

Páciensek ateroszklerózis vagy diabetikus
retinopátia általi veszélyeztetettségének
diagnosztizálása

K I V O N A T

A találmány tárgyát személyek ateroszklerózis kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának vagy diabéteszes személyek diabetikus retinopátia kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására szolgáló eljárások képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá az említett megbetegedésekkel szemben fokozott fogékonyságúnak diagnosztizált személyek kezelésére szolgáló, az említett megbetegedések kialakulásának megelőzését célzó eljárások is. A találmány tárgyát képezik emellett az említett megbetegedések kezelésében eredményesen alkalmazható gyógyhatású anyagok vagy genetikai célmolekulák vizsgálatára vagy szkrínelésére alkalmas, transzgénikus állatot magában foglaló állati modellt alkalmazó eljárások is.

Jelölés: 1000 9
Terve

Képviselő:

Danubia

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

B u d a p e s t

**Páciensek ateroszklerózis vagy diabetikus
retinopátia általi veszélyeztetettségének
diagnosztizálása**

A találmány tárgyát személyek ateroszklerózis kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának vagy diabéteszes személyek diabetikus retinopátia kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására szolgáló eljárások képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá az említett megbetegedésekkel szemben fokozott fogékonyságúnak diagnosztizált személyek kezelésére szolgáló, az említett megbetegedések kialakulásának megelőzését célzó eljárások is. A találmány tárgyát képezik emellett az említett megbetegedések kezelésében eredményesen alkalmazható gyógyhatású anyagok vagy genetikai célmolekulák vizsgálatára vagy szkrínelésére alkalmas, transzgénikus állatot magában foglaló állati modellt alkalmazó eljárások is.

Hivatkozás útján a kitanítás részét képezik a találmány szerinti megoldás előzményeinek illusztrálását szolgáló közlemények és egyéb anyagok, különös tekintettel a gyakorlati kérdésekkel kapcsolatos esetismerttetésekre.

A központi és környéki idegrendszer idegsejtjeinek nagy része által termelt Y neuropeptid (NPY) a hasnyálmirigy-eredetű polipeptidek családjába tartozó neuro-modulátor, amely a leggyakrabban előforduló peptid az agyvelőben és a szívben (1-4). Az NPY a leghatékonyabb orexigén (hízást elősegítő) neuropeptid, amely tonicusan gátolhatja a leptin közvetítette jóllakottsági jelet (2-3,5). Az NPY egészséges patkányokban stimulálja az inzulinszekréciót (6) és az inzulin kiváltotta glükózfelvételt (7). Ezzel szemben az inzulin és az inzulinszerű növekedési faktor II. elnyomja a hipotalamusz NPY-kibocsátását (8). Az elhízás és a 2. típusú diabétesz állati modelljeiben az NPY-neuronoknak a hipotalamusz inzulingátlással szembeni rezisztenciája miatt kialakuló fokozott aktivitása közrejátszhat a hiperfágia (túlevés), a csökkent energiafelhasználás és az elhízás kialakulásában (9). Mindemellett az NPY szerepet játszik a hipotalamusz-hipofízis-mellékvese tengely szabályozásában is (10). A szív- és érrendszerben az NPY érösszehúzó hatással bír, meggátolja a noradrenalin kibocsátását és támogatja a noradrenalin válaszreakciót (11). Kísérletesen előidézett diabéteszben érdekes módon módosulnak az NPY kiváltotta szív-légzőrendszeri reakciók (12-13). Az NPY mindemellett angiogén tulajdonságokkal is rendelkezhet (4), amelyek elősegíthetik az ateroszklerózis kialaku-

lását. Az NPY széleskörű hatása különböző NPY-receptor-altípusokon keresztül érvényesül (14). Nemrégiben egy meglehetősen gyakori, 7. leucin-prolin polimorfizmust azonosítottunk (15). Ez a polimorfizmus két, egymástól független finn és egy holland populációban, különösen elhízott páciensekben lényeges mértékben emelkedett összes- és LDL-szérumkoleszterin-mennyiségekkel mutatott összefüggést. Az említett populációk egyikében ezen felül a leu7/pro polimorfizmussal rendelkező, nem diabéteszes páciensekben magasabb volt az apolipoprotein B koncentrációja (15). Bár a koleszterin-metabolizmus és az NPY közötti biokémiai és élettani kapcsolat még nem tisztázott, az NPY-gén leu7/pro polimorfizmusa elhízott páciensekben a magas koleszterinszint új genetikai markerének tekintendő.

Egy szempontból a találmány tárgyát egy személy ateroszklerózis kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására alkalmas eljárás képezi, amely eljárás az emberi prepro-NPY szignálpeptidrészében található polimorfizmus adott személyben való meglétének kimutatásán alapul, amely polimorfizmus a prepro-NPY szignálpeptidrészének 7. pozíciójában lévő leucinnak prolinnal történt helyettesítését (szubsztitúcióját) jelenti, és amely polimorfizmus az ateroszklerózis kialakulásának fokozott kockázatára utal.

Egy másik szempontból a találmány tárgyát egy diabéteszes személy diabetikus retinopátia kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására alkalmas eljárás képezi, amely eljárás az emberi prepro-NPY szignál-

peptidrészében található polimorfizmus adott személyben való meglétének kimutatásán alapul, amely polimorfizmus a prepro-NPY szignálpeptidrészének 7. pozíciójában lévő leucin prolinnal történt helyettesítését jelenti, és amely polimorfizmus a diabetikus retinopátia kialakulásának fokozott kockázatára utal.

Egy harmadik szempontból a találmány tárgyát ateroszklerózis kialakulása tekintetében fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált személy, vagy diabetikus retinopátia kialakulása szempontjából fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált diabéteszes személy esetében bármely említett megbetegedés kialakulásának megelőzésére szolgáló terápiás eljárás képezi, amely eljárás a mutáns NPY-gén hatását ellensúlyozó hatóanyag hatékony mennyiségének az adott személynek történő beadásából áll.

Egy negyedik szempontból a találmány tárgyát ateroszklerózis kialakulása tekintetében fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált személy, vagy diabetikus retinopátia kialakulása szempontjából fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált diabéteszes személy esetében bármely említett megbetegedés kialakulásának megelőzésére szolgáló terápiás eljárás képezi, amely eljárás az adott személynek a mutáns NPY szignálpeptid-szekvencia kijavítását célzó specifikus génterápiás kezeléséből áll.

Egy ötödik szempontból a találmány tárgyát az ateroszklerózis vagy a diabetikus retinopátia gyógykezelésére igénybevehető gyógyászati készítmények vagy genetikai megoldások vizsgálatára vagy szkrínelésére alkalmas, egy

prepro Y neuropeptidet (preproNPY-t) vagy annak egy, érett emberi NPY-peptidet kódoló részét kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló emberi DNS-szekvenciát hordozó transzgénikus állatot magában foglaló állati modellen alapuló eljárás képezi, ahol a preproNPY szignálpeptid részének 7. pozíciójában lévő leucin i) változatlan vagy ii) azt prolin helyettesíti.

Egy hatodik szempontból a találmány tárgyát az atheroszklerózis vagy a diabetikus retinopátia gyógykezelésére igénybevehető gyógyászati készítmények vagy genetikai megoldások vizsgálatára vagy szkrínelésére alkalmas, egérszer eredetű NPY-szekvenciát vagy annak egy, érett egérszer eredetű NPY-peptidet kódoló részét kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló DNS-szekvenciát hordozó transzgénikus állatot magában foglaló állati modellen alapuló eljárás képezi, amely egyéb tekintetben normális egérszer eredetű NPY-szekvenciában vagy annak egy, érett egérszer eredetű NPY-peptidet kódoló részében az egérszer eredetű szignálpeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát vagy ép, vagy mutáns emberi szignálpeptidet kódoló emberi szignálpeptid-szekvencia helyettesíti.

Az alábbiakban a szerkezeti vázlatok és az ábrák rövid leírását közöljük.

Az 1. szerkezeti vázlat a prepro-NPY mRNS várható másodlagos szerkezetét mutatja be. A szerkezeti vázlat a K01911 GenBank deponálási számú teljes hosszúságú prepro-NPY mRNS 5' végének (1-138. bázis) várható másodlagos szer-

kezetét szemlélteti. A várható másodlagos szerkezet összeállításához az MFOLD programot alkalmaztuk (Genetics Computer Group, University of Wisconsin).

A 2. szerkezeti vázlat a prepro-NPY mRNS várható másodlagos szerkezetét mutatja be. A szerkezeti vázlat a K01911 GenBank deponálási számú teljes hosszúságú prepro-NPY mRNS 5' végének (1-138. bázis) várható másodlagos szerkezetét szemlélteti. A várható másodlagos szerkezet összeállításához az MFOLD programot alkalmaztuk (Genetics Computer Group, University of Wisconsin). A T/C mutáció a 106. bázist érintette.

Az 1a ábra az emberi NPY-gén, a prepro-NPY-peptid és az érett NPY-peptid molekuláris szerkezetét mutatja be vázlatosan.

