P03 03194

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

DKK-1 és antagonistái alkalmazásai

KIVONAT

A találmány tárgya Dickkopf-1 (Dkk-1) fehérjék antagonistáinak alkalmazása inzulinrezisztenziával - például nem inzulinfüggő *diabetes mellitus* (NIDDM), *hipoinsulinaemia* - és izomsorvadással, traumával vagy degenerációval járó elváltozások kezelésére szolgáló gyógyszerek, készítmények, illetve készletek előállítására. Előnyös, ha az antagonisták a Dkk-1 hatásainak gátlására alkalmas, Dkk-1 elleni antitesteket tartalmaznak. Továbbá, a találmány tárgya készletek elhízottság vagy *hiperinzulinémia* kezelésére emlősben, továbbá Dkk-1 alkalmazása emlősben ilyen rendellenességek kezelésére szolgáló készítmények előállítására. Továbbá, a találmány tárgyát képezik inzulinnal szembeni rezisztencia, *hiper-* vagy *hipoinzulinémia*, elhízottság és ezekkel rokon elváltozások diagnosztizálására szolgáló eljárások Dkk-1-et, és *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, embertől különböző, transzgénikus állatok alkalmazásával.

P03 03194

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A2

DKK-1 és antagonistái alkalmazásai

A találmány tárgya Dickkopf-1 (Dkk-1) fehérjék antagonistáinak alkalmazása inzulinrezisztenziával és izomsorvadással, traumával vagy degenerációval járó elváltozások kezelésére szolgáló gyógyszerek, készítmények, illetve készletek előállítására. Előnyös, ha az antagonisták a Dkk-1 hatásainak gátlására alkalmas, Dkk-1 elleni antitesteket tartalmaznak. Továbbá, a találmány tárgya készletek elhízottság vagy *hiperinzulinémia* kezelésére emlősben, továbbá Dkk-1 alkalmazása emlősben ilyen rendellenességek kezelésére szolgáló készítmények előállítására. Továbbá, a találmány tárgyát képezik inzulinnal szembeni rezisztencia, *hiper-* vagy *hipoinzulinémia*, elhízottság és ezekkel rokon elváltozások diagnosztizálására szolgáló eljárások.

A Dickkopf-1 (dkk) fehérjék, Wnt aktivitást módosító, szekretálódó fehérjék csoportját képezik [Krupnik és mtsai., Gene 238, 301-313 (1999); Monaghan és mtsai., Mech. Dev. 87, 45-56 (1999); Roessler és mtsai., Cell Genet. 89, 220-224 (2000)]. E családnak négy tagja van, amelyek egymáshoz igen hasonlóak, és két konzervált, ciszteinben gazdag domént tartalmazó tagból állnak [WO 00/52047 sz. nemzetközi közzétételi irat (2000. szeptember 8.)].

A Dkk-1-et [WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi irat (199, szeptember 16.), amelyben a Dkk-1-et, a DNA57530 által kódolt PRO1008-nak nevezték; WO 00/18914 sz. nemzetközi közzétételi irat (2000. április 6.); WO 00/52047 sz. nemzetközi közzétételi irat (2000. szeptember 8.); WO 98/46755 sz. nemzetközi közzétételi irat (1998. október 22.)] elsőként a *Xenopus* fejének kialakulását, a Wnt szignál gátlása útján indukáló fehérjeként azonosították [Glinka és mtsai., Nature 391, 357-362 (1998)], majd ezt követően kimutatták, hogy részt vesz a végtagok fejlődésében [Grotewold és mtsai., Mech. Dev. 89, 151-153 (1999)] és gátolja a Wnt-által indukált morfológiai transzformációt [Fedi és mtsai., J. Biol. Chem. 274, 19465-19472 (1999)].

Újabb vizsgálatok szerint, a Dkk-k úgy működnek, hogy a Wnt-jelátvitelben társreceptorként funkcionáló, az alacsony sűrűségű lipoproteinekkel rokon LRP6 fehérjéhez kötődnek [Mao és mtsai., Mol. Cell. 7, 801-809 (2001); Pinson és mtsai., Nature 407, 535-538 (2000); Tamai és mtsai., Nature 407, 530-535 (2000); Wehrli és mtsai., Nature 407, 527-530 (2000)]. A Dkk úgy antagonizálja a Wnt-jelátvitelt, hogy az LRP6-nak azon doménjeihez kötődik, amelyek nem vesznek részt a Wnt-vel és „Frizzled" (bodros) fehér-

jével történő kölcsönhatásban, gátolva ezzel az LRP6-által közvetített Wnt/β-katenin jelátvitelt [Bafico és mtsai., Nat. Cell. Biol. 3, 638-686 (2001); Mao és mtsai., Nature 411, 321-325 (2001); Semenov és mtsai., Curr. Biol. 11, 951-961 (2001)].

A Wnt családba tartozó fehérjék kulcsszerepet játszanak az embrionális fejlődésben és különféle sejttípusok differenciálódásában [Peifer és Polakis, Science 287, 1606-1609 (2000)]. A Wnt szignálútvonal a szekretálódott Wnt-k és receptorai, a „Frizzled" fehérjék közötti kölcsönhatás útján aktiválódik [Hlsken és Behrens, J. Cell. Sci. 113, 3545-3546 (2000)], amely folyamatban az LDL-receptorral rokon LRP5 és LRP6 fehérjék társreceptorként működnek [Mao és mtsai., mint fenn; Pinson és mtsai., mint fenn; Wehrli és mtsai., mint fenn]. A Wnt-jelátvitel ez utáni hatásai közé tartozik a rendezetlen (*disheveled*) (Dvl1) fehérje aktiválása, mely eredményeként az Akt aktiválódik és az axin-β-katenin-GSK3β-APC komplexhez gyűlik („recruitment") [Fukumoto és mtsai., J. Biol. Chem. 276, 17479-17483 (2001)]. Ezt követi a GSK3β foszforilálódása és inaktiválása, amely eredményeként a β-katenin foszforilációja és degradálódása gátlást szenved. A felgyülemlett β-katenin a sejtmagban transzlokálódik, ahol kölcsönhatásba lép a limfoid enhancer faktor – T sejtfaktor (LEF/TCF) családba tartozó transzkripciós faktorokkal és indukálják a célgének transzkripcióját.

A Wnt-jelátvitel későbbi szakaszainak két effektora, az Akt és GSK3β, kulcsfontosságú intermedier az inzulin-jelátviteli útvonalban, illetve a glükózmetabolizmusban. Wnt-jelátvitel vesz részt az izmok differenciálódásának szabályozásában [Borello és mtsai., Development 126, 4247-4255 (1999); Cook és mtsai., EMBO J. 15, 4526-4536 (1996); Cossu és Borello, EMBO J. 18, 6867-6872 (1999); Ridgeway és mtsai., J. Biol. Chem. 275, 32398-32405 (2000); Tian és mtsai., Development 126, 3371-3380 (1999); Toyofuku és mtsai., J. Cell. Biol. 150, 225-241 (2000)] és a zsírképződésben [Ross és mtsai., Science 289, 950-953 (2000)], illetve a Wnt-jelátvitel gátlása serkentheti a miociták zsírsejtekké történő transzdifferenciálódását [Ross és mtsai., mint fenn].

Wnt/Wg-vel kiegészített tápoldattal végzett rövid idejű kezelés nem eredményezett Akt aktiválást és a GSK3β foszforilálódását a Ser9 aminosavon, bár szabad β-katenin akkumulálódott a citoszolban [Ding és mtsai., J. Biol. Chem. 275, 32475-32481 (2000)]. Ezzel szemben, Wnt-vel végzett elhúzódó vagy konstitutív stimuláció az Akt aktiválását és az Akt, Wnt-jelátvitelben történő részvételét eredményezte [Fukumoto és mtsai., mint fenn]. HepG2 sejtekben az inzulin jelátvitel két szignálútvonal révén serkenti a β-katenint, a Wnt-jelátvitel egyik intermedierjét: a PI3 kináz és Akt aktiválása eredményeként a

GSK3β gátlása, illetve a Ras aktiválása útján [Desbois-Mouthon és mtsai., Oncogene 20, 252-259 (2001)]. Azonban 293, C57 és CHOIR sejtekben, az inzulin nem befolyásolja a β-katenin szintjeit a citoszolban, és ennél lényegesebb, hogy e sejtekben a Wnt nem szabályozza sem a GSK3β Ser9 aminosavának foszforilációs állapotát, sem pedig a B-fehérjekináz aktivitását [Ding és mtsai., mint fenn].

Az inzulinnal szembeni rezisztencia olyan állapot, amelyben az inzulin jelenléte a normálisnál gyengébb biológiai választ vált ki. Klinikai értelemben, akkor beszélünk inzulinrezisztenciáról, ha normális vagy megemelkedett inzulinszintek jelenlétében a vérben a glükóz szintje normális vagy megemelkedett. Ez lényegében akkor jelentkezik, ha a glikogén - alapszintű vagy inzulin által serkentett, vagy mindkettő - szintézisének gátlása a normál szint alá csökken. Az inzulinnal szembeni rezisztencia fontos szerepet játszik a 2. típusú diabetesben, amit az a tény demonstrál, hogy a 2. típusú diabetes során tapasztalt hiperglikémia néha visszafordítható megfelelő diétával vagy súlyvesztéssel (fogyással), amelynek következtében a perifériális szövetek inzulinnal szembeni érzékenysége érzékelhetően visszaáll.

Elfogadott, hogy az inzulinnal szembeni rezisztencia rendszerint az inzulin receptorának jelátviteli rendszerében, az inzulin a receptorhoz való kötődése utáni lépésben bekövetkezett károsodás eredménye. Az inzulinnal befolyásolható főbb szövetekben (izom, máj, zsír) az inzulinnal szemben tapasztalt rezisztenciát tárgyaló felgyülemlett tudományos bizonyítékok szerint, az inzulin jelátvitelében fennálló károsodás e kaszkád korai lépéseit, ezek közül specifikusan az inzulin receptorának kinázaktivitását, érinti. A károsodás következtében a kinázaktivitás, úgy tűnik, lecsökken [Haring, Diabetologia 34, 848 (1991)].

Számos, a glükóz transzportrendszerére, mint az ilyen, receptor utáni károsodás potenciális helyére, irányuló kutatás kimutatta, hogy az inzulinra érzékeny glükóztranszporter (GLUT4) mennyisége és funkciója hibás bizonyos rágcsálók és emberek inzulinra rezisztens stádiumaiban [Garvey és mtsai., Science 245, 60 (1989); Sivitz és mtsai., Nature 340, 72 (1989); Berger és mtsai., Nature 340, 70 (1989); Kahn és mtsai., J. Clin. Invest. 84, 404 (1989); Charron és mtsai., J. Biol. Chem. 265, 7994 (1990); Dohm és mtsai., Am. J. Physiol. 260, E459 (1991); Sinha és mtsai., Diabetes 40, 472 (1991); Friedman és mtsai., J. Clin. Invest. 89, 701 (1992)]. Inzulinra szenzitív glükóztranszporterek normális készletének hiánya következtében egy adott egyed- elméletileg - lehet inzulinra rezisztens [Olefsky és mtsai., Diabetes Mellitus, 121-153, szerk.: Rifkin és Porte, Jr., kiad.: Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York (1990)]. Azonban, né-

hány kísérletben nem sikerült a GLUT4 lecsökkent szabályozottságát kimutatni emberi NIDDM-ben, különösen, a glükóz elhelyezésének legfőbb helyében, az izomban [Bell, Diabetes 40, 413 (1990); Pederson és mtsai, Diabetes 39, 865 (1990); Handberg és mtsai., Diabetologia 33, 625 (1990); Garvey és mtsai, Diabetes 41, 465 (1992)].

Állatrendszerekben és klinikai kísérletekben végzett tanulmányokból származó bizonyítékok jelzik, hogy a 2. típusú diabetes esetén fennálló inzulinnal szembeni rezisztencia létrejöhet az inzulin jelátviteli rendszer intermedierjei expressziójának vagy aktivitásának megváltozása, az inzulin által serkentett glükóztranszport arányának megváltozása vagy a GLUT4-nek a plazmamembránba való transzlokációjának megváltozása eredményeként [Zierath és mtsai., Diabetologia 43, 821-835 (2000)]. Állatokon végzett kísérletekből származó bizonyítékok szerint az inzulin-jelátviteli rendszer izomban tapasztalható hiányossága megváltoztatja az egész szervezet glükóz-homeosztázisát [Saad és mtsai., J. Clin. Invest. 90, 1839-1849 (1992); Folli és mtsai., J. Clin. Invest. 92, 1787-1794 (1993); Heydrick és mtsai., J. Clin. Invest. 91, 1358-1366 (1993); Saad és mtsai., J. Clin. Invest. 92, 2065-2072 (1993); Heydrick és mtsai., Am. J. Physiol. 268, E604-612 (1995)], és inzulinra rezisztens és 2. típusú diabeteses alanyok vázizomzatában az – IR-t, IRS-1-et és PI3-kinázt magábanfoglaló – inzulin-szignálkaszkád intermedierjeinek hiányossága csökkent glükóztranszportot és az inzulin által serkentett GLUT4 csökkent transzlokációját eredményezheti.

Bizonyos példákban, megváltozott IRS-1 [Saad és mtsai., (1992) mint fenn; Saad és mtsai., (1993) mint fenn; Goodyear és mtsai., J. Clin. Invest. 95, 2195-2204 (1995)], PI3-kináz [Anai és mtsai., Diabetes 47, 13-23 (1998)] és GSK-3 expressziót [Nikoulina és mtsai., Diabetes 49, 263-271 (2000)], illetve csökkent PKCθ [Chalfant és mtsai., Endocrinology 141, 2773-2778 (2000)] és PTP1B szinteket [Dadke és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 274, 583-589 (2000)] figyeltek meg. Bizonyos 2. típusú diabeteses alanyok vázizomzatában az IR [Arner és mtsai., Diabetologia 30, 437-440 (1987); Maegawa és mtsai., Diabetes 44, 815-819 (1991); Saad és mtsai., (1992) mint fenn; Saad és mtsai., (1993) mint fenn; Goodyear és mtsai., mint fenn], IRS-1 [Saad és mtsai., (1992) mint fenn; Saad és mtsai., (1993) mint fenn; Goodyear és mtsai., mint fenn] és Akt csökkent foszforilációját is tapasztalták [Krook és mtsai., Diabetes 47, 1281-1286 (1998)].

Ezenfelül, csökkent PI3-kináz aktivitást [Saad és mtsai., (1992) mint fenn; Heydrick és mtsai., (1995) mint fenn; Saad és mtsai., (1993) mint fenn; Goodyear és mtsai., mint fenn; Heydrick és mtsai., (1993) mint fenn; Folli és mtsai., Acta Diabetol. 33, 185-192 (1996); Bjornholm és mtsai., Diabetes 46, 524-527 (1997); Andreelli és mtsai.,

Diabetologia 42, 358-364 (1999); Kim és mtsai., J. Clin. Invest. 104, 733-741 (1999); Andreelli és mtsai., Diabetologia 43, 356-363 (2000); Krook és mtsai., Diabetes 49, 284-292 (2000)], megnövekedett GSK-3 [Eldar-Finkelman és mtsai., Diabetes 48, 1662-1666 (1999)] és PKC aktivitást [Avignon és mtsai., Diabetes 45, 1369-1404 (1996)] is kimutattak a 2. típusú diabetessel kapcsolatban. A PI3-kináz p85 alegységének roncsolása egerekben megnövekedett inzulinérzékenységet eredményezett [Terauchi és mtsai., Nature Genet. 21, 230-235 (1999)].

Ezenfelül, diabeteses állatokból származó vázizomban a PKC izoformáinak eloszlása megváltozott [Smitz-Peiffer és mtsai., Diabetes, 46, 169-178 (1997)] és a PKCα, PKCβ, PKCε és PKCδ tartalom a nem elhízott Goto-Kakizaki (GK) diabetikus patkányok talpemelő izmából készített membránfrakcióban megnőtt, míg a citoszolfrakcióban lecsökkent [Avignon és mtsai., mint fenn].

A GLUT4 abnormális szubcelluláris lokalizációját figyelték meg 2. típusú diabeteses vagy anélküli, inzulinra rezisztens alanyok vázizmában [Vogt és mtsai., Diabetologia 35, 456-463 (1992); Garvey és mtsai., J. Clin. Invest. 101, 2377-2386 (1998)] amely azt jelzi, hogy a GLUT4 szállításában és transzlokációjában bekövetkezett károsodások inzulinrezisztenciát okozhatnak a vázizomban. *In vivo* és *in vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy bizonyos 2. típusú diabeteses alanyok vázizmában az inzulin által serkentett glükóztranszport aránya lecsökkent [Andreasson és mtsai., Acta Physiol. Scand. 142, 255-260 (1991); Zierath és mtsai., Diabetologia 37, 270-277 (1994); Bonadona és mtsai., Diabetes 45, 915-925 (1996)].

Figyelemre méltó, a kezelés más módjai ellenére, az inzulinterápia marad sok, a 2. típusú diabetestől szenvedő beteg esetében a kiválasztott kezelés, különösen olyan esetekben, amikor a primer diéta sikertelen és nem elhízottak, vagy amikor a primer diéta sikertelensége mellett a másodlagos orális hipoglikémiás sikertelenség is fennáll. De egyformán világos, hogy az inzulinterápiát kombinálni kell az étrend megfelelő szabályozásával és az életstílus megváltoztatásával, és ne gondoljuk, hogy ezek helyettesíthetők. Optimális eredmények elérése céljából, az inzulinterápiát nyomon kell követni a vér glükózszintjének mérésével és a glikozilált vérfehérjék megfelelő becslésével. Az inzulin beadható önmagában különféle beadási rendek szerint, két vagy több, rövid, közepes vagy hosszú hatástartamú, vagy több mint egy típus keverékét tartalmazó inzulinkészítmény beinjektálásával. Az egyes pácienseknek leginkább megfelelő beadási rendet az egyes pácienseknél az inzulinterápiára adott válasz nyomonkövetésével kell megállapítani.

A 2. típusú diabetes gyógyításával kapcsolatos ismeret és gyakorlat jelenleg még nem kielégítő. A páciensek legtöbbje idővel átesik a primer diéta sikertelenségén. Bár az orálisan bevehető hipoglikémiás ágensek gyakran sikeresen csökkentik a glikémia fokát a primer diéta sikertelensége esetén, számos szakember kétli, hogy a glikémiás kontrol így elért szintje elégséges a hosszú ideig fennálló 2. típusú diabetessel kapcsolatos atheromatous betegségek, neuropathiás, nephropathiás, retinopathiás és perifériális keringési betegségek okozta hosszútávú komplikációk jelentkezésének elkerülésére. Ennek oka világosan felfogható annak megértése fényében, hogy már minimális – körülbelül 5,5-6,0 nmol/l éhezési plazma-glükózszinttel egyenértékű – glükózintolerancia esetében megnő a szív és érrendszeri halálozás kockázata [Fuller és mtsai., Lancet 1, 1373-1378 (1980)]. Az sem világos, hogy az inzulinterápia az orális hipoglikémiás ágensekhez képest produkál-e bármilyen, hosszútávú javulást.

A hiperinzulinémia olyan állapot, amikor az inzulin szintje a keringésben a normálisnál magasabb, míg ezzel szemben a hipoinzulinémia esetében az inzulin szintje a keringésben a normálisnál alacsonyabb. A hiperinzulinémia kockázati faktor a koszorúéren végzett ballon-angioplastica utáni restenosis (újbóli érszűkület) esetén [Imazu és mtsai., Jpn. Circ. J. 65, 947-952 (2001)]. Továbbá, a hiperinzulinémia magas vérnyomással jár együtt [Imazu és mtsai., Hypertens. Res. 24, 531-536 (2001)]. Például, idősebb magas vérnyomástól szenvedő alanyokban a hiperinzulinémia és hemosztázisos rendellenességek csendes lacunaris cerebralis infarktusokkal járnak együtt, és esszenciális magas vérnyomás esetén a hiperinzulinémia az eritrociták mebránfluiditásának meghatározója [Kario és mtsai., J. Am. Coll. Cardiol. 37, 871-877 (2001); Tsuda és mtsai., Am. J. Hypertens. 14, 419-423 (2001)].

Az elhízás a modern társadalomban igen elterjedt krónikus betegség, amely nemcsak szociális megbélyegzéssel, hanem lecsökkent élettartammal és számos gyógyászati problémával – így kedvezőtlen szellemi fejlődéssel, szaporodási elváltozásokkal, mint például policisztikus petefészek-betegséggel, dermatológiai elváltozásokkal, például fertőzésekkel, visszértágulással, *Acanthosis nigricans*-sal és ekcémával, gyakorlatokkal szembeni türelmetlenséggel, inzulinnal szembeni rezisztenciával, magas vérnyomással, magas koleszterinszinttel, epekőbántalommal, csont-ízületigyulladással, ortopédiai sérüléssel, tromboembólikus betegséggel, rákkal és szív-koszorúér betegséggel - jár együtt [Rissanen és mtsai., Brit. Med. J. 301, 835-837 (1990)]. Az elhízottság kezelése során étvágycsökkentők és más, súlyvesztést indukálók, étrendi változtatások és hasonlók alkalmazására kerül sor, de az inzulinrezisztenciás páciensekhez hasonlóan, az elhízott páciensek legtöbb-

je esetében az elsődleges étrendi változtatás egy idő után sikertelen, így nem lesznek képesek elérni az ideális testtömeget.

