

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2370

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

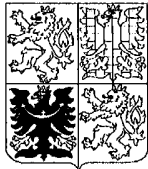
A 61 K 38/33

C 07 K 14/67

C 12 N 15/62

A 61 P 5/48

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **21.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.12.1997 30.03.1998**
21.05.1998 01.07.1998
05.08.1998 13.10.1998

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/068659 1998/079857 1998/086321**
1998/091385 1998/095405 1998/103976

(33) Země priority: **US US US US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/27238**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/32142**

(71) Přihlašovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN, US;

(72) Původce:

Becker Gerald Wayne, Fishers, IN, US;
Butler Jon Paul, Pendleton, IN, US;
Hale John Edward, Fishers, IN, US;
Heath William Francis Jr., Fishers, IN, US;
Heiman Mark Louis, Indianapolis, IN, US;
Schoner Brigitte Elisabeth, Monrovia, IN, US;
Varshavsky Alexander David, Carmel, IN, US;

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Beta-lipotropin a jeho použití

(57) Anotace:

Řešení se týká izolovaných nukleových kyselin, vektorů, transformovaných hostitelských buněk, analogů, funkčních fragmentů a fúzovaných proteinů, vztahujících se k beta-lipotropinu. Řešení se také týká farmaceutických kompozic, obsahujících beta-lipotropin nebo jeho fragment a/nebo funkční analog a jejich použití při léčení diabetu a komplikací s ním spojených.

Beta-lipotropin a jeho použití

Tato přihláška nárokuje výsledky U.S. předběžných patentových přihlášek č. 60/068,659, podaná 23. prosince 1997; 60/079,857, podaná 30. března 1998; 60/086321, podaná 21. května 1998; 60/091,385, podaná 1. června 1998; 60/095,405, podaná 5. srpna 1998; a 60/103,976, podaná 13. října 1998.

Oblast techniky

Předložený vynález se týká oboru farmacie a medicíny. Předložený vynález se obzvláště týká beta-lipotropinu, jeho fragmentů a analogů, farmaceutických přípravků a způsobů jejich použití pro léčbu diabetu a dalších vztahujících se stavů u savců.

Dosavadní stav techniky

Proopiomelanokortin (POMC) je neuropeptidová prekurzorová molekula, která je translokována do sekrečních drah v neuroendokrinních buňkách. POMC se štěpí působením specifických endopeptidáz a tím vznikají peptidy jako je adrenokortikotropní hormon (ACTH), beta-lipotropin (BLAT) beta-endorfin a melanocytový stimulační hormon (MSH). Ke zpracování POMC na jeden nebo více specifických peptidů dochází v tkáni a způsobem specifickým pro buňku (viz obecně M. Castro a E. Morrison, Crit. Rev. Neurobiol., 11, 35-57, 1997; Roberts, J. L. a Herbert, E., Proc. Nat. Acad. Sci., 74, 4826 (1977); Roberts, J. L. a Herbert, E., Proc. Nat.

Acad. Sci. 74, 5300 (1977); Mains a kol., Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 3014 (1977)). POMC je produkován hlavně v hypofýze a hypothalamu. Post-translační zpracování POMC v předním laloku hypofýzy produkuje ACTH a BLAT. Na druhé straně hlavní produkty střední části hypofýzy jsou α -MSH, CLIP, γ -lipotropin, β -endorfin a β -MSH, zatímco v hypothalamu se POMC zpracovává primárně na γ -MSH a β -endorfin.

Peptidy odvozené od POMC hrají řadu důležitých rolí v metabolické a fyziologické regulaci. Například ACTH, peptid o 39 aminokyselinách, stimuluje sekreci glukokortikoidů z nadledvinové kůry. Sloučeniny typu MSH na druhé straně stimuluji syntézu melaninu melanocyty v kůži a také se zúčastňují metabolismu tuků. β -endorfin je odvozen od karboxylového konce BLAT (viz rezidua 59 až 89 lidské sekvence) a má analgetickou aktivitu, která je antagonizována naloxonem, známým antagonistou morfinu. Peptidové hormony odvozené od POMC tedy mají různé role ve fyziologické a metabolické regulaci.

Vlastní metabolismus glukózy a energie závisí na inzulínu, peptidu, který nemá vztah k POMC. Specificky inzulín stimuluje syntézu glykogenu, mastných kyselin a proteinů a také stimuluje glykolýzu. Inzulín je kritickou látkou pro podporování vstupu glukóza do svalů a tukových buněk.

Vadný metabolismus inzulínu může vést k diabetu. Diabetici typu 1 vyžadují exogenní podávání inzulínu pro správné řízení metabolismu energie a glukózy. Naopak diabetici typu 2 typicky nepotřebují exogenní inzulín až do pozdních stadií

onemocnění. Správné řízení metabolismu glukózy a energie je nezbytné pro účinné zvládnutí diabetu. Bez něj může docházet k závažným a někdy dokonce fatálním následkům, mezi které patří ketoacidóza, kóma, retinopatie, diabetická mikroangiopatie, ateroskleróza, infarkt myokardu, mrtvice, gangréna, hypertriglyceridémie, hypercholesterolémie, kardiomyopatie, dermatopatie, syndrom diabetických nohou, nefropatie, infekce močového traktu, papilární nekróza, katarakty, diabetická gastroenteropatie, zácpa, periferní vaskulární onemocnění a dokonce smrt. V mnoha případech musí být udržována delikátní rovnováha mezi podáním příliš velkého množství inzulínu a příliš malého množství inzulínu. Ideální terapií diabetu by tedy byla léčba, která řídí hladinu glukózy v krvi zlepšením citlivosti na inzulín.

V dalším je popsán způsob léčení a farmaceutické kompozice, které jsou účinné pro léčbu nebo prevenci diabetu typu 1 a typu 2 a s nimi souvisejících komplikací, který zahrnuje podávání farmaceuticky účinného množství beta-lipotropinu a/nebo jeho fragmentů a/nebo jeho analogů.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká izolovaných proteinů, mezi které patří beta-lipotropin (BLAT), jeho analogy, jeho fragmenty, nukleových kyselin, které je kódují, a způsobů získávání a používání BLAT při léčbě diabetu a komplikací s ním spojených.

Jsou popsány způsoby léčení diabetu a komplikací s ním spojených u savců, v to počítaje člověka, podáváním

farmaceuticky účinných množství BLAT, jeho analogů nebo jeho funkčních fragmentů. Předložený vynález se dále týká způsobu léčení diabetu typu 1 a typu 2, retinopatie, diabetické mikroangiopatie, aterosklerózy, infarktu myokardu, mrtvice, gangrény, hypertriglyceridémie, hypercholesterolémie, kardiomyopatie, dermopatie, syndrom diabetické nohy, nefropatie, infekce močových cest, papilární nekrózy, kataraktů, diabetické gastroenteropatie, zácpa a periferní vaskulární onemocnění.

Popsány jsou způsoby výroby BLAT v *E. coli* a kvasinkách. V *E. coli* se BLAT získává jako fúzovaný protein, který může být získán z buněčných lyzátů v přítomnosti vysoké koncentrace solí obvyklými způsoby čištění. Fúzovaný BLAT protein obsahuje rozpoznávací místo pro specifické proteázy, které jsou používány pro separaci partnera fúze od BLAT. V kvasince *Pichia pastoris* se fúzovaný protein štěpí po sekreci proteinu buňky, tak že původní BLAT může být získán neporušený z kultivačního média.

V jednom provedení se předložený vynález týká a v zásadě čistého proteinu, který má sekvenci aminokyselin, kterou je SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 nebo SEQ ID NO: 7.

V jiném provedení se předložený vynález týká izolované nukleové kyseliny, kódující fúzovaný protein nebo rekombinantní protein nebo peptid zahrnující beta lipotropin.

V dalším provedení se předložený vynález týká alespoň jedné izolované nukleové kyseliny kódující protein nebo peptid

podle předloženého vynálezu.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká vektoru zahrnujícího izolovanou nukleovou kyselinu podle předloženého vynálezu.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká vektoru zahrnujícího izolovanou nukleovou kyselinu podle předloženého vynálezu, přičemž uvedená izolovaná nukleová kyselina je operativně vázána k sekvenci promotoru.

V dalším provedení se předložený vynález týká hostitelské buňky, obsahující vektor podle předloženého vynálezu.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká způsobu konstrukce rekombinantní hostitelské buňky, která má schopnost exprimovat beta-lipotropin, přičemž uvedený způsob zahrnuje vložení vektoru do uvedené hostitelské buňky libovolným způsobem.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu exprese beta-lipotropinu v rekombinantní hostitelské buňce, kde uvedený způsob zahrnuje kultivaci uvedené rekombinantní hostitelské buňky za podmínek vhodných pro expresi genu.

V dalším provedení se předložený vynález týká farmaceutického přípravku, obsahujícího jako účinnou složku beta-lipotropin, jeho analog nebo funkční fragment spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, excipienty nebo ředidly.

V dalším provedení se předložený vynález týká farmaceutického přípravku, ve kterém uvedený beta-lipotropin, jeho analog nebo funkční fragment, je lidský beta-lipotropin.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu, pro použití při léčení diabetu nebo komplikací s ním spojených.

V dalším provedení se předložený vynález týká fragmentů BLAT, které mají inzulinotropní aktivitu.

V dalším provedení se předložený vynález týká peptidu, který má inzulinotropní aktivitu a je zvolen ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 13.

V dalším provedení se předložený vynález týká peptidu, který má inzulinotropní aktivitu a je zvolen ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 14 až SEQ ID NO: 25.

V dalším provedení se předložený vynález týká funkčního analogu beta-lipotropinového peptidu, který zde byl popsán.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu léčení diabetu, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství alespoň jednoho peptidu, zvoleného ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 25.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu léčení diabetu, který zahrnuje podávání terapeuticky účinné množství peptidu, zvoleného ze souboru sestávajícího z

SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 13.

V dalším provedení se předložený vynález týká farmaceutického přípravku, obsahujícího jako účinnou složku alespoň jeden peptid, který má inzulinotropní aktivitu a je zvolen ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 25.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu léčení diabetu u savce, v to počítaje člověka, který zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství beta-lipotropinu, jeho analog nebo funkčního fragmentu.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká a způsobu snižování hladiny glukózy v krvi u savce podáváním účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká způsobu léčení hyperglykémie u savce, který má potřebu takového léčení, podáváním účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu léčení hyperinzulinemie u savce podáváním účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu zvyšování citlivosti na inzulín u savce podáváním účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

V dalším provedení se předložený vynález způsobu syntézy v pevné fázi pro syntézu beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

V dalším provedení se předložený vynález týká způsobu přípravy beta-lipotropinu, který zahrnuje kroky:

- a. transformace vhodného hostitele vektorem exprese, kde uvedený vektor kóduje beta-lipotropin, jeho analog nebo funkční fragment;
- b. kultivace uvedeného transformovaného hostitele za podmínek, které umožňují expresi uvedeného beta-lipotropinu;
- c. čištění libovolného beta-lipotropinu libovolným vhodným způsobem.

V ještě dalším provedení se předložený vynález týká testu na beta-lipotropinovou aktivitu, který zahrnuje následující kroky:

- a) podávání testovaného proteinu savci, který vykazuje necitlivost na inzulin a zvýšenou hladinu glukózy v krvi; a
- b) testování hladiny glukózy a inzulinu v krvi po provedení kroku (a).

Předložený vynález se také týká způsobu léčení diabetu typu I nebo typu II a komplikací s ním spojených u savců podáváním farmaceuticky účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

Podrobný popis předloženého vynálezu

Definice

Výraz "analog" nebo "funkční analog" se vztahuje k modifikované formě BLAT, ve které byla provedena alespoň jedna substituce aminokyseliny tak, že uvedený analog si udržuje v zásadě stejnou biologickou aktivitu jako nemodifikovaný BLAT *in vivo* a/nebo *in vitro*.

Výraz "bid" nebo "b.i.d." se vztahuje k dávce BLAT nebo další sloučeniny, která je podávána dvakrát denně.

"BLAT" znamená beta-lipotropin. Lidský BLAT zahrnuje 89 aminokyselinových zbytků (SEQ ID NO: 8). BLAT protein byl určen v množství organismů a sekvence aminokyselin byla určena v množství organismů, v to počítaje člověka, myš, ovci a prase (Li & Chung, Nature, 260, 622-24 (1976); a slona (Li a kol. Int. J. Pept. Prot. Res. 32, 573-78, 1988); stejně jako další savce; všechny uvedené práce jsou zde zahrnuty jako reference.

Výraz "beta-lipoproteinový fúzovaný protein" nebo "BLAT fúzovaný protein" se vztahuje k třídě hybridních rekombinantních proteinových molekul, které obsahují BLAT, které jsou produkovány v E. coli nebo dalších typech buněk a ze kterých může být BLAT nebo fragment BLAT vytvořen specifickou proteolýzou nebo chemickým štěpením. Příklady BLAT fúzovaných proteinů zahrnují proteiny, které jsou v předložené přihlášce vynálezu specifikovány jako SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Výrazy "komplementární" nebo "komplementarita", jak jsou zde užívány, se vztahují ke schopnosti purinových a pyrimidinových nukleotidů asociovat pomocí vodíkových vazeb a vytvářet dvojitěvláknové molekuly nukleových kyselin. Následující páry bází se týkají komplementarity: guanin a cytosin; adenin a thymin; a adenin a uracil. Jak je zde užíván, výraz "komplementární" znamená, že výše uvedený vztah se týká v zásadě všech párů bází, které jsou obsaženy ve dvou jednovláknových molekulách nukleových kyselin podél celé délky uvedených molekul. "Částečně komplementární" se vztahuje k výše uvedenému vztahu v případě, kdy jedna ze dvou jednovláknových molekul nukleové kyseliny je délkově kratší než druhá, takže zbývající část jedné z molekul zůstává jednovláknová.

Výraz "komplikace" nebo "komplikace s ním spojené" jak je zde užíván, se vztahuje k stavům, syndromům, přidruženým onemocněním nebo onemocněním, chorobám a podobně, které souvisejí s jedním nebo více onemocněními nebo syndromy nebo stavy, souvisejícími s defektem metabolismu inzulínu nebo defektem metabolismu uhlovodíků, například defektem metabolismu glukózy, mezi které neomezujícím způsobem patří diabetes typu 1 a typu 2. Příklady komplikací mohou zahrnovat ketoacidózu, kóma, retinopatii, diabetickou mikroangiopatii, aterosklerózu, infarkt myokardu, mrtvici, gangrénu, hypertriglyceridemii, hypercholesterolemii, kardiomyopatii, dermopatii, syndrom diabetické nohy, nefropatii, infekce močových cest, papilární nekrózu, katarakty, diabetickou gastroenteropatii, zácpu a periferní vaskulární onemocnění.

"Konzervativní substituce" nebo "konservativní substituce aminokyselin" se vztahuje k nahrazení jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v proteinu nebo peptidu způsobem uvedeným v Tabulce 1.

"Jeho fragment" se vztahuje k fragmentu, části nebo podoblasti peptidu nebo nukleové kyseliny, tak že fragment obsahuje 2 (dvě) nebo více po sobě následujících aminokyselin nebo alternativně asi 5 až 14 aminokyselin nebo více; nebo 10 nebo více nukleotidů, které po sobě následují ve výchozí molekule peptidu nebo nukleové kyseliny. Fragment si může nebo nemusí uchovávat biologickou aktivitu. Například fragment v předložené přihlášce popsaného peptidu může být použit jako antigen pro vytvoření specifické protilátky proti základnímu peptidu, ze kterého je fragment odvozen. Pokud se mluví o molekule nukleové kyseliny, "její fragment" se vztahuje k 10 nebo více po sobě následujících nukleotidech, odvozených ze základní nukleové kyseliny a také, v důsledku genetického kódu, ke komplementární sekvenci. Například jestliže fragment představuje sekvenci 5'-AGCTAG-3', potom "její fragment" bude také zahrnovat komplementární sekvenci, 3'-TCGATC-5'.

Výraz "fúzovaný protein" označuje hybridní molekulu proteinu, která se nevyskytuje v přírodě a zahrnuje translačně fúzovaný nebo enzymaticky fúzovaný protein, ve kterém dva nebo více proteiny nebo jejich fragmenty jsou kovalentně vázány v jediném polypeptidovém řetězci.

"Fúzovaný partner" se vztahuje k sekvenci aminokyselin v

BLAT fúzovaném proteínu, kde uvedená sekvence není odvozena od BLAT, například sekvence identifikovaná v předložené přihlášce jako SEQ ID NO: 6.

"Funkční fragment" nebo "funkčně ekvivalentní fragment", jak je zde užíván, se vztahuje k oblasti nebo fragmentu BLAT o plné délce, který si uchovává biologickou aktivitu, to jest schopnost zvyšovat účinek inzulínu *in vivo* a/nebo *in vitro*; a/nebo schopnost podporovat snižování hladiny glukózy v krvi *in vivo* nebo zvyšovat příjem glukózy buňkami nebo tkání *in vitro*. Funkční fragmenty mohou také přinášet biologickou aktivitu, manifestovanou BLAT o plné délce, *in vivo* a/nebo *in vitro*, to jest schopnost podporovat příjem glukózy a/nebo zlepšovat účinky inzulínu a/nebo zvyšovat citlivost na inzulín. Funkční fragmenty mohou být vytvářeny klonovacími technologiemi nebo prostředky chemické syntézy nebo chemickým nebo enzymatickým štěpením.

"Hostitelská buňka" se vztahuje k libovolné eukaryotní nebo prokaryotní buňce, která je vhodná pro propagaci a/nebo expresi klonovaného genu, obsaženého ve vektoru, který byl vložen do uvedené hostitelské buňky například transformací nebo transfekcí nebo podobnými způsoby.

Výraz "homolog" nebo "homologní" popisuje vztah mezi různými molekulami nukleových kyselin nebo sekvencemi aminokyselin, kdy se uvedené sekvence nebo molekuly porovnávají na základě identity nebo částečné identity a/nebo podobnosti v jednom nebo více blocích nebo oblastech sekvence v uvedených molekulách.

Výraz "hybridizace", jak je zde užíván, se vztahuje k procesu, ve kterém jednovláknová molekula nukleové kyseliny se spojuje z komplementárním vláknem prostřednictvím párování nukleotidových bází. "Selektivní hybridizace" se vztahuje k hybridizaci podmínek vysoké stringence (přísnosti řízení hybridizace). Stupeň hybridizace závisí například na stupni homologie, stringenci hybridizace a délce hybridizovaných vláken.

Výraz "inzulinotropní" se vztahuje k aktivitě posilování inzulínu, například reverzí nebo ulehčením necitlivosti na inzulín.

"Izolovaná nukleová kyselina" se vztahuje k libovolné sekvenci RNA nebo DNA, ať již konstruované nebo syntetizované, která je místně odlišná od svého přirozeného místa výskytu, například v buňce.

Výraz "sonda nukleové kyseliny" nebo "sonda", jak je zde užíván, se vztahuje k označené nukleové kyselině, která hybridizuje s jinou nukleovou kyselinou. "Sonda nukleové kyseliny" znamená jednovláknovou sekvenci nukleové kyseliny, která se kombinuje s komplementární nebo částečně komplementární jednovláknovou cílovou sekvencí nukleové kyseliny pro vytvoření dvouvláknové molekuly. Sonda nukleové kyseliny může být oligonukleotid nebo nukleotidový polymer. Sonda obvykle obsahuje detekovatelnou část, která může být vázána ke konci nebo koncům sondy nebo se nacházet uvnitř sekvence sondy.

Výraz "plasmid" se vztahuje k extrachromosomálnímu

genetickému prvku. Plasmidy popsané v předložené přihlášce jsou komerčně dostupné, veřejně dostupné ne neomezených základnách nebo mohou být konstruovány ze snadno dostupných plasmidů postupem podle publikovaných procedur.

"Primer" je fragment nukleové kyseliny, který funguje jako iniciační substrát pro enzymatickou nebo syntetickou elongaci například molekuly nukleové kyseliny.

Výraz "promotor" se vztahuje k sekvenci nukleové kyseliny, která řídí transkripci například DNA na RNA. Indukovatelný promotor je takový, který je možno regulovat signály z okolního prostředí jako jsou například zdroj uhlíku, teplo nebo ionty kovů. Konstitutivní promotor obecně operuje na konstantní úrovni a není regulovatelný.

Výrazy "protein" a "peptid" jsou používány navzájem zaměnitelně a vztahují se ke dvěma nebo více aminokyselinovým zbytkům, které jsou kovalentně vázány peptidovou vazbou. V některých případech tyto výrazy popisují aminokyselinové biopolymery, obsahující více než 10 a až do asi 500 aminokyselinových zbytků, vázaných peptidovou vazbou.

Výraz "rekombinantní DNA klonovací vektor", jak je zde užíván, se vztahuje k libovolnému autonomně se replikujícímu činiteli, v to neomezujícím způsobem počítaje plasmidy a fágy, které obsahují molekulu DNA, do které mohou být nebo byly vloženy jeden nebo více dodatečných segmentů DNA.

Výraz "rekombinantní DNA vektor exprese" nebo "vektor

exprese", jak je zde užíván, se vztahuje k libovolnému rekombinantnímu DNA klonovacímu vektoru, například plasmidu nebo fágu, ve kterém je přítomen promotor a další regulační prvky, čímž je umožněna transkripce vložené DNA, která může kódovat protein.

Výraz "stringence" se vztahuje k hybridizačním podmínkám a znamená přísnost řízení hybridizace. Vysoce stringentní podmínky znevýhodňují nehomologní párování bází. Málo stringentní podmínky mají opačný účinek. Stringence může být změněna například změnou teploty a koncentrace solí.

"Malá (nízká) stringence" představuje podmínky, zahrnující například teplotu okolo 37 °C nebo méně, koncentraci formamidu menší než přibližně 50% a střední až nízkou koncentraci solí (SSC); nebo alternativně teplotu okolo 50 °C nebo menší a střední až vysokou koncentraci solí (SSPE), například 1M NaCl.

"Vysoká stringence" představuje podmínky, zahrnující například teplotu okolo 42 °C nebo méně, koncentraci formamidu menší než přibližně 20% a nízkou koncentraci solí (SSC); nebo alternativně teplotu okolo 65 °C nebo menší nízkou koncentraci solí (SSPE). Vysoce stringentní podmínky například zahrnují hybridizaci v 0,5 M NaHPO₄, 7% dodecylsulfátu sodného (SDS), 1 mM EDTA při teplotě 65 °C (Ausubel, F.M. a kol. Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, 1989; Green Inc. New York, v 2.10.3).