Az 1b ábra az emberi NPY-gén nukleotidszekvenciáját mutatja be. A nagybetűs részek exon-, a kisbetűs részek intronszekvenciákat jelölnek. A GenBank deponálási számokat zárójelben tüntettük fel. A nyíl azt a pozíciót jelöli, ahol az eredeti génbeli timidin (T) citozinnal (C) történt helyettesítése mutáns gént eredményezett. A 2. exonban aláhúzással jelölt szekvencia a 28 aminosavból álló szignálpeptidet kódoló szekvenciának felel meg (az 1. azonosítószámú szekvencia az 1. exonnak, a 2. azonosítószámú szekvencia 2. exonnak, a 3. azonosítószámú szekvencia 3. exonnak, a 4. azonosítószámú szekvencia a 4. exonnak felel meg).

Az 1.c ábra az emberi prepro-NPY mRNS nukleotid-szekvenciáját mutatja be (5. azonosítószámú szekvencia, a proteinszekvenciát a 6. azonosítószámú szekvencia tartalmazza). A nyíl azt a pozíciót jelöli, ahol az ép mRNS-beli timidin (T) citozinnal (C) történt helyettesítése mutáns mRNS-t eredményezett.

Az alábbiakban részletesen bemutatjuk a találmány szerinti megoldást.

Az Y-neuropeptid (NPY) egy 36 aminosavból álló neurotranszmitter, amely széles körben előfordul a központi és a perifériás idegrendszerben. Hatása kiterjed a test energiaegyensúlyának és szív-érrendszeri funkcióinak szabályozására. Nemrégiben kimutattuk, hogy a vad típusú (leu7/leu7) szignálpeptid-szekvenciával rendelkező egyénekkel összehasonlítva NPY-szignálpeptidjük 7. pozíciójában prolint (pro7) tartalmazó személyek magasabb szérumkoleszterin és apolipoprotein B koncentrációval rendelkeznek. Találmányunk a prepro-NPY-génbeli leu7pro polimorfizmus szempontjából genotipizált, újonnan diagnosztizált 2. típusú diabéteszes páciensek (81 személy, 41 férfi, átlagéletkor 67,1 év) és nem diabéteszes páciensek (105 személy, 48 férfi, átlagéletkor 65,5 év) csoportjainak 10 éves utánkövetéses („follow-up”) vizsgálatából keresztmetszeti („cross-sectional”) mintavételezéssel nyert adatok alapján az NPY-gén 7. pozíciójában lévő leucin-prolin polimorfizmus és a carotis communis ultrahangos vizsgálattal megállapított intima-média vastagsága („intima-media thickness”,

IMT) közötti összefüggés vizsgálatán alapul. A pro7 szubsztitúció hordozási gyakorisága diabéteszes páciensek esetében 9,9%, kontroll páciensek esetében pedig 14,3% volt ($p = 0,360$). Az átlagos carotis communis IMT-érték a leu7pro polimorfizmussal nem rendelkező nem diabéteszes páciensek esetében $1,04 \pm 0,02$ mm, a polimorfizmussal rendelkezőknél $1,14 \pm 0,04$ mm volt ($p = 0,156$), diabéteszes pácienseknél ezek az értékek $1,18 \pm 0,03$ mm valamint $1,58 \pm 0,21$ mm voltak ($p = 0,004$). A teljes csoport adatainak kovarianciaanalízise alapján az átlagos carotis communis IMT-érték összefüggött a leu7pro polimorfizmus jelenlétével ($F = 5,165$, $p = 0,024$). A modell összetevői voltak a kor, a nem, a diabétesz megléte vagy hiánya, a klinikai makrovaszkuláris megbetegedés megléte vagy hiánya, a dohányzás, a szisztolés vérnyomás és az LDL-koleszterol mennyiség. Mindezek mellett a leu7/leu7 genotípussal rendelkező páciensekhez képest a prepro-NPY-ban pro7 szubsztitúcióval rendelkező diabéteszes páciensekben lényegesen gyakrabban fordult elő diabetikus retinopátia ($p = 0,04$). A vizsgálat eredményei arra utalnak, hogy diabéteszes és nem diabéteszes páciensekben a prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúció jelenléte az ismert hajlamosító tényezők hatásának kiküszöbölésére végzett korrekció után is szoros összefüggést mutat a carotis fokozott ateroszklerózisával. Mindezek mellett ez az első bizonyítéka annak, hogy 2. típusú diabéteszben szenvedő páciensekben a prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúció növeli a diabetikus retinopátia kialakulásnak veszélyét.



A DNS-szekvencia, vagy a mutáns szignálpeptid, vagy a prepro-NPY bármely egyéb hasítási termékével összefüggő peptid igénybevehető olyan szkrínelés során, amelynek célja egy adott egyén mutáns NPY-gén hordozásának kimutatása.

Az előbbi vizsgálat vagy DNS-elemzésként végezhető el, jól ismert eljárások - pl. az ép és a mutáns NPY-gén közvetlen DNS-szekvenálása, vagy az ép vagy mutáns NPY-szekvencia kimutatását lehetővé tevő, polimeráz-lánc-reakcióval (PCR) végzett allélspecifikus amplifikáció - segítségével, vagy az ép és a mutáns NPY-gén közvetett kimutatását lehetővé tevő különféle eljárások alkalmazásával, pl. PCR- szimpla szálú konformációs polimorfizmus („single stranded conformation polymorphism”, SSCP) vizsgálattal vagy denaturáló grádiens-gélelektroforézissel („denaturing gradient gel electrophoresis”, DGGE). Az ép vagy mutáns gén kimutatására igénybevehető még a nagyszámú minta feldolgozására különösen alkalmas restrikciós fragmenshossz-polimorfizmus („restriction fragment length polymorphism”, RFLP) vizsgálat is.

A kimutatás elvégezhető a szövetekben expresszált RNS különböző eljárásokkal történő vizsgálatával is. Hibridizáció céljára allélspecifikus próbák tervezhetők. A hibridizáció pl. Northern-blot-eljárással, Rnáz védő vizsgálati eljárással vagy *in situ* hibridizációs eljárásokkal valósítható meg. Az ép vagy a mutáns NPY-génből származó RNS vizsgálható továbbá az RNS előzetesen cDNS-sé konvertálásával, majd a cDNS allélspecifikus PCR-eljárással végzett amplifi-

kálásával, azt követően pedig a fentiekben a genomi DNS esetében leírtak szerinti elemzésével.

A kimutatás alternatív módon immun-vizsgálati eljárás segítségével, a mintának a szignálpeptidhez vagy a prepro-NPY bármely egyéb hasítási termékével kapcsolatos peptidhez kötődni képes ellenanyaggal történő reagáltatásával is elvégezhető.

Ellenanyagok termelhetők az ép vagy mutáns prepro-NPY, pontosabban az NPY ép vagy mutáns szignálpeptid-részlete ellen. Az ellenanyag-termeltetés poliklonális ellenanyagok előállítása érdekében kísérleti állatokban *in vivo*, monoklonális ellenanyagok nyerése érdekében sejtenyészetekben *in vitro* történhet.

Ateroszklerózis kialakulása tekintetében fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált személy, vagy diabetikus retinopátia kialakulása szempontjából fokozottan veszélyeztetettnek diagnosztizált diabéteszes személy bármely említett megbetegedés kialakulásának megelőzése érdekében a mutáns NPY-gén hatását ellensúlyozó hatóanyag hatékony adagjával kezelhető. Ez megvalósítható a mutáns NPY-szekvencia kijavítását célzó specifikus génterápiával, vagy az endogén NPY szintézisét, kibocsátását vagy metabolizmusát módosító, vagy az NPY célhelyein az NPY és a specifikus NPY receptor-proteinek kölcsönhatását megváltoztató gyógyászati készítmények alkalmazásával. Ezidáig öt különféle NPY-receptor-altípus (Y1-Y5) leírására és klónozására került sor, valamint előállítottak az ezekkel a receptorokkal specifikus reakcióba lépő drogmolekulákat is. A találmány tárgyát ké-



pező gyógyszeres kezelés nem csupán az itt megnevezett receptorokat és mechanizmusokat foglalja magában, hanem kiterjed a később felfedezendő és felismerendő NPY-receptorokra és mechanizmusokra, ideértve az NPY szekrécióját is.

Egy páciensben a mutáns NPY-gén hatásának antiszensz terápiával vagy génkapcsolással vagy -helyettesítéssel történő ellensúlyozása a megbetegedéssel kapcsolatos mutáció célzott korrekcióját vagy a mutáns allél homológ rekombinációval történő helyspecifikus inaktiválását foglalja magában.

Az antiszensz terápia körébe tartozó eljárások a cél-mRNS-sel kialakított közvetlen kölcsönhatáson keresztül gátolják a transzlációt. Ez megvalósítható pl. a gátolandó mRNS-sel Watson-Crick-bázispárokat kialakító, specifikusan tervezett oligonukleotid alkalmazásával. A génexpresszió antiszensz oligonukleotiddal történő gátlásának eredményessége attól függ, képes-e az antiszensz oligonukleotid egy komplementer mRNS-szekvenciához kötődni és meggátolni az mRNS transzlációját. Oligonukleotid-alapú stratégia alkalmazásával korrigálható egy gén egy bázisra kiterjedő mutációja [Giles és mtsai. (1995); Schwab és mtsai. (1994); Yoon és mtsai. (1996)]. Egy rövid, 7 vagy 8 bázis hosszúságú oligonukleotid már antiszensz aktivitással és specifitással rendelkezhet, amely nagymértékben függ a célpont RNS szegélyező szekvenciáitól. A kötődésnek olyan stabilnak kell lennie, hogy elősegítse az RnázH-közvetített hasítást.

A mutáns NPY-gén hatását a mutáns szakasz ... cga ct/cg ggg ... szekvenciáját tartalmazó, rövid, allélspecifikus oligonukleotiddal ellensúlyozzuk (a mutáns bázist vastagítva jelöltük). Ez a mutáns bázisszekvenciát felismerő, különböző hosszúságú oligonukleotidokkal valósítható meg. A prepro-NPY mRNS-ek várható másodlagos szerkezete alapján (1. és 2. séma) a legmegfelelőbb célszekvencia a mutáns bázis körüli -9. bázistól a +2. bázisig terjed, vagyis a 3'-acaagcgtactgg-5' szekvenciának felel meg. Ez a szekvencia „csomókat” („bulbs”) tartalmaz, amelyek köztudottan fokozzák az oligonukleotid cél mRNS-hez kötődését.

A fenti célra módosítatlan oligonukleotidok is alkalmazhatók, de stabilitásuk és nukleázzal szembeni ellenálló képességük fokozása, valamint magba történő behatolásuk elősegítése érdekében az oligonukleotidokon különféle módosítások is végezhetők. Eddig már viszonylag sok, főleg a C-2, C-4, C-5 és C-6 helyeken módosított pirimidinvegyület szintetizálására és nukleotidokba építésére került sor. Hasonlóképpen purinanalógok is szintetizálhatók és oligonukleotidokba építhetők. A cukorgyök, a pentofuranóz-gyűrű 2' pozíciója metoxi-, propoxi-, O-alkoxi- vagy metoxietoxi csoporttal szubsztituálható. Az oligonukleotidok foszfát- vagy cukor-foszfát váza is helyettesíthető, mint pl. a C-5 propinilpirimidin-módosított foszfotioát oligonukleotidok esetében. A fenti célra felhasználhatók továbbá 5'- és 3'-végeiken nukleotidok közötti pl. metilfoszfotioát-, foszfo-diészter- vagy metilfoszfonát-kötésekkel módosított kiméra oligonukleotidok is. Viszonylag új eljárásnak számít a kon-

formáció-korlátozott rögzített nukleinsav („locked nucleic acid”, LNA) oligonukleotidok és peptidnukleinsavak alkalmazása. A biotechnológiai úton előállított ribozimek szerkezetileg eltérnek, de specifitásuk szintén a cél mRNS-szekvencia felismerésének függvénye.

A génkicserélő vagy génkapcsoló eljárások inaktiválják a mutáns génszekvenciát és egy kijavított szekvenciát juttatnak a helyére. Ez ép szekvenciával rendelkező exogén gén transzfekciójával és a mutáns kódoló szekvencia antiszensz oligonukleotiddal történő gátlásával valósítható meg. Igénybevehető olyan technológia is, amelyben a mutáns szekvencia gátlása nélkül kerül sor a kijavított ép szekvencia beépítésére. Ez heterozigóta, vagyis egy ép és egy mutáns allélt hordozó sejtekben alkalmazva a normális allélek túlzott expressziójához vezet. Homozigóta mutáns sejtek kezelése domináns pozitív hatást eredményez, vagyis a normál allélnek a mutánsénál nagyobb mértékű expresszióját idézi elő.

A mutáns NPY-szekvencia NPY-gén működésére gyakorolt hatásának vizsgálatára transzgénikus állatok vehetők igénybe. Transzgénikus állathoz célzott homológ rekombinációs eljárás alkalmazásával juthatunk. Ennek során az endogén szignálpeptid-szekvencia helyettesítése céljából az NPY-gén szekvenciájába juttatjuk az emberi NPY-szignálpeptid ép és mutáns szekvenciáit [vagy bármely, prepro-Y-neuropeptidet (prepro-NPY-t) vagy annak az egérs eredetű vagy emberi érett NPY-peptid aminosav-szekvenciáját kódoló részét kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló DNS-szekvenciát,

amelyben i) a prepro-NPY szignálpeptid részének 7. aminosav-pozíciójában a leucint prolin helyettesíti, vagy ii) a prepro-NPY szignálpeptid részének 7. aminosav-pozíciójában változatlanul leucin található]. Ilyen körülmények között az endogén NPY-gén a megszokott módon működik, de a prepro-NPY szintézisét vagy az ép, vagy a mutáns humán NPY szignálpeptid-szekvencia szabályozza. Ez a transzgénikus modell lehetővé teszi az NPY-génmutáció élettani hatásának nagymértékben célzott vizsgálatát, emellett ideális préklinikai modellt biztosít a mutáns NPY-gén hatásának módosítása céljából tervezett új drogmolekulák vizsgálatához és szkrineléséhez.

A találmány szerinti megoldás részleteit a következő kísérletek bemutatásán keresztül ismertetjük.

1. példa

Kísérleti elrendezés

Vizsgálatunkban 2. típusú diabéteszes betegek és nem diabéteszes kontroll páciensek csoportjainak a diagnózistól számított 10 éves utánkövetéses vizsgálatából keresztmetszeti mintavételezéssel nyert adatok elemzését végeztük el (16-22). Röviden összefoglalva, az eredeti vizsgálatban 133, 45-64 éves, 2. típusú diabéteszsel újonnan diagnosztizált beteg és 144, a lakossági nyilvántartásból véletlenszerűen kiválasztott nem diabéteszes kontroll személy szerepelt. Az alapvizsgálatot 1979-81 között végeztük, az összes páciens Kelet-Finnország egy körülhatárolt területéről származott (16). Az 1985-86-ban (17), valamint az 1991-



92-ben (18-19) elvégzett 5 és 10 éves utánkövetéses vizsgálatokra a páciensek mindegyikét behívtuk. A 10 éves utánkövetési periódus alatt a diabéteszes páciensek közül 36 (27%), a nem diabéteszes páciensek közül 8 (6%) hunyt el, főként szív- és érrendszeri megbetegedések következtében (18). A 10 éves vizsgálat során az eredetileg diabéteszes populációból 84 (63%), a nem diabéteszes csoportból 119 (83%) személy esetében ultrahangos carotis-vizsgálatot és (3 diabéteszes valamint 1 nem diabéteszes páciens kivételével) genotípus-elemzést végeztünk. A kísérletet a Kuopioi Egyetem (University of Kuopio) Etikai Bizottságának jóváhagyásával folytattuk.

Anyag és módszer

Az egészségügyi előélet és a szív- és érrendszeri megbetegedések elbírálását, a gyógyszerszedésre, a dohányzásra, a vérnyomásra, a testtömeg-indexre („body-mass index”, BMI) valamint a derék-csípő körméret arányra vonatkozó adatokat korábban már részletesen ismertettük (18-22). A „makrovaszkuláris megbetegedéssel érintett” csoportba a korábban bizonyítottan szívizominfarktusra, agyvérzésre vagy időszakos sántításra jellemző tüneteket mutatott pácienseket soroltuk. A pácienseken 75 g glükózádaggal orális glükóztolerancia-vizsgálatot végeztünk. A kontroll páciensek esetében megfigyelt csökkent glükóztoleranciát a WHO-szerinti beosztásnak megfelelően osztályoztuk (23). A vérminták gyűjtésével, a szérum lipid és lipoprotein mennyiségének ultracentrifugálással és precipitációs eljárással történt meghatározásával, az apolipoprotein B, a plazma

glükóz és plazma inzulin mennyiségének megállapításával kapcsolatos adatokat korábban már szintén közöltük (19-22).

Genotípus-elemzés

A prepro-NPY genotípus megállapítását egy, a páciensek fenotípusát nem ismerő vizsgáló végezte a perifériás vérmintáikból kivont DNS RFLP-elemzésével. Röviden összefoglalva, amint azt korábban már közzétettük (15), a páciensek leu7pro polimorfizmus alapján történő genotipizálását a *BsiEI* restrikciós helyet eredményező timidin(1128)/citozin(1128) szubsztitúció alkotta polimorfizmusra alapozva végeztük. A PCR-termékeket *BsiEI*-gyel (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) emésztettük, majd 2%-os agarózgélén végzett elektroforézissel vizsgáltuk.

Az a. carotis-beli ateroszklerózis elbírálása

Az arteria carotis-beli referenciapontok, valamint a közeli és távoli érfalfelületek pontos és megbízható azonosítására a korábban részletesebben ismertetett nagyfelbontású „B-mód” ultrahangos képalkotó vizsgálati eljárást alkalmaztuk (20-21, 24). Röviden összefoglalva, az arteria carotis-t anatómiai és geometriai alapon két szakaszra osztottuk. Az e szakaszokat elhatároló főbb anatómiai jellegzetességek a bulbus proximalis vége (carotis bifurkáció), valamint az a. carotis externa-t és a. c. interna-t elválasztó, az áramlást kettéosztó sövény csúcsa voltak. Az IMT-t az artériákról készített hosszirányú felvételeken a távoli fal adventitia/media és intima/üreg határfelületei között mértük. A carotis ultrahangos vizsgálatait két képesített szakember végezte. A vizsgálatokhoz „Biosound Phase

Two" típusú, 10 Mhz-es gyűrűs elrendezésű fejfel felszerelt ultrahangkészüléket használtunk. A vizsgálatokról videofelvételeket készítettünk, amelyek számítógéppel támogatott mennyiségi elemzését egy központi laboratóriumban végezték el (24-25). A carotis communis IMT értéke a kétoldali távolibb fal esetében kapott maximum értékek átlagának felelt meg.

Statisztikai eljárások

A *priori* hipotézisünk szerint a prepro-NPY-ban pro7 szubsztitúcióval rendelkező páciensek átlagos IMT-értéke magasabb a vad típusú prepro-NPY-nal (leu7/leu7) rendelkező páciensekénél. A leu7pro polimorfizmus folytonos változókkal való összefüggéseit Student-féle t-próbával, kategorikus változókkal való összefüggéseit Khi-négyzet próbával vizsgáltuk. Egyes meghatározott kovariánsok hatásának kiküszöbölése érdekében a carotis communis IMT és a leu7pro polimorfizmus összefüggését kovariancia-analízissel (ANCOVA) is megvizsgáltuk. A ferde eloszlású változókat (pl. carotis IMT, inzulinkoncentráció) logaritmikus transzformációt követően vizsgáltuk. A 0,05 vagy annál kisebb p érték statisztikailag lényeges mértékű különbségre utalt. A statisztikai elemzéseket SPSS-Unix szoftverrel végeztük.

Eredmények

A C1128-allél frekvenciája tekintetében nem volt lényeges mértékű különbség a nem diabéteszes (14,3%) és a diabéteszes (9.9%, $p = 0,36$) csoportok között. A diabéteszes és a nem diabéteszes leu7/leu7 és pro7 csoportok vizsgálati



eredményeit az 1a-b táblázatok tartalmazzák. A diabéteszes és nem diabéteszes csoportokon belül az életkor, a nem, a testtömeg-index, a derék/csípő hányados, a vérnyomás és a makrovaszkuláris megbetegedés gyakorisága tekintetében nem volt különbség az eltérő genotípusú páciensek között. A korábbi megfigyelésekkel (15) összhangban a leu7pro polimorfizmussal rendelkező páciensekben magasabb volt az LDL-koleszterin koncentrációja ($p = 0,05$). Bár a leu7/leu7 csoporthoz képest a pro7 csoportban magasabb volt az apolipoprotein B koncentrációja, a különbség statisztikailag nem volt lényeges mértékű. Korábbi vizsgálatunkban a nem diabéteszes csoportban csak a sovány, a koleszterin-metabolizmust ismerten befolyásoló (pl. béta-blokkoló vagy vizelethajtó) kezelésben nem részesülő személyek adatait szerepeltettük (15). A többi lipoprotein tekintetében nem állapítottunk meg eltéréseket, érdekes módon a diabéteszes páciensekben még a testtömeg-index középértékének elemzésével sem találtunk összefüggést a szérum koleszterinszint vonatkozásában (nem közölt adatok).

Az átlagos carotis communis IMT-érték kb. 25%-kal magasabbnak bizonyult a pro7 alléllal rendelkező diabéteszes páciensekben mint a másik alléllal rendelkezőkben ($p = 0,004$), a nem diabéteszes páciensek esetében ez az érték 9%-kal volt magasabb ($p = 0,156$). A két csoport összevonásával kapott adatok kovariancia-elemzése (2. táblázat) során a kor, a pro7 allél jelenléte, a diabétesz, a szisztolés vérnyomás és a makrovaszkuláris megbetegedés bizonyultak a carotis communis IMT-érték független prediktorainak.

Mindemellett a prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúcióval rendelkező diabéteszes páciensek esetében sokkal magasabb volt a diabetikus retinopátia előfordulási aránya, mint a leu7/leu7 genotípusú diabéteszes pácienseknél ($p = 0,04$).

Diszkusszió

Az idős finn nem diabéteszes és diabéteszes páciensek vizsgálatával kapott eredményeink alapján a prepro-NPY pro7 allélje szoros összefüggést mutat a fokozott carotis ateroszklerózissal. Ez az összefüggés diabéteszes páciensek esetében még kifejezettebbnek bizonyult. Ez lényeges megállapítás, mivel a carotisartériák IMT-jének megnövekedésével egyenes arányban nő a szív- és érrendszeri problémák veszélye, még mielőtt a szív- és érrendszeri megbetegedések klinikai tünetei megjelennének (26). A prepro-NPY-beli pro7 polimorfizmus megléte szoros összefüggést mutatott továbbá a diabetikus retinopátia előfordulási arányával. Sovány, nem diabéteszes páciensekben a pro7 allél és a magas LDL-koleszterin valamint apolipoprotein B koncentráció között is összefüggést mutattunk ki (15), ami azonban a diabéteszes páciensek esetében testtömegüktől függetlenül nem volt megfigyelhető.

A 2. típusú diabétesz jelentős mértékben fokozza az ateroszklerózis kialakulásának veszélyét, és bár a diabetikus makrovaszkuláris megbetegedések kialakulása nagyrészt ismert hajlamosító tényezőknek köszönhető (27), az érfal-elváltozások nagy része továbbra is ismeretlen eredetű, így további potenciális környezeti, metabolikus és genetikai okaik felderítésére van szükség. Vizsgálatunkkal első ízben



mutattuk ki, hogy a pro7 alléllal rendelkező diabéteszes páciensek carotis IMT-értéke nagyobb, mint a leu7/leu7 genotípusú pácienseké. Bár ezt az összefüggést viszonylag kisszámú páciens vizsgálatának eredményeként állapítottuk meg, a diabéteszes betegek esetében meghatározott egyéb hajlamosító tényezők és a pro7 allél közötti kapcsolat hiánya miatt az mégis figyelemreméltónak tekintendő. Mivel a nem diabéteszes kontroll csoportban is voltak (mint ahogy bármely populációs vizsgálatban lennének) csökkent glükóztoleranciájú személyek, és emiatt a glükóz-tolerancia tekintetében bizonyos mértékű folytonosság állt fenn a vizsgálati csoportok között, a kovariancia-analízis statisztikai teljesítményének („statistical power”) fokozása érdekében a csoportok adatait összevontan elemeztük. Ennek eredménye alapján a korábban közöltekkel (7) összhangban a kor, a diabétesz, a szisztolés vérnyomás és a makrovaszkuláris megbetegedés jelenléte bizonyultak a carotis communis IMT-érték független változóinak. Az NPY genotípus hatása érdekes módon ebben az elemzésben is statisztikailag lényeges maradt. Egyéb szív- és érrendszeri hajlamosító tényezők egyik csoportban sem mutattak összefüggést az NPY genotípussal, kivéve az éhezési inzulint a nem diabéteszes páciensek esetében. Mint a keresztmetszeti mintavételezéssel végzett vizsgálatok esetében általában, a szelektív mortalitás itt is torzíthatta az adatok értékelését. Mivel azonban egyrészt a pro7 alléllal rendelkező sovány, nem diabéteszes kontroll páciensekben a 10 éves utánkövetési periódus teljes időtartama alatt következetesen magasabb volt az

LDL-koleszterin koncentrációja, másrészt pedig a magasabb mortalitású diabéteszes csoportban kifejezettebb volt a genotípus carotis IMT-re gyakorolt hatása (18), vizsgálatunk feltehetően alulbecsülte a kimutatott összefüggés nagyságát.