Így, egyértelmű, hogy az inzulinnal szembeni rezisztencia és elhízottság kezelésére alkalmas jobb eljárás nagymérvű hasznosításra tarthat számot. Különösen, igény van olyan hatékony ágensekre, amelyek alkalmazhatók inzulinrezisztenciás – így NIDDM-es - egyedek diagnosztizálására és kezelésére. Ezenfelül, ha figyelembe vesszük az elhízottság magas gyakoriságát társadalmunkban és az azzal társult, a fentiekben tárgyalt súlyos következményeket bármilyen, az elhízott személyek számára súlyvesztésre potenciálisan alkalmazható drog kiemelkedően jótékony hatást gyakorolhat az illető személyek egészségére. Végül, szükség van hiperinzulinémia, hipoinzulinémia kezelésére, izom-helyreállításra és -regenerálásra alkalmas drogokra is.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

Eszerint, a találmány tárgyát a Dkk-1, például glükóz-intoleranciával, diabetes mellitus-sal, magas vérnyomással, és a nagy és kis véredények ischaemiás betegségeivel társult inzulinrezisztencia kezelésére és hipoinzulinémia kezelésére alkalmas antagonistái, mint például antitestek, képezik. Továbbá, a találmány tárgya önmagában a Dkk-1 is, amely zsírszintek csökkentésére és a hiperinzulinémia kezelésére alkalmazható.

Specifikusan, a találmány tárgyát a szabadalmi igénypontokban igényeltek képezik. A találmány tárgya emlősökben inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére vagy hipoinzulinémia kezelésére szolgáló eljárás, amelyben a kérdéses emlősnek Dkk-1 antagonista hatékony mennyiségét adjuk be. Előnyös, ha az emlős ember, a Dkk-1 pedig emberi Dkk-1, és/vagy az ember NIDDM-ben beteg. A szisztémás beadás is előnyös. Előnyös, ha az antagonista a Dkk-1-et megkötni képes antitest, előnyösebb, ha Dkk-1-et megkötni képes monoklonális antitest, és még előnyösebb az olyan antitest, amely inzulinnal szembeni rezisztenciát vagy a Dkk-1 hipoinzulinémiás aktivitását semlegesíti. Legelőnyösebb, az ATCC-nél a PTA-3086 katalógusszámú hibridómából készített monoklonális antitest, amely semlegesítő antitest. A találmány további előnyös megvalósítási módjában, az antagonista mellett más, inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágenst is beadunk az inzulinrezisztenciás elváltozás kezelésére, vagy inzulint adunk be az antagonista mellett a hipoinzulinémia kezelése céljából.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, a találmány tárgya valamely emlősben az inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló eljárás. Az eljárás az alábbi lépésekből áll:

(a) a kérdéses emlősből származó mintában megmérjük a Dkk-1 mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, az (a) lépésben mért Dkk-1 megnövekedett mennyisége inzulinnal szembeni rezisztenciát vagy hipoinzulinémiát jelez.

Előnyös, ha a mérést Dkk-1 elleni antitest, például monoklonális antitest, alkalmazásával, immunvizsgálatban végezzük. Szintén előnyös, ha az ilyen, Dkk-1 elleni antitest jelölést, előnyösebben fluoreszcens jelölést, radioaktív jelölést, vagy enzim jelölést – mint például biolumineszcens vagy kemiluminszcens jelölést – tartalmaz. Szintén előnyös, ha az immunvizsgálat radioimmunológiai vizsgálat, enzimes immunológiai vizsgálat, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat, szendvics immunvizsgálat, precipitációs vizsgálat, immunradioaktív vizsgálat, fluoreszcens immunológiai vizsgálat, protein A immunvizsgálat, vagy immunoelektroforetikus vizsgálat. Szintén előnyös az olyan eljárás, amelyben az emlős ember, és emberi Dkk-1-et mérünk. A találmány további előnyös megvalósítási módjában, az inzulinnal szembeni rezisztencia NIDMM.

A találmány megvalósítási módjában, a találmány tárgya inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 elleni antagonistát, előnyösen Dkk-1-et megkötni képes antitestet, tartalmazó tárolóedény; és

(b) útmutatást az antagonista alkalmazására az inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésében.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, az antitest monoklonális antitest, előnyösebben olyan antitest, amely inzulinnal szembeni rezisztenciát vagy a Dkk-1 hipoinzulinémiás aktivitását semlegesíti. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában, a készlet tartalmaz továbbá az inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágenst vagy inzulint tartalmazó tárolóedényt (a javallattól függően).

A találmány tárgya továbbá toldalékolt Dkk-1-el (előnyösen tisztított rekombináns, polihisztidinnel toldalékolt, emberi Dkk-1-el) hiperimmunizált egerekből preparált, adjuvánsban hígított, monoklonális antitestkészítmény, amelyet úgy állítottunk elő, hogy Dkk-1 elleni antitest-titereket (előnyösen magas titereket) mutató egerekből származó B-sejteket egéreredetű mielóma sejtekkel fuzionáltattunk, ezekből felülúszót nyertünk, a felülúszókat összegyűjtöttük, az összegyűjtött felülúszókon szűrővizsgálatot végeztünk antitest-termelés azonosítására, előnyösen közvetlen, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálattal, a második szubklónozási körben a legmagasabb immunkötést

mutató pozitív klónokat, előnyösen korlátozott hígítással, egerekbe injektáltuk monoklonális antitestek in vivo előállítása céljából, az egerekből származó aszcites folyadékokat összeöntöttük, és az összeöntött aszcites folyadékokat, előnyösen protein A kromatográfiával, tisztítottuk az antitest-készítmény előállítására.

A találmány tárgya továbbá az alábbi ATCC katalógusszámú hibridómák bármelyike: PTA-3084, PTA-3085, PTA-3086, PTA-3087, PTA-3088, PTA-3089, és PTA-3097. Az előnyös hibridóma a PTA-3086 ATCC katalógusszámú hibridóma. A találmány tárgya továbbá a fenti hibridómák egyikéből, előnyösen a PTA-3086 hibridómából, előállított antitest.

A találmány tárgya továbbá eljárás egy adott feltételezetten gyógyhatású drog inzulinrezisztenciára, hipoinzulinémiára, vagy izom-helyreállításra gyakorolt hatásának értékelésére, ahol az eljárásban a kérdéses drogot embertől különböző, *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drog hatását a glükózkiürítésre kérdéses állat véréből, a kérdéses állat keringési rendszerében keringő inzulinszintekre, vagy az izom differenciálódására. Előnyös, ha az állat rágcsáló, előnyösebben egér vagy patkány, és legelőnyösebben egér. A találmány egy másik előnyös megvalósítási módjában, az állatban a *dkk-1* nukleinsav túlexpresszálása az izomra specifikus promóter szabályozása alatt áll, és a cDNS túlexpressziója az izomszövetben történik.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, a találmány tárgya inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, hiperinzulinémia és elhízottság meglétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló diagnosztikai készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1-et megkötni képes antitestet tartalmazó tárolóedény;

(b) Dkk-1-et tartalmazó standard mintát tartalmazó tárolóedény; és

(c) útmutatás az antitest és a standard minta alkalmazására inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, hiperinzulinémia, vagy elhízottság kimutatására, ahol vagy a Dkk-1-et megkötni képes antitest kimutatható jelölést hordoz, vagy a készlet tartalmaz egy másik tárolóedényt is, amelyben kimutatható jelölést hordozó és a Dkk-1-et vagy a Dkk-1-et megkötni képes antitestet megkötni képes második antitest van. Előnyös, ha a készlet részét képező, Dkk-1 elleni antitest monoklonális antitest, előnyösebb, ha az antitest semlegesíti az inzulinnal szembeni rezisztenciát, hipoinzulinémiát, hiperinzulinémiát vagy a Dkk-1 elhízottságot előidéző aktivitását.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, a találmány tárgya eljárás elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére emlősben, amely során az azt igénylő emlősnek hatékony mennyiségű Dkk-1-et adunk be. Előnyös, ha az emlős ember, a Dkk-1 pedig em-

beri Dkk-1. A szisztémás beadás is előnyös. A találmány egy másik megvalósítási módjában, az eljárásban hatékony mennyiségű fogyasztószert is beadunk.

A találmány további szempontja szerint, a találmány tárgya valamely emlősben az elhízottság vagy hiperinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló eljárás. Az eljárás az alábbi lépésekből áll:

(a) a kérdéses emlősből származó mintában megmérjük a Dkk-1 mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, az (a) lépésben mért Dkk-1 lecsökkent mennyisége inzulinnal szembeni rezisztenciát vagy hipoinzulinémiát jelez.

Előnyös, ha a mérést Dkk-1 elleni antitest, például monoklonális antitest, alkalmazásával, immunvizsgálatban végezzük. Szintén előnyös, ha az ilyen, Dkk-1 elleni antitest jelölést hordoz. Az előnyös jelöléseket és immunvizsgálatokat az inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló eljárásnál ismertettük. Ezenfelül, az elhízottság vagy hiperinzulinémia kimutatására szolgáló ezen eljárásban, az emlős előnyösen ember és emberi Dkk-1-et mérünk.

A találmány még további megvalósítási módjában, a találmány tárgya elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1-et tartalmazó tárolóedény;

(b) útmutatások a Dkk-1 alkalmazására az elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésében.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, a Dkk-1 emberi Dkk-1, és a készlet fogyasztószert tartalmazó tárolóedényt is tartalmaz.

A találmány tárgya továbbá eljárás egy adott feltételezetten gyógyhatású drog elhízásra és hiperinzulinémiára kifejtett hatásának értékelésére, ahol az eljárásban a kérdéses drogot nem emberi, bináris, *dkk-1* nukleinsavat expresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drognak az elhízottság valamelyik jellemzőjére vagy a kérdéses állat inzulinszintjére gyakorolt hatását. Előnyös, ha az állat rágcsáló, előnyösebben egér vagy patkány, és legelőnyösebben egér.

A találmány tárgya továbbá *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, nem ember, transzgénikus állat. Előnyös, ha az állat rágcsáló, legelőnyösebben egér.

A találmány tárgya továbbá eljárás izom helyreállítására vagy regenerálására egy adott emlősben, ahol az eljárásban az állatnak hatékony mennyiségű Dkk-1 antagonistát, előnyösen Dkk-1-et megkötni képes antitestet adunk be. Előnyös, ha az állat ember és/vagy az antitest monoklonális antitest.

A találmány tárgya továbbá izom helyreállítására vagy regenerálására szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 antagonistát, előnyösen Dkk-1-et megkötni képes antitestet tartalmazó tárolóedény; és

(b) az antagonista izom helyreállítására vagy regenerálására történő alkalmazásához szükséges útmutatás.

Ezért, a találmány tárgya inzulinnal szembeni rezisztencia, hiperinzulinémia, hipoinzulinémia és elhízás, illetve izom helyreállítására vagy regenerálására szolgáló kezelés és ezek diagnosztizálása. Az elhízás Dkk-1-el történő kezelési rendjétől elvárjuk, hogy alkalmas legyen az elhízott személyek testtömegének normális, ideális testtömegre történő visszaállítására, továbbá az elhízás gyógyításától pedig elvárt, hogy a lecsökkent testtömeget hosszabb időtartamig fenntartsa, és/vagy védjen az elhízástól.

Az alábbiakban röviden leírjuk a találmányhoz tartozó ábrákat.

1. ábra: A Dkk-1 relatív expressziós szintjei különböző felnőttkori emberi szövetekben.

2. ábra: Bakulovírusban expresszált emberi Dkk-1-et és annak kivágását mutató gél.

3A. ábra: Az emberi Dkk-1 (sötét oszlopok) hatásai L6 izomsejtek 2, 6 és 26 órás, alapszintű glükózfelvételére. A 3B. ábra az emberi Dkk-1 hatásait mutatja az alapszintű glükózfelvételre (világos oszlopok), a 3C. ábra pedig az emberi Dkk-1 hatásait mutatja a 30 nM inzulinnal serkentett glükózfelvételre (sötét oszlopok) L6 izomsejteken.

4A. ábra: Az emberi Dkk-1 hatásai (sötét oszlopok) az alapszintű és az inzulintól függő glükózfelvételre a differenciálódás különböző stádiumaiban. A 4B. ábra mutatja be az emberi Dkk-1 hatásait az alapszintű és az inzulinnal serkentett glükózfelvételre (a kontrol százalékában) az emberi Dkk-1 koncentrációjának (nM) függvényében, 48 órás kezelés esetén.

5A-5B. ábrák: Az emberi Dkk-1 hatása a glükóz glikogénbe történő beépülésére L6 izomsejtekben inzulin jelenlétében (sötét oszlopok) és hiányában (világos oszlopok) 48 órás (5A. ábra) és 96 órás vizsgálatban (5B. ábra).

6A-6E. ábrák: 40 nM emberi Dkk-1 hatásai a MyoD (6A. ábra), MLC2 (6B. ábra), miozineredetű nehézlánc (6C. ábra), miogenin (6D. ábra), és Pax3 expressziós szintjeire (6E. ábra) L6 izomsejtekben. A kontrolt trapézokkal, a Dkk-1-et pedig négyzetekkel jelöl-

tük. Az egyetlen csillaggal jelöltek esetében $p<0,01$, míg a két csillaggal jelölteknél $p<0,005$ (n=3).

7. ábra: Az emberi Dkk-1 hatása L6 izomsejtekben, az inzulin szignálútvonalban résztvevő különböző gének expressziójára az 5. napon (világos oszlopok) és 7. napon (sötét oszlopok).

8A-8D. ábrák: 40 nM emberi Dkk-1 hatása (sötét oszlopok) a PDK-1 (8A. ábra), GSK3β (8B. ábra), S6 kináz (8C. ábra) és Akt kinázaktivitására (8D. ábra) L6 izomsejtekben 1 nM inzulinnal végzett 48 órás serkentés hatására vagy inzulin nélkül.

9A. és 9B. ábrák: Az emberi Dkk-1 hatása a 3T3 L1 sejtek (zsírsejtek) alapszintű (világos oszlopok) és 30 nM inzulinnal serkentett glükózfelvételére (sötét oszlopok) 48 órás (9A. ábra) és 96 órás kezelés (9B. ábra) után. A 9C. és 9D. ábrák pedig az emberi Dkk-1 lipidekbe történő glükóz-beépülésre gyakorolt hatását mutatják be 48 órás (9C. ábra) és 96 órás kezelés (9D. ábra) után.

10A-10D. ábrák: A PPARγ, C/EBPα, AP2 és zsírsav-szintáz (FAS) transzkriptumok relatív szintjei, megfelelően, emberi Dkk-1-el kezelt 3T3 L1 sejtekben a zsírsejtek differenciálódás során (sötét trapézok = kontrol, világos négyzetek = Dkk-1).

11A. ábra: A vér glükóztartalma glükózzal injektált, nőstény FVB egerekben sóoldattal (trapézok) és 0,2 mg/kg emberi Dkk-1-el (háromszögek) történt intravénás injektálást követően. A 11B. ábra mutatja be a sóoldattal (kontrol), 0,05 mg/kg/nap emberi Dkk-1-el, és 0,2 mg/kg/nap emberi Dkk-1-el intravénásan injektált, nőstény FVB egerekben mért inzulinszinteket.

12A. ábra: Az emberi Dkk-1 hatása az izomdifferenciálódás különböző markereinek expressziójára kontrol (világos oszlopok) és 0,2 mg/kg/nap emberi Dkk-1-el injektált egerekben (sötét oszlopok). A 12B. ábra mutatja be a foszforilált peptid, inzulinnal nem kezelt, 33 nM inzulinnal, és 100 nM izulinnal intravénásan injektált egerekben mért szintjeit (világos oszlopok = kontrol (n=4), sötét oszlopok = Dkk-1 (n=5)).

13A. ábra: A újszülött/fiatal hím és nőstény kontrol (világos oszlopok) és Dkk-1 transzgénikus egerek testtömegei (sötét oszlopok). A 13B. ábra mutatja be a szokásos étrenden tartott kontrol (C) és transzgénikus (TG) nőstény és hím egerek növekedési görbéit (nőstény (C) = trapézok, nőstény (TG) négyzetek, hím (C) háromszögek, hím (TG) = körök).

14A. ábra: Kontrol (világos oszlopok) és transzgénikus hím egerek zsírpárnáinak tömege (sötét oszlopok). A 14B. ábra: Kontrol (világos oszlopok) és transzgénikus nőstény

egerek zsírpárnáinak tömege (sötét oszlopok). A 14C. és 14D. ábrák bemutatják a transzgénikus és kontrol hím és nőstény egerek szérumában mért alapszintű és éhezési leptinszinteket.

15A. ábra: Nőstény kontrol egerek (trapézok), hím kontrol egerek (háromszögek), nőstény transzgénikus egerek (négyszögek), és hím transzgénikus egerek növekedési görbéi (körök). A 15B. ábra a hím kontrol (világos oszlopok) és transzgénikus egerek (sötét oszlopok), a 15C. ábra pedig a nőstény kontrol (világos oszlopok) és transzgénikus egerek zsírpárnáinak tömegét (sötét oszlopok) mutatja be. A 15D. ábra a hím és nőstény kontrol (világos oszlopok) és Dkk-1-el kezelt egerek nem éhezési leptinszintjeit (sötét oszlopok) mutatja be.

16A. és 16B. ábrák: Hím és nőstény egerek, megfelelően, vérének glükózszintjei glükózinjekciót követően, ahol a trapézok MDKK-1 egereknek, a kontrolnak a 16A. ábrán a háromszögek, a 16B. ábrán pedig a négyzetek felelnek meg. A 16C. és 16D ábra mutatja be a kontrol és Dkk-1 transzgénikus nőstény és hím egerek inzulintoleranciáját, megfelelően, ahol a trapézok a nőstény kontrol, a négyzetek a nőstény transzgénikus, a háromszögen a hím kontrol, és a körök pedig a hím transzgénikus egereknek felelnek meg. A 16E. ábra mutatja be a glükózzal végzett indukálás után, a transzgénikus és kontrol egerek szérumában mért inzulinszinteket, ahol a világos oszlopok a nőstény, a sötét oszlopok pedig a hím egereknek felelnek meg.

17. ábra: Emberi Dkk-1 elleni monoklonális antitest hatása a glükózfelvétel Dkk-1 által közvetített csökkentésére L6 sejtekben inzulin jelenlétében és hiányában, ahol a kontrol L6 sejteknek a világos oszlopok, 40 nM Dkk-1-el kezelt L6 sejteknek a sötét oszlopok, és a 40 nM Dkk-1-el és 0,5 μg/ml, emberi Dkk-1 elleni monoklonális antitesttel kezelt L6 sejteknek pedig a jobboldalon lévő sötétszürke oszlop felel meg.

Az alábbiakban részletesen leírjuk a találmány előnyös megoldási módjait.

Meghatározások

A leírás szerinti értelemben, az „inzulinnal szembeni rezisztencia" vagy „inzulinnal szembeni rezisztenciás elváltozás" vagy „inzulinnal szembeni rezisztencia aktivitás" kifejezések olyan betegséget, állapotot, vagy elváltozást jelentenek, amely az exogén eredetű inzulin hatására a perifériális szövetek normális metabolikus válasza elégtelenségének (inszenzitivitás) következtében alakul ki, azaz ez olyan állapot, amelyben az inzulin jelenléte a normálisnál alacsonyabb biológiai válasz vált ki. Klinikai értelemben, inzulinnal szembeni rezisztenciáról akkor beszélünk, ha normális vagy megemelkedett inzulinszintek

esetében a vér glükózszintje normális vagy megemelkedett. Ennek következtében, lényegében, a glikogénszintézis gátlása - amely vagy alapszintű vagy inzulinnal serkentett glikogénszintézis, vagy mindkettő - a normális szint alá csökken. A leírás szerinti értelemben, az inzulinnal szembeni rezisztencia kifejezésbe tartozik az abnormális glükóztolerancia, „A" típusú diabetes, 2. típusú diabetes, de az inzulinnal szembeni rezisztenciával nem kapcsolatos elhízottság nem tartozik ide.

A leírás szerinti értelemben, a „hipoinzulinémia" olyan állapot, amelyben a normálisnál alacsonyabb mennyiségű inzulin kering a testben, és amely általában nem jár elhízottsággal.

