und Muskelzellen. Zum Beispiel können Polynucleotide, die ein TGF-α-Polypeptid codieren, in Stammzellen transferiert werden.

Arzneimittel und Formulierungen

[0059] Die Erfindung umfasst die Erzeugung von Arzneimitteln, die für den Transfer oder die Verabreichung des Peptids der Erfindung nützlich sind. Die gemäß der Erfindung verwendeten Arzneimittel werden erzeugt, indem das TGF-α-Peptid, das in der Erfindung verwendet wird, in eine Form gebracht wird, die unter Verwendung von Trägern, Excipienten und Zusatzmitteln oder Hilfsmitteln für die Verabreichung an ein Individuum geeignet ist. Oft verwendete Träger oder Hilfsstoffe umfassen Magnesiumcarbonat, Titandioxid, Lactose, Mannit und andere Zucker, Talk, Milchprotein, Gelatine, Stärke, Vitamine, Cellulose und ihre Derivate, tierische und Pflanzenöle, Polyethylenglykole und Lösungsmittel wie zum Beispiel steriles Wasser, Alkohole, Glycerin und mehrwertige Alkohole. Intravenöse Vehikel umfassen Flüssigkeiten und Nähstoffauffüllmittel. Konservierungsmittel umfassen antimikrobielle Stoffe, Antioxidantien, chelierende Mittel und inerte Gase. Andere pharmazeutisch verträgliche Träger umfassen wässrige Lösungen, nicht-toxische Excipientien, einschließlich Salze, Konservierungsmittel, Puffer und ähnliches, wie beschrieben zum Beispiel in Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. Aufl. Esston: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487, (1975) und The National Formulary XIV., 14. Aufl., Washington: American Pharmaceutical Association (1975), deren Inhalte hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden. Der pH-Wert und die genaue Konzentration der verschiedenen Komponenten des Arzneimittels werden gemäß üblichem Fachkönnen eingestellt. Siehe Goodman und Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7. Aufl.).

[0060] Die Arzneimittel werden vorzugsweise in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht. Einheiten von festen Dosierungen sind Tabletten, Kapseln und Zäpfchen und enthalten zum Beispiel auf Algibnat basierte, pH-abhängige Freisetzungs-Gelkapseln. Zur Behandlung eines Individuums sind abhängig von der Aktivität der Verbindung, Art der Verabreichung, Natur und Schwere der Störung, vom Alter und Körpergewicht des Individuums sind unterschiedliche tägliche Dosierungen nötig. Unter bestimmten Umständen jedoch können höhere oder niedrigere tägliche Dosierungen angebracht sein. Die Verabreichung der täglichen Dosierung kann sowohl als eine einzelne Verabreichung in Form einer individuellen Dosierungseinheit oder durch mehrere kleinere Dosierungseinheiten und auch durch mehrfache Verabreichungen von unterteilten Dosierungen mit spezifischen Intervallen durchgeführt werden.

[0061] Das Arzneimittel gemäß der Erfindung kann lokal oder systemisch in einer therapeutisch effektiven Dosis verabreicht werden. Mengen, die für diese Verabreichung effektiv sind, werden natürlich von der Schwere der Krankheit und dem Gewicht und allgemeinen Zustand des Individuums abhängen. Üblicherweise können in vitro verwendete Dosierungen nützliche Richtlinien in den Mengen bereitstellen, die für in situ-Verabreichung des Arzneimittels nützlich sind, und Tiermodelle können verwendet werden, um effektive Dosierungen für die Behandlung von einzelnen Funktionsstörungen zu bestimmen. Verschiedene Überlegungen dazu werden z.B. in Langer, Science, 249: 1527, (1990); Gilman et al., (Hrg.) (1990) beschrieben, jede davon wird hierin durch Bezugnahme aufgenommen.

[0062] Das in der Erfindung verwendete TGF-α-Peptid kann parenteral, enterisch, durch Injektion, schnelle Infusion, nasopharyngeale Absorption, dermale Absorption, rektal und oral verabreicht werden. Pharmazeutisch verträgliche Trägerpräparationen für parenterale Verabreichung umfassen sterile oder wässrige oder nicht-wässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen. Beispiele von nicht-wässrigen Lösungsmitteln sind Propylenglykol, Polyethylenglycol, Pflanzenöle wie zum Beispiel Olivenöl und injizierbare organische Ester wie zum Beispiel Ethyloleat. Träger für okklusive Verbände können verwendet werden, um die Hautdurchlässigkeit zu erhöhen und die Antigenabsorption zu verstärken. Flüssige Dosierungsformen zur oralen Verabreichung können im Allgemeinen eine Liposomenlösung umfassen, die eine flüssige Dosierungsform enthält. Geeignete feste oder flüssige Arzneimittelpräparationsformen sind zum Beispiel Körnchen, Puder, Tabletten, beschichtete Tabletten, (Mikro)-Kapseln, Zäpfchen, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen, Kremen, Aerosole, Tropfen oder eine injizierbare Lösung in Ampullenform und auch Präparationen mit lang anhaltender Freisetzung der aktiven Komponenten, wobei in den Präparationen Excipienten und Zusatzstoffe und/oder Hilfsmitteln wie zum Beispiel Zerfallsstoffe, Bindemittel, Beschichtungsmittel, Quellmittel, Gleitmittel, Geschmackstoffe, Süßstoffe und Elixiere, die inerte Verdünnungsmittel enthalten, die üblicherweise im Fachgebiet verwendet werden, wie zum Beispiel gereinigtes Wasser hinzugefügt werden. Wenn die Krankheit oder Funktionsstörung eine Magen-Darm-Störung ist, werden orale Rezepturen oder Zapfenrezepturen bevorzugt.

[0063] Sterile injizierbare Lösungen können durch Einführen des aktiven Mittels in der benötigten Menge (z.B. etwa 10 µg bis etwa 10 mg/kg) in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt und dann zum Beispiel durch sterile Filtration sterilisiert werden. Ferner können Puder durch Standardtechniken wie zum Beispiel Gefriertrocknen oder Vakuumtrocknen erzeugt werden.

[0064] In einer anderen Ausführungsform wird das aktive Mittel mit einem biologisch abbaubaren Träger für langanhaltende Freisetzungscharakteristika für entweder langanhaltende Freisetzung im GI-Trakt oder zur Implantation in ein Zielorgan mit langzeitiger Freisetzungscharakteristika des Wirkstoffs an die vorgesehene Stelle der Aktivität erzeugt. Biologisch abbaubare Polymere umfassen zum Beispiel Ethylen-Vinylacetat, Polyanhydride, Polyglykolsäuren, Poly-Milchsäuren, Kollagen, Polyorthoester, und Poly-Essigsäuren. Liposomale Rezepturen können auch verwendet werden.