"SSC" představuje hybridizační a promývací roztok. Zásobní roztok 20x SSC obsahuje 3M chlorid sodný, 0,3M citrát sodný,

pH 7,0.

"SSPE" představuje hybridizační a promývací roztok. 1x SSPE roztok obsahuje 180 mM NaCl, 9 mM Na₂HPO₄, 0,9 mM NaH₂PO₄ a 1 mM EDTA, pH 7,4.

"V zásadě čistý" s odvoláním na protein znamená, že uvedený protein je oddělen od dalších buněčných a nebuněčných složek, v to počítaje molekuly jiných proteinů.

V zásadě čistý přípravek je alespoň na 85% čistý; a výhodně na alespoň 95% čistý. "V zásadě čistý" protein může být připraven libovolným z mnoha vhodných způsobů, které zahrnují například IMAC proteinový purifikační způsob (U.S. patent č. 4,569,794), který je zde uveden jako reference.

Výraz "léčení", jak je zde užíván, popisuje zacházení a péči o pacienta s cílem potlačit onemocnění, stav nebo poruchu a zahrnuje podávání proteinu podle předloženého vynálezu pro prevenci vypuknutí symptomů nebo komplikací, úlevu symptomů nebo komplikací nebo eliminaci onemocnění, stavu nebo poruchy.

Všechny reference citované v tomto popisu vynálezu jsou zde zahrnuty jako reference.

Beta-lipotropin byl izolován v roce 1964 z ovčí hypofýzy a jeho primární struktura byla popsána následujícího roku (Li a kol., Nature, 208, 1093, 1965). Od té doby byly popsány primární sekvence BLAT ovce, krávy, myši, vepře, morčete, krysy, slona a člověka. (Viz například Lohmar a Li, Biochim.

Biophys. Acta, 147, 381, 1967; Li a Chung, Nature, 260, 622, 1976; Drouin a Goodman, Nature, 288, 619, 1980; Li a kol. Int. J. Pept. Prot. Res. 32, 573-78, 1988; Blake a Li, Proc. Nat. Acad. Sci. 80, 1556-1559, 1983; Takahashi a kol. FEBS Lett. 135, 97-102, 1981; všechny tyto citace jsou zde zahrnuty jako reference). Data o sekvenci ukazují, že karboxy konec BLAT je vysoce konzervován napříč druhy. Naopak existují značné rozdíly v sekvenci na amino konci molekul BLAT u různých druhů.

Předložený vynález se dále týká BLAT fúzovaných proteinů, v to počítaje lidský BLAT (SEQ ID NO: 8) nebo BLAT dalších druhů nebo jeho funkční fragmenty. Příklady BLAT fúzovaných proteinů jsou popsány jako SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.

Funkční fragmenty BLAT jsou výhodně identifikovány jako fragmenty BLAT, které vykazují biologickou aktivitu, například schopnost zlepšovat diabetické symptomy, pokud jsou podávány savci, který má jejich potřebu, nebo snižovat hladiny inzulínu v séru a/nebo zlepšovat citlivost na inzulín a/nebo snižovat hladinu glukózy v krvi, a/nebo stimulovat příjem glukózy v adipozní nebo svalové tkáni, *in vivo* nebo *in vitro* nebo v adipocytech *in vitro*. Funkční fragmenty BLAT zahrnují libovolné fragmenty, které si uchovávají biologickou aktivitu a které obsahují alespoň dva (2) nebo více aminokyselinových zbytků, které jsou v některých případech vedle sebe v BLAT proteinu. Výhodné fragmenty obsahují souvislé oblasti BLAT které se nacházejí částečně nebo úplně mimo oblast zbytků 59 až 89 lidského BLAT (SEQ ID NO: 8) nebo ekvivalentní oblasti jiného než

lidského BLAT (t.j. oblasti kódující β -endorfin).

Příklady funkčních fragmentů lidského BLAT jsou v předložené přihlášce popsány jako SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 25. Výhodné fragmenty jsou v předložené přihlášce označeny jako SEQ ID NO: 9 až SEQ ID NO: 13; nejvýhodnější fragmenty jsou v předložené přihlášce označeny jako SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 13. V některých případech mohou funkční fragmenty obsahovat vnitřní delecí původního BLAT, například SEQ ID NO: 13, ve které aminokyselinové zbytky 7 až 23 lidského BLAT jsou vynechány. Funkční fragmenty mohou být vytvářeny chemickou syntézou v pevné fázi a/nebo rekombinantními DNA technikami, které jsou odborníkovi dobře známy. Viz například K. Struhl, "Reverse biochemistry: Methods and applications for synthesizing yeast proteins *in vitro*," Meth. Enzymol. 194, 520-535. Například při jednom způsobu se zahrnutý soubor delečních mutací vloží do nukleové kyseliny kódující BLAT tak, že různá množství oblasti kódující peptid jsou vynechány, buď na amino konci nebo na karboxylovém konci molekuly. Tento způsob může být také použit pro vytvoření vnitřních fragmentů neporušeného proteinu, ve kterých jak karboxylový, tak i amino konec jsou vyjmuty. Vhodné nukleázy pro vytvoření takových delecí zahrnují například Bal31 nebo v případě jednovláknové molekuly nukleové kyseliny nukleázu bobů mung. Pro zjednodušení se předpokládá, že BLAT kódující nukleovou kyselinu je klonována do jednovláknového klonovacího vektoru jako je bakteriofág M13 nebo ekvivalent. Je-li to požadováno, výsledné deleční fragmenty mohou být subklonovány do vhodného vektoru pro propagaci a expresi v libovolné vhodné hostitelské buňce.

Funkční fragmenty BLAT mohou být identifikovány a testovány na biologickou aktivitu použitím libovolného vhodného testu, například schopností peptidového fragmentu stimulovat nebo posilovat citlivost na inzulín a/nebo příjem glukózy buňkami *in vivo* nebo *in vitro*.

Funkční analogy BLAT mohou být vytvořeny delecí, insercí, inverzí a/nebo substitucí jednoho nebo více aminokyselinových zbytků v uvedeném BLAT nebo v libovolném z peptidů popsaných v předložené přihlášce vynálezu. Substituční analogy mohou obecně být vytvořeny syntézou v pevné fázi nebo rekombinantními technikami, ve kterých byly provedeny jednoduché nebo vícenásobné konzervativní aminokyselinové substituce, například podle Tabulky 1. Obecně, v případě vícenásobných substitucí, je výhodné aby bylo změněno méně než deset zbytků v libovolné dané molekule, nejvýhodněji aby bylo změněno od jednoho do pěti zbytků v libovolné dané molekule tak, aby od 90% do 99% zbytků bylo identických se sekvencí SEQ ID NO: 8; alternativně aby přibližně 95% až 99% zbytků bylo identických se SEQ ID NO: 8 nebo dalším vhodným BLAT pocházejícím od jiného druhu.

Například analogy lidského BLAT (SEQ ID NO: 8) obsahující jednoduché nebo vícenásobné aminokyselinové substituce v oblasti mezi aminokyselinovými zbytky 1 až 89, zahrnují substituce, ve kterých:

zbytek v poloze 1 představuje alternativně Glu, Ala, Asp
nebo Gln;

zbytek v poloze 2 představuje alternativně Leu, Ile, Val
nebo Met;

zbytek v poloze 3 představuje alternativně Thr, Ala, Glu,
Ser, Pro nebo Gly;

zbytek v poloze 4 představuje alternativně Gly, Arg, Ala,
Leu, Pro nebo Ser;

zbytek v poloze 5 představuje alternativně Glu, Gln, Asp,
Asn nebo Ala;

zbytek v poloze 6 představuje alternativně Arg, Glu, Leu,
Lys, Gln nebo Ala;

zbytek v poloze 7 představuje alternativně Leu, Pro, Asp,
Val, Ile nebo Met;

zbytek v poloze 8 představuje alternativně Arg, Glu, Ala,
Tyr, Leu, Lys, Pro, Gln nebo Trp;

zbytek v poloze 9 představuje alternativně Glu, Ala, Pro,
Asp, Asn nebo Gln;

zbytek v poloze 10 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Asp;

zbytek v poloze 11 představuje alternativně Asp, Arg, Pro,
Asn, Gln, Ala nebo Glu;

zbytek v poloze 12 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Met;

zbytek v poloze 13 představuje alternativně Pro, Glu, Gly
nebo Val;

zbytek v poloze 14 představuje alternativně Asp, Glu, Asn,
Gln nebo Gly;

zbytek v poloze 15 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Glu;

zbytek v poloze 16 představuje alternativně pro, Gln, Leu,

Gly nebo Glu;

zbytek v poloze 17 představuje alternativně Ala, Asp, Ser nebo Gly;

zbytek v poloze 18 představuje alternativně Asp, Glu, Gln nebo Asn;

zbytek v poloze 19 představuje alternativně Asp, Glu, Asn nebo Gln;

zbytek v poloze 20 představuje alternativně Gly, Ser nebo Ala;

zbytek v poloze 21 představuje alternativně Ala, Gly, Ser nebo Phe;

zbytek v poloze 22 představuje alternativně Gly, Ala, Ser nebo Lys;

zbytek v poloze 23 představuje alternativně Ala, Phe, Thr, Gly, Ser nebo Leu;

zbytek v poloze 24 představuje alternativně Gln, Arg, Asp, Asn, Leu nebo Val;

zbytek v poloze 25 představuje alternativně Ala, Leu, Asp, Ile, Gly, Ser nebo Thr;

zbytek v poloze 26 představuje alternativně Asp, Glu, Gly, Asn, Gln nebo Lys;

zbytek v poloze 27 představuje alternativně Leu, Ala, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 28 představuje alternativně Glu, Gln, Asn nebo Asp;

zbytek v poloze 29 představuje alternativně His, Asn, Tyr, Ala, Gln nebo Glu;

zbytek v poloze 30 představuje alternativně Ser, Gly, Glu, Ala, Leu nebo Asp;

zbytek v poloze 31 představuje alternativně Leu, Ala, Val, Met nebo Ile;

zbytek v poloze 32 představuje alternativně Leu, Ala, Val, Ile, Met nebo Pro;

zbytek v poloze 33 představuje alternativně Val, Ala, Glu, Leu, Ile, Met nebo Arg;

zbytek v poloze 34 představuje alternativně Ala, Ser, Pro, Glu nebo Gly;

zbytek v poloze 35 představuje alternativně Ala, Asp, Gly, Ser nebo Leu;

zbytek v poloze 36 představuje alternativně Glu, Ala, Thr, Leu, Asp, Asn nebo Gln;

zbytek v poloze 37 představuje alternativně Lys, Glu, Thr, Arg, Gln nebo Asp;

zbytek v poloze 38 představuje alternativně Lys, Arg, Gln nebo Glu;

zbytek v poloze 39 představuje alternativně Asp, Ala, Asn, Glu, Gln nebo Lys;

zbytek v poloze 40 představuje alternativně Glu, Ser, Asp, Asn, Gln nebo Gly;

zbytek v poloze 41 představuje alternativně Gly, Ala nebo Ser ;

zbytek v poloze 42 představuje alternativně Pro, Gly, Ser nebo Asn;

zbytek v poloze 43 představuje alternativně Tyr, Phe nebo Trp ;

zbytek v poloze 44 představuje alternativně Arg, Lys, Gln nebo Glu;

zbytek v poloze 45 představuje alternativně Met, Ile, Ser nebo Val;

zbytek v poloze 46 představuje alternativně Glu, Gln, Asp, Asn, His, Arg nebo Gly;

zbytek v poloze; 48 představuje alternativně Tyr nebo Trp;

zbytek v poloze 45 představuje alternativně Arg nebo Lys;
zbytek v poloze 50 představuje alternativně Trp, Tyr nebo Phe;
zbytek v poloze 51 představuje alternativně Gly, Ala, Ser nebo gln;
zbytek v poloze 52 představuje alternativně Ser, Thr, Asn nebo Ala;
zbytek v poloze 53 představuje alternativně Pro nebo Gly;
zbytek v poloze 54 představuje alternativně Pro, Ala, Gly, Arg, Leu nebo Thr;
zbytek v poloze 55 představuje alternativně Lys, Arg, Gln nebo Ala;
zbytek v poloze 56 představuje alternativně Asp, Asn, Glu, Gln, Ala, Gly nebo Ile;
zbytek v poloze 57 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg ;
zbytek v poloze 58 představuje alternativně Arg, Gln nebo Lys ;
zbytek v poloze 59 představuje alternativně Tyr, Phe nebo Trp ;
zbytek v poloze 60 představuje alternativně Gly, Ala nebo Ser;
zbytek v poloze 61 představuje alternativně Gly, Ala nebo Ser;
zbytek v poloze 62 představuje alternativně Phe, Tyr nebo Trp;
zbytek v poloze 63 představuje alternativně Met, Leu, Ile nebo Val;
zbytek v poloze 64 představuje alternativně Thr, Ala, Ser nebo Lys;
zbytek v poloze 65 představuje alternativně Ser, Ala, Thr

nebo Pro;

zbytek v poloze 66 představuje alternativně Glu, Asp, Asn, Lys nebo Gln;

zbytek v poloze 67 představuje alternativně Lys, Arg nebo Gln;

zbytek v poloze 68 představuje alternativně Ser, Ala, Thr nebo Gly;

zbytek v poloze 69 představuje alternativně Gln, Glu, Asp, Asn, Arg nebo His;

zbytek v poloze 70 představuje alternativně Thr, Ser, Ala nebo Lys;

zbytek v poloze 71 představuje alternativně Pro nebo Gly;

zbytek v poloze 72 představuje alternativně Leu, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 73 představuje alternativně Val, Leu, Ile nebo Met;

zbytek v poloze 74 představuje alternativně Thr, Ala nebo Ser;

zbytek v poloze 75 představuje alternativně Leu, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 76 představuje alternativně Phe, Tyr, Trp nebo Leu;

zbytek v poloze 77 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 78 představuje alternativně Asn, Asp, Glu, Gln nebo His;

zbytek v poloze 79 představuje alternativně Ala, Gly, Ser, Ile nebo Val;

zbytek v poloze 80 představuje alternativně Ile, Leu, Met, Val nebo Thr;

zbytek v poloze 81 představuje alternativně Ile, Met, Val,

Thr nebo Leu;

zbytek v poloze 82 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg ;

zbytek v poloze 83 představuje alternativně Asn, Asp, Glu, Gln nebo Ser;

zbytek v poloze 84 představuje alternativně Ala, Val, Ser, Gly nebo Glu;

zbytek v poloze 85 představuje alternativně Tyr, Phe, Trp nebo His;

zbytek v poloze 86 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 87 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 88 představuje alternativně Gly, Ala nebo Ser;

zbytek v poloze 89 představuje alternativně Glu, Gln, Asp, Asn nebo His.

Dodatečné specifické substituce v lidském BLAT (SEQ ID NO: 8) zahrnují jednoduché nebo vícenásobné substituce v SEQ ID NO: 8, kde:

zbytek v poloze 3 je Glu;

zbytek v poloze 4 je Arg;

zbytek v poloze 6 je Gln;

zbytek v poloze 7 je Pro;

zbytek v poloze 8 je Glu, Ala nebo Pro;

zbytek v poloze 5 je Pro nebo Ala;

zbytek v poloze 11 je Arg nebo Pro;

zbytek v poloze 16 je Leu nebo Gln;

zbytek v poloze 21 je Phe;

zbytek v poloze 23 je Thr, Leu nebo Pro;

zbytek v poloze 24 je Arg nebo Val;
zbytek v poloze 27 je Ala;
zbytek v poloze 29 je Asn, Tyr nebo Ala;
zbytek v poloze 30 je Glu;
zbytek v poloze 31 je Ala;
zbytek v poloze 32 je Ala;
zbytek v poloze 33 je Ala nebo Glu;
zbytek v poloze 34 je Pro nebo Ser;
zbytek v poloze 35 je Asp;
zbytek v poloze 36 je Thr nebo Ala;
zbytek v poloze 37 je Glu;
zbytek v poloze 40 je Ser;
zbytek v poloze 42 je Ser;
zbytek v poloze 44 je Glu;
zbytek v poloze 45 je Val;
zbytek v poloze 52 je Asn;
zbytek v poloze 54 je Ala nebo Arg;
zbytek v poloze 56 je Gly;
zbytek v poloze 84 je Val;
zbytek v poloze 85 je His; a
zbytek v poloze 89 je His.

Tabulka 1

Příklady substitucí aminokyselin

| Původní zbytek | Příklad substituce |
|----------------|--------------------|
| 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 |
| TYR | TRP, PHE |
| VAL | ILE, LEU, MET |
| PRO | GLY |

Tabulka 2

Identifikátory seznamu sekvencí

| SEQ ID NO: | Popis |
|------------|---|
| 1 | Nukleová kyselina kódující Met-Arg-BLT |
| 2 | Aminokyselinová sekvence Met-Arg-BLT |
| 3 | Aminokyselinová sekvence fúzovaného partnera použitého pro vytvoření SEQ ID NO: 5 |
| 4 | Oligonukleotidový linker použitý pro konstrukci BLAT fúze |
| 5 | Aminokyselinová sekvence fúzovaného BLAT |
| 6 | Glutathion-S-transferázový (GST) fúzový partner |
| 7 | GST/BLAT fúzovaný protein |
| 8 | Aminokyselinová sekvence lidského BLAT |
| 9 | Lidský BLAT (1-49) |
| 10 | Lidský BLAT (50-89) |
| 11 | Lidský BLAT (38-67) |
| 12 | Lidský BLAT (38-89) |
| 13 | Lidský BLAT (Δ 7-23) |
| 14 | Lidský BLAT (1-14) |
| 15 | Lidský BLAT (8-21) |
| 16 | Lidský BLAT (15-28) |
| 17 | Lidský BLAT (22-35) |
| 18 | Lidský BLAT (29-42) |
| 19 | Lidský BLAT (36-49) |
| 20 | Lidský BLAT (43-56) |
| 21 | Lidský BLAT (50-63) |
| 22 | Lidský BLAT (57-70) |
| 23 | Lidský BLAT (64-77) |
| 24 | Lidský BLAT (71-84) |

- 25 Lidský BLAT (78-89)
- 26 BLAT analog (1:Glu-Ala)
- 27 BLAT analog (3:Thr-Ser)
- 28 BLAT analog (5:Gln-Glu)
- 29 BLAT analog (7:Leu-Asp)
- 30 BLAT analog (10:Gly-Ala)
- 31 BLAT analog (15:Gly-Glu)
- 32 BLAT analog (17:Ala-Gly)
- 33 BLAT analog (23:Ala-Phe)
- 34 BLAT analog (30:Ser-Glu)
- 35 BLAT analog (42:Pro-ser)

Procedury izolace genů

Odborníkovi v oboru je zřejmé, že nukleová kyselina kódující BLAT nebo fúzovaný BLAT může být získána množstvím rekombinantních DNA technik zahrnujících například polymerázovou řetězovou reakční (PCR) amplifikaci nebo *de novo* DNA syntézu. (Viz například, T. Maniatis a kol. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Ed. Chap. 14 (1989)).

Například oligonukleotidové primery cílené na 3' a 5' konce SEQ ID NO: 1 mohou být použity pro PCR amplifikaci Met-Arg-BLT. Viz například *PCR Protocols: A Guide to Method and Application*, Ed. M. Innis a kol., Academic Press (1990). PCR amplifikace zahrnuje templátovou DNA, vhodné enzymy, primery a pufry, a je výhodně prováděna v přístroji DNA Thermal Cykler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT). Pozitivní výsledek je určen detekcí DNA fragmentů vhodné velikosti (273 párů bází) pomocí agarózové gelové elektroforézy.

Způsoby vytváření proteinů

Jedno provedení předloženého vynálezu se týká použití BLAT proteinu jako farmaceutické sloučeniny.

Odborníkovi v oboru je zřejmé, že proteiny a jejich fragmenty nebo funkční fragmenty podle předloženého vynálezu mohou být syntetizovány množstvím různých způsobů jako jsou chemické způsoby dobře známé v oboru, v to počítaje syntézu peptidů v pevné fázi nebo rekombinantní způsoby. Oba typy metod jsou popsány v U.S. patentu 4,617,149, který je zahrnut jako reference.

Způsoby chemické syntézy proteinů v pevné fázi jsou dobře známy v oboru a mohou být nalezeny v obecných učebnicích oboru. Viz například H. Dugas a C. Penney, *Bioorganic Chemistry* (1981) Springer-Verlag, New York, 54-92. Například peptidy mohou být syntetizovány způsobem v pevné fázi použitím peptidového syntetizátoru Applied Biosystems 430A (Applied Biosystems, Foster City, CA) a syntetickými cykly dodávanými společnostmi Applied Biosystems.

Sekvenční t-butoxykarbonylová chemie používající dvojité kopulované protokoly se aplikuje na výchozí p-methyl benzhydryl aminové pryskyřice pro získání C-terminálních karboxamidů. Pro získání C-terminálních kyselin se použije odpovídající pyridine-2-aldoxim methjodidová pryskyřice. Asparagin, glutamin, a arginin se kopulují použitím předem vytvořených hydroxybenzotriazolových esterů. Po ukončení syntézy mohou být peptidy zbaveny ochrany a odštěpen od

pryskyřice bezvodým fluorovodíkem, obsahujícím 10% meta-kresol. Odštěpení ochranné skupiny nebo skupin postranních řetězců a odštěpení peptidu od pryskyřice se provádí při teplotě 0 °C nebo nižší, výhodně -20 °C po dobu třiceti minut následovaných třiceti minutami při teplotě 0 °C.

Obecně syntéza peptidu sestává z posloupnosti následujících kroků. Nejprve se aminokyselina s chráněnou α -amino skupinou (a funkční skupinou postranního řetězce, je-li to nutné) aktivuje pro vytvoření reaktivního esteru. Tato aktivovaná aminokyselina se váže na inertní pevný nosič prostřednictvím této aktivované esterové skupiny a vázaná aminokyselina se důkladně promývá. Po ukončení tohoto kroku se druhá chráněná aminokyselina aktivuje na ester v oddělené reakci. α -amino skupina první aminokyselina se zbaví ochrany, čímž se získá reaktivní amin a druhá aktivovaná aminokyselina se s ní nechá reagovat pro vytvoření dipeptidu na pevném nosiči. Sekvenční opakování těchto kroků vede k peptidu vzrůstající délky. Po ukončení syntézy se peptid odstraní od pevného nosiče a funkční skupiny postranních řetězců se zbaví ochrany zpracováním peptidu silnou kyselinou. Peptid se potom oddělí od pevného nosiče filtrací, precipituje s organickým rozpouštědlem a čistí množstvím technik, které jsou známy z oboru.

V konkrétním případě je ochrannou skupinou α -amino skupiny 9-fluoroenylmethylkarbonyl (Fmoc). Ochranné skupiny postranních řetězců jsou: Boc (pro zbytky Lys a Trp), Trt (pro Asn, His, Gln), tBu (pro Ser, Thr, Tyr), OtBu (pro Asp, Glu) a Pmc (pro Arg). Aktivní estery se vytvářejí pomocí 2-(1H-benzo-triazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium

hexafluorofosfátu (HBTU).

Ochranná skupina Fmoc skupiny α -amino se odstraní zpracováním pevné fáze piperidinem. Za těchto podmínek se Fmoc skupina snadno odstraní, zatímco vazba k pevné fázi a ochranné skupiny postranních řetězců nejsou ovlivněny. Chráněná aminokyselina, která má být přidána k vytvářenému peptidovému řetězci se aktivuje pomocí HBTU.

Syntéza lidského BLAT přináší několik specifických problémů. Předně sekvence peptidu obsahuje ser-pro-pro tripeptidový segment. Standardní kopulační chemické postupy vedou k sérii delečních chyb při syntéze. Takové delece se minimalizují dvojitou kopulací zbytků pro. Ve výhodném provedení se syntéza provádí dvojitou kopulací zbytků Pro a Ser.

Navíc, po ukončení kopulačního kroku se veškerý nezreagovaný nechráněný peptid blokuje acetanhydridem pro zabránění prodlužování řetězce delečního peptidu.

Za druhé, lidský peptid obsahuje 3 asp-gly dipeptidové sekvence. Tyto sekvence jsou náchylné k vytváření cyklického iminu, dokonce i když jsou postranní řetězce asp chráněny. Tyto cyklické iminy potom mohou reagovat s piperidinem v deprotekcčním kroku za vytvoření piperidinem modifikovaného peptidu. Tato cyklizace byla eliminována použitím N-a-Hmb ochrany každého glycinového zbytku, který předchází zbytek asp. Viz například Qubbell a kol., J. Chem. Soc. Chem. Commun. 2343, 1994, zahrnutý zde jako reference. Dva z asp-gly dipeptidů předchází zbytek pro. V důsledku této vlastnosti sekvence a nižší reaktivity hmb chráněných

aminokyselin, je každý z nich vícenásobně kopulován a potom provedena čepičková úprava acetanhydridem. Ve výhodném provedení jsou dvojnásobně kopulovány.

Ve výhodném způsobu se peptid syntetizuje v jednom kroku použitím Fmoc. Syntéza BLAT je komplikována přítomností několika asp-gly dipeptidových sekvencí v N-terminální části molekuly. Bylo pozorováno, že aspartylové postranní řetězce v asp-gly dipeptidové sekvenci podstupují bázi katalyzovanou cyklizaci a následnou adici piperidinem během Fmoc syntézy. Tato reakce se eliminuje použitím Fmoc-(FmocHmb)-glycinu v každé asp-gly sekvenci během syntézy. Ochrana glycylového amidu skupinou Hmb inhibuje cyklizaci aspartylového postranního řetězce. Po provedení štěpení, zbavení ochrany a čištění pomocí HPLC s obrácenými fázemi může být peptid analyzován elektrosprejovou hmotovou spektrometrií. Hlavní součástí, pozorovanou při této syntéze BLAT je peptid plné délky, který má očekávanou hmotnost. Použití tohoto způsobu dovoluje produkci množství čistého proteinu, které přesahuje 100 mg z jednoho běhu v 0,1 mmolové škále.

Proteiny podle předloženého vynálezu také mohou být vytvářeny rekombinantními DNA způsoby. Exprese klonované nukleové kyseliny kódující BLAT nebo fúzovaný BLAT (například SEQ ID NO: 1) může být prováděna v množství vhodných hostitelských buněk, dobře známých odborníkům v oboru. Pro tento účel se BLAT kódující nukleová kyselina vloží do hostitelské buňky libovolným z řady způsobů, dobře známých odborníkům v oboru. I když chromosomová integrace spadá do rozsahu předmětu předloženého vynálezu, je výhodné, aby sekvence byla klonována do vhodného extrachromosomálně

udržovaného vektoru exprese tak, že kódující oblast BLAT genu je operativně vázána ke konstitučnímu nebo indukovatelnému promotoru.

Základní kroky rekombinantní produkce BLAT proteinu jsou:

- a) konstrukce přírodní, syntetické nebo semi-syntetické DNA, kódující BLAT nebo jeho fúzovaný protein;
- b) integrace uvedené DNA do vektor exprese způsobem umožňujícím expresi uvedeného proteinu;
- c) transformace nebo jiný způsob vložení vektoru do vhodné eukaryotní nebo prokaryotní hostitelské buňky, představující rekombinantní hostitelskou buňku,
- d) kultivace uvedené rekombinantní hostitelské buňky způsobem, vhodným pro expresi uvedeného proteinu; a
- e) získání a čištění proteinu libovolným vhodným způsobem.

Exprese rekombinantního BLAT fúzovaného proteinu v prokaryotních a eukaryotních hostitelských buňkách

Lidský beta-lipotropin (BLAT) je hormon, obsahující 89 aminokyselin, který je produkován hypofýze ve formě prekurzorového proteinu, který podstupuje post-translační zpracování pro vytvoření několika biologicky aktivních hormonů včetně BLAT. Jelikož BLAT je malý a obsahuje proteolyticky citlivá místa, byl tento protein přihlašovatelé nejprve vytvořen pomocí chemické syntézy. Tento způsob však není vhodný pro vytváření velkého množství látky. V tomto předloženém vynálezu je popisován způsob, kterým BLAT může být produkován v bakteriálním nebo fungálním hostiteli exprese ve formě fúzovaných proteinů.

Tyto fúzované proteiny jsou chráněny proti proteolytické degradaci a dovolují získání neporušeného BLAT způsobem popsanými dále.

V *E. coli* se BLAT produkuje jako fúzovaný protein, který může být získán z buněčných lyzátů v přítomnosti velkého množství soli obvyklými purifikačními způsoby. Fúzovaný protein obsahuje rozpoznávací místo pro specifické proteázy, které jsou použity pro separaci fúzového partnera od BLAT. V *Pichia pastoris* se fúzovaný protein štěpí po sekreci z buňky takovým způsobem, že přirozený BLAT může být detekován a získán neporušený z kultivačního média.

Tento způsob přináší způsob produkce BLAT. Na rozdíl od chemické syntézy zde popsaný způsob může být prováděn ve velkém měřítku pro získávání velkých množství BLAT.

Prokaryota mohou být použita pro produkci rekombinantního BLAT proteinu. Například *Escherichia coli* K12, kmen 294 (ATCC No. 31446) je obzvláště užitečný pro expresi cizích proteinů v prokaryotní buňce. Jako hostitelská buňky pro klonování a expresi rekombinantních proteinů podle předloženého vynálezu mohou také být použity další kmeny *E. coli*, bacily jako je *Bacillus subtilis*, enterobakterie jako je *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans*, různé druhy Pseudomonád a další bakterie, jako jsou *Streptomyces*.

Promotorové sekvence, vhodné pro provádění exprese genů v prokaryotech zahrnují b-laktamázu [například vektor pGX2907, ATCC 39344, obsahuje gen s replikonem a b-laktamázu], laktózové systémy [Chang a kol., *Nature* (London), 275:615

(1978); Goeddel a kol., Nature (London), 281:544 (1979)], alkalické fosfatázy a tryptofanové (trp) promotorové systémy [vektor pATH1 (ATCC 37695)], které jsou navrženy pro usnadnění exprese otevřeného čtecího rámce jako je trpE fúzovaný protein za řízení trp promotorem. Hybrid promotory jako je tac promotor (isolovatelný z plasmidu pDR540, ATCC-37282) jsou také vhodné, stejně tak jako T7 promotory. Ještě další bakteriální promotory, jejichž nukleotidové sekvence jsou obecně známy, mohou být ligovány na DNA kódující protein podle předloženého vynálezu, používajíce spojovníky (linker) nebo adaptéry pro vytvoření libovolných restričních míst. Promotory pro použití v bakteriálních systémech také mohou obsahovat Shine-Dalgarno sekvence operativně vázané k DNA kódující požadované polypeptidy. Tyto příklady jsou ilustrativní a nikoli omezující.

Proteiny podle předloženého vynálezu mohou být syntetizovány buď přímou expresí nebo jako fúzované proteiny, ze kterých fúzový partner může být odstraněn enzymatickým nebo chemickým štěpením. V principu se předložený vynález týká libovolného fúzovaného systému, který může být exprimován v bakteriálním nebo fungálním hostiteli. V jednom provedení vhodného fúzovaného systému se rozpoznávací místo umístí mezi BLAT a fúzového partnera, kdy například se fúzový partner umístí na amino terminální konec BLAT. Vhodné místo může být rozpoznávací sekvence pro proteázu nebo místo, které je náchylné chemickému štěpení.

Příklady vhodných bakteriálních fúzových partnerů zahrnují glutathion-S-transferázu, maltózové vazebné proteiny, prokarboxypeptidázu, kalmodulinové vazebné proteiny nebo

libovolnou sekvenci umístěnou na aminovém konci, která podporuje vysokou úroveň exprese fúzovaného proteinu.

Příklady vhodných proteáz zahrnují faktor Xa, thrombin a enterokinázu. Činidla pro chemické štěpení zahrnují kyanogenbromid, kyselinu a podobně.

Příklady fúzových partnerů užitečných ve fungálních systémech zahrnují alfa párovací faktor, propeptid, lidský sérový albumin a libovolné další sekvence, které podporují expresi a sekreci fúzovaného proteinu a následné štěpení (během sekrece) pro uvolnění přirozeného BLAT do kultivačního média.

V jednom provedení BLAT fúzovaný protein obsahuje přirozenou BLAT sekvenci fúzovanou na dipeptid (například Met-Arg) na amino terminálním konci přirozené BLAT molekuly (například SEQ ID NO: 2). Dipeptidový partner této fúzované molekuly může být uvolněn působením Cathepsinu C a přirozená BLAT molekula může být čištěna technikami známými z oboru jako je například HPLC. V jiném způsobu produkce rekombinantního BLAT fúzovaného proteinu se používá glutathion-S-transferáza (GST) jako fúzový partner pro získání proteinu označeného jako SEQ ID NO: 7, v zásadě způsobem, který popsali Smith a Johnson (Gene, 67, 31, 1988), a který je zde zahrnut jako reference.

Často bylo při vytváření jistých peptidů v rekombinantních systémech pozorováno, že exprese ve formě fúzovaného proteinu prodlužuje dobu života, zvyšuje výtěžek požadovaného peptidu nebo poskytuje výhodné prostředky pro

čištění proteinu. To je obzvláště platné při expresi savčích proteinů prokaryotních hostitelích. Je známa řada peptidáz (například enterokinázy a thrombin), které štěpí polypeptid ve specifických místech nebo provádí natrávení peptidů z amino nebo karboxy konce (například diaminopeptidáza) peptidového řetězce. Kromě toho jisté chemikálie (například kyanogenbromid) štěpí polypeptidový řetězec ve specifických místech. Odborníkovi je zřejmé, že modifikace sekvence aminokyselin (a syntetické nebo semi-syntetické kódovací sekvence pokud jsou použity rekombinantní prostředky) jsou nutné pro vložení místně specifických vnitřních míst štěpení. Viz například P. Carter, "Site Specific Proteolysis of Fusion Protein", Kapitola 13, v Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes, American Chemical Society, Washington, D.C. (1990).

Kromě prokaryotů je možno použít množství systémů exprese založených na obojživelnících, jako jsou žabí oocyty a dále savčí buněčné systémy. Volba konkrétní hostitelské buňky závisí v jistém rozsahu na konkrétním použitém vektoru exprese. Příklady savčích hostitelských buněk vhodných pro použití podle předloženého vynálezu zahrnují například HepG-2 (ATCC HB 8065), CV-1 (ATCC CCL 70), LC-MK₂ (ATCC CCL 7.1), 3T3 (ATCC CCL 92), CHO-K1 (ATCC CCL 61), HeLa (ATCC CCL 2), RPMI8226 (ATCC CCL 155), H4IIEC3 (ATCC CCL 1600), C127I (ATCC CCL 1616), HS-Sultan (ATCC CCL 1484) a BHK-21 (ATCC CCL 10).

Existuje velké množství vhodných vektorů pro transformaci savčích hostitelských buněk. Například vektory typu pSV2 obsahují segmenty genomu opičího viru 40 (simian virus SV40)

požadované pro transkripci a polyadenylaci. Bylo zkonstruováno velké množství plasmidových vektorů typu pSV2, jako jsou pSV2-gpt, pSV2-neo, pSV2-dhfr, pSV2-hyg a pSV2-b-globinve kterých SV40 promotor provádí transkripci vloženého genu. Tyto vektory jsou snadno dostupné ze zdrojů jako je American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 nebo Northern Regional Research Laboratory (NRRD), 1815 N. University Street, Peoria, Illinois, 61604.

Promotory vhodné pro expresi v savčích buňkách zahrnují SV40 pozdní promotor, promotory z eukaryotních genů, jako je například estrogenem indukovatelný kuřecí ovalbuminový gen, interferonové geny, glukokortikoidově indukovatelný gen tyrosin aminotransferázy, genový promotor thymidinkinázy a promotory hlavních genů časných a pozdních adenovirů.

Transfekce savčích buněk vektory může být prováděna množstvím známých způsobů, které zahrnují, aniž by tím byly omezeny, protoplastovou fúzi, koprecipitace fosforečnanem vápenatým, elektroporace a podobně. Viz například Maniatis a kol., supra.

Některé viry také vytvářejí vhodné vektory. Příklady zahrnují adenoviry, viry související s adenoviry, virus vaccinia, herpes viry, bakuloviry a sarkomový Rous virus, jak je popsáno v U.S. patentu 4,775,624, zahrnutém jako reference.

Eukaryotní mikroorganismy jako je kvasinka a další houby jsou také vhodnými hostitelskými buňkami. Kvasinky

Saccharomyces cerevisiae a *Pichia pastoris* jsou výhodné eukaryotní mikroorganismy. Další kvasinky jako je *Xluveromyces lactis* jsou také vhodné. Pro expresi v *Saccharomyces* může být použit například plasmid YRp7 (ATCC-40053). Viz například L. Stinchcomb a kol., *Nature*, 282, 39 (1979); J. Kingsman a kol., *Gene*, 7, 141 (1979); S. Tschemper a kol., *Gene*, 10, 157 (1980). Plasmid YRp7 obsahuje gen TRP1, který přináší volitelný marker pro použití v *trp1* auxotrofním mutantu.

Další provedení předloženého vynálezu zahrnují sekvence izolované nukleové kyseliny, které kódují BLAT nebo jeho fragmenty. Jak je odborníkovi v oboru zřejmé, aminokyselinové sloučeniny podle předloženého vynálezu mohou být kódovány řadou různých sekvencí nukleových kyselin. Jelikož tyto alternativní sekvence nukleových kyselin kódují stejné aminokyselinové sekvence, předložený vynález dále zahrnuje tyto alternativní sekvence nukleových kyselin.

Nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu, kódující BLAT, mohou také být produkovány způsoby chemické syntézy. Syntéza nukleových kyselin je dobře známa z oboru. Viz například E.L. Brown, R. Belagaje, M.J. Ryan a H.G. Khorana, *Methods in Enzymology*, 68:109-151 (1979). Fragmenty DNA sekvence odpovídající BLAT mohou být vytvořeny pomocí konvenčních zařízení pro syntézu DNA jako je DNA syntetizátor Applied Biosystems Model 380A nebo 380B (Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404) použitím fosforamiditových chemických postupů, následovných ligací fragmentů pro rekonstituci celého genu. Alternativně mohou být použity fosfotriesterové

chemické postupy pro syntézu nukleových kyselin podle předloženého vynálezu. (Viz například M.J. Gait, ed., Oligonucleotide Synthesis, A Practical Approach, (1984)).

Vektory

Další předmět předloženého vynálezu se týká rekombinantních DNA klonovacích vektorů exprese obsahujících nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu. Výhodné vektory nukleové kyseliny jsou ty, které obsahují DNA. Nejvýhodnější rekombinantní DNA vektory zahrnují izolovanou DNA sekvenci SEQ ID NO: 1.

Odborníkovi je zřejmé, že volba nejvýhodnějšího klonovacího vektoru nebo vektoru exprese závisí na řadě faktorů zahrnujících dostupnost míst pro restrikční enzymy, typy hostitelských buněk, do kterých má být vektor transfektován nebo transformován, účel transfekce nebo transformace (například, stabilní transformace jako extrachromosomální prvek nebo integrace do hostitelského chromosomu), přítomnost nebo nepřítomnost snadno testovatelných nebo volitelných markerů (například odolnost na antibiotika a metabolické markery jednoho a druhého typu) a počet kopií genu, požadovaných v hostitelské buňce.

Vektory vhodné pro to, aby nesly nukleové kyseliny podle předloženého vynálezu, zahrnují RNA viry, DNA viry, lytické bakteriofágy, lysogenní bakteriofágy, stabilní bakteriofágy, plasmidy, viroidy a podobně. Nejvýhodnější vektory jsou plasmidy.

Odborníkovi je jasné, že při přípravě vektoru exprese je třeba vzít do úvahy mnoho proměnných, například zda použít konstituční nebo indukovatelný promotor. Praktik také chápe, že množství nukleové kyseliny nebo proteinu, které má být produkováno, částečně diktuje volbu systému exprese. Vzhledem k promotorovým sekvencím jsou indukovatelné promotory výhodné, neboť umožňují vysokou úroveň a regulovatelnost exprese operativně vázaného genu. Odborníkovi je zřejmé, že existuje množství vhodných promotorů, které odpovídají množství indukujících faktorů, například zdroji uhlíku, iontům kovů a teple. Další relevantní úvahy týkající se vektoru exprese zahrnují otázku, zda zahrnout sekvence pro řízení lokalizace rekombinantního proteinu. Například sekvence kódující signální peptid předcházející kódující oblastí genu je užitečná pro řízení extracelulárního exportu vzniklého polypeptidu.

Předložený vynález se také týká způsobu konstrukce rekombinantní hostitelské buňky, která je schopna exprimovat BLAT proteiny, přičemž uvedený způsob zahrnuje transformaci nebo jiný způsob vložení do hostitelské buňky týkající se rekombinantního DNA vektoru, který obsahuje izolovanou DNA sekvenci, která kóduje BLAT. Výhodná hostitelská buňka je libovolná buňka, která může poskytnout vysokou úroveň exprese exogenně vloženého genu nebo proteinu. Transformované hostitelské buňky mohou být kultivovány za podmínek dobře známých odborníkům v oboru, tak aby byl exprimován rekombinantní BLAT.

Předložený vynález také podává způsob léčení člověka a

dalších savců postižených onemocněními nebo stavy spojenými s defektem metabolismu inzulínu nebo metabolismu uhlovodíků, jako je například hyperglykémie, hyperinzulínemie, diabetes typu 1 a typu 2 a komplikace s nimi spojené. Způsob zahrnuje podávání organismu, který má jeho potřebu, účinného množství BLAT proteinu nebo peptidu nebo fúzaný protein obsahující BLAT nebo jeho funkční fragment nebo jeho analog v dávce, která je v rozmezí od 1 do 1000 µg/kg tělesné hmotnosti. Při provádění tohoto způsobu může být BLAT podáván v jedné denní dávce, ve více dávkách za den nebo pomocí kontinuálního nebo přerušovaného podávání mechanickou pumpou, která je implantována do těla nebo je k tělu připevněna. Množství BLAT nebo vztahujícího se proteinu nebo peptidu, které má být podáváno, bude určeno ošetřujícím lékařem a závisí na takových faktorech jako je povaha a závažnost stavu, syndromu nebo onemocnění, které mají být léčeny, na věku a celkovém zdravotním stavu pacienta.

Předložený vynález se také týká farmaceutických kompozic, obsahujících jako účinnou složku BLAT protein nebo jeho funkční fragment nebo jeho analog, například ten, který je reprezentovaný sekvencí SEQ ID NO: 8, nebo jeho farmaceuticky přijatelnou netoxickou sůl, ve směsi s farmaceuticky přijatelným pevným nebo tekutým nosičem. Protein, výhodně ve formě farmaceuticky přijatelné soli, může být připraven pro parenterální podávání pro terapeutické nebo profylaktické ošetření při diabetu nebo jeho komplikacích. Sloučenina o sekvenci SEQ ID NO: 8 nebo jiný BLAT nebo jeho fragment může být například smíchána s obvyklými farmaceutickými nosiči a excipienty. Kompozice obsahující BLAT protein obsahují přibližně 0,1 až 90% hmot.

proteinu, výhodně v rozpustné formě a obecně obsahují 10 až 30% proteinu. Dále mohou být proteiny podle vynálezu podávány samotné nebo v kombinaci s dalšími antidiabetickými činidly nebo činidly použitelnými pro léčení diabetu.

Pro intravenózní (IV) použití se BLAT protein, jeho fragment nebo analog podává v obvykle používaných intravenózních kapalinách a podává se infúzí. Takovými tekutinami jsou například fyziologický roztok, Ringerův roztok nebo 5% roztok dextrózy.

Pro intramuskulární podávání může být sterilní přípravek, výhodně ve formě vhodné rozpustné soli BLAT proteinu, například SEQ ID NO: 8, jako je hydrochlorid, rozpuštěn a podáván ve farmaceutickém ředidle jako je apyrogenní voda (destilovaná, fyziologický roztok nebo 5% roztok glukózy).

Vhodná nerozpustná forma sloučeniny může být připravena a podávána jako suspenze ve vodné bázi nebo farmaceuticky přijatelné olejové bázi, například esteru mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, jako je ethyloléát.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady úplněji popisují předložený vynález a použití BLAT pro léčení diabetu. Odborníkovi je zřejmé, že konkrétní reagenty, zařízení a procedury jsou pouze ilustrativní a nejsou zamýšleny jako omezení předloženého vynálezu jakýmkoli způsobem.

Příklad 1

Syntéza v pevné fázi a čištění lidského BLAT proteinu

Lidský BLT peptid (SEQ ID NO: 8) byl syntetizován v jednom běhu použitím Fmoc. Syntéza BLAT je komplikována přítomností několika asp-gly dipeptidových sekvencí v N-terminální části peptidu. Bylo pozorováno, že aspartylový postranní řetězec asp-gly dipeptidových sekvencí podstupuje bázi katalyzovanou cyklizaci a následnou adici s piperidinem v průběhu Fmoc syntézy. Tato reakce je eliminována použitím Fmoc-(FmocHmb)-glycinu v každé asp-gly sekvenci během syntézy. Ochrana glycyramidu skupinou Hmb inhibuje cyklizaci aspartylového postranního řetězce. Po provedení štěpení, deprotektce a čištění pomocí HPLC s obrácenými fázemi, může být peptid analyzován elektrosprejovou hmotovou spektrometrií. Hlavní součástí, pozorovanou při této syntéze BLAT je peptid plné délky, který má očekávanou hmotnost. Použití tohoto způsobu dovoluje produkci množství čistého proteinu, které přesahuje 100 mg z jednoho běhu v 0,1 mmolové škále.

Materiály:

Wangova pryskyřice (1% zesíťovaný polystyren funkcionalizovaný p-benzoxybenzyl alkoholem) s předem naneseným Fmoc-Glu (OtBu) s přibližně 0,6 mmolu aminokyseliny na jeden gram pryskyřice.

N-methylpyrrolidon (NMP), piperidin, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU), 2 M N,N-diisopopylethylamin (DIEA), 1-hydroxybenzotriazol (HOBT), dichloromethan (DCM), dimethylformamid (DMF).

Pryskyřice, na kterou byla předem vázána Fmoc-chráněná C-

terminální aminokyselina (0,1 nebo 0,25 mmolu aminokyselina), byla zvážena a umístěna do reakční komory. Pryskyřice byla předem nabobtnána promýváním DCM. Potom byla pryskyřice promývána NMP. N-terminální Fmoc skupiny byla odstraněna inkubací pryskyřice v 18-22 % roztoku piperidinu v NMP. Po deprotekcí byla pryskyřice extenzivně promývána NMP.

Jeden mol následující Fmoc-chráněné aminokyseliny určené k přidání k peptidu byl rozpuštěn v 2,1 g NMP, 2,0 g 0,45 M HBTU/HOBt reagentu v DMF. Po rozpuštění byla započata aktivace aminokyseliny přidáním 3 ml 2M DIEA v NMP. Aktivovaná aminokyselina byla potom přidána k pryskyřici zbavené ochrany a ponechána kopulovat. Po ukončení kopulace byla pryskyřice extenzivně promývána NMP. Úplný cyklus deprotekcce a kopulace byl potom opakován pro každou následující aminokyselinu.

Specifické cyklové kroky v syntéze byly následující:

| Cykl | Aminokyselina | Kroky |
|------|---------------|---------------------|
| 1 | Glu(OtBu) | úplné promývání |
| 2 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 3 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 4 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 5 | Tyr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 6 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 7 | Asn (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 8 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 9 | Ile | jednoduchá kopulace |
| 10 | Ile | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|-----------|-------------------------------|
| 11 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 12 | Asn(Trt) | jednoduchá kopulace |
| 13 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 14 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 15 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 16 | Thr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 17 | Val | jednoduchá kopulace |
| 18 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 19 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 20 | Thr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 21 | Gln(Trt) | jednoduchá kopulace |
| 22 | Ser(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 23 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 24 | Glu(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 25 | Ser(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 26 | Thr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 27 | Met | jednoduchá kopulace |
| 28 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 29 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 30 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 31 | Tyr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 32 | Arg(Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 33 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 34 | Asp(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 35 | Lys(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 36 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 37 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 38 | Ser(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 39 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 40 | Trp(Boc) | jednoduchá kopulace |
| 41 | Arg(Pmc) | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|----------------|-------------------------------|
| 42 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 43 | His (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 44 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 45 | Met | jednoduchá kopulace |
| 46 | Arg (Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 47 | Tyr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 48 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 49 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 50 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 51 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 52 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 53 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 54 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 55 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 56 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 57 | Val | jednoduchá kopulace |
| 58 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 59 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 60 | Ser (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 61 | His (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 62 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 63 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 64 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 65 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 66 | Gln (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 67 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 68 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 69 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 70 | Gly (Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 71 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 72 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|---------------|-------------------------------|
| 73 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 74 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 75 | Gly(Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 76 | Asp(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 77 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 78 | Gly(Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 79 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 80 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 81 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 82 | Arg (Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 83 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 84 | Arg(Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 85 | Gln(Trt) | jednoduchá kopulace |
| 86 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 87 | Thr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 88 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 89 | Glu(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 90 | | konečná deprotekce |

Pro aminokyseliny, které reagují pomalu nebo neúčinně byly prováděny dvě oddělené kopulační reakce. Veškerý zbylý nezreagovaný peptid byl blokován zpracováním acetanhydridem. Posloupnost kroků pro jednu z takových aminokyselin byla deprotekce, kopulační reakce 1, promývání, kopulační reakce 2, promývání, Ac20 čepička, promývání, deprotekce.

Zkratky:

OtBu: t-butylester,

tBu: t-butyl,

Boc: t-butoxykarbonyl,

Pmc: 2,2,5,7,8-pentamethylchroma-6-sulfonyl,

Hmb: 2-hydroxy-4-methoxybenzyl,
Fmoc: 9-fluorenylmethoxykarbonyl.

Příklad 2

Konstrukce syntetického genu, kódujícího BLAT

Plasmidové konstrukce byly prováděny použitím standardních klonovacích metodologií, jak jsou popsány v Maniatis a kol., *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1982). Enzymy a další reagenty byly získány od společnosti Gibco-BRL, Gaithersburg, MD nebo New England Biolabs, Beverly MA 01915. Způsoby natrávení, identifikace, získávání a čištění různých oligonukleotidů a DNA fragmentů používaných podle předloženého vynálezu jsou známy odborníkům stejně tak jako způsoby ligace těchto sekvencí do vektorů, transformace hostitelských mikroorganismů a kultivace těchto hostitelských mikroorganismů za podmínek umožňujících produkci plasmidové DNA a rekombinantních proteinových produktů.

DNA sekvence kódující lidský BLAT (SEQ ID NO: 8) byla sestavena z 8 chemicky syntetizovaných oligonukleotidů s rozmezím velikostí od 52 do 86 bází. Oligonukleotidy byly vytvořeny použitím konvenčního přístroje pro syntézu DNA jako je Applied Biosystems model 380A nebo 380B (komerčně dostupný od společnosti Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA 94404). Sekvence oligonukleotidů byla navržena tak, aby 4 z oligonukleotidů vytvářely jedno vlákno syntetického genu a zbývající 4 oligonukleotidy vytvářely komplementární vlákno syntetického genu. Před sestavením byly oligonukleotidy zpracovány

polynukleotidovou kinázou v přítomnosti ATP pro fosforylaci volných hydroxylových skupin jednotlivých oligonukleotidů.

8 oligonukleotidů bylo smícháno v ekvimolární koncentraci (3 pikomolů/ μl) v objemu 100 μl , zahřáto na teplotu 95 °C a postupně ochlazováno na teplotu okolí v průběhu periody několika hodin. To umožnilo správné párování bází jednotlivých oligonukleotidů. T4 DNA ligáza byla přidána pro ligaci oligonukleotidů a vytvoření dvouvláknové DNA s přibližně 285 páry bází, která byla analyzována a čištěna na 2% agarózovém gelu. Tento fragment, který měl "lepivé" konce, byl ligován do pUC18 vektoru natráveného NdeI a BamHI. Ligační směs byla transformována do kompetentních DH10B buněk, které byly nanášeny na trypton-kvasinkové agarové destičky obsahující 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu. Kolonie, které přes noc vyrostly, byly analyzovány na přítomnost plasmidů, které obsahovaly chemicky syntetizovaný gen. To bylo provedeno vyčištěním plasmidové DNA z těchto kolonií, natrávením plasmidové DNA pomocí NdeI a BamHI a ověřením přítomnosti fragmentů s přibližně 285 páry bází. Správnost sekvence byla následně potvrzena DNA sekvenční analýzou. Plasmid byl pojmenován pOJ838.

Příklad 3

Konstrukce plasmidů exprimujících BLAT fúzovaný protein

Jelikož BLAT je malý protein, bylo výhodné zvýšit jeho velikost vytvořením fúzovaného proteinu. Pro tento účel byly používány dva fúzovní partneři. Jedním byla glutathion-S-transferáza (GST), která má místo štěpení faktorem Xa a sekvence aminokyselin označené v předložené přihlášce jako

SEQ ID NO: 6, jako je kódovaná vektorem pGEX-21 (Pharmacia Biotechnology, Piscataway, NJ 08855); druhým byla kratší peptidová sekvence MIIGLMVGGVSGSGSGSGDDDDP (SEQ ID NO: 3).

Pro získání přirozeného beta-lipotropinu se fúzané proteiny zpracovávají buď chemicky nebo enzymatickým natrávením pro oddělení beta-lipotropinu od jeho fúzového partnera. Toho se dosahuje vložением míst pro enzymatické nebo chemické štěpení mezi fúzaného partnera a beta-lipotropin. Pro GST fúzi byla zvolena rozpoznávací místa pro enterokinázu nebo faktor Xa; pro fúzi malého syntetického peptidu (SEQ ID NO: 3) byl vložen prolin, čímž se umožnilo chemické štěpení po zpracování kyselinou.

Plasmid kódující GST fúzi s rozpoznávací sekvencí faktoru Xa (IEGR) byl konstruován následujícím způsobem. Plasmid pOJ838 (pUC18 obsahující syntetický beta-lipotropin; viz Příklad 4) byl natráven NdeI a NruI a největší vektorový fragment byl gelově čištěn. Syntetický linker sekvence 5'-TATGAGATCTATCGAAGGTCGTGAGCTCACCGGTCAGCGTGTTTCG-3'

(SEQ ID NO: 4) a jeho komplement byly smíchány v ekvimolárních množstvích, zahřívány na teplotu 95 °C a ponechány ochladit se postupným snižováním teploty na přibližně 25 °C. Ochlazený linker byl ligován do fragmentu vektoru a ligační směs byla transformována do kompetentních DH10B buněk. Transformované buňky přeneseny na trypton-kvasinkové agarové destičky, obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Kolonie, které vyrostly přes noc, byly analyzovány na přítomnost plasmidů, které obsahovaly sekvenci linkeru. To bylo provedeno čištěním plasmidové DNA z těchto kolonií a ověřením přítomnosti nového BglII místa,

které bylo vloženo prostřednictvím linkeru. Správné sekvence linkeru byly následně potvrzeny DNA sekvenční analýzou. Výsledný plasmid byl pojmenován p0J839.

Plasmid p0J839 byl natráven BglII a EcoRI a malý fragment obsahující gen beta-lipotropinu (nyní vázaný k rozpoznávací sekvenci faktoru Xa) byl gelově čištěn a ligován do PGEX 2-T natráveného BamHI a EcoRI. Ligační směs byla transformována do kompetentních DH10B buněk, které byly naneseny na trypton-kvasinkové agarové destičky obsahující 100 µg/ml ampicilinu. Kolonie, které vyrostly přes noc, byly analyzovány na přítomnost plasmidů, které obsahovaly nový fragment s přibližně 300 páry bází s následujícím natrávením SacI. Tento nový plasmid byl pojmenován p0J840.

Příklad 4

Rekombinantní vektor pHMM260-ProCpB(10)/LVPR/beta lipotropin (R49) kódující fúzovaný protein prokarboxypeptidázy a BLAT

Rekombinantní DNA vektor exprese, pHMM260, obsahuje kazetu exprese ProCpB(10)/LVPR/beta lipotropin (R49), fúzovaný protein prokarboxypeptidázy a BLAT. Tento vektor byl vytvořen použitím standardních klonovacích technik. Anotace kazety exprese pHMM260 je znázorněna na Obr. 16. Kazeta exprese se lemuje místem NdeI na konci 5' a místem BamHI na konci 3'. Propeptidová část prasečího proteinu prokarboxypeptidáza B se nachází na konci 5' kazety, začíná zbytkem Met a končí zbytkem Ser. Rozpoznávací sekvence thrombinové proteázy, LVPR, se nachází okamžitě na 3' prokarboxypeptidázové sekvence. Sekvence začínající zbytkem Glu na konci 3' thrombinového místa štěpení kóduje divoký

typ lidského beta-lipotropinu.

Několik odvozených kazet bylo zkonstruováno tak, že poloha 45 BLAT sekvence byla změněna z Arg (R49) sekvence divokého typu na Ala (A49) pHMM261 nebo Glu (E49) pHMM262 nebo Gln (Q49) pHMM263. Tyto deriváty byly vytvořeny s cílem snížit náchylnost na proteolýzu během syntézy a čištění fúzovaných proteinů. Všechny tyto vektory kódují rozpustné fúzované proteiny.

Příklad 5

Rekombinantní vektor pHMM268 kódující fúzovaný protein serinové hydroxymethyltransferázy (SHMT) a BLAT

Fúzovaný protein obsahující aminoterminální sekvenci enzymu serinová hydroxymethyltransferáza (SHMT) byl konstruován použitím standardních klonovacích technik. Plasmid pHMM268 byl exprimován na vysoké úrovni v *E. coli*. Fúzovaný protein produkovaný pHMM268 byl nerozpustný a bylo možno získat částicovou frakci. Tento rys představoval výhodu v ochraně proti proteolytické degradaci.

Příklad 6

Podávání myšního BLAT po 7 dní samcům myši $A^{vy/A}$

$A^{vy/A}$ myš je model pro obezitu a diabetes. U tohoto inbredního kmenu se vyvíjí hyperglykémie, hyperinzulínemie a necitlivost na inzulin ve střední části života a proto představuje užitečný model jak pro obezitu, tak i pro diabetes.

Samci myši A^{VY/A} byli zakoupeni od Harlan Co. (Indianapolis, IN) ve stáří přibližně 6 měsíců. Zvířata byla chována po 6 v kleci a krmena *ad libitum* krmivem 5008 a vodou. Hladina glukózy v krvi byla měřena v pravidelných intervalech; jakmile ranní hladina glukózy dosáhla alespoň 300 mg/dl, zvířata byla vystavena experimentálnímu protokolu. Pět náhodně zvolených zvířat bylo společně chováno jako kontrola; pět náhodně zvolených zvířat bylo chováno společně a dostávalo ošetření myším BLAT (myší BLAT sekvence je snadno dostupná; viz například M. Notake a kol., FEBS Lett. 156, 67-71, 1983; zde zahrnuto jako reference), syntetizovaný technikami v pevné fázi.

Myši podstupující ošetření BLAT dostávaly 60 μ g bid subkutánně (SC) (200 μ l celkový objem každé dávky); kontrolní zvířata dostávala 200 μ l vehikula bid (solný roztok) Zvířatům byla injekce dávana dvakrát denně, ráno a odpoledne, po 6 dní; v den 7 dostaly pouze ranní injekci.

Hladina glukózy v krvi, tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly měřeny ráno v den 0. Tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly měřeny ráno v den 1 až 6. Triglyceridy v plasmě byly měřeny ráno v den 6. Myši byly ponechány hladovět od odpoledne dne 6 do rána dne 7. V den 7 byl proveden orální test tolerance glukózy. Hladina glukózy v krvi v čase nula byla měřena 2 hodiny po ranní injekci solného roztoku nebo BLAT. Pro tento test byl zvířatům orálně podán 25% roztok dextrózy (100 μ l/10 g tělesné hmotnosti), potom jim byly odebrány vzorky krve 30, 60 a 120 minut později. Vzorky krve byly použity pro určení hladin glukózy a inzulinu. Po

provedeném testu tolerance glukózy byla zvířata krmena *ad libitum*. Ve dnech 1, 3 a 14 po poslední SC injekci solného roztoku nebo BLAT byly zvířatům odebrány vzorky krve pro určení hodnot glukózy v krvi.

Výsledky :

BLAT Podávání snižuje krevní glukózu a inzulin *in vivo*

Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 1-8. V průběhu sedmidenního ošetřování zkonzumovala zvířata v kontrolní skupině a testované skupině přibližně 4,5 až 6 gramů potravy (Obr. 1). Tělesná hmotnost v obou skupinách zůstala stejná v obou skupinách na přibližně 50 gramech (Obr. 2).

Ošetření pomocí BLAT snížilo triglyceridy v plasmě u ošetřených myší po 6 dnech ošetřování (viz Obr. 3). Kontrolní zvířata vykazovala střední hodnotu 3,05 nmol/L (standardní odchylka 0,58), zatímco ošetřená zvířata byla změřena s hodnotou 2,05 nmol/L (standardní odchylka 0,43). To reprezentuje pokles triglyceridů v séru o přibližně 30% až 35%.

BLAT také indukoval podstatný pokles hladiny glukózy v krvi u ošetřovaných zvířat (Obr. 4). Po 7 dnech podávání BLAT ošetřená skupina manifestovala hladinu glukózy v krvi 135 mg/dl (standardní odchylka 16); v znatelném kontrastu naproti tomu kontrolní skupina měla 171 mg/dl (standardní odchylka 16).

Pokles hladiny glukózy v krvi u ošetřovaných zvířat pokračoval po alespoň 3 dny po posledním podání BLAT v den 7 (Obr. 5). Kontrolní zvířata vykazovala hladinu glukózy 331 mg/dl (standardní odchylka 79). Naproti tomu ošetřená zvířata si udržovala znatelně nižší hladinu glukózy v krvi 205 mg/dl (standardní odchylka 76). Účinek BLAT na snižování hladiny glukózy v krvi nebyl pozorován 14 dní po posledním podávání BLAT (Obr. 6).

Pro určení účinků ošetření pomocí BLAT na hladinu inzulínu byl proveden orální test tolerance glukózy po 7 dnech ošetřovací periody a hladovění přes noc (Obr. 7 a Obr. 8). Kontrolní a ošetřovaná zvířata vykazala počáteční vzrůst hladiny glukózy v krvi z přibližně 80 mg/dl na 200 mg/dl nebo více v časový bod 30 minut po počátku testu; potom obě skupiny vykazaly srovnatelné rychlosti poklesu hodnot po 2 hodinách (Obr. 7). Zarážející bylo, že ošetřená zvířata vykazovala hodnoty inzulínu v plasmě podstatně pod hodnotami kontrolních zvířat (Obr. 8). Například v časovém bodě 30 minut měla kontrolní zvířata hladinu inzulínu 11,5 ng/ml (standardní odchylka 1,9), zatímco ošetřená zvířata měla hodnoty inzulínu 6,0 ng/ml (standardní odchylka 3,0).

Příklad 7

Podávání myšího BLAT po 14 dní samcům A^{vy/A} myši

byli chováni po 6 v kleci a krmeni *ad libitum* krmivem 5008 a vodou. Hladina glukózy v krvi byla měřena v pravidelných intervalech; jakmile ranní hladina glukózy dosáhla alespoň 300 mg/dl, zvířata byla vystavena experimentálnímu protokolu. Pět náhodně zvolených zvířat bylo společně

chováno jako kontrola; pět náhodně zvolených zvířat bylo chováno společně a dostávalo ošetření myším BLAT, který byl syntetizován technikami v pevné fázi.

Myši podstupující ošetření BLAT dostávaly 60 μg bid subkutánně (SC) (200 μl celkový objem každé dávky); kontrolní zvířata dostávala 200 μl vehikula bid (solný roztok) Zvířatům byla injekce dávana dvakrát denně, ráno a odpoledne, po 13 dní; v den 14 dostala pouze ranní injekci.

Hladina glukózy v krvi, tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly měřeny ráno v den 0. Tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly měřeny ráno v den 1 až 13. Myši byly ponechány hladovět od odpoledne dne 13 do rána dne 14. V den 7 byl proveden orální test tolerance glukózy. Hladina glukózy v krvi v čase nula byla měřena 2 hodiny po ranní injekci solného roztoku nebo BLAT. Pro tento test byl zvířatům orálně podán 25% roztok dextrózy (100 $\mu\text{l}/10$ g tělesné hmotnosti), potom jim byly odebrány vzorky krve 30, 60 a 120 minut později. Vzorky krve byly použity pro určení hladin glukózy a inzulinu. Po provedeném testu tolerance glukózy byla zvířata krmena *ad libitum*. Ve dnech 1, 3 a 14 po poslední SC injekci solného roztoku nebo BLAT byly zvířatům odebrány vzorky krve pro určení hodnot glukózy v krvi.



Výsledky:

BLAT podávání po 14 dní snižuje krevní glukózu a inzulín

Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 9-10. v průběhu čtrnáctidenního ošetřování zkonzumovala zvířata v kontrolní skupině a testované skupině přibližně 4,5 až 6 gramů potravy. Tělesná hmotnost v obou skupinách zůstala stejná v obou skupinách na přibližně 50 gramech (data nejsou znázorněna).

Pro určení účinků dvoutýdenního ošetření pomocí BLAT na hladinu inzulinu byl proveden orální test tolerance glukózy po 14 dnech ošetřovací periody (Obr. 9 a Obr. 10). Kontrolní a ošetřovaná zvířata vykazala počáteční vzrůst hladiny glukózy v krvi z asi 80 mg/dl na 300 mg/dl nebo více, v časovém bodě 30 minut; potom obě skupiny vykazovaly srovnatelnou rychlost poklesu hodnot, až do konečného bodu testu po dvou hodinách (Obr. 9). Například, ošetřená zvířata vykazala průměrnou hladinu glukózy v krvi v 30 minutovém časovém bodě 289 mg/dl (standardní odchylka 24), zatímco kontrolní zvířata měla hladinu 348 mg/dl (standardní odchylka 18). Nižší hladiny byly pozorovány také v časových bodech 60 minut a 120 minut. Například po 120 minách ošetřená zvířata měla střední hladinu glukózy v krvi 114 mg/dl (standardní odchylka 4), zatímco kontrolní zvířata měla hladinu 188 mg/dl (standardní odchylka 23).

Ošetřená zvířata vykazovala hodnoty inzulinu v plasmě podstatně pod hodnotami kontrolních zvířat (Obr. 10). Například v časovém bodě 30 minut měla kontrolní zvířata

hladinu inzulínu 7,4 ng/ml (standardní odchylka 2,1), zatímco ošetřená zvířata měla hladinu inzulínu 4,8 ng/ml (standardní odchylka 0,6).

Příklad 8

BLAT stimuluje příjem glukózy u 3T3 adipocytů

Myši 3T3-L1 buňky byly uloženy do 100 μ l růstového média na jamku v 96 jamkových destičkách, tak aby na jednu jamku připadlo přibližně 25,000 buněk.

Růstové médium:

DMEM, vysoké množství glukózy, bez L-glutaminu

10% telecí sérum

2 mM L-glutamin

1% PenStrep

1,25 μ g/ml fungizonu

Buňky byly indukovány k diferenciaci na adipocyty 3 dny po umístění na destičky nahrazením růstového média diferenciačním médiem.

Diferenciační médium:

DMBM, vysoké množství glukózy, bez L-glutaminu

10% FBS

2 mM L-glutaminu

1% Pen Strep

1,25 μ g/ml fungizonu

10 mM Hepes

0,25 μ M dexamethasonu (1 μ l/ml 0,25 mM zásobního roztoku)

0,5 mM IBNX (10 μ l/ml 50 mM zásobního roztoku)

5 μ g/ml inzulinu (1 μ l/ml 5 mg/ml zásobního roztoku)

Médium bylo odstraněno z buněk odsátím použitím osmikanálového zařízení připojeného k zdroji podtlaku regulátorem průtoku. Čerstvé médium bylo dodáno do jamek použitím osmikanálového maticového elektronického pipetoru, nastaveného na nejmenší rychlost, tak aby se minimalizovalo porušení buněk.

V den 1 bylo do každé jamky přidáno 100 μ l diferenciačního média pro inicializaci diferenciaci 3T3 buněk na adipocyty. V den 3 po počátku diferenciaci bylo médium změněno na diferenciační médium obsahující inzulin, ale bez IBMX nebo dexamethasonu (inzulinové médium). V den 6 bylo médium znovu změněno na diferenciační médium neobsahující inzulin, IBMX nebo dexamethason (FBS médium). Buňky byly udržovány ve FBS médiu, s napájením další den, dokud nebyly připraveny pro test transportu glukózy ve dnech 15 až 21 po začátku diferenciaci.

Příklad 9

Test transportu glukózy v 3T3 buňkách indukovaných pro diferenciaci na adipocyty v přítomnosti BLAT

Myší 3T3-L1 buňky byly indukovány na diferenciaci na adipocyty způsobem podle Příkladu 8. 15 - 24 hodin před provedením testu transportu glukózy byly buňky zpracovány následujícím způsobem:

1 Jamky byly promývány dvakrát 100 ml fosfátově pufovaným

fyziologickým roztokem (PBS) při 37 °C, odsávání mezi promýváními.

2. Dále byly do každé jamky přidány 100 ml DMEM, vysoké množství glukózy, 1% antibiotický/antimykotický roztok, 2 mM glutamin, 0,1% BSA (zahřáté na teplotu 37 °C), 0 až 1000 nM myšího BLAT (syntetizován technikami v pevné fázi), a 0 až 100 nM inzulínu. Toto je fáze sérového hladovění.

3. Potom byly buňky inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

V den pokusu byly buňky ošetřeny následujícím způsobem:

1 Médium bylo odstraněno, destičky byly přeneseny na papír a buňky byly dvakrát promývány 100 ml KRBH pufru (Krebs-Ringerův pufr, obsahující Hapes, pH 7,4).

2. Po odstranění závěrečného promývacího roztoku byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C po 1 hodinu v 100 µl KRBH, 0,1% BSA s 100 µM glukózy, 10 µl/ml (0,1 µCi/jamku) radioaktivně označené 2- deoxyglukózy (C^{14}) a požadovanou koncentrací inzulínu.

3. Po provedení inkubace s radioaktivně označenou glukózou bylo přidáno 10 µl 10x cytochlasinu B (200 µM) pro zastavení dalšího příjmu glukózy buňkami.

4. Příjem radioaktivně označené glukóza byl stanoven odečtením destiček na destičkové čtečce Microbeta.

Výsledky:

Výsledky tohoto experimentu jsou souhrnně uvedeny na Obr. 11. Příjem glukózy 3T3 buňkami indukovanými k diferenciaci na adipocyty byl stimulován od asi 3-násobku do asi 6-násobku, pokud byly adipocyty předem ošetřeny v testu příjmu pomocí BLAT.

Příklad 10

Test transportu glukózy v 3T3 buňkách indukovaných pro diferenciaci na adipocyty v přítomnosti funkčních fragmentů BLAT

Myší 3T3-L1 buňky byly indukovány na diferenciaci na adipocyty způsobem podle Příkladu 8. 15 - 24 hodin před provedením testu transportu glukózy byly buňky zpracovány následujícím způsobem:

1. Jamky byly promývány dvakrát 100 ml fosfátově pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) při 37 °C, odsávání mezi promýváními.

2. Dále byly do každé jamky přidány 100 ml DMEM, vysoké množství glukózy, 1% antibiotický/antimykotický roztok, 2 mM glutamin, 0,1% BSA (zahřáté na teplotu 37 °C), 0 až 1000 nM myšího nebo lidského BLAT (syntetizován technikami v pevné fázi), a 0 až 100 nM inzulínu. Toto je fáze sérového hladovění. Například, v jednom testu byl použit lidský BLAT fragment označený v této přihlášce vynálezu jako SEQ ID NO: 10; v jiném testu byl použit lidský BLAT fragment označený v této přihlášce vynálezu jako SEQ ID NO: 12.

3. Potom byly buňky inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

V den pokusu byly buňky ošetřeny následujícím způsobem:

1. Médium bylo odstraněno, destičky byly přeneseny na papír a buňky byly dvakrát promývány 100 ml KRBH pufru (Krebs-Ringerův pufr, obsahující HEPES, pH 7,4).

2. Po odstranění závěrečného promývacího roztoku byly buňky inkubovány při teplotě 37 °C po 1 hodinu v 100 μ l KRBH, 0,1% BSA s 100 μ M glukózy, 10 μ l/ml (0,1 μ Ci/jamku) radioaktivně označené 2- deoxyglukózy (C^{14}) a požadovanou koncentrací

inzulínu.

3. Po provedení inkubace s radioaktivně označenou glukózou bylo přidáno 10 μ l 10x cytochlasinu B (200 μ M) pro zastavení dalšího příjmu glukózy buňkami.

4. Příjem radioaktivně označené glukóza byl stanoven odečtením destiček na destičkové čtečce Microbeta.

Výsledky:

Příjem glukózy 3T3 buňkami indukovanými k diferenciaci na adipocyty je zvýšen ve srovnání s kontrolními buňkami, pokud byly adipocyty před provedením testu příjmu zpracovány funkčními fragmenty BLAT.

Příklad 11

Funkční Analogy BLAT

Myši 3T3-L1 buňky byly indukovány k diferenciaci na adipocyty jako v Příkladu 10. Adipocyty byly potom vystaveny analogům lidského BLAT, například SEQ ID NO: 26 až SEQ ID NO: 35 a transport glukózy byl monitorován jako v Příkladu 8. Funkční analogy vykazovaly v zásadě stejné výsledky jako přirozený BLAT.

Příklad 12

Podávání lidského BLAT po 14 dní samcům myši A^{vy/A}

V pevné fázi syntetizovaný lidský BLAT byl podáván samcům myši A^{vy/A} v dávkování a podle režimu, popsaného v Příkladu 7.

Výsledky:

Podávání lidského BLAT snížilo podstatně hladiny inzulínu v séru samců myši A^{VY/A} (viz Obr. 12 a 13).

Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 12-13. V průběhu čtrnáctidenního ošetřování zkonsumovala zvířata v kontrolní skupině a testované skupině přibližně 4,5 až 6 gramů potravy a tělesná hmotnost v obou skupinách zůstala stejná v obou skupinách na přibližně 50 gramech (data nejsou znázorněna).

Pro určení účinků dvoutýdenního ošetření pomocí lidského BLAT na hladinu glukózy a inzulínu v plasmě byl proveden orální test tolerance glukózy po 14 dnech ošetřovací periody. Kontrolní a ošetřovaná zvířata vykázala počáteční vzrůst hladiny glukózy v krvi z asi 80 mg/dl na 300 mg/dl nebo více, v časovém bodě 30 minut; potom obě skupiny vykazovaly srovnatelnou rychlost poklesu hodnot, až do konečného bodu testu po dvou hodinách (Obr. 12). Například, ošetřená zvířata vykázala průměrnou hladinu glukózy v krvi v 30 minutovém časovém bodě 400 mg/dl (standardní odchylka 12), zatímco kontrolní zvířata měla hladinu 330 mg/dl (standardní odchylka 19). Nižší hladiny byly pozorovány také v časových bodech 60 minut a 120 minut. Například po 120 minách ošetřená zvířata měla střední hladinu glukózy v krvi 178 mg/dl (standardní odchylka 16), zatímco kontrolní zvířata měla hladinu 202 mg/dl (standardní odchylka 13).

Ošetřená zvířata vykazovala hodnoty inzulínu v plasmě podstatně pod hodnotami kontrolních zvířat (Obr. 13). Například v časovém bodě 30 minut měla kontrolní zvířata

hladinu inzulínu 14,0 ng/ml (standardní odchylka 1,5),
zatímco ošetřená zvířata

-61-

zvířata měla hladinu inzulínu 10,2 ng/ml (standardní
odchylka 0,4). V časovém bodě 120 minut měla kontrolní
zvířata hladinu inzulínu 9,3 ng/ml (standardní odchylka 2,3)
a ošetřená zvířata měla hladinu inzulínu 5,4 ng/ml
(standardní odchylka 0,9).

Příklad 13

Podávání myšího beta lipotropinu samcům myši Lep^{ob}/Lep^{ob}

Samci myši Lep^{ob}/Lep^{ob} zakoupení od Jackson Laboratories (Bar
Harbor, ME) byly chovány jednotlivě a krmeny *ad libitum*
krmivem 5008 a vodou. Myším byla odebrána krev z ocasu pro
počáteční stanovení hodnot glukózy, inzulínu a triglyceridů.
Myši byly rozděleny buď do kontrolní skupiny nebo do skupiny
pro podávání 60 µg nebo 120 µg bid myšího beta lipotropinu.
Ošetřované myši dostávaly buď 60 µg bid SC nebo 120 µg bid
SC (200 µl celkový objem každé dávky); kontrolní myši
dostávaly 200 µl vehikula (solný roztok). Myším byla
podávána injekce denně v 7.00 a 15.00 po 16 dní a pouze
injekce v 7.00 v den 17. Tělesná hmotnost a spotřeba potravy
byly měřeny ráno ve dnech 0 až 17. Myším byla odebrána krev
z ocasu ráno v den 7 pro stanovení hodnot glukózy, inzulínu
a triglyceridů v krvi. Zvířata byla ponechána přes noc od
odpoledne v den 13 do rána v den 14. V den 14 byl proveden
orální test tolerance glukózy. Hladiny glukózy a inzulínu v
krvi v čase nula byly měřeny 2 hodiny po ranní injekci.

Myším byl orálně podán 25% roztok dextrózy (100 μ l/10 g tělesné hmotnosti), potom jim byly odebrány vzorky krve 30, 60 a 120 minut později. Vzorky krve byly použity pro určení hladin glukózy a inzulínu. Po provedeném testu tolerance glukózy byla zvířata krmena *ad libitum*. Ve den 16 byly odebrány vzorky krve z ocasu pro určení hodnot glukózy, inzulínu, triglyceridů a kortikosteronu v krvi. V den 17 byly myši usmrceny.

Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny na Obr. 14. Hladina inzulínu v krvi byla významně nižší u ošetřených zvířat v průběhu 16 denní periody ošetřování. Například v den 7 ošetřování kontrolní zvířata vykazovala hodnoty inzulínu přibližně 300 ng/ml, zatímco ošetřeným zvířatům bylo změřeno přibližně 215 ng/ml, snížení alespoň 30%. Navíc hladina inzulínu v krvi zůstávala nižší u ošetřených zvířat v den 16 ošetřování (Obr. 14).

Příklad 14

Podávání lidského BLAT samcům myši Lep^{ob}/Lep^{ob} pumpou AlzetTM

Samci myši Lep^{ob}/Lep^{ob} zakoupené od společnosti Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) ve věku jeden měsíc byly chovány jednotlivě a krmeny *ad libitum* krmivem 5008 a vodou s osvětlením po dobu 12 hodin (vypnuto od 18.00 do 6.00). Myším byla odebrána krev z ocasu pro počáteční stanovení hladin glukózy, inzulínu a triglyceridů. Ošetřovaná zvířata dostávala 0,24 mg/den nebo 0,48 mg/den kontinuálního podávání lidského beta lipotropinu (ER4-VBH-43) podkožně implantovanou pumpou AlzetTM (Alza, Inc.) takže střední hladiny glukózy a triglyceridů byly stejné ve všech třech

skupinách; kontrolním zvířatům byl podáván solný roztok. Pumpy byly plněny solným roztokem pro kontrolní skupinu a 20 mg/ml lidského beta lipotropinu pro skupinu s nízkými dávkami a 40 mg/ml lidského beta lipotropinu pro skupinu s vysokými dávkami. Myši byli anestetizováni isofluranem před implantací pumpy. Tělesná hmotnost a spotřeba krmiva byly měřeny ráno ve dnech 0 až 7. Myšim byla odebrána krev z ocasu ráno v den 4 pro stanovení hodnot glukózy, inzulínu a triglyceridů v krvi. Myši byly ponechány hladovět přes noc od odpoledne v den 6 do rána v den 7.

V den 7 byl proveden orální test tolerance glukózy. Myšim byla odebrána krev z ocasu pro stanovení hodnot inzulínu a glukózy v čase nula, potom jim byl orálně podáván 25% roztok dextrózy (100 μ l/10 g tělesné hmotnosti), pak jim byly odebrány vzorky krve 30, 60 a 120 minut později. Krevní vzorky byly použity pro stanovení hladin glukózy a inzulínu. Po provedení orálního testu tolerance glukózy byly myši krmeny *ad libitum*.

Výsledky testu tolerance glukózy ukazující hodnoty inzulínu v plasmě jsou znázorněny na Obr. 15. Hodnoty 0,24 mg BLAT/den byla přibližně 25% nižší než u kontrolní skupiny, zatímco hodnoty 0,48 mg BLAT/den byly o asi 40% nižší než u kontrolní skupiny (viz Obr. 15, oblast pod křivkami).

Příklad 15

Syntéza v pevné fázi a čištění analogu lidského BLAT proteinu

Analog lidského BLAT peptidu (t.j. analog představovaný

SEQ ID NO: 26), ve kterém Ala je vložen namísto Glu v SEQ ID NO: 8, byl syntetizován v jediném běhu použitím Fmoc chemických postupů. Syntéza BLAT je komplikována přítomností několika asp-gly dipeptidových sekvencí v N-terminální části peptidu. Bylo pozorováno, že aspartylové postranní řetězce v asp-gly dipeptidové sekvenci podstupují bázi katalyzovanou cyklizaci a následnou adici piperidinem během FMOC syntézy. Tato reakce se eliminuje použitím Fmoc-(FmocHmb)-glycinu v každé asp-gly sekvenci během syntézy. Ochrana glycylového amidu skupinou Hmb inhibuje cyklizaci aspartylového postranního řetězce. skupinou Hmb inhibuje cyklizaci aspartylového postranního řetězce. Po provedení štěpení, zbavení ochrany a čištění pomocí HPLC s obrácenými fázemi může být peptid analyzován elektrosprejovou hmotovou spektrometrií. Hlavní součástí, pozorovanou při této syntéze BLAT je peptid plné délky, který má očekávanou hmotnost. Použití tohoto způsobu dovoluje produkci množství čistého proteinu, které přesahuje 100 mg z jednoho běhu v 0,1 mmolové škále.

Materiály:

Wangova pryskyřice (1% zesíťovaný polystyren funkcionalizovaný p-benzoxybenzyl alkoholem) s předem naneseným Fmoc-Glu (OtBu) s přibližně 0,6 mmolu aminokyseliny na jeden gram pryskyřice, N-methylpyrrolidon (NMP), piperidin, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU), 2 M N,N-diisopopylethylamin (DIEA), 1-hydroxybenzotriazol (HOBT), dichloromethan (DCM), dimethylformamid (DMF).

Pryskyřice, na kterou byla předem vázána Fmoc-chráněná C-

terminální aminokyselina (0,1 nebo 0,25 mmolu aminokyselina), byla zvážena a umístěna do reakční komory. Pryskyřice byla předem nabobtnána promýváním DCM. Potom byla pryskyřice promývána NMP. N-terminální Fmoc skupiny byla odstraněna inkubací pryskyřice v 18-22 % roztoku piperidinu v NMP. Po deprotekcii byla pryskyřice extenzivně promývána NMP.

Jeden mol následující Fmoc-chráněné aminokyseliny určené k přidání k peptidu byl rozpuštěn v 2,1 g NMP, 2,0 g 0,45 M HBTU/HOBt reagentu v DMF. Po rozpuštění byla započata aktivace aminokyseliny přidáním 3 ml 2M DIEA v NMP. Aktivovaná aminokyselina byla potom přidána k pryskyřici zbavené ochrany a ponechána kopulovat. Po ukončení kopulace byla pryskyřice extenzivně promývána NMP. Úplný cyklus deprotekcce a kopulace byl potom opakován pro každou následující aminokyselinu. Specifické cyklové kroky v syntéze byly následující:

| Cykl | Aminokyselina | Kroky |
|------|---------------|---------------------|
| 1 | Ala | úplné promývání |
| 2 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 3 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 4 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 5 | Tyr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 6 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 7 | Asn (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 8 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 9 | Ile | jednoduchá kopulace |
| 10 | Ile | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|------------|-------------------------------|
| 11 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 12 | Asn (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 13 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 14 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 15 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 16 | Thr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 17 | Val | jednoduchá kopulace |
| 18 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 19 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 20 | Thr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 21 | Gln (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 22 | Ser (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 23 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 24 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 25 | Ser (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 26 | Thr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 27 | Met | jednoduchá kopulace |
| 28 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 23 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 30 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 31 | Tyr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 32 | Arg (Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 33 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 34 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 35 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 36 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 37 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 38 | Ser (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 39 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 40 | Trp (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 41 | Arg (Pmc) | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|----------------|-------------------------------|
| 42 | Phe | jednoduchá kopulace |
| 43 | His (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 44 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 45 | Met | jednoduchá kopulace |
| 46 | Arg (Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 47 | Tyr (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 48 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 49 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 50 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 51 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 52 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 53 | Lys (Boc) | jednoduchá kopulace |
| 54 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 55 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 56 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 57 | Val | jednoduchá kopulace |
| 58 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 59 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 60 | Ser (tBu) | jednoduchá kopulace |
| 61 | His (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 62 | Glu (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 63 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 64 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 65 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 66 | Gln (Trt) | jednoduchá kopulace |
| 67 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 68 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 69 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 70 | Gly (Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 71 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 72 | Asp (OtBu) | jednoduchá kopulace |

| | | |
|----|---------------|-------------------------------|
| 73 | Ala | jednoduchá kopulace |
| 74 | pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 75 | Gly(Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 76 | Asp(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 77 | Pro | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 78 | Gly(Fmoc-hmb) | dvojitá kopulace/Ac20 čepička |
| 79 | Asp(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 80 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 81 | Glu(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 82 | Arg(Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 83 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 84 | Arg(Pmc) | jednoduchá kopulace |
| 85 | Gln(Trt) | jednoduchá kopulace |
| 86 | Gly | jednoduchá kopulace |
| 87 | Thr(tBu) | jednoduchá kopulace |
| 88 | Leu | jednoduchá kopulace |
| 89 | Glu(OtBu) | jednoduchá kopulace |
| 90 | | konečná deprotekce |

Pro aminokyseliny, které reagují pomalu nebo neúčinně byly prováděny dvě oddělené kopulační reakce. Veškerý zbylý nezreagovaný peptid byl blokován zpracováním acetanhydridem. Posloupnost kroků pro jednu z takových aminokyselin byla deprotekce, kopulační reakce 1, promývání, kopulační reakce 2, promývání, Ac20 čepička, promývání, deprotekce.

Zkratky:

OtBu: t-butylester,

tBu: t-butyl,

Boc: t-butoxykarbonyl,

Pmc: 2,2,5,7,8-pentamethylchroma-6-sulfonyl,

Hmb: 2-hydroxy-4-methoxybenzyl,
Fmoc: 9-fluorenylmethoxykarbonyl.

Příklad 16

Podávání lidského BLAT samcům krys ZDF Alzetovou pumpou

Samci krys „Zucker Diabetic Fatty“ (ZDF), zakoupené od společnosti Genetic Models Inc. (Indianapolis, IN), byly chovány jednotlivě a krmeny *ad libitum* krmivem 5008 a vodou. Ve věku pěti týdnů byly krysy ponechány hladovět přes noc pro počáteční test orální tolerance glukózy. Krev byla odebrána z ocasu pro stanovení hladin inzulínu a glukózy v časovém bodě 0 a potom byla zvířatům orálně podáván 50% roztok dextrózy (2,5 g/kg tělesné hmotnosti) a krev byla odebírána 30, 60 a 120 minut po podávání. Po provedení testu orální tolerance glukózy byly krysy krmeny *ad libitum*. Ve věku 6 týdnů byla zvířata rozdělena do skupin po 4 zvířatech podávání lidského BLAT. V den nula testu byla opět z ocasu odebrána krev pro měření hodnot glukózy, inzulínu, kortikosteronu a triglyceridů. Krysy byly náhodně rozděleny do kontrolní skupiny a skupin pro kontinuální podávání 0,5 mg/den nebo 1,0 mg/den lidského beta lipotropinu (ER4-VTA-2) podkožně implantovanou Alzetovou pumpou. Pumpy byly naplněny solným roztokem pro kontrolní skupinu a 20,835 mg/ml lidského beta lipotropinu pro skupinu s nízkou dávkou a 41,67 mg/ml lidského beta lipotropinu pro skupinu s vysokou dávkou. Pumpy byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C v solance před podkožní implantací. Tělesná hmotnost a spotřeba potravy byly měřeny v den 0 až 8. Krevní vzorky byly odebírány ráno v den 3 pro určení hodnot glukózy, inzulínu, kortikosteronu a triglyceridů. Krysy byly

ponechány hladovět přes noc od odpoledně dne 5 do rána dne 6. V den 6, byl proveden orální test tolerance glukózy. Po provedení orálního testu tolerance glukózy byly krysy krmeny *ad libitum*.

Zvířata Zucker, použitá v této studii, představují dobrý model pro diabetes typu 2. Ve věku 6 až 7 týdnů hodnoty glukózy v krvi a hladina triglyceridů stoupají, zatímco sekrece inzulínu klesá. Tato zvířata jsou hyperkortikosteronemická a resistantní na inzulín.

Tabulka 3. ZDF krysy, ošetřované lidským BLAT

| Ošetření (mg/den BLAT) | Krevní glukóza (mg/dl) | | | Triglyc. (mmol/l) | | |
|------------------------------|------------------------|-------|---------|-------------------|-------|---------|
| | 0 | Den 2 | Den 7 | 0 | Den 2 | Den 7 |
| Kontrola | 149 | 153 | 150±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 |

Výsledky presentované v Tabulce 3 a na Obr. 16 demonstrují zřetelný účinek lidského BLAT na ZDF krysy v dávce 1 mg denně lidského BLAT. Po 30 minutách po započetí orálního testu tolerance glukózy byla hladina glukózy v plasmě v průměru 191 ± 16 mg/dl v kontrolní skupině a 172 ± 5 mg/dl u zvířat ošetřených BLAT (viz Obr. 16). Po 60 minutách od započetí kontrolní zvířata vykazovala hladinu glukózy 157 ± 6 mg/dl, zatímco BLT-ošetřená zvířata byla na 154 ± 8 mg/dl.

Tabulka 3 ilustruje, že hodnoty glukózy v krvi zůstaly nižší u zvířat, ošetřených BLAT ve srovnání s kontrolními zvířaty, obzvláště při vyšší dávce. Kontrolní zvířata vykazovala hodnoty glukózy přibližně 150 mg/dl po 0, 2 a 7 dnech následujících po začátku podávání BLAT. Naproti tomu zvířata ošetřovaná 1 mg/den lidského BLAT měla průměr 140 mg/dl v den 7, zhruba 7% nižší než kontrolní zvířata. Ošetřovaná zvířata také vykazovala o 11% nižší hladinu triglyceridů v krvi než kontrolní zvířata (Tabulka 3), což demonstruje inzulinotropní účinek léčby pomocí BLAT.

Příklad 17

Lidský BLAT stimuluje transport glukózy v kosterních svalech ZDF krys

Studie byla prováděna pro určení účinku beta-lipotropinu na transport glukózy kosterním svalu. Samci Zucker diabetických obézních (ZDF/GmiTM-fa/fa) krys byly získány od společnosti Genetic Models Inc. (Indianapolis, IN). Krysy byly krmeny krysím krmivem Purina Formulab 5008 (Purina Mills, Inc., St. Louis, MO) a umístěny ve světlých kontrolovaných prostorách s alternujícím dvanáctihodinovým cyklem světla a tmy. Krysy byly chovány po jedné v kleci a byl jim dán volný přístup k potravě a vodě.

Pro určení transportu glukózy ve svalové tkáni byla zvířata z Příkladu 16 anestetizována intraperitoneální injekcí pentobarbitolu sodného (6,5 mg/100 g tělesné hmotnosti) a motorické svaly byly izolovány a rozděleny na polovinu. Každá polovina tkáňového vzorku byla promývána v solance po dobu 2 minut a potom v plynu syčeném (95% O₂-5% CO₂) KHB s

1% BSA, 8 mM glukózy a 32 mM manitolu.

Test transportu glukózy byl prováděn následujícím způsobem.

Preinkubace:

Vzorky svalové tkáně byly přeneseny do 20 ml nádobek, obsahujících 1,8 ml plynem syceného KHB s 1% BSA, 8 mM glukózy a 32 mM manitolu, s nebo bez 500 nM myšího beta-lipotropinu. Vzorky byly umístěny v třepané vodní lázni po dobu 20 hodin při teplotě okolí se dvěma výměnami pufry.

Po preinkubaci byly vzorky svalové tkáně promývány při teplotě 29 °C po 15 minut za konstantního sycení plynem tvořeným 95% O₂ a 5% CO₂. Vzorky byly promývány v nádobkách, obsahujících 1,8 ml KHB s 40 mM manitolu, inzulinem (2000 μU/ml) nebo bez inzulinu a s nebo bez beta-lipotropinu (500 nM).

Svalové vzorky byly potom přeneseny do nových nádobek za konstantního sycení plynem, tvořeným 95% O₂-5% CO₂. Inkubační médium sestávalo z 8 mM 3-O-methyl-glukózy (OMG), 2 mCi/ml ³H-3-OMG, 30 mM manitolu, 0,3 mCi/ml ¹⁴C manitol, 2 mM pyruvátu, inzulinu (2000 μU/ml), a myšího beta-lipotropinu. Kontrolní vzorky postrádaly inzulin a/nebo beta-lipotropin. Po 10 minutách při teplotě 29 °C byly vzorky fixovány vymrazováním a uchovávány zmrazené až do okamžiku testování transportu glukózy.

Transport glukózy:

Svaly byly zmenšeny na přibližně 20-25 mg pro natrávení v 0,5 ml 1M KOH při teplotě 70 °C po dobu 30 minut. Po

natrávení byly vzorky umístěny na led a 100 μ l vzorku bylo odebráno pro analýzu glykogenu. Do zbývajících 0,4 ml vzorku bylo přidáno 0,4 ml 1N HCl a zkumavka byla podrobena víření. Potom bylo 300 ml vzorku zpracovaného HCl přidáno do 6,4 ml scintilační tekutiny a radioaktivita ve vzorku byla určena scintilačním počítačem.

Transport glukózy byl vypočítáván na základě vnitrobuněčné akumulace ^3H -3-OMG použitím ^{14}C manitolu jako extracelulárního markeru.

Úroveň glykogenu:

Do 100 μ l vzorku uvedeného výše bylo přidáno 17 μ l ledové kyseliny octové spolu s 500 μ l 0,3 M pufru octanu sodného (Ph 4,8 + 5 mg/ml amyloglukosidázy). Zkumavky byly ponechány inkubovat přes noc při teplotě 37 °C. Následující den bylo 50 μ l vzorku umístěno do 96 jamkové destičky a bylo přidáno 200 μ l Trinderova reagentu (Sigma 315-100; zředěný na 20 μ l vodou). Destička byla inkubována po 10 minut při teplotě 37 °C a absorbance byla odečítána při vlnové délce 505 nm.

Tabulka 4. Transport glukózy ve svalové tkáni ZDF krys s ošetřením lidským BLAT

| | |
|----------------|--|
| Ošetření | 3 OMG transport ($\mu\text{mol/g/10 min}$) |
| Kontrola | $0,085 \pm 0,01$ |
| inzulín | $0,080 \pm$ |
| BLAT + inzulín | $0,113 \pm 0,018$ |

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

SEZNAM SEKVENCÍ

<110> Butler, Jon P.

Hale, John E.

Heath Jr., William F.

Schoner, Brigitte E.

Heiman, Mark L.

Becker, Gerald W.

Varshavsky, Alexander D.

<120> Beta-lipotropin a jeho použití

<130> X-12139

<140>

<141>

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 273

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Met-Arg lidský BLT

<400> 1

atgCGtgagc tcaccggtca gcgtcttgcg gaaggtgacg gtccggacgg tccggctgac 60
gacggtgctg gtgctcaggc agatctcgag cactccctgc tggttgctgc agaaaaaaaa 120
gacgaaggtc cgtaccgtat ggaacacttc cgttgggggtt ccccgccgaa agacaaacgt 180
tacggtgggtt tcatgacctc cgaaaaatcc cagaccccgc tggttaccct gttcaaaaac 240
gctatcatca aaaatgcata caaaaaaggt gaa 273

<210> 2

<211> 91

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Met-Arg lidský BLT

<400> 2

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

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
Fúzový proteinový partner
partner

<400> 3

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

20

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
Oligonukleotidový linker

<400> 4

tatgagatct atcgaaggtc gtgagctcac cggtcagcgt gttcg

45

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
BLT fúzovaný protein

<400> 5

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

<210> 6

<211> 331

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
GTS fúzový partner

<400> 6

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

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
225 230 235 240

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

325

330

<210> 7

<211> 422

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
GST/BLT fúzovaný protein

<400> 7

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 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
 225 230 235 240

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

<210> 8

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

<210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12

<211> 52

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

17

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

His Ser Leu Leu Val Ala Ala Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro

1 5 10

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Lys Lys Asp Glu Gly Pro Tyr Arg Met Glu His Phe Arg

1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Thr Ser Glu Lys Ser Gln Thr Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys

1

5

10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Leu Val Thr Leu Phe Lys Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala

1

5

10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Asn Ala Ile Ile Lys Asn Ala Tyr Lys Lys Gly Glu

1 5 10

<210> 26

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence:
Lidský analog

<400> 26

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 His Arg Tyr Ala Ala Phe Met Thr

50 55 60

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

<210> 28

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 28

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

<210> 29

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 29

Glu Leu Thr Gly Gln Arg Leu Arg Glu Gly Asp Gly Pro Asp Gly Pro
 1 5 10 15

-105-

20.07.00

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

<210> 30

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 30

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 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

<210> 31

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<210> 33

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 33

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

<210> 34

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 34

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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

<210> 35

<211> 89

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: Lidský analog

<400> 35

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

-112-

20.07.00

Lys Trp Ala Thr Pro Pro His Glu Arg Arg 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

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. V zásadě čistý protein, který má aminokyselinovou sekvenci zvolenou ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 7.
2. Izolovaná nukleová kyselina kódující protein podle nároku 1.
3. Vektor zahrnující izolovanou nukleovou kyselinu podle nároku 2.
4. Vektor podle nároku 3, ve kterém uvedená izolovaná nukleová kyselina je operativně vázána na promotorovou sekvenci.
5. Hostitelská buňka obsahující vektor podle nároku 4.
6. Způsob konstrukce rekombinantní hostitelské buňky, která má schopnost exprimovat beta-lipotropin, **vyznačující se tím**, že se do uvedené hostitelské buňky vloží libovolným způsobem vektor podle nároku 5.
7. Způsob exprese beta-lipotropinu v rekombinantní hostitelské buňce podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kultivaci uvedené rekombinantní hostitelské buňky za podmínek vhodných pro expresi genu.
8. Farmaceutický přípravek obsahující jako účinnou složku

beta-lipotropin, jeho analog nebo funkční fragment, společně s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, excipienty nebo ředidly.

g. Farmaceutický přípravek podle nároku 8, ve kterém uvedený beta-lipotropin je lidský beta-lipotropin.

10. Beta-lipotropin, jeho analog nebo funkční fragment, pro použití při léčení diabetu nebo jeho komplikací.

11. Způsob léčení diabetu u savce, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství beta-lipotropinu nebo jeho analogu.

12. Způsob léčení diabetu u savce, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství funkčního fragmentu beta-lipotropinu.

13. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedený beta-lipotropin je lidský beta-lipotropin, který má sekvence identifikovanou jako SEQ ID NO: 8.

14. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedený beta-lipotropin je rekombinantní lidský beta-lipotropin.

15. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedený diabetes je diabetes typu 1 nebo typu 2.

16. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedený savec je člověk.

17. Způsob léčení komplikací diabetu u pacienta, který má jeho potřebu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

18. Způsob snižování hladiny glukózy v krvi u savce, **vyznačující se tím**, že se podává účinné množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

19. Způsob léčení hyperglykémie u savce, který má jeho potřebu, **vyznačující se tím**, že se podává účinné množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

20. Způsob léčení hyperinzulínemie u savce, **vyznačující se tím**, že se podává účinné množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

21. Způsob zvyšování citlivosti na inzulín u savce, **vyznačující se tím**, že se podává účinné množství beta-lipotropinu, jeho analogu nebo funkčního fragmentu.

22. Způsob syntézy beta-lipotropinu, jeho analogu nebo fragmentu, v pevné fázi v jednom běhu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje následující kroky:

a) aktivace aminokyseliny která má chráněnu svoji α -amino skupinu a alternativně funkční skupinu postranního řetězce, pro vytvoření reaktivního esteru;

b) navázání uvedené aktivované aminokyseliny na inertní pevný nosič;

c) aktivace druhé chráněné aminokyseliny na ester, zatímco

α -amino skupina první aminokyseliny je zbavena ochrany pro získání reaktivního aminu a druhá aktivovaná aminokyselina se nechá reagovat s uvedenou první aminokyselinou pro vytvoření dipeptidu na pevném nosiči;

d) opakování kroků (a) až (c);

e) odstranění peptidu z pevného nosiče a deprotektace funkčních skupin postranních řetězců;

f) oddělení peptidu od pevného nosiče; a

g) čištění peptidu libovolným vhodným způsobem; přičemž,

h) jestliže BLT sekvence obsahuje tripeptidový segment ser-pro-pro, provádí se vícenásobná kopulace zbytků pro;

i) po ukončení kopulačního kroku se veškerý nezreagovaný a nechráněný peptid blokuje pro zabránění prodlužování řetězce delečního peptidu; a

j) pokud BLT sekvence obsahuje dipeptidovou sekvenci asp-gly, použije se N- α ochranná skupina na každém glycinovém zbytku, který předchází zbytek asp.

23. Způsob přípravy beta-lipotropinu podle nároku 1 **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky:

a. transformace vhodného hostitele vektorem exprese, kde uvedený vektor kóduje beta-lipotropin;

b. kultivace uvedeného transformovaného hostitele za podmínek, které umožňují expresi uvedeného beta-lipotropinu;

c. čištění uvedeného beta-lipotropinu libovolným vhodným způsobem.

24. Test aktivity beta-lipotropinu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky:

a) podávání testovaného proteinu savci, který vykazuje necitlivost na inzulin a zvýšenou hladinu glukózy v krvi; a

b) testování hladiny glukózy a inzulínu v krvi libovolným způsobem po provedení kroku (a).

25. Způsob, podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedený beta-lipotropin je zvolen ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 8.

26. Peptid, který má inzulinotropní aktivitu, zvolený ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 13.

27. Peptid, který má inzulinotropní aktivitu, zvolený ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

28. Peptid, který má inzulinotropní aktivitu, zvolený ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

29. Způsob léčení diabetu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství alespoň jednoho peptidu, zvoleného ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

30. Způsob léčení diabetu, **vyznačující se tím**, že zahrnuje podávání terapeuticky účinného množství alespoň jednoho peptidu, zvoleného ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, a SEQ ID NO: 13.

31. Farmaceutický přípravek zahrnující jako účinnou složku peptid, který má inzulinotropní aktivitu a je zvolen ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 25.

32. Funkční analog beta-lipotropinu.

33. Fragment beta-lipotropinu, který má inzulinotropní aktivitu *in vitro* nebo *in vivo*.

34. Funkční analog beta-lipotropinu, který je přibližně 90% až 95% identický se SEQ ID NO: 8, přičemž substituce aminokyselin jsou vybrány ze souboru sestávajícího z následujících substitucí:

zbytek v poloze 1 představuje alternativně Glu, Ala, Asp nebo Gln;

zbytek v poloze 2 představuje alternativně Leu, Ile, Val nebo Met;

zbytek v poloze 3 představuje alternativně Thr, Ala, Glu, Ser, Pro nebo Gly;

zbytek v poloze 4 představuje alternativně Gly, Arg, Ala,

Leu, Pro nebo Ser;
zbytek v poloze 5 představuje alternativně Glu, Gln, Asp,
Asn nebo Ala;
zbytek v poloze 6 představuje alternativně Arg, Glu, Leu,
Lys, Gln nebo Ala;
zbytek v poloze 7 představuje alternativně Leu, Pro, Asp,
Val, Ile nebo Met;
zbytek v poloze 8 představuje alternativně Arg, Glu, Ala,
Tyr, Leu, Lys, Pro, Gln nebo Trp;
zbytek v poloze 9 představuje alternativně Glu, Ala, Pro,
Asp, Asn nebo Gln;
zbytek v poloze 10 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Asp;
zbytek v poloze 11 představuje alternativně Asp, Arg, Pro,
Asn, Gln, Ala nebo Glu;
zbytek v poloze 12 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Met;
zbytek v poloze 13 představuje alternativně Pro, Glu, Gly
nebo Val;
zbytek v poloze 14 představuje alternativně Asp, Glu, Asn,
Gln nebo Gly;
zbytek v poloze 15 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo Glu;
zbytek v poloze 16 představuje alternativně Pro, Gln, Leu,
Gly nebo Glu;
zbytek v poloze 17 představuje alternativně Ala, Asp, Ser
nebo Gly;
zbytek v poloze 18 představuje alternativně Asp, Glu, Gln
nebo Asn;
zbytek v poloze 19 představuje alternativně Asp, Glu, Asn
nebo Gln;

zbytek v poloze 20 představuje alternativně Gly, Ser nebo Ala;

zbytek v poloze 21 představuje alternativně Ala, Gly, Ser nebo Phe;

zbytek v poloze 22 představuje alternativně Gly, Ala, Ser nebo Lys;

zbytek v poloze 23 představuje alternativně Ala, Phe, Thr, Gly, Ser nebo Leu;

zbytek v poloze 24 představuje alternativně Gln, Arg, Asp, Asn, Leu nebo Val;

zbytek v poloze 25 představuje alternativně Ala, Leu, Asp, Ile, Gly, Ser nebo Thr;

zbytek v poloze 26 představuje alternativně Asp, Glu, Gly, Asn, Gln nebo Lys;

zbytek v poloze 27 představuje alternativně Leu, Ala, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 28 představuje alternativně Glu, Gln, Asn nebo Asp;

zbytek v poloze 29 představuje alternativně His, Asn, Tyr, Ala, Gln nebo Glu;

zbytek v poloze 30 představuje alternativně Ser, Gly, Glu, Ala, Leu nebo Asp;

zbytek v poloze 31 představuje alternativně Leu, Ala, Val, Met nebo Ile;

zbytek v poloze 32 představuje alternativně Leu, Ala, Val, Ile, Met nebo Pro;

zbytek v poloze 33 představuje alternativně Val, Ala, Glu, Leu, Ile, Met nebo Arg;

zbytek v poloze 34 představuje alternativně Ala, Ser, Pro, Glu nebo Gly;

zbytek v poloze 35 představuje alternativně Ala, Asp, Gly,

Ser nebo Leu;
zbytek v poloze 36 představuje alternativně Glu, Ala, Thr,
Leu, Asp, Asn nebo Gln;
zbytek v poloze 37 představuje alternativně Lys, Glu, Thr,
Arg, Gln nebo Asp;
zbytek v poloze 38 představuje alternativně Lys, Arg, Gln
nebo Glu;
zbytek v poloze 39 představuje alternativně Asp, Ala, Asn,
Glu, Gln nebo Lys;
zbytek v poloze 40 představuje alternativně Glu, Ser, Asp,
Asn, Gln nebo Gly;
zbytek v poloze 41 představuje alternativně Gly, Ala nebo
Ser;
zbytek v poloze 42 představuje alternativně Pro, Gly, Ser
nebo Asn;
zbytek v poloze 43 představuje alternativně Tyr, Phe nebo
Trp;
zbytek v poloze 44 představuje alternativně Arg, Lys, Gln
nebo Glu;
zbytek v poloze 45 představuje alternativně Met, Ile, Ser
nebo Val;
zbytek v poloze 46 představuje alternativně Glu, Gln, Asp,
Asn, His, Arg nebo Gly;
zbytek v poloze 48 představuje alternativně Tyr nebo Trp;
zbytek v poloze 49 představuje alternativně Arg nebo Lys;
zbytek v poloze 50 představuje alternativně Trp, Tyr nebo
Phe;
zbytek v poloze 51 představuje alternativně Gly, Ala, Ser
nebo gln;
zbytek v poloze 52 představuje alternativně Ser, Thr, Asn
nebo Ala;

zbytek v poloze 53 představuje alternativně Pro nebo Gly;
zbytek v poloze 54 představuje alternativně Pro, Ala, Gly,
Arg, Leu nebo Thr;
zbytek v poloze 55 představuje alternativně Lys, Arg, Gln
nebo Ala;
zbytek v poloze 56 představuje alternativně Asp, Asn, Glu,
Gln, Ala, Gly nebo Ile;
zbytek v poloze 57 představuje alternativně Lys, Gln nebo
Arg;
zbytek v poloze 58 představuje alternativně Arg, Gln nebo
Lys ;
zbytek v poloze 59 představuje alternativně Tyr, Phe nebo
Trp;
zbytek v poloze 60 představuje alternativně Gly, Ala nebo
Ser;
zbytek v poloze 61 představuje alternativně Gly, Ala nebo
Ser;
zbytek v poloze 62 představuje alternativně Phe, Tyr nebo
Trp;
zbytek v poloze 63 představuje alternativně Met, Leu, Ile
nebo Val;
zbytek v poloze 64 představuje alternativně Thr, Ala, Ser
nebo Lys;
zbytek v poloze 65 představuje alternativně Ser, Ala, Thr
nebo Pro;
zbytek v poloze 66 představuje alternativně Glu, Asp, Asn,
Lys nebo Gln;
zbytek v poloze 67 představuje alternativně Lys, Arg nebo
Gln;
zbytek v poloze 68 představuje alternativně Ser, Ala, Thr
nebo Gly;

zbytek v poloze 69 představuje alternativně Gln, Glu, Asp, Asn, Arg nebo His;

zbytek v poloze 70 představuje alternativně Thr, Ser, Ala nebo Lys;

zbytek v poloze 71 představuje alternativně Pro nebo Gly

zbytek v poloze 72 představuje alternativně Leu, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 73 představuje alternativně Val, Leu, Ile nebo Met;

zbytek v poloze 74 představuje alternativně Thr, Ala nebo Ser;

zbytek v poloze 75 představuje alternativně Leu, Ile, Met nebo Val;

zbytek v poloze 76 představuje alternativně Phe, Tyr, Trp nebo Leu;

zbytek v poloze 77 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 78 představuje alternativně Asn, Asp, Glu, Gln nebo His;

zbytek v poloze 79 představuje alternativně Ala, Gly, Ser, Ile nebo Val;

zbytek v poloze 80 představuje alternativně Ile, Leu, Met, Val nebo Thr;

zbytek v poloze 81 představuje alternativně Ile, Met, Val, Thr nebo Leu;

zbytek v poloze 82 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 83 představuje alternativně Asn, Asp, Glu, Gln nebo Ser;

zbytek v poloze 84 představuje alternativně Ala, Val, Ser, Gly nebo Glu;

zbytek v poloze 85 představuje alternativně Tyr, Phe, Trp nebo His;

zbytek v poloze 86 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 87 představuje alternativně Lys, Gln nebo Arg;

zbytek v poloze 88 představuje alternativně Gly, Ala nebo Ser;

zbytek v poloze 89 představuje alternativně Glu, Gln, Asp, Asn nebo His.

35. Funkční analog beta-lipotropinu podle nároku 34, kde analog je přibližně mezi 95% a 99% identický se SEQ ID NO: 8.

36. Peptid, který má inzulinotropní aktivitu, zvolený ze souboru sestávajícího z SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22.

37. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že v kroku:
h) pokud BLT sekvence obsahuje tripeptidový segment ser-pro-pro, provádí se dvojitá kopulace zbytků pro a ser;
i) po ukončení kopulačního kroku se veškerý nezreagovaný nechráněný peptid je blokuje anhydridem pro zabránění prodlužování řetězce delečního peptidu.

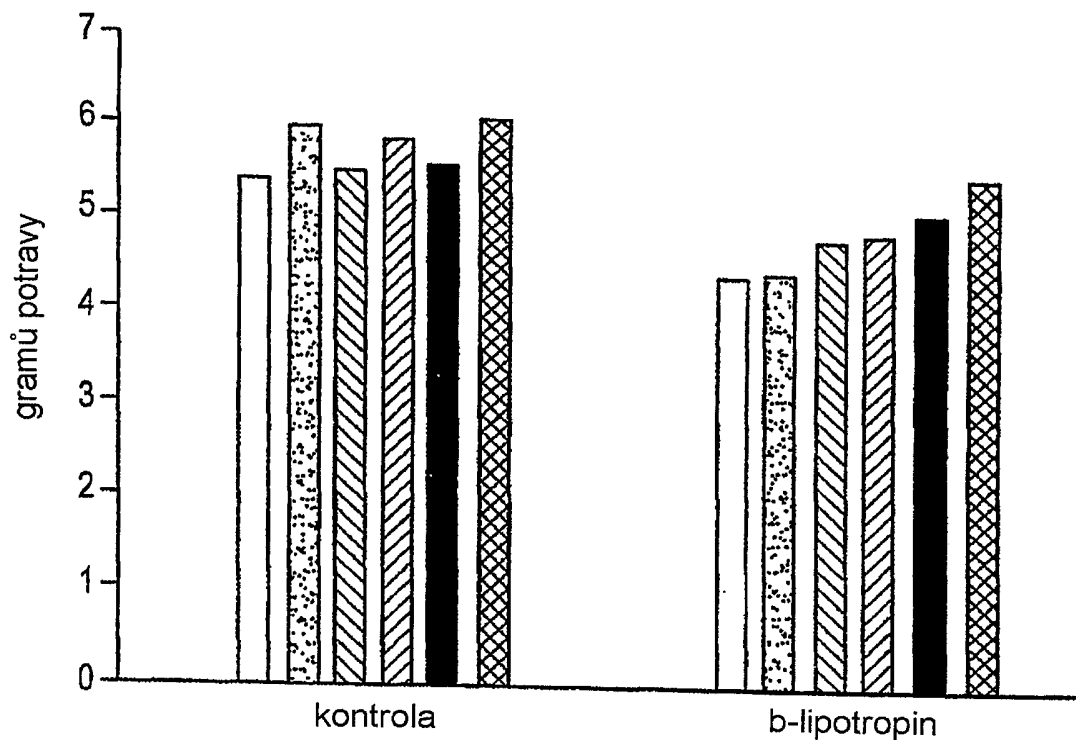
38. Způsob podle nároku 37, **vyznačující se tím**, že v kroku:
j) uvedená N- α ochrana zahrnuje N- α -Hmb nebo methylbenzoát.







39. Funkční analog beta-lipotropinu, který je alespoň 90% identický se SEQ ID NO: 8.

Zastupuje:

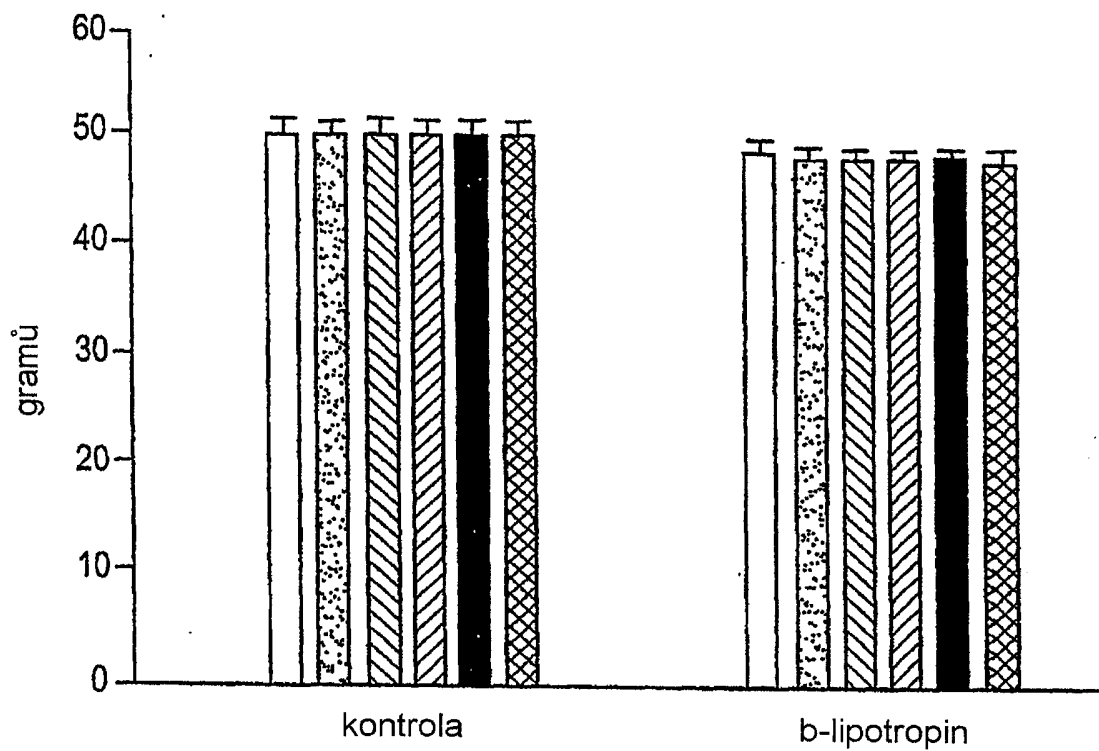
Dr. Otakar Švorčík







Obr. 1



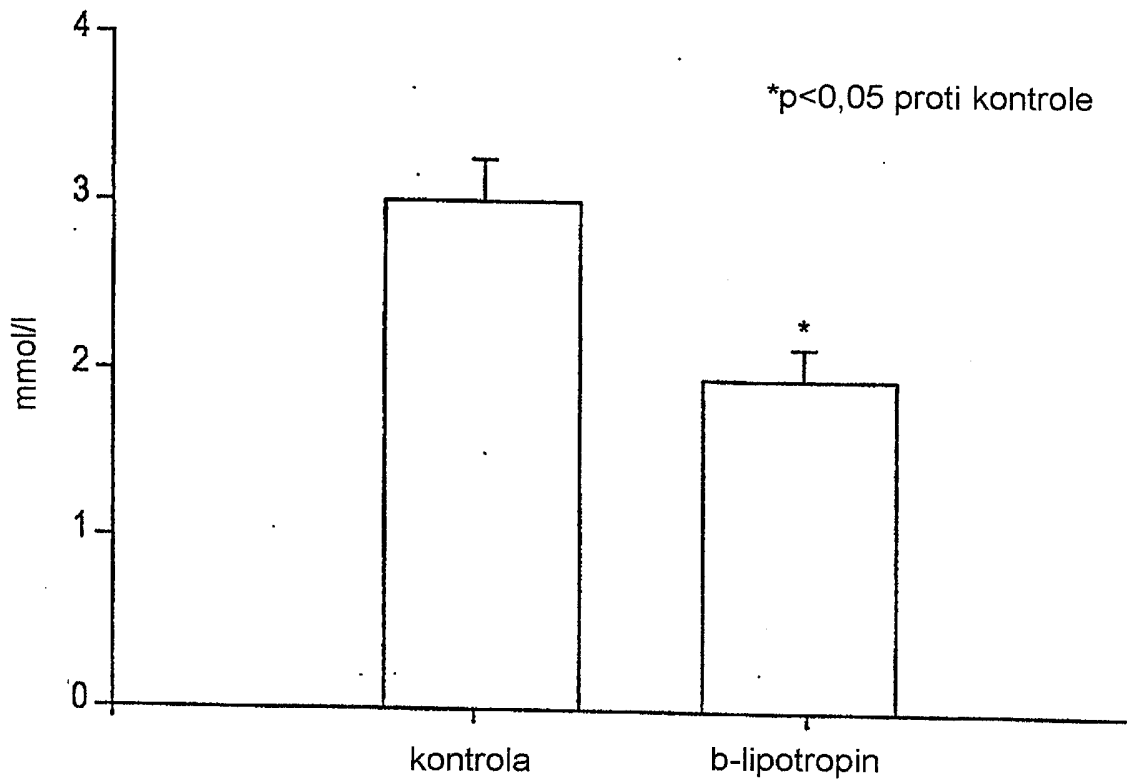
-  gramů potravy snědené den 1 před podáním b-lipotropinu nebo vehikula
-  gramů potravy snědené den 1 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  gramů potravy snědené den 2 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  gramů potravy snědené den 3 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  gramů potravy snědené den 4 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  gramů potravy snědené den 5 po podání b-lipotropinu nebo vehikula

Obr. 2

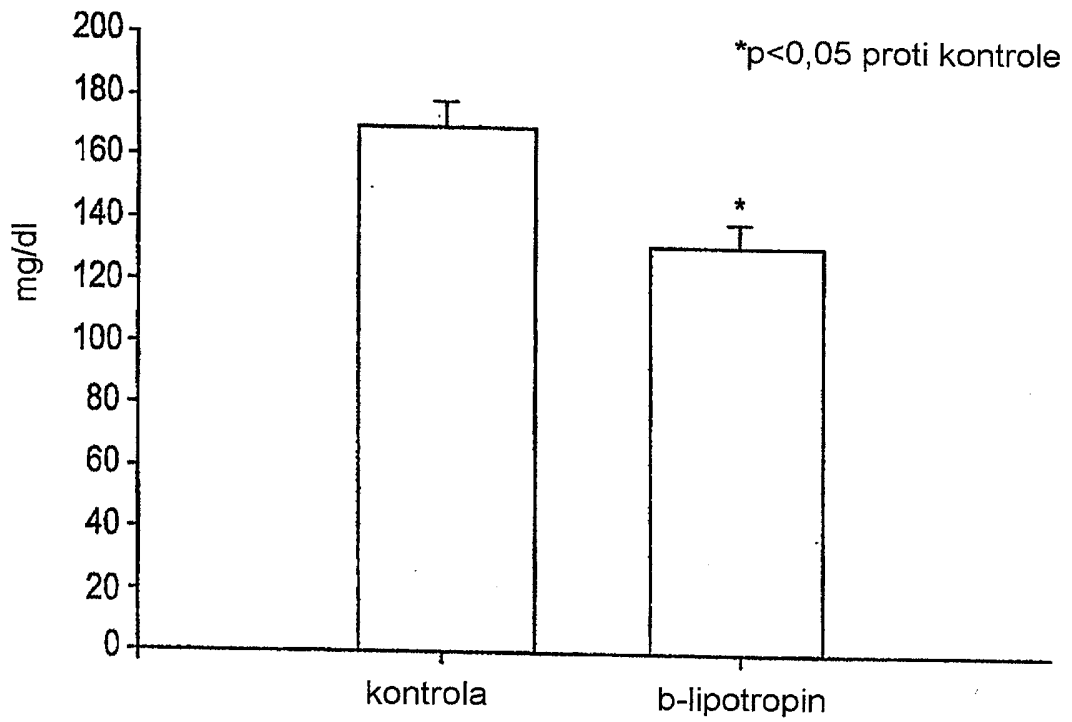


-  tělesná hmotnost před podáním b-lipotropinu nebo vehikula
-  tělesná hmotnost den 1 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  tělesná hmotnost den 2 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  tělesná hmotnost den 3 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  tělesná hmotnost den 4 po podání b-lipotropinu nebo vehikula
-  tělesná hmotnost den 5 po podání b-lipotropinu nebo vehikula