A leírás szerinti értelemben, a „*diabetes mellitus*" az inzulinnal szembeni rezisztencia és hipoinzulinémia körébe tartozik és krónikus hiperglikémiás állapotra utal, azaz túlzott mennyiségű cukorra a vérben, amely az inzulin hatásának viszonylagos vagy teljes hiányának következménye. Alapjában véve a *diabetes mellitus*nak három csoportja van: 1. típusú, vagy inzulintól függő *diabetes mellitus* (IDDM), 2. típusú, vagy inzulintól nem függő *diabetes mellitus* (NIDDM), és „A" típusú inzulinrezisztencia (bár az „A" típus viszonylag ritka). Különféle mechanizmusok révén az 1. típusú vagy 2. típusú diabetesben szenvedő betegek gyakran válnak érzéketlenné a külsőleg beadott inzulinnal szemben. Az „A" típusú inzulinrezisztencia vagy az inzulinreceptort kódoló gén mutációinak vagy a receptor utáni, a glükózmetabolizmus szempontjából kritikus hatáshelyek fogyatékosságainak eredménye. A diabetikus alanyokat az orvos könnyen felismeri, és e személyeket az éhezési hiperglikémia, csökkent glükóztolerancia, glikozilált hemoglobin, és – bizonyos esetekben – traumával vagy betegséggel járó *ketoacidosis* jellemez.

A leírás szerinti értelemben, az „inzulintól nem függő *diabetes mellitus*" vagy „NIDDM" kifejezések 2. típusú diabetest jelentenek. A NIDDM-ben beteg páciensek vérében a glükóztolerancia-tesztként ismert diagnosztikai vizsgálatok szerint, vagy éhezés esetén abnormálisan magas a glükóz koncentrációja, és étkezést követően a glükóz celluláris felvétele eltolódik. A NIDDM diagnosztizálása általánosan elismert kritériumok szerint történik [American Diabetes Association, Physician's Guide to Insulin-Dependet (Type I) Diabetes (1988); American Diabetes Association, Physician's Guide to Non-Insulin-Dependet (Type I) Diabetes (1988)].

A leírás szerinti értelemben, a „hiperinzulinémia" olyan állapotot jelent, amely esetén a normálisnál magasabb mennyiségű inzulin kering a testben, és amelynek nincs köze az inzulinnal szembeni rezisztenciához, és amelyet nem az inzulinnal szembeni rezisztencia vált ki.

A leírás szerinti értelemben, az „elhízottság" olyan állapotot jelent, amelyben egy adott emlős testtömeg-indexe (BMI) – tömeg (kg) osztva a magasság (méter) négyzetével – nagyobb, mint 25,9. Konvencionálisan, azon személyek tömege normális, akiknek a testtömeg-indexe 19,9-25,9 közötti. A leírás szerinti értelemben vett elhízottság eredményezheti bármilyen genetikai vagy környezeti ok. Elhízottságot eredményező vagy azt okozó betegség lehet például fokozott táplálkozás vagy bulémia, policisztikus petefészek-betegség, *craniopharyngioma*, a Prader-Willi szindróma, GH-hiányos alanyok, normálisan változó alacsony testméret, Turner szindróma, és más olyan patológiai állapotok, amelyek csökkent metabolitikus aktivitással vagy a pihenési energia csökkent felhasználásával – zsírnélküli össztömeg aránya – járnak, például akut limfoblaszt-leukémiás gyermekek. A leírás szerinti értelemben, az „elhízottságot meghatározó tényezők" közé tartoznak az alábbiak: zsírsejtek és szövetek, mint például zsírpárnák, teljes testtömeg, izmokban mért trigliceridszintek, a leptin szintjei a májban és zsírban éhezéskor és nem éhezéskor, szabad zsírsavak és trigliceridek a vérben.

A leírás szerinti értelemben, az izom „helyreállítása" vagy „regenerálása" kifejezés azt jelenti, hogy egy adott izomszövetet bármely traumát, degenerálódást, és/vagy bármely okból bekövetkezett izomvesztést követően legalább részben meggyógyítunk vagy visszaállítunk a korábbi egészséges állapotra és/vagy funkciójára.

A leírás szerinti értelemben, a kezeléscéljául szolgáló „emlős" bármilyen emlősként osztályozott állat lehet, ideértve - minden korlátozás nélkül – az embereket, sport-, állatkerti, kedvtelésből tartott vagy tenyészállatokat, mint például ebeket, macskákat, szarvasmarhákat, juhokat, sertéseket, lovakat, és nem emberi főemlősöket, mint például majmokat. Előnyös, ha az emlős ember, akit a leírásban páciensnek nevezünk.

A leírás szerinti értelemben, a „kezelés" kifejezés az inzulinnal szembeni rezisztenciától, hiperinzulinémiától, hipoinzulinémiától vagy elhízottságtól szenvedő emlős kezelését és az arról való gondoskodást jelenti, amely során az inzulinnal szembeni rezisztencia, hiperinzulinémia, hipoinzulinémia vagy elhízottság szimptómáinak jelentkezése vagy komplikációi megelőzésére, szimptómák vagy komplikációk enyhítésére vagy megszüntetésére, vagy izmok helyreállítására és/vagy regenerálására az emlősnek valamit beadunk.

A találmány céljai szempontjából, az inzulinnal szembeni rezisztencia csökkentésében elért jótékony vagy kívánatos „kezelési" eredmények közé - minden korlátozás nélkül – az alábbiak tartoznak: inzulinnal szembeni rezisztenciával kapcsolatos szimptómák enyhítése, az inzulinnal szembeni rezisztencia szimptómái mértékének csökkentése, az inzulinnal szembeni rezisztenciával kapcsolatos szimptómák (például az inzulinszükséglet

csökkentése) stabilizilása (azaz a rosszabbodás megakadályozása), inzulinra való érzékenység és/vagy inzulinszekréció növelése a szigetsejtek károsodásának megelőzésére, és az inzulinnal szembeni rezisztencia progressziójának (például, a diabetes progressziójának) késleltetése vagy lelassítása.

A diabetes „kezelendő" szimptómái és komplikációi közé az alábbiak tartoznak: hiperglikémia, elégtelen glikémiás szabályzás, ketoacidosis, inzulinnal szembeni rezisztencia, megemelkedett növekedésihormon-szintek, megemelkedett glikozilált hemoglobin és előrehaladott glikozilációs végtermékek (AGE) szintjei, dawn jelenség, nem kielégítő lipidprofil, keringési betegség (például, *atherosclerosis*), hajszálér-keringési betegség, retina-elváltozások (például, proliferatív diabetikus retinopátia), vese-rendellenességek, neuropátia, terhesség során jelentkező problémák (például, idő előtti termináció és szülési rendellenességek) és hasonlók. A meghatározásba olyan kezelések is tartoznak, amelyek céljai, például, inzulinnal szembeni érzékenység fokozása, a glikémiás kontrol fenntartása mellett az inzulin dózisának csökkentése, HbA1c csökkentése, javított glikémiás kontrol, csökkent keringési, vese, idegi, retinát érintő és más diabetikus komplikációk, a „dawn jelenség" megelőzése vagy csökkentése, javított lipidprofil, a terhesség közbeni komplikációk csökkentése, és csökkent ketoacidosis. A szakember számára világos, hogy a találmánnyal összhangban, a konkrét szimptóma a kezelni kívánt inzulinrezisztencia típusától függ.

Az izom-helyreállítás és izomregenerálás vonatkozásában, a „kezelés" az izomsorvadás, trauma vagy degeneráció enyhítését és az izomszövet helyreállításának és/vagy működésének javulását jelenti.

Hiperinzulinémia vagy hipoinzulinémia vonatkozásában, a „kezelés" a testben keringő inzulin szintjeinek normális szintekre – azaz az emlős testében, az állapotot megelőző általános szintekre - történő csökkentését vagy emelését, megfelelően, jelenti.

Az elhízottsággal kapcsolatban, a „kezelés" általában az emlős BMI-jének, 25,9 érték alá történő csökkentését, és az ennek megfelelő testtömeg legalább 6 hónapig történő fenntartását jelenti. A kezelés alkalmas módon az emlős élelem vagy kalória-felvételében bekövetkező csökkenést eredményezi. Ezenfelül, ebben a vonatkozásban a kezelés az elhízottság előfordulásának megelőzését is jelenti, ha a kezelést az elhízott állapot jelentkezése előtt alkalmazzuk. A kezelésbe tartozik az elhízott emlősben a lipogenézis - azaz a lipidek túlzott felgyülemlése a zsírsejtekben, amely az emberi és állati elhízottság egyik fő vonása - gátlása és/vagy teljes elnyomása mellet a teljes testtömeg csökkentése.

Azok közé, akik „a kezelést igénylik" tartoznak az elváltozástól már szenvedő emlősök mellett, azok is, akik hajlamosak az elváltozásra, így akikben az elváltozást megelőzni szükséges.

A leírás szerinti értelemben, az „inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágens" inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló, Dkk-1 antagonistától eltérő ágens, amilyenek például a hipoglikémiás ágensek. Ilyen, kezelésre szolgáló ágensek például az alábbiak lehetnek: inzulin (egy vagy több különböző inzulin); inzulint utánzók, mint például kismolekulájú inzulin, például L-783,281; inzulinanalógok (például, HUMALOG® inzulin (Eli Lilly Co.), Lys^{B28} inzulin, Pro^{B29} inzulin, vagy Asp^{B28} inzulin vagy azok, amelyek például az US 5.149.777 sz. és 5.514.646 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban vannak leírva), vagy azok fiziológiailag aktív fragmentumai; inzulinnal rokon peptidek (C-peptid, GLP-1, inzulinszerű növekedésifaktor (IGF-1), vagy IGF-1/IGFBP-3 komplex) vagy azok analógjai vagy fragmentumai; ergoset; pramlintid; leptin; BAY-27-9955; T-1095; inzulinreceptor tirozinkináz aktivitását gátlók antagonistái; TNF-α funkciójának antagonistái; növekedési hormont felszabadító ágensek; amilin vagy amilin elleni antitestek; inzulinnal szembeni érzékenységet biztosító anyagok, mint például a glitazon család vegyületei, ideértve az US 5.753.681 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban leírtakat, mint például troglitazon, pioglitazon, englitazon, és rokon vegyületek; Linalol önmagában vagy E vitaminnal [US 6.187.333 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]; inzulinszekréciót fokozók, például nateglinid (AZ-4166), kalcium (2S)-2-benzil-3-(cisz-hexahidro-2-izoindolinilkarbonil)propionát dihidrát (mitiglinid, KAD-1229), és repaglinid; szulfonilurea drogok, például acetohexamid, klorpropamid, tolazamid, tolbutamid, glikopiramid és ennek ammóniumsója, glibenklamid, glibornurid, gliklazid, 1-butil-3-metanilurea, karbutamid, glipinamid, fenbutamid, tolciklamid, glimepirid, stb.; biguanidok (például, fenformin, metformin, buformin, stb.); α-glükozidázt gátlók (mint például, akarbóz, voglibóz, miglitol, emiglitát, stb.), és olyan nem tipikus kezelések, mint hasnyálmirigy-transzplantáció vagy autoimmun reagensek.

A leírás szerinti értelemben, a „fogyasztószer" kifejezés elhízottság kezelésére vagy megelőzésére alkalmas molekulát jelent. Ilyen molekulák közé tartoznak, például, hormonok (katekolaminok, glükagon, ACTH, és IGF-1-el kombinált növekedési hormon); az Ob fehérje; klofibrát; halogenát; cinkokain; klorpromazin; noradrenerg neurotranszmittereken ható étvágycsökkentő drogok, mint például mazindol és fenetilamin-származékok, például fenilpropanolamin, dietilpropion, fentermin, fendimetrazin, benzfetamin, amfetamin, metamfetamin, és fenmetrazin; szerotonin neurotranszmittereken

ható drogok, mint például fenfluramin, triptofán, 5-hidroxitriptofán, fluoxetin, és sertalin; központi idegrendszerre ható drogok, mint például naloxon, neuropeptid-Y, galanin, kortikotropin felszabadulást kiváltó hormon, és kolecisztokinin; kolinerg agonisták, például piridostigmin; szfingolipidek, például lizoszfingolipid vagy annak származéka; termogén drogok, például tiroid hormon; efedrin; β-adrenerg agonisták; az emésztőrendszert befolyásoló drogok, mint például enzimgátlók, például tetrahidrolipostatin, emészthetetlen élelmiszerek, mint például cukorpolimerek, és a gyomor ürülését gátlók, mint például treo-klorocitromsav vagy ennek származékai; β-adrenerg agonisták, mint például izoproterenol és yohimbin; aminofillin a yohimbin β-adrenerg-szerű hatásainak fokozására, α_2-adrenerg gátló drog, mint például klonidin önmagában vagy növekedési hormont felszabadító peptiddel kombinálva; vékonybélből történő felszívódást megakadályozó drogok, például biguanidok, például metformin és fenformin; eltelítődést okozó anyagok, például metilcellulóz; metabolizmust gátló szerek, például hidroxicitrát; progeszteron; kolecisztokinin-agonisták; ketoacidokat utánzó kisméretű molekulák; kortikotropint felszabadító hormon agonistái; a test zsírraktárait csökkentő, ergot-eredetű, prolaktint gátló vegyületek [US 4.783.469 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (1988. november 8.)]; β3-agonisták; bromokriptin; az opioid peptidek antagonistái; neuropeptid-Y antagonistái; a glükokortikoid receptor antagonistái; a növekedésihormon antagonistái; ezek kombinációi, stb.

A leírás szerinti értelemben, az „inzulin" kifejezés jelent bármely és minden inzulinhatású anyagot, mint például borjú- és sertés-hasnyálmirigyből kivont inzulin, félszintetikus emberi inzulin, amelyet sertés-hasnyálmirigyből kivont inzulinból enzimatikus úton szintetizáltak, és génsebészeti úton, jellemzően, *E. coli* vagy élesztő alkalmazásával szintetizált emberi inzulin. Továbbá, inzulin lehet még a körülbelül 0,45-0,9% (w/w) cinket tartalmazó inzulin-cink komplex, cinkkloridból, protamin-szulfátból és inzulinból előállított protamin-inzulin-cink, stb. Az inzulin lehet inzulinfragmentumok vagy származékok – például INS-1 – formájában. Inzulinok közé tartozhatnak továbbá inzulinszerű anyagok, mint például L83281 és inzulinagonisták. Bár az inzulin különféle típusokban létezik, mint például szupergyorsan ható, azonnal ható, kétféleképpen ható, közepesen ható, hosszú hatástartamú, stb. a megfelelő típust a páciens állapota szerint választjuk ki.

A leírás szerinti értelemben, a „Dkk-1" vagy „Dickkopf-1" a WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi iratban (1999. szeptember 16) és Glinka és munkatársai [Glinka és

mtsai., Nature 391, 357-362 (1998)] által leírtak szerinti tulajdonságokat és jellemzőket mutató, Wnt inhibitor. A WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi iratban, az emberi Dkk-1-et PRO1008-nak, az azt kódoló DNS-t pedig DNA57530-nak nevezik. E találmány tárgyát képezi bármely emlősfajból – ideértve a rágcsálókat, juhot, borjút, sertést, lófélét, ebet, macskát, nem emlős főemlőst és emberből - származó, natív szekvenciájú Dkk-1, különösen az emberi Dkk-1. E találmány tárgyát képezik továbbá bármely emlőseredetű Dkk-1 natív szekvenciájának antagonistája, de előnyösen rágcsáló, borjú, sertés, eb, macska, lóféle, nem emberi főemlős, vagy emberi eredetű Dkk-1, legelőnyösebben emberi Dkk-1 antagonisták.

A leírás szerinti értelemben, a „terápiás készítmény" Dkk-1-et vagy Dkk-1 antagonistát és gyógyászatilag elfogadható hordozót, például vizet, ásványi anyagokat, fehérjéket, vagy a szakember számára ismert más adalékanyagokat tartalmazó készítmény.

A leírás szerinti értelemben, a találmány oltalmi körében az „antagonista", Dkk-1 antagonista", és hasonlók közé tartozik bármely molekula, amely Dkk-1-el kölcsönhatásba lép és interferál annak működésével vagy a Dkk-1 valamely releváns aktivitását, bármilyen módon – kezelni kívántaktól függően - blokkolja vagy semlegesíti. Megakadályozhatja a Dkk-1 és annak egy vagy több receptora közötti kölcsönhatást. Ilyen ágens hatását különféle módon fejtheti ki. Például, a Dkk-1 aktivitását „semlegesítő" antagonista-osztály megfelelő affinitással és specificitással kötődik a Dkk-hez a Dkk-1 alábbiakban leírt gátlása céljából. A Dkk-1-et „megkötő" antitest olyan, amely ehhez az antigénhez megfelelő affinitással képes kötődni, így az antitest terápiás ágensként alkalmas a Dkk-1-et expresszáló sejtek célbavételére.

Ezen antagonista-csoportba tartoznak, például, Dkk-1 elleni antitestek vagy azok Dkk-1-el reaktív részei, Dkk-1 receptorok vagy azok Dkk-1-el reaktív részei, vagy bármely más, Dkk-1-t megkötni képes ligandum. A kifejezésbe tartozik bármely olyan ágens, amely interferál a *dkk-1* mRNS, vagy Dkk-1 fehérje túltermelődésével vagy legalább egy Dkk-1 receptort antagonizál. Ilyen antagonista lehet kiméra hibrid formájában, amelyben alkalmasan kombináltuk az ágens funkcióját a szérumban a terápiás ágens fél-életidejét növelő hordozófehérjével vagy fajok közötti toleranciát biztosító fehérjével. Ennélfogva, az ilyen antagonisták közé tartoznak például bioorganikus molekulák (például, peptid-mimetikumok), antitestek, fehérjék, peptidek, glikoproteinek, glikopeptidek, glikolipidek, poliszaccharidok, oligoszaccharidok, nukleinsavak, gyógyászati ágensek és azok metabolitjai, transzkripcionális és transzlációs szabályozó szekvenciák, és hasonlók. A találmány előnyös megvalósítási módjában, az antagonista olyan antitest, amely Dkk-1-et

megkötő és annak saját receptorával való kölcsönhatását megakadályozó kívánatos tulajdonságokkal bír.

A leírás szerinti értelemben, a „semlegesít" és az „aktivitását semlegesíti" kifejezések jelentik, például, a Dkk-1 aktivitásának blokkolását, megakadályozását, csökkentését, közömbösítését, vagy a Dkk-1 bármilyen mechanizmus útján történő hatástalanítását. Ennek következtében, az antagonista megakadályozhatja a Dkk-1 aktiválásához szükséges kötődési eseményt. Például, a semlegesítő antitest gátolhatja vagy csökkentheti a Dkk-1 Dkk-1-receptorral való kölcsönhatásba lépési képességét. Esetleg, a semlegesítő antitest gátolhatja vagy csökkentheti a Dkk-1 Dkk-1-receptor jelátviteli útvonalát gátló képességét. Dkk-1 aktivitási immunvizsgálatban – mint például azok, amiket a leírásban említettünk - a semlegesítő antitest képes lehet immunspecifikusan kötődni a Dkk-1-hez. A találmány szerinti „semlegesítő antitestre" jellemző, hogy funkcionális aktivitását *in vitro* és *in vivo* is megtartja.

A leírás szerinti értelemben, az „antitest" kifejezést a legszélesebb értelemben alkalmazzuk, és intakt monoklonális antitesteket, poliklonális antitesteket, - legalább két intakt antitestből kialakított - multispecifikus antitesteket (például bispecifikus antitesteket), és – a kívánt biológiai aktivitást mutató - antitest-fragmentumokat foglal specifikusan magába.

A leírás szerinti értelemben, a „monoklonális antitest" lényegében homológ antitest-populációból – azaz a populációt alkotó egyedi antitestek, a nyomokban jelenlévő, természetben előforduló lehetséges mutációktól eltekintve, azonosak - nyert antitestet jelent. A monoklonális antitestek igen specifikusak, és egyetlen antigén-hely ellen irányulnak. Továbbá, a különféle determinánsok (epitópok) ellen irányuló antitesteket tartalmazó poliklonális antitest-készítményekkel szemben, minden egyes monoklonális antitest az antigénen lévő egyetlen determináns ellen irányul.

Specifikusságuk mellett, a monoklonális antitestek azért is előnyösek, mert más antitestek általi kontaminációtól mentesen szintetizálhatók. A „monoklonális" módosítószó az antitest azon jellemzőjére vonatkozik, hogy az antitest lényegében homológ antitest-populációból származik, és a kifejezést nem szabad úgy értelmezni, mintha az az antitest bármilyen konkrét eljárás alkalmazásával történő előállítását követelné meg. Például, a találmány vonatkozásában alkalmazásra kerülő monoklonális antitesteket elkészíthetjük a Kohler és munkatársai által először leírt [Kohler és mtsai., Nature 256, 495 (1975)] hibridóma eljárással, vagy előállíthatjuk rekombináns DNS eljárásokkal [például, US 4.816.567 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. A „monoklonális antitestek"

izolálhatók fágantitest-könyvtárakból például a Clackson és munkatársai [Clackson és mtsai., Nature 352, 624-628 (1991)] és Marks és munkatársai által leírt eljárással [Marks és mtsai., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)].

A monoklonális antitestek, és az ilyen antitestek fragmentumai közé különösen olyan „kiméra" antitestek tartoznak, amelyekben a nehéz- és/vagy könnyűlánc egy része azonos vagy homológ egy adott fajból származó antitest megfelelő szekvenciáival, vagy egy konkrét antitest-osztályba vagy –alosztályba tartozik, míg a lánc(ok) többi része egy másik fajból származó antitest megfelelő szekvenciáival azonos vagy homológ vagy egy másik konkrét antitest-osztályba vagy –alosztályba tartozik, amennyiben a kívánt biológiai aktivitást mutatják [US 4.816.567 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Morrison és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855 (1984)]. A kérdéses kiméra antitestek közé tartoznak „főemlősített" antitestek, amelyek nem emberi főemlősből (például, Óvilági majmok, emberszabású majmok, stb.) származó variábilis domén antigénkötő-szekvenciákat és emberi konstans régióból származó szekvenciákat tartalmaznak.

Az „antitest-fragmentumok" intakt antitest egy adott részét, előnyösen annak antigént kötő vagy variábilis régióját tartalmazza. Antitest-fragmentumok közé tartoznak, például, Fab, Fab', $F(ab')_2$, és Fv fragmentumok; diatestek; lineáris antitestek, egyszálú antitest-molekulák; antitest-fragmentumokból készített multispecifikus antitestek.

„Intakt antitestnek" nevezzük az olyan antitestet, amely antigént kötő variábilis régiót, könnyűlánc-eredetű konstans domént (C_L) és nehézlánc-eredetű konstans doméneket (C_H1, C_H2 és C_H3) tartalmaz. A konstans domének lehetnek natív szekvenciából származó konstans domének (például, emberi natív szekvenciából származó konstans domének) vagy azok aminosavszekvencia-változata. Előnyös, ha az intakt antitestnek egy vagy több effektor funkciója van.

Antitestek „effektor funkciója" egy adott antitest Fc régiójának (natív szekvenciájú Fc régió, vagy Fc régió aminosav-szekvenciájának variánsa) tulajdonítható biológiai aktivitást jelent. Antitestek effektor funkciója lehet például C1q kötés; komplementtől függő citotoxicitás; Fc receptorhoz való kötődés; antitesttől függő, sejtek által közvetített citotoxicitás (ADCC); fagocitózis; sejtfelszíni receptorok (például, B-sejt receptorok; BCR) csökkentő szabályozása, stb.

A nehézláncok konstans doménjének aminosav-szekvenciájától függően, az intakt antitesteket különféle „osztályokba" sorolhatjuk. Az intakt antitesteknek öt fő osztálya létezik: IgA, IgD, IgE, IgG, és IgM, és ezek közül sokat további „alosztályokba"

(izotípusokba" sorolhatunk, például IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA és IgA2. Az antitestek különböző osztályainak megfelelő, nehézlánc-eredetű konstans doméneket α, δ, ε, γ, és μ betűkkel – megfelelően – jelezhetjük. A különböző immunglobulin-osztályok alegység-szerkezetei és három-dimenziós konfigurációi jól ismertek.

A „natív antitestek" általában, körülbelül 150.000 dalton tömegű, heterotetramer glikoproteinek, amelyeket két, egymással azonos könnyűlánc (L) és két, egymással azonos nehézlánc (H) alkot. Az egyes könnyűláncok egyenként kovalens diszulfid-kötéssel kapcsolódnak egy nehézlánchoz, azonban a különböző immunglobulin-izotípusok nehézláncai között a diszulfid-kötések száma változik. Minden egyes nehéz- és könnyűláncban szabályosan elhelyezkedő láncközti diszulfid-hidak vannak. Minden egyes nehézlánc egyik végén variábilis domén (V_H) és az azt követő számos, konstans domén található. Minden egyes könnyűlánc egyik végén variábilis domén (V_L), a másik végén pedig konstans domén található. A könnyűlánc konstans doménje a nehézlánc konstans doménjével rendeződik. Konkrét aminosavakról véljük azt, hogy a nehézlánc-eredetű és könnyűlánc-eredetű variábilis domének között határfelületet alkotnak.

A leírás szerinti értelemben, a „variábilis" kifejezés jelenti azt a tényt, hogy a variábilis domének bizonyos részeinek szekvenciái nagymértékben különböznek az antitestek között, és ezek vesznek részt az egyes konkrét antitesteknek a hozzájuk rendelhető konkrét antigénekkel szembeni specifikusságában és az antigének megkötésében. Azonban, a variabilitás nem egyenletesen oszlik el az antitestek variábilis doménjén belül. A variabilitás három szegmentumra, a könnyűlánc és a nehézlánc variábilis doménjén belüli hipervariábilis régiónak nevezett szakaszra koncentrálódik. A variábilis régió magasabban konzervált részeit nevezzük váz (*framework*) régióknak (FR-ek). A natív nehéz- és könnyűláncok mindegyike négy FR-et tartalmaz, amelyek nagyjából β-lemez konfigurációban vannak. Az FR-eket három hipervariábilis régió köti össze, amelyek a kötéshez hurkokat alkotnak, és bizonyos esetekben a β-lemezszerkezetnek is részét képezik. Az egyes láncokban a hipervariábilis régiókat az FR-ek tartják közeli szomszédságban és a másik lánc hipervariábilis régióival együtt alakítják ki az antitestek antigénkötő-helyét [Kabat és mtsai., Sequences of Proteins of Immunological Interest, kiad.: Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]. A konstans domének közvetlenül nem vesznek részt az antitest antigén-kötésében, de különféle effektor funkciókat mutatnak.

A leírás szerinti értelemben, a „hipervariábilis régió" kifejezés egy adott antitestnek az antigén megkötéséért felelős aminosavait jelenti. A hipervariábilis régió általában egy adott „komplementaritást meghatározó régió" vagy „CDR" aminosavait (például, 24-31. (L1), 50-56. (L2) és 89-97. aminosavak (L3) a könnyűlánc variábilis doménjében, és 31-35. (H1), 50-65. (H2) és 95-102. aminosavak (H3) a nehézlánc variábilis doménjében [Kabat és mtsai., Sequences of Proteins of Immunological Interest, kiad.: Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]) és/vagy egy adott „hipervariábilis hurok" aminosavait (például, 26-32. (L1), 50-52. (L2) és 91-96. aminosavak (L3) a könnyűlánc variábilis doménjében, és 26-32. (H1), 53-55. (H2) és 96-101. aminosavak (H3) a nehézlánc variábilis doménjében [Chothia és Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)]) tartalmazza. A „vázrégiót" vagy „FR-t" aminosavai a variábilis domént alkotó, az itt meghatározott hipervariábilis régióba tartozó aminosavak melletti, aminosavak.

Antitesteket papainnal végzett emésztése két azonos, „Fab" fragmentumnak nevezett, antigénkötő-fragmentumot eredményez, amelyek mindegyikén egyetlen antigénkötőhely van, és a maradék „Fc" fragmentumot eredményez, amelynek neve a könnyű kristályosíthatóságára utal. A pepszinnel végzett kezelés hatására $F(ab')_2$ fragmentum keletkezik, amelynek két antigénkötő-helye van és antigénnel történő keresztkötésre továbbra is képes.

Az „Fv" olyan, minimális antitest-fragmentum, amely komplett antigénfelismerőhelyet és antigént kötő helyet tartalmaz. E régió egymással szorosan, nem kovalens úton kapcsolódó egy nehézlánc és egy könnyűlánc alkotta dimerből áll. E konfigurációban az van hogy, az egyes variábilis domének három hipervariábilis régiója kölcsönhatásba lepve antigénkötő-helyet határoz meg a V_H-V_L dimer felszínén. A hat hipervariábilis régió együttesen antigénkötő-specificitást biztosít az antitestnek. Azonban, már egyetlen variábilis domén (vagy csak három, egy adott antigénre specifikus hipervariábilis régiót tartalmazó Fv fele) rendelkezik azzal a képességgel, hogy antigént ismerjen fel és megkössön, bár ez esetben az affinitás alacsonyabb, mintha meglenne a teljes kötőhely.

A Fab fragmentum emellett tartalmazza a könnyűlánc konstans doménjét és a nehézlánc első konstans doménjét (CH1). A Fab' fragmentumok abban különböznek a Fab fragmentumoktól, hogy a nehézlánc CH1 doménjének C-terminálisán néhány aminosavval többet - így az antitest csuklórégiójából származó egy vagy több ciszteint – találunk. Fab'-SH-nak nevezzük az olyan Fab'-ot, amelyben a konstans régiókból származó cisztein aminosav(ak) legalább egy tiolcsoportot hordoznak. $F(ab')_2$ antitest-fragmentumokat eredeti-

leg olyan Fab' fragmentumpárként állítottak elő, amelyek között csuklót alkotó ciszteinek vannak. Antitest-fragmentumok más, kémiai úton történő kapcsolása szintén ismert.

Bármely gerinces fajból származó antitestek „könnyűláncait" két vagy több, egyértelműen elkülöníthető típusba, a kappa (κ) és lambda (λ) típusba, sorolhatjuk azok konstans doménjeinek aminosav-szekvenciája alapján.

„Egyszálú Fv" vagy „scFv" antitest-fragmentumok tartalmazzák az antitest V_H és V_L doménjeit, ahol e domének egyetlen polipeptid-láncként vannak jelen. Előnyös, ha az Fv polipeptid tartalmazza a V_H és V_L domének közötti polipeptid-linkert, amely lehetővé teszi, hogy az scFv kialakítsa az antigén-kötéshez kívánatos szerkezetet [az scFv-vel kapcsolatban lásd: Plückthun, The Pharamacology of Monoclonal Antibodies, 269-315, szerk: Rosenburg és Moore, kiad.: Springer-Verlag, New York (1994)].

A leírás szerinti értelemben, a „diatestek" kifejezés két antigénkötő-helyet tartalmazó, kis antitest-fragmentumokat jelent, amelyek nehézlánc-eredetű variábilis domént (V_H) és az ahhoz kapcsolva könnyűlánc-eredetű variábilis domént (V_L) tartalmaznak ugyanabban a polipeptid-láncban (V_H-V_L). Ugyanazon láncon belüli két domén párba rendeződéséhez nem elégendő hosszúságú linker alkalmazásával, a doménokat arra kényszerítjük, hogy egy másik lánc komplementer doménjával alkossanak párt, és így két antigénkötő-helyet alakítsanak ki [részletesebben lásd, például: EP 404.097 sz. európai közzétételi irat; WO 93/11161 sz. nemzetközi közzétételi irat; Hollinger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993)].

A nem emberi (például rágcsálóeredetű) antitestek „humanizált" formái olyan kiméra antitestek, amelyek nem emberi immunglobulinból származó minimális szekvenciát tartalmaznak. A legtöbb esetben, a humanizált antitestek olyan emberi immunglobulinok (befogadó antitest), amelyekben a befogadó hipervariábilis régiójából származó aminosavakat nem emberi faj – például, egér, patkány, nyúl, nem emberi főemlős – megfelelő specificitású, affinitású és kapacitású antitestjének (donor antitest) hipervariábilis régiójából származó aminosavakkal helyettesítettük. Bizonyos esetekben, az emberi immunglobulinok vázrégióját (FR) alkotó aminosavakat helyettesítjük a megfelelő, nem emberi eredetű aminosavakkal. Továbbá, a humanizált antitestek tartalmazhatnak a befogadó antitestben vagy a donor antitestben nem található aminosavakat. E módosításokat az antitest teljesítőképességének javítása céljából végezzük. Általában, a humanizált antitest tartalmaz legalább egy, jellemzően két, variábilis domént teljes egészében, amelyben lényegében minden hipervariábilis hurok a nem emberi immunglobulinon lévő hurkoknak, és lényegében minden FR a nem emberi immunglobulin-szekvencián lévő FR-nek felel meg. A humani-

zált antitest, igény szerint, tartalmazhatja egy adott immunglobulin, jellemzően emberi immunglobulin, konstans régiójának (Fc) legalább egy részét [részletesebben lásd: Jones és mtsai., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann és mtsai., Nature 332, 323-329 (1988); Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 593-596 (1992)].

A leírás szerinti értelemben, a „minta" kifejezés, Dkk-1-et feltehetően tartalmazó vagy azt tartalmazó biológiai mintát jelent. E minta lehet bármilyen eredetű, előnyösen emlős, és még előnyösebben emberi eredetű. Ilyen minták közé az alábbiak tartoznak: vizes folyadékok, például szérum, plazma, nyirok, szinoviális folyadék, follikuláris folyadék, szeminális folyadék, tej, teljes vér, vizelet, cerebrospinális folyadék, nyál, köpet, könny, verejték, nyálka, szövettenyészetből származó felülúszó, szövetkivonatok, és sejtkivonatok.

A leírás szerinti értelemben, a „transzgén" kifejezés olyan nukleinsav-szekvenciát jelent, amely részben vagy teljes egészben heterológ – azaz idegen – abban az állatban, amelybe azt bevitték, vagy homológ annak a transzgénikus állatnak egy adott endogén génjével, amely állatba a kérdéses szekvenciát bevitték, de amelyet úgy terveztek bevinni, vagy úgy vittek be az állat genomjába, hogy az megváltoztatta annak a sejtnek a genomját, amelybe bevitték (például, a gén természetes helyétől eltérő helyre illesztették be). Transzgént lehet működőképesen kapcsolni egy vagy több, transzkripcionális szabályozó szekvenciához vagy bármely más, egy adott nukleinsav optimális expressziójához szükséges nukleinsavhoz, például intronokhoz. A leírásban a transzgén Dkk-1-et kódol.

A leírás szerinti értelemben, a „*dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, nem emberi transzgénikus állat" olyan nem ember állatot, például rágcsálót, jelent, amelynek számos sejtjében jelen van a Dkk-1-et kódoló transzgén, amely transzgén a vérben a glükózürülést, a vérben a keringő inzulint, izomregenrációt, vagy inzulinrezisztenciával kapcsolatos más tulajdonságokat, hipoinzulinémiát, és/vagy izom-helyreállítást illetően megváltoztatja a gazdasejt fenotípusát.

A leírás szerinti értelemben, a „*dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, nem emberi, bináris transzgénikus állat" olyan nem ember állatot, például rágcsálót, jelent, amelyben a Dkk-1 egy adott transzgénnel történő kölcsönhatása szabályozza a génexpressziót. Ezen kölcsönhatásokat állati tenyészvonalak (például, rágcsáló, például egérvonalak) keresztezésével, vagy exogén indukálószer hozzáadásával vagy eltávolításával szabályozhatjuk. Ilyen szabályozott génexpresszió, tömeg- és zsírtartalom-indikátorok, a vérben keringő inzulin, vagy más, elhízással és hiperinzulinémiával kapcsolatos tulajdonságok tekintetében megváltoztatja a gazdasejt fenotípusát.

Az alábbiakban a találmány néhány konkrét kivitelezési módját mutatjuk be.

A találmány tárgyát inzulinnal szembeni rezisztencia és hipoinzulinémia diagnosztizálására és kezelésére szolgáló újszerű eljárások képezik, amelyek a Dkk-1-et megkötő, és előnyösen annak aktivitását semlegesítő antagonistákon alapulnak.

Továbbá, Dkk-1-et önmagában is alkalmazhatunk elhízottság és hipoinzulinémia kezelésére.

Ráadásul, izomregenerálásra és izom-helyreállításra szolgáló eljárásokban Dkk-1 antagonistákat alkalmazunk.

Ezért, a találmány tárgyát számos *in vitro* és *in vivo* diagnosztikai és terápiás helyzetekben alkalmazható eljárások képezik.

A Dkk-1 származhat bármely forrásból, és előállíthatjuk bármely eljárással, ideértve a fentiekben említett eljárásokban leírtakat is, így például rekombináns előállítással vagy aminosav-szintézissel feltéve, hogy annak szekvenciája elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésében hatékonyan alkalmazható.

Az antagonista lehet antitest, előnyösen monoklonális antitest, és a Dkk-1 vagy *dkk-1* mRNS termelődésének elnyomására képes molekula. Antagonista-jelölteket tesztelhetünk hatékonyságra nézve, például az itt leírt vizsgálati eljárások alkalmazásával, ideértve azt is, hogy az antagonista-jelölteknek a keringő Dkk-1 szintek csökkentésére gyakorolt hatását ELISA vizsgálattal mérjük. Az alábbiakban, a találmánnyal kapcsolatos monoklonális antitestek előállítására példáként szolgáló eljárásokat írunk le.

Poliklonális antitesteket előnyösen előállíthatunk állatokban a releváns antigén és valamilyen adjuváns többszörös szubkután (sc) vagy intraperitoneális injektálásával. Alkalmas lehet, ha a releváns antigénhez polihisztidin toldalékot vagy az immunizálásra szánt fajban immunogén fehérjét- például, kürtőscsiga-eredetű hemocianint, szérumalbumint, borjúeredetű tiroglobulint, vagy szójából származó tripszininhibitort – konjugáltatunk bifunkcionális vagy derivatizáló ágens – például, maleimidobenzoil szulfoszukcinát észter (cisztеineken keresztül történő konjugáláshoz), N-hidroxiszukcinimid (lizineken keresztüli konjugáláshoz), glutáraldehid, szukcininsav anhidrid, $SOCl_2$, vagy $R^1N=C=NR$, ahol R és R^1 különféle alkilcsoportok – alkalmazásával.

Állatokat immunizálhatunk az antigén, immunogén konjugátumok, vagy származékok ellen úgy, hogy, például, 100 μg (nyúlnál) vagy 5 μg fehérjét vagy konjugátumot (egérnél) háromszoros térfogat Freund-féle komplett adjuvánssal kombinálunk és az oldatot több helyen intradermálisan injektáljuk. Egy hónappal később az állatoknak az eredetileg beadott peptid vagy konjugátum mennyiségének 1/5-1/10-ét tartalmazó Freund-féle

komplett adjuvánssal rásegítő oltást adhatunk több helyen végzett szubkután injektálással. Hét vagy 14 nappal később az állatokból vérmintát vehetünk és a szérumot antitest-titerre nézve vizsgáljuk. Az állatoknak további rásegítő oltásokat adhatunk, amíg a titer a maximális szintet el nem éri. A találmány egyik megvalósítási módjában, az állatoknak beadott rásegítő injekcióban a konjugátum ugyanazt az antigént, de más fehérjéhez és/vagy az antigént más keresztkötő reagens útján kapcsolva tartalmazza. Konjugátumokat rekombináns sejttenyészetben fúziós fehérjeként is előállíthatunk. Továbbá, aggregációs ágensek, mint például alum, is alkalmazható az immunválasz fokozására.

Monoklonális antitesteket lényegében homogén antitestek – azaz a populációt alkotó egyedi antitestek, a természetben feltehetően előforduló, kis mennyiségű mutációktól eltekintve, azonosak - populációjából állíthatunk elő. Így, a „monoklonális" módosítószó azt jelzi, hogy az antitestre jellemző tulajdonság nem különálló antitestek keverékének következménye.

Például, monoklonális antitestek előállíthatók a Kohler és Milstein által elsőként leírt hibridóma-eljárással [Kohler és Milstein, Nature 256, 495-497 (1975)], vagy rekombináns DNS eljárásokkal [US 4.816.567 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat].

A hibridóma eljárásban egeret vagy más alkalmas gazdaállatot, például hörcsögöt, a fentiekben leírtak szerint immunizálunk az immunizálásra alkalmazott fehérjét specifikusan megkötő antitesteket termelő azt termelni képes limfociták előállítása céljából. Esetleg, limfocitákat *in vitro* is immunizálhatunk. Azután, a limfocitákat megfelelő fúziós ágens, például polietilén-glikol, alkalmazásával mielóma sejtekkel fuzionáltatjuk hibridóma sejtek kialakítása céljából [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103, kiad.: Academic Press (1986)].

Az így előállított hibridóma sejteket átoltjuk és alkalmas, előnyösen egy vagy több, a nem fuzionált, parentális mielóma sejtek szaporodását vagy túlélését gátló anyagot tartalmazó - tápoldatban szaporítjuk. Például, ha a parentális mielóma sejtekből hiányzik a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz enzim (HGPRT vagy HPRT), a hibridómák tenyésztésére alkalmazott tápoldat jellemzően hipoxantint, aminopterint, és timidint tartalmaz (HAT tápoldat), amely anyagok megakadályozzák a HGPRT-re nézve hiányos sejtek szaporodását.

Előnyösek az olyan mielóma sejtek, amelyek hatékonyan fuzionálnak, elősegítik a kiválasztott antigén-termelő sejtek stabil, magas szintű antigén-termelését, és érzékenyek az olyan tápoldatokra, mint amilyen a HAT. Ezek közül előnyös mielóma sejtvonalak az

alábbiak: egéreredetű mielóma sejtvonalak, mint például a MOPC-21 és MPC-11 egértumorokból származó sejtek (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA), és az SP-2 vagy X63-Ag8-653 sejtek (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) Emberi mielóma és egér-emberi heteromielóma sejtvonalakat is leírtak már az emberi monoklonális antitestek előállítására [Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984); Bordeaur és mtsai., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63, kiad.: Marcel Dekker, Inc., New York (1987)].

Tápoldatot, amelyben hibridóma sejtek szaporodnak, az antigén elleni monoklonális antitestek termelődésére nézve vizsgálunk. Előnyös, ha a hibridóma sejtek által termelt monoklonális antitestek kötési specificitását immunprecipitációval vagy valamilyen *in vitro* kötési vizsgálattal, mint például radioimmunológiai vizsgálattal (RIA) vagy enzimmel kapcsolt immunszorbens-vizsgálattal (ELISA), meghatározzuk.

A monoklonális antitest kötési specificitását meghatározhatjuk, például, Scatchard analízissel [Munson és mtsai., Anal. Biochem. 107, 220 (1980)].

Miután azonosítottuk a kívánt specificitású, affinitású és/vagy aktivitású antitesteket termelő hibridóma sejteket, a klónokat korlátozott hígításos eljárással szubklónozhatjuk és standard eljárásokkal szaporíthatjuk [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103, kiad.: Academic Press (1986)]. E célra alkalmas tápoldatok közé tartozik, például, a D-MEM vagy RPMI-1640 tápoldat. Ezenfelül, a hibridóma sejteket egy adott állatban képzett ascites tumorként is szaporíthatjuk *in vivo*.

A szubklónok által szekretált monoklonális antitesteket a tápoldattól, ascites folyadéktól, vagy szérumtól alkalmas eljárással, például hagyományos antitest-tisztítási eljárások – például protein A Speharose, hidroxilapatit kromatográfia, gélelektroforézis, dialízis, vagy affinitáskromatográfia - alkalmazásával elkülönítjük.

A monoklonális antitesteket kódoló DNS hagyományos eljárásokkal (például, egéreredetű antitestek nehéz- és könnyűláncait kódoló génekhez specifikusan kötődni képes oligonukleotid-próbák alkalmazásával) könnyen izolálható és szekvenálható. A hibridóma sejtek előnyös forrásai az ilyen DNS-nek. Az izolálást követően, a DNS-t expressziós vektorba építhetjük, amelyet ezután gazdasejtekbe – például, *E. coli*, majomeredetű COS sejtek, kínai aranyhörcsög ováriumából származó (CHO) sejtek, vagy antitest-fehérjéket máskülönben nem termelő mielóma sejtek – transzfektálhatjuk a monoklonális antitesteknek a rekombináns gazdasejtekben történő szintetizálása céljából. Az antitesteket kódoló DNS baktériumokban történő rekombináns expresszióját számos

összefoglaló tárgyalja [például, Skerra és mtsai., Curr. Opin. Immunol. 5, 256-262 (1993); Plückthun, Immunol. Rev. 130, 151-188 (1992)].

A találmány további megvalósítási módjában, monoklonális antitesteket vagy antitest-fragmentumokat izolálhatunk az irodalomban ismert eljárások [McCafferty és mtsai., Nature 348, 552-554 (1990)] alkalmazásával generált antitest-fágkönyvtárakból. Az irodalomban ismert az egéreredetű [Clackson és mtsai., Nature 352, 624-628 (1991)] és emberi antitestek, fágkönyvtárak alkalmazásával történő izolálása [Marks és mtsai., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)]. Ezt követő publikációk leírják a magas affinitású (nM tartomány) emberi antitestek előállítását láncátrendezéssel („chain shuffling") [Marks és mtsai., Bio/Technology 10, 779-783 (1992)], és a nagyon nagy fágkönyvtárak készítésére irányuló stratégiában alkalmazott kombinatorikai fertőzéssel és *in vivo* rekombinációval [Waterhouse és mtsai., Nucl. Acid Res. 21, 2265-2266 (1993)]. Így, ezen eljárások, a hagyományos monoklonális antitestek izolálására szolgáló hibridóma eljárások életképes alternatívái.

A DNS módosítható, például, oly módon, hogy az emberi nehézlánc és könnyűlánc konstans doménjeit helyezzük az egéreredetű homológ szekvenciák helyére [US 4.816.567 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; Morrison és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984)], vagy az immunglobulint kódoló szekvencia teljes egészét vagy egy részét nem immunglobulin-eredetű polipeptidet kódoló szekvenciához kovalensen kapcsoljuk.

Jellemző, hogy ilyen nem immunglobulin-eredetű polipeptiddel helyettesítjük egy adott antitest konstans doménjeit, vagy egy adott antitest egyik antigén-kombinációs helyének variábilis doménjeit helyettesítjük olyan, kiméra bivalens antitest készítése céljából, amelynek egyik antigén-kombinációs helye egy adott antigénre, a másik antigén-kombinációs helye pedig egy másik, az előzőtől eltérő antigénre specifikus.

Nem emberi antitestek humanizálására szolgáló eljárások a technikában le vannak írva. Előnyös, ha egy adott humanizált antitest egy vagy több, nem emberi forrásból származó aminosavat tartalmaz. E nem emberi eredetű aminosavakat gyakran nevezik „import" aminosavaknak, amelyek jellemzően egy adott „import" variábilis doménből származnak. Humanizálást lényegében a Winter és munkatársai által leírt [Jones és mtsai., Nature 321, 522-525 (1986); Riechmann és mtsai., Nature 332, 323-327 (1988); Verhoeyen és mtsai., Science 239, 1534-1536 (1988)] eljárásokkal, a hipervariábilis régió szekvenciáinak a megfelelő emberi antitestből származó helyettesítésével végezzük. Eszerint, az ilyen „humanizált" antitestek kiméra antitestek [US 4.816.567 sz. amerikai egyesült

államokbeli szabadalmi irat], amelyekben egy adott emberi variábilis doménnél lényegében kevesebb részt a megfelelő, nem emberi fajból származó szekvenciával helyettesítettünk. A gyakorlatban, a humanizált antitestek jellemzően olyan emberi antitestek, amelyekben a hipervarábilis régiót és lehetőség szerint az FR régiót alkotó bizonyos aminosavakból néhányat rágcsálóeredetű antitestek analóg helyéből származó antitestekkel helyettesítünk.

Az antigenitás csökkentése szempontjából a humanizált antitestek készítésére alkalmazott emberi, nehéz- és könnyűlánc-eredetű variábilis domének kiválasztása igen fontos. Az úgynevezett „legjobb illesztési" eljárás szerint, a rágcsálóeredetű antitest variábilis doménjének szekvenciáját szkríneljük az ismert emberi variábilis domének szekvenciáit tartalmazó teljes könyvtár ellen. A rágcsálóéhoz legközelebb álló emberi szekvenciát fogadjuk el a humanizált antitest emberi vázszerkezet-régiójának (FR) [Sims és mtsai., J. Immunol. 151, 2296 (1993); Chothia és mtsai., J. Mol. Biol. 196, 901 (1987)]. Egy másik eljárásban az összes emberi antitest könnyű- vagy nehézlánc alcsoportjának konszenzus szekvenciájából származó vázrégiót alkalmazunk. Ugyanazon vázrégió alkalmazható számos, különböző humanizált antitestek esetében [Carter és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 4285 (1992); Presta és mtsai., J. Immunol. 151, 2623 (1993)].

Az antitesteket továbbá oly módon humanizáljuk, hogy megtartsák az antigénnel szembeni magas affinitásukat és más előnyös biológiai tulajdonságaikat. Ennek elérésére, a találmány előnyös eljárásában, humanizált antitesteket állatunk elő a parentális szekvenciák és különféle konceptuális humanizált termékek analízisével, amelyben a parentális és humanizált szekvenciák három-dimenziós modelljeinek alkalmazásával. Három-dimenziós immunglobulin-elérhetők és ismertek a szakember számára. A kiválasztott immunglobulin-szekvenciák feltételezett három-dimenziós konformációs szerkezeteit illusztrálására és bemutatására alkalmas számítógépes programok elérhetők. E képek vizsgálata lehetővé teszi az aminosavaknak a kérdéses immunglobulin-szekvencia működésében betöltött, feltételezett szerepének vizsgálatát, például a kérdéses immunglobulinnak az antigénjéhez való kötődésének képességét befolyásoló aminosavak analízisét. Ily módon, a befogadó és import szekvenciákból olyan FR aminosavakat választhatunk ki, amelyekkel elérhetjük, hogy az antitest az általunk kívánt jellemzőkkel, például a célbavett antigénnel szembeni megnövekedett affinitás, rendelkezzen. Általában, az antigén megkötésének befolyásolásában a hipervariábilis régió aminosavai vesznek részt közvetlenül és elsősorban.

A találmány tárgyát a humanizált antitest vagy affinitás szempontjából érett antitest különféle formái képezik. Például, a humanizált antitest vagy affinitás szempontjából

érett antitest lehet antitest-fragmentum, mint például Fab, amelyet igény szerint egy vagy több célbajuttató antigénnel konjugáltatunk immunkonjugátum előállítása céljából. Esetleg, a humanizált antitest vagy affinitás szempontjából érett antitest lehet intakt antitest, mint például intakt IgG1 antitest.

A humanizáció alternatívájaként emberi antitesteket is előállíthatunk. Például, transzgénikus állatokat (például egeret) generálhatunk, amely immunizálást követően, az endogén immunglobulin-termelés hiányában, képes termelni az emberi antitestek teljes repertoárját. Például, leírták, hogy az antitest nehézlánca kapcsolódási régiójának (J_H) homozigóta törlése kiméra és őssejtvonal tekintetében mutáns egerekben, az endogén antitest-termelés teljes gátlását eredményezi. Az emberi őssejt-eredetű immunglobulin-génsorozat transzfere ilyen, őssejtvonal tekintetében mutáns egerekbe azt eredményezi, hogy antigén hatására emberi antitestek fognak termelődni [Jakobovits és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551 (1993); Jakobovits és mtsai., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggermann és mtsai., Year Immunol. 7, 33 (1993); US 5.591.669 sz. és US 5.545.807 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok].

Esetleg, fág-kimutatási eljárás [McCafferty és mtsai., Nature 348, 552-553 (1990)] is alkalmazható emberi antitestek vagy antitest-fragmentumok, nem immunizált donorokból származó immunglobulin-eredetű variábilis (V) domént kódoló génrepertoárokból kiinduló, *in vitro* előállítására. Ezen eljárásban, antitestből származó V doméneket kódoló géneket leolvasási keretbe klónozunk egy szálas bakteriofág – mint például M13 vagy fd – fő vagy kisebb burokfehérjéjébe, amelyek a fágrészecske felszínén funkcionális antitest-fragmentumként jelennek meg. Mivel a szálas partikulum tartalmazza a fág genomjának egyesszálú DNS-kópiáját, az antitest funkcionális tulajdonságain alapuló szelekciók egyben a kérdéses tulajdonságokat mutató antigént kódoló gén szelekcióját is eredményezik. Így, a fág a B-sejt bizonyos tulajdonságait utánozza. Fágkimutatási-eljárások különféle formátumokban végezhetők [lásd például, Johnson és Chiswell, Curr. Opin. Struct. Biol. 3, 564-571 (1993)]. Fág-kimutatásban forrásként különféle V-gén szegmentumok alkalmazhatók. Clackson és munkatársai [Clackson és mtsai., Nature 352, 624-628 (1991)] oxazolon elleni antitestek diverz sorozatát izolálták immunizált egerek lépeiből származó V gének kisméretű, kombinatorikai könyvtárából. Nem immunizált emberi donorokból származó V-gének repertoárja is elkészíthető és antigének (ideértve a saját antigéneket is) diverz sorozata elleni antitestek izolálhatók lényegében a Marks és munkatársai [Marks és mtsai., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)], Griffith és munkatársai [Griffith és mtsai., EMBO J. 12, 725-734 (1993)] által leírt vagy az US 5.565.332 sz. vagy

az US 5.573.905 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetett eljárást követve.

Emberi antitestek előállíthatók B-sejtek *in vitro* aktiválásával is [US 5.567.610 sz. és US 5.229.275 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat].

Az antitest-fragmentumok előállítására különféle eljárások ismertek. Hagyományosan e fragmentumok intakt antitestek proteolitikus emésztéséből származnak [Morimoto és mtsai., J. Biochem. Biophys. Methods 24, 107-117 (1992); Brennan és mtsai., Science 229, 81 (1985)]. Azonban, e fragmentumok jelenleg már rekombináns gazdasejtekkel közvetlenül is előállíthatók. Például, az antitest-fragmentumok izolálhatók a fentiekben tárgyalt fág-kimutatási könyvtárakból. Esetleg, Fab'-SH fragmentumok közvetlen kinyerhetők *E. coli*-ból és kémiai úton kapcsolhatók $F(ab')_2$ fragmentumokká [Carter és mtsai., Bio/Technology 10, 163-167 (1992)]. Egy másik megközelítés szerint, rekombináns gazdasejt-tenyészetből közvetlenül izolálhatunk $F(ab')_2$ fragmentumokat. Az antitest-fragmentumok előállítására szolgáló egyéb eljárások a szakember számára ismertek. A találmány más megvalósítási módjaiban, a kiválasztott antitest egyesszálú Fv-fragmentum (scFv) [WO 93/16185 sz. nemzetközi közzétételi irat; US 5.571.894 sz. és US 5.587.458 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Ilyen, lineáris antitest-fragmentumok lehetnek monospecifikusak vagy bispecifikusak.

A bispecifikus antitestek olyan antitestek, amelyek kötőspecificitás mutatnak legalább két különböző epitópra nézve. Például, bispecifikus antitestek a Dkk-1 két különböző epitópjához kötődhetnek. Bispecifikus antitestek készíthetők teljes hosszúságú antitest vagy antitest-fragmentumok formájában (például $F(ab')_2$ bispecifikus antitestek).

Bispecifikus antitestek előállítására szolgáló eljárások a technikában ismertek. Teljes hosszúságú bispecifikus antitest előállítása hagyományosan két, különböző specificitású, immunglobulin-eredetű nehézlánc-pár koexpresszióján alapul [Milstein és mtsai., Nature 305, 537-539 (1983)]. Mivel az immunglobulin-eredetű nehéz- és könnyűláncok összeválogatódása véletlenszerű, e hibridómák (kvadrómák) tíz különböző antitest-molekula lehetséges keverékét állítják elő, amelyek közül csak egynek van helyes bispecifikus szerkezete. A helyes molekula tisztítása – amely általában affinitáskromatográfiás lépésekkel történik – és a kitermelés alacsony. Hasonló eljárást ismertet a WO 93/08829 sz. nemzetközi közzétételi irat, és írtak le Traunecker és munkatársai [Traunecker és mtsai., EMBO J. 10, 3655-3659 (1991)].

Különféle megközelítések szerint, antigének kívánt kötési specificitású variábilis doménjeit (antitest-antigén kombinációs helyek) fuzionáltatjuk immunglobulinok konstans

doménjeinek szekvenciáival. Előnyös, ha a fúzió egy adott immunglobulin nehézláncának konstans doménjével történik, amely domén legalább a csuklórégió, CH2 és CH3 régiók egy részét tartalmazza. Előnyös, ha legalább a fúziók egyike tartalmazza a könnyűlánc kötéséhez szükséges helyet tartalmazó első nehézlánc-eredetű konstans régiót (CH1). Immunglobulin-eredetű nehézláncot és, igény szerint, az immunglobulin-eredetű könnyűláncot is tartalmazó fúziókat kódoló DNS-eket külön-külön expressziós vektorokba illesztünk, és ezzel alkalmas gazdaszervezetet kotranszfektálunk. A találmány megvalósítási módjaiban, ez nagy flexibilitást biztosít a három polipeptid-fragmentum közös részeinek beállítására, ha az optimális kitermelést biztosító konstrukcióban egyenlő arányban alkalmazzuk a három polipeptidláncot. Azonban beilleszthetjük két vagy mind a három polipeptidláncot kódoló szekvenciát egyetlen vektorba is, ha legalább két polipeptidlánc egyenlő arányban történő expressziója elégségesen magas mértékű, vagy ha az arányoknak nincs különösebb jelentősége.

E megközelítés előnyös megvalósítási módjában, a bispecifikus antitestek egyik karja egy adott első kötési specificitású, hibrid immunglobulin-eredetű nehézláncot, a másik kar pedig hibrid immunglobulin-eredetű nehézlánc-könnyűlánc párt (amely a második specificitást biztosítja) tartalmaz. Úgy találtuk, hogy ezen aszimmetrikus szerkezet elősegíti a kívánt bispecifikus vegyület elkülönítését az immunglobulin-láncok nem kívánt kombinációitól, mivel a bispecifikus molekula egyik felét képező, immunglobulin eredetű könnyűlánc jelenléte könnyű lehetőséget biztosít a tisztításhoz [lásd például, Suresh és mtsai., Meth. Enzymol. 121, 210 (1986)].

Egy másik, az US 5.731.168 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetett megközelítés szerint, antitest-molekulapárok közötti érintkezési felületet génsebészeti úton megváltoztathatunk, hogy maximalizáljuk a rekombináns sejttenyészetből visszanyerhető heterodimerek arányát. Az előnyös érintkező felület egy adott antitest konstans doménjének részét képező C_H3 doménnek legalább egy részét tartalmazza. Ebben az eljárásban, az első antitest-molekula érintkezési felületét alkotó, kisméretű aminosav-oldalláncokból egyet vagy többet nagyobb oldalláncokra (például, tirozin vagy triptofán) cserélünk. Nagyméretű aminosav-oldalláncok kisebb méretűre (például, alanin vagy treonin) cserélésével a másik antitest-molekula érintkezési felületén azonos vagy hasonló méretű kompenzációs „üregeket" alakítunk ki. Ennek segítségével fokozzuk a heterodimerek kialakulásának kitermelését a nem kívánt végtermékekkel, például homodimerekkel, szemben.

Bispecifikus antitestek közé tartoznak keresztkötött vagy „heterokonjugátum" típusú antitestek. Például, a heterokonjugátumot alkotó egyik antitesthez avidint kapcsolhatunk, a másikhoz pedig biotint. Ilyen antitesteket, például, nem kívánt sejtek immunrendszer általi célbavételéhez [US 4.676.980 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], és HIV fertőzés kezelésére javasolnak [WO 91/00360 sz. és WO 92/200373 sz. nemzetközi közzétételi iratok; EP 03089 sz. európai közzétételi irat]. Heterokonjugátum típusú antitesteket készíthetünk bármilyen, kényelmesen alkalmazható keresztkötési eljárásokkal. Alkalmas keresztkötő reagensek a technikában ismertek, és ilyenek mellett számos keresztkötési eljárásokat is ismertet az US 4.676.980 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat.

Bispecifikus antitestek antitest-fragmentumokból történő készítésére szolgáló eljárások az irodalomban szintén le vannak írva. Például, bispecifikus antitesteket előállíthatunk kémiai kapcsolás alkalmazásával. Brennan és munkatársai [Brennan és mtsai., Science 229, 81 (1985)] leírnak egy olyan eljárást, amelyben intakt antitesteket proteolitikus úton hasítanak $F(ab')_2$ fragmentumok előállítása céljából. E fragmentumokat azután nátriumarzénit (ditiol komplexáló ágens) jelenlétében redukálnak a vicinális ditiolok stabilizálása és az intracelluláris diszulfid kialakulás megakadályozása céljából. Az így készített Fab' fragmentumokat tionitrobenzoát (TNB) származékokká alakítják. A Fab'-TNB származékok egyikét merkaptoetilaminnal végzett redukcióval visszaalakítják Fab'-tiollá és a bispecifikus antitest kialakítása céljából összekeverik a másik Fab'-TNB származék ekvimoláris mennyiségével. Az előállított bispecifikus antitesteket alkalmazhatjuk enzimek szelektív immobilizálására.

Továbbá, Fab'-SH fragmentumokat közvetlenül visszanyerhetünk *E. coli*-ból, és ezeket kémiai úton összekapcsolva bispecifikus antitesteket készíthetünk [Shalaby és mtsai., J. Exp. Med. 175, 217-225 (1992)].

Különféle eljárás ismert bispecifikus antitest-fragmentumoknak közvetlenül valamilyen rekombináns sejttenyészetben történő előállítására és az abból való izolálására. Például, bispecifikus antitesteket előállítottak már leucinzippzárak alkalmazásával [Kostelny és mtsai., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992)]. A Fos és Jun fehérjékből származó leucinzippzár-peptideket génfúzióval kapcsolunk két különböző antitest Fab' részeihez. Antitest-homodimereket monomerek kialakítása céljából a csuklórégiónál redukálunk és az antitest-heterodimerek kialakítása végett újra oxidáljuk. Ezen eljárás alkalmazható antitest-homodimerek előállítására is. A Hollinger és munkatársai által leírt [Hollinger és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448 (1993)] „diatest" eljárás alternatív me-

chanizmust biztosít bispecifikus antitest-fragmentumok előállítására. A fragmentumok nehézlánc-eredetű variábilis doménhez (V_H) a könnyűlánc-eredetű variábilis domént (V_L) olyan méretű linkerrel kapcsoljuk, amely túl rövid ahhoz, hogy ugyanazon láncon két domén között párképződés jöjjön létre. Eszerint, az egyik fragmentum V_H és V_L doménjeit arra kényszerítjük, hogy egy másik fragmentum komplementer V_H és V_L doménjei képezzenek párt, így két antigénkötő-helyet alakítunk ki. Bispecifikus antitest-fragmentumok előállítására szolgáló másik eljárásban egyesszálú Fv (sFv) dimereket alkalmazunk [Gruber és mtsai., J. Immunol. 152, 5368 (1994)].

A találmány tárgyát képezik a kettőnél több valenciájú antitestek is. Például, trispecifikus antitestek is készíthetők [Tutt és mtsai., J. Immunol. 147, 60 (1991)].

A találmány tárgyát képezik az itt leírt, Dkk-1 elleni antitestek aminosav-szekvenciáját érintő módosítások. Például, kívánatos lehet az antitest kötési affinitásának és/vagy más biológiai tulajdonságainak javítása. A Dkk-1 elleni antitest aminosav-szekvencia-változatai előállíthatók a Dkk-1 elleni antitestet kódoló nukleinsav megfelelő nukleotidjainak megváltoztatásával, vagy peptidszintézissel. Ilyen módosítások közé tartoznak – például – a Dkk-1 elleni antitest aminosav-szekvenciáját alkotó aminosavakat érintő deléciók, inzerciók és/vagy szubsztitúciók. A deléciók, inzerciók, és szubsztitúciók a végtermék eléréséhez bárhogy kombinálhatók feltéve, hogy a végtermék a kívánt jellemzőket mutatja. Az aminosavakat érintő cserék megváltoztathatják a Dkk-1 elleni antitest poszttranszlációs folyamatait, például a glikozilációs helyek számának vagy helyének megváltoztatásával.

A Dkk-1 elleni antitest bizonyos, a mutagenezis szempontjából előnyös helyeknek számító aminosavai vagy régiói meghatározására alkalmas eljárás az „alaninre irányuló pásztázó mutagenezis" [Cunningham és Wells, Science 244, 1081-1085 (1989)]. Ebben, aminosavat vagy célbavett aminosav-csoportot azonosítunk (például, töltést hordozó aminosavakat, mint például arg, asp, his, lys, és glu) és ezeket semleges vagy negatív töltésű aminosavval (legelőnyösebben alaninnal vagy polialaninnal) helyettesítjük a kérdéses aminosavaknak a Dkk-1 antigénnel történő kölcsönhatásának befolyásolására. A szubsztitúciókra funkcionális érzékenységet mutató aminosav-helyeket ezután finomítjuk további szubsztitúciók bevitelével vagy a szubsztitúciós helyeken vagy azokra irányuló változatokkal. Így, míg egy adott aminosavszekvencia-változat bevitele előre meghatározott, addig a mutáció természete önmagában nem meghatározott. Például, egy adott helyen végzett mutáció működőképességének analízisére, alaninre irányuló pásztázást vagy véletlenszerű

mutagenezist végzünk a célbavett kodonon vagy régión, és az expresszált Dkk-1 elleni antitest-változatokat a kívánt aktivitásra nézve szkríneljük.

Aminosav-szekvenciába irányuló inzerciók közé tartoznak amino- és/vagy karboxiterminális fúziók, amelyek - méretüket tekintve - egy aminosavtól száz vagy több aminosavból álló polipeptidek mellett lehetnek egy vagy több aminosavat érintő intraszekvenciális inzerciók. Terminális inzerció közé tartozik például olyan, Dkk-1 elleni antitest, amely N-terminális metionil aminosavat tartalmaz, vagy az antitestet hipoglikémiás polipeptiddel fuzionáltattuk. A Dkk-1 elleni antitest-molekula más inzerciós változatai közé tartozik a Dkk-1 elleni antitest N- vagy C-terminálisának fúziója enzimmel vagy a szérumban az antitest fél-életidejét megnövelő polipeptidhez.

A változatok másik típusa az aminosav szubsztitúciós változata. E változatok esetében a Dkk-1 elleni antitestben legalább egy aminosavat egy másik, attól különböző aminosavval helyettesítünk. A szubsztitúciós mutagenezis szempontjából leginkább érdekes helyek közé a hipervariábilis régió tartozik, de az FR megváltoztatása is számbavehető. Konzervatív szubsztitúciókat mutatunk be az 1. táblázatban az „előnyös szubsztitúciók" című fejléc alatt. Ha ilyen szubsztitúciók következtében a biológiai aktivitás megváltozik, akkor jelentősebb változtatásokat – az 1. táblázatban „példakénti szubsztitúciók" néven jelezve, vagy az aminosav-osztályok vonatkozásában az alábbiakban részletezve - vihetünk be és a terméket szkrínelhetjük.

1. táblázat

Eredeti aminosav	példakénti szubsztitúciók	előnyös szubsztitúciók
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe, norleucin	leu
Leu (L)	norleucin, ile, val, met, ala, phe	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala, norleucin	leu

Az antitest biológiai tulajdonságait lényeges mértékben módosíthatjuk olyan szubsztitúciók szelektálásával, amelyek jelentősen különböznek a (a) a szubsztitúció által érintett területen a polipeptid vázszerkezetének, például lemez vagy helikális konformáció, fenntartását, (b) a molekula töltésének vagy hidrofobicitásának a célzott helyen történő megtartásának, vagy (c) az oldalláncok fenntartását illetően. A természetes körülmények között előforduló aminosavakat az oldalláncok közös tulajdonságai alapján az alábbi csoportokba sorolhatjuk:

(1) hidrofób: norleucin, met, ala, val, leu, ile;

(2) semleges hidrofil: cys, ser, thr;

(3) savas: asp, glu;

(4) bázikus: asn, gln, his, lys, arg;

(5) a lánc orientációját befolyásoló aminosavak: gly, pro; és

(6) aromás: trp, tyr, phe.

A nem konzervatív szubsztitúciók az egyik ilyen osztályba tartozó aminosav másik osztályba tartozó aminosavra történő cseréjét jelentik.

Bármely más cisztein, amely nem vesz részt a Dkk-1 elleni antitest korrekt konformációjának biztosításában, szintén szubsztituálható, általában szerinnel, a molekula oxidatív stabilitásának javítása és a helytelen keresztkötődés megakadályozása céljából. Viszont, cisztein kötés(eke)t adhatunk az antitesthez a stabilitás fokozása céljából (különösen, ha az antitest antitest-fragmentum, mint például Fv fragmentum).

Különösen előnyös szubsztitúciós változatok típusai közé tartoznak azok, amelyekben a kiindulási antitest (például, humanizált- vagy emberi antitest) hipervariábilis régióját alkotó aminosavak közül egyet vagy többet szubsztituálunk. Általában, az eredményül kapott, további fejlesztésre kiválasztott változat(ok) biológiai tulajdonságai jobbak azoknál az antitesteknél, amelyekből elő lettek állítva. Ilyen szubsztitúciós változatok készítésének kényelmes módjai közé tartozik a fág-kimutatás alkalmazásával végzett affinitás érési eljárás. Röviden, a hipervariábilis régió számos helyén (például, 6-7 helyen) mutációt végzünk az egyes helyeken lehetséges összes aminosav-szubsztitúció generálása céljából. Az így előállított antitest-változatokat monovalens formában, szálas fágrészecskékből mutatjuk ki úgy, hogy az antitest-változatokat az M13 III. génjével fuzionáltatva a részecskékbe csomagoljuk. A fággal kimutatott változatokat, az ismertettek szerint, biológiai aktivitásukra (például, kötési affinitásra) nézve szkríneljük. A hipervariábilis régióban lévő, módosításra alkalmas helyek azonosítására alaninnal pásztázó mutagenezist végezhetünk a hipervariábilis régióban az antigén megkötésében jelentős mértékben résztvevő aminosa-

vak azonosítására. Esetleg, vagy emellett, hasznos lehet, ha analizáljuk az antigén-antitest komplex kristályszerkezetét az antitest és a Dkk-1 közötti érintkezési pontok azonosítására. Ilyen, az érintkezésben résztvevő és az azt övező aminosavak, az ismertetett eljárások szerint szubsztitúció szempontjából számbavehetők. Miután előállítottunk ilyen változatokat, a változatokat a leírtak szerint szkríneljük és egy vagy több releváns vizsgálatban legkiválóbb tulajdonságokat mutató antitesteket további fejlesztés céljából kiválaszthatjuk.

Az antitest másik aminosav-variánsa megváltoztatja az antitest eredeti glikozilációs mintázatát. A megváltoztatás azt jelenti, hogy az antitestben talált egy vagy több szénhidrát-csoportot megszüntetjük és/vagy az antitesthez egy vagy több, az antitestben egyébként jelen nem lévő glikozilációs helyet adunk.

Antitestek glikozilációja jellemzően N-kapcsolt vagy O-kapcsolt glikoziláció. Az N-kapcsolt glikoziláció azt jelenti, hogy a szénhidrát-csoport egy adott aszparagin aminosavhoz kapcsolódik. Az aszparagin-X-szerin és aszparagin-X-treonin (ahol X a prolinon kívül lehet bármilyen aminosav) tripeptid-szekvencia alkotja a szénhidrát-csoportnak az aszparagin oldalláncra történő enzimatikus kapcsolásának felismerési helyét. Így, e tripeptidek egyikének megléte egy adott polipeptidben potenciális glikozilációs helyet jelent. Az O-kapcsolt glikoziláció esetén, N-acetilgalaktózamin, galaktóz, vagy xilóz cukrok egyike kapcsolódik egy adott hidroxi-aminosavhoz, leginkább szerinhez vagy treoninhoz, bár 5-hidroxiprolin vagy 5-hidroxilizin is számbajöhet.

Az antitesthez úgy adhatunk könnyen glikozilációs helyeket, ha oly módon változtatjuk meg az antitest aminosav-szekvenciáját, hogy az a fentiekben leírt tripeptid-szekvenciák (N-kapcsolt glikozilációs helyek) közül egyet vagy többet tartalmazzon. A változtatás történhet úgy is, hogy az eredeti antitest szekvenciájába szubsztitúcióval vagy addícióval egy vagy több szerin vagy treonin aminosavat viszünk be (O-kapcsolt glikozilációs helyek).

A Dkk-1 elleni antitestek aminosav-változatait kódoló nukleinsav-molekulák a technikában ismert különféle eljárásokkal állíthatók elő. Ezen eljárások közé - minden korlátozás nélkül – az alábbiak tartoznak: természetes forrásból történő izolálás (természetes körülmények között előforduló aminosavszekvencia-változatok esetében) vagy oligonukleotiddal közvetített (vagy irányított) mutagenezissel, PCR mutagenezissel, vagy egy adott korábban készített változatnak vagy a Dkk-1 elleni antitest nem variáns változatának kazetta-mutagenezisével.

Kívánatos lehet a találmány szerinti antitest effektor funkcióit érintő módosítása, például Fc receptorhoz való kötődés fokozása. Ezt úgy érhetjük el, ha az antitest Fc régió-

jába egy vagy több aminosav-szubsztitúciót illesztünk be. Esetleg vagy ezenfelül, cisztein aminosavakat is bevihetünk az Fc régióba, ezáltal lehetővé tesszük, hogy e régióban láncok közötti diszulfid-kötések alakuljanak ki.

Az antitest szérum-féléletidejének fokozására az antitestbe (különösen egy adott antitest-fragmentumba) „mentő" („salvage") receptorkötő-epitópot építhetünk be [lásd például, US 5.739.277 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. A leírás szerinti értelemben, a „mentő receptorkötő-epitóp" kifejezés egy adott IgG molekula (például, IgG_1, IgG_2, IgG_3 vagy IgG_4) Fc régiójának olyan receptorát jelenti, amely felelős az IgG molekula *in vivo* szérum-féléletidejének fokozására.

Az antitest más módosításai is a találmány tárgykörébe tartoznak. Például, az antitestet kapcsolhatjuk különféle nem fehérje természetű polimerekhez, például polietilén-glikolhoz, polipropilén-glikolhoz, polioxialkilénekhez, vagy polietilén-glikol és polipropilén-glikol kopolimerjeihez.

Izommal kapcsolatos, inzulinnal szembeni rezisztenciára és hipoinzulinémiára utaló előjelek esetén történő terápiás alkalmazások

Izommal kapcsolatos, inzulinnal szembeni rezisztenciára és hipoinzulinémiára utaló előjelek esetén a Dkk-1 antagonistát bármely alkalmas módon beadhatjuk, így - minden korlátozás nélkül – intravénás (IV), intramuszkuláris (IM), szubkután (SC) és intraperitoneális (IP) módok mellett, a beadás történhet transzdermális, orális, nyelv alatti, végbélen át, orron keresztül, és inhalációs utakon. IV, IM, SC, és IP beadás lehet rásegítő vagy infúziós, és SC esetében alkalmazhatunk lassú felszabadulást biztosító, beültethető eszközt ideértve - minden korlátozás nélkül – a pumpákat, lassú felszabadulást biztosító készítményeket, és mechanikai eszközöket. Előnyös a szisztémás beadás.

A Dkk-1 antagonista beadására szolgáló különösen előnyös eljárások egyike szubkután infúzióval, különösen valamilyen pontosan adagoló eszközzel, például pumpával, történik. Az ilyen pumpa újra felhasználható vagy eldobható, és beültethető vagy külsőleg felerősíthető. E célra megfelelően alkalmazható, gyógyászati célra gyártott infúziós pumpák közé tartoznak, például, az US 5.637.095 sz., US 5.569.186 sz. és US 5.527.307 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismertetett pumpák. A készítmények az ilyen eszközökből folyamatosan vagy szakaszosan adhatók be.

Dkk-1 antagonisták tárolásra alkalmas, terápiás formulációi közé tartoznak a kívánt tisztasági fokú antagonista gyógyászatilag elfogadható hordozókkal, kötőanyagokkal vagy stabilizálókkal [Remington's Pharmaceutical Sciences, szerk.: Osol (1980)] készített, liofilizált formulációban lévő vagy vizes oldatok alkotta keverékei. Gyógyászatilag elfo-

gadható hordozók, kötőanyagok vagy stabilizálók a befogadóra nézve, az alkalmazott dózisban és koncentrációkban nem toxikusak, és tartalmaznak puffereket, például foszfátot, citrátot és más szerves savakat; antioxidánsokat, például aszkorbinsavat és metionint; tartósítószereket (mint például oktadecildimetilbenzil ammónium klorid, hexametónium klorid, benzalkónium klorid, benzetónium klorid, fenol, butil- vagy benzilalkohol, alkil-parabének – például metil- vagy propilparabén -, katekol, rezorcinol, ciklohexanol, 3-pentanol, m-krezol); alacsony molekulatömegű (10 aminosavnál rövidebb) polipeptideket; fehérjéket, mint például szérumalbumin, zselatin, vagy immunglobulinok; hidrofil polimereket, például polivinilpirrolidon; aminosavakat, például glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, arginin vagy lizin; monoszaccharidokat, diszaccharidokat és más szénhidrátokat, így glükózt, mannózt vagy dextrineket; kelátképző ágenseket, például EDTA; cukrokat, például szacharóz, mannitol, trehalóz vagy szorbitol; sóképző ionokat, például nátriumion; fémkomplexeket (például, Zn-fehérje komplexeket); és nem ionos felületaktív anyagokat, például TWEEN™, PLURONICS™ vagy polietilénglikol (PG). Előnyös liofilizált, Dkk-1 elleni antitest-készítményeket ismertet a WO 97/04801 sz. nemzetközi közzétételi irat. E készítményekben az (előnyösen oldható formában lévő) aktív, Dkk-1 antagonista aránya körülbelül 0,1-90 tömeg%-ot, és általánosabban 10-30% tesz ki.

Az aktív összetevőt bezárhatjuk olyan mikrokapszulákba, amelyeket, például, koacervációs eljárással, mint például hidroximetil-cellulózt vagy zselatint tartalmazó mikrokapszulák, vagy interfaciális polimerizációval, mint például poli-(metilmetacilát) mikrokapszulák, állítunk elő kolloid szerkezetű drogbeviteli rendszerekben (például, liposzómák, albumin mikroszférák, mikroemulziók, nano-partikulumok és nanokapszulák) vagy makroemulziókban. Ilyen eljárásokat ismertet a Remington's Pharmaceutical Sciences [mint fent].

A találmány szerinti, Dkk-1 elleni antitestek immunliposzómákba is formulázhatók. Az antitestet tartalmazó liposzómákat a technikában ismert eljárásokkal [Epstein és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3688 (1985); Hwang és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4030 (1980); US 4.485.045 sz. és US 4.544.545 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat; WO 97/38731 sz. nemzetközi közzétételi irat (1997. október 23)] állítjuk elő. Fokozott keringési időt biztosító liposzómákat ismertet az US 5.013.556 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat.

Különösen alkalmas liposzómák készíthetők foszfatidilkolint, koleszterolt és PEG-gel derivatizált foszfatidil-etanolamint (PEG-PE) tartalmazó lipidkészítménnyel végzett fordított fázisú evaporációs eljárással. Liposzómákat préselünk át meghatározott pó-

rusméretű szűrőn a kívánt átmérőjű liposzómák előállítása céljából. A találmány szerinti antitest Fab' fragmentumait kölcsönös diszulfid-cserés reakcióban a liposzómákhoz konjugáltathatjuk [Martin és mtsai., J. Biol. Chem. 257, 286-288 (1982)].

Késleltetett felszabadulást biztosító készítmények is előállíthatók. Ilyen, késleltetett felszabadulást biztosító készítmények közé tartoznak az antitestet tartalmazó, szilárd, hidrofób polimerekből álló féligáteresztő mátrixok, amelyek megfelelő alakra – például filmek, vagy mikrokapszulák - vannak formálva. Ilyen, késleltetett felszabadulást biztosító mátrixok közé az alábbiak tartoznak: poliészterek, hidrogélek (például, poli(2-hidroxietil-metakrilát), vagy poli(vinilalkohol)), polilaktidok [US 3.773.919 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], L-glutaminsav és γ etil-L-glutamát kopolimerjei, nem lebomló etilén-vinil-acetát, lebomló tejsav-glikolsav kopolimer, mint például LUPRON DEPOT™ (tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid acetátból álló, injektálható mikrogömbök), és poli-D-(-)-3-hidroxivajsav.

A specifikus antagonisták bármelyike kapcsolható hordozófehérjéhez a terápiás antagonista szérum-féléletidejének fokozása céljából. Például, oldható immunglobulin-kimérát, mint például amilyet a találmányban leírtunk, készíthetünk az egyes specifikus Dkk-1 antagonistára vagy az antagonista egy részére [US 5.116.964 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Az immunglobulin-kimérát könnyen tisztíthatjuk IgG-t megkötő protein A-Sepharose kromatográfiával. A kiméra képes magasabb aviditású és szérum-féléletidejű immunglobulin-szerű dimert kialakítani.

Az *in vivo* beadásra szánt készítményeknek sterilnek kell lenniük. A sterilizálást könnyen elvégezhetjük steril szűrőmembránokon keresztüli szűréssel.

A találmány szerinti készítmény tartalmazhat egynél több aktív vegyületet, amennyiben a konkrét probléma kezelésében erre szükség van. Ebből a szempontból előnyösek az olyan komplementer aktivitású vegyületek, amelyek károsan nem befolyásolják egymás hatásait. Emellett, ilyen aktív vegyület külön is beadható a kezelni kívánt emlősnek.

Például, bizonyos problémák esetén szükség lehet továbbá arra, hogy inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére alkalmas ágenst biztosítsunk. Ezenfelül, a diétára és súlycsökkentésre nem reagáló, 2. típusú dibeteses egyedek reagálhatnak a Dkk-1 antagonistával együtt beadott szulfonilkarbamidokra. A szulfonilkarbamid típusú drogok osztályába tartozik az acetohexamid, klórpropamid, tolazamid, tolbutamid, glibenklamid, glibornurid, gliklazid, glipizid, gliquidon és glimidin. E célra alkalmas más ágensek közé tartozik autoimmun reagens, inzulinnal szembeni érzékenységet fokozó ágens, mint példá-

ul a glitazon családba tartozó vegyületek, ideértve az US 5.753.681 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetett vegyületeket, mint például troglitazon, pioglitazon, englitazon, és rokon vegyületek, inzulinreceptor-tirozinkináz inhibitorának antagonistái [US 5.939.269 sz. és US 5.939.269 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok], IGF-1/IGFBP-3 komplex [US 6.040.292 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], TNF-α működésének antagonistái [US 6.015.558 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], növekedési hormont felszabadító ágens [US 5.939.387 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], és amilin elleni antitestek [US 5.942.227 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Egyéb alkalmazható vegyületek közé tartozik az inzulin (egy vagy több különféle inzulin), inzulinutánzók, mint például kismolekulájú inzulin, a fentiekben már említett, inzulin analógok vagy azok fiziológiailag aktív fragmentumai, a fentiekben már említett, inzulineredetű peptidek, vagy azok analógjai illetve fragmentumai. A fenti meghatározásban specifikáltuk ezeket az ágenseket.

Hipoinzulinémia kezelésére, például, inzulint adhatunk be a Dkk-1 antagonistával együtt vagy attól elkülönítve.

Ilyen további molekulák megfelelően hatásos mennyiségben vannak jelen, vagy valamilyen kombinációban, a cél szempontjából ilyen mennyiségben beadhatók. Kombináció esetében, a beadásra szánt mennyiség jellemzően kevesebb, mintha önmagukban, a Dkk-1 antagonista nélkül adnánk be. Ha a Dkk-1 antagonistát és az említett molekulákat együtt formulázzuk, a formulázásban, például, a probléma típusa, az alany, az alany kora és testtömege, az aktuális klinikai állapot, beadási idő, dózisforma, a beadás módja, stb. szerint meghatározott mennyiségeket alkalmazhatunk. Például, a Dkk-1 antagonistával együtt formulázott drogot előnyösen, a Dkk-1 antagonista tömegarányához viszonyítva körülbelül 0,0001-10.000 tömegarányban alkalmazzuk.

A Dkk-1 antagonista inzulinnal együtt történő alkalmazása lehetővé teszi az inzulin dózisának, a kezelés idején önmagában alkalmazott dózishoz képest történő, csökkentését. Ezért, a nagy mennyiségű inzulin beadásával járó érrendszeri komplikáció és hipoglikémia indukálásának kockázata alacsony. Felnőtt, (körülbelül 50 kg testtömegű) diabetikus páciensnek beadandó inzulin napi dózisa, például, általában körülbelül 10-100 E (egység), előnyösen 10-80 E, de az orvos meghatározhat ennél kevesebbet is. Ilyen páciensnek beadandó, inzulin szekrécióját fokozó ágensek napi dózisa, például, előnyösen körülbelül 0,1-1000 mg, előnyösebben körülbelül1-100 mg. Ilyen páciensnek beadandó biguanidok napi dózisa, például, előnyösen körülbelül 10-2500 mg, előnyösebben körülbelül 100-1000 mg. Ilyen páciensnek beadandó, α-glikozidázgátlók napi dózisa, például,

előnyösen körülbelül 0,1-400 mg, előnyösebben körülbelül 0,6-300 mg. Ilyen páciensnek beadandó ergoset, pramlintid, leptin, BAY-27-9955, vagy T-1095 dózisa, például, előnyösen körülbelül 0,1-2500 mg, előnyösebben körülbelül 0,5-1000 mg. A fenti dózisok mindegyikét beadhatjuk naponta egyszer vagy több alkalommal.

A Dkk-1 antagonista beadható az inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére alkalmas, nem drog típusú kezeléssel, például hasnyálmirigy-átültetéssel együtt.

Inzulinnal szemben rezisztens vagy hipoinzulinémiás emlősnek beadandó antagonista dózisát releváns körülmények ismeretében - ideértve az emlős állapotát, az antagonista típusát, a probléma típusát, és a beadás módját - az orvos határozza meg. A dózis előnyösen olyan alacsony, hogy ne okozzon jelentős mértékű súlygyarapodást, és az orvos meg tudja határozni ezt a szintet. Az emberi 2. típusú diabetes kezelésére bevált glitazonok (rosiglitazon/Avandia és pioglitazon/Actos) ugyan okoznak némi súlygyarapodást, azonban a mellékhatások ellenére még is alkalmazzák ezeket, mivel terápiás indexük szerint jótékony hatásúnak bizonyultak. A leírásban megadott dózisok a találmány oltalmi körét semmilyen módon sem korlátozzák. A leírás szerinti értelemben, a hipoinzulinémiára és inzulinnal szembeni rezisztenciára vonatkozó „terápiásan hatékony" mennyiséget a fenti faktorok határozzák meg, de a mennyiség általában körülbelül 0,01-100 mg/kg testtömeg/nap. Az előnyös dózis körülbelül 0,1-50 mg/kg/nap, előnyösebben 0,1-25 mg/kg/nap. Továbbá, előnyösebb, ha a Dkk-1 antagonistát naponta adjuk be, emberek esetében az intravénás vagy intramuszkuláris dózis körülbelül 0,3-10 mg/kg testtömeg/nap, előnyösebben körülbelül 0,5-5 mg/kg. Szubkután beadásra, a dózis előnyösen nagyobb, mint az intravénásan vagy intramuszkulárisan beadásra kerülő, terápiásan egyenértékű dózis. Előnyös, ha embereknél a napi szubkután dózis körülbelül 0,3-20 mg/kg, előnyösebben körülbelül 0,5-5 mg/kg, mindkét probléma esetében.

A találmány tárgyát különféle dozírozási ütemezések is képezik. A találmány tárgykörébe tartoznak olyan folyamatos dozírozási ütemezések, amelyekben Dkk-1 antagonistát adunk be szabályos időközönként (a dózistól és a dózisformától függően naponta, hetente, vagy havonta), lényeges szünetek nélkül. Előnyös folyamatos dozírozási ütemezések közé tartozik a naponkénti folyamatos infúzió, amely során minden egyes napon infúzióval Dkk-1 antagonistát adunk be, és a folyamatos rásegítő beadási ütemezés, amikor naponta legalább egyszer, rásegítő injekció vagy inhaláló szer formájában vagy intranazális úton Dkk-1 antagonistát adunk be. A találmány tárgyát szakaszos dozírozási ütemezések is képezik. A szakaszos beadási ütemezés pontos paraméterei a készítmény, beadási mód, a kezelni kívánt emlős klinikai szükségleteitől függően változnak. Például, ha

a Dkk-1 antagonistát infúzióval adjuk be, a beadási ütemezésben elkülöníthetünk egy első beadási periódust, amelyet egy másik periódus követ, amely utóbbiban a Dkk-1 antagonistát nem adunk be, és amely az első periódusnál nem hosszabb, azzal egyenlő, vagy annál rövidebb.

Ha a beadás rásegítő injekcióval történik különösen, ha abban lassú felszabadulást biztosító készítmény alkalmazunk, a dozírozási ütemezés lehet folyamatos abban, hogy a Dkk-1 antagonistát minden egyes nap beadjuk, vagy lehet szakaszos, amelyben elkülönítünk egy első és egy második periódust (lásd fent).

Bármely eljárással végzett folyamatos vagy szakaszos beadás tartalmaz olyan dozírozási ütemezést, amelyben a dózist az első periódus során úgy módosítjuk, hogy – például – az első periódus kezdetén a dózis alacsony, majd növeljük egészen az első periódus végéig, vagy a dózis kezdetben magas és az első periódus során csökkentjük, vagy a dózis kezdetben alacsony, majd csúcsszintre emeljük, az első periódus vége felé pedig csökkentjük, vagy ezek bármilyen kombinációja.

A Dkk-1 antagonista beadásának az inzulinnal szembeni rezisztenciára gyakorolt hatásait különféle, a technikában ismert vizsgálatokkal mérhetjük. Legáltalánosabb az, amikor a diabetes hatásainak enyhítése javított glikémiás szabályozást (amelyet a vér glükózszintjének sorozatos tesztelésével mérünk), jó glikémiás szabályozáshoz szükséges inzulinigény csökkenését, a glikozilált hemoglobin csökkenését, megnövekedett glikozilációs végtermékek (AGE) vérben mérhető szintjének csökkenését, a „dawn jelenség" csökkenését, csökkent ketoacidosist és javult lipidprofilt eredményez. Esetleg, Dkk-1 antagonista beadása eredményezheti a diabetes szimptómáinak stabilizálást, amelyet a vér csökkent glükózszintjei, csökkent inzulinigény, csökkent glikozilált hemoglobin és vér AGE, csökkent keringési, vese, idegi és retinát érintő komplikációk, a terhesség komplikációinak csökkenése, és javult lipidprofil jelez.

A Dkk-1 antagonista vércukor-szintet csökkentő hatása megbecsülhető a glükóz vagy Hb(hemoglobin)A_{1c} koncentrációjának, az alany vénás vérplazmájából, a beadás előtt és után történő meghatározásával, és a beadás előtti és a beadás utáni koncentrációk összehasonlításával. A HbA_{1c} rövidítés glikozilált hemoglobint jelent, és általában a vér glükózkoncentrációjától függően jön létre. Ezért, a HbA_{1c}-et, mint a vér cukortartalma szabályozásának indexét, fontosnak tartjuk, és a HbA_{1c}-re nem egykönnyen befolyásolják a diabetikus páciens vérében tapasztalható gyors vércukor-ingadozások.

A hipoinzulinémia kezelésének eredményességét az mutatja, ha például, a páciensben a cirkuláló inzulin szintjei megemelkednek.

Az izom-helyreállításban és –regenerációban alkalmazott dózis - a páciens állapotától, a kérdéses i izom-helyreállítás specifikus típusától, stb. függően - jellemzően 0,01-100 mg/testtömeg-kilogramm, előnyösen 1-10 mg/kg. A dozírozás ütemezését tekintve, ezen a területen a klinikus a standard ütemezést alkalmazza. Az izom-helyreállítás és – regeneráció bizonyítékai kimutathatók különféle, a technikában ismert mérésekkel, ideértve az izomsejtek proliferációjának és differenciálódásának vizsgálatát, és polimeráz-láncreakciós tesztet [lásd például, Best és mtsai., J. Orthop. Res. 19, 565-572 (2001), amely eljárásban mioblasztból és fibroblasztból származó géntermékek mRNS szintjei változását mérték nyúleredetű, gyógyuló vázizomban mennyiségi, reverz-transzkriptáz – polimeráz-láncreakcióval].

A találmány tárgyát képezik továbbá inzulinnal szembeni rezisztencia és hipoinzulinémia kezelése mellett, izom-helyreállításra és –regenerációra szolgáló készletek is. A találmány szerinti készlet egy vagy több, Dkk-1 antagonistát, előnyösen antitestet, tartalmazó tárolóedényt és utasításkészletet tartalmaz, amelyben általában, az inzulinnal szembeni rezisztencia és hipoinzulinémia kezelésében, illetve az izom-helyreállításban és – regenerációban a Dkk-1 alkalmazására és dozírozására vonatkozó instrukciók vannak leírva. A készletben található instrukciók általában olyan információkat tartalmaznak, mint a dozírozás, a dozírozás ütemezése, az inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémiás elváltozás vagy izomállapot kezelésére javasolt beadási módok. A Dkk-1 antagonistát tartalmazó tárolóedények lehetnek egységnyi dózisok, ömlesztett csomagok (például, többszörös dózist tartalmazó csomagok), vagy alegység-dózisok.

Dkk-1 antagonistát csomagolhatunk bármilyen, kényelmesen alkalmazható, megfelelő csomagolásban. Például, ha a Dkk-1 antagonista fagyasztva-szárított formulációjú, normális esetben, visszazárható záródugóval ellátott ampullát alkalmazunk, így a drogot fiziológiás konyhasóoldatban átömlesztésre könnyen előkészíthetjük oly módon, hogy a visszazárható záródugón keresztül beinjektáljuk a folyadékot. Nem visszazárható, eltávolítható lezárással vagy visszazárható záródugóval ellátott ampulla (például, leforrasztott ampulla) alkalmazható a legkényelmesebben a Dkk-1 antagonista injektálható formái esetén. A találmány tárgyát specifikus eszközzel - például inhalálókészülék, orron keresztüli beadásra alkalmas eszköz (például, porlasztó), vagy infúziós eszköz, mint például minipumpa - kombinált alkalmazásra szolgáló csomagok is képezik.

Terápiás alkalmazás elhízottsággal és hiperinzulinémiával kapcsolatos problémák esetében

Elhízottsággal és hiperinzulinémiával kapcsolatos problémák esetében, a Dkk-1-et bármely alkalmas módon beadjuk, amelyek közé - minden korlátozás nélkül – az alábbiak tartoznak: intravénás (IV), intramuszkuláris (IM), szubkután (SC) és intraperitoneális (IP) módok mellett, a beadás történhet transzdermális, orális, nyelv alatti, végbélen át, orron keresztül, és inhalációs utakon. IV, IM, SC, és IP beadás lehet rásegítő vagy infúziós, és SC esetében alkalmazhatunk lassú felszabadulást biztosító, beültethető eszközt ideértve - minden korlátozás nélkül – a pumpákat, lassú felszabadulást biztosító készítményeket, és mechanikai eszközöket. Előnyös a szisztémás beadás.

A Dkk-1 beadására szolgáló különösen előnyös eljárások egyike szubkután infúzióval, különösen valamilyen pontosan adagoló eszközzel, például pumpával, történik. Az ilyen pumpa újra felhasználható vagy eldobható, és beültethető vagy külsőleg felerősíthető. E célra megfelelően alkalmazható, gyógyászati célra gyártott infúziós pumpák közé tartoznak, például, az US 5.637.095 sz., US 5.569.186 sz. és US 5.527.307 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismertetett pumpák. A készítmények az ilyen eszközökből folyamatosan vagy időszakosan adhatók be.

Dkk-1 tárolásra alkalmas, terápiás formulációi közé tartoznak a kívánt tisztasági fokú Dkk-1 gyógyászatilag elfogadható hordozókkal, kötőanyagokkal vagy stabilizálókkal [Remington's Pharmaceutical Sciences, szerk.: Osol (1980)] készített, liofilizált formulációban lévő vagy vizes oldatok alkotta keverékei. Gyógyászatilag elfogadható hordozók, kötőanyagok vagy stabilizálók a befogadóra nézve, az alkalmazott dózisban és koncentrációkban nem toxikusak, és tartalmaznak puffereket, például foszfátot, citrátot és más szerves savakat; antioxidánsokat, például aszkorbinsavat és metionint; tartósítószereket (mint például oktadecildimetilbenzil ammónium klorid, hexametónium klorid, benzalkónium klorid, benzetónium klorid, fenol, butil- vagy benzilalkohol, alkilparabének – például metil- vagy propilparabén -, katekol, rezorcinol, ciklohexanol, 3-pentanol, m-krezol); alacsony molekulatömegű (10 aminosavnál rövidebb) polipeptideket; fehérjéket, mint például szérumalbumin, zselatin, vagy immunglobulinok; hidrofil polimereket, például polivinilpirrolidon; aminosavakat, például glicin, glutamin, aszparagin, hisztidin, arginin vagy lizin; monoszaccharidokat, diszaccharidokat és más szénhidrátokat, így glükózt, mannózt vagy dextrineket; kelátképző ágenseket, például EDTA; cukrokat, például szacharóz, mannitol, trehalóz vagy szorbitol; sóképző ionokat, például nátriumion; fémkomplexeket (például, Zn-fehérje komplexeket); és nem ionos felületaktív anyagokat, pél-

dául TWEEN™, PLURONICS™ vagy polietilénglikol (PG). Előnyös liofilizált, Dkk-1 készítményeket ismertet a WO 97/04801 sz. nemzetközi közzétételi irat. E készítményekben a Dkk-1 aránya körülbelül 0,1-90 tömeg%-ot, és általánosabban 10-30% tesz ki.

Az aktív összetevőt bezárhatjuk olyan mikrokapszulákba, amelyeket, például, koacervációs eljárással, mint például hidroximetil-cellulózt vagy zselatint tartalmazó mikrokapszulák, vagy interfaciális polimerizációval, mint például poli-(metilmetacilát) mikrokapszulák, állítunk elő kolloid szerkezetű drogbeviteli rendszerekben (például, liposzómák, albumin mikroszférák, mikroemulziók, nano-partikulumok és nanokapszulák) vagy makroemulziókban. Ilyen eljárásokat ismertet a Remington's Pharmaceutical Sciences [mint fent].

A Dkk-1 liposzómakészítményei hagyományos eljárásokkal könnyen elkészíthetők. Ezenfelül, késleltetett felszabadulást biztosító készítmények is előállíthatók. Ilyen, késleltetett felszabadulást biztosító készítmények közé tartoznak az antitestet tartalmazó, szilárd, hidrofób polimerekből álló féligáteresztő mátrixok, amelyek megfelelő alakra – például filmek, vagy mikrokapszulák - vannak formálva. Ilyen, késleltetett felszabadulást biztosító mátrixok közé az alábbiak tartoznak: poliészterek, hidrogélek (például, poli(2-hidroxietil-metakrilát), vagy poli(vinilalkohol)), polilaktidok [US 3.773.919 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat], L-glutaminsav és γ etil-L-glutamát kopolimerjei, nem lebomló etilén-vinil-acetát, lebomló tejsav-glikolsav kopolimer, mint például LUPRON DEPOT™ (tejsav-glikolsav kopolimerből és leuprolid acetátból álló, injektálható mikrogömbök), és poli-D-(-)-3-hidroxivajsav.

A Dkk-1 kapcsolható hordozófehérjéhez vagy PEG-hez vagy POG-hoz vagy ilyen tulajdonságú más molekulához a szérum-féléletidő fokozása céljából, ahogyan ez a szakember számára már jól ismert.

Az *in vivo* beadásra szánt készítményeknek sterilnek kell lenniük. A sterilizálást könnyen elvégezhetjük steril szűrőmembránokon keresztüli szűréssel.

Hiperinzulinémia kezelésére, a Dkk-1-et beadhatjuk, például, diazoxiddal együtt [lásd például, Shaer, Nephron 89, 337-339 (2001)].

Elhízottság kezelésére, a Dkk-1-et beadhatjuk úgy, hogy emellett étrendi korlátozásokat, mint például napi táplálék- vagy kalória-bevitel korlátozása, írhatunk elő az egyes páciensek esetében, vagy nem írunk ilyet elő. Ezenfelül, a Dkk-1 megfelelően beadható a súlycsökkentés elleni vagy azt megelőző más kezelésekkel, például súlycsökkentő ágensek néven ismert vegyületekkel, kombinálva. E célra alkalmas anyagok közé tartoznak, példá-

ul, hormonok (katekolaminok, glukagon, ACTH, és inzulinszerű növekedési faktorral kombinált növekedési hormon); az Ob fehérje; klofibrát; halogenát; cinchocaine; klórpromazin; noradrenerg neurotranszmittereken ható étvágycsökkentő drogok, mint például mazindol és fenetilamin-származékok, például fenilpropanolamin, dietilpropion, fentermin, fendimetrazin, benzfetamin, amfetamin, metamfetamin, és fenmetrazin; szerotonin neurotranszmittereken ható drogok, mint például fenfluramin, triptofán, 5-hidroxitriptofán, fluoxetin, és sertralin; központilag aktív drogok, például naloxon, neuropeptid-Y, galanin, kortikotropint felszabadító hormon, és kolecisztokinin; kolinerg agonista, például piridostigmin; szfigolipid, mint például lizoszfingolipid vagy annak származéka [EP 321.287 sz. európai közzétételi irat (1989. június 21)] ; termogén drogok, mint például tiroid hormon; efedrin; β-adrenerg agonisták; az emésztőrendszert befolyásoló drogok, mint például enzimgátlók, például tetrahidrolipostatin, emészthetetlen élelmiszerek, mint például cukorpolimerek, és a gyomor ürülését gátlók, mint például treoklorocitromsav vagy ennek származékai; β-adrenerg agonisták, mint például izoproterenol és yohimbin; aminofillin a yohimbin β-adrenerg-szerű hatásainak fokozására, α_2-adrenerg gátló drog, mint például klonidin önmagában vagy növekedési hormont felszabadító peptiddel kombinálva [US 5.120.713 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]; vékonybélből történő felszívódást megakadályozó drogok, például biguanidok, például metformin és fenformin; eltelítődést okozó anyagok, például metilcellulóz; metabolizmust gátló szerek, például hidroxicitrát; progeszteron; kolecisztokinin-agonisták; ketoacidokat utánzó kisméretű molekulák; kortikotropint felszabadító hormon agonistái; a test zsírraktárait csökkentő, ergot-eredetű, prolaktint gátló vegyületek [US 4.783.469 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat (1988. november 8.)]; β3-agonisták; bromokriptin; az opioid peptidek antagonistái; a neuropeptid-Y antagonistái; a glükokortikoid receptor antagonistái; a növekedésihormon antagonistái; ezek kombinációi, stb. Ide tartozik az összes drog, amit Bray és Greenway leírt [Bray és Greenway, Clin. Endoc. Metab. 5, 455 (1976)].

E súlycsökkentő járulékos ágenseket és diazoxidot a Dkk-1 beadásával egyidőben, előtte vagy utána adjuk be, és ezek esetében alkalmazhatók a Dkk-1 beadási módja.

A Dkk-1, hiperinzulinémiás vagy elhízott emlősnek beadandó dózisát releváns körülmények ismeretében - ideértve az emlős állapotát, a Dkk-1 típusát, a probléma típusát, és a beadás módját - az orvos határozza meg. A dózis előnyösen olyan alacsony legyen, hogy ne okozzon inzulinnal szembeni rezisztenciát, és az orvos meg tudja határozni ezt a

szintet. Az emberi 2. típusú diabetes kezelésére bevált glitazonok (rosiglitazon/Avandia és pioglitazon/Actos) ugyan okoznak némi súlygyarapodást, azonban a mellékhatások ellenére még is alkalmazzák ezeket, mivel terápiás indexük szerint jótékony hatásúnak bizonyultak. A leírásban megadott dózisok a találmány oltalmi körét semmilyen módon sem korlátozzák. A leírás szerinti értelemben, a fenti célokra a Dkk-1 „terápiásan hatékony" mennyiségét a fenti faktorok határozzák meg, de a mennyiség általában körülbelül 0,01-100 mg/testtömeg kg/nap, mindkét probléma esetében. Az előnyös dózis körülbelül 0,1-50 mg/kg/nap, előnyösebben 0,1-25 mg/kg/nap. Továbbá, előnyösebb, ha a Dkk-1-et naponta adjuk be, emberek esetében az intravénás vagy intramuszkuláris dózis körülbelül 0,3-10 mg/kg testtömeg/nap, előnyösebben körülbelül 0,5-5 mg/kg. Szubkután beadásra, a dózis előnyösen nagyobb, mint az intravénásan vagy intramuszkulárisan beadásra kerülő, terápiásan egyenértékű dózis. Előnyös, ha embereknél a napi szubkután dózis körülbelül 0,3-20 mg/kg, előnyösebben körülbelül 0,5-5 mg/kg, mindkét probléma esetében.

A találmány tárgyát különféle dozírozási ütemezések is képezik. A találmány tárgykörébe tartoznak olyan folyamatos dozírozási ütemezések, amelyekben Dkk-1-et adunk be szabályos időközönként (a dózistól és a dózisformától függően naponta, hetente, vagy havonta), lényeges szünetek nélkül. Előnyös folyamatos dozírozási ütemezések közé tartozik a naponkénti folyamatos infúzió, amely során a Dkk-1-et minden egyes napon infúzióval adjuk be, és a folyamatos rásegítő beadási ütemezés, amikor naponta legalább egyszer, rásegítő injekció vagy inhaláló szer formájában vagy intranazális úton adunk be Dkk-1-et. A találmány tárgyát szakaszos dozírozási ütemezések is képezik. A szakaszos beadási ütemezés pontos paraméterei a készítmény, beadási mód, a kezelni kívánt emlős klinikai szükségleteitől függően változnak. Például, ha a Dkk-1-et infúzióval adjuk be, a beadási ütemezésben elkülöníthetünk egy első beadási periódust, amelyet egy másik periódus követ, amely utóbbiban a Dkk-1-et nem adunk be, és amely az első periódusnál nem hosszabb, azzal egyenlő, vagy annál rövidebb.

Ha a beadás rásegítő injekcióval történik különösen, ha abban lassú felszabadulást biztosító készítmény alkalmazunk, a dozírozási ütemezés lehet folyamatos abban, hogy a Dkk-1-et minden egyes nap beadjuk, vagy lehet szakaszos, amelyben elkülönítünk egy első és egy második periódust (lásd fent).

Bármely eljárással végzett folyamatos vagy szakaszos beadás tartalmaz olyan dozírozási ütemezést, amelyben a dózist az első periódus során úgy módosítjuk, hogy – például – az első periódus kezdetén a dózis alacsony, majd növeljük egészen az első periódus végéig, vagy a dózis kezdetben magas és az első periódus során csökkentjük, vagy a dózis

kezdetben alacsony, majd csúcsszintre emeljük, az első periódus vége felé pedig csökkentjük, vagy ezek bármilyen kombinációja.

A Dkk-1 antagonista beadásának az elhízottságra gyakorolt hatásait különféle, a technikában ismert vizsgálatokkal mérhetjük, ideértve a zsírsejtek és –szövetek – mint például zsírpárnák –, teljes testtömeg analízisét, trigliceridek szintjének mérését az izomban, májban és zsírban, éhezési és nem éhezési leptinszintek, és a vér szabad zsírsavai és a trigliceridek szintjeinek analízisét. A Dkk-1 beadásának a hiperinzulinémiára gyakorolt hatásai is megmérhetők különféle vizsgálatokkal, amelyek közül a legelterjedtebb a páciensben, a keringő inzulin szintjeinek mérése.

A találmány tárgyát képezik továbbá elhízás és hiperinzulinémia kezelésére szolgáló készletek is. A találmány szerinti készlet egy vagy több, Dkk-1-et tartalmazó tárolóedényt és utasításkészletet tartalmaz, amelyben általában, az elhízottság és hiperinzulinémia kezelésében, a Dkk-1 alkalmazására és dozírozására vonatkozó instrukciók vannak leírva. A készletben található instrukciók általában olyan információkat tartalmaznak, mint a dozírozás, a dozírozás ütemezése, az elhízottság és hiperinzulinémia kezelésére javasolt beadási módok. A Dkk-1-et tartalmazó tárolóedények lehetnek egységnyi dózisok, ömlesztett csomagok (például, többszörös dózist tartalmazó csomagok), vagy alegységdózisok.

Dkk-1-et csomagolhatunk bármilyen, kényelmesen alkalmazható, megfelelő csomagolásban. Például, ha a Dkk-1 fagyasztva-szárított formulációjú, normális esetben, visszazárható záródugóval ellátott ampullát alkalmazunk, így a drogot fiziológiás konyhasóoldatban átömlesztésre könnyen előkészíthetjük oly módon, hogy a visszazárható záródugón keresztül beinjektáljuk a folyadékot. Nem visszazárható, eltávolítható lezárással vagy visszazárható záródugóval ellátott ampulla (például, leforrasztott ampulla) alkalmazható a legkényelmesebben a Dkk-1 injektálható formái esetén. A találmány tárgyát specifikus eszközzel - például inhalálókészülék, orron keresztüli beadásra alkalmas eszköz (például, porlasztó), vagy infúziós eszköz, mint például minipumpa - kombinált alkalmazásra szolgáló csomagok is képezik.

Diagnosztikai alkalmazások

Számtalan különféle vizsgálat és vizsgálati formátum alkalmazható a Dkk-1 mennyiségének kimutatására egy adott mintában egy adott kontrolhoz képest. E formátumokat, amelyek egyébként alkalmazhatók a találmány szerinti diagnosztikai vizsgálatokban, alkalmazzuk az inzulinnal szembeni rezisztencia, hiper- vagy hipoinzulinémia, vagy elhízottság jelenlétére vagy kezdetének kimutatására.

Bármilyen, a technikában ismert, oldható analitikumok mérésére szolgáló eljárás alkalmazható a találmány gyakorlatba vételében. Ilyen eljárások - minden korlátozás nélkül – a kompetitív és nem kompetitív vizsgálati rendszerek, amelyekben különféle eljárásokat, mint például radioimmunológiai vizsgálat, enzimes immunológiai vizsgálatok (EIA), előnyösen ELISA, „szendvics" immunvizsgálatok, lecsapási reakciók, géldiffúziós reakciók, immundiffúziós vizsgálatok, agglutinációs vizsgálatok, komplementkötési vizsgálatok, immunradiometriás vizsgálatok, fluoreszcens immunológiai vizsgálatok, protein A immunvizsgálatok, és immunelektroforézises vizsgálatok [US 4.845.026 sz. és US 5.006.549 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok], alkalmazunk.

A találmány egyik megvalósítási módjában, egy vagy több, a Dkk-1 elleni antitestet jelöléssel látunk el, a találmány másik megvalósítási módjában, a Dkk-1-et először nem jelzett antitesttel reagáltatjuk, majd egy második, jelzett antitestet alkalmazunk az első antitesthez kötött Dkk-1 kimutatására vagy az első antitest kimutatására.

Diagnosztikai alkalmazásra, jellemzően az antitestet kimutatható csoporttal jelezzük. Számtalan jelölés lehetséges, és ezeket általában az alábbi kategóriákba csoportosíthatjuk:

(a) Radioizotópok, mint például ^{35}S, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H és ^{131}I. Az antitestet radioizotóppal vagy radionukliddal az irodalomban ismert eljárások alkalmazásával [Current Protocols in Immunology, szerk.: Coligen és mtsai., kiad.: Wiley-Interscience, New York (1991)] jelölhetjük, és például a radioaktivitást mérhetjük szcintillációs számlálással.

(b) Fluoreszcens jelölések, mint például ritkaföldfémek kelátjai (európium kelátok) vagy fluoreszcein és ennek származékai (mint például fluoreszcein-izotiocianát), rodamin és ennek származékai, fikoeritrin, fikocianin, allofikocianin, o-ftálaldehid, fluoreszkamin, danzil, lizzamin és Texas Vörös. A fluoreszcens jelölést az antitesthez konjugáltathatjuk, például, az irodalomban ismert módon [Current Protocols in Immunology, mint fent]. Fluoreszcenciát fluoriméterrel kvantifikálhatunk. A kimutatásra szolgáló antitest szintén ellátható kimutatható jelöléssel, ahol a jelölést fluoreszcenciát emittáló fémekkel, mint például ^{152}Eu vagy más, a Lantanidák közé tartozó fémmel, biztosítjuk E fémeket fémkomplexet képző csoportokkal, mint például a dietiléntriaminpentaecetsav (DTPA) vagy etiléndiamintetraecetsav (EDTA) kapcsolhatjuk az antitesthez.

(c) Számos enzimszubsztrátum érhető el EIA céljára (az US 4.275.149 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat ismertet ezek közül néhányat). Az enzim általában a kromogén szubsztrátum kémiai változását katalizálja, és a változás eredményeként kapott terméket különféle eljárásokkal mérhetjük. Például, az enzim katalizálhatja egy adott

szubsztrátum színének megváltozását, és ezt spektrofotometriás úton mérhetjük. Esetleg, az enzim megváltoztathatja a szubsztrátum fluoreszcenciáját, kemilumineszcenciáját, vagy biolumineszcenciáját. A fluoreszcenciában történt változás a fentiekben leírtak szerint kvantifikálható. A kemilumineszcens szubsztrátum egy adott kémiai reakció következtében elektromosan gerjesztődik és (például kemiluminométerrel) mérhető fényt emittál vagy egy adott fluoreszcens akceptornak energiát ad át. Enzimatikus jelölések közé tartoznak a luciferázok (például, világító bogarakból származó luciferázok vagy baktériumból származó luciferázok [US 4.737.456 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]), luciferin, aequorin, 2,3-dihidroftalazindionok, malát-dehidrogenáz, ureáz, peroxidáz – mint például tormaeredetű peroxidáz (HRPO), lúgos foszfatáz, β-galaktozidáz, glükoamiláz, lizozim, szacharid-oxidázok (például, glükózoxidáz, galaktózoxidáz, élesztőből származó alkohol-dehidrogenáz, α-glicerofoszfát-dehidrogenáz, és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz), *Staphylococcus*ból származó nukleáz, Δ-5-szteroid-izomeráz, triózfoszfát-izomeráz, aszparagináz, ribonukleáz, ureáz, kataláz, acetilkolineszteráz, heterociklikus oxidáz(mint például urikáz és xantinoxidáz), laktoperoxidáz, mikroperoxidáz, és hasonlók. Enzimek antitestekhez történő konjugáltatására szolgáló eljárások az irodalomban ismertek [O'Sullivan és mtsai., Methods in Enzymology, 73, 147-166, szerk.: Langone és Van Vunakis, kiad.: Academic Press, New York (1981)].

Enzim-szubsztrátum kombinációk közé például az alábbiak tartoznak:

(i) tormaeredetű peroxidáz (HRPO) hidrogén-peroxidáz szubsztrátummal, ahol a hidrogén-peroxidáz egy adott festék prekurzorát (például, ortofenilén-diamin (ODP) vagy 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin-hidroklorid (TMB)) oxidálja.

(ii) lúgos foszfatáz (AP) p-nitrofenilfoszfáttal, mint kromogén reagenssel; és

(iii) β-D-galaktozidáz (β-D-gal) kromogén szubsztrátummal (például, p-nitrofenil-β-D-galaktopiranoziddal) vagy 4-metilumbelliferil-β-D-galaktopiranoziddal.

Számos más enzim-szubsztrátum kombináció elérhető a szakember számára. A szakembernek ismeri ezeket a különféle eljárásokat. Például, az antitestet biotinnal és a fentiekben, három csoportba sorolt jelölések bármelyikét avidinnal lehet konjugáltatni, és fordítva. A biotin szelektíven kötődik az avidinhoz és így a jelölést ezen indirekt módon lehet konjugáltatni az antitesthez. Esetleg, a jelölésnek az antitesthez történő indirekt konjugáltatása céljából, az antitestet kisméretű hapténnal (például, digoxin) konjugáltatjuk, míg a fentiekben említett különböző típusú jelölések egyikét a haptén elleni antitesttel

(például, digoxin elleni antitest) konjugáltatjuk. Így, így érhetjük el a jelölésnek az antitesthez történő indirekt konjugáltatását.

A találmány egy másik megvalósítási módjában, a Dkk-1 elleni antitestet nem szükséges jelöléssel ellátni, és annak jelenlétét a Dkk-1 elleni antitestet kötő, jelöléssel ellátott antitest alkalmazásával mutatjuk ki.

A találmány szerinti antitestek alkalmazhatók bármely ismert vizsgálati eljárásban, mint például kompetitív vizsgálatokban, közvetlen és közvetett „szendvics" vizsgálatokban, és immunprecipitációs vizsgálatokban [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147-158, kiad.: CRC Press, Inc. (1987)].

A találmány szerinti vizsgálatokban előnyös, ha antigént – például Dkk-1-et -, vagy antitestet szilárd fázisú hordozóhoz vagy vivőanyaghoz kötünk. A leírás szerinti értelemben, a „szilárd fázisú hordozó vagy vivőanyag" kifejezés jelent bármilyen, antigént vagy antitestet megkötni képes hordozót. Az ismert hordozók és vivőanyagok közé az alábbiak tartoznak: üveg, polisztirol, polipropilén, polietilén, dextrán, nylon, amilózok, természetes vagy módosított cellulózok, poliakrilamidok, agarózok, és magnetit. A találmány céljait tekintve, a vivőanyag természetét tekintve lehet oldható vagy bizonyos mértékben oldhatatlan. A hordozóanyag tulajdonképpen lehet bármilyen lehetséges szerkezeti konfigurációban, ameddig az ahhoz kapcsolt molekula képes antigénhez vagy antitesthez kötődni. Így, a hordozó konfigurációja lehet gömb alakú, mint például gyöngyök, vagy hengeres, amilyen a tesztcső belső felszíne, vagy egy bot külső felszíne. Esetleg, a felszín lehet sík, mint például lemez, tesztcsík, stb. Előnyös hordozók közé tartoznak a polisztirol gyöngyök. A szakember felismeri, vagy rutin kísérletezéssel megbizonyosodhat afelől, hogy számos más alkalmas hordozó létezik, amely alkalmas antitest vagy antigén megkötésére.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, antigén-antitest szendvics immunvizsgálatot végzünk, azaz antigént olyan eljárással mutatunk ki vagy mérünk, amelyben először egy első antitestet kötünk az antigénhez, majd egy második antitestet kötünk az antitesthez, és kimutatjuk vagy megmérjük az első és második antitesthez egyaránt, immunspecifikusan kötődött antigént. A találmány specifikus megvalósítási módjában, az első és második antitest monoklonális antitest. Ebben a megvalósítási módban, ha az antigén nem tartalmaz olyan, ismétlődő epitópokat, amelyeket a monoklonális antitest felismer, akkor a második antitestnek az első antitesttől eltérő helyre kell bekötnie (így, a két antitest között nincs kompetitív gátlás az antigénhez való kötődés tekintetében). A találmány egy másik specifikus megvalósítási módjában, az első vagy második antitest

poliklonális antitest. A találmány további előnyös megvalósítási módjában, mind az első és mind pedig a második antitest poliklonális antitest.

A találmány előnyös megvalósítási módjában, „előre" szendvics immunvizsgálatot alkalmazunk, amelyet az alábbiakban részletezünk. A Dkk-1 ellen irányuló antitestet (befogó antitest, Ab1) szilárdfázisú mátrixhoz, előnyösen mikrotiter-lemezhez, rögzítünk. A mintát érintkeztetjük az Ab1-el bevont mátrixszal úgy, hogy a mintában lévő összes Dkk-1 (amelyre nézve az Ab1 specifikus) kötődjön a szilárd fázishoz rögzített Ab1-hez. A minta nem kötődött összetevőit mosással eltávolítjuk. Az antigén egy második epitópja ellen irányuló második, enzimmel konjugált antitestet (kimutató antitest, Ab2) kötünk az Ab1 által megkötött antigénhez, és így létrejön a szendvics. A nem kötött Ab2-t mosással eltávolítjuk, az enzim kromogén szubsztrátumát adjuk a rendszerhez, és a szendvicsben jelenlevő enzim mennyiségével arányos színes termék alakul ki, amely tükrözi a mintában lévő antitest mennyiségét. A reakciót stop oldat hozzáadásával állítjuk le. A színt spektrofotométerben , megfelelő hullámhosszon, abszorbanciaként mérjük. Ismert koncentrációjú antigénből, standard görbét készítünk, és az ismeretlen minta értékét ezzel határozzuk meg.

A „szendvics" vizsgálatok másik típusát az úgynevezett „szimultán" vagy „fordított" vizsgálatok alkotják. Szimultán vizsgálat során a szilárd hordozóhoz kötött antitestet és a jelzett antitestet egyszerre, egyetlen lépésben adjuk a tesztelni kívánt mintához. Az inkubálás befejezése után, a szilárd hordozót mossuk a folyadékminta és nem komplexált, jelzett antitest eltávolítására. A szilárd hordozóval asszociálódott, jelzett antitest jelenlétét, a hagyományos „előre" szendvics vizsgálatnál leírtak szerint határozzuk meg.

A „fordított" vizsgálatban, lépésenként először a jelzett antitest oldatát adjuk a folyékony mintához, majd megfelelő inkubációs idő elteltével a szilárd hordozóhoz kötött antitestet. Második inkubálás után, a szilárd hordozót hagyományos módon mossuk a minta maradékainak és az el nem reagált antitestek eltávolítására. A szilárd hordozóval asszociálódott, jelzett antitest jelenlétét, a hagyományos „szimultán" vagy „előre" szendvics vizsgálatnál leírtak szerint határozzuk meg.

Egy vagy több, a találmány szerinti vizsgálatok kivitelezéséhez szükséges komponenseket tartalmazó tárolóedényt vagy fiolát tartalmazó készletek is a találmány tárgykörébe tartoznak. Az ilyen készletek előre meghatározott mennyiségű reagensek kombinációját és a diagnosztikai vizsgálat kivitelezésére vonatkozó instrukciókat tartalmazó csomagok. Például, egy ilyen készlet tartalmazhat antitestet vagy antitesteket, előnyösen Dkk-1 antigén elleni olyan antitestpárt, amelyek előnyösen nem versengenek az antigénen levő ugyanazért a kötőhelyért. A találmány specifikus megvalósítási módjában, a Dkk-1-et előre

adszorbeáljuk valamilyen szilárd fázisú mátrixhoz. A készlet előnyösen tartalmaz a mosáshoz szükséges, a technikában ismert reagenseket is. EIA esetében, a készlet a kromogén szubsztrátum mellett tartalmazza az enzimatikus reakció (a szín előhívása utáni) leállításához szükséges reagenst. A készletben lévő szubsztrátum az, amely az egyik antitesthez konjugált enzimnek megfelel. Ezek a technikában jól ismertek, és ezek közül néhányat az alábbiakban példaként említünk. A készlet, igény szerint, tartalmazhatnak még Dkk-1 standardot (azaz egy adott standard mintában lévő, normális mennyiségű Dkk-1-nek megfelelő mennyiségű tisztított Dkk-1) is.

Ha az antitest enzimmel van jelölve, a készlet tartalmazza az enzim működéséhez szükséges szubsztrátumokat és kofaktorokat (például, a kimutatható kromofórt vagy fluorofórt biztosító szubsztrátum-prekurzort). Ezenfelül, más adalékanyagok is lehetnek a készletben, mint például stabilizálók, pufferek (például, blokkpuffer vagy lízispuffer) és ilyenek. A különféle reagensek relatív mennyisége széles tartományban változhat a reagensek oldatában a vizsgálat érzékenységének lényeges mértékű optimalizálásához szükséges koncentrációk biztosítása céljából. Különösen, a reagenseket biztosíthatjuk, az adalékanyagokat is tartalmazó, száraz porok formájában, általában liofilizátumként, és a por feloldása szolgáltatja a megfelelő koncentrációjú reagensoldatot.

A találmány egyik szempontja szerint, a készlet egynél több tárolóedényt tartalmaz: Dkk-1-et megkötni képes antitestet, amelyet felköthetünk szilárd fázisú hordozóra, például mikrotiter-lemezre, Dkk-1-et tartalmazó standard mintát, és a kimutatáshoz szükséges instrukciókat, ahol a Dkk-1-et megkötni képes antitest kimutatható jelöléssel van ellátva vagy a készlet tartalmaz továbbá olyan antitestet, amely képes a Dkk-1-et megkötni és kimutatható jelöléssel van ellátva, vagy köti az első antitestet.

Transzgénikus és „knockout" állatok és ezek alkalmazása szkrínelésre

Nem emberből, hanem valamilyen állatfajból, mint például rágcsálóