

70.553/SZE

H 2

A béta-lipotropin és felhasználása

KIVONAT

A találmány tárgyát a béta-lipotropinnal kapcsolatban levő izolált nukleinsavak, vektorok, transzformált gazdasejtek, analógok, funkcionális fragmensek és fúziós fehérjék képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a béta-lipotropint vagy fragmenseit és/vagy analógjait tartalmazó gyógyászati készítmények, valamint a cukorbetegség és annak komplikációi kezelésére alkalmas eljárások, a béta-lipotropin hatékony mennyiségének beadásával.

H 2

2001.02.16.

70.553/SZE

A béta-lipotropin és felhasználása

A jelen találmány tárgyát a béta-lipotropin, annak fragmensei és analógjai képezik, valamint az ezeket használó gyógyászati készítmények és eljárások, amiket a cukorbetegség és más, ezzel rokon betegségek kezelésére lehet használni emősőkben.

A proopiomelanokortin egy neuropeptid prekursor molekula, ami a szekréciós bioszintézis utakba transzlokálódik a neuroendokrin sejtekben. A proopiomelanokortint specifikus endopeptidázok hasítják, így kapunk különböző peptideket, azaz például az adrenokortikoid hormont (ACTH), a béta-lipotropint (BLT), a béta-endorfin és a melanocita stimuláló hormont (MSH). A proopiomelanokortin processzáldása egy vagy több specifikus peptiddé egy szövetben vagy sejtben játszódik le, specifikus módon [M. Castro és E. Morrison: Crit. Rev. Neurobiol. 11, 35-57 (1997); Roberts, J.L. és Herbert, E.: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74, 4826 (1977); Roberts, J.L. és Herbert, E.: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74, 5300 (1977); Mains és Mtsai: Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74, 3014 (1977)]. A proopiomelanokortin főleg az agyalapi mirigyben és a hipotalamuszban keletkezik. A proopiomelanokortin poszttranszlációs módosítása az agyalapi mirigy elülső lebenyében termeli az adrenokortikoid hormont és a béta-lipotropint. Másrészt viszont, az agyalapi mirigy közbenső lebenyének fő termékei az alfa-melanocita stimuláló hormon, a CLIP, a gamma-lipotropin, a béta-endorfin és a béta-melanocita stimuláló hormon, míg a hipotalamuszban a proopiomelanokortin elsődlegesen gamma-melanocita stimuláló hormonná és béta-endorfinná processzáldódik.

A proopiomelanokortin eredetű peptidek számos fontos szerepet játszanak a metabolikus és fiziológiai szabályozásban. Például az adrenokortikoid hormon, ami egy 39 aminosavból álló peptid, serkenti a glükokortikoidok szekrécióját a mellékvese kéregből. Az melanocita stimuláló hormonok viszont serkentik a



melanin melanociták által való szintézisét a bőrben, valamint úgy tűnik, hogy a zsírok metabolizmusában is szerepet játszanak. A béta-endorfin a béta-lipotropin C-terminálisából származik (a humán szekvencia 58-89-es csoportjai), és fájdalomcsillapító hatással rendelkeznek, amit a naloxon, a morfin egy ismert antagonistája antagonizál. Tehát a proopiomelanokortin eredetű peptid hormonok eltérő szerepet játszanak a fiziológiás és metabolikus szabályozásban.

A helyes glükóz és fűtőanyag metabolizmus függ a nem proopiomelanokortin eredetű peptidtől, az inzulintól. Specifikusan, az inzulin serkenti a glikogén, a zsírsav és a fehérje szintézisét, és emellett serkenti a glikolízist is. Az inzulin kritikus a glükóz izomba és zsírsejtekbe való belépésének elősegítésében.

A defektív inzulin metabolizmus cukorbetegséget okozhat. Az 1-es típusú cukorbetegség exogén inzulin bevitelét igényli a fűtőanyag és a glükóz metabolizmus helyes szabályozása céljából. Másrészt viszont, a 2-es típusú cukorbetegség általában nem igényel exogén inzulint, egészen a betegség késői stádiumáig. A glükóz és a fűtőanyag metabolizmus helyes szabályozása esszenciális a cukorbetegség hatékony kezeléséhez. Ennek súlyos, még akár halálos következményei is lehetnek, beleértve a ketoacidózist, kómát, retinopátiát, diabetikus mikroangiopátiát, atheroszklerózist, szívizom infarktust, sztrókot, gangrénát, hipertrigliceridémiát, hiperkoleszterolémiát, kardiomiopátiát, dermopátiát, diabetikus láb szindrómát, nefropátiát, húgyúti fertőzést, papilláris nekrozist, szürkehályogot, diabeteszes gasztroenteropátiát, székrekedést, perifériális érbetegséget, vagy éppen a halált. Számos esetben finom egyensúlyt kell tartani a túl sok inzulin és a túl kevés inzulin beadása között. Ennek következtében a cukorbetegség egy ideális terápiája az lenne, ami úgy szabályozza a vércukor szintjét, hogy javítja az inzulinra való érzékenységet.

Az alábbiakban ismertetünk egy kezelési módot, és egy gyógyászati készítményt, ami hatékonyan kezeli vagy megelőzi az 1-es és 2-es típusú cukorbetegséget, valamint az ehhez kapcsolódó komplikációkat, ami abból áll, hogy hatékony mennyiséget



adunk be a béta-lipotropinból és/vagy fragmenseiből és/vagy analógjaiból.

A jelen találmány tárgyát izolált fehérjék képezik, amik lehetnek béta-lipotropin (BLT), annak analógjai, fragmensei, az ezeket kódoló nukleinsavak, valamint a béta-lipotropin előállítás és a cukorbetegség valamint az ahhoz kapcsolódó komplikációk kezelésében való alkalmazási eljárás.

Az alábbiakban a cukorbetegség és az ahhoz kapcsolódó komplikációk emlősökben, beleértve az embert is, kezelésére szolgáló eljárásokat ismertetjük, amiknek során a béta-lipotropin, annak analógjai vagy funkcionális fragmensei gyógyászatilag hatékony mennyiségét adjuk be. A találmány tárgyát képezik továbbá az 1-es típusú és 2-es típusú cukorbetegség, retinopátia, diabeteszes mikroangiopátia, atheroszklerózis, szívizom infarktus, hipertrigliceridémia, hiperkoleszterolémia, kardiomiopátia, dermopátia, diabeteszes láb szindróma, nefropátia, húgyúti fertőzés, papillária nekrozis, szürkehályog, diabeteszes gasztroenteropátia, székrekedés és a perifériális érbetegségek kezelési módjai.

Az alábbiakban a béta-lipotropin *Escherichia coli*-ban és élesztőben való előállítását ismertetjük. *Escherichia coli*-ban a béta-lipotropint fúziós fehérje formájában állítjuk elő, amit a sejtlizátumokból lehet kinyerni magas sókoncentráció mellett, hagyományos tisztítási módszerekkel. A béta-lipotropin fúziós fehérje tartalmaz egy felismerési helyet specifikus proteázok számára, amiket a fúziós partnernek a béta-lipotropintól való elválasztására használunk. A *Pichia pastoris* élesztőben a fúziós fehérje a sejtől való szekréció során hasad le, oly módon, hogy a természetes béta-lipotropin érintetlenül kinyerhető a tenyésztő közegből.

A jelen találmány egyik megvalósítási módja szerint a találmány tárgya egy lényegében tiszta fehérje, aminek az aminosav szekvenciája megegyezik a 2. számú szekvenciavázlaton, 5. számú szekvenciavázlaton vagy a 7. számú szekvenciavázlaton bemutatott aminosav szekvenciával.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy izolált nukleinsav vegyület, ami egy fúziós fehérjét vagy



egy béta-lipotropint tartalmazó rekombináns fehérjét vagy peptidet kódol.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya legalább egy izolált nukleinsav vegyület, ami egy, a jelen találmány szerinti fehérjét vagy peptidet kódol.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy vektor, ami egy, a jelen találmány szerinti izolált nukleinsav vegyületet tartalmaz.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy vektor, ami a találmány szerinti izolált nukleinsav vegyületet tartalmazza, azzal jellemezve, hogy az említett izolált nukleinsav molekula működés szempontjából egy promoter szekvenciához kapcsolódik.

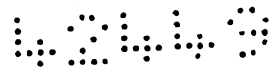
Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy gazdasejt, ami a jelen találmány szerinti vektort tartalmazza.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás egy olyan rekombináns gazdasejt előállítására, aminek megvan a potenciálja, hogy a béta-lipotropint expresszálja, azzal jellemezve, hogy az említett módszer abban áll, hogy az említett gazdasejtbe bármilyen megfelelő módszerrel bejuttatunk egy találmány szerinti vektort.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás béta-lipotropin expresszálására egy rekombináns gazdasejtben, azzal jellemezve, hogy az említett módszer abban áll, hogy az említett rekombináns gazdasejtet a gén expressziójához megfelelő körülmények között tenyésztjük.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy gyógyászati készítmény, ami aktív adalékanyagként béta-lipotropin analógot tartalmaz, valamint annak funkcionális fragmentjét, ami egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hordozóval, töltőanyaggal vagy higítószerrel van kapcsolatban.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy gyógyászati készítmény, amiben az említett béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmentje, humán béta-lipotropin.



Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense, cukorbetegség vagy annak komplikációinak kezelésére.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát a béta-lipotropin inzulinotróp aktivitásával rendelkező fragmensei képezik.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát egy inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid képezi, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9-13. számú szekvencia.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát egy inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid képezi, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 14-25. számú szekvencia.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy, az itt ismertetett béta-lipotropin peptidnek egy funkcionális analógja.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás cukorbetegség kezelésére, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatásos mennyiséget adunk be legalább egy peptidből, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9-25. számú szekvencia.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás cukorbetegség kezelésére, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatásos mennyiséget adunk be legalább egy peptidből, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9-13. számú szekvencia.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy gyógyászati készítmény, ami aktív adalékanyagként legalább egy, inzulinotróp aktivitással rendelkező peptidet tartalmaz, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9-25. számú szekvencia.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás cukorbetegség kezelésére emlősben, beleértve az embert is, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatásos mennyiséget adunk be béta-lipotropinból, annak analógiából vagy funkcionális fragmenseiből.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás a vércukor-szint csökkentésére emlősben, azzal jelle-



mezve, hogy hatékony mennyiséget adunk be béta-lipotropinból, annak analógjából vagy funkcionális fragmenseiből.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás hiperglikémia kezelésére emlősben, azzal jellemezve, hogy hatékony mennyiséget adunk be béta-lipotropinból, annak analógjából vagy funkcionális fragmenseiből.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás hiperinzulinémia kezelésére emlősben, azzal jellemezve, hogy hatékony mennyiséget adunk be béta-lipotropinból, annak analógjából vagy funkcionális fragmenseiből.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás az inzulin-érzékenység növelésére emlősben, azzal jellemezve, hogy hatékony mennyiséget adunk be béta-lipotropinból, annak analógjából vagy funkcionális fragmenseiből.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya egy szilárd fázisú szintetikus módszer béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense szintézisére.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya eljárás béta-lipotropin előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) egy megfelelő gazdaszervezetet egy expressziós vektorral transzformálunk, amely szóbanforgó vektor béta-lipotropint, annak analógját vagy funkcionális fragmensét kódolja;
- ii) az említett transzformált gazdaszervezetet olyan körülmények között szaporítjuk, amik lehetővé teszik az említett béta-lipotropin expresszióját;
- iii) az említett béta-lipotropint bármilyen megfelelő módszerrel tisztítjuk.

Egy másik megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgya a béta-lipotropin aktivitás vizsgálatára alkalmas eljárás, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) egy inzulin érzéketlenséget és megnövekedett vércukor-szintet mutató emlősnek egy vizsgált fehérjét adunk be; és
- ii) az i) lépés után vizsgáljuk a vércukor-szinteket és az inzulin-szinteket.



A jelen találmány tárgya továbbá eljárás az I-es vagy II-es típusú cukorbetegség és az azzal kapcsolatban álló komplikációk kezelésére emlősökben, azzal jellemezve, hogy béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense hatékony mennyiségét adjuk be.

Az alábbiakban ismertetjük a leírásban alkalmazott szakkifejezések jelentését.

Az "analóg" vagy "funkcionális analóg" szakkifejezés a béta-lipotropin módosított formájára vonatkozik, amiben legalább egy aminosav cserét hajtottunk végre, oly módon, hogy az említett analóg lényegében megtartja ugyanazt a biológiai aktivitást, mint amivel a módosítatlan béta-lipotropin *in vivo* és/vagy *in vitro* rendelkezik.

A "bid" vagy "b.i.d" szakkifejezés a béta-lipotropin vagy más, naponta kétszer beadott vegyület dózisára vonatkozik.

A "BLT" jelentése béta-lipotropin. A humán BLT 89 aminosav csoportból áll (8. számú szekvencia). A béta-lipotropin fehérjét számos különböző szervezetben leírták, és aminosav szekvenciáját is leírták számos különböző szervezetben, beleértve az embert, az egeret, a birkát és a sertést [Li és Chung: Nature 260, 622-624 (1976)], valamint elefántban [Li és mtsai: Int. J. Peptide Prot. Res. 32, 573-578 (1988)], és más emlősökben, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A "béta-lipotropin fúziós fehérje" vagy "BLT fúziós fehérje" szakkifejezés a hibrid rekombináns fehérjemolekulák olyan csoportjára vonatkozik, amiket *Escherichia coli*-ban vagy más sejttípusban állítottak elő, és amikből a béta-lipotropin vagy egy béta-lipotropin fragmens specifikus hidrolízissel vagy kémiai hasítással előállítható. A béta-lipotropin fúziós fehérjék az alábbi csoportból választhatók ki: 2. számú szekvencia, 5. számú szekvencia és 7. számú szekvencia.

A "komplementer" vagy "komplementaritás" szakkifejezések jelentése az alábbiakban a purin- és pirimidin nukleotidoknak arra a képességére vonatkozik, hogy hidrogén-kötéseken keresztül asszociálódnak, így kétszálú nukleinsav molekulákat képeznek. Az alábbi bázispárok komplementerek: guanin és citozin; adenin és timin; valamint adenin és uracil. A továbbiakban a



“komplementer” szakkifejezés azt jelenti, hogy az előzőekben említett kapcsolat lényegében az összes bázispárra vonatkozik, amik két egyszálú nukleinsav molekulát alkotnak, az említett molekula teljes hosszában. A “részlegesen komplementer” szakkifejezés is az előzőekben említett kapcsolatra vonatkozik, amiben a két egyszálú nukleinsav molekula közül az egyik rövidebb mint a másik, oly módon, hogy a molekulák egyike egyszálú marad.

A “komplikációk” vagy “amiknek a komplikációi” szakkifejezés a továbbiakban olyan állapotokra, tünetekre, kapcsolt betegségekre, gyengélkedésekre, vagy hasonlókra vonatkozik, amik a defektív inzulin metabolizmushoz vagy defektív szénhidrát metabolizmushoz, azaz például a defektív glükóz metabolizmushoz, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, az I-es és II-es típusú cukorbetegséget is, kapcsolódó egy vagy több betegségek, tünetek vagy állapotok. A komplikációk közé tartozik a ketoacidózis, a kóma, a retinopátia, a diabeteszes mikroangiopátia, az atheroszklerózis, a szívinfarktus, a sztrók, a gangréna, a hipertrigliceridémia, a hiperkoleszterolémia, a kardiomiopátia, a húgyúti fertőzés, a papilláris nekrozis, a szürkehályog, a diabeteszes gasztroenteropátia, a székrekedés és a periferiális érbetegség.

A “konzervatív helyettesítés” vagy “konzervatív aminosav helyettesítés” szakkifejezés egy vagy több aminosav csoportnak a helyettesítését jelenti egy fehérjében vagy egy peptidben, amint az az 1. táblázatban látható.

A “fragmensei” szakkifejezés jelentése egy peptid vagy egy nukleinsav fragmense, darabja vagy al-régiója, oly módon, hogy a fragmens 2 (két) egybefüggő aminosavat tartalmaz, vagy egy másik változat szerint körülbelül 5-14 vagy több aminosavat; vagy 10 vagy több nukleotidot, amik egybefüggőek a kiindulási peptidben vagy nukleinsav molekulában. A fragmensek vagy megtartják a biológiai aktivitásukat vagy nem. Az itt ismertetett fragmens vagy peptid használható antigénként, hogy specifikus ellenanyagot készítsünk vele az ellen a kiindulási peptiddel szemben, amiből a fragmens származik. Ha egy nukleinsavról beszélünk, akkor a “fragmense” szakkifejezés 10 vagy több egybefüggő nukleotidot jelent, ami a kiindulási nukleinsavból



származik, valamint, a genetikai kód alapján a komplementer szekvenciája. Ha például a fragmens az 5'-AGCTAG-3' szekvenciával rendelkezik, akkor a "fragmense" szakkifejezés vonatkozik a komplementer, 3'-TCGATC-5' szekvenciára is.

A "füziós fehérje" szakkifejezés egy hibrid fehérje molekulát jelent, ami nem található meg a természetben, és tartalmaz egy transzlációs fúziót vagy enzimátikus fúziót, amiben két vagy több fehérje, vagy ezek fragmensei kovalens kötéssel kapcsolódnak össze egyetlen polipeptid láncná.

A "füziós partner" szakkifejezés a béta-lipotropin fúziós fehérjében egy olyan szekvenciára vonatkozik, amely említett szekvencia nem származik a béta-lipotropinból, azaz például ebben a leírásban 6. számú szekvenciaként azonosított szekvencia.

A "funkcionális fragmens" vagy "funkcionálisan ekvivalens fragmens" szakkifejezés a leírásban egy teljes hosszúságú béta-lipotropin egy régiójára vagy fragmensére vonatkozik, ami megtartja a biológiai aktivitását, azaz azt a képességét, hogy fokozza az inzulin *in vivo* és/vagy *in vitro* aktivitását; és/vagy azt a képességét, hogy elősegítse a vércukor szintjének csökkenését *in vivo*, vagy *in vitro* fokozza a glükóz bejutását egy sejtbe vagy szövetbe. A funkcionális fragmensek rendelkezhetnek a teljes hosszúságú béta-lipotropin által mutatott biológiai aktivitással, *in vivo* és/vagy *in vitro*, úgymint azzal a képességgel, hogy elősegíti a glükóz felvételét és/vagy fokozza az inzulin hatását és/vagy fokozza az inzulin-érzékenységet. A funkcionális fragmenseket elő lehet állítani klónozási technikákkal, vagy kémiai szintézissel, vagy kémiai vagy enzimes hasítással.

A "gazdasejt" szakkifejezés bármilyen olyan eukarióta vagy prokarióta sejtre vonatkozik, ami alkalmas egy olyan vektorban levő klónozott gén szaporítására és/vagy expresszáására, amely vektort az említett gazdasejtbe például transzformációval vagy transzfekcióval vagy hasonlóval juttatunk be.

A "homológ" szakkifejezés két különböző nukleinsav molekula vagy aminosav szekvencia közötti kapcsolatot írja le, amely szekvenciák vagy molekulák az említett molekulákban levő egy vagy több blokkban vagy régióban levő azonosság vagy részleges azonosság és/vagy hasonlóság alapján állnak kapcsolatban.



A "hibridizáció" szakkifejezés az alábbiakban egy olyan eljárásra vonatkozik, amiben egy egyszálú nukleinsav molekula egy komplementer szálhoz kötődik, a nukleotid bázisok közötti párképzés alapján. A "szelektív hibridizáció" szakkifejezés a nagy szigorúságú körülmények között végzett hibridizálásra vonatkozik. A hibridizáció mértéke függ például a homológia mértékétől, a hibridizációs körülmények szigorúságától, valamint a hibridizálódó szálak hosszától.

Az "inzulinotróp" szakkifejezés egy inzulin-fokozó aktivitásra utal, ami például megfordítja vagy enyhíti az inzulin érzéketlenség hatásait.

Az "izolált nukleinsav vegyület" szakkifejezés jelentése bármilyen RNS vagy DNS szekvencia, akár összeállítva akár szintetizálva, aminek az előfordulása eltér a természetes előfordulásától, azaz például egy sejt belsejétől.

A "nukleinsav próba" vagy "próba" szakkifejezés jelentése a továbbiakban egy jelzett nukleinsav vegyület, ami egy másik nukleinsav vegyülettel hibridizálódik. A "nukleinsav próba" szakkifejezés jelentése egy egyszálú nukleinsav szekvencia, ami kombinálódik egy komplementer, vagy részlegesen komplementer egyszálú cél-nukleinsav szekvenciával, kétszálú molekula létrehozásával. Egy nukleinsav próba lehet lehet oligonukleotid vagy egy nukleotid polimer. Egy próba általában tartalmaz egy kimutatható egységet, ami kapcsolódhat a próba végéhez (vagy végeihez), vagy lehet a próba szekvenciájának belsejében.

A "plazmid" szakkifejezés jelentése egy extrakromoszómális genetikai elem. Az itt ismertetett plazmidok kereskedelmi forgalomban vannak, bárki számára korlátlanul hozzáférhetők, vagy előállíthatók könnyen hozzáférhető plazmidokból, a publikált eljárások alkalmazásával.

A "primer" szakkifejezés jelentése egy nukleinsav fragmens, ami beindítja például egy DNS-nek RNS-sé való transzkripcióját. Az indukálható promoter egy olyan promoter, ami környezeti jelekkel, azaz például szénforrással, hővel vagy fémionokkal szabályozható. A konstitutív promoter általában állandó szinten működik, és nem szabályozható.



A "fehérje" és "peptid" szakkifejezést egymás helyett is használhatjuk a leírásban, és jelentése az, hogy két vagy több aminosav csoport kovalens módon, peptid-kötéssel kapcsolódik egymáshoz. Néhány esetben ezek a szakkifejezések 10 aminosavnál nagyobb, (egészen 500 aminosavig) aminosav biopolimereket írnak le, amik peptidkötéssel kapcsolódnak egymáshoz.

A "rekombináns DNS klónozó vektor" szakkifejezés a továbbiakban egy autonóm replikációra képes ágensre utal, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a plazmidokat és fágokat, amik egy olyan DNS molekulát tartalmaznak, amihez egy vagy több további DNS szegmens kapcsolódik vagy kapcsolódhat.

A "rekombináns DNS expressziós vektor", vagy "expressziós vektor" szakkifejezés jelentése a továbbiakban bármilyen rekombináns DNS klónozó vektor, például egy plazmid vagy egy fág, amiben egy promoter vagy más szabályozó elemek vannak jelen, ezzel lehetővé téve a beépített DNS transzkripcióját, ami egy fehérjét kódolhat.

A "szigorúság" szakkifejezés a hibridizációs körülményekre vonatkozik. A nagy szigorúságú körülmények nem előnyösek a nem-homológ bázispárosodáshoz. Az alacsony szigorúságú körülményeknek ellentétes hatásuk van. A szigorúság megváltoztatható a hőmérséklet és a sókoncentráció megváltoztatásával.

Az "alacsony szigorúságú" körülmények jelenthetik például a 37 °C, vagy annál alacsonyabb hőmérséklet, a körülbelül 50%-nál kisebb formamid koncentráció, és egy közepes vagy alacsony sókoncentráció (SSC), vagy egy másik változat szerint körülbelül 50 °C, vagy alacsonyabb hőmérséklet és közepes vagy magas sókoncentráció (SSPE), például 1 mol/l nátrium-klorid.

A "magas szigorúságú" körülmények jelentése például a 42 °C vagy alacsonyabb hőmérséklet, a körülbelül 20 °C-nál alacsonyabb formamid koncentráció, és alacsony sókoncentráció (SSC); vagy, egy másik változat szerint körülbelül 65 °C vagy alacsonyabb hőmérséklet és alacsony sókoncentráció (SSPE). A magas szigorúságú körülmények például az alábbiak lehetnek: hibridizáció 0,5 mol/l nátriumfoszfát, 7% nátrium-dodecil-szulfát (SDS), 1 mmol/l EDTA összetételű oldatban, 65 °C-on [Current



Protocols in Molecular Biology, I. kötet, 2.10.3., szerk.: Ausubel és mtsai, Greene Publishing és Wiley-Interscience: New York (1987)].

Az "SSC" szakkifejezés jelentése egy hibridizációs és mosó oldat. Egy 20×SSC törzsoldat 3 mol/l nátrium-kloridot, 0,3 mol/l nátrium-citrátot tartalmaz, pH=7,0.

Az "SSPE" szakkifejezés jelentése egy hibridizációs és mosó oldat. Egy 1×SSPE oldat összetétele 180 mmol/l nátrium-klorid, 9 mmol/l Na_2HPO_4 , 0,9 mmol/l NaH_2PO_4 és 1 mmol/l EDTA, pH=7,4.

A "lényegében tiszta" szakkifejezés egy fehérjére vonatkoztatva azt jelenti, hogy az említett fehérjét elválasztjuk a többi celluláris és nem-celluláris komponensektől, beleértve a többi fehérjemolekulát is.

Egy lényegében tiszta készítmény legalább 85%-os tisztaságú; előnyösen legalább 95%-os tisztaságú. Egy "lényegében tiszta" fehérjét bármely ismert módszerrel előállíthatunk, beleértve az IMAC fehérje-tisztítási módszert (4,569,794 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk).

A "kezelés" szakkifejezés a továbbiakban egy betegről való gondoskodást, törődést jelent, azzal a céllal, hogy leküzdjünk egy betegséget, állapotot vagy rendellenességet, ide tartozik a jelen találmány szerinti fehérje beadása, azzal a céllal, hogy megelőzzük a tünetek vagy komplikációk felléptét, enyhítsük a tüneteket vagy komplikációkat, vagy elimináljuk a betegséget, állapotot vagy rendellenességet.

Az ebben a specifikációban idézett minden publikációt referenciaként kezelünk.

A béta-lipotropint 1964-ben izolálták birka agyalapi mirigyből, primer szerkezetét a következő évben írták le [Li és mtsai: *Nature* 208, 1093 (1965)]. Attól kezdve a juh, szarvasmarha, birka, egér, sertés tengerimalac, patkány, elefánt és humán béta-lipotropin szerkezetét is leírták [Lohmar és Li: *Biochimica et Biophysica Acta* 147, 381 (1967); Li és Chung: *Nature* 260, 622 (1976); Drouin és Goodman: *Nature* 288, 619 (1980); Li és mtsai: *Int. J. Peptide Prot. Res.* 32, 573-578 (1988); Blake és Li:

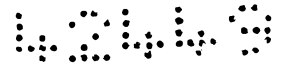


Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 80, 1556-1559 (1983); Takahashi és mtsai: FEBS Letters 135, 97-102 (1981); amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk]]. A szekvencia-adatokból kiderül, hogy a béta-lipotropin C-terminálisa erősen konzerválódott a fajok között. Másrészt viszont jelentős szekvencia-különbségek vannak a különböző fajokból származó béta-lipotropin molekulák N-terminális végén.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a béta-lipotropin fúziós fehérjék, beleértve a humán béta-lipotropint (8. számú szekvencia), vagy a más fajból származó béta-lipotropin, vagy ezek egy funkcionális fragmensét. A példaként említett béta-lipotropin fúziós fehérjéket a későbbiekben a 2. számú szekvenciavázlaton, az 5. számú szekvenciavázlaton és a 7. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be.

A béta-lipotropin funkcionális fragmenseit egyszerűen úgy azonosíthatjuk, mint a béta-lipotropin azon fragmenseit, amik biológiai aktivitással rendelkeznek, azaz például megvan a képességük, hogy enyhítsék a diabeteszes tüneteket, ha egy ilyen kezelésre szoruló emlősnek adják be, vagy csökkentsek a szérum inzulin-szintet, és/vagy fokozzák az inzulin-érzékenységet, és/vagy csökkentsek a vércukor szintjét és/vagy serkentsék a glükóz felvételét a zsírszövetben vagy az izomszövetben, *in vivo* vagy *in vitro*, vagy az adipocitákban *in vitro*. A béta-lipotropin funkcionális fragmensei bármilyen fragmensek lehetnek, amik megtartják a biológiai aktivitásukat, és amik legalább két (2) vagy több aminosav csoportot tartalmaznak, amik néhány esetben egybefüggő szegmenst képeznek a béta-lipotropin fehérjében. Az előnyben részesített fragmensek tartalmazzák a béta-lipotropin egy egybefüggő régió régióját, ami részben vagy teljes egészében a humán béta-lipotropin 59-es és 89-es csoportjai között található (8. számú szekvencia), vagy a nem-humán béta-lipotropin ekvivalens régióját (azaz például a béta-endorfint kódoló régió).

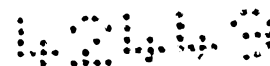
A humán béta-lipotropin funkcionális fragmenseit a továbbiakban a 9-25. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. Az előnyben részesített fragmenseket a 9-13. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be, a leginkább előnyben részesített fragmenseket a 10. számú szekvenciavázlaton, 12. számú szekvenciavázlaton



és 13. számú szekvenciavázlaton mutatjuk be. Néhány esetben egy funkcionális fragmens tartalmazhat a kiindulási béta-lipotropinhoz viszonyítva egy belső deléció, ilyen például a 13. számú szekvencia, amiből a humán béta-lipotropin 7-13-as aminosav csoportjai ki vannak vágva. A funkcionális fragmenseket a szakterületen jártas szakember számára jól ismert szilárd fázisú kémiai szintézissel és/vagy rekombináns DNS technikával lehet előállítani [K. Struhl: "Reverse Biochemistry: Methods and applications for synthesizing yeast proteins *in vitro*", *Methods in Enzymology* 194, 520-535]. Az egyik módszer szerint például a deléciós mutációk átfedő készletét visszük be egy béta-lipotropint kódoló nukleinsavba, oly módon, hogy a peptidet kódoló régió különböző mennyiségét vágjuk ki, a molekulának akár az N-terminálisáról, akár a C-terminálisáról. Ezt a módszert használhatjuk arra is, hogy az érintetlen fehérje belső fragmenseit állítsuk elő, amikből mind a C-terminális mind az N-terminális végeket eltávolítottuk. Az ilyen deléciók előállításához megfelelő nukleázok közé tartozik például a Bal31, vagy egy egyszálú nukleinsav molekula esetében a mungóbab nukleáz. Az egyszerűség kedvéért azt részesítjük előnyben, hogy a béta-lipotropint kódoló nukleinsavat egy egyszálú klónozó vektorba, azaz például M13 bakteriofágba vagy annak ekvivalensébe klónozzuk. Ha szükséges, akkor a kapott deléciós fragmenseket szubklónozzhatjuk bármilyen megfelelő vektorba, bármilyen megfelelő gazdasejtben való szaporítás és klónozás céljából.

A béta-lipotropin funkcionális fragmenseit azonosíthatjuk és vizsgálhatjuk a biológiai aktivitás szempontjából, bármilyen megfelelő módszer alkalmazásával, például vizsgálva azt, hogy egy peptid-fragmens képes-e serkenteni vagy fokozni az inzulin érzéketlenséget és/vagy a sejtek glükóz-felvételét, mind *in vivo* mind *in vitro*.

A béta-lipotropin funkcionális analógjait előállíthatjuk az említett béta-lipotropin, vagy az itt ismertetett bármelyik peptid egy vagy több aminosavának deléciójával, inszerciójával, inverziójával és/vagy helyettesítésével. A helyettesítéses analógokat általában szilárd fázisú vagy rekombináns technikákkal lehet előállítani, amikkel egyetlen vagy többszörös konzervatív aminosav



helyettesítést lehet tenni, például az 1. táblázatnak megfelelően. A többszörös helyettesítések esetében általában az az előnyös, ha egy adott molekulában tíznél kevesebb csoportot változtatunk meg, még előnyösebb, ha egy adott molekulában egy-öt csoportot változtatunk meg, oly módon, hogy a csoportok 90-99%-a egyezzen meg a 8. számú szekvenciával; egy másik változat szerint úgy, hogy a csoportoknak körülbelül 95-99%-a legyen azonos a 8. számú szekvenciával, vagy bármely más, más fajból származó megfelelő béta-lipotropinnal.

Ha például a humán béta-lipotropin (8. számú szekvencia) analógjai egy vagy több aminosav helyettesítést tartalmaznak az 1-89-es aminosav csoportok közötti régióban, akkor ezek az alábbi helyettesítések lehetnek:

az 1-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Asp vagy Gln;

a 2-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Val vagy Met;

a 3-as pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala, Glu, Ser, Pro vagy Gly;

a 4-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Arg, Ala, Leu, Pro vagy Ser;

az 5-ös pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asp, Asn vagy Ala;

a 6-os pozícióban levő csoport lehet Arg, Glu, Leu, Lys, Gln vagy Ala;

a 7-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Pro, Asp, Val, Ile vagy Met;

a 8-as pozícióban levő csoport lehet Arg, Glu, Ala, Tyr, Leu, Lys, Pro, Gln vagy Trp;

a 9-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Pro, Asp, Asn vagy Gln;

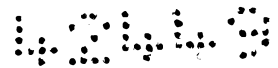
a 10-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Asp;

a 11-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Arg, Pro, Asn, Gln, Ala vagy Glu;

a 12-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Met;

a 13-as pozícióban levő csoport lehet Pro, Glu, Gly vagy Val;

a 14-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Asn, Gln vagy Gly;



- a 15-ös pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Glu;
- a 16-os pozícióban levő csoport lehet Pro, Gln, Leu, Gly vagy Glu;
- a 17-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Asp, Ser vagy Gly;
- a 18-as pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Gln vagy Asn;
- a 19-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Asn vagy Gln;
- a 20-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ser vagy Ala;
- a 21-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Gly, Ser vagy Phe;
- a 22-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Lys;
- a 23-as pozícióban levő csoport lehet Ala, Phe, Thr, Gly, Ser vagy Leu;
- a 24-es pozícióban levő csoport lehet Gln, Arg, Asp, Asn, Leu vagy Val;
- a 25-ös pozícióban levő csoport lehet Ala, Leu, Asp, Ile, Gly, Ser vagy Thr;
- a 26-os pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Gly, Asn, Gln vagy Lys;
- a 27-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Ile, Met, Met vagy Val;
- a 28-as pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asn vagy Asp;
- a 29-es pozícióban levő csoport lehet His, Asn, Tyr, Ala, Gln vagy Glu;
- a 30-as pozícióban levő csoport lehet Ser, Gly, Glu, Ala, Leu vagy Asp;
- a 31-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Val, Met vagy Ile;
- a 32-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Val, Ile, Met vagy Pro;
- a 33-as pozícióban levő csoport lehet Val, Ala, Glu, Leu, Ile, Met vagy Arg;
- a 34-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Ser, Pro, Glu vagy Gly;
- a 35-ös pozícióban levő csoport lehet Ala, Asp, Gly, Ser vagy Leu;



a 36-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Thr, Leu, Asp, Asn vagy Gln;

a 37-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Glu, Thr, Arg, Gln vagy Asp;

a 38-as pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg, Gln vagy Glu;

a 39-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Ala, Asn, Glu, Gln vagy Lys;

a 40-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ser, Asp, Asn, Gln vagy Gly;

a 41-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;

a 42-es pozícióban levő csoport lehet Pro, Gly, Ser vagy Asn;

a 43-as pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe vagy Trp;

a 44-es pozícióban levő csoport lehet Arg, Lys, Gln vagy Glu;

a 45-ös pozícióban levő csoport lehet Met, Ile, Ser vagy Val;

a 46-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asp, Asn, His, Arg vagy Gly;

a 48-as pozícióban levő csoport lehet Tyr vagy Trp;

a 49-es pozícióban levő csoport lehet Arg vagy Lys;

az 50-es pozícióban levő csoport lehet Trp, Tyr vagy Phe;

az 51-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Gln;

az 52-es pozícióban levő csoport lehet Ser, Thr, Asn vagy Ala;

az 53-as pozícióban levő csoport lehet Pro vagy Gly;

az 54-es pozícióban levő csoport lehet Pro, Ala, Gly, Arg, Leu vagy Thr;

az 55-ös pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg, Gln vagy Ala;

az 56-os pozícióban levő csoport lehet Asp, Asn, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ile;

az 57-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

az 58-as pozícióban levő csoport lehet Arg, Gln vagy Lys;

az 59-es pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe vagy Trp;

a 60-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;

a 61-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;
 a 62-es pozícióban levő csoport lehet Phe, Tyr vagy Trp;
 a 63-as pozícióban levő csoport lehet Met, Leu, Ile vagy Val;
 a 64-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala, Ser vagy Lys;
 a 65-ös pozícióban levő csoport lehet Ser, Ala, Thr vagy Pro;
 a 66-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Asp, Asn, Lys
 vagy Gln;

a 67-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg vagy Gln;
 a 68-as pozícióban levő csoport lehet Ser, Ala, Thr vagy Gly;
 a 69-es pozícióban levő csoport lehet Gln, Glu, Asp, Asn,
 Arg vagy His;

a 70-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ser, Ala vagy Lys;
 a 71-es pozícióban levő csoport lehet Pro vagy Gly;
 a 72-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Met vagy Val;
 a 73-as pozícióban levő csoport lehet Val, Leu, Ile vagy Met;
 a 74-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala vagy Ser;
 a 75-ös pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Met vagy Val;
 a 76-os pozícióban levő csoport lehet Phe, Tyr, Trp vagy
 Leu;

a 77-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;
 a 78-as pozícióban levő csoport lehet Asn, Asp, Glu, Gln
 vagy His;

a 79-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Gly, Ser, Ile vagy
 Val;

a 80-as pozícióban levő csoport lehet Ile, Leu, Met, Val vagy
 Thr;

a 81-es pozícióban levő csoport lehet Ile, Met, Val, Thr vagy
 Leu;

a 82-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

a 83-as pozícióban levő csoport lehet Asn, Asp, Glu, Gln
 vagy Ser;

a 84-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Val, Ser, Gly vagy
 Glu;

a 85-ös pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe, Trp vagy
 His;

a 86-os pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

a 87-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

- a 88-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;
- a 89-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, As, Asn vagy

His.

A béta-lipotropinban (8. számú szekvencia) előforduló további specifikus helyettesítések közé tartoznak a 8. számú szekvenciában tett alábbi egyszeres vagy többszörös helyettesítések:

- a 3-as pozícióban levő csoport Glu;
- a 4-es pozícióban levő csoport Arg;
- a 6-os pozícióban levő csoport Gln;
- a 7-es pozícióban levő csoport Pro;
- a 8-as pozícióban levő csoport Glu, Ala vagy Pro;
- a 9-es pozícióban levő csoport Pro vagy Ala;
- a 11-es pozícióban levő csoport Arg vagy Pro;
- a 16-os pozícióban levő csoport Leu vagy Gln;
- a 21-es pozícióban levő csoport Phe;
- a 23-as pozícióban levő csoport Thr, Leu vagy Pro;
- a 24-es pozícióban levő csoport Arg vagy Val;
- a 27-es pozícióban levő csoport Ala;
- a 29-es pozícióban levő csoport Asn, Tyr vagy Ala;
- a 30-as pozícióban levő csoport Glu;
- a 31-es pozícióban levő csoport Ala;
- a 32-es pozícióban levő csoport Ala;
- a 33-as pozícióban levő csoport Ala vagy Glu;
- a 34-es pozícióban levő csoport Pro vagy Ser;
- a 35-ös pozícióban levő csoport Asp;
- a 36-os pozícióban levő csoport Thr vagy Ala;
- a 37-es pozícióban levő csoport Glu;
- a 40-es pozícióban levő csoport Ser;
- a 42-es pozícióban levő csoport Ser;
- a 44-es pozícióban levő csoport Glu;
- a 45-ös pozícióban levő csoport Val;
- az 52-es pozícióban levő csoport Asn;
- az 54-es pozícióban levő csoport Ala vagy Arg;
- az 56-os pozícióban levő csoport Gly;
- a 84-es pozícióban levő csoport Val;
- a 85-ös pozícióban levő csoport His; és
- a 89-es pozícióban levő csoport His.

1. Táblázat
Az aminosav helyettesítések lehetséges példái

<u>Eredeti csoport</u>	<u>Lehetséges helyettesítések</u>
Ala	Ser, Gly
Arg	Lys
Asn	Gln, His, Asp, Glu
Asp	Glu, Gln, Asn
Cys	Ser
Gln	Asn, Glu, Asp
Glu	Asp, Gln, Asn
Gly	Pro, Ser, Ala
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val, Met
Leu	Ile, Val, Met
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile, Val
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr, Ala
Thr	Ser, Ala
Trp	Tyr, Phe
Val	Ile, Leu, Met
Pro	Gly

2. Táblázat
A szekvencia-lista azonosítói

A szekvencia sorszáma	Leírás
1	Met-Arg-béta-lipotropint kódoló nukleinsav
2	A Met-Arg-béta-lipotropin aminosav szekvenciája
3	Az 5. számú szekvencia készítésére használt fúziós partner aminosav szekvenciája
4	A béta-lipotropin fúzió készítésében használt oligonukleotid linker
5	A béta-lipotropin fúzió aminosav szekvenciája
6	Glutation-S-transzferáz (GST) fúziós partner
7	GST/BLT fúziós partner
8	A humán béta-lipotropin aminosav szekvenciája
9	Humán béta-lipotropin (1-49)
10	Humán béta-lipotropin (50-89)
11	Humán béta-lipotropin (38-67)
12	Humán béta-lipotropin ((38-89)
13	Humán béta-lipotropin (?7-23)
14	Humán béta-lipotropin (1-14)
15	Humán béta-lipotropin (8-21)
16	Humán béta-lipotropin (15-28)
17	Humán béta-lipotropin (22-35)
18	Humán béta-lipotropin (29-42)
19	Humán béta-lipotropin (36-49)



2. Táblázat (folyt.)
A szekvencia-lista azonosítói

A szekvencia sorszáma	Leírás
20	Humán béta-lipotropin ((43-56)
21	Humán béta-lipotropin (50-63)
22	Humán béta-lipotropin (57-70)
23	Humán béta-lipotropin (64-77)
24	Humán béta-lipotropin (71-84)
25	Humán béta-lipotropin (78-89)
26	Béta-lipotropin analóg (1:Glu-Ala)
27	Béta-lipotropin analóg (3:Thr-Ser)
28	Béta-lipotropin analóg (5:Gln-Glu)
29	Béta-lipotropin analóg (7:Leu-Asp)
30	Béta-lipotropin analóg (10:Gly-Ala)
31	Béta-lipotropin analóg (15:Gly-Glu)
32	Béta-lipotropin analóg (17:Ala-Gly)
33	Béta-lipotropin analóg (23:Ala-Phe)
34	Béta-lipotropin analóg (42:Pro-Ser)
35	Béta-lipotropin analóg (42:Pro-Ser)

Gén-izolálási eljárások

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy egy béta-lipotropint vagy egy béta-lipotropin fúziós fehérjét kódoló nukleinsav számos különböző rekombináns DNS technikával előállítható, beleértve például a polimeráz láncreakciót (PCR) a *de novo* DNS szintézishez [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, 14. fejezet, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Például az 1. számú szekvencia 3' és 5' végeire célzott oligonukleotid primerek használható a Met-Arg-béta-lipotropin polimeráz láncreakciós amplifikálására [PCR Protocols: A Guide to Method and Application, szerk.: M. Innis és mtsai; Academic Press (1990)]. A polimeráz láncreakciós amplifikáláshoz templát DNS, megfelelő enzimek, primerek és pufferek szükségesek, amit egyszerűen egy PCR berendezésben (DNA Thermal Cycler,



Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) alkalmazunk. A pozitív eredményt úgy definiáljuk, hogy egy megfelelő (nevezetesen 273 bázispár) méretű DNS fragmenst mutatunk ki az agaróz gélelektroforézis után.

Fehérjetermelési eljárások

A jelen találmány egyik tárgya a béta-lipotropin fehérje használata gyógyászati készítményként.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a jelen találmány szerinti fehérjék és fragmensek, vagy azok funkcionális fragmensei számos különböző módszerrel megszintetizálhatók, például a szakterületen jól ismert kémiai módszerrel, beleértve a szilárd fázisú peptid-szintézist vagy a rekombináns módszereket is. Mindegyik módszer leírását megtaláljuk a 4,617,149 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírásban, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk.

A fehérjék szilárd fázisú kémiai szintézisének elve jól ismert a szakterületen, és megtalálható a publikált szakcikkekben [H. Douglas és C. Penney: Bioorganic Chemistry, 54-92. old., Springer-Verlag, New York (1981)]. A peptideket például megszintetizálhatjuk a szilárd fázisú eljárással, amihez az Applied Biosystems 430A peptid-szintetizátorát használhatjuk (Applied Biosystems, Foster City, CA), amihez a szintézis-ciklusokat az Applied Biosystems szolgáltatja.

A dupla-kapcsolásos protokollokat alkalmazó szekvenciális terc-butoxikarbonil kémiát használjuk a kiindulási p-metil-benz-hidrilamin gyantákon, C-terminális karboxamidok előállítására céljából. A C-terminális savak előállításához a megfelelő piridin-2-aldoxim metiodid gyantát használjuk. Aszparagint, glutamint és arginint kapcsolunk, az előre kialakított hidroxibenzotriazol észterek felhasználásával. A szintézis befejezése után a peptidekről eltávolíthatjuk a védőcsoportokat, és 10% meta-krezolt tartalmazó vízmentes hidrogénfluoriddal lehasítjuk a gyantáról. Az oldallánc védőcsoport(ok)nak és a peptidnek a gyantáról való lehasítását nulla °C-on, vagy alacsonyabb hőmérsékleten hajtjuk végre, előnyösen -20 °C-on, 30 percig, majd újabb 30 percig 0 °C-on.



Egy peptid szintézise általában egy sor lépésből áll, amit az alábbiakban sorolunk fel. Először az alfa-amino csoportján (és ha szükséges, akkor az oldallánc funkciós csoportján) védett aminosavat aktiválunk, egy reaktív észter előállítására céljából. Ezt az aktivált aminosavat kapcsoljuk egy inert szilárd hordozóhoz, a hordozó aktivált észter-csoportján keresztül, majd a megkötött aminosavat alaposan mossuk. Ez után lépés után egy külön reakcióban egy második védett aminosavat aktiválunk észterre. Az első aminosav alfa-aminocsoportjáról eltávolítjuk a védőcsoportot, így kapunk egy reaktív amint, és a második aktivált aminos csoportot reagáltatjuk vele, így kapunk egy dipeptidet a szilárd hordozón. Ezeknek a lépéseket a sorozatos ismétlése növekvő hosszúságú peptidet eredményez. A szintézis befejezése után a peptidet eltávolítjuk a szilárd hordozóról, és az oldallánc funkciós csoportokról eltávolítjuk a védőcsoportokat, oly módon, hogy a peptidet erős savval kezeljük. A peptidet azután szűrővel, szerves oldószerrel való kicsapással elválasztjuk a szilárd hordozótól, majd a szakterületen ismert számos különböző technika egyikével tisztítjuk.

Ebben az esetben a az alfa-amino védőcsoport a 9-fluorenil-metilkarbonil (Fmoc) csoport. Az oldallánc védőcsoportok az alábbiak: Boc (a Lys és Trp csoportokhoz), Trt (az Asn, His, Gln csoportokhoz), tBu (a Ser, Thr, Tyr csoportokhoz), OtBu (az Asp és Glu csoportokhoz) és a Pmc (az Arg-hoz). Az aktiv észterek a 2-(1H-benzo-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil urónium-hexafluoráttal (HBTU) képződnek.

Az alfa-amino Fmoc védőcsoportot úgy távolítjuk el, hogy a szilárd fázist piperidinnel kezeljük. Ilyen körülmények között a Fmoc csoportot könnyen el lehet távolítani, miközben a szilárd fázishoz való kötődés és az oldallánc védőcsoportok nem változnak. A naszcens peptidlánchoz adandó védett aminocsoportot HBTU-val aktiváljuk.

A humán béta-lipotropin szintézise számos kihívást jelentett. Először is, a peptid-szekvencia egy ser-pro-pro tripeptid szegmenst tartalmaz. A standard kapcsolási kémia egy sorozat deléciós hibát eredményez a szintézisben. Ezeket a deléciókat a pro csoportok kettős kapcsolásával lehet minimalizálni. Az előny-



ben részesített megvalósítási mód szerint a szintézist a Pro és Ser csoportok kettős-kapcsolásával hajtjuk végre. Emellett, a kapcsolási lépés befejezése után minden visszamaradt reagálatlan, védőcsoport-mentesített peptidet ecetsav-anhidriddel blokkolunk, hogy megakadályozzuk egy deléciós peptid láncának meghosszabbítását.

Másodszor, a humán peptid 3 asp-gly dipeptid szekvenciákat tartalmaz. Ezek a szekvenciák érzékenyek a ciklikus iminképződésre, még akkor is, ha az asp oldalláncok védve vannak. Ezek a ciklikus iminek azután reagálhatnak a piperidinnel a védőcsoport eltávolítási lépésben, így piperidinnel módosított peptid képződik. Ezt a ciklizálódást úgy lehet eliminálni, hogy N-a-Hmb védelmet használunk mindegyik asp-csoportot megelőző glicincsoporthoz [Qubbell és mtsai: J. Chem. Soc. Chem. Comm., 2343 (1994), amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk]. Az asp-gly dipeptidek közül kettőt előz meg pro. A szekvencia ilyen tulajdonsága, valamint a hmb-vel védett aminosavak alacsonyabb reakcióképessége következtében, ezeket mind többszörösen kapcsoljuk, majd ecetsavanhidriddel zárjuk le. Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint ezek duplán kapcsoltak.

Egy előnyben részesített megvalósítási mód szerint a peptidet egyetlen menetben szintetizáljuk meg, Fmoc kémia alkalmazásával. A BLT szintézisét számos asp-gly dipeptid szekvenciának a molekula N-terminális részén való jelenléte komplikálja. Az asp-gly dipeptid szekvenciák aspartil oldalláncairól megfigyelték, hogy lúggal katalizált ciklizálódáson, majd ezt követően az Fmoc szintézis során piperidinnel való addíción esnek át. Ezt a reakciót a szintézis során az egyes asp-gly szekvenciáknál Fmoc-(FmocHmb)-glicin használatával lehet eliminálni. A glicilamid Hmb csoporttal való megvédése gátolja az aszpartil oldallánc ciklizálódását. A hasítás, védőcsoport eltávolítás és fordított fázisú HPLC tisztítás után a peptidet elektronpermet tömegspektroszkópiával lehet elemezni. A béta-lipotropinnak ebben a szintézisében látható fő molekulafajta a várt tömeggel rendelkező, teljes hosszúságú peptid. Ha ezt a módszert használjuk, akkor egyetlen



menetben, a 0,1 mmol skálán több mint 100 mg tisztított fehérjét lehet előállítani.

A jelen találmány szerinti fehérjét előállíthatjuk rekombináns DNS módszerekkel is. Egy béta-lipotropint vagy béta-lipotropin fúziós fehérjét kódoló klónozott nukleinsavat (azaz például az 1. számú szekvencia) számos különböző gazdasejtben expresszáltathatjuk, amik jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára. Ebből a célból egy béta-lipotropint kódoló nukleinsavat bármilyen ismert módszerrel bejuttathatunk egy gazdasejtbe, amik jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára. Bár a kromoszómális integráció a jelen találmány oltalmi körébe tartozik, az az előnyös, ha a szekvenciát egy megfelelő, extra-kromoszómálisan fennmaradó expressziós vektorba klónozzuk, oly módon, hogy a béta-lipotropin gén kódoló régiója működés szempontjából egy konstitutív vagy indukálható promoterhez van kapcsolva.

A béta-lipotropin fehérje rekombináns előállításában az alapvető lépések az alábbiak:

- i) egy béta-lipotropint, vagy annak egy fúziós fehérjéjét kódoló természetes, szintetikus vagy félszintetikus DNS előállítása;
- ii) az említett DNS integrálódása egy expressziós vektorba, oly módon, hogy lehetővé váljon az említett fehérje expressziója;
- iii) az említett vektort egy megfelelő eukarióta vagy prokarióta gazdasejtbe juttatjuk be, ezzel egy rekombináns gazdasejtet hozva létre;
- iv) az említett rekombináns gazdasejtet oly módon tenyésztjük, hogy az lehetővé tegye az említett fehérje expresszióját; és
- v) az említett fehérjét kinyerjük és megtisztítjuk, bármilyen megfelelő módszer alkalmazásával.

A rekombináns béta-lipotropin fúziós fehérje expressziója prokarióta és eukarióta gazdasejtekben

A humán béta-lipotropin (BLT) egy 89 aminosavból álló hormon, amit a hipofízis termel egy prekursor fehérje formájában,

ami poszt-transzlációs processzálon megy át, így keletkezik számos biológiailag aktív hormon, beleértve a béta-lipotropint. Mivel a béta-lipotropin kicsi és proteolitikusan érzékeny helyeket tartalmaz, ezért ezt a fehérjét eleinte kémiai szintézissel állítottuk elő. Ez a módszer azonban nem használható nagy mennyiségek előállítására. Ebben a találmányban egy olyan módszert írunk le, amivel a béta-lipotropin bakteriális vagy gomba expressziós gazdaszervezetekben állítható elő fúziós fehérjék formájában. Ezek a fúziós fehérjék védettek a proteolitikus degradációval szemben, és lehetővé teszik az intakt béta-lipotropin kinyerését az alábbiakban ismertetett módszerekkel.

Escherichia coli-ban a béta-lipotropin fúziós fehérje formájában keletkezik, ami a sejtlizátumokból nagymennyiségű só jelenlétében nyerhető ki, hagyományos tisztítási módszerekkel. A fúziós fehérje tartalmaz egy felismerési helyet a specifikus proteázok számára, amiket a fúziós partnernek a béta-lipotropintól való elválasztására használunk. *Pichia pastoris*-ban a fúziós fehérje a sejtől való szekréció során hasad le, oly módon, hogy a természetes BLT kimutatható, és érintetlenül kinyerhető a tenyésztő táptalajból.

Ezzel az eljárással béta-lipotropin állítható elő. A kémiai szintézistől eltérően az itt ismertetett eljárás alkalmas arra, hogy nagy mennyiségű béta-lipotropint állítsunk elő.

A prokarióták használhatók a rekombináns béta-lipotropin fehérjék előállítására. Például az *Escherichia coli* K12 294-es törzse (ATCC 31446) különösen jól használható idegen fehérjék prokarióta sejtekben való előállítására. Az *Escherichia coli* más törzsei, a bacillusok, azaz például a *Bacillus subtilis*, az enterobaktériumok, azaz például a *Salmonella typhimurium* vagy a *Serratia marcescens*, a különböző *Pseudomonas* fajok, és más baktériumok, azaz például a *Streptomyces* szintén használhatók gazdaszervezetként a jelen találmány szerinti rekombináns fehérjék klónozására és expresszáására.

A gének prokariótákban való expressziójának meghajtására alkalmas promotor szekvenciák közé tartozik a béta-laktamáz [azaz például a pGX2907 vektor (ATCC 39344) tartalmaz egy replikont és egy béta-laktamáz gént], a laktóz rendszerek [Chang



és mtsai: Nature (London) 275, 615 (1978); Goeddel és mtsai: Nature (London) 281, 544 (1979)], az alkalikus foszfatáz és a triptofán (trp) promoter rendszer [a pATH1 vektor (ATCC 37695)], amit úgy terveztek meg, hogy megkönnyítse egy nyitott leolvasási keret expresszióját trpE fúziós fehérje formájában, a triptofán promoter szabályozásával. A hibrid promoterek, azaz például a tac promoter [amit a pDR540 plazmidből (ATCC 37282)] lehet izolálni] szintén megfelelőek, ugyanúgy mint a T7 promoterek. Még más bakteriális promoterek, amiknek a nukleotid szekvenciája általában ismert, ligálhatók a jelen találmány szerinti fehérjét kódoló DNS-hez, linkereket vagy adaptereket használva akármilyen restriktációs hasítási helyek biztosítására. A bakteriális rendszerben használható promoterek emellett tartalmaznak egy Shine-Dalgarno szekvenciát, működés szempontjából a kívánt polipeptideket kódoló DNS-hez kapcsolva. Ezek a példák inkább illusztrációk mint korlátozó jellegűek.

A jelen találmány szerinti fehérjéket vagy közvetlen expresszióval vagy fúziós fehérje formájában szintetizálhatjuk meg, amiből a fúziós partner enzimes vagy kémiai hasítással távolíthatjuk el. Ez a találmány elvileg alkalmazható bármilyen fúziós rendszerre, ami bakteriális vagy gomba gazdaszervezetekben expresszálható. Egy megfelelő fúziós rendszer egyik megvalósítási módja szerint egy felismerési helyet helyezünk el a béta-lipotropin és a fúziós partner közé, ahol például a fúziós partnert a béta-lipotropin N-terminálisára tesszük. Egy megfelelő hely lehet egy proteáz felismerési szekvencia, vagy egy olyan hely, ami érzékeny a kémiai hasításra.

A megfelelő bakteriális fúziós partnerek közé tartozik például a glutation-S-transzferáz, a maltózkötő fehérje, a prokarboxipeptidáz, a kalmodulin-kötő fehérje, vagy bármilyen N-terminálisan elhelyezkedő szekvencia, ami egy fúziós fehérje magas szintű expresszióját segíti elő.

A megfelelő proteázok közé tartozik az Xa faktor, a trombin és az enterokináz. A kémiai hasítás ágensei közé tartozik a brómcian, a sav, stb.

A gomba rendszerekben jól használható fúziós partnerek közé tartozik az alfa mating faktor, a propeptid, a humán szé-



rum-albumin és minden más olyan szekvencia, ami elősegíti a fúziós fehérje expresszióját és szekréciónak, majd az azt követő hasítást (a szekréció során), amivel a természetes béta-lipotropin a tenyésztő táptalajba kerül.

Az egyik megközelítési mód szerint egy béta-lipotropin fúziós fehérje tartalmaz egy természetes béta-lipotropin szekvenciát, egy dipeptidhez (úgy mint Met-Arg) kapcsolva a természetes béta-lipotropin N-terminálisán (azaz például a 2. számú szekvencia). Ennek a fúziós molekulának a dipeptid partnere Cathepsin C-vel való kezeléssel vágható le, és a természetes béta-lipotropin molekulát a szakterületen ismert technikákkal tisztíthatjuk, azaz például HPLC-vel. Egy másik, a rekombináns béta-lipotropin fúziós fehérje szolgáló másik módszerben a glutation-S-transzferázt (GST) használjuk fúziós partnerként, a későbbiekben a 7. számú szekvenciavázlaton bemutatott fehérje előállítására, lényegében Smith és Johnson eljárásának megfelelően [Smith és Johnson: *Gene* **67**, 31 (1988)], amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk.

Bizonyos peptidek rekombináns rendszerekben való előállítása során gyakran megfigyelhető, hogy a fúziós fehérjeként való expresszió meghosszabbítja az élettartamot, megnöveli a kívánt peptid termelt mennyiségét, vagy kényelmes módszert biztosít a fehérje tisztításához. Ez különösen akkor igaz, ha emlős fehérjéket expresszálunk prokarióta gazdaszervezetekben. Számos különböző peptidáz ismert (azaz például az enterokináz és a trombin), ami egy polipeptidet specifikus pontokon hasít el, vagy a peptideket a peptidlánc N-terminálisáról vagy a C-terminálisáról emészti (ilyen például a diaminopeptidáz). Emellett bizonyos vegyületek (azaz például a brómcián) a polipeptidet specifikus pontokon hasítja el. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvalóak azok a módosítások, amik ahhoz szükségesek, hogy az aminosav szekvenciába (és a szintetikus vagy félszintetikus kódoló szekvenciába, ha rekombináns módszereket alkalmazunk) helyspecifikus belső hasítási helyeket építsünk be [P. Carter: "Site Specific Proteolysis of Fusion Proteins", 13. fejezet, *in* Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes, American Chemical Society, Washington, D.C. (1990)].



A prokarióták mellett számos különböző kételtű expressziós rendszer, azaz például béka oocyták és emlős sejtszrendszerek is használhatók. Egy bizonyos gazdasejt megválasztása bizonyos mértékig a használt expressziós vektortól függ. A jelen találmányban használható emlős gazdasejtek közé tartozhat például a HepG-2 (ATCC HB 8065), a CV-1 (ATCC CCL 70), az LC-MK₂ (ATCC CCL 7.1), a 3T3 (ATCC CCL 92), a CHO-K1 (ATCC CCL 61), a HeLa (ATCC CCL 2), az RPMI8226 (ATCC CCL 155), a H4IIEC3 (ATCC CCL 1600), a C127I (ATCC CCL 1616), a HS-Sultan (ATCC CCL 1484) és a BHK-21 (ATCC CCL 10).

Számos különböző vektor alkalmas emlős gazdasejtek transzformálására. Például a pSV2-típusú vektorok tartalmazzák az SV40 vírus genomjának a transzkripcióhoz és a poliadenizációhoz szükséges szegmenseit. A pSV2-típusú vektorokból sokat állítottak elő, azaz például a pSV2-gpt-t, a pSV2-neo-t, a pSV2-dhfr-t, a pSV2-hyg-et és a pSV2-b-globint, amikben az SV40 promotor hajtja meg egy beszúrt gén transzkripcióját. Ezek a vektorok széles körben hozzáférhetők a megfelelő forrásokból, azaz például az American Type Culture Collection-től (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, vagy a Northern Regional Research Laboratory-tól (NRRL), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604.

Az emlős sejtekben való expresszióra alkalmas promoterek közé tartozik az SV40 késői promotere, az eukarióta génekből, azaz például az ösztrogénnel indukálható csirke ovalbumin génből, az interferon génekből, a glükokortikoiddal indukálható tirozin aminoszferáz génből, a timidin kináz génből származó promotor, valamint a fő korai és késői adenovírus gének promoterei.

Az emlős sejtek vektorokkal való transzfekcióját számos különböző jól ismert eljárással hajthatjuk végre, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a protoplaszt-fúziót, a kalciumfoszfát ko-precipitációt, az elektroporációt és hasonlókat [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)].

Néhány vírusból is készíthető megfelelő vektor. Ilyen lehet például az adenovírus, az adeno-asszociált vírusok, a vakcína vírus, a herpeszvírusok, a bakulovírusok és a Rous szarkóma vírus (4,775,624 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás, amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk).

Az eukarióta mikroorganizmusok, azaz például az élesztő és a gombák szintén megfelelő gazdasejtek. A *Saccharomyces cerevisiae* és *Pichia pastoris* élesztők az előnyben részesített eukarióta mikroorganizmusok. Más élesztők is megfelelnek, mint például a *Kluyveromyces lactis*. A *Saccharomyces*-ben való expresszióhoz például az Yrp7 plazmid (ATCC-40053) használható [Stihlcomb és mtsai: *Nature* **282**, 39 (1979); J. Kingsman és mtsai: *Gene* **7**, 141 (1979); S. Tschemper és mtsai: *Gene* **10**, 157 (1980)]. Az Yrp7 plazmid tartalmazza a TRP1 gént, ami szelekciós markert biztosít egy *trp1* auxotróf mutánsban való felhasználás céljára.

A jelen találmány más megvalósítási módjai béta-lipotropint vagy annak fragmensét kódoló nukleinsav szekvenciákat tartalmaznak. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti aminosav vegyületeket számos különböző nukleinsav szekvencia kódolhatja. Mivel ezek az alternatív nukleinsav szekvenciák ugyanazt az aminosav szekvenciát kódolhatják, ezért ezek az alternatív nukleinsav szekvenciák is a jelen találmány tárgyát képezik.

A találmány szerinti béta-lipotropint kódoló nukleinsavak kémiai szintetikus módszerekkel is előállíthatók. A nukleinsavak szintézise jól ismert a szakterületen [E.L. Brown, R. Belagaje, M.J. Ryan és H.G. Khorana: *Methods in Enzymology* **68**, 109-151 (1979)]. A béta-lipotropinnak megfelelő DNS szekvencia fragmenseit hagyományos DNS-szintetizáló berendezéssel állíthatjuk elő, azaz például az Applied Biosystems Model 380A vagy 380B DNS-szintetizátorokkal (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404), foszforamidit kémia alkalmazásával, majd a fragmenseket ligáljuk, ezzel elkészítve a teljes gént. Egy másik változat szerint foszfortriészter kémia használha-

tó a találmány szerinti nukleinsavak szintézisére [M.J. Gait, szerk.: Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach (1984)].

Vektorok

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá a rekombináns DNS klónozó vektorok és expressziós vektorok, amik a jelen találmány szerinti nukleinsavakat tartalmazzák. Azokat a nukleinsav vektorokat részesítjük előnyben, amik DNS-t tartalmaznak. A leginkább előnyben részesített rekombináns DNS vektorok az izolált, 1. számú szekvenciavázlaton bemutatott DNS szekvenciát tartalmazzák.

A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a legmegfelelőbb klónozó vektor vagy expressziós vektor megválasztása számos tényezőtől függ, beleértve a restriktációs enzim hasítási helyek hozzáférhetőségét, annak a gazdasejtnek a típusát, amibe a vektort transzfektálni vagy transzformálni akarjuk, a transzfekció vagy transzformáció célját (azaz például stabil transzformáció extrakromoszómális elemként, vagy a gazdaszervezet kromoszómájába való integráció), könnyen vizsgálható vagy szelekciós markerek megléte vagy hiánya (azaz például antibiotikum rezisztencia és egyes típusú metabolikus markerek és mások), valamint a gazdasejtbe bevinni kívánt gén kópiaszáma.

A jelen találmány szerinti nukleinsavak hordozására alkalmas vektorok közé tartoznak az RNS vírusok, a DNS vírusok, a lítikus bakteriofágok, a lizogén bakteriofágok, a stabil bakteriofágok, a plazmidok, a viroidok és hasonlóak. A leginkább előnyben részesített vektorok a plazmidok.

Ha egy expressziós vektort kell készíteni, akkor a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy számos változót kell figyelembe venni, például azt, hogy konstitutív vagy indukálható promotert használunk. A gyakorló szakember számára az is nyilvánvaló, hogy az előállítandó nukleinsav vagy fehérje mennyisége határozza meg részben az expressziós rendszer szelekcióját. Ami a promoter szekvenciákat illeti, az indukálható promotereket részesítjük előnyben, mivel lehetővé teszik, hogy egy működés szempontjából kapcsolt gén magas szinten, szabályozhatóan expresszáldjon. A szakterületen jártas szakember

számára nyilvánvaló, hogy számos olyan megfelelő promoter létezik, ami számos különböző indukálószerre reagál, azaz például szénforrásra, fémionokra és hőre. Az expressziós vektort illetően más megfontolandó dolgok közé tartozik az, hogy tartalmaznak-e a rekombináns fehérje lokalizálására alkalmas szekvenciákat. Például egy gén kódoló régióját megelőző szignálpeptidet kódoló szekvencia jól használható egy kapott polipeptid extracelluláris exportjának vezérlésére.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan rekombináns gazdasejt előállítási eljárása, ami képes a béta-lipotropin fehérjéket expresszálni, ami abban áll, hogy egy gazdasejtbe egy olyan rekombináns DNS vektort transzformálunk vagy más módon juttatunk be, ami béta-lipotropint kódoló izolált DNS szekvenciát tartalmaz. Az előnyben részesített gazdasejt bármilyen olyan sejt, ami képes egy kívülről bevitt gén vagy fehérje magas szintű expresszáására. A transzformált gazdasejteket a szakterületen jártas szakember számára jól ismert körülmények között tenyészthetjük, amik között a rekombináns béta-lipotropin expresszálódik.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az olyan emberek és más emlősök kezelésére szolgáló eljárások, akik vagy amik a hibás inzulin metabolizmushoz vagy szénhidrát metabolizmushoz kapcsolódó betegségekben vagy állapotokban szenvednek, azaz például hiperglikémiában, hiperinzulinémiában, 1-es vagy 2-es típusú cukorbetegségben, valamint az ezekhez kapcsolódó komplikációkban. Az eljárás abban áll, hogy az erre szoruló szervezetnek hatékony mennyiséget adunk be a béta-lipotropin fehérjéből vagy peptidből, vagy a béta-lipotropint tartalmazó fúziós fehérjéből, vagy annak funkcionális fragmenséből, vagy analógiából, körülbelül 1-1000 $\mu\text{g}/\text{testsúlykg}$ dózisban. Ebben a módszerben a béta-lipotropint beadhatjuk napi egy dózisban, napi több dózisban, vagy folytonos vagy megszakított beadást alkalmazva egy mechanikus szivattyúval, amit a testbe lehet beültetni, vagy más módon hozzá kapcsolni. A beadandó béta-lipotropin vagy rokon fehérje vagy peptid mennyiségét a kezelőorvos határozza meg, és olyan tényezőktől függ, mint például az állapot természete és súlyossága, a kezelendő tünet

vagy betegség, valamint a beteg kora és általános egészségi állapota.

A jelen találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan gyógyászati készítmény, ami aktív adalékanyagként egy béta-lipotropin fehérjét vagy annak funkcionális fragmensét vagy analógját tartalmazza (8. számú szekvenciavázlat), vagy ezek gyógyászatilag elfogadható atoxikus sóját, egy gyógyászatilag elfogadható szilárd anyaggal vagy folyadék hordozóval összekeverve. A fehérjét, előnyösen egy gyógyászatilag elfogadható só formájában, a parenterális beadáshoz formulálhatjuk cukorbetegség vagy annak komplikációja terápiás vagy profilaktikus kezelésére. Például a 8. számú szekvenciavázlatnak megfelelő vegyületeket vagy más béta-lipotropint összekeverhetjük hagyományos gyógyászati hordozókkal és töltőanyagokkal. A béta-lipotropint tartalmazó készítmények a fehérjére számítva körülbelül 0,1-90 tömeg% fehérjét tartalmaznak, előnyösen oldható formában, még általánosabban körülbelül 10-30%-ot. Emellett, a jelen találmány szerinti fehérjéket beadhatjuk egyedül, vagy más, a cukorbetegség kezelésében jól használható anti-diabeteszes ágensekkel kombinálva.

Az intravénás (iv) felhasználáshoz a béta-lipotropin fehérjét vagy fragmenst vagy analógot általánosan használt intravénás folyadék(ok)ban, infúzióval adják be. Ringer oldat vagy 5% szacharóz oldat használható.

Az intramuszkuláris készítményekhez egy steril készítményt, előnyösen a béta-lipotropin fehérje (8. számú szekvenciavázlat) megfelelő oldható só formáját, azaz például a hidroklorid sóját oldhatjuk fel és adhatjuk be egy gyógyászati hígítószerben, azaz például pirogénmentes vízben (desztillált), fiziológiás sóoldatban vagy 5% glükóz oldatban. A vegyület egy megfelelő oldhatatlan formáját víz- vagy olaj-alapú (azaz például egy hosszú szénláncú zsírsav, azaz például etil-oleát) szuszpenzióként állíthatjuk elő és adhatjuk be.

Az alábbi példákbn részletesen ismertetjük a jelen találmányt és a béta-lipotropin cukorbetegség kezelésében való használatát. A szakterületen jártas szakember számára nyilvánvaló, hogy a leírásban szereplő reagensek, berendezések és eljárások

csupán az illusztrálást célozzák, semmiképpen nem tekinthetők a jelen találmány korlátozásának.

1. Példa

A humán béta-lipotropin fehérje szilárd fázisú szintézise és tisztítása

A humán béta-lipotropin peptidet (8. számú szekvencia) egy menetben szintetizáljuk meg, Fmoc kémia alkalmazásával. A BLT szintézisét számos asp-gly dipeptid szekvenciának a molekula N-terminális részén való jelenléte komplikálja. Az asp-gly dipeptid szekvenciák aspartil oldalláncairól megfigyelték, hogy lúggal katalizált ciklizálódáson, majd ezt követően az Fmoc szintézis során piperidinnel való addíción esnek át. Ezt a reakciót a szintézis során az egyes asp-gly szekvenciáknál Fmoc-(FmocHmb)-glicin használatával lehet eliminálni. A glicilamid Hmb csoporttal való megvédése gátolja az aszpartil oldallánc ciklizálódását. A hasítás, védőcsoport eltávolítás és fordított fázisú HPLC tisztítás után a peptidet elektronpermet tömegspektroszkópiával lehet elemezni. A béta-lipotropinnak megfelelő, ebben a szintézisében látható fő molekulafajta a várt tömeggel rendelkező, teljes hosszúságú peptid. Ha ezt a módszert használjuk, akkor egyetlen menetben, a 0,1 mmol skálán több mint 100 mg tisztított fehérjét lehet előállítani.

Anyagok: Előre töltött Fmoc-Glu (OtBu) Wang (1% kereszt-kötéses polisztirol, p-benzoxibenzil-alkohollal) gyanta, körülbelül 0,6 mmol/l aminosav/g gyanta. N-metil-pirrolidon (NMP), piperidin, 2-(1H-benzo-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil urónium-hexafoszfát (HBTU), 2 mol/l N,N-diizopropiletilamin (DIEA), 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt), diklórmétán (DCM), dimetilformamid (DMF).

Az Fmoc védett C-terminális aminosavval előre töltött gyantát lemérjük, majd egy reakciókamrába tesszük. A gyantát előre duzzasztjuk diklórmétánnal való mosással. A gyantát azután NMP-vel mossuk. A N-terminális Fmoc csoportot eltávolítjuk, a gyantát 18-22%-os, NMP-ben készített piperidin oldatban inkubálva. A védőcsoport eltávolítása után a gyantát alaposan mossuk NMP-vel.

A peptidhez adandó következő Fmoc-védett aminosavból egy mmol-t szolubilizálunk dimetilformamidban készített 2,1 g NMP, 2,0 g 0,45 mol/l HBTU/HOBt reagensben. A szolubilizálást követően az aminosav aktiválását 3 ml, NMP-ben készített 2 mol/l DIEA hozzáadásával iniciáljuk. Az aktivált aminosavat azután a védőcsoporttól megszabadított gyantához adjuk, majd hagyjuk hogy kapcsolódjon. A kapcsolás teljes lejátszódása után a gyantát alaposan mossuk NMP-vel. A védőcsoport eltávolításának és a kapcsolásnak a ciklusát azután minden egyes következő aminosavra megismételjük.

A szintézisben a specifikus ciklus lépések az alábbiak.

<u>Ciklus</u>	<u>Aminosav</u>	<u>Lépések</u>
1	Glu(OtBu)	Teljes mosás
2	Gly	egyszeres kapcsolás
3	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
4	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
5	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
6	Ala	egyszeres kapcsolás
7	Asn(Trt)	egyszeres kapcsolás
8	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
9	Ile	egyszeres kapcsolás
10	Ile	egyszeres kapcsolás
11	Ala	egyszeres kapcsolás
12	Asn(Trt)	egyszeres kapcsolás
13	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
14	Phe	egyszeres kapcsolás
15	Leu	egyszeres kapcsolás
16	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
17	Val	egyszeres kapcsolás
18	Leu	egyszeres kapcsolás
19	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
20	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
21	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
22	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
23	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
24	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
25	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás

26	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
27	Met	egyszeres kapcsolás
28	Phe	egyszeres kapcsolás
29	Gly	egyszeres kapcsolás
30	Gly	egyszeres kapcsolás
31	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
32	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
33	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
34	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
35	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
36	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
37	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
38	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
39	Gly	egyszeres kapcsolás
40	Trp(Boc)	egyszeres kapcsolás
41	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
42	Phe	egyszeres kapcsolás
43	His(Trt)	egyszeres kapcsolás
44	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
45	Met	egyszeres kapcsolás
46	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
47	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
48	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
49	Gly	egyszeres kapcsolás
50	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
51	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
52	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
53	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
54	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
55	Ala	egyszeres kapcsolás
56	Ala	egyszeres kapcsolás
57	Val	egyszeres kapcsolás
58	Leu	egyszeres kapcsolás
59	Leu	egyszeres kapcsolás
60	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
61	His(Trt)	egyszeres kapcsolás
62	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás

63	Leu	egyszeres kapcsolás
64	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
65	Ala	egyszeres kapcsolás
66	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
67	Ala	egyszeres kapcsolás
68	Gly	egyszeres kapcsolás
69	Ala	egyszeres kapcsolás
70	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
71	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
72	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
73	Ala	egyszeres kapcsolás
74	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
75	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
76	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
77	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
78	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
79	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
80	Gly	egyszeres kapcsolás
81	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
82	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
83	Leu	egyszeres kapcsolás
84	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
85	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
86	Gly	egyszeres kapcsolás
87	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
88	Leu	egyszeres kapcsolás
89	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
90	A védőcsoportok eltávolítása végső	

A lassan vagy nem elég hatékonyan reagáló aminosavakhoz 2 külön kapcsolási reakciót kell végrehajtani. Minden megmaradt, nem reagált peptidet ecetsav-anhidrides kezeléssel blokkolunk. Az egyik ilyen aminosav esetében a lépések sorrendje védőcsoport eltávolítás, 1. kapcsolási reakció, mosás, 2. kapcsolási reakció, mosás, Ac20 cap, mosás, védőcsoport eltávolítás.



Rövidítések: OtBu: terc-butil-észter, tBu: terc-butil, Boc: terc-butoxikarbonil, Pmc: 2,25,7,8-pentametilkroma-6-szulfonil, Hmb: 2-hidroxi-4-metoxibenzil, Fmoc: 9-fluorenil-metoxikarbonil.

2. Példa

Béta-lipotropint kódoló szintetikus gén készítése

Standard klónozási módszerek alkalmazásával plazmid konstrukciókat készítünk [Sambrook és mtsai: Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]. Az enzimeket és a többi reagenst a Bibco-BRL-től (Gaithersburg, MD), vagy a New England Biolabs-tól (Beverly, MA 01915) vásároljuk. Az ebben a találmányban használt különböző oligonukleotidok és DNS fragmensek emésztésére, azonosítására, kinyerésére és tisztítására használt enzimek és más reagensek jól ismertek a szakterületen jártas szakember számára, ugyanúgy, mint az ezeknek a szekvenciáknak a vektorokba való ligálására szolgáló módszerek, a gazda mikroorganizmusok transzformálási módszerei, valamint ezeknek a gazda mikroorganizmusoknak a tenyésztési módszerei, olyan körülmények között, amik lehetővé teszik plazmid DNS és rekombináns DNS termékek készítését.

A humán béta-lipotropint kódoló DNS szekvenciát (8. számú szekvencia) 8 kémiai szintetizált oligonukleotidból állítjuk össze, amiknek a mérete 52-86 bázis között változik. Az oligonukleotidokat hagyományos DNS-szintetizáló berendezéssel állítjuk elő, azaz például az Applied Biosystems Model 380A vagy 380B berendezéssel (kereskedelmi forgalomban beszerezhető az Applied Biosystems Inc.-től, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404). Az oligonukleotidok szekvenciáját úgy terveztük meg, hogy az előállított oligonukleotidokból 4 alkotja a szintetikus gén egyik szálát, míg a többi 4 előállított oligonukleotid alkotja a szintetikus gén komplementer szálát. Az összeállítás előtt az oligonukleotidokat polinukleotid kinázzal kezeljük ATP jelenlétében, hogy foszforilezzük az egyes oligonukleotidok szabad hidroxil-csoportjait.

A 8 oligonukleotidot ekvimoláris koncentrációban (3 piko-mól/μl) összekeverjük 100 μl térfogatban, 95 °C-ra melegítjük,



majd lassan, több óra alatt szobahőmérsékletre hűtjük. Ez lehetővé teszi az egyes oligonukleotidok közötti helyes bázispárosodás kialakulását. T4 DNS ligázt adunk az oligonukleotidokhoz, majd egy kétszálú, körülbelül 285 bázispár méretű DNS-t kapunk, amit egy 2%-os agaróz gélen elemzünk. Ezt a fragmenst, aminek "ragadós" végei vannak, az NdeI és BamHI restrikciós enzimmel emésztett pUC18 vektorba ligáljuk. A ligáló elegyet kompetens DH10B sejtekbe transzformáljuk, amiket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó tripton-élesztőkivonat agarlemezekre szélesztünk. Az éjszakán át kinőtt telepeket elemezzük, hogy vannak-e bennük plazmidok, amik tartalmazzák a kémiaailag szintetizált gént. Ezt úgy csináljuk, hogy ezekből a telepekből plazmid DNS-t tisztítunk, a plazmid DNS-t NdeI és BamHI restrikciós endonukleázokkal emésztjük, majd igazoljuk, hogy jelen van-e egy körülbelül 285 bázispár méretű fragmens. A korrekt szekvenciát ezt követően DNS szekvencia elemzéssel igazoljuk. A plazmid a pOJ838 nevet kapja.

3. Példa

A béta-lipotropin fúziós fehérjét expresszáló plazmidok készítése

Mivel a béta-lipotropin egy kis fehérje, ezért előnyös, ha méretét fúziós fehérje készítésével megnöveljük. Ebből a célból két különböző fúziós partnert használunk. Az egyik a glutation-S-transzferáz (GST), amiben található egy Xa hasítási hely, aminosav szekvenciáját a 6. számú szekvenciavázlaton láthatjuk, ezt a pGEX-2T vektor kódolja (Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ 08855); a másik egy rövid peptid-szekvencia: MIIGLMVGGVSGSGSGSGDDDDP (3. számú szekvencia).

A természetes béta-lipotropin előállításához a fúziós fehérjéket vagy kémiaailag, vagy enzimes emésztéssel kezeljük, hogy a béta-lipotropin dez-asszociálódjon a fúziós partneréről. Ezt úgy érhetjük el, ha enzimatis vagy kémiai hasítási helyet építünk be a fúziós partner és a béta-lipotropin közé. A GST fúziókhoz az enterokináz vagy az Xa faktor felismerési helyét választjuk ki; a kis szintetikus peptidbe fúzióhoz (3. számú szekvencia) egy prolint építünk be, ami lehetővé teszi, hogy savas kezelés után kémiai hasítást hajtsunk végre.



Egy Xa felismerési szekvenciát tartalmazó, GST fúziót kódoló plazmidot (IEGR) az alábbiak szerint állítunk elő. A pOJ838 plazmidot (pUC18, ami a szintetikus béta-lipotropint tartalmazza; lásd a 4. példát) NdeI és NruI restriktív enzimekkel emésztjük, majd a legnagyobb fragmenst gélen tisztítjuk. Egy szintetikus linkert, aminek a szekvenciája az alábbi: 5'-TATGAGATCTATCG-

AAGGTCGTGAGCTCACCGGTCAGCGTGTTCG-3' (4. számú szekvencia), valamint ennek komplementerét ekvimoláris mennyiségben keverjük össze, 95 °C-ra melegítjük, majd hagyjuk illeszkedni, a hőmérsékletet fokozatosan körülbelül 25 °C-ra csökkentve. Az egymáshoz illesztett linkert a vektor-fragmenshez ligáljuk, majd a ligálási elegyet kompetens DH10B sejtekbe transzformáljuk. A transzformált sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó tripton-élesztőkivonat agarlemezre szélesztjük. Az éjszakán át kinőtt telepeket elemezzük, hogy van-e bennük plazmid, ami tartalmazza a linker szekvenciát. Ezt úgy hajtjuk végre, hogy plazmid DNS-t tisztítunk ezekből a tenyészetekből, majd igazoljuk egy új BglII hely meglétét, amit a linkerrel vittünk be. A korrekt linker szekvencia meglétét azután DNS szekvencia elemzéssel igazoljuk. A kapott plazmid jelzése pOJ839.

A pOJ839 plazmidot BglII és EcoRI restriktív enzimekkel emésztjük, majd a béta-lipotropin gént tartalmazó fragmenst (ami az Xa faktor felismerési szekvenciához van kapcsolva) gélen tisztítjuk, majd BamHI és EcoRI restriktív enzimekkel emésztett pGEX-2 plazmidba ligáljuk. A ligáló elegyet kompetens DH10B sejtekbe transzformáljuk. A transzformált sejteket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó tripton-élesztőkivonat agarlemezre szélesztjük. Az éjszakán át kinőtt telepeket elemezzük, hogy van-e bennük plazmid, ami tartalmazza az új, körülbelül 300 bázispár méretű fragmenst, amit SacI restriktív enzimmel végzett emésztés után várhatunk. Az új plazmid jelzése pOJ840.

4. Példa

A prokarboxipeptidáz-béta-lipotropin fúziós fehérjét kódoló pHMM260-ProCpB(10)ILVPR/béta-lipotropin (R49) rekombináns vektor



Egy rekombináns DNS expressziós vektor, a pHMM260 tartalmaz egy ProCpB(10)ILVPR/béta-lipotropin (R49) expressziós kazettát, ami egy prokarboxipeptidáz-béta-lipotropin fúziós fehérjét kódol. Ezt a vektort standard klónozási technikákkal állítjuk elő. A pHMM260 expressziós kazetta annotációja a 16. ábrán látható. Az expressziós kazettát egy NdeI hasítási hely határolja az 5' végén és egy BamHI hasítási hely határolja a 3' végén. A sertés prokarboxipeptidáz B fehérje pro-peptid része a kazetta 5' végén található, ami egy Met csoporttal kezdődik és egy Ser csoporttal végződik. Egy trombin proteáz felismerési hely, LVPR van közvetlenül a prokarboxipeptidáz szekvencia 3' végén. A trombin hasítási hely 3' végén egy Glu csoporttal kezdődő szekvencia vad-típusú humán béta-lipotropint kódol.

Az expressziós kazetta számos származékát állítjuk elő, oly módon, hogy a béta-lipotropin szekvencia 49-es pozíciójában a vad-típusban található Arg(49) Ala(49)-re változik a pHMM261 plazmidban, vagy Glu(E49)-re a pHMM262-ben, vagy Gln(Q49)-re a pHMM263-ban. Ezeket a származékokat azért állítjuk elő, hogy csökkentjük a proteolízisre való érzékenységet a fúziós fehérjék szintézise és tisztítása során. Mindegyik szóbanforgó vektor oldható fúziós fehérjéket kódol.

5. Példa

Szerin-hidroxi-metiltranszferáz (SHMT)-béta-lipotropin fúziós fehérjét kódoló pHMM268 rekombináns vektor

A szerin-hidroxi-metiltranszferáz (SHMT) N-terminális szekvenciáját tartalmazó fúziós fehérjét készítünk standard klónozási technikák használatával. A pHMM268 plazmid magas szinten expresszálódik *Escherichia coli*-ban. A pHMM268 által termelt fúziós fehérje oldhatatlan, és a részecske frakcióval kinyerhető. Ez a tulajdonság előnyt biztosít a proteolitikus degradációval szembeni védelemben.

6. Példa

Egér béta-lipotropin beadása 7 napig hím A^{vy/A} egereknek

Az A^{vy/A} egér az elhízás és a cukorbetegség modellje. Ebben a beltenyésztett törzsben hiperglikémia, hiperinzulinémia és in-

zulin érzéketlenség fejlődik ki életének középső szakaszában, és így hasznos modellje mind az elhízásnak mind a cukorbetegségnek.

A hím $A^{vy/A}$ egereket a Harlan Co.-tól vásároljuk (Indianapolis, IN), körülbelül hathónapos korukban. Az állatokat hatosával helyezzük el a ketrecekben, majd *ad libitum* 5008 táppal és vízzel tápláljuk. A vércukor-szintet szabályos időközönként mérjük; ha az állatokban a reggeli glükóz-szint elér legalább 300 mg/dm^3 szintet, akkor az állatokat alávetjük a kísérleti protokollnak. Öt, véletlenszerűen kiválasztott állatot teszünk egy ketrecbe, ez a kontroll csoport; öt, véletlenszerűen kiválasztott állatot teszünk egy ketrecbe, ezeket kezeljük egér béta-lipotropinnal [az egér béta-lipotropin szekvencia könnyen hozzáférhető; Notake és mtsai: FEBS Letters 156, 67-71 (1983); amely publikációt a továbbiakban referenciaként kezelünk], amit szilárd fázisú technikával állítunk elő.

A béta-lipotropinnal kezelt egerek $60 \mu\text{g}$ -ot kapnak szubkután (BID SC) (mindegyik dózis $200 \mu\text{l}$ oldat); a kontroll állatok $200 \mu\text{l}$ hordozót (sóoldat) kapnak. Az állatokat hat napig naponta kétszer injektáljuk, reggel és délután; a 7. napon csak a reggeli injekciót kapják meg.

A vércukor-szintet, a testsúlyt és a tápfogyasztást a 0. nap reggelén megmérjük. A testsúlyt és a tápfogyasztást az 1-6. napokon reggel mérjük. A plazma triglicerideket a 6. nap reggelén mérjük meg. Az egereket a 6. napról a 7. napra virradó éjszakán éheztetjük. A 7. napon orális glükóz-tolerancia tesztet végzünk. A nulla időponthoz tartozó vércukor-szinteket 2 órával a reggeli sóoldat vagy béta-lipotropin injekció után mérjük meg. Ehhez a vizsgálathoz az állatoknak orálisan 25% szacharóz oldatot adunk ($100 \mu\text{l}/10 \text{ g}$ testsúly), majd 30, 60 és 120 perccel később vért veszünk tőlük. A vérmintákat használjuk a glükóz és az inzulin szintjének meghatározására. Az orális vércukor-szint meghatározás után az állatokat *ad libitum* tápláljuk. Az utolsó szubkután sóoldat vagy béta-lipotropin injekció utáni 1., 3. vagy 14. napon az állatoktól vért veszünk, hogy meghatározzuk a vércukor szintjét.



EREDMÉNYEK:

A béta-lipotropin beadás *in vivo* csökkenti a vércukor és az inzulin szintjét

Ezeknek a kísérleteknek az eredményeit az 1-8. ábrán foglaljuk össze. A hétnapos kezelés során a kontroll csoportban és a vizsgált csoportban levő állatok durván 4,5-6 gramm tápot fogyasztanak (1. ábra). Mindkét csoportban a testsúlyok ugyanazok maradtak, azaz körülbelül 50 gramm (2. ábra).

A béta-lipotropin kezelés csökkenti a plazma trigliceridek szintjét a kezelt állatokban, hatnapos kezelés után (3. ábra). A kontroll állatok átlagértéke 3,05 nmol/liter (s.d. 0,58), míg a kezelt állatok mért átlagértéke 2,05 nmol/liter (s.d. 0,43). Ez a szérum trigliceridek szintjének csökkenését jelenti, körülbelül 30-35 százalékkal.

A béta-lipotropin emellett a vércukor szintjének lényeges csökkenését is okozza a kezelt állatokban (4. ábra). A béta-lipotropin hétnapos beadása után a kezelt csoportban a vér glükóz-szintje 135 mg/dm³ (s.d. 16); ezzel éles ellentétben a a kontroll csoportban 171 mg/dm³-t mértünk (s.d. 16).

A vér glükóz-szintjének csökkenése a kezelt állatokban még legalább 3 napig folytatódik a béta-lipotropin 7. napon történő utolsó beadása után (5. ábra). A kontroll állatok glükóz-szintje 331 mg/dm³ (s.d. 79). Másrészt viszont a kezelt állatokban lényegesen alacsonyabb vér glükóz-szint maradt meg (205 mg/dm³, s.d. 76). A béta-lipotropinnak a vércukor szintjének csökkentésére gyakorolt hatását a béta-lipotropin utolsó beadása után 14 nappal már nem lehet megfigyelni (6. ábra).

Ahhoz, hogy megvizsgáljuk a béta-lipotropin kezelés hatáseit az inzulin szintekre, orális glükóz-tolerancia vizsgálatot hajtunk végre a hétnapos kezelési periódus és egy éjszakán át való éheztetés után (7. és 8. ábra). A kontroll és kezelt állatokban a vizsgálat megkezdése után a vércukor szintje először megnőtt, körülbelül 80 mg/dm³-ról 200 mg/dm³-re, vagy többre; ezután mindkét csoportban csökkentek az értékek, egészen a kétórás időpontig (7. ábra). Meglepő módon a kezelt állatok plazma inzulin értékei lényegesen a kontroll állatok értékei alatt vannak (8. ábra). Például a 30 perces időpontban a kontroll állatok inzulin-



szintje 11,5 ng/ml volt (s.d. 1,9), míg a kezelt állatok inzulin-szintje 6,0 ng/ml volt (s.d. 3,0).

7. Példa

Egér béta-lipotropin beadása 14 napig hím $A^{vy/A}$ egereknek

Hím $A^{vy/A}$ egereket hatosával helyezünk el ketrecekben, majd *ad libitum* 5008 etetjük és itatjuk. A vér glükóz-szintjét szabályos időközönként megmérjük; amikor a glükóz reggeli szintje elér legalább 300 mg/dm³ szintet, akkor az állatokat alávetjük a kísérleti protokollnak. Kontrollként öt véletlenszerűen kiválasztott állatot teszünk egy ketrecbe; öt véletlenszerűen kiválasztott állatot teszünk egy ketrecbe és kezelünk egér béta-lipotropinnal, amit szilárd fázisú technikával szintetizáltunk.

A béta-lipotropin kezelést kapott egerek 60 µg-ot kapnak BID szubkután (200 µl ösztérfogat az egyes dózisokban); a kontroll állatok 200 µl hordozót (sóoldat) kapnak. Az állatokat 13 napig naponta kétszer injekciózzuk, reggel és délután; a 14. napon csak a reggeli injekciót kapják meg.

A vércukor-szinteket, a testsúlyt és a tápfogyasztást mérjük a nulladik nap reggelén. A testsúlyt és a tápfogyasztást az 1-13. napon mérjük. Az egereket éjszakán át éheztetjük a 13. nap délutánjától a 14. nap reggeléig. A 14. napon orális glükóz tolerancia vizsgálatot végzünk. A nulla időponthoz tartozó vércukor-szinteket 2 órával a reggeli sóoldat vagy béta-lipotropin injekció után mérjük meg. Ehhez a vizsgálatához az állatoknak 25%-os szacharóz oldatot adunk be orálisan (100 µl/10g testsúly), majd 30, 60 és 120 perccel veszünk vért. A vérmintákból határozzuk meg a glükóz és az inzulin szintjét. Az orális glükóz tolerancia vizsgálat után az állatokat *ad libitum* tápláljuk. Az utolsó szubkután sóoldat vagy béta-lipotropin injekció után az állatokból vért veszünk, hogy meghatározzuk a vér glükóz-szintjét.

EREDMÉNYEK:

A 14 napig tartó béta-lipotropin adagolás csökkenti a vér glükóz- és inzulin-szintjét

Az eredményeket a 9-10. ábrán mutatjuk be. A 14 napos kezelés során a kontroll-csoportban és a vizsgálati csoportban

levő állatok durván 4,5-6 gramm tápot fogyasztanak, és a testsúly mindkét csoportban ugyanaz marad, körülbelül 50 gramm (nem közölt adatok).

A kéthetes béta-lipotropin kezelésnek az inzulin-szintekre gyakorolt hatásának vizsgálatához orális glükóz-tolerancia szintet hajtunk végre a 14 napos periódus után (9. és 10. ábra). A kontroll és kezelt állatokban a vér glükóz-szintje először körülbelül 80 mg/dm³-ről körülbelül 300 mg/dm³-re vagy többre nő 30 perccel később; ezután mindkét csoportban az értékek összehasonlítható módon csökkennek, egészen a vizsgálat kétórás végpontjáig (9. ábra). A kezelt állatok átlagos vércukor-szintje például a 30 perces mérési pontban 289 mg/dm³ volt (s.d. 24), míg a kontrollok szintje 348 mg/dm³ volt (s.d. 18). Alacsonyabb szinteket figyelhetünk meg a 60 és 120 perces időpontokban is. Például 120 percnél a kezelt állatok átlagos vér glükóz-szintje 114 mg/dm³ volt (s.d. 4), míg a kontrollok szintje 188 mg/dm³ volt (s.d. 23).

A kezelt állatok plazma inzulin-szintje lényegesen a kontroll állatoké alatt maradt (10. ábra). Például a 30 perces időpontban a kontroll állatok inzulin-szintje 7,4 ng/ml volt (s.d. 2,1), míg a kezelt állatok inzulin-szintje 4,8 ng/ml volt (s.d. 0,6).

8. Példa

A béta-lipotropin serkenti a glükóz felvételét a 3T3 adipocitákban

Egér 3T3-L1 sejteket szélesztünk lukanként körülbelül 100 μ l táptalajban, 96 lukas lemezekre, úgy, hogy az egyes lukakba körülbelül 25000 sejt jusson.

Szaporító táptalaj:

DMEM, magas glükóztartalom, L-glutamin
nélkül
10%-os borjúsérum
2 mmol/l L-glutamin
1% PenStrep
1,25 μ g/ml Fungizone

A sejteket indukáljuk, hogy adipocitákká differenciálódjanak 3 nappal a szélesztés után, oly módon, hogy a szaporító táptalajt differenciálódító táptalajjal helyettesítjük.

Differenciálódító táptalaj:

DMEM, magas glükóztartalom, L-glutamin
nélkül
10%-os FBS
2 mmol/l L-glutamin
1% PenStrep
1,25 μ g/ml Fungizone
10 mmol/l HEPES
0,25 μ mol/l dexametazon (1 μ l/ml egy
0,25 mmol/l-es törzsoldatból)
0,5 mmol/l IBMX (10 μ l/ml egy 50
mmol/l-es törzsoldatból)
5 μ g/ml inzulin (1 μ l/ml egy 5 mg/ml-es
törzsoldatból)

A táptalajt leszívással eltávolítjuk a sejtekről, egy vákuum-forráshoz kapcsolt, áramlás-szabályozóval ellátott nyolccsatornás pipetta használatával. Friss táptalajt teszünk a lukakba egy nyolccsatornás Matrix elektronikus pipettával, amit a legkisebb sebességre állítottunk, hogy minimalizáljuk a sejtek roncsolódását.

Az 1. napon 100 μ l differenciálódtató táptalajt adunk az egyes lukakhoz, hogy a 3T3 sejtek adipocitákká való differenciálódását iniciáljuk. A differenciálódás kezdete után három nappal a táptalajt inzulint tartalmazó differenciálódtató táptalajra változtatjuk, ami viszont IBMX-et vagy dexametazont nem tartalmaz (Inzulin táptalaj). A 6. napon a táptalajt megint megváltoztatjuk inzulint, IBMX-et vagy dexametazont nem tartalmazó táptalajra (FBS táptalaj). A sejteket FBS táptalajban tartjuk, minden másnap tápláljuk őket, ameddig alkalmassá nem válnak a glükóz-transzport vizsgálatra a differenciálódás kezdete utáni 15-21. napon.

9. Példa

Glükóz-transzport vizsgálat olyan 3T3 sejtekben, amiket adipocitákká való differenciálódásra indukáltunk béta-lipotropin jelenlétében

Egér 3T3-L1 sejteket indukálunk a 8. példában leírt módon, hogy adipocitákká indukálódjanak. A glükóz-transzport vizsgálat elvégzése előtt 15-24 órával a sejteket az alábbiak szerint kezeljük:

1. A sejteket kétszer mossuk 100 ml foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) 37 °C-on, a mosások között a folyadékot leszívva.
2. Ezután 100 ml DMEM, magas glükóztartalom, 1% antibiotikum/antimikotikum oldat, 2 mmol/l glutamin, 0,1% BSA (37 °C-ra melegítve), 0-1000 nmol egér béta-lipotropin (szilárd fázisú technikával szintetizálva) és 0-100 nmol inzulin összetételű oldatot adunk az egyes lukakhoz. Ez a szérum-éheztetési fázis.
3. A sejteket ezután éjszakán át inkubáljuk 37 °C-on.
A vizsgálat napján a sejteket az alábbiak szerint kezeljük:
 1. A táptalajt eltávolítjuk, a lemezeket papírtörülközőkre blottoljuk, majd a sejteket kétszer mossuk 100 ml KRBH pufferrel (Krebs-Ringer puffer, ami HEPES-t tartalmaz, pH=7,4).
 2. Az utolsó mosófolyadék eltávolítása után a sejteket 1 óra hosszat 37 °C-on inkubáljuk 100 µl KRBH, 0,1% BSA, 100 µmol/l glükóz, 10 µl/ml (0,1 µCi/luk) radioaktívan jelzett 2-dezoxiglükóz (^{14}C) és a kívánt inzulin koncentráció összetételű oldatban.
 3. A radioaktív glükózzal való inkubálás után 10 µl 200 µmol/l koncentrációjú $10\times$ cytochalasin B-t adunk hozzá, hogy leállítsuk a sejtek további glükóz-felvételét.
 4. A radioaktív izotóppal jelzett glükóz felvételét úgy határozzuk meg, hogy a lemezeket Microbeta lemezolvasóval olvassuk le.

Eredmények:

Ennek a kísérletnek az eredményeit a 11. ábrán foglaljuk össze. A glükóznak az adipocitákká való differenciálódásra indukált 3T3 sejtekbe való felvétele körülbelül 3-6-szorosra nő, ha az adipocitákat a felvételi vizsgálat előtt béta-lipotropinnal kezeljük.

10. Példa

Glükóz-transzport vizsgálat olyan 3T3 sejtekben, amiket adipocitákká való differenciálódásra indukáltunk béta-lipotropin jelenlétében

Egér 3T3-L1 sejteket indukálunk a 8. példában leírt módon, hogy adipocitákká indukálódjanak. A glükóz-transzport vizsgálat elvégzése előtt 15-24 órával a sejteket az alábbiak szerint kezeljük:

4. A sejteket kétszer mossuk 100 ml foszfáttal pufferelt sóoldattal (PBS) 37 °C-on, a mosások között a folyadékot leszívva.
5. Ezután 100 ml DMEM, magas glükóztartalom, 1% antibiotikum/antimikotikum oldat, 2 mmol/l glutamin, 0,1% BSA (37 °C-ra melegítve), 0-1000 nmol egér vagy humán béta-lipotropin (szilárd fázisú technikával szintetizálva) és 0-100 nmol inzulin összetételű oldatot adunk az egyes lukakhoz. Ez a szérum-éheztetési fázis. Az egyik vizsgálatban például az ebben a leírásban a 10. számú szekvenciavázlaton bemutatott humán béta-lipotropin fragmenst használjuk; egy másik vizsgálatban az ebben a leírásban a 12. számú szekvenciavázlaton bemutatott humán béta-lipotropin fragmenst használjuk.
6. A sejteket ezután éjszakán át inkubáljuk 37 °C-on.
A vizsgálat napján a sejteket az alábbiak szerint kezeljük:
 1. A táptalajt eltávolítjuk, a lemezeket papírtörülközőkre blottoljuk, majd a sejteket kétszer mossuk 100 ml KRBH pufferrel (Krebs-Ringer puffer, ami HEPES-t tartalmaz, pH=7,4).
 2. Az utolsó mosófolyadék eltávolítása után a sejteket 1 óra hosszat 37 °C-on inkubáljuk 100 µl KRBH, 0,1% BSA, 100 µmol/l glükóz, 10 µl/ml (0,1 µCi/luk) radioaktívan



jelzett 2-dezoxiglükóz (^{14}C) és a kívánt inzulin koncentráció összetételű oldatban.

3. A radioaktív glükózzal való inkubálás után $10\ \mu\text{l}$ $200\ \mu\text{mol/l}$ koncentrációjú $10\times$ cytochalasin B-t adunk hozzá, hogy leállítsuk a sejtek további glükóz-felvételét.
4. A radioaktív izotóppal jelzett glükóz felvételét úgy határozzuk meg, hogy a lemezeket Microbeta lemezolvasóval olvassuk le.

Eredmények:

A glükóznak az adipocitákká való differenciálódásra indukált 3T3 sejtekbe való felvétele megnő, ha az adipocitákat a felvételi vizsgálat előtt béta-lipotropin funkcionális fragmenseivel kezeljük.

11. Példa

A béta-lipotropin funkcionális analógjai

Egér 3T3-L1 sejteket indukálunk a 10. példában leírt módon, hogy adipocitákká differenciálódjanak. Az adipocitákat azután a humán béta-lipotropin analógokkal hozzuk érintkezésbe, például a 26-35. számú szekvenciavázlaton bemutatott fragmensekkel, és a glükóz transzportot a 8. példában leírt módon követjük. A funkcionális analógokkal lényegében ugyanazokat az eredményeket kapjuk mint a természetes béta-lipotropinnal.

12. Példa

Humán béta-lipotropin beadása 14 napig hím $A^{vy/A}$ egerekbe

Szilárd fázisú módszerrel szintetizált humán béta-lipotropint adunk be hím $A^{vy/A}$ egerekbe, a 7. példában ismertetett dózisban és beadási mód szerint.

Eredmények

A humán béta-lipotropin beadása lényegesen csökkenti a szérum inzulin-szintet hím $A^{vy/A}$ egerekben (lásd a 12. és 13. ábrát).



Az eredményeket a 12. és 13. ábrán foglaljuk össze. A 14 napos kezelés során a kontroll csoportban és a vizsgálati csoportban levő állatok durván 4,5-6 gramm tápot fogyasztanak, és a testsúly mindkét csoportban ugyanaz marad, körülbelül 50 gramm (nem közölt adatok).

A kéthetes béta-lipotropin kezelésnek az inzulin-szintekre gyakorolt hatásának vizsgálatához orális glükóz-tolerancia vizsgálatot hajtunk végre a 14 napos periódus után. A kontroll és kezelt állatokban a vér glükóz-szintje először körülbelül 80 mg/dm³-ről körülbelül 300 mg/dm³-re vagy többre nő 30 perccel később; ezután mindkét csoportban az értékek összehasonlítható módon csökkennek, egészen a vizsgálat kétórás végpontjáig (12. ábra). A kezelt állatok átlagos vércukor-szintje például a 30 perces mérési pontban 400 mg/dm³ volt (s.d. 12), míg a kontrollok szintje 330 mg/dm³ volt (s.d. 19). Alacsonyabb szinteket figyelhetünk meg a 60 és 120 perces időpontokban is. Például 120 percnél a kezelt állatok átlagos vér glükóz-szintje 178 mg/dm³ volt (s.d. 16), míg a kontrollok szintje 202 mg/dm³ volt (s.d. 13).

A kezelt állatok plazma inzulin-szintje lényegesen a kontroll állatoké alatt maradt (13. ábra). Például a 30 perces időpontban a kontroll állatok inzulin-szintje 14,0 ng/ml volt (s.d. 1,5), míg a kezelt állatok inzulin-szintje 10,2 ng/ml volt (s.d. 0,4). A 120 perces időpontban a kontroll állatok inzulin-szintje 9,3 ng/ml volt (s.d. 2,3), a kezelt állatok inzulin-szintje 5,4 ng/ml volt (s.d. 0,9).

13. Példa

Egér béta-lipotropin beadás hím *Lep^{ob}/Lep^{ob}* egereknek

A hím *Lep^{ob}/Lep^{ob}* egereket a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME) vásároljuk, majd egyenként helyezzük el őket a ketrecekben és *ad libitum* 5008 tápláljuk majd itatjuk őket. Az egereket a farkukon véreztetjük a kiindulási glükóz, inzulin és triglicerid értékek meghatározása céljából. Az egereket kontroll, 60 µg vagy 120 µg BID egér béta-lipotropin kezelést kapó csoportokba osztjuk. A kezelt egerek vagy 60 µg-t kapnak BID szubkután vagy 120 µg-ot kapnak BID szubkután (mindegyik dózis



200 μ l ösztérfogatban); a kontroll egerek 200 μ l hordozót (sóoldat) kapnak. Az egereket 16 napig naponta reggel 7:00-kor és délután 3:00-kor injekciózzuk, majd a 17. napon csak reggel 7:00-kor. A testsúlyt és a tápfogyasztást a 0-17. napokon reggel mérjük. A 7. nap reggelén az egerek farkából veszünk vért, és megmérjük a vér glükóz, inzulin és triglicerid értékeit. Az egereket a 13. napról a 14. napra virradó éjszakán éheztetjük. A 14. napon orális glükóz-tolerancia tesztet végzünk. A nulla időponthoz tartozó vércukor-szinteket 2 órával a reggeli injekció után mérjük meg. Ehhez a vizsgálathoz az egereknek orálisan 25% szacharóz oldatot adunk (100 μ l/10 g testsúly), majd 30, 60 és 120 perccel később vért veszünk tőlük. A vérmintákat használjuk a glükóz és az inzulin szintjének meghatározására. Az orális vércukor-szint meghatározás után az állatokat *ad libitum* tápláljuk. A 16. napon a farokból vett vérmintákat használjuk a vér glükóz-, inzulin-, triglicerid- és kortikoszteron értékeinek meghatározásához. A 17. napon az egereket leöljük.

Az ebből a kísérletből származó eredményeket a 14. ábrán mutatjuk be. A plazma inzulin-szintje lényegesen alacsonyabb volt a kezelt állatokban a 16 napos kezelési periódusban. Például a kezelés 7. napján a kontroll állatokban az inzulin érték körülbelül 300 ng/ml volt, míg a kezelt állatokban körülbelül 215 ng/ml volt, legalább 30%-kal kevesebb. Emellett a plazma inzulin-szintek alacsonyabbak voltak a kezelt állatokban a kezelés 16. napján (14. ábra).

14. Példa

A humán béta-lipotropin AlzetTM pumpával való beadása hím *Lep^{ob}/Lep^{ob}* egereknek

A hím *Lep^{ob}/Lep^{ob}* egereket a Jackson Laboratories-tól (Bar Harbor, ME) vásároljuk, majd egyenként helyezzük el őket a ketrecekben és *ad libitum* 5008 tápláljuk majd itatjuk őket, 12 órás megvilágítási ciklust használva (délután 6:00-tól reggel 6:00-ig kikapcsolva a fényt). Az egereket a farkukon véreztetjük a kiindulási glükóz, inzulin és triglicerid értékek meghatározása céljából. A kezelt állatoknak 0,24 mg/nap vagy 0,48 mg/nap humán béta-lipotropint (ER4-VBH-43) adunk be folyamatosan,



szubkután beültetett AlzetTM pumpákkal (Alza, Inc.), oly módon, hogy az átlagos glükóz- és triglicerid értékek azonosak legyenek mind a 3 csoportban. A kontroll állatoknak sóoldatot adunk. A pumpákat a kontroll csoport esetében sóoldattal töltöttük meg, 20 mg/ml humán béta-lipotropinnal az alacsony dózisú csoport esetében, és 40 mg/ml humán béta-lipotropinnal a magas dózisú csoport esetében. A pumpa beültetése előtt az egereket izofluránnal érzéstelenítettük. A testsúlyt és a tápfogyasztást a 0-7. napokon reggel mérjük. A 4. nap reggelén az egerek farkából veszünk vért, és megmérjük a vér glükóz, inzulin és triglicerid értékeit. Az egereket a 6. napról a 7. napra virradó éjszakán éheztetjük.

A 7. napon orális glükóz-tolerancia tesztet végzünk. Az egerek farkából veszünk vért az inzulin és a glükóz meghatározásához, majd orálisan 25% szacharóz oldatot adunk be nekik (100 µl/10 g testsúly), majd 30, 60 és 120 perccel később vért veszünk tőlük. A vérmintákat használjuk a glükóz és az inzulin szintjének meghatározására. Az orális glükóz-tolerancia teszt után az állatokat *ad libitum* tápláljuk.

A glükóz tolerancia tesztből kapott plazma inzulin szint eredményeket a 15. ábrán mutatjuk be. A 0,24 mg béta-lipotropin/nap beadásnál az érték 25%-kal alacsonyabb mint a kontrollnál, míg a 0,48 mg béta-lipotropin/nap beadásnál körülbelül 40%-kal alacsonyabb mint a kontrollnál (15. ábra, görbe alatti terület).



15. Példa

A humán béta-lipotropin fehérje egy analógjának szilárd fázisú szintézise és tisztítása

A humán béta-lipotropin peptid egy analógját (azaz a 26. számú szekvenciavázlaton bemutatott analóg), amiben a 8. számú szekvenciában szereplő Glu-t Ala helyettesíti egyetlen menetben szintetizáljuk meg, Fmoc kémia alkalmazásával. A BLT szintézisét számos asp-gly dipeptid szekvenciának a molekula N-terminális részén való jelenléte komplikálja. Az asp-gly dipeptid szekvenciák aspartil oldalláncairól megfigyelték, hogy lúggal katalizált ciklizálódáson, majd ezt követően az Fmoc szintézis során piperidinnel való addíción esnek át. Ezt a reakciót a szintézis során az egyes asp-gly szekvenciáknál Fmoc-(FmocHmb)-glicin használatával lehet eliminálni. A glicilamid Hmb csoporttal való megvédése gátolja az aszpartil oldallánc ciklizálódását. A hasítás, védőcsoport eltávolítás és fordított fázisú HPLC tisztítás után a peptidet elektronpermet tömegspektroszkópiával lehet elemezni. A béta-lipotropinnak ebben a szintézisében látható fő molekulafajta a várt tömeggel rendelkező, teljes hosszúságú peptid. Ha ezt a módszert használjuk, akkor egyetlen menetben, a 0,1 mmol skálán több mint 100 mg tisztított fehérjét lehet előállítani.

Anyagok: Előre töltött Fmoc-Glu (OtBu) Wang (1% kereszt-kötéses polisztirol, p-benzoxibenzil-alkohollal) gyanta, körülbelül 0,6 mmol/l aminosav/g gyanta. N-metil-pirrolidon (NMP), piperidin, 2-(1H-benzo-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil urónium-hexafoszfát (HBTU), 2 mol/l N,N-diizopropiletilamin (DIEA), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), diklórmétán (DCM), dimetilformamid (DMF).

Az Fmoc védett C-terminális aminosavval (0,1 vagy 0,25 mmol aminosav) előre töltött gyantát lemérjük, majd egy reakciókamrába tesszük. A gyantát előre duzzasztjuk diklórmétánnal való mosással. A gyantát azután NMP-vel mossuk. A N-terminális Fmoc csoportot eltávolítjuk, a gyantát 18-22%-os, NMP-ben készített piperidin oldatban inkubálva. A védőcsoport eltávolítása után a gyantát alaposan mossuk NMP-vel.

A peptidhez adandó következő Fmoc-védett aminosavból egy mmol-t szolubilizálunk dimetilformamidban készített 2,1 g



NMP, 2,0 g 0,45 mol/l HBTU/HOBt reagensben. A szolubilizálást követően az aminosav aktiválását 3 ml, NMP-ben készített 2 mol/l DIEA hozzáadásával iniciáljuk. Az aktivált aminosavat azután a védőcsoporttól megszabadított gyantához adjuk, majd hagyjuk hogy kapcsolódjon. A kapcsolás teljes lejátszódása után a gyantát alaposan mossuk NMP-vel. A védőcsoport eltávolításának és a kapcsolásnak a ciklusát azután minden egyes következő aminosavra megismételjük.

A szintézisben a specifikus ciklus lépések az alábbiak.

<u>Ciklus</u>	<u>Aminosav</u>	<u>Lépések</u>
1	Ala	Teljes mosás
2	Gly	egyszeres kapcsolás
3	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
4	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
5	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
6	Ala	egyszeres kapcsolás
7	Asn(Trt)	egyszeres kapcsolás
8	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
9	Ile	egyszeres kapcsolás
10	Ile	egyszeres kapcsolás
11	Ala	egyszeres kapcsolás
12	Asn(Trt)	egyszeres kapcsolás
13	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
14	Phe	egyszeres kapcsolás
15	Leu	egyszeres kapcsolás
16	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
17	Val	egyszeres kapcsolás
18	Leu	egyszeres kapcsolás
19	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
20	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
21	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
22	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
23	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
24	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
25	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
26	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
27	Met	egyszeres kapcsolás

28	Phe	egyszeres kapcsolás
29	Gly	egyszeres kapcsolás
30	Gly	egyszeres kapcsolás
31	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
32	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
33	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
34	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
35	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
36	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
37	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
38	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
39	Gly	egyszeres kapcsolás
40	Trp(Boc)	egyszeres kapcsolás
41	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
42	Phe	egyszeres kapcsolás
43	His(Trt)	egyszeres kapcsolás
44	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
45	Met	egyszeres kapcsolás
46	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
47	Tyr(tBu)	egyszeres kapcsolás
48	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
49	Gly	egyszeres kapcsolás
50	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
51	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
52	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
53	Lys(Boc)	egyszeres kapcsolás
54	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
55	Ala	egyszeres kapcsolás
56	Ala	egyszeres kapcsolás
57	Val	egyszeres kapcsolás
58	Leu	egyszeres kapcsolás
59	Leu	egyszeres kapcsolás
60	Ser(tBu)	egyszeres kapcsolás
61	His(Trt)	egyszeres kapcsolás
62	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
63	Leu	egyszeres kapcsolás
64	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás



65	Ala	egyszeres kapcsolás
66	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
67	Ala	egyszeres kapcsolás
68	Gly	egyszeres kapcsolás
69	Ala	egyszeres kapcsolás
70	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
71	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
72	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
73	Ala	egyszeres kapcsolás
74	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
75	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
76	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
77	Pro	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
78	Gly(Fmoc-hmb)	kétszeres kapcsolás/Ac20 cap
79	Asp(OtBu)	egyszeres kapcsolás
80	Gly	egyszeres kapcsolás
81	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
82	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
83	Leu	egyszeres kapcsolás
84	Arg(Pmc)	egyszeres kapcsolás
85	Gln(Trt)	egyszeres kapcsolás
86	Gly	egyszeres kapcsolás
87	Thr(tBu)	egyszeres kapcsolás
88	Leu	egyszeres kapcsolás
89	Glu(OtBu)	egyszeres kapcsolás
90		A védőcsoportok végső eltávolítása

A lassan vagy nem elég hatékonyan reagáló aminosavakhoz 2 külön kapcsolási reakciót kell végrehajtani. Minden megmaradt, nem reagált peptidet ecetsav-anhidrides kezeléssel blokkolunk. Az egyik ilyen aminosav esetében a lépések sorrendje védőcsoport eltávolítás, 1. kapcsolási reakció, mosás, 2. kapcsolási reakció, mosás, Ac20 cap, mosás, védőcsoport eltávolítás.

Rövidítések: OtBu: terc-butil-észter, tBu: terc-butil, Boc: terc-butoxikarbonil, Pmc: 2,25,7,8-pentametilkroma-6-szulfonil, Hmb: 2-hidroxi-4-metoxibenzil, Fmoc: 9-fluorenil-metoxikarbonil.



16. Példa

Humán béta-lipotropin beadása Alzet pumpával him ZDF patkányoknak

Hím Zucker cukorbeteg Fatty (ZDF) patkányokat a Genetics Models Inc.-től (Indianapolis, IN) vásároljuk, majd egyenként tesszük ketrecbe, majd *ad libitum* 5008 etetjük és itatjuk őket. Öthetes korukban a patkányokat éjszakán át éhezettetjük, a kiindulási orális glükóz tolerancia teszt elvégzéséhez. 0 időpontban a patkányok farkából vett vérből határozzuk meg az inzulin- és glükóz-szinteket, majd az állatoknak orálisan 50% szacharóz oldatot adunk be (2,5 g/testsúlykg), majd vért veszünk belőlük a beadás után 30, 60 és 120 perccel. Az orális glükóz tolerancia teszt után a patkányokat *ad libitum* tápláljuk. Hathetes korukban az állatokat 4 állatból álló csoportokba osztjuk, mindegyiknek humán béta-lipotropint adunk be. A vizsgálat nulladik napján megint vért veszünk a patkányok farkából, a glükóz, inzulin, kortikoszteroidon és triglicerid értékek meghatározása céljából. A patkányokat véletlenszerűen osztjuk be a kontroll csoportba, vagy a szubkután beültetett Alzet pumpákkal 0,5 mg/nap vagy 1,0 mg/nap folyamatos humán béta-lipotropin (ER4-VTA-2) infúziót kapó csoportba. A pumpákat a kontrollok esetében sóoldattal töltjük, az alacsony dózist kapó csoport esetében 20,835 mg/ml humán béta-lipotropinnal, a magas dózist kapó csoport esetében 41,67 mg/ml humán béta-lipotropinnal. A pumpákat a szubkután beültetése előtt egy éjszakán át 37 °C-on inkubáljuk sóoldatban. A testsúlyt és a tápfogyasztást a 0-8. napon mérjük. A 3. nap reggelén vért veszünk, a glükóz, inzulin, kortikoszteroidon és triglicerid értékek meghatározása céljából. A patkányokat éjszakán át éhezettetjük az 5. nap délutánjától a 6. nap reggeléig. A 6. napon orális glükóz-tolerancia tesztet hajtunk végre. Az orális glükóz tolerancia teszt után a patkányokat *ad libitum* tápláljuk.

Az ebben a vizsgálatban használt Zucker állatok a 2-es típusú cukorbetegség jó modelljei. 6-7 hetes korban a vércukor értékek és a triglicerid szintek megemelkednek, miközben az inzulin szekréció csökken. Ezek az állatok hiperkortikoszteroidonémiások és inzulin rezisztensek.

3. Táblázat

Humán béta-lipotropinnal kezelt ZDF patkányok

Kezelés (mg/nap BLT)	Vér glükózsint (mg/dm ³)			Triglicerid (mmol/liter)		
	0	2. nap	7. nap	0	2. nap	7. nap
Kontroll	149	153	150±8,8	1,9	2,4	4,1±0,5
0,5	151	160	150±5,5	2,0	2,8	4,0±0,4
1,0	154	144	141±5,7	2,0	2,8	3,6±0,1

A 3. táblázatban és a 16. ábrán bemutatott eredmények a humán béta-lipotropin jelentős hatását mutatják a ZDF patkányokra, 1 mg/nap humán béta-lipotropin dózisonál. Az OGTT iniciálása után 30 perccel a plazma glükóz szintek átlaga 191 ± 16 mg/dm³ volt a kontrollokban és 172 ± 5 mg/dm³ a béta-lipotropinnal kezelt állatokban (16. ábra). Az iniciálás után 60perccel a kontroll állatok glükóz-szintje 157 ± 6 mg/dm³, míg a béta-lipotropinnal kezelt állatokban 154 ± 8 mg/dm³.

A 3. táblázatból azt láthatjuk, hogy a vér glükóz-szintje alacsonyabb maradt a béta-lipotropinnal kezelt állatokban mint a kontroll állatokban, különösen magasabb dózisban. A kontroll állatok glükóz értéke körülbelül 150 mg/dm³ volt a béta-lipotropin beadásának megkezdése után a 0., 2. és 7. napon. Másrészt viszont az 1 mg/nap humán béta-lipotropinnal kezelt állatokban a 7. napon a glükóz-szintek átlaga körülbelül 140 mg/dm³ volt, körülbelül 7%-kal alacsonyabb mint a kontroll állatokban. A kezelt állatokban a szérum triglicerid szint is körülbelül 11%-kal alacsonyabb volt mint a kontroll állatokban (3. táblázat), ami a béta-lipotropin kezelés inzulinotróp hatását igazolja.