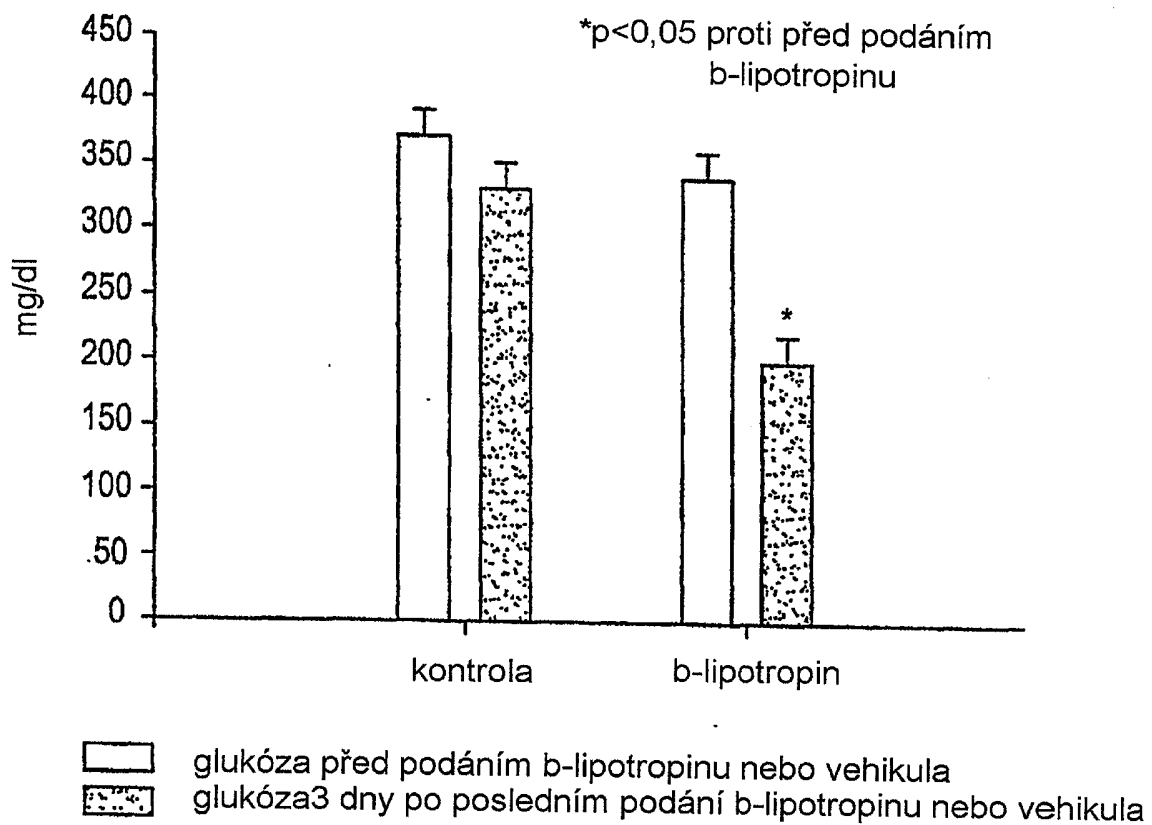
Obr. 3



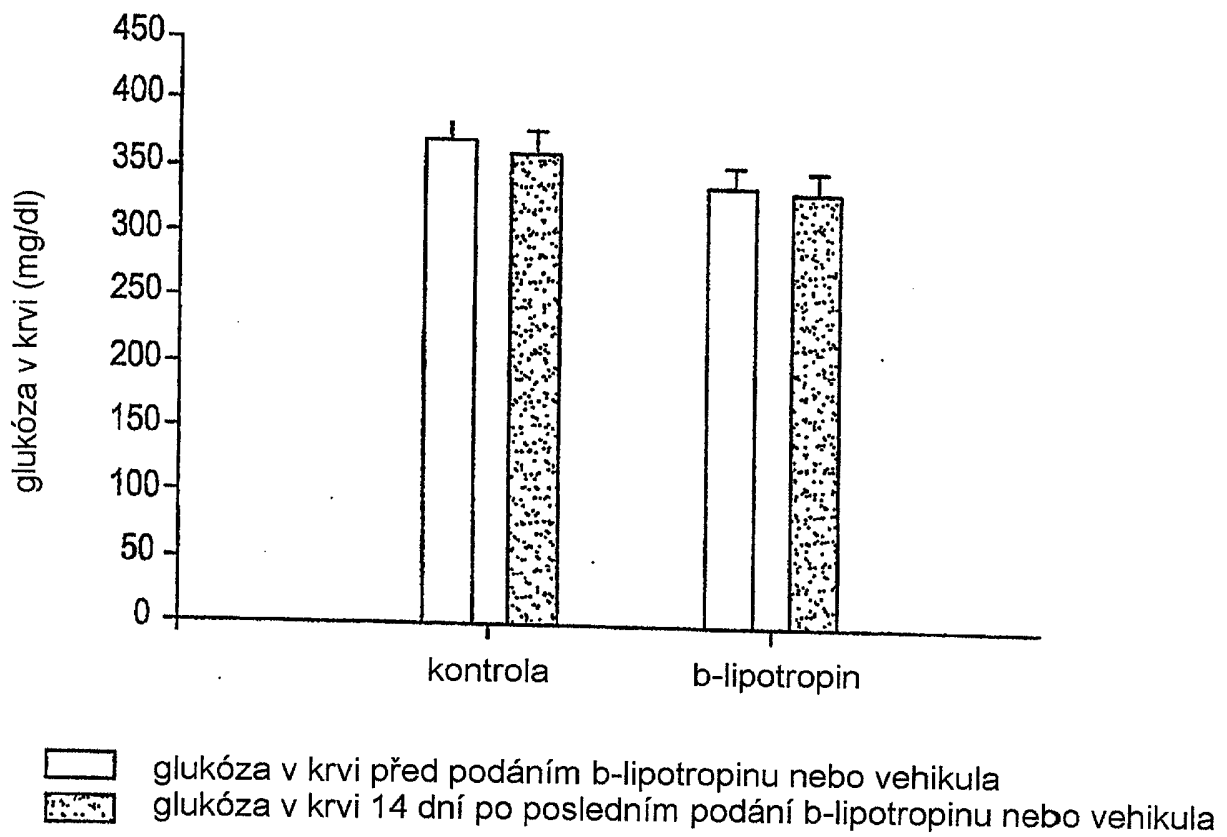
Obr. 4



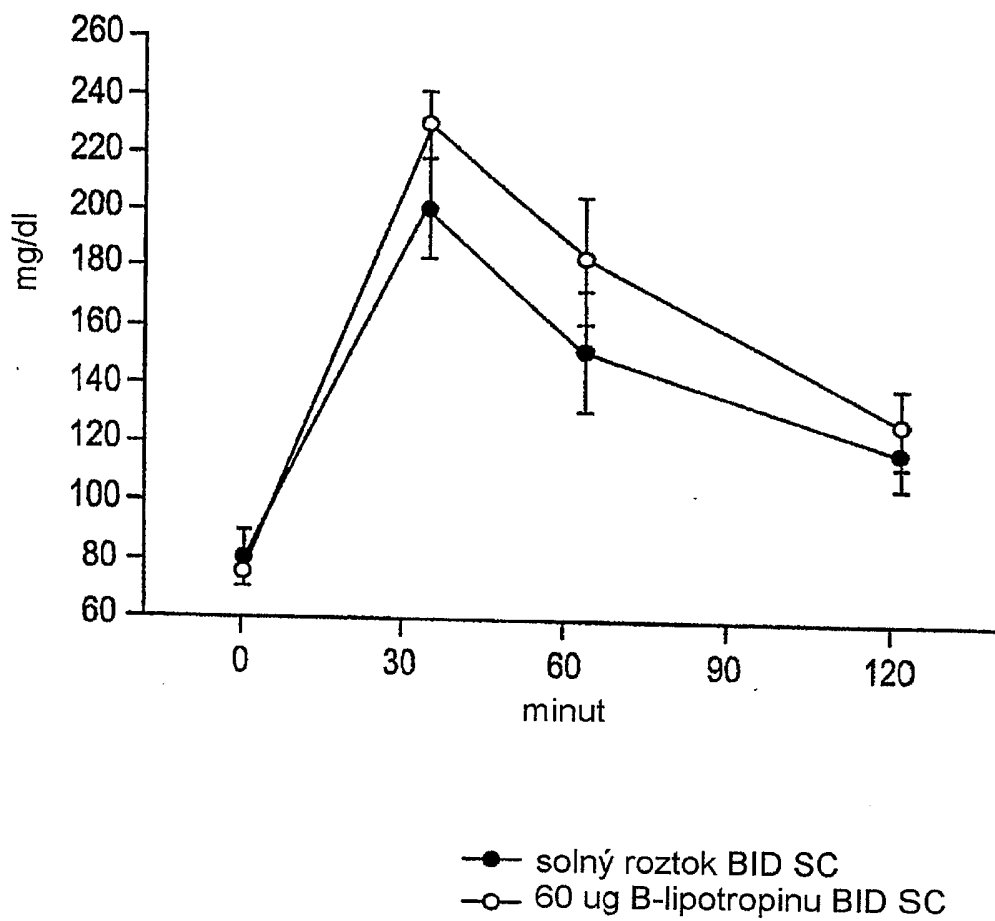
Obr. 5



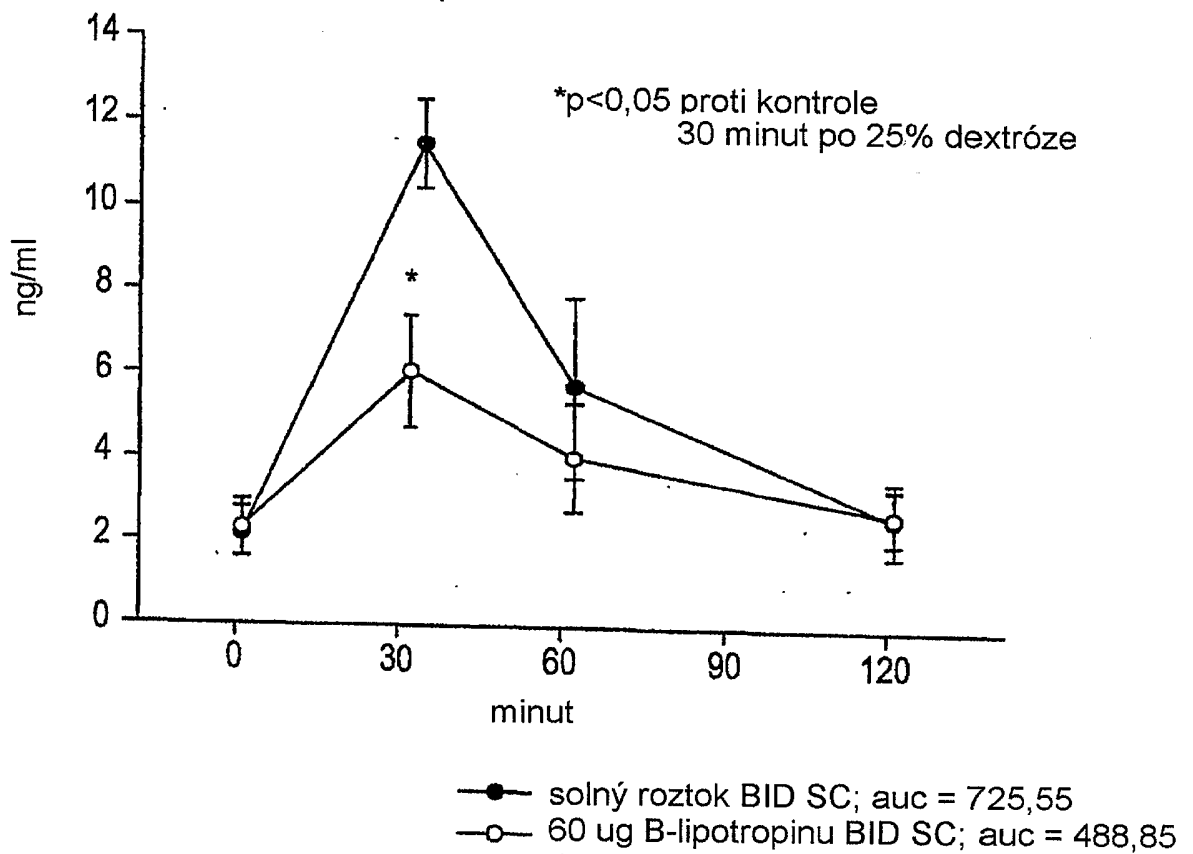
Obr. 6



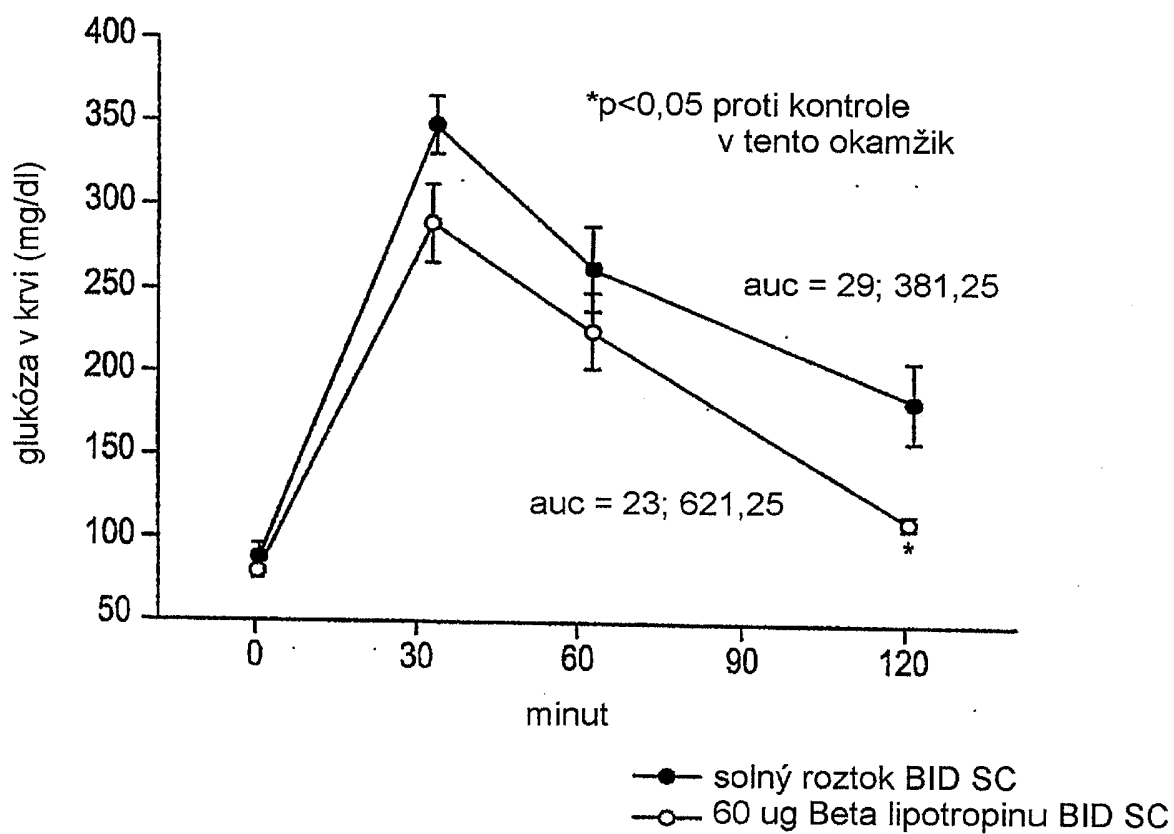
Obr. 7



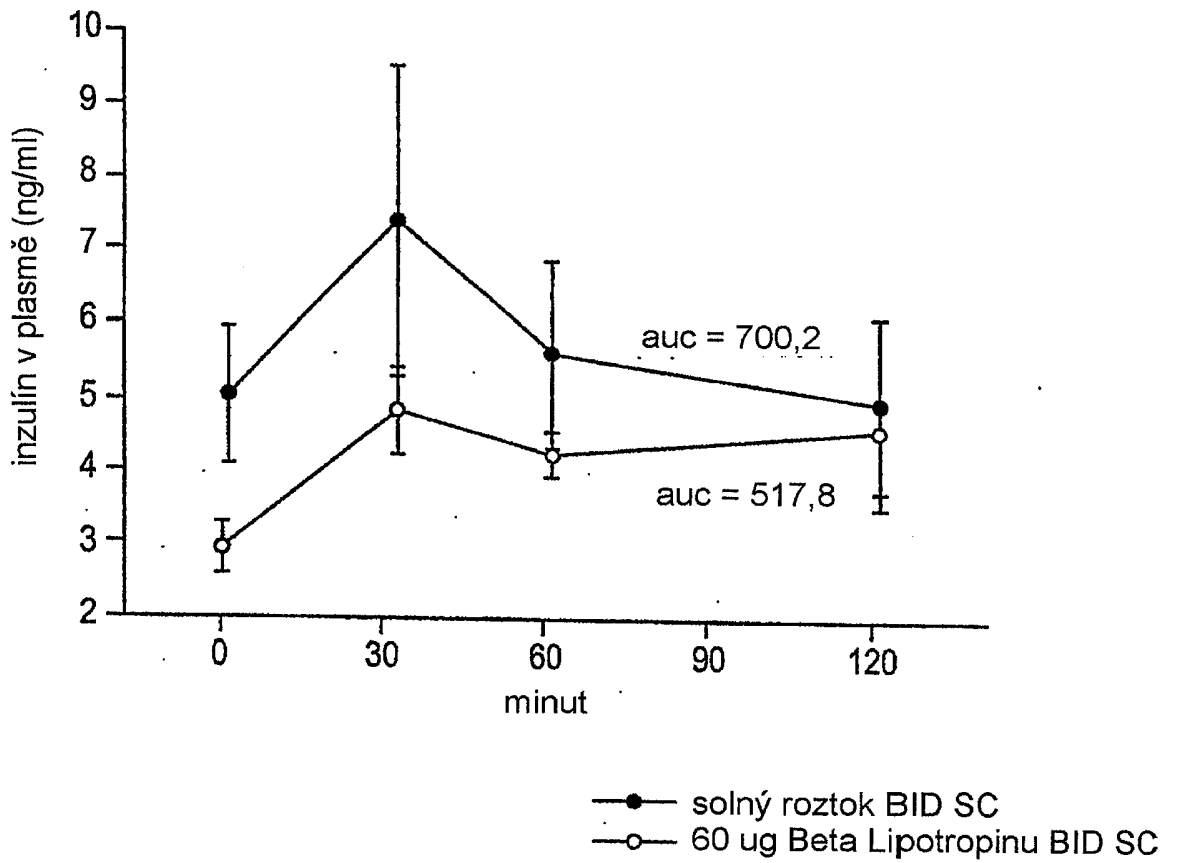
Obr. 8



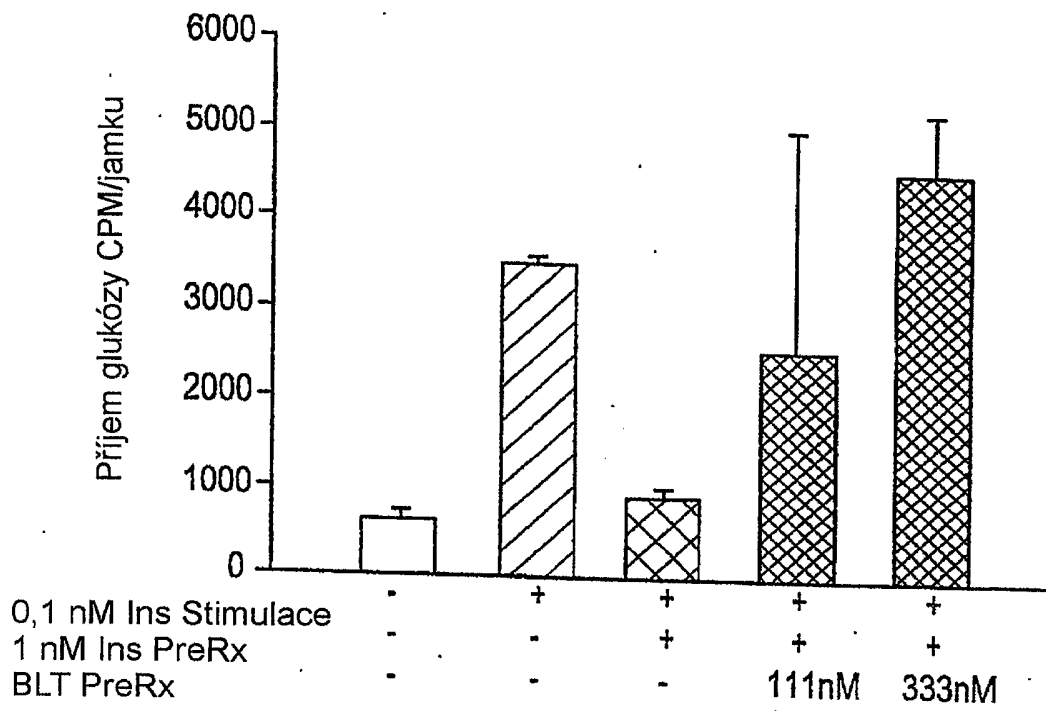
Obr. 9



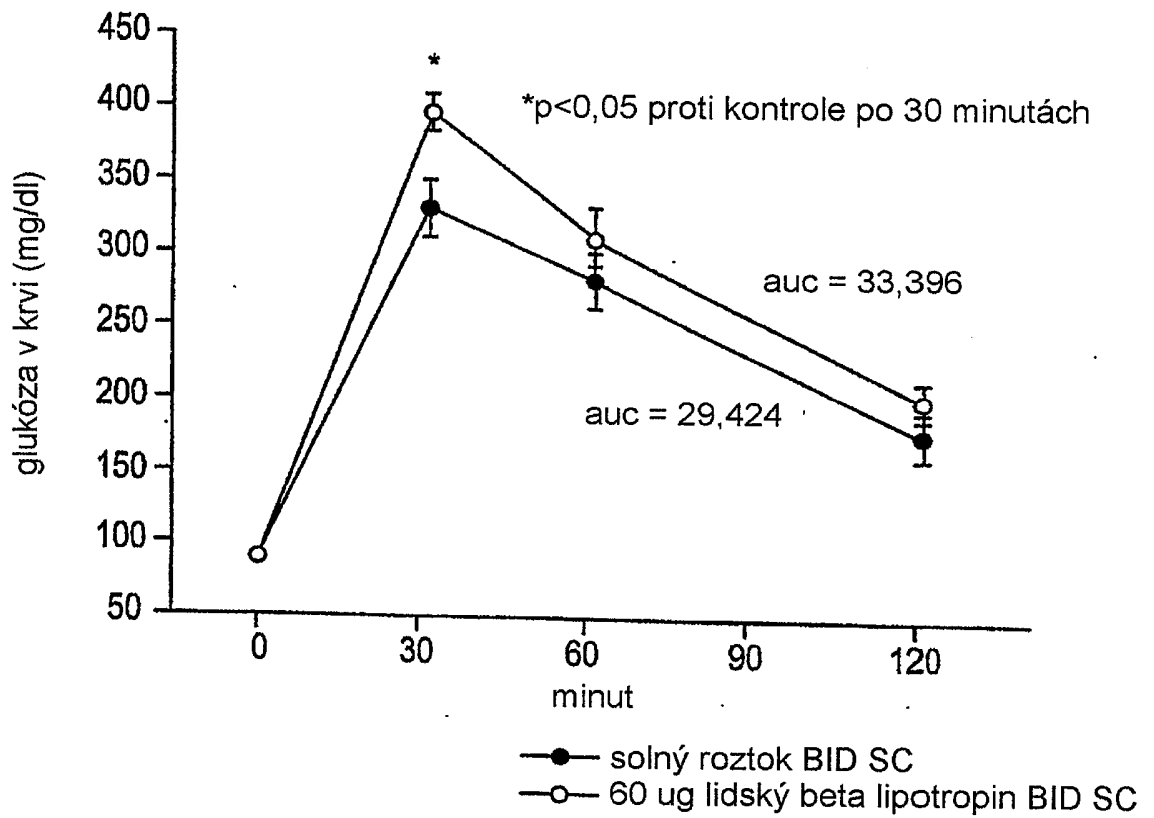
Obr. 10



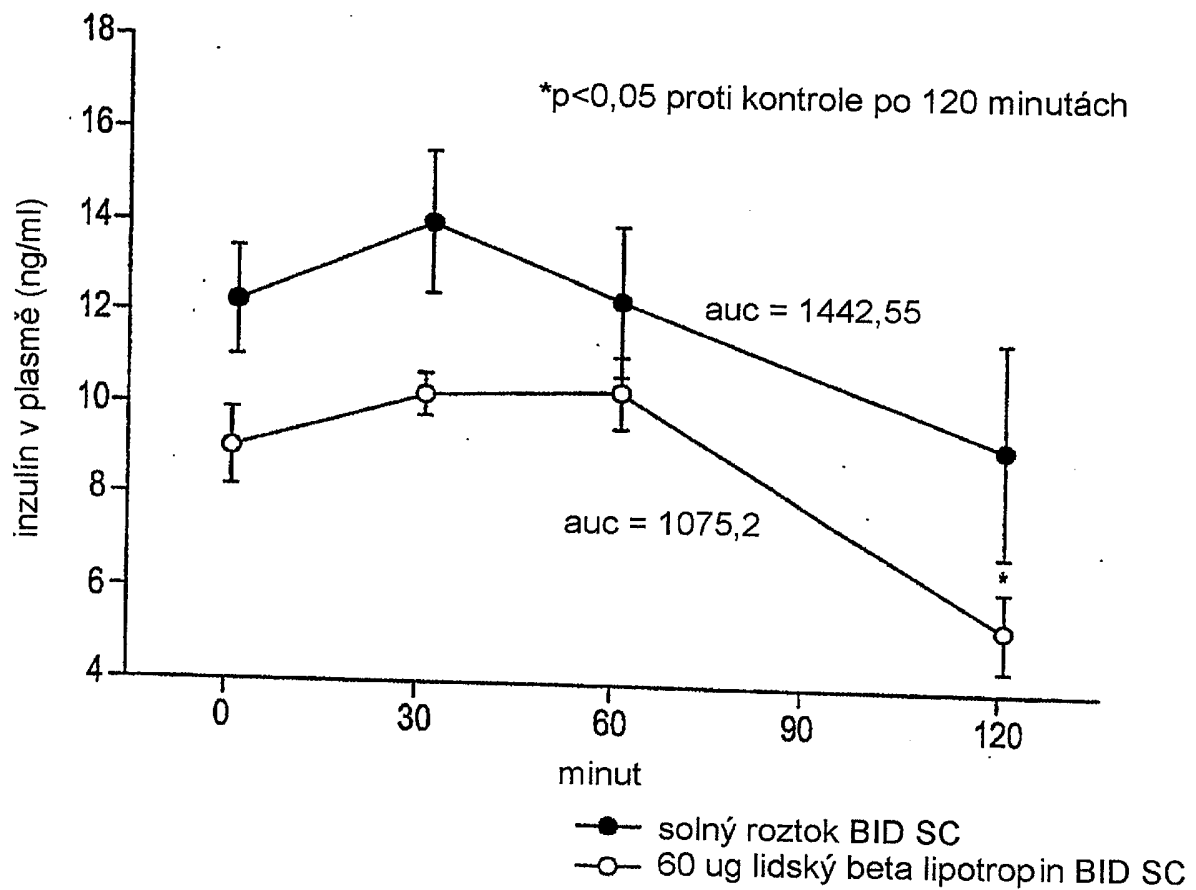
Obr. 11



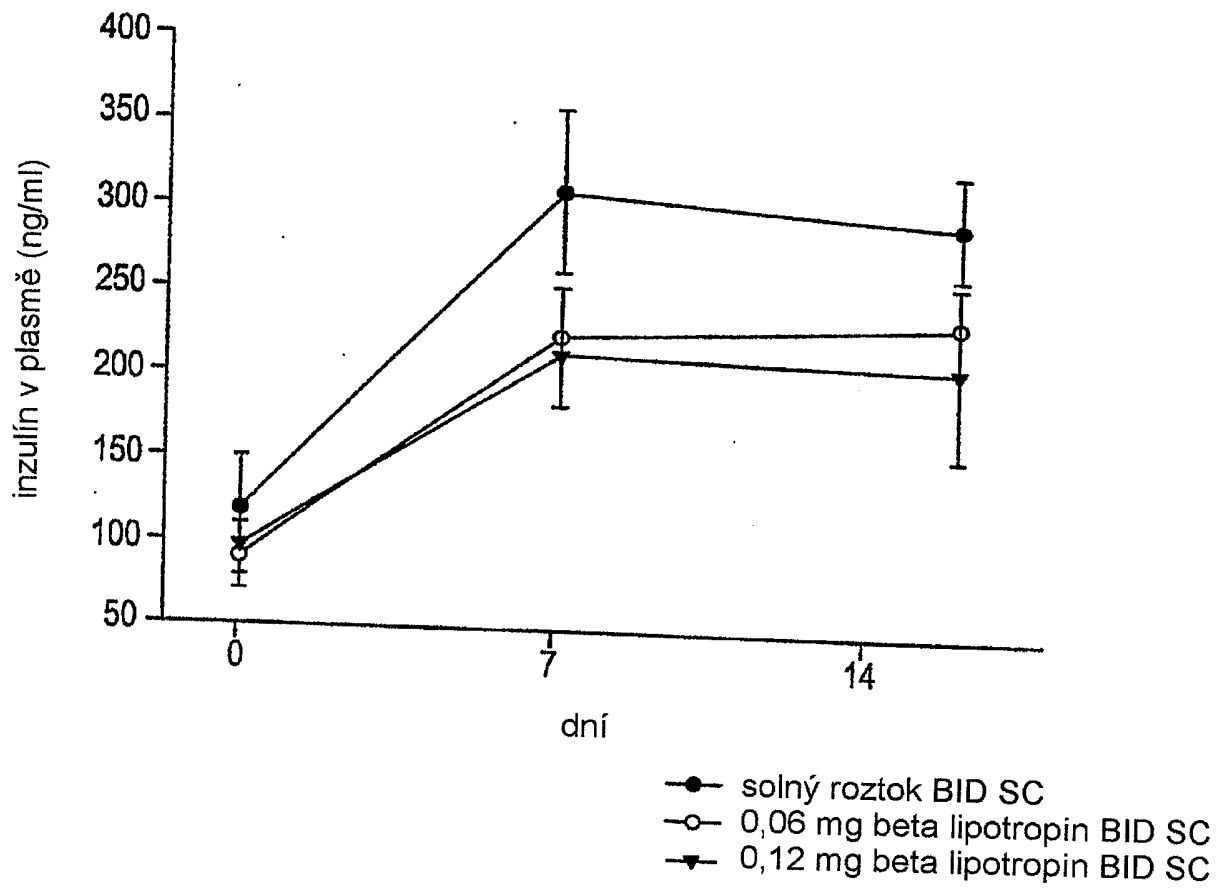
Obr. 12



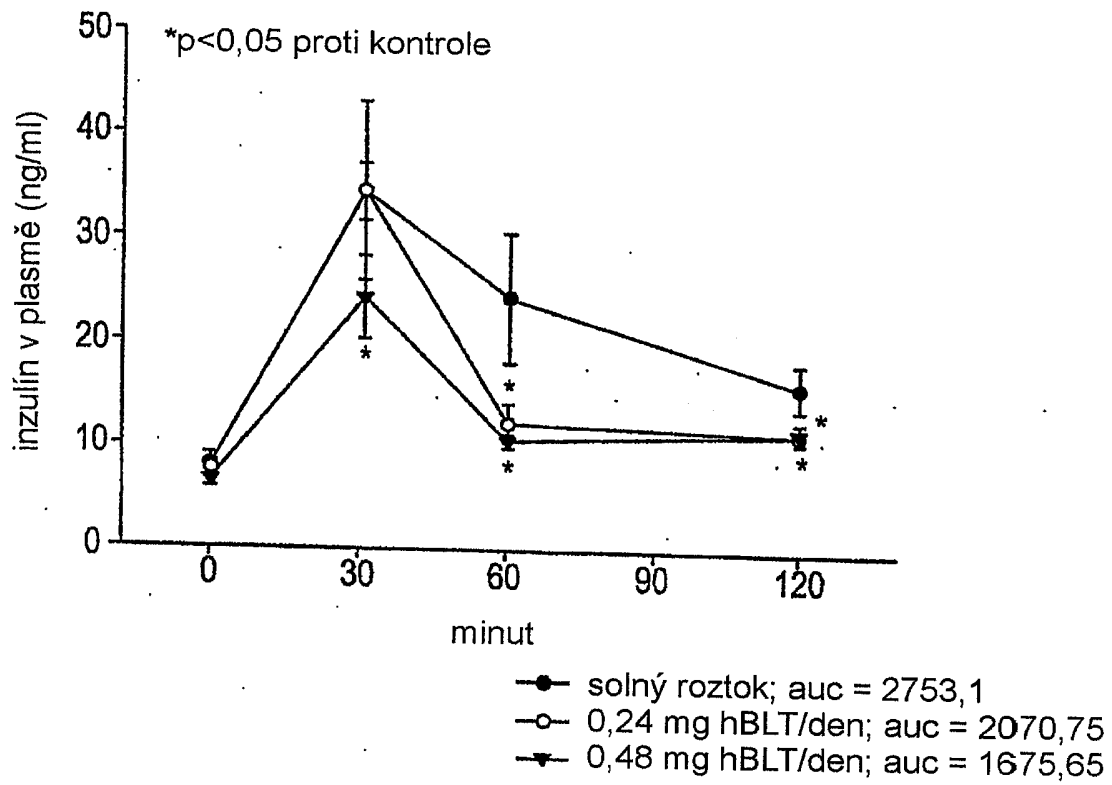
Obr. 13



Obr. 14



Obr. 15A



Obr. 15B