Hogyan segítheti elő az NPY az ateroszklerózis kialakulását? Ez elsősorban a prepro-NPY-genotípus LDL-koleszterin metabolizmusra gyakorolt hatásának következménye lehet (15). Ezt a hatást ugyanakkor a testtömeg módosítja (15), vizsgálati eredményeink alapján pedig 2. típusú diabéteszes páciensek esetében ilyen hatást nem észleltünk (ebben a tekintetben a lipoprotein-adatok keresztmetszeti vagy utánkövetéses típusú részletesebb elemzése sem szolgáltat további információval). Másodsorban az NPY rendelkezhet az ateroszklerózis kialakulásában szerepet játszó angiogén tulajdonságokkal is. Az NPY-ról kimutatták, hogy simaizom-mitogén hatású (28), stimulálja az emberi endotélsejtek megtapadását, migrációját, DNS-szintézisét (29), valamint kapilláriscső-képzését (4). A vérkeringésben lévő NPY-mennyiség egy kis hányada endotélsejtekből származik, ez az endotél-eredetű NPY pedig még nagyon alacsony koncentráció esetén is autokrin angiogén faktorként hathat (4). A prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúcióval rendelkező páciensek ezért az endoteliális NPY csökkent működése miatt hajlamosak lehetnek a carotis artériák intima-média rétegének megszélesbedéseként jelentkező artériafal-megvastagodásra. Harmadrészt az NPY az autonóm idegrendszer fontos mediátor anyaga is. A vérkeringésben található NPY-

mennyiség nagyobb hányada a perivaszkuláris szimpatikus idegvégződésekből származik, az NPY-koncentráció összefügg a noradrenalin mennyiségével (30). Amint az általunk vizsgált populáció esetében is kiderült, az autonóm idegrendszeri működészavar a 2. típusú diabéteszes páciensek szív- és érrendszeri eredetű halálozási okainak független prediktora (22). A szív- és érrendszeri megbetegedések és az autonóm idegrendszeri működészavar közötti összefüggések ugyan még csak feltételezésen alapulnak, de saját, nem közölt megfigyeléseink arra utalnak, hogy a prepro-NPY-ban pro7 szubsztitúcióval rendelkező páciensek szívének autonóm szabályozása rendellenes. Mindezek alapján úgy véljük, hogy az ateroszklerózis kialakulása összefügghet az érfejlődésben, lipid metabolizmusban és autonóm idegi funkciókban szerepet játszó génnel (génekkel), és az általunk nemrégiben leírt NPY-génváltozat (15) az első, amely kimutatható kapcsolatban áll a fokozott ateroszklerózissal.

Összefoglalva, eredményeink arra utalnak, hogy diabéteszes és nem diabéteszes finn páciensekben a prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúció jelenléte összefügg a carotis ultrahangos vizsgálattal megállapított ateroszklerózisával. Vizsgálatunk ezen felül elsőként szolgáltatott adatokat arról, hogy a prepro-NPY-beli pro7 szubsztitúció jelenléte NIDDM (2. típusú) diabéteszes páciensekben a diabetikus retinopátia fokozott előfordulási arányával is összefüggést mutat, ezért ez a drogfejlesztés potenciális célterülete lehet.



A találmány szerinti eljárások számos különböző megvalósítási módban alkalmazhatók, amelyek közül itt csupán néhányat ismertettünk. Szakember számára nyilvánvaló, hogy további megvalósítási módok is léteznek, amelyekben szintén megvalósul a találmányi gondolat. Ennek megfelelően a bemutatott megvalósítási módok csupán a találmány szerinti megoldás illusztrálását szolgálják és nem korlátozzák annak hatókörét.

1a táblázat

A nem diabéteszes páciensek klinikai jellemzői

leu7/pro- genotípus szerint

Jellemző	leu7/leu7 n = 90	pro7/- n = 15	p-érték
Életkor (év)	65.5±0.6	65.5±1.1	0.982
Férfi nem (n, %)	43 (48)	5 (33)	0.298
Testtömeg-index (kg/m ²)	27.8±0.5	28.4±1.2	0.611
Makrovaszkuláris megbetegedés (n, %)	11 (12)	4 (27)	0.139
Dohányzás (n, %)	23 (26)	5 (33)	0.528
Gyógykezelt magas vérnyomás (n, %)	26 (29)	6 (40)	0.387
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	149±2	148±3	0.863
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	85±1.1	85±3	0.847
Éhezési szérum inzulin (mE/L)	11.0±0.6	14.8±2.2	0.056
Csökkent glükóztolerancia (n, %)	11 (12)	1 (7)	0.531
Átlagos carotis communis IMT (mm)	1.04±0.02	1.14±0.4	0.156
Szérum apolipoprotein B (mg/L)	1.04±0.03	1.12±0.08	0.285
Szérum HDL koleszterin (mmol/L)	1.34±0.03	1.27±0.08	0.403
Szérum LDL koleszterin (mmol/L)	4.11±0.09	4.61±0.30	0.05
Szérum összes koleszterin (mmol/L)	6.29±0.11	6.72±0.37	0.153
Szérum triglicerid (mmol/L)	1.81±0.12	1.65±0.18	0.811
Derék/csípő hányados	0.91±0.01	0.91±0.03	0.926

1b táblázat

A diabéteszes páciensek klinikai jellemzői leu7/pro- geno-
típus szerint

Jellemző	leu7/leu7 n = 73	pro7/- n = 8	p-érték
Életkor (év)	67.1±0.7	66.5±1.2	0.765
Férfi nem (n, %)	36 (49)	5 (63)	0.479
Testtömeg-index (kg/m ²)	29.4±0.6	27.6±4.1	0.344
Makrovaszkuláris megbetegedés (n, %)	28 (38)	5 (63)	0.187
Dohányzás (n, %)	25 (34)	2 (25)	0.598
Gyógykezelt magas vérnyomás (n, %)	40 (55)	5 (63)	0.677
Szisztolés vérnyomás (Hgmm)	154±2.8	150±10.3	0.637
Diasztolés vérnyomás (Hgmm)	84±2	87±4	0.482
Éhezési szérum inzulin (mE/L)	15.0±0.9	15.7±3.7	0.823
Átlagos carotis communis IMT (mm)	1.18±0.03	1.58±0.21	0.004
Szérum apolipoprotein B (mg/L)	1.17±0.03	1.00±0.09	0.10
Szérum HDL koleszterin (mmol/L)	1.11±0.03	1.27±0.12	0.142
Szérum LDL koleszterin (mmol/L)	4.09±0.10	3.66±0.27	0.204
Szérum összes koleszterin (mmol/L)	6.44±0.16	5.95±0.36	0.325
Szérum triglicerid (mmol/L)	2.62±0.22	2.09±0.34	0.455
Derék/csípő hányados	0.94±0.01	0.98±0.03	0.222

2. táblázat

Az átlagos carotis intima-média vastagság kovariancia-
analízise az összevont csoportok adatai alapján, a leu7/pro
polimorfizmus és kovariánsai hatásának korrekciójával

Hajlamosító tényező	F-érték	Szignifikancia
Életkor	7,744	0,006
Nem	2,866	0,092
Diabétesz	3,960	0,048
NPY leu7/pro	5,165	0,024
Makrovaszkuláris megbetegedés	4,278	0,040
Dohányzás	2,225	0,138
Szisztolés vérnyomás	5,754	0,018
LDL-koleszterin	0,142	0,707

Kétirányú interakció: diabétesz x NPY leu7/pro, $F = 0,174$,
 $p = 0,677$

Felhasznált szakirodalom

1. Benarroch EE: Neuropeptides in the sympathetic system: presence, plasticity, modulation, and implications. *Ann Neurol* 36: 6-13, 1994
2. Tomaszuk A, Simpson C, Williams G: Neuropeptide Y, the hypothalamus and the regulation of energy homeostasis. *Horm Res* 46: 53-8, 1996
3. Palmiter RD, Erickson JC, Hollopeter G, Baraban SC, Schwartz MW: Life without neuropeptide Y. *Recent Prog Horm Res* 53: 163-99, 1998
4. Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS: Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 83: 187-95, 1998
5. Sahu A, Kalra SP: Neuropeptide regulation of feeding behaviour Neuropeptide Y: *TEM* 4: 217-224, 1993
6. Moltz JH, McDonald JK: Neuropeptide Y: direct and indirect action on insulin secretion in the rat. *Peptides* 6:1155-1159, 1985
7. Vettor R, Pagano C, Granzotto M, Englaro P, Angeli P, Blum WF, Federspil G, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B: Effects of intravenous neuropeptide Y on insulin secretion and insulin sensitivity on skeletal muscle in normal rats. *Diabetologia* 41: 1361-7, 1998
8. Sahu A, Dube MG, Phelps CP, Sninsky CA, Kalra PS, Kalra SP: Insulin and insulin-like growth factor II suppress neuropeptide Y release from the nerve

- terminals in the paraventricular nucleus: a putative hypothalamic site for energy homeostasis. *Endocrinology* 136: 5718-24, 1995
9. Frankish HM, Dryden S, Hopkins D, Wang Q, Williams G: Neuropeptide Y, the hypothalamus, and diabetes: insights into the central control of metabolism. *Peptides* 16: 757-71, 1995
10. Wahlestedt C, Skagerberg G, Ekman R, Heilig M, Sundler F, Hakanson R: Neuropeptide Y (NPY) in the area of the hypothalamic paraventricular nucleus activates the pituitary-adrenocortical axis in the rat. *Brain Res* 417:33-38, 1987
11. Shine J, Potter EK, Biden T, Selbie LA, Herzog H: Neuropeptide Y and regulation of the cardiovascular system. *J Hypertens* (Suppl) 12:S41-S45, 1994
12. Dunbar JC, Ergene E, Anderson GF, Barraco RA: Decreased cardiorespiratory effects of neuropeptide Y in the nucleus tractus solitarius in diabetes. *AmJ Physiol* 262: R865-71, 1992
13. Lind H, Erlinge D, Brunkwall J, Edvinsson L: Selective attenuation of neuropeptide-Y-mediated contractile responses in blood vessels from patients with diabetes mellitus. *Clin Auton Res* 5: 191-7, 1995
14. Larhammar D, Söderberg C, Lundell I: Evolution of the neuropeptide Y family and its receptors. *Ann NY Acad Sci* 839: 35-40, 1998
15. Karvonen MK, Pesonen U, Koulu M, Niskanen L, Laakso M, Rissanen A, Dekker JM, Hart LM, Valve R, Uusitupa MJ: Association of a leucine(7)-to-proline(7) polymorphism in the signal peptide of neuropeptide Y with high serum cholesterol and LDL cholesterol levels. *Nat Med* 4:1434-1437, 1998

16. Uusitupa M, Siitonen O, Aro A, Pyörälä K: Prevalence of coronary heart disease, left ventricular failure and hypertension in middle-aged, newly diagnosed type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabetologia* 28: 22-27, 1985
17. Niskanen LK, Uusitupa MI, Sarlund H, Siitonen O, Pyörälä K: Five-year follow-up study on plasma insulin levels in newly diagnosed NIDDM patients and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 13: 41-48, 1990
18. Uusitupa MIJ, Niskanen LK, Siitonen O, Voutilainen E, Pyörälä K: Ten-year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia* 36: 1175-1184, 1993
19. Niskanen L, Uusitupa M, Karjalainen J, Siitonen O: Metabolic evolution of Type 2 diabetes - 10-year follow-up study. *J Intern Med* 236: 263-270, 1994
20. Uusitupa M, Niskanen L, Luoma J, Mercouri M, Rauramaa R, Ylä-Herttuala S: Autoantibodies against oxidized LDL as predictors of atherosclerotic vascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscl & Thromb & Vasc Biol* 16: 1236-1242, 1996
21. Niskanen L, Rauramaa R, Miettinen H, Haffner SM, Mercuri M, Uusitupa M: Carotid artery intima-media thickness in elderly patients with NIDDM and in nondiabetic subjects. *Stroke* 27: 1986-1992, 1996
22. Töyry J, Niskanen L, Mäntysaari M, Länsimies E, Uusitupa M: Occurrence, predictors, and clinical significance of autonomic neuropathy in NIDDM: 10-year follow-up from the diagnosis. *Diabetes* 45: 308-315, 1996



23. World Health Organization. Diabetes mellitus: report of a WHO Study Group. Geneva: World Health Org., Tech Rep Ser, no 727, 1985
24. Mercuri M, Bond MG, Nichols FT, Carr AA, Flack JM, Byington R, Raines J, for the MIDAS Group. Baseline reproducibility of B-mode ultrasound imaging measurements of carotid intimal media thickness: the Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS). J Cardiovasc Diagnosis Procedures 11: 241-252, 1993
25. Rauramaa R, Väisänen S, Mercuri M, Rankinen T, Penttilä I, Bond MG: Association of risk factors and body iron status to carotid atherosclerosis in middle-aged Eastern Finnish men. Eur Heart J 15: 1020-1027, 1994
26. O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SKJ. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. N Engl J Med 1999; 340:14-22.
27. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D for the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group: Diabetes, other risk factors and 12-years cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Diabetes Care 16: 434-444, 1993
28. Zukowska-Grojec Z, Pruszczyk P, Colton C, Yao J, Shen GH, Myers AK, Wahlestedt C: Mitogenic effect of neuropeptide Y in rat vascular smooth muscle cells. Peptides 1993; 14:263-268.
29. Shigeri Y, Fujimoto M: Neuropeptide Y stimulates DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. Neurosci Lett 1993; 149:19-22.

30. Lundberg JM, Franco-Cereceda A, Hemsén A, Lacroix JS, Pernow J:
Pharmacology of noradrenaline and neuropeptide tyrosine (NPY)-mediated
sympathetic cotransmission. *Fundam Clin Pharmacol* 4:373-391, 1990

SZEKVENCIALLISTA

<210> 1
<211> 325
<212> DNS
<213> Homo sapiens

<400> 1

ccgcttcttc aggcagtgcc tggggcgga gggttgggt gtgggtggct ccctaagtcg 60
acactcgtgc ggctgcggtt ccagccccct ccccccgcca ctcaggggcg ggaagtggcg 120
gggtgggagtc acccaagcgt gactgcccga ggccccctct gccgcggcga ggaagctcca 180
taaaagccct gtgcgaccc gctctctgca ccccatccgc tggctctcac ccctcggaga 240
cgctcgcccg acagcatagt acttgccgcc cagccacgcc cgcgcgccag ccaccgtgag 300
tgctacgacc cgtctgtcta ggggt 325

<210> 2
<211> 247
<212> DNS
<213> Homo sapiens

<400> 2

cccgctcgtt gagccttctg tgccctgcaga tgctaggtaa caagcgactg gggctgtccg 60
gactgaccct cgcctgtcc ctgctcgtgt gcctgggtgc gctggccgag gcgtaccct 120
ccaagccgga caaccgggc gaggacgcac cagcggagga catggccaga tactactcag 180
cgctgcgaca ctacatcaac ctcatcacca ggcagagggtg ggtgggaccg cgggaccgat 240
tccggga 247



<210> 3
<211> 142
<212> DNS
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
acttgcttta aaagactttt ttttttccag atatggaaaa cgatctagcc cagagacact 60
gatttcagac ctcttgatga gagaaagcac agaaaatggt cccagaactc ggtatgacaa 120
ggcttgtgat ggggacattg tt                                     142
```

<210> 4
<211> 300
<212> DNS
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
ccttacatgc tttgcttctt atgttttaca ggcttgaaga ccctgcaatg tggatgatggg 60
aaatgagact tgctctctgg cctttttccta ttttcagccc atatttcata gtgtaaaacg 120
agaatccacc catcctacca atgcatgcag ccaactgtgct gaattctgca atgttttcct 180
ttgtcatcat tgtatatatg tgtgttttaa taaagtatca tgcattcaaa agtgtatcct 240
cctcaatgaa aaatctatta caatagtgag gattattttc gttaaactta ttattaacaa 300
```

<210> 5
<211> 551
<212> DNS
<213> Homo sapiens



<220>

<221>

<222> (87)..(377)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (87)..(170)

(400) 5

```

accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacagcatag tacttgccgc 60
ccagccacgc ccgcgcgcca gccacc atg cta ggt aac aag cga ctg ggg ctg 113
                                Met Leu Gly Asn Lys Arg Leu Gly Leu
                                1              5

tcc gga ctg acc ctc gcc ctg tcc ctg ctc gtg tgc ctg ggt gcg ctg 161
Ser Gly Leu Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Val Cys Leu Gly Ala Leu
10              15              20              25
gcc gag gcg tac ccc tcc aag ccg gac aac ccg ggc gag gac gca cca 209
Ala Glu Ala Tyr Pro Ser Lys Pro Asp Asn Pro Gly Glu Asp Ala Pro
30              35              40
gcg gag gac atg gcc aga tac tac tcg gcg ctg cga cac tac atc aac 257
Ala Glu Asp Met Ala Arg Tyr Tyr Ser Ala Leu Arg His Tyr Ile Asn
45              50              55
ctc atc acc agg cag aga tat gga aaa cga tcc agc cca gag aca ctg 305
Leu Ile Thr Arg Gln Arg Tyr Gly Lys Arg Ser Ser Pro Glu Thr Leu
60              65              70
att tca gac ctc ttg atg aga gaa agc aca gaa aat gtt ccc aga act 353
Ile Ser Asp Leu Leu Met Arg Glu Ser Thr Glu Asn Val Pro Arg Thr
75              80              85

```



cgg ctt gaa gac cct gca atg tgg tgatgggaaa tgagacttgc tctctggcct 407
Arg Leu Glu Asp Pro Ala Met Trp
90 95
tttcctatatt tcagcccata tttcatcgtg taaaacgaga atccacccat cctaccaatg 467
catgcagcca ctgtgctgaa ttctgcaatg ttttcctttg tcatcattgt atatatgtgt 527
gtttaaataa agtatcatgc attc 551

<210> 6

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás személy ateroszklerózis kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy az adott személyben kimutatjuk az emberi prepro-NPY szignálpeptidrészében található, a prepro-NPY szignálpeptidrészének 7. pozíciójában lévő leucin prolinnal történt helyettesítését tartalmazó, az ateroszklerózis kialakulásának fokozott kockázatára utaló polimorfizmus meglétét.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy diabéteszes személyt vizsgálunk.

3. Eljárás egy diabéteszes személy diabetikus retinopátia kialakulásával szembeni fokozott fogékonyságának diagnosztizálására, azzal jellemezve, hogy az adott személyben kimutatjuk az emberi prepro-NPY szignálpeptidrészében található, a prepro-NPY szignálpeptidrészének 7. pozíciójában lévő leucin prolinnal történt helyettesítését tartalmazó, a diabetikus retinopátia kialakulásának fokozott kockázatára utaló polimorfizmus meglétét.

4. Mutáns NPY-gén hatása ellen ható hatóanyag alkalmazása az 1. vagy 2. igénypontok szerint ateroszklerózis kialakulásával szemben fokozottan fogékonynak diagnosztizált személy ateroszklerózis megelőzése céljából végzett kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

5. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hatóanyag az endogén NPY szintézisét, kibocsátását vagy metabolizmusát módosító, vagy az NPY célhelyein az NPY és a spe-

cifikus NPY-receptorproteinek kölcsönhatását megváltoztató gyógyhatású anyag.