[0065] Die Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die folgenden, nicht-limitierenden Beispiele genauer beschrieben werden.

BEISPIEL 1

[0066] Jede der drei Schleifenregionen in menschlichem TGF-α wurde auf TGF-α-ähnliche biologische Aktivität untersucht, wie Stimulation der zellulären Proliferation, wie gemessen durch den ^{3}H-Thymidineinbau von Stammzellen. Wie in **Fig. 2** gezeigt, zeigte nur das Schleife-C-Peptid (entsprechend den Aminosäuren 33-50) wesentliche biologische TGF-α-Aktivität, wenn es mit den Daten verglichen, die mit TGF-α-Peptid von 50 Aminosäuren oder sogar mit dem anders gespleißten 57 Aminosäuren-Polypeptid erhalten wurden, und ist daher ein nachahmendes TGF-α-Peptid. Demgemäß zeigen Daten von TGF-α und TGF-α57 eine Aktivität, die als „TGF-α-Aktivität" bezeichnet werden kann, und diese sagen die Aktivität des funktionellen TGF-α-Peptids und

ähnlicher funktioneller TGF-α-Peptide voraus, die in der Gattung der Formel I mit oder ohne dem Hinzufügen einer „Schwanz"-Region von Formel II beinhaltet sind. Diese Daten sagen Aktivität für die funktionellen TGF-α-Peptide voraus, wenn Aktivität auch für TGF-α oder für TGF-α57 gezeigt wird.

BEISPIEL 2

Hämatopoese

[0067] TGF-α und verwandte Polypeptide wie zum Beispiel TGF-α57 zeigten überraschende verstärkende Aktivität in einem in vivo-Model von allgemeiner Hämatopoese, wenn sie gemeinsam mit dem wirksamen cytotoxischen Mittel Cis-Platinum (CP) verabreicht wurden. Fig. 3 zeigt eine graphische Darstellung von Milzgewichten von Mäusen, die entweder mit Konzentrationen von 5 µg/g oder 10 µg/g CP und von 10 ng/g oder 50 ng/g TGF-α57 behandelt wurden. Diese Daten zeigen, dass die TGF-α57-Behandlung trotz CP-Behandlung welche die Milzgewichte erheblich verminderte eine Rückkehr zu normalen Milzgewichten verursachte, Dieses in vivo-Experiment ist ein Prognosemodell für Hämatopoese in Menschen, da CP ein cytotoxisches Mittel ist, das üblicherweise für Krebstherapie verwendet wird und von dem bekannt ist, dass es hämatopoetische Zellen von drei Zellreihen erheblich vermindert. Hämatopoetische und myeloide Zellen sind Vorläufer von roten Blutzellen, Blutplättchen-Vorläufer (Megakaryocyten) und Vorläufer von Immun(weißen) Blutzellen von verschieden Formen von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. Darüber hinaus war die Zahl der Blutplättchen in jenen Mäusen höher, denen TGF-α57 (und CP) injiziert wurde, im Gegensatz zu CP alleine, wo solche Zahlen hinsichtlich des Normalzustands erheblich reduziert waren. Es sollte festgehalten werden, dass Bezugnahmen auf TGF-α als menschliches 50 Aminosäuren-Polypeptid ferner die Bezugnahme auf menschliches TGFα57 als eine alternative Variante umfasst.

[0068] Bei dem Experimentablauf erhielten jene Tiere, die behandelt werden sollten, 4 Stunden vor der Herausforderung mit CP eine Dosis von TGFα57. Eine einzelne Dosis an CP wurde verabreicht. Zusätzliche Dosierungen (wie angezeigt) von TGFα57 wurden bei 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 96 Stunden nach der CP-Dosierung gemacht. Alle Dosierungen wurden durch IP-Injektion durchgeführt. Kontrollen wurden mit Salzlösung anstelle von CP oder TGF-α57 oder CP und TGF-α57 durchgeführt.

[0069] Die Tiere wurden etwa 4 Stunden nach der letzten TGF-α57-(oder Salzlösung) Dosierung getötet. Entscheidende Organe wurden entfernt und die Milzen wurden sofort nach einem sauberen Einschnitt gewogen. Alle relevanten Organe wurden in Formalin gelegt, zur histopathologischen Analyse transportiert, eingebettet, geschnitten, gefärbt und betrachtet. Die Ergebnisse dieser histologischen Analyse der Milzen auf hämatopoetische Wirkung und des Magen-Darm-Traktes (nachstehend) stellte überraschende und unerwartete Daten des Effekts der TGF-α57-Aktivität bereit.

[0070] Die H&E-gefärbte Milz einer mit CP behandelten Mausmilz (10 µg/g) zeigte apoptotische Zellen (dicht gefärbt mit Kernfragmenten) im Keimzentrum (GC). T-Zellen im zentralen arteriellen Gebiet zeigten das Fehlen einer marginalen Zone und viel weniger Erythrocyten und T-Zellen im perifolliculären Gebiet. Eine normale Mausmilz (kein CP und kein TGF-α57), fixiert in Formalin, zeigte eine Arteriole, die mit Vorläufern von T-Zellen angereichert war. Es gab Erythrocyten in der perifolliculären Zone, die sowohl die T-Zell- als auch die B-Zell-Kompartimente der Milzfollikel umgab. Eine mit CP (10 µg/g) und TGF-α57 (50 ng/g) behandelte Mausmilz zeigte eine erhöhte Zahl an T-Zellen und Erythrocyten in der perifolliculären Zone. Die T-Zellen färbten hinsichtlich des T-Zellrezeptors, waren aber für CD4- und CD8-Marker negativ. Demgemäß sind die T-Zellen Doppelnull-T-Zellvorläufer, die durch TGF-α-Verabreichung induziert werden.

[0071] Diese in vivo-Daten in einem voraussagenden Model der Hämatopoese, bestätigt durch blinde histologische Analyse (der Histologe/Pathologe kannte die Behandlungsgeschichte der erhaltenen codierten Gewebe nicht), stellten einen überraschenden Beweis für die Nützlichkeit der Peptide bereit, die TGF-α-Aktivität aufwiesen, um Hämatopoese und Genese von Immunzellen nach Inkontaktbringen mit cytotoxischen Mitteln zu verstärken. Diese Daten prognostizieren und stellen eine vernünftige Korrelation bereit, dass TGF-α und die Peptide der Formel I, Formel II und Formel III nützliche therapeutische Mittel zur Verstärkung der Hämatopoese nach oder während cytotoxischer Therapie sind, wie zum Beispiel Krebsbehandlung. Ein nützliches Verfahren zur Verbesserung der Krebstherapie ist es daher, entweder TGF-α oder ein Peptid der Formel I, Formel II, Formel III, Formel IV oder Kombinationen davon mit cytotoxischen Behandlungsschemata zu kombinieren, um die Dosis-limitierende Nebenwirkungen von cytotoxischen Mitteln zu reduzieren.