17. PéldaA humán béta-lipotropin serkenti a glükóz-transzportot a ZDF patkányok vázizmaiban

Vizsgálatot végeztünk annak meghatározására, hogy a béta-lipotropinnak milyen hatása van a glükóz-transzportra a vázizomban. A hím Zucker cukorbeteg Fatty (ZDF) patkányokat a



Genetics Models Inc.-től (Indianapolis, IN) vásároljuk. A patkányokat Purina Formulab 5008 patkánytápon (Purina Mills, Inc., St. Louis, MO) tartjuk, majd szabályozott megvilágítású szobában tartjuk, ahol a fény és a sötétség 12 órás ciklusokban változik. A patkányokat egyenként helyezzük el a ketrecbe, majd szabad hozzáférést biztosítunk számára a táplálékhoz és a vízhez.

A glükóz-transzport izomszövetben való meghatározására a 16. példában használt állatokat érzéstelenítjük 6,5 mg/100 mg interperitoneális pentobarbitol-nátrium injekcióval, majd a talpemelő izmokat izoláljuk és két egyforma részre osztjuk. A szövetmintának mindkét felét 2 percig mossuk sóoldattal, majd levegőztetett (95% O₂ – 5% CO₂), 1% BSA-t, 8 mmol/l glükózt és 32 mmol/l mannitot tartalmazó KHB-vel mossuk.

A glükóz-transzport vizsgálatot az alábbiak szerint hajtjuk végre:

Elő-inkubálás:

Izomszövet mintákat viszünk át 20 ml-es csövekbe, amik 1,8 ml gázosított, 1% BSA-t, 8 mmol/l glükózt és 32 mmol/l mannitot tartalmazó KHB-t tartalmaznak, és vagy tartalmaznak 500 nmol/l egér béta-lipotropint vagy nem. A mintákat 20 órára szobahőmérsékletű rázás vízfürdőbe tesszük, miközben kétszer cseréljük a puffert.

Az előinkubálás után az izomszövet-mintákat 15 percig 29 °C-on mossuk konstans levegőztetés közben (95% O₂ – 5% CO₂). A mintákat 1,8 ml, 40 mmol/l mannitot tartalmazó KHB-vel mossuk, ami vagy tartalmaz 2000 mikroE/ml inzulint, vagy nem, és vagy tartalmaz 500 nmol/l béta-lipotropint vagy nem.

Az izommintákat azután új csövekbe tesszük, konstans levegőztetéssel (95% O₂ – 5% CO₂). Az inkubáló közeg összetétele 8 mol/l 3-O-metil-glükóz (OMG), 2 mCi/ml ³H-3-OMG, 30 mmol/l mannit, 0,3 mCi/ml ¹⁴C mannit, 2 mmol/l piruvát, inzulin (2000 mikroE/ml) és egér béta-lipotropin. A kontrollokban nincs inzulin és/vagy béta-lipotropin. 10 percig tartjuk 29 °C-on, majd a mintákat lefagyasztva tároljuk a glükóz-transzport vizsgálat végrehajtásáig.

Glükóz transzport:

Az izmokat körülbelül 20-25 mg-os darabokra vágjuk, hogy 0,5 ml 1 mol/l kálium-hidroxidban emésszük 70 °C-on 30 percig. Az emésztés után a mintákat jégre tesszük, majd egy 100 µl-es mintát kiveszünk belőle glikogén elemzéshez. A megmaradt 0,4 ml-es mintához 0,4 ml 1 mol/l koncentrációjú sósavat adunk, majd a csövet vortexeljük. Ezután 300 µl sósavval kezelt mintát adunk 6,4 ml szcintillációs folyadékhoz, majd a minta radioaktivitását szcintillációs számlálóval határozzuk meg.

A glükóz-transzportot az intracelluláris ^3H -3-OMG akkumuláció alapján határozzuk meg, ^{14}C mannitot használva extracelluláris markerként.

Glikogén szintek

Az előzőekben említett 100 µl-es mintához 17 µl jégecetet adunk, 500 µl 0,3 mol/l koncentrációjú nátrium-acetát pufferrel együtt (pH=4,8 + 5 mg/ml amiloglikozidáz). A csöveket azután éjszakán át inkubáljuk 37 °C-on. A következő napon 50 µl mintát teszünk egy 96 lukas lemezbe, és 200 µl Trinder reagenst (Sigma 315-100; 20 µl vízzel hígítva) adunk hozzá. A lemezt 10 percig 37 °C-on inkubáljuk, majd az elnyelést 505 nm-en olvassuk le.

4. Táblázat

Glükóz-transzport ZDF patkányokból származó, humán béta-lipotropinnal kezelt izomszövetben

Kezelés	3 OMG transzport ($\mu\text{mol/g/10 perc}$
Kontroll	$0,085 \pm 0,01$
inzulin	$0,080 \pm$
BLT + inzulin	$113 \pm 0,018$

Az alábbiakban ismertetjük a leírásban említett szekvenciákat.

A SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) BENYÚJTÓ:

(A) NÉV: Butler, Jon P
Hale, John E.
Heath Jr., William F.
Schoner, Brigitte E.
Heiman, Mark L.
Becker, Gerald W.
Varshavsky, Alexander D.

(ii) A TALÁLMA NY A béta-lipotropin és felhasználása
CÍME:

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 35

(D) PROGRAM: PATENTIN RELEASE #1.0, VERSION
#1.25

1. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 273 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges Met-Arg humán béta-lipotropin

(xi) A szekvencia leírása: 1. számú szekvencia

atgcgtgagc tcaccggtca gcgtcttcgc gaaggtagc gtccggacgg tccggctgac 60
gacggtgctg gtgctcaggc agatctcgag cactccctgc tggttgctgc agaaaaaaaa 120
gacgaaggtc cgtaccgtat ggaacacttc cgttgggggtt ccccgccgaa agacaaacgt 180
tacgggtggtt tcatgacctc cgaaaaatcc cagacccgc tggttaccct gttcaaaaac 240
gctatcatca aaaatgcata caaaaaaggt gaa 273

2. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 91 aminosav
 (B) Típus: fehérje
 (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges Met-Arg humán béta-li-
 potropin
- (xi) A szekvencia leírása: 2. számú szekvencia

Met	Arg	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp
1				5					10					15	
Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser
			20					25					30		
Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu
			35					40					45		
His	Phe	Arg	Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	Tyr	Gly	Gly	Phe
			50					55				60			
Met	Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn
			65					70				75			80
Ala	Ile	Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu					
				85								90			

3. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 23 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges fúziós fehérje partner

(xi) A szekvencia leírása: 3. számú szekvencia

Met	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	
Ser	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Pro	Met	Arg	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu
			20					25					30		
Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro										

4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 45 nukleotid

(B) Típus: nukleinsav

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: oligonukleotid linker

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

tatgagatct atcgaaggtc gtgagctcac cggtcagcgt gttcg	45
---	----

5. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 114 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges béta-lipotropin fúziós fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 5. számú szekvencia

Met	Ile	Ile	Gly	Leu	Met	Val	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	

Ser Gly Asp Asp Asp Asp Pro Met Arg Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu
 20 25 30
 Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp Gly Pro Ala Asp Asp Gly Ala Gly Ala
 35 40 45
 Gln Ala Asp Leu Glu His Ser Leu Leu Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp
 50 55 60
 Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys
 65 70 75 80
 Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro
 85 90 95
 Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys
 100 105 110
 Gly Glu

6. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 331 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges GST fúziós fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 6. számú szekvencia

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
 1 5 10 15
 Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
 20 25 30
 Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
 35 40 45
 Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
 50 55 60
 Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
 65 70 75 80
 Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
 85 90 95
 Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser



100	105	110
Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu		
115	120	125
Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn		
130	135	140
Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp		
145	150	155
Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu		
165	170	175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr		
180	185	190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala		
195	200	205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp Leu Val Pro Arg		
210	215	220
Gly Ser Pro Gly Ile His Arg Asp Leu Val Pro Arg Gly Ser Ile Glu		
225	230	235
Gly Arg Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp		
245	250	255
Gly Pro Ala Asp Asp Gly Ala Gly Ala Gln Ala Asp Leu Glu His Ser		
260	265	270
Leu Leu Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu		
275	280	285
His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe		
290	295	300
Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn		
305	310	315
Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu		
325	330	

7. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 422 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú



(ii) A molekula típusa: Mesterséges GST-béta-lipotropin
fúziós fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 7. számú szekvencia

Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	1	5	10	15
Thr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Glu	His	Leu	20	25	30	
Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Trp	Arg	Asn	Lys	Lys	Phe	Glu	Leu	35	40	45	
Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Lys	50	55	60	
Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile	Ala	Asp	Lys	His	Asn	65	70	75	80
Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala	Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	85	90	95	
Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly	Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser	100	105	110	
Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val	Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	115	120	125	
Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp	Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	130	135	140	
Gly	Asp	His	Val	Thr	His	Pro	Asp	Phe	Met	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	145	150	155	160
Val	Val	Leu	Tyr	Met	Asp	Pro	Met	Cys	Leu	Asp	Ala	Phe	Pro	Lys	Leu	165	170	175	
Val	Cys	Phe	Lys	Lys	Arg	Ile	Glu	Ala	Ile	Pro	Gln	Ile	Asp	Lys	Tyr	180	185	190	
Leu	Lys	Ser	Ser	Lys	Tyr	Ile	Ala	Trp	Pro	Leu	Gly	Gly	Trp	Gln	Ala	195	200	205	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Asp	His	Pro	Pro	Lys	Ser	Asp	Leu	Val	Pro	Arg	210	215	220	
Gly	Ser	Pro	Gly	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser	Ile	Glu	225	230	235	240
Gly	Arg	Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	245	250	255	
Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser				



	260		265		270										
Leu	Leu	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu
	275				280				285						
His	Phe	Arg	Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	Tyr	Gly	Gly	Phe
	290				295				300						
Met	Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn
305				310					315					320	
Ala	Ile	Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu	Met	Arg	Glu	Leu	Thr
			325						330				335		
Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Ala	Asp	Asp
			340						345				350		
Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu	Val	Ala	Ala
	355						360						365		
Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu	His	Phe	Arg	Trp	Gly
	370					375						380			
Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	Tyr	Gly	Gly	Phe	Met	Thr	Ser	Glu	Lys
385				390						395				400	
Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile	Lys	Asn
			405						410					415	
Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu										
			420												

8. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 89 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20						25					30	



Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe
35 40 45
Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Thr
50 55 60
Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
65 70 75 80
Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
85
<210> 9 <211> 49 <212> PRT



9. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 49 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 9. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu	His	Phe
			35					40					45		

Arg

10. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 40 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 10. számú szekvencia

Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	Tyr	Gly	Gly	Phe	Met	Thr	Ser
1				5					10					15	
Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile
			20					25					30		
Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu								
			35				40								

11. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:



- (A) Hossz: 30 aminosav
- (B) Típus: fehérje
- (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 11. számú szekvencia

Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys
 20 25 30

12. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 52 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 12. számú szekvencia

Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln
 20 25 30
 Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr
 35 40 45
 Lys Lys Gly Glu
 50

13. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 72 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi



(xi) A szekvencia leírása: 13. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	Val
1				5					10					15	
Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu	His	Phe	Arg
			20					25					30		
Trp	Gly	Ser	Pro	Pro	Lys	Asp	Lys	Arg	Tyr	Gly	Gly	Phe	Met	Thr	Ser
			35				40					45			
Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile
			50				55				60				
Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu								
65							70								

14. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 14 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 8. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp
1				5					10				

15. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 14 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 15. számú szekvencia

Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala
1					5					10			



16. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: fehérje
 (C) Száltípus: egyszálú
(ii) A molekula típusa: emberi
(xi) A szekvencia leírása: 16. számú szekvencia

Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu
1				5					10				

17. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 14 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 17. számú szekvencia

Gly Ala Gln Ala Asp Leu Glu His Ser Leu Leu Val Ala Ala
1 5 10

18. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 14 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 18. számú szekvencia

His Ser Leu Leu Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro
1 5 10

19. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 14 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 19. számú szekvencia

Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg
1 5 10

20. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 14 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 20. számú szekvencia

Tyr Arg Met Glu His Phe Arg Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp
1 5 10

21. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 14 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 21. számú szekvencia

Trp Gly Ser Pro Pro Lys Asp Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met
1 5 10

22. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 14 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 22. számú szekvencia

Lys Arg Tyr Gly Gly Phe Met Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr
1 5 10

23. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 14 aminosav
 (B) Típus: fehérje
 (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 23. számú szekvencia

Thr	Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys
1				5					10				

24. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 14 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 24. számú szekvencia

Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala
1 5 10

25. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
(A) Hossz: 12 aminosav
(B) Típus: fehérje
(C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: emberi
- (xi) A szekvencia leírása: 25. számú szekvencia

Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
1 5 10

26. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 89 aminosav
 (B) Típus: fehérje
 (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
 cia
- (xi) A szekvencia leírása: 26. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Asp	Lys	Tyr
			35					40					45		
Arg	Tyr	Ala	Thr	Pro	Pro	His	Glu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Ala	Phe	Met	Thr
	50					55					60				
Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile
	65				70					75				80	
Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu							
															85

27. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 (A) Hossz: 89 aminosav
 (B) Típus: fehérje
 (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
 cia
- (xi) A szekvencia leírása: 27. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		

Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu Lys Phe
 35 40 45
 Arg Tyr Gly Ser Pro Pro Arg Glu Lys His Trp Gly Ala Trp Met Thr
 50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

28. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 89 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
cia
- (xi) A szekvencia leírása: 28. számú szekvencia

Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Asp Asp Gly Ala Gly Ala Gln Ala Asp Leu Glu His Ser Leu Leu
 20 25 30
 Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Asp His Phe
 35 40 45
 His Phe Ala Ser Pro Pro Arg Glu Lys His Tyr Gly Ala Tyr Met Thr
 50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

29. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:



(A) Hossz: 89 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
cia

(xi) A szekvencia leírása: 29. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Asp	His	Phe
			35					40					45		
Arg	Trp	Ala	Ser	Pro	Pro	Lys	Glu	Arg	His	Phe	Ala	Ala	Tyr	Met	Thr
	50						55				60				
Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile
65					70					75				80	
Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu							
					85										

30. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 89 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
cia

(xi) A szekvencia leírása: 30. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	Iüs	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Asp	Lys	Tyr
			35					40					45		



Arg Phe Gly Thr Pro Pro Arg Glu Lys Arg Phe Ala Gly Tyr Met Thr
 50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

31. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 89 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
 cia
- (xi) A szekvencia leírása: 31. számú szekvencia

Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Asp Asp Gly Ala Gly Ala Gln Ala Asp Leu Glu His Ser Leu Leu
 20 25 30
 Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Asp Arg Trp
 35 40 45
 Arg Trp Ala Ser Pro Pro Arg Glu Lys His Tyr Gly Ala Trp Met Thr
 50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

32. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
 - (A) Hossz: 89 aminosav



(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
cia

(xi) A szekvencia leírása: 32. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Glu	Arg	Trp
			35					40					45		
Lys	Phe	Ala	Thr	Pro	Pro	His	Asp	His	Lys	Trp	Gly	Gly	Phe	Met	Thr
			50				55					60			
Ser	Glu	Lys	Ser	Gln	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Ile
			65			70				75				80	
Ile	Lys	Asn	Ala	Tyr	Lys	Lys	Gly	Glu							
															85

33. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 89 aminosav

(B) Típus: fehérje

(C) Száltípus: egyszálú

(ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
cia

(xi) A szekvencia leírása: 33. számú szekvencia

Glu	Leu	Thr	Gly	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro
1				5					10					15	
Ala	Asp	Asp	Gly	Ala	Gly	Ala	Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Ser	Leu	Leu
			20					25					30		
Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Lys	Asp	Glu	Gly	Pro	Tyr	Arg	Met	Asp	Lys	Trp
			35					40					45		
Arg	Trp	Ala	Ser	Pro	Pro	Lys	Glu	His	Arg	Trp	Gly	Gly	Tyr	Met	Thr



50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

34. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 89 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú
- (ii) A molekula típusa: Mesterséges humán analóg szekven-
- cia
- (xi) A szekvencia leírása: 34. számú szekvencia

Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Asp Asp Gly Ala Gly Ala Gln Ala Asp Leu Glu His Ser Leu Leu
 20 25 30
 Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Asp His Phe
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Pro Pro His Glu Arg His Phe Gly Ala Trp Met Thr
 50 55 60
 Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile
 65 70 75 80
 Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu
 85

35. számú szekvenciavázlat

- (i) A szekvencia jellemzői:
- (A) Hossz: 89 aminosav
 - (B) Típus: fehérje
 - (C) Száltípus: egyszálú

(xi) A szekvencia leírása: 35. számú szekvencia

[illegible]



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Lényegében tiszta fehérje, aminek aminosav szekvenciáját az alábbi csoportból választhatjuk ki: 2. számú szekvencia, 5. számú szekvencia és 7. számú szekvencia.

2. Izolált nukleinsav szekvencia, ami az 1. igénypont szerinti fehérjét kódolja.

3. Vektor, ami a 2. igénypont szerint izolált nukleinsav vegyületet tartalmazza.

4. A 3. igénypont szerinti vektor, amiben az említett izolált nukleinsav vegyület működés szempontjából egy promoter szekvenciához kapcsolódik.

5. A 4. igénypont szerinti vektort tartalmazó gazdasejt.

6. Eljárás egy rekombináns gazdasejt előállítására, aminek megvan a képessége a béta-lipotropin expressziójára, azzal jellemezve, hogy az eljárás során az említett gazdasejtbe bármelyik, az 5. igénypont szerinti vektort juttatjuk be.

7. Eljárás béta-lipotropin expresszáására a 6. igénypont szerinti rekombináns gazdasejtben, azzal jellemezve, hogy az eljárás során az említett rekombináns gazdasejtet a gén expressziójához megfelelő körülmények között tenyésztjük.

8. Gyógyászati készítmény, ami aktív adalékanyagként béta-lipotropint, annak analógját vagy funkcionális fragmensét tartalmazza, egy vagy több gyógyászatilag elfogadható hordozóval, töltőanyaggal vagy hígítószerrel együtt.

9. A 8. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amiben az említett béta-lipotropin humán béta-lipotropin.

10. Béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense, cukorbetegség vagy annak komplikációi kezelésére.

11. Eljárás cukorbetegség kezelésére egy emlősben, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatékony mennyiségű béta-lipotropint vagy analógot adunk be.

12. Eljárás cukorbetegség kezelésére egy emlősben, azzal jellemezve, hogy a béta-lipotropin funkcionális fragmenséből terápiásan hatékony mennyiséget adunk be.



13. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett béta-lipotropin humán béta-lipotropin, aminek a szekvenciáját a 8. számú szekvenciavázlaton adjuk meg.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett béta-lipotropin rekombináns humán béta-lipotropin.

15. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett cukorbetegség 1-es vagy 2-es típusú cukorbetegség.

16. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett emlős ember.

17. Eljárás a cukorbetegség komplikációinak kezelésére ilyen kezelésre szoruló betegben, azzal jellemezve, hogy a béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be.

18. Eljárás a vér glükóz-szintjének csökkentésére emlősben, azzal jellemezve, hogy a béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be.

19. Eljárás hiperglikémia kezelésére ilyen kezelésre szoruló emlősben, azzal jellemezve, hogy a béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be.

20. Eljárás hiperinzulinémia kezelésére emlősben, azzal jellemezve, hogy a béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be.

21. Eljárás inzulin-érzékenység fokozására emlősben, azzal jellemezve, hogy béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense terápiásan hatásos mennyiségét adjuk be.

22. Szilárd fázisú szintetikus módszer béta-lipotropin, annak analógja vagy funkcionális fragmense előállítására egy menetben, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) egy alfa-aminocsoportot tartalmazó és egy másik változat szerint védett oldallánc funkciós csoporttal rendelkező aminosavat aktiválunk, reaktív észtert képezve;
- ii) az említett aktivált aminosavat egy inert hordozóhoz kapcsoljuk;



- iii) egy második védett aminosavat észterré aktiválunk, úgy, hogy az első aminosav alfa-aminocsoportjáról eltávolítjuk a védőcsoportot, ezzel egy reaktív amint állítva elő, majd a második aktivált aminosavat reagáltatjuk az említett első aminosavval, ezzel dipeptidet képezve a szilárd hordozón;
- iv) megismételjük az (i) – (iii) lépéseket;
- v) eltávolítjuk a peptidet a szilárd hordozóról, majd eltávolítjuk az oldallánc védőcsoportokat;
- vi) elválasztjuk a peptidet a szilárd hordozótól; és
- vii) bármilyen megfelelő módszerrel megtisztítjuk a peptidet, aminek során
- viii) ahol a béta-lipotropin szekvencia egy ser-pro-pro tripeptid szekvenciát tartalmaz, a pro csoportokat többszörösen kapcsoljuk;
- ix) a kapcsolási lépés befejezése után az összes reagálatlan, védőcsoportot nem tartalmazó peptidet blokkoljuk, hogy megakadályozzuk egy deléciós peptid láncának meghosszabbodását; és
- x) ahol a béta-lipotropin szekvencia egy asp-gly dipeptid szekvenciát tartalmaz, ott egy N-alfa védőcsoportot használunk az asp csoportot megelőző glicineken.

23. Az 1. igénypont szerinti eljárás béta-lipotropin előállítására, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) egy megfelelő gazdaszervezetet transzformálunk egy expressziós vektorral, ami béta-lipotropint kódol;
- ii) az említett transzformált gazdaszervezet olyan körülmények között tenyésztjük, amik lehetővé teszik az említett béta-lipotropin expresszióját;
- iii) az említett béta-lipotropint bármilyen megfelelő módszerrel tisztítjuk.

24. Eljárás béta-lipotropin aktivitásának vizsgálatára, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- i) egy inzulin érzéketlenséget vagy megnőtt vér glükózszintet mutató emlősnek egy vizsgált fehérjét adunk be; és



- ii) az i) lépés után bármilyen megfelelő módszerrel vizsgáljuk a vér glükóz- és inzulin-szintjét.

25. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett béta-lipotropint az alábbi csoportból választjuk ki: 2. számú szekvencia, 5. számú szekvencia, 7. számú szekvencia és 8. számú szekvencia.

26. Inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9. számú szekvencia, 10. számú szekvencia, 11. számú szekvencia, 12. számú szekvencia és 13. számú szekvencia.

27. Inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 14. számú szekvencia, 15. számú szekvencia, 16. számú szekvencia, 17. számú szekvencia, 18. számú szekvencia, 19. számú szekvencia, 20. számú szekvencia, 21. számú szekvencia, 22. számú szekvencia, 23. számú szekvencia, 24. számú szekvencia és 25. számú szekvencia.

28. Inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 9. számú szekvencia, 10. számú szekvencia, 11. számú szekvencia, 12. számú szekvencia és 13. számú szekvencia, 14. számú szekvencia, 15. számú szekvencia, 16. számú szekvencia, 17. számú szekvencia, 18. számú szekvencia, 19. számú szekvencia, 20. számú szekvencia, 21. számú szekvencia, 22. számú szekvencia, 23. számú szekvencia, 24. számú szekvencia és 25. számú szekvencia.

29. Eljárás cukorbetegség kezelésére, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatékony mennyiséget adunk be legalább egy, az alábbi csoportból választható peptidből: 9. számú szekvencia, 10. számú szekvencia, 11. számú szekvencia, 12. számú szekvencia és 13. számú szekvencia, 14. számú szekvencia, 15. számú szekvencia, 16. számú szekvencia, 17. számú szekvencia, 18. számú szekvencia, 19. számú szekvencia, 20. számú szekvencia, 21. számú szekvencia, 22. számú szekvencia, 23. számú szekvencia, 24. számú szekvencia és 25. számú szekvencia.

30. Eljárás cukorbetegség kezelésére, azzal jellemezve, hogy terápiásan hatékony mennyiséget adunk be legalább egy, az alábbi csoportból választható peptidből: 9. számú szekvencia, 10.



számú szekvencia, 11. számú szekvencia, 12. számú szekvencia és 13. számú szekvencia.

31. Gyógyászati készítmény, ami aktív adalékanyagként egy inzulinotróp aktivitással rendelkező, az alábbi csoportból választható peptidet tartalmaz: 9. számú szekvencia, 10. számú szekvencia, 11. számú szekvencia, 12. számú szekvencia és 13. számú szekvencia, 14. számú szekvencia, 15. számú szekvencia, 16. számú szekvencia, 17. számú szekvencia, 18. számú szekvencia, 19. számú szekvencia, 20. számú szekvencia, 21. számú szekvencia, 22. számú szekvencia, 23. számú szekvencia, 24. számú szekvencia és 25. számú szekvencia.

32. A béta-lipotropin funkcionális analógja.

33. A béta-lipotropin *in vitro* vagy *in vivo* inzulinotróp aktivitással rendelkező fragmense.

34. A béta-lipotropin funkcionális analógja, ami körülbelül 90-95%-ban azonos a 8. számú szekvenciával, és amiben az aminosav helyettesítéseket az alábbi csoportból választhatjuk ki.

az 1-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Asp vagy Gln;

a 2-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Val vagy Met;

a 3-as pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala, Glu, Ser, Pro vagy Gly;

a 4-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Arg, Ala, Leu, Pro vagy Ser;

az 5-ös pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asp, Asn vagy Ala;

a 6-os pozícióban levő csoport lehet Arg, Glu, Leu, Lys, Gln vagy Ala;

a 7-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Pro, Asp, Val, Ile vagy Met;

a 8-as pozícióban levő csoport lehet Arg, Glu, Ala, Tyr, Leu, Lys, Pro, Gln vagy Trp;

a 9-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Pro, Asp, Asn vagy Gln;

a 10-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Asp;

a 11-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Arg, Pro, Asn, Gln, Ala vagy Glu;



- a 12-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Met;
a 13-as pozícióban levő csoport lehet Pro, Glu, Gly vagy Val;
a 14-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Asn, Gln
vagy Gly;
a 15-ös pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Glu;
a 16-os pozícióban levő csoport lehet Pro, Gln, Leu, Gly
vagy Glu;
a 17-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Asp, Ser vagy Gly;
a 18-as pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Gln vagy
Asn;
a 19-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Asn vagy
Gln;
a 20-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ser vagy Ala;
a 21-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Gly, Ser vagy Phe;
a 22-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Lys;
a 23-as pozícióban levő csoport lehet Ala, Phe, Thr, Gly, Ser
vagy Leu;
a 24-es pozícióban levő csoport lehet Gln, Arg, Asp, Asn,
Leu vagy Val;
a 25-ös pozícióban levő csoport lehet Ala, Leu, Asp, Ile, Gly,
Ser vagy Thr;
a 26-os pozícióban levő csoport lehet Asp, Glu, Gly, Asn,
Gln vagy Lys;
a 27-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Ile, Met, Met
vagy Val;
a 28-as pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asn vagy
Asp;
a 29-es pozícióban levő csoport lehet His, Asn, Tyr, Ala, Gln
vagy Glu;
a 30-as pozícióban levő csoport lehet Ser, Gly, Glu, Ala, Leu
vagy Asp;
a 31-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Val, Met
vagy Ile;
a 32-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ala, Val, Ile, Met
vagy Pro;
a 33-as pozícióban levő csoport lehet Val, Ala, Glu, Leu, Ile,
Met vagy Arg;

- a 34-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Ser, Pro, Glu vagy Gly;
- a 35-ös pozícióban levő csoport lehet Ala, Asp, Gly, Ser vagy Leu;
- a 36-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Ala, Thr, Leu, Asp, Asn vagy Gln;
- a 37-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Glu, Thr, Arg, Gln vagy Asp;
- a 38-as pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg, Gln vagy Glu;
- a 39-es pozícióban levő csoport lehet Asp, Ala, Asn, Glu, Gln vagy Lys;
- a 40-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Ser, Asp, Asn, Gln vagy Gly;
- a 41-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;
- a 42-es pozícióban levő csoport lehet Pro, Gly, Ser vagy Asn;
- a 43-as pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe vagy Trp;
- a 44-es pozícióban levő csoport lehet Arg, Lys, Gln vagy Glu;
- a 45-ös pozícióban levő csoport lehet Met, Ile, Ser vagy Val;
- a 46-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, Asp, Asn, His, Arg vagy Gly;
- a 48-as pozícióban levő csoport lehet Tyr vagy Trp;
- a 49-es pozícióban levő csoport lehet Arg vagy Lys;
- az 50-es pozícióban levő csoport lehet Trp, Tyr vagy Phe;
- az 51-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala, Ser vagy Gln;
- az 52-es pozícióban levő csoport lehet Ser, Thr, Asn vagy Ala;
- az 53-as pozícióban levő csoport lehet Pro vagy Gly;
- az 54-es pozícióban levő csoport lehet Pro, Ala, Gly, Arg, Leu vagy Thr;
- az 55-ös pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg, Gln vagy Ala;
- az 56-os pozícióban levő csoport lehet Asp, Asn, Glu, Gln, Ala, Gly vagy Ile;

az 57-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;
 az 58-as pozícióban levő csoport lehet Arg, Gln vagy Lys;
 az 59-es pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe vagy Trp;
 a 60-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;
 a 61-es pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;
 a 62-es pozícióban levő csoport lehet Phe, Tyr vagy Trp;
 a 63-as pozícióban levő csoport lehet Met, Leu, Ile vagy Val;
 a 64-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala, Ser vagy Lys;
 a 65-ös pozícióban levő csoport lehet Ser, Ala, Thr vagy Pro;
 a 66-os pozícióban levő csoport lehet Glu, Asp, Asn, Lys
 vagy Gln;
 a 67-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Arg vagy Gln;
 a 68-as pozícióban levő csoport lehet Ser, Ala, Thr vagy Gly;
 a 69-es pozícióban levő csoport lehet Gln, Glu, Asp, Asn,
 Arg vagy His;
 a 70-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ser, Ala vagy Lys;
 a 71-es pozícióban levő csoport lehet Pro vagy Gly;
 a 72-es pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Met vagy Val;
 a 73-as pozícióban levő csoport lehet Val, Leu, Ile vagy Met;
 a 74-es pozícióban levő csoport lehet Thr, Ala vagy Ser;
 a 75-ös pozícióban levő csoport lehet Leu, Ile, Met vagy Val;
 a 76-os pozícióban levő csoport lehet Phe, Tyr, Trp vagy
 Leu;
 a 77-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;
 a 78-as pozícióban levő csoport lehet Asn, Asp, Glu, Gln
 vagy His;
 a 79-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Gly, Ser, Ile vagy
 Val;
 a 80-as pozícióban levő csoport lehet Ile, Leu, Met, Val vagy
 Thr;
 a 81-es pozícióban levő csoport lehet Ile, Met, Val, Thr vagy
 Leu;
 a 82-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;
 a 83-as pozícióban levő csoport lehet Asn, Asp, Glu, Gln
 vagy Ser;
 a 84-es pozícióban levő csoport lehet Ala, Val, Ser, Gly vagy
 Glu;

a 85-ös pozícióban levő csoport lehet Tyr, Phe, Trp vagy His;

a 86-os pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

a 87-es pozícióban levő csoport lehet Lys, Gln vagy Arg;

a 88-as pozícióban levő csoport lehet Gly, Ala vagy Ser;

a 89-es pozícióban levő csoport lehet Glu, Gln, As, Asn vagy His.

35. A béta-lipotropin 34. igénypont szerinti funkcionális analógja, ami körülbelül 95-99%-ban azonos a 8. számú szekvenciával.

36. Inzulinotróp aktivitással rendelkező peptid, amit az alábbi csoportból választhatunk ki: 14. számú szekvencia, 15. számú szekvencia, 16. számú szekvencia, 17. számú szekvencia, 18. számú szekvencia, 19. számú szekvencia, 20. számú szekvencia, 21. számú szekvencia, 22. számú szekvencia.

37. A 22. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy:

ha a viii) lépésben a béta-lipotropin szekvencia egy ser-pro tripeptid szegmenst tartalmaz, akkor a pro és ser csoportokat kétszeresen kapcsoljuk;

ix) a kapcsolási lépés befejezése után az összes reagálatlan, védőcsoport-mentesített peptidet egy anhidriddel blokkoljuk, hogy megakadályozzuk a deléciós peptid meghosszabbodását.

38. A 37. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ix lépésben az említett N-alfa védőcsoport N-alfa-Hmb vagy metil-benzoát.

39. A béta-lipotropin funkcionális analógja, ami legalább 90%-ban azonos a 8. számú szekvenciával.

94+16

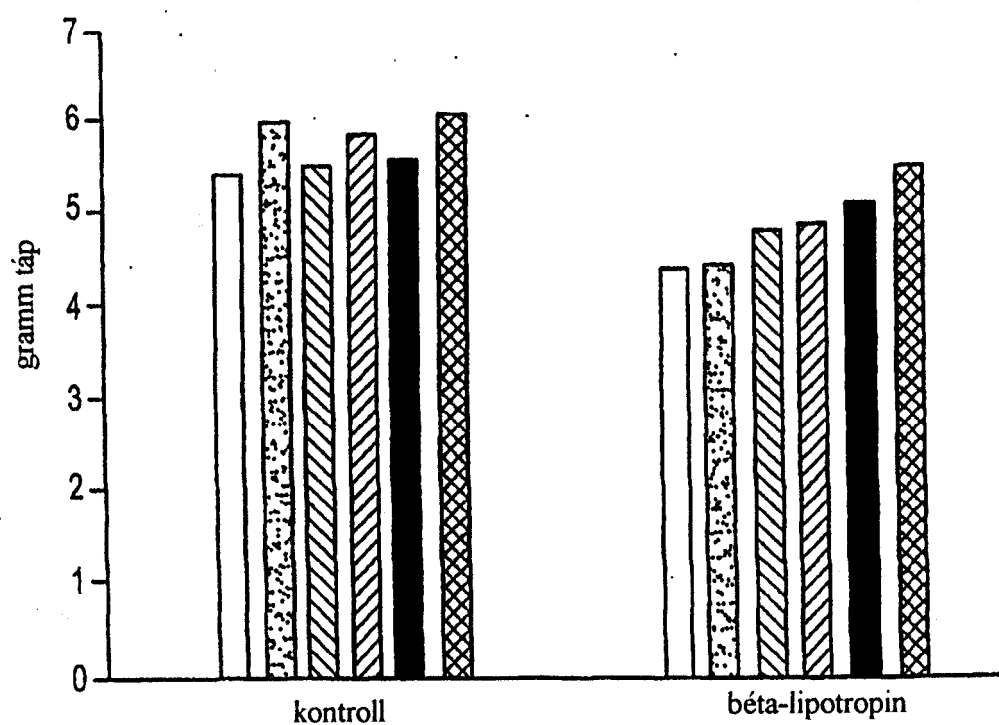
110 a del

11 p 7

2001.02.14,

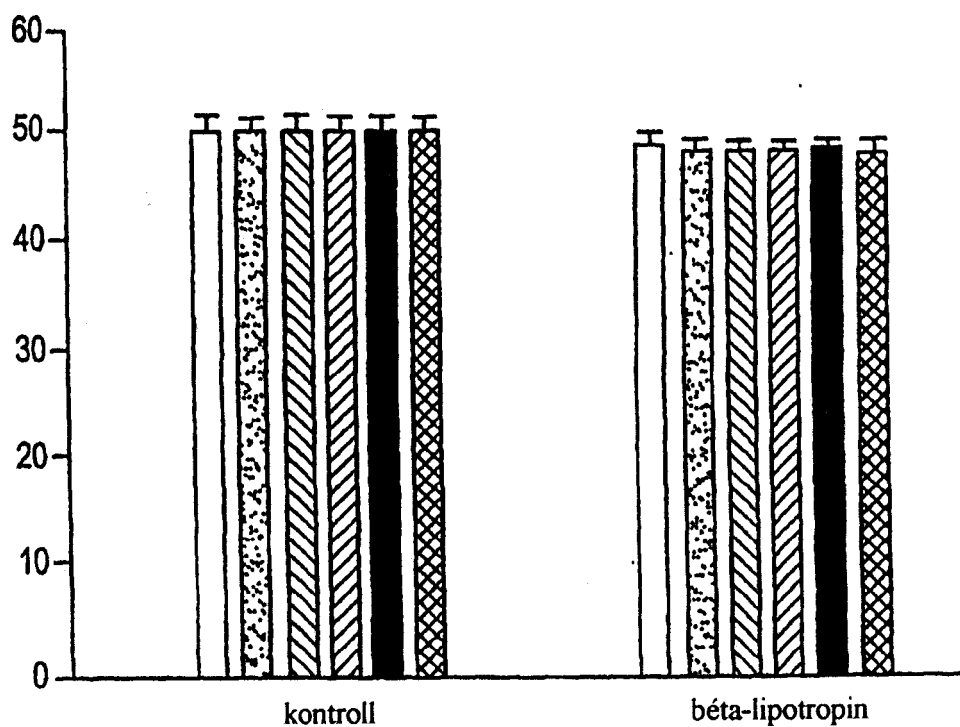
ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvivő
az S.P.G. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Aranybolygó 113.
Telefon: 342-2320 Fax: 342-4323

1. ábra



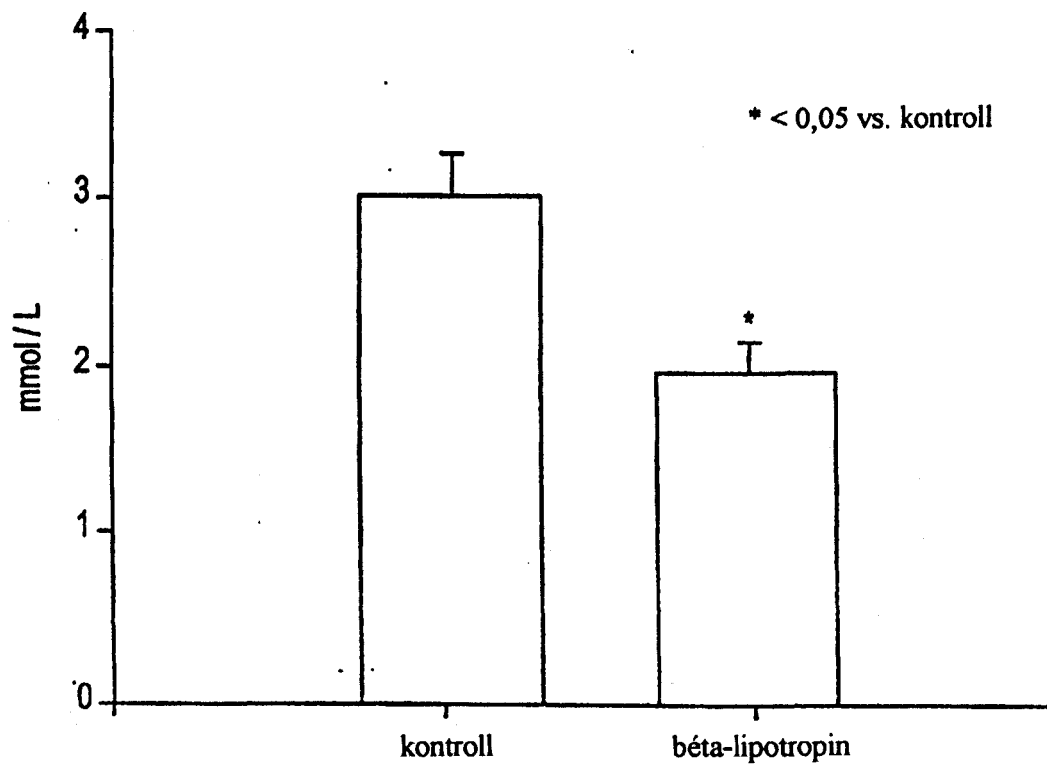
-  elfogyasztott táplálék grammja 1 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása előtt
-  elfogyasztott táplálék grammja 1 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 2 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 3 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 4 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 5 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után

2. ábra

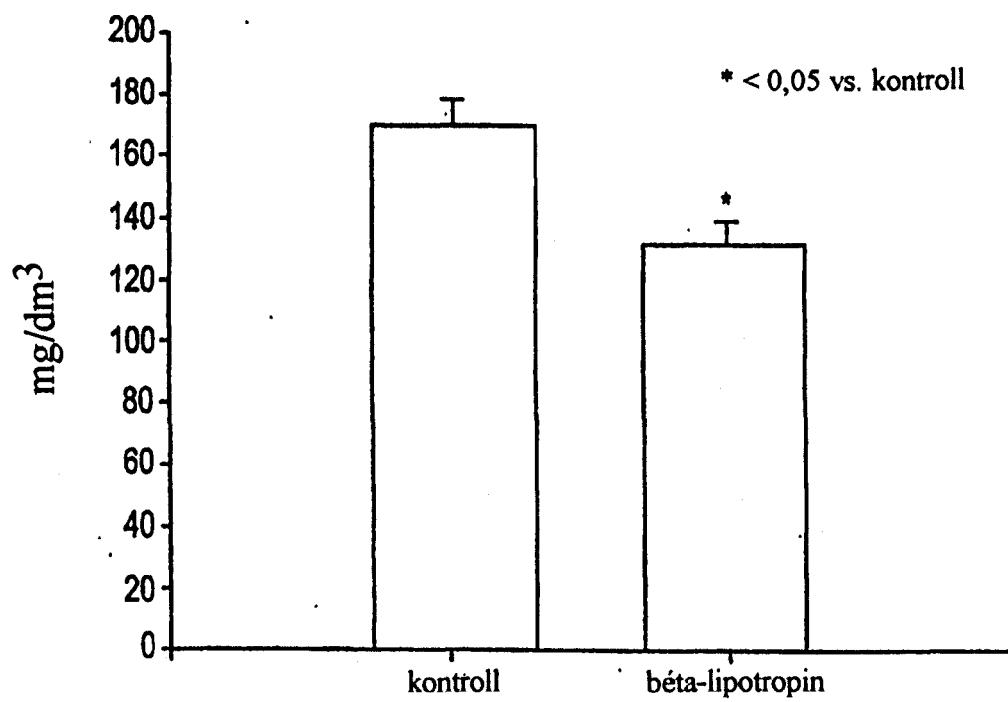


-  elfogyasztott táplálék grammja 1 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása előtt
-  elfogyasztott táplálék grammja 1 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 2 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 3 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 4 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után
-  elfogyasztott táplálék grammja 5 nappal a béta-lipotropin vagy a hordozó beadása után

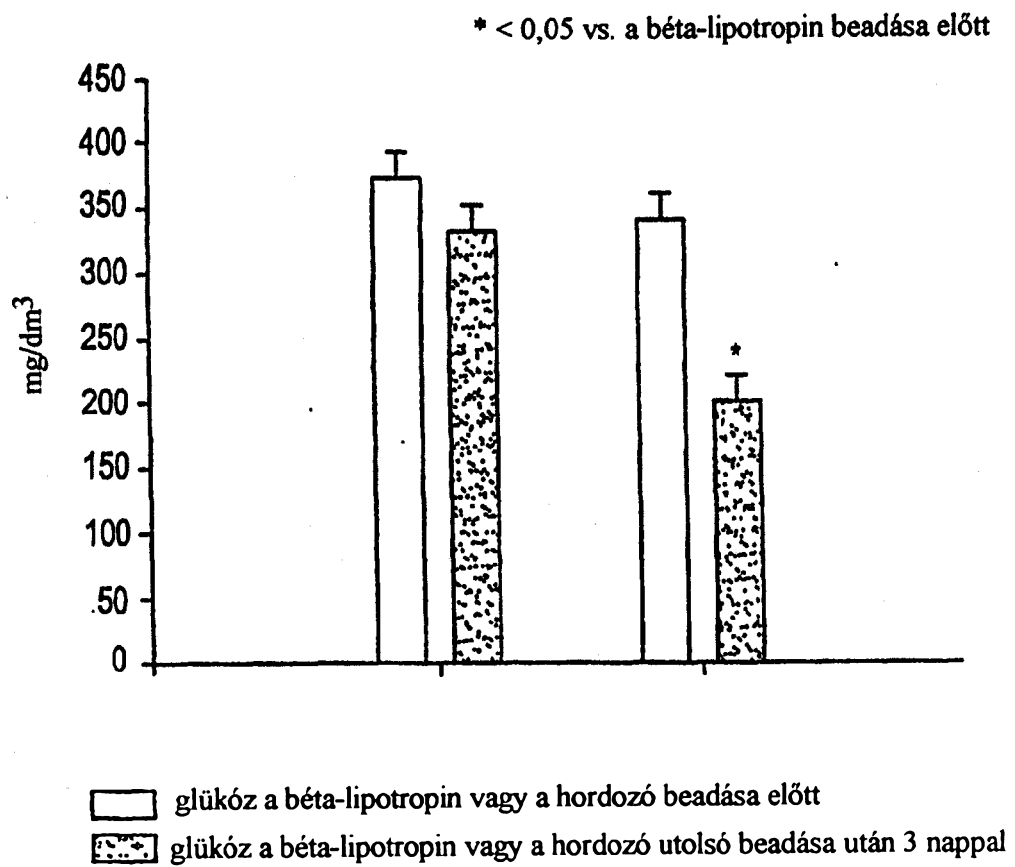
3. ábra



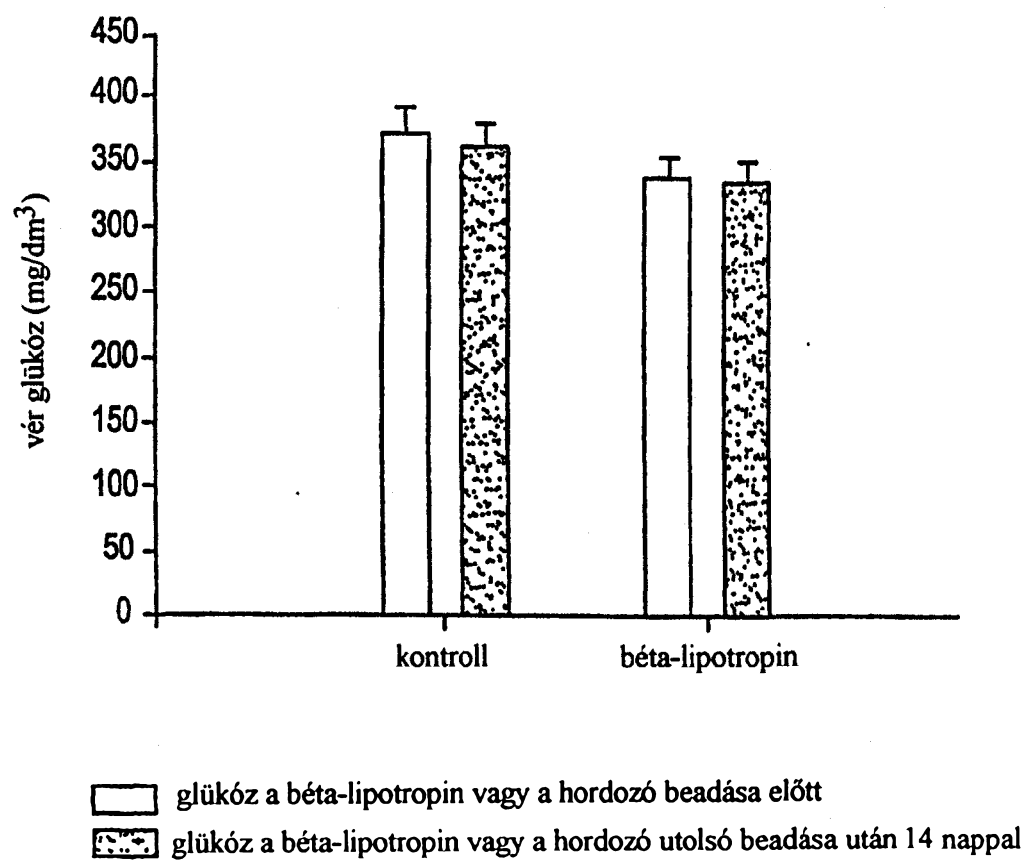
4. ábra



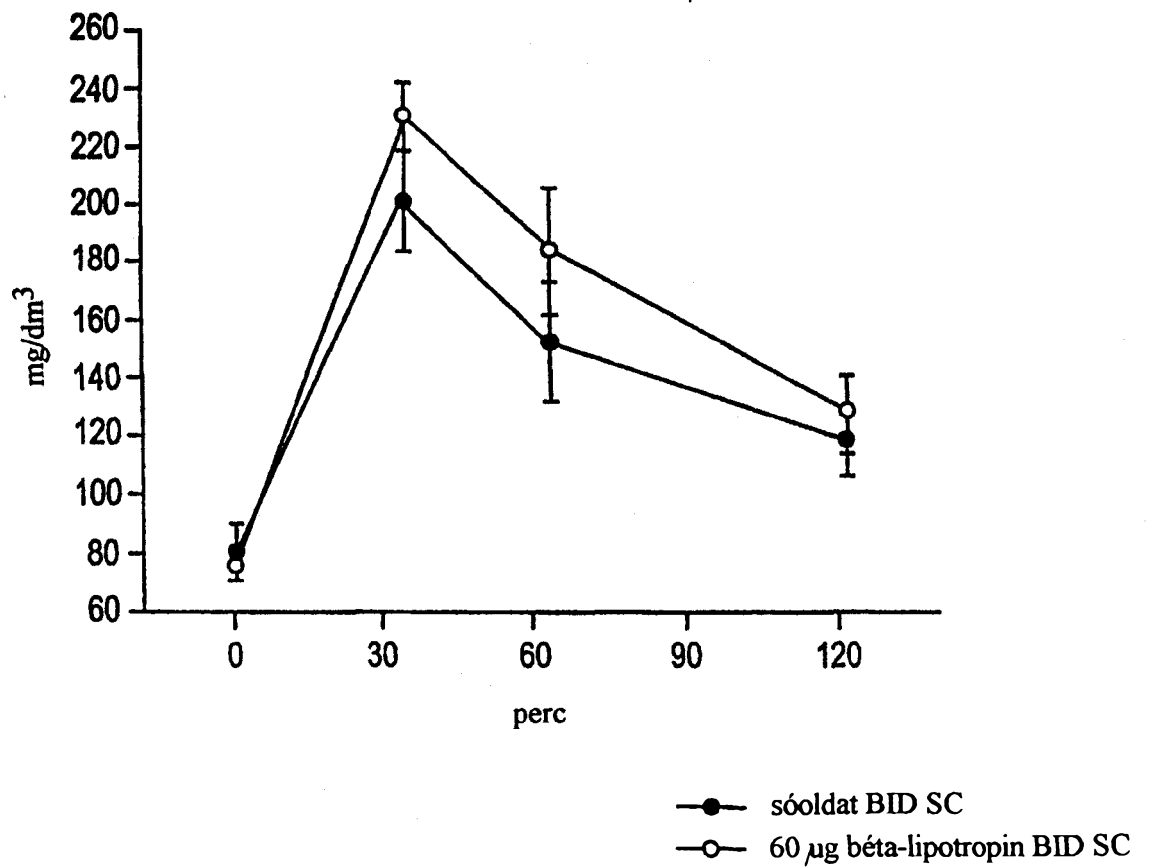
5. ábra



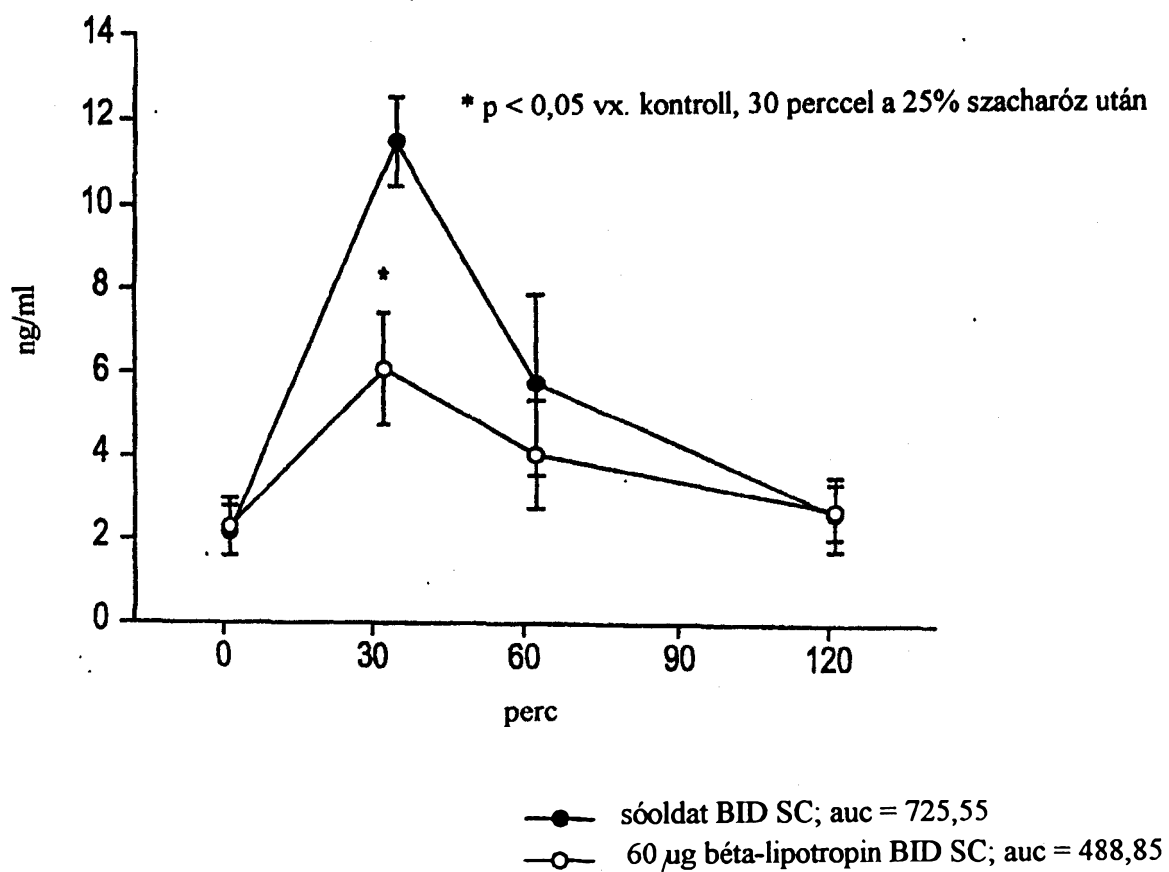
6. ábra



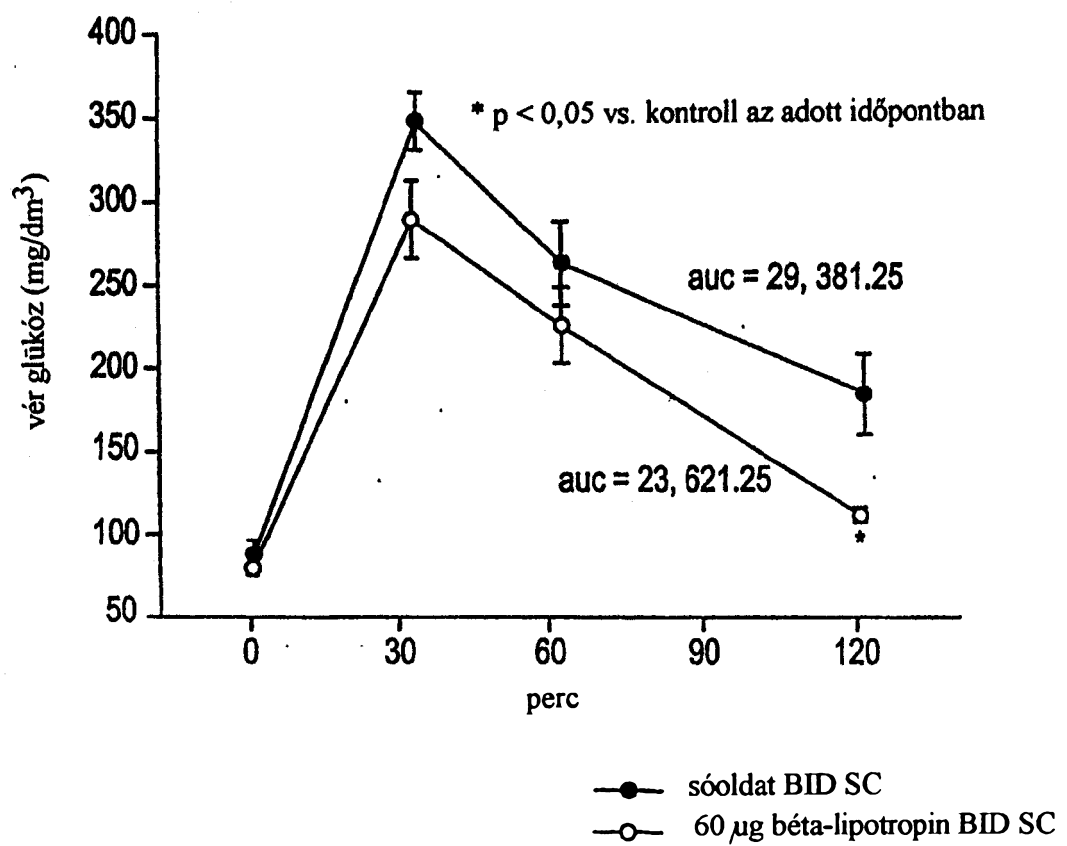
7. ábra



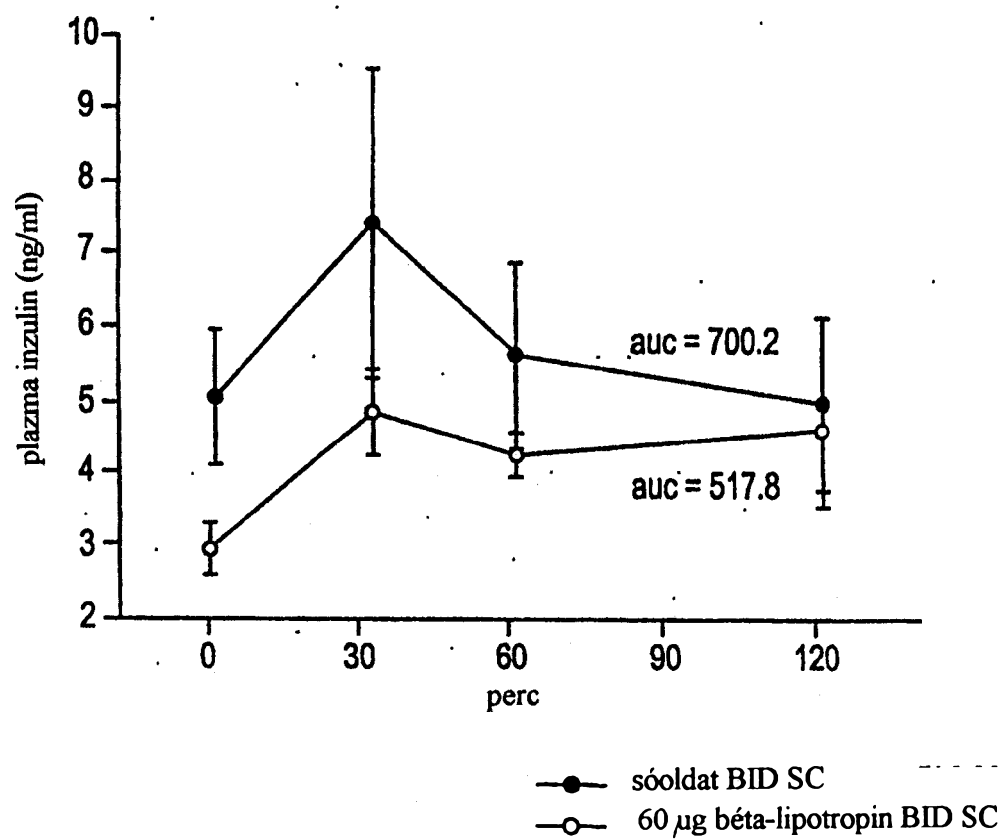
8. ábra



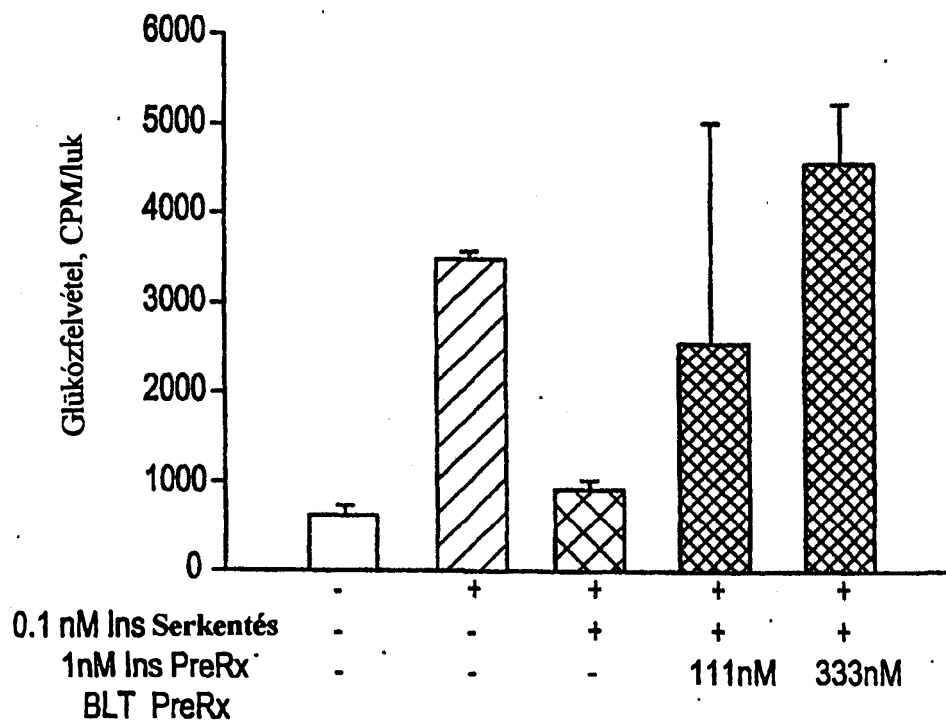
9. ábra



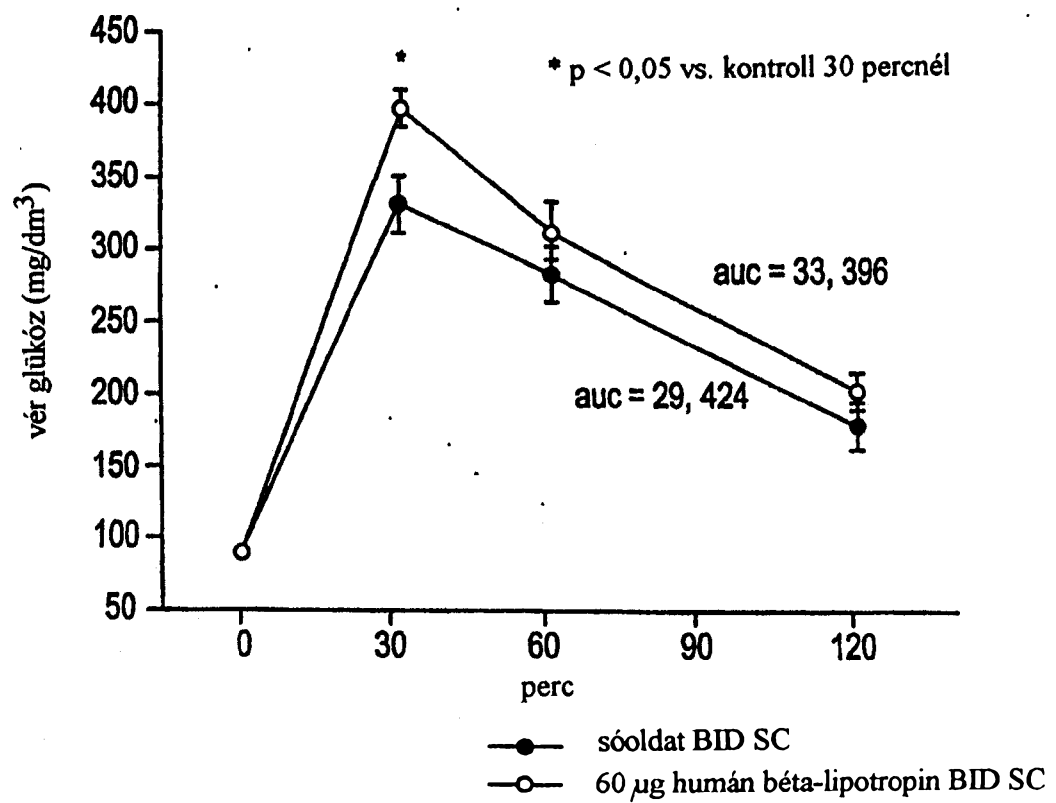
10. ábra



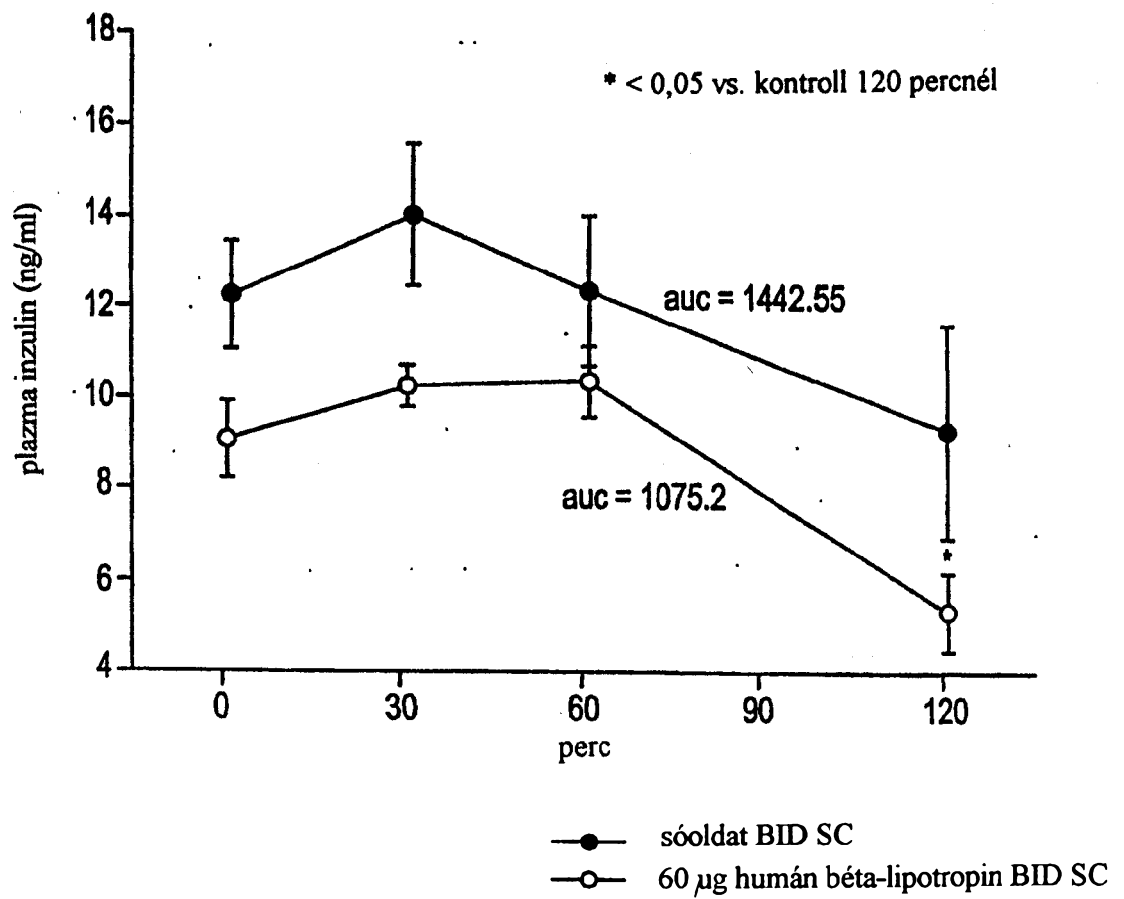
11. ábra



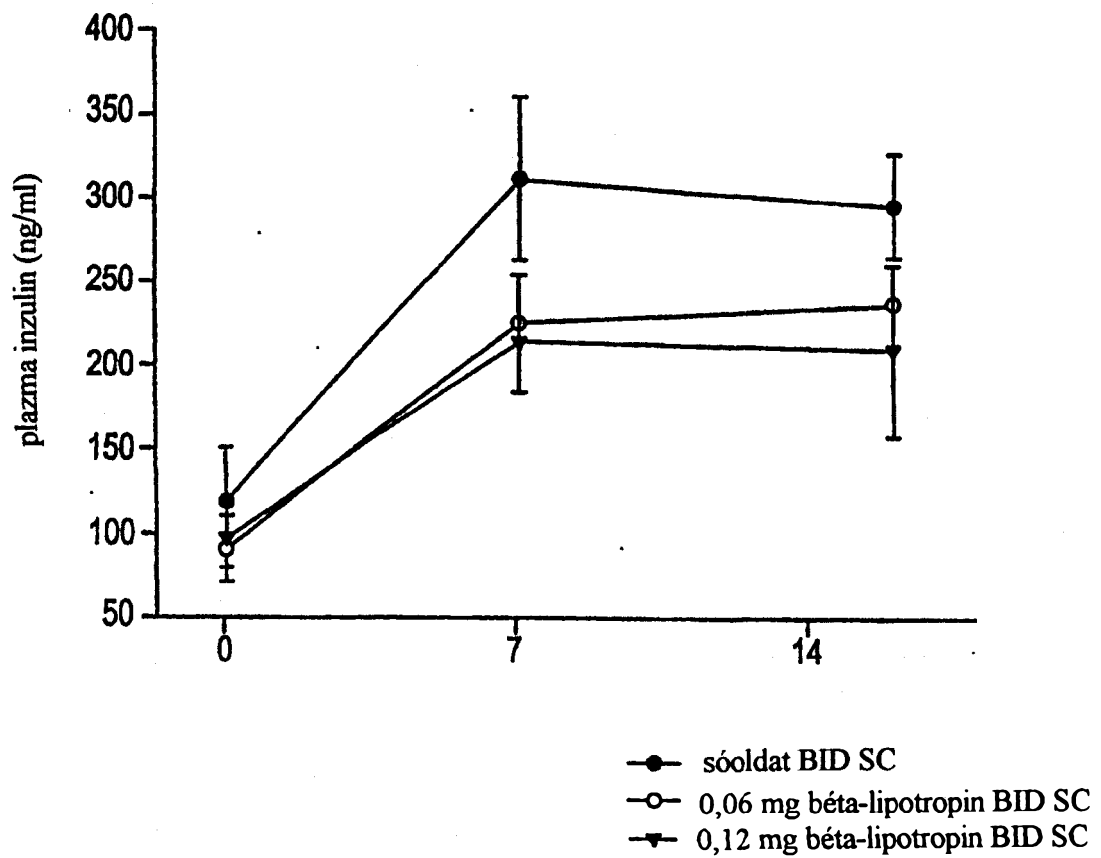
12. ábra



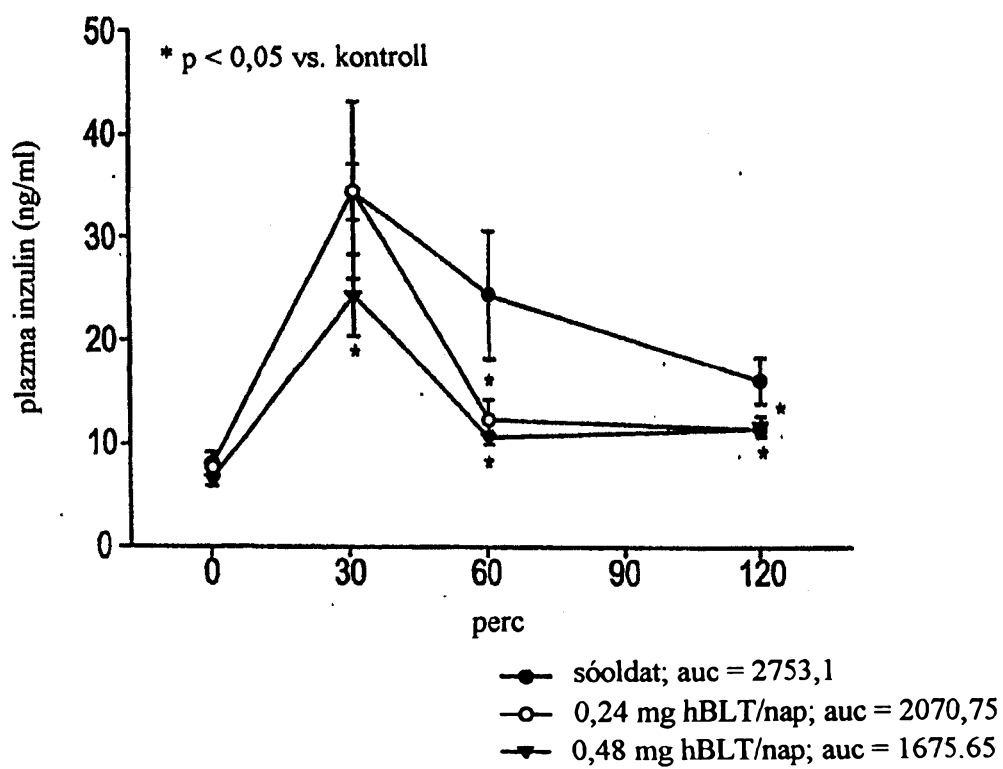
13. ábra



14. ábra



15A. ábra



15B. ábra