6. A 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hatóanyag az ép vagy mutáns NPY-gén expresszióját módosító gyógyhatású anyag.

7. Emberi, 7. pozíciójában leucint tartalmazó prepro-NPY-szignálpeptidrészt vagy annak egy részét kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó nukleotidszekvencia alkalmazása az 1. vagy 2. igénypontok szerinti eljárással ateroszklerózis kialakulásával szemben fokozottan fogékonyak diagnosztizált személynek a mutáns NPY-szekvencia kijavítása útján ateroszklerózis megelőzésére szolgáló, génterápiás kezelésére alkalmas génterápiás eszköz, előnyösen vektor, előállítására.

8. Mutáns NPY-gén hatását ellensúlyozó hatóanyag alkalmazása diabetikus retinopátia kialakulásával szemben fokozottan fogékonyak diagnosztizált diabéteszes személynek diabetikus retinopátia megelőzése céljából végzett kezelésére alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

9. A 8. igénypont szerinti alkalmazás ahol a hatóanyag az endogén NPY szintézisét, kibocsátását vagy metabolizmusát módosító, vagy az NPY célhelyein az NPY és a specifikus NPY receptorproteinek kölcsönhatását megváltoztató gyógyhatású anyag.

10. A 8. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hatóanyag az ép vagy mutáns NPY-gén expresszióját módosító gyógyhatású anyag.

11. Emberi, 7. pozíciójában leucint tartalmazó prepro-NPY-szignálpeptidrészt vagy annak egy részét kódoló nukleotidszekvenciát tartalmazó nukleotidszekvencia alkalmazása diabetikus retinopátia kialakulásával szemben fokozottan fogékonyak diagnosztizált diabéteszes személynek a mutáns NPY-szekvencia kijavítása útján diabetikus retinopátia megelőzésére szolgáló, génterápiás kezelésére alkalmas génterápiás eszköz, előnyösen vektor előállítására.

12. Eljárás ateroszklerózis vagy diabetikus retinopátia gyógykezelésére igénybevehető gyógyászati készítmények vagy genetikai megoldások vizsgálatára vagy szkrínelésére, *azzal jellemezve*, hogy egy prepro-Y-neuropeptidet (preproNPY-t) vagy annak egy, érett emberi NPY-peptidet kódoló részét kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló emberi DNS-szekvenciát hordozó transzgénikus állatot magában foglaló állati modellt alkalmazunk, ahol a prepro-NPY szignálpeptidrészének 7. pozíciójában lévő leucin i) változatlan vagy ii) azt prolin helyettesíti.

13. Eljárás ateroszklerózis vagy diabetikus retinopátia gyógykezelésére igénybevehető gyógyászati készítmények vagy genetikai megoldások vizsgálatára vagy szkrínelésére, *azzal jellemezve*, hogy egérreredetű NPY-szekvenciát vagy annak egy, érett egérreredetű NPY-peptidet kódoló részét kódoló nukleotid-szekvenciát magában foglaló DNS-szekvenciát hordozó transzgénikus állatot magában foglaló állati modellt alkalmazunk, ahol az egyéb tekintetben normális egérreredetű NPY-szekvenciában vagy annak egy,

érett, egéreredetű NPY-peptidet kódoló részében az egéreredetű szignálpeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát vagy ép, vagy mutáns emberi szignálpeptidet kódoló emberi szignálpeptid-szekvencia helyettesíti.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.



Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivőjelölt

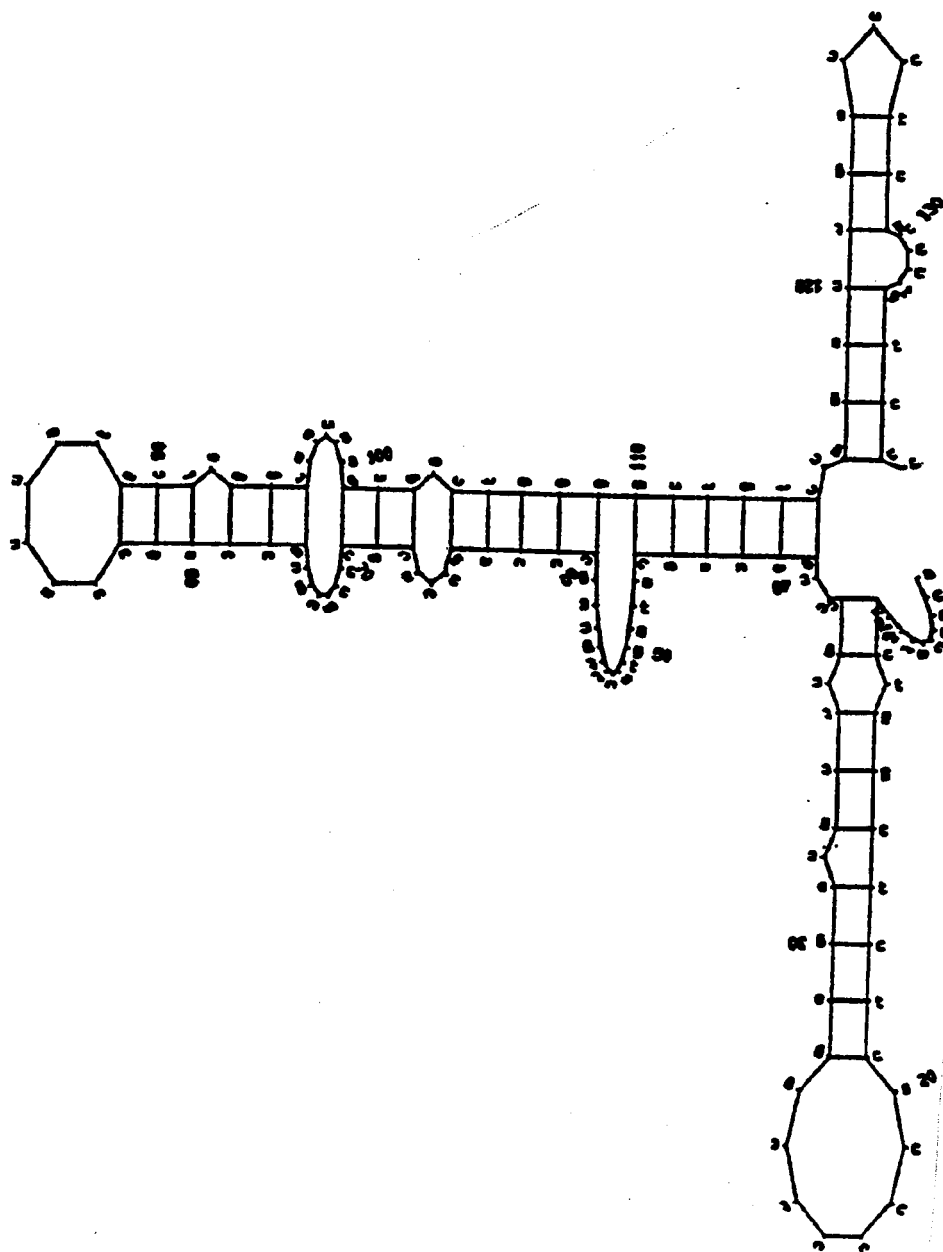
320 oldal
Svingor Ádám
43 oldal
P. 2000

PCT/FI00/00260

1/5

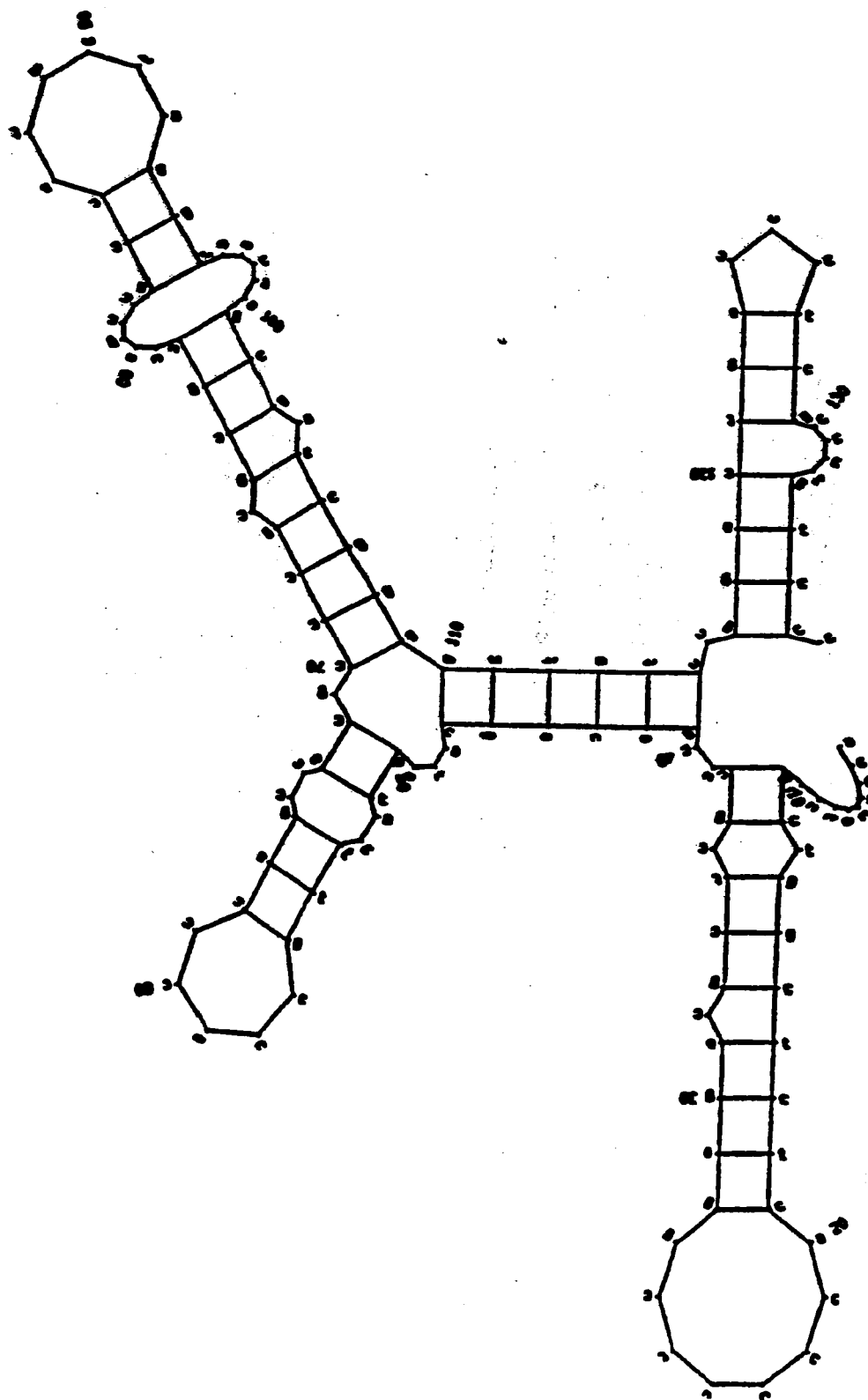
I. Szerkezeti vázlat

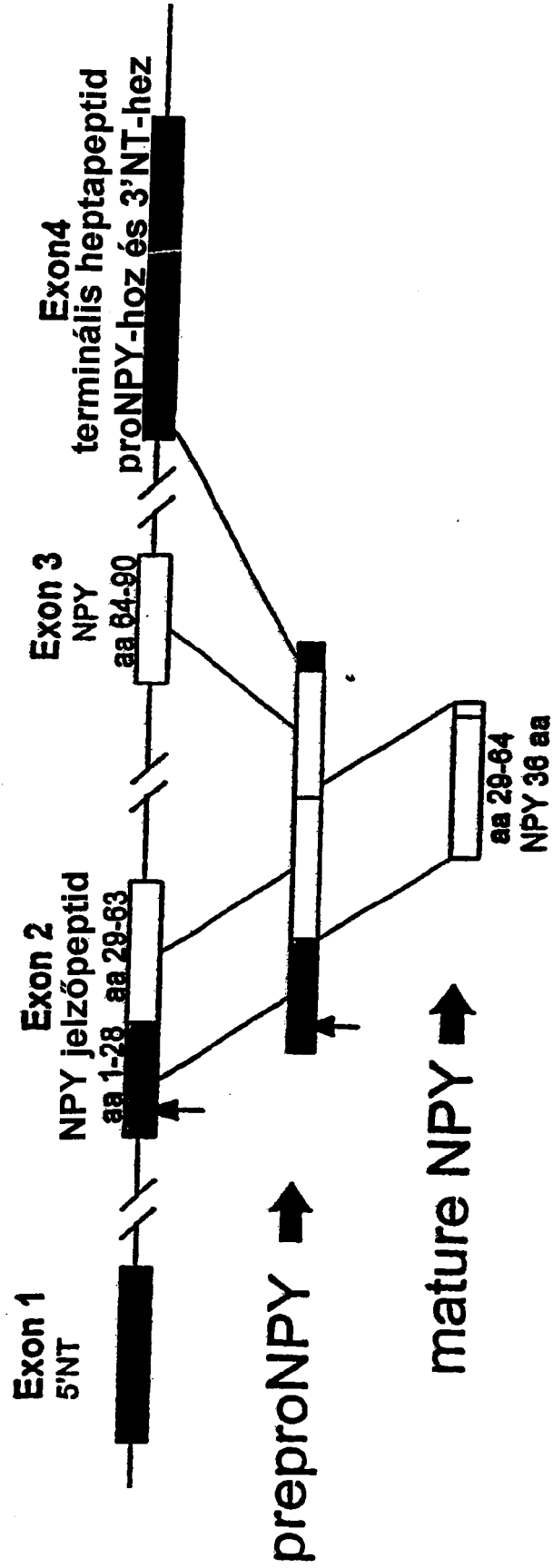
Osa1. mfold „Squiggle plot”-ja Február 7, 19100 12: 46
Osai. szekv. (lineáris) MFOLD-ja T: 37.0 Ellenőrzés: 5173, 1-138-ig, február 7, 19100 12: 43,
Hosszúság: 138, Energia: -28.4



II. Szerkezeti vázlat

Osa2. mfold „Squiggle plot”-ja Február 7, 19100 14: 11
Osai. szekv. (lineáris) MFOLD-ja T: 37.0 Ellenőrzés: 4340, 1-138-ig február 7, 19100 14: 07,
Hosszúság: 138 Energia: -26.4





1. ábra

Emberi Y neuropeptid (NPY) gén

EXON 1 (M14295)

```

1   ccgcttcttc aggcagtgcc tggggcggga gggttggggt gtgggtggct ccctaagtcc
61  aactcgtgc ggctgcgggt ccagccccct ccccccgcca ctcaggggag ggaagtggcg
121 ggtgggagtc acccaagcgt gactgcccga ggccccctct gccgcggcga ggaagctcca
181 taaaagccct gtcgcgaccc gctctctgca CCCCATCCGC TGGCTCTCAC CCCTCGGAGA
241 CGCTCGCCCG ACAGCATAGT ACTTGCCGCC CAGCCACGCC CGCGCGCCAG CCACCGTGAG
301 tgctacgacc cgtctgtcta ggggt

```

EXON 2 (M14296)

```

1   cccgtccggt gagecttctg tgccctgcagA TGCTAGGTAA CAAGCGACTG GGGCTGTCCG
61  GACTGACCCT CGCCCTGTCC CTGCTCGTGT GCCTGGGTGC GCTGGCCGAG GCGTACCCCT
121 CCAAGCCGGA CAACCCGGGC GAGGACGCAC CAGCGGAGGA CATGGCCAGA TACTACTCAG
181 CGCTGCGACA CTACATCAAC CTCATCACCA GGCAGAGgtg ggtgggaccg cgggaccgat
241 tccggga

```

EXON 3 (M14297)

```

1   acttgcttta aaagactttt ttttttccag ATATGGAAAA CGATCTAGCC CAGAGACACT
61  GATTTTCAGAC CTCTTGATGA GAGAAAGCAC AGAAATGTT CCCAGAACTC Ggtatgacaa
121 ggcttctgat ggggacattg tt

```

EXON 4 (M14298)

```

1   CCTTACATGC TTGCTTCTT ATGTTTACA Ggcttgaaga ccctgcaatg tggatgatggg
61  aaatgagact tgetctctgg ctttttcccta ttttcagccc atatttcacg gtgtaaaacg
121 agaatccacc catcctacca atgcatgcag ccactgtgct gaattctgca atgttttcct
181 ttgtcatcat tgtatatatg tgtgtttaaa taaagtatca tgcattcaaa agtgtatcct
241 cctcaatgaa aaatctatta caatagttag gattattttc gttaaactta ttattaacaa

```

Emberi Y neuropeptid (NPY) mRNS

K01911

c
↓

```
1  accccatccg ctggctctca cccctcggag acgctcgccc gacaggatag tacttgccgc
61  ccagccacgc ccgcgcgcca gccaccatgc taggtaacaa gcgacggggg ctgtccggac
121 tgaccctcgc cctgtccctg ctcgtgtgcc tgggtgcgct ggccgaggcg taccctcca
181 agccggacaa cccgggcgag gacgcaccag cggaggacat ggccagatac tactcggcgc
241 tgcgacacta catcaacctc atcaccaggc agagatatgg aaaacgatcc agcccagaga
301 cactgatttc agacctcttg atgagagaaa gcacagaaaa tgttcccaga actcggcttg
361 aagaccctgc aatgtggtga tgggaaatga gacttgctct ctggcctttt cctattttca
421 gcccatattt catcgtgtaa aacgagaatc caccatcctt accaatgcat gcagccactg
481 tgetgaattc tgcaatgttt tcctttgtca tcattgtata tatgtgtgtt taaataaagt
541 atcatgcatt c
```

1c ábra