[0072] Ein zusätzliches Experiment untersuchte TGF-α-Aktivität (unter Verwendung von TGF-α57) auf menschliche, mit Knochenmark angereicherte CD34-Zellen. FACS-sortierte menschliche CD34-positive und

CD38-negative Zellen wurden in flüssigen primären Kulturen in Iscove modifiziertem Dulbecco-Medium mit Ergänzungen gezüchtet. TGF-α (57) wurde alleine (10 ng/ml) hinzugefügt und zeigte eine 35% Steigerung in CD34-positiven Vorläuferzellen. Stammzellenfaktor (SCF) wurde als eine positive Kontrolle (500 ng/ml) verwendet und stellte eine dreifache Zunahme von CD34-positiven Zellen bereit. Wenn eine Kombination von SCF (500 ng/ml) und TGFα (10 ng/ml) hinzugefügt wurde, wurde eine synergistische 12-fache Zunahme an CD34-positiven Zellen beobachtet. Ein unerwartetes Ergebnis war die Stimulierung der Proliferation von dentritischen Vorläuferzellen in den TGF-α-behandelten Kulturen.

BEISPIEL 3

Mukositis und Magen-Darm-Krankheiten

[0073] Der Dünndarm umfasst den Zwölffingerdarm, Leerdarm und Krummdarm. Er ist die Hauptstelle für die Absorption von Verdauungsprodukten aus dem GI-Trakt. Die Verdauung beginnt im Magen und wird im Dünndarm mit dem absorbierenden Prozess abgeschlossen. Die Dünndarmschleimhautoberfläche besteht aus zahlreichen fingerähnlichen Fortsätzen, die Zotten (Villi) genannt werden. Außerdem ist das Schleimhautepithel zwischen der Basis der Zotten in Krypten geformt, die Stammzellen enthalten.

[0074] TGF-α oder ein Peptid der Formel I, Formel II, Formel III oder Formel IV, welches TGF-α-Aktivität aufweist, oder Kombinationen davon sind für die Behandlung von Mukositis, die mit Darmblutung in Zusammenhang steht, Dyspepsie, die durch cytotoxische Therapie verursacht wird, und zur Verbesserung der Barrierefunktion des GI-Traktes, die durch cytotoxische Therapie beeinträchtigt wid, nützlich. Bei dem in vivo-Experiment mit sieben Gruppen an Mäusen, das vorstehend beschrieben wurde, für hämatopoetische Wirkungen, die in Milzen beobachtet wurden, wurde auch der GI-Trakt dieser behandelten Mäuse untersucht. Histologische Untersuchung des Mausdarms zeigte Folgendes: mit CP (einzelne ip Dosis von 10 μg/g) behandelter Darm zeigte im Querschnitt erhebliche Verletzungen der Zotten. Insbesondere sind die Zotten nekrotisch, die Krypten weisen unregelmäßige Formen auf und die Spitzen der Krypten zeigten den Verlust von zellulärer Integrität. Ein Querschnitt eines GI-Traktes einer normalen Maus (kein CP und kein TGF-α57) zeigte eine normale Darmoberfläche mit Zotten, die lange schlanke Schleimhautfortsätze aufwiesen mit einem Kern an Lamina propria, die durch eine luminale Epithelschicht bedeckt war. An der Basis der Schleimhaut befindet sich eine einzelne Reihe an Darmkrypten. Diese Krypten, die zwischen benachbarten Zotten liegen, sind von der gleichen Lamina propria umgeben, welche die villösen Kerne bilden. Sowohl säulenförmige absorbierende Zellen als auch Becherzellen bedecken die villösen Oberflächen. Die Becherzellen enthalten apicale klare Vakuolen. Ein Querschnitt eines Mäusedarms, der sowohl mit CP (10 μg/g) als auch mit TGF-α57 (50 ng/g) in Kontakt gebracht wurde, zeigte, dass die Darmstruktur sehr ähnlich zur normalen Darmstruktur war. Insbesondere waren die Zotten lang und schlank. Sowohl absorbierende Zellen als auch Becherzellen waren auf der Oberfläche der Zotten sichtbar und es gab eine reichliche Menge an Becherzellen auf der Oberfläche.

[0075] Eine 160-fache Vergrößerung des Darms von einer mit CP behandelten Maus, einer normalen Maus und einer mit CP und TGF-α57 behandelten Maus bei gleichen, vorstehend beschriebenen Dosierungen. Die mit CP behandelte Maus zeigte verletzte Zotten mit degenerierenden und nekrotischen Spitzen. Rote Blutzellen wurden in den verletzten Zotten beobachtet. Die Krypten waren irregulär geformt und hatten unterschiedliche Höhen. Die normale Maus zeigte glatte Zottenspitzen und die Kerne der Enterocyten wurden überall im Villus beobachtet. Die Krypten waren von ähnlicher Höhe und hatten eine regelmäßige Form. Die mit CP und TGF-α behandelte Maus wies normal aussehende Zotten auf, wie sie für die normale Maus beschrieben wurden. Die Krypten erschienen auch normal.

[0076] Ferner zeigten mit CP (10 μg/g) und ohne TGF-α57 behandelte Mäuse und mit CP (10 μg/g) und 50 ng/g TGF-α57 behandelter Mausdarm, wenn er unter höheren Vergrößerungen betrachtet wurde, aufgrund von Zelltod und Nekrose schwer verletzte Kryptenoberflächen in den mit CP behandelten Mäusen. Rote Zellen waren an der verletzten Oberfläche sichtbar, was auf Darmblutung hindeutete. Außerdem zeigte die mit CP behandelte Maus einen Verlust des Bürstensaums und sehr wenig Glycocalyx oder verschwommene Beschichtung. Becherzellen erschienen verteilt, nekrotisch und in geringer Zahl als normal. Die Wirkung der TGF-α-Behandlung zeigte Schutz der Zotten-Oberfläche. Genau gesagt erschienen die Epithelzellen normal, mit verlängertem Bürstensaum. Die Kerne waren sehr dicht gefärbt und verlängert.

[0077] Die histologischen Daten, welche die durchschnittliche Kryptenhöhe der drei Gruppen von Mäusen maßen, werden in **Fig. 4** zusammengefasst. TGF-α57- und TGF-α (50 As)-Behandlung (50 ng/g) war im Stande die Höhenverlust der Krypte durch die CP-Behandlung mehr als wiederherzustellen.

[0078] Ein Alzianblau-Färbeverfahren erlaubte die Unterscheidung von absorbierenden Zellen und Becherzellen. Becherzellenschleim wird in einer blauen Farbe gefärbt, während die absorbierenden Zellen weniger gefärbt bleiben. Färbungen des Darms von normalen Mäusen, nur mit CP behandelten (10 µg/g) und sowohl mit CP (10 µg/g) als auch mit TGF-α57 (50 ng/g) behandelten Mäusen zeigten wesentliche Unterschiede. Im normalen Darm erstreckte sich jede Zotte von der luminalen Oberfläche zur basalen muskulären Schleimhautoberfläche.

[0079] Becherzellen waren verstreut und herrschten an der Basis der Zotten vor, wohingegen säulenförmige absorbierende Zellen die luminale Oberfläche auskleideten. In der mit CP behandelten Maus zeigte die Alzianblau-Färbung Zotten, die eine geringere Zahl an Becherzellen (als normal) enthielten. Die verletzten absorbierenden Zellen und Becherzellen waren an der Spitze der Zotten degenerierten und reichlich sekretorisches Schleimhautmaterial war an der luminalen Oberfläche gefärbt. In der CP/TGF-α-Maus gab es eine erhöhte Zahl an Becherzellen, die überall in den Zotten verstreut waren. Die Darmzotten erschienen normal mit Verlängerung. Die Mehrzahl der Enterocyten schien mit Alzianblau nicht positiv gefärbt zu sein. Die luminalen Plasmamembranen der Zotten waren durch die TGF-α-Behandlung gut geschützt. Die Anzahl an Becherzellen wurde anhand der durchschnittlichen Einheitslänge des Dünndarms gezählt. TGF-α-Behandlung erhöhte nicht nur die Zahl der Becherzellen, sondern erhöhte auch die Zahl aus der CP-Behandlung auf ein höheres Niveau als im normalen Darm.

[0080] Demgemäß zeigen diese Daten die Wirkungen von TGF-α und der funktionellen Peptide, die TGF-α-Aktivität aufweisen, von Formel I, Formel II, Formel III und Formel IV, die therapeutische Aktivität aufweisen, um Mukositis, die mit cytotoxischer Arzneistofftherapie in Zusammenhang steht, sowie entzündliche Darmkrankheit zu behandeln oder zu verhindern. Darüber hinaus stellt der histologische Effekt, der zeigt, dass es eine Verhinderung der Mastzellendegranulation gab, zusätzliche Daten bereit, welche die Magen-Darm-Anwendungen durch TGFα sowie die funktionellen Peptide von Formel I, Formel II, Formel III und Formel IV, die TGF-α-Aktivität aufweisen, unterstützen.

BEISPIEL 4

Immunspezifische Krankheiten

[0081] Außerdem resultierte TGF-α-Aktivität nach der Verabreichung an Mäuse nach Immunsuppremierung aus CP-Verabreichung in der Stimulierung der Proliferation von ausgewählten Immunzellen (insbesondere der T-Zellen-Abstammungslinie). Die stimulierten Immunzellen wurden phänotypisch als CD4-positive T-Zellen und als CD4-negative, CD8-negative Doppelnull T-Zellen-Vorläufer identifiziert. TGF-α-Aktivität (z.B. aus TGF-α57 Verabreichung) resultierte daher in der Erzeugung von T-Zellen mit Eigenschaften, die Immunfunktionen regulieren. Diese Daten sagen daher voraus, dass TGF-α-Aktivitat und die funktionellen Peptide von Formel I, Formel II, Formel III und Formel IV in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen durch die Abschwächung von entzündlichen Überreaktionen wirkungsvoll sein werden. Die in vivo-Aktivität von TGFα (und der funktionellen Peptide von Formel I, Formel II, Formel III und Formel IV) ist es, frühe T-Zell-Vorläufer zur Freisetzung von TH-1- und TH-2- Cytokinen und diese Regulation von Immunphänomenen zu stimulieren. Die Stimulation von ausgewählten Immunzellen, insbesondere von Zellen der T-Zellen-Abstammungslinie, wurde beständig in Mäusen beobachtet, die CP und TGF-α57 in lymphoiden Gewebe, Peyer-Haufen und der Milz erhielten. Rekrutierung der Hilfe über CD4-Zellen frischt in manchen Fällen ferner die Immunsystemfunktion im Allgemeinen auf.

[0082] TGF-α-Verabreichung verhinderte Mastzellen-Degranulation und anschließende Histaminfreisetzung. Außerdem hat TGF-α Wirkung auf die Herunterregulation von TGF-α-Rezeptoren in vivo und der Herunterregulation von IL-6 und MIP in vivo, einschließlich der Blockierung des Neutrophilen-Traffiking. Das ist eine parallele Aktivität, die zusätzlich zur anti-entzündlichen Magen-Darm-Aktivität und der Vorbeugung vor Mukositis durch TGF-α (und der funktionellen Peptide von Formel I, Formel II, Formel III und Formel IV), wie hierin beschrieben, vorliegt.

BEISPIEL 5

[0083] Um die Wirkung der TGF-α-Polypeptide auf Gewichtsverlust zu bestimmen, wurden vier Rattengruppen untersucht. Das Experiment wurde entworfen, um zwei der Peptide von TGF-α (SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 3) auf Gewichtsverlust in der Anwesenheit eines chemotherapeutischen Arzneistoffs, Cisplatin, zu testen.

[0084] Alle Tiere erhielten Dosierungen über eine Dauer von 5 Tagen. Gruppe 1-Tiere erhielten Cisplatin zu 10 µg/g, Gruppe 2-Tiere erhielten Cisplatin zu 10 µg/g mit TGF-α (SEQ ID NO:1) zu 50 ng/g; Gruppe 3-Tiere erhielten Cisplatin zu 10 µg/g mit TGF-α57 (SEQ ID NO: 3) zu 50 ng/g; und Gruppe 4-Tiere erhielten TGF-α (SEQ ID NO: 1) zu 50 ng/g. Nach Beendigung des Dosierungsprotokolls wurden Tiere von jeder Gruppe gemessen und Organe/Gewebe wurden geerntet und in gepuffertes Formalin gelegt. Die gemessenen Gewebe umfassten Lungen, Milzen, Nieren, Bauchspeicheldrüse, Därme und Zungen.

[0085] In den 9 Tieren in Gruppe 1 (Cisplatin-Behandlung) war der durchschnittliche Gewichtsverlust 18,3%; in den 13 Tieren in den Gruppen 2 und 3 (Cisplatin + TGF) war der durchschnittliche Gewichtsverlust 12,1 % und in den 6 Tieren in Gruppe 4 (TGF alleine) war der durchschnittliche Gewichtsverlust 0,9% (**Fig. 5**).

[0086] Außerdem wurden Studien von TGF-α für die Behandlung von Durchfall in nicht-menschlichen Primaten durchgeführt. Ein 6 Jahre alter nicht-menschlicher Primat, der chronische entzündungsähnliche Magen-Darmsymptome zeigte, wurde mit TGF-α zu 300 ng/g einmal intraperitoneal und anschließend mit 50 ng/g subkutan für 6 Tage behandelt. Der Primat zeigte einen beständigen Anstieg in Stuhlkonsistenz und der Affe zeigte beständige Gewichtszunahme während der Behandlungsdauer (siehe Tabelle 1 und 2). Diese Gewichtszunahme wurde mindestens für mehrere Wochen nach der Behandlung beibehalten. Außerdem korreliert die Reduktion von SEGs (siehe Spalte 6, Tabelle 1) Neutrophilen mit einer Reduktion der Entzündung, die mit dem Neutrophilen Einstrom und gleichzeitig vorhandenen pro-entzündlichen Cytokinen in Zusammenhang steht. Keine nachteiligen Effekte wurden in der Hämatologie oder Serum-Chemie oder in der Einstellung, dem Verhalten oder Appetit des Primaten beobachtet.

TABELLE 1

Zeit	Gewicht	Hämo-globin	pcv %	weisse Blut-zellen	Seg.	Banden	Lymph.	Mono-cyten	Eosino	Baso	anbnorme Zellen	Blut-Plättchen	$CD4^+$	$CD8^+$	Dual $CD8^+$ $CD4^+$
1	5.80	12.6	40.3	16.6	76%	0%	19%	5%	0%	0%	0%	543	28.4%	56.3%	6.7%
2	6.33	11.1	38.0	20.2	69%	0%	20%	10%	1%	0%	0%	567			
3	6.74	9.2	32.1	10.3	61%	0%	34%	4%	1%	0%	0%	456	36.7%	53.1%	6.3%
4	8.21	10.3	34.2	8.4	48%	0%	42%	9%	1%	0%	0%	534	31.3%	54.0%	9.1%
5	8.93	10.8	37.1	11.2	46%	0%	45%	8%	0%	1%	0%	425	33.4%	49.8%	8.1%
6	9.42	11.5	38.1	15.5	56%	1%	31%	11%	1%	0%	0%	434	35.1%	50.3%	7.7%

TABELLE 2

Zeit	Na^+	K^+	Cl	Glu	BUN	Creatin	Gesamt-Protein	Albumin	Albumin korrigiert	Billirubin gesamt	Ca^{2+}	Alk. Phos.	ALT (GPT)	AST (GOT)	GGT
1	133	3.3	87	73	45	0.6	8.6	4.9	5.9	1.2	11.6	103	8	26	57
2	144	4.8	95	51	19	0.5	7.4	3.7	4.4						
3	146	4.6	107	68	16	0.5	7.2	2.9	3.5	0.3	9.8	116	17	45	89
4	150	4.4	107	50	19	0.7	7.1	2.9	3.5	0.3	9.7	130	25	34	91
5	148	4.0	108	25	18	0.6	6.6	2.5	3.0	0.2	9.1	107	19	37	64
6	145	3.8	108	21	22	0.5	7.0	2.5	3.0	0.3	9.3	113	15	34	58

_ Hinweis: Blutzuckerspiegel liegen im Allgemeinen weit unter dem normalen Referenzbereich. Das ist keine Abnormalität. Albuminergebnisse benötigen einen Korrekturfaktor für nicht-menschliche Primaten, der in der zweiten "Albumin korrigiert"-Spalte berechnet ist.

DE 600 35 192 T2 2008.02.14

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Stem Cell Pharmaceuticals, Inc.
TWARDZIK, Daniel
FELKER, Thomas
PASKELL, Stefan

<120> TGF-alpha Polypeptide, funktionelle Fragmente und Verfahren ihrer Verwendung

<130> F 2896 EP

<150> PCT/US 00/11564
<151> 26.04.2000

<150> US 09/299.473
<151> 26.04.1999

<150> US 09/459.813
<151> 13.12.1999

<160> 6

<170> PatentIn Version 3.0

<210> 1
<211> 50
<212> Protein
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Phe Cys
1               5                  10                  15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys
            20                  25                  30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
        35                  40                  45

Leu Ala
    50
```

<210> 2
<211> 50
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 2

```
Val Val Ser His Phe Asn Lys Cys Pro Asp Ser His Thr Gln Tyr Cys
1               5                  10                  15

Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val Gln Glu Glu Lys Pro Ala Cys
            20                  25                  30

Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys Glu His Ala Asp Leu
        35                  40                  45

Asp Ala
    50
```

<210> 3
<211> 57
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220> eine modifizierte menschliche TGF-alpha-Sequenz

<400> 3

```
Ser Leu Ser Leu Pro Ala Met Val Val Ser His Phe Asn Asp Cys Pro
1               5                  10                  15

Asp Ser His Thr Gln Phe Cys Phe His Gly Thr Cys Arg Phe Leu Val
            20                  25                  30

Gln Glu Asp Lys Pro Ala Cys Val Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Ala
        35                  40                  45

Arg Cys Glu His Ala Asp Leu Leu Ala
    50                  55
```

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> künstliche Peptidsequenz

<220>
<221> Variante
<222> (1)..(10)
<223> Xaa bei Rest 1, 5, 7 bis 9 ist unabhängig V, G oder A; Xaa bei Rest 6 ist Y oder F; und Xaa bei Rest 10 Ist R oder K

<400> 4

```
Xaa Cys His Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
1               5                  10
```

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> künstliche Peptidsequenz

<220>
<221> Variante
<222> (1)..(7)
<223> Xaa bei Rest 1 und 4 ist E oder D; Xaa bei Rest 3 und 7 ist V, G oder A; Xaa bei Rest 5 ist L oder I; und Xaa bei Rest 6 ist D oder E

<400> 5

```
Xaa His Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
```

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> künstliche Sequenz

<220>
<223> künstliche Peptidsequenz

<220>
<221> Variante
<222> (1)..(18)
<223> Xaa bei Rest 1, 5, 7-9, 14, 18 ist unabh. V, G oder A; Xaa bei Rest 6 ist Y oder F; Xaa bei Rest 10 ist R oder K; Xaa bei Rest 12, 15 ist unabh. E oder D; Xaa bei Rest 16 ist L oder I; Xaa bei Rest 17 ist D oder E

<400> 6

```
Xaa Cys His Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa His Xaa Xaa Xaa
1               5                   10                  15

Xaa Xaa
```

Patentansprüche

1. Verwendung eines Peptids bestehend aus Aminosäuren 33-50 der SEQ ID NO: 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung von Mukositis des Magen-Darm-Trakts, die von einer cytotoxischen oder immunsupprimierenden Therapie herrührt.

2. Verwendung eines Peptids bestehend aus Aminosäuren 33-50 der SEQ ID NO: 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer entzündlichen Darmkrankheit, von Colitis oder Crohn's Krankheit des Magen-Darm-Trakts.

3. Verwendung eines Peptids bestehend aus Aminosäuren 33-50 der SEQ ID NO: 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung oder Vorbeugung einer entzündlichen Reaktion einer Autoimmunerkrankung.

4. Verwendung eines Peptids bestehend aus Aminosäuren 33-50 der SEQ ID NO: 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung einer neurodegenerativen Erkrankung oder zur Behandlung einer CNS-Erkrankung oder -Funktionsstörung, wobei die CNS- Erkrankung oder -Funktionsstörung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CNS-Ischämie, Rückenmarksverletzung, multipler Sklerose und Netzhautverletzung.

5. Verwendung eines Peptids bestehend aus Aminosäuren 33-50 der SEQ ID NO: 1 für die Herstellung eines Arzneimittels zur Verstärkung der Blutbildung während einer cytotoxischen oder immunsupprimierenden Therapie, wobei das Arzneimittel gegebenenfalls ferner einen zweiten hämatopoetischen Wachstumsfaktor umfasst, um mehr reife hämatopoetische Vorläuferzellen zu stimulieren, wobei der zweite hämatopoetische Wachstumsfaktor ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Erythropoietin, Thrombopoietin, G-CSF (Granulocyten-koloniestimulierender Faktor) und GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor).

6. Verwendung gemäß Anspruch 5, wobei die hämatopoetischen Zellen Erythrocytenvorläufer, Thrombocytenvorläufer, Vorläufer von Immunblutzellen oder eine Kombination davon sind.

7. Verwendung gemäß Anspruch 6, wobei die Zellen T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen oder eine Kombination davon sind.

8. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das Arzneimittel verwendet werden soll, um eine menschliche Person zu behandeln.

9. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei die cytotoxische Therapie eine Cisplatin-Therapie ist.

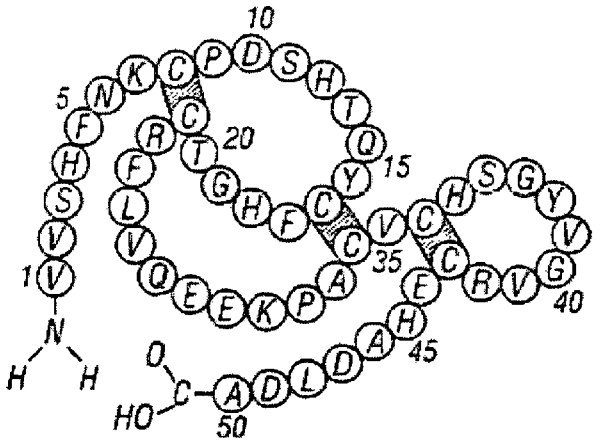
10. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei die T-Zellen CD4-positive Zellen sind.

11. Verwendung gemäß Anspruch 7, wobei die T-Zellen Doppelnull-CD4-negative und -CD8-negative T-Zell-Vorläufer sind.

12. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei die Autoimmunerkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Typ II (jugendlicher) Diabetes, rheumatoider Arthritis, Lupus, Glomerulonephritis und multipler Sklerose.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



TGFα

FIG. 1

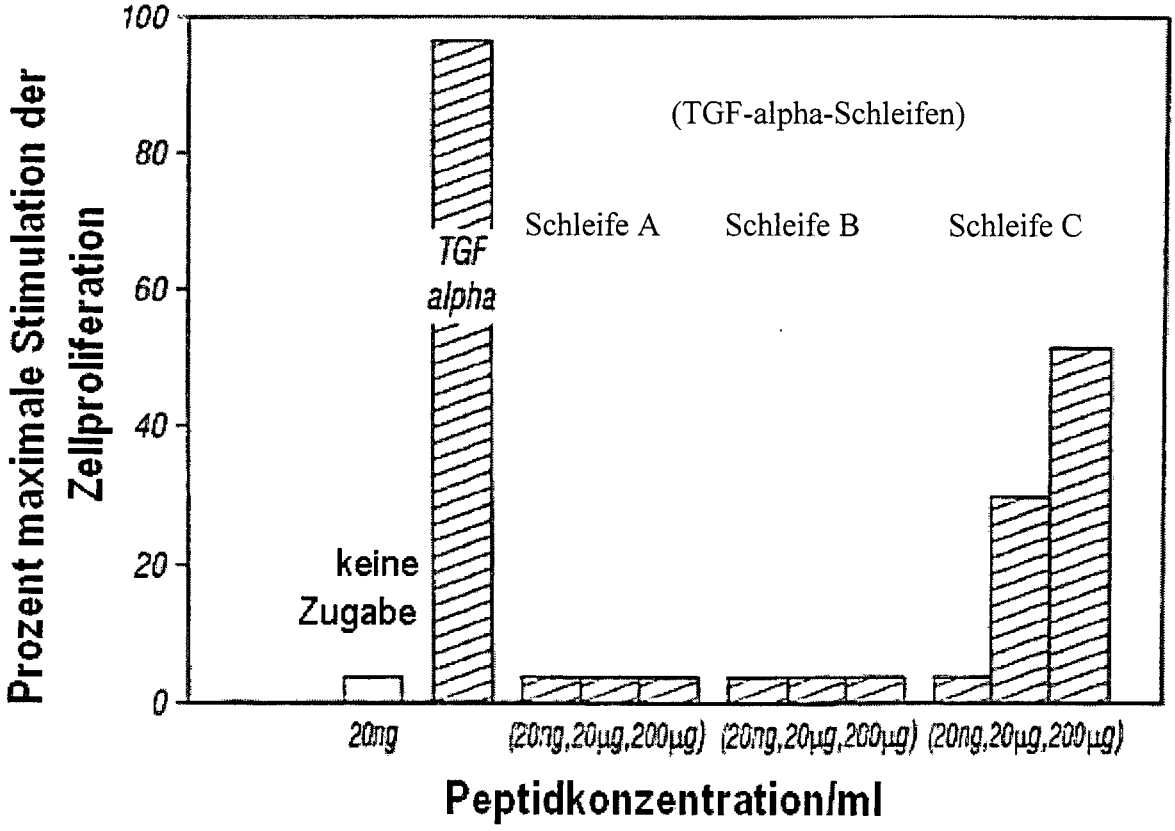


FIG.2

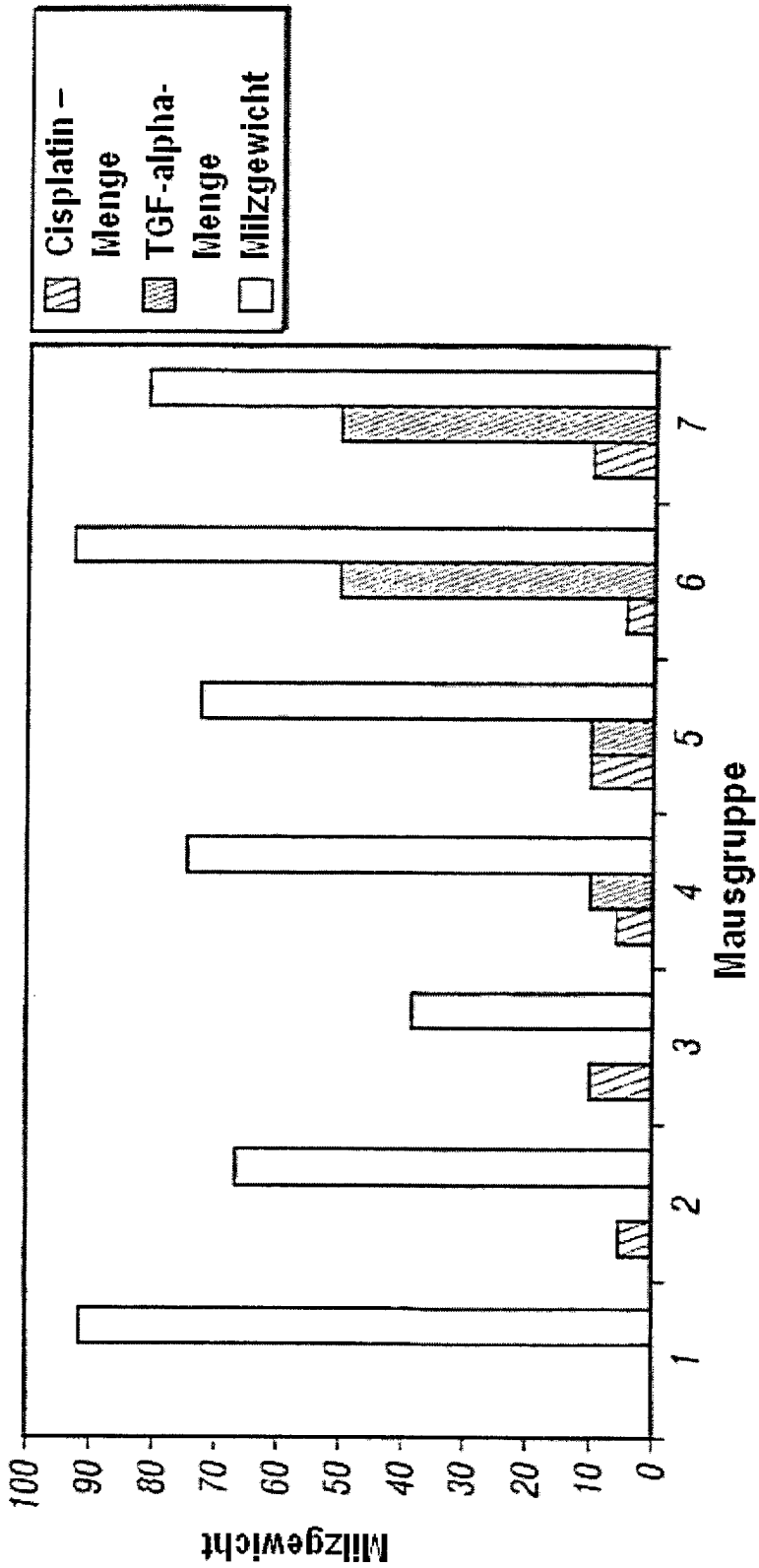

Cisplatin – Menge
TGF-alpha-Menge
Milzgewicht
Milzgewicht
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
2
3
4
5
6
7
Mausgruppe

FIG. 3

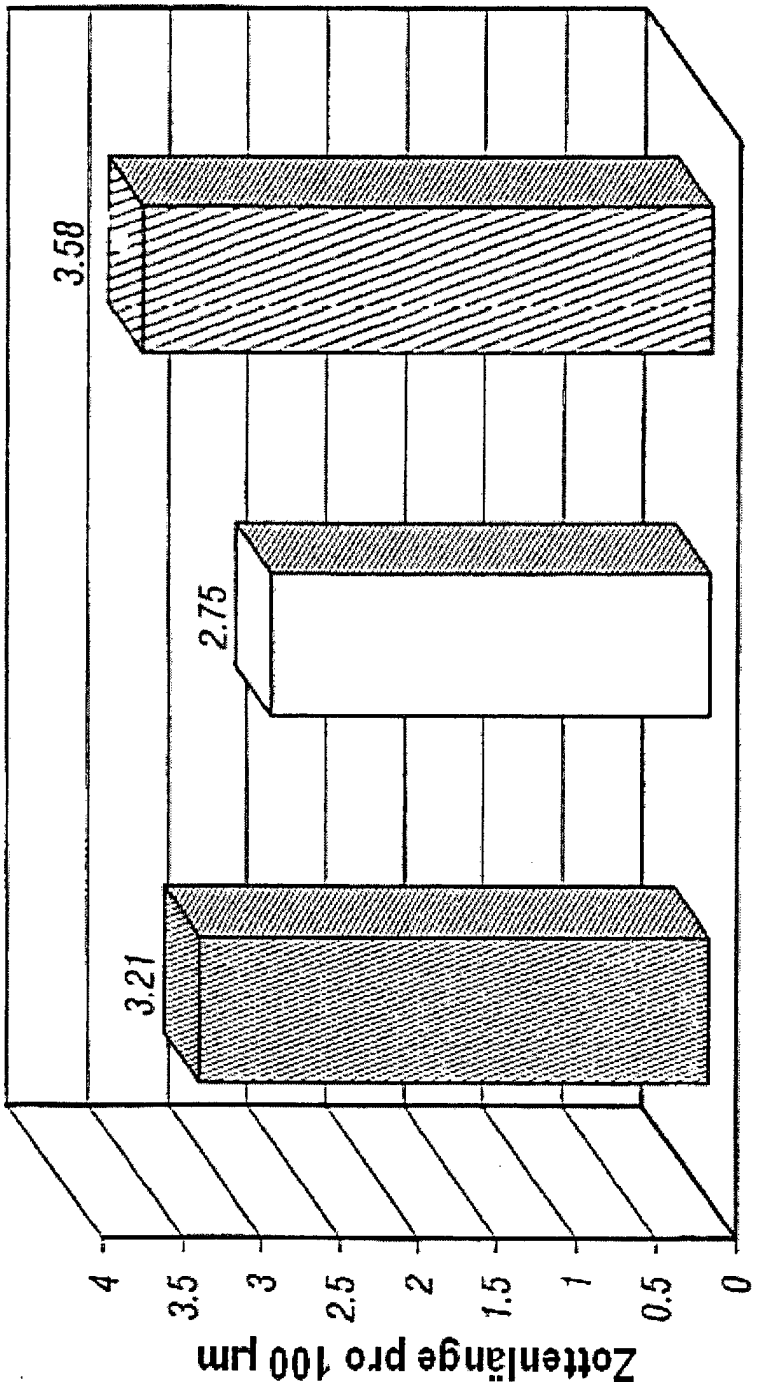

Zottenlänge pro 100 µm
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
3.21
2.75
3.58
0/0
10/0
10/50
Behandlungen mit TGF-alpha

FIG. 4

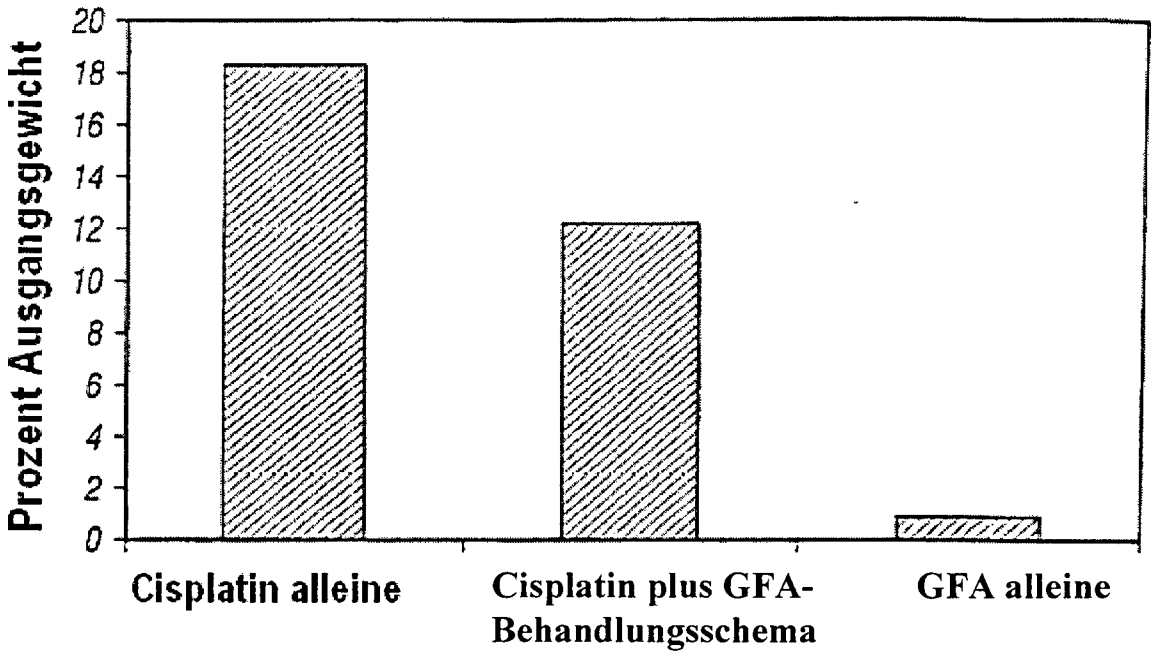

Prozent Ausgangsgewicht
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
Cisplatin alleine
Cisplatin plus GFA-Behandlungsschema
GFA alleine

FIG. 5

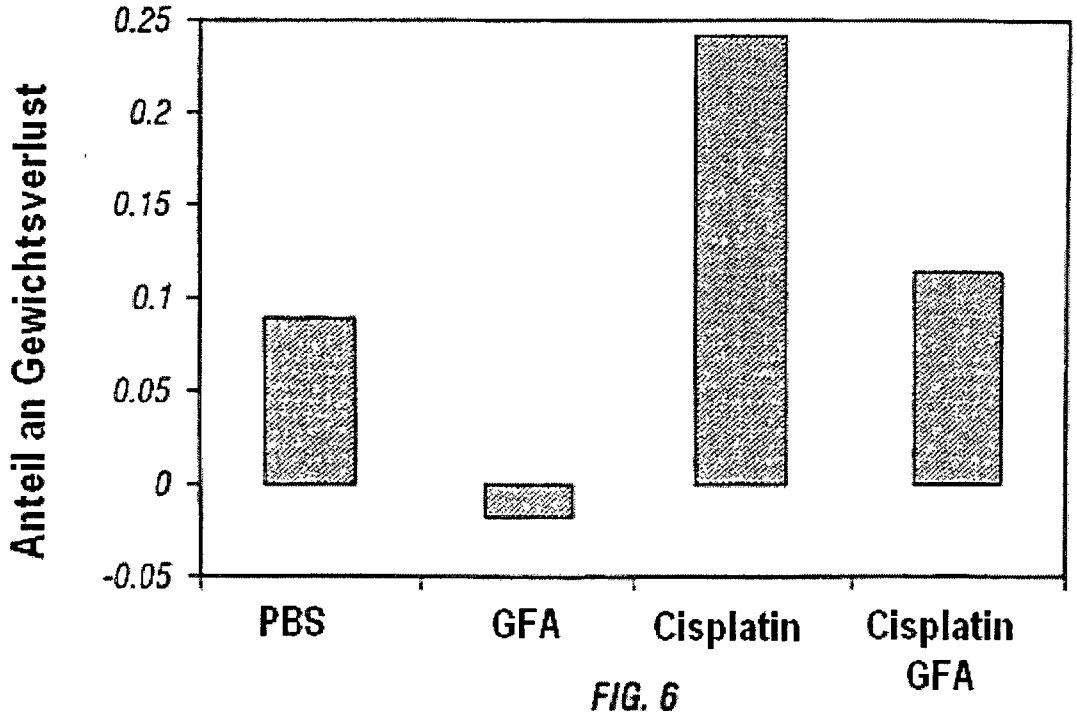

Anteil an Gewichtsverlust
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
PBS
GFA
Cisplatin
Cisplatin GFA

FIG. 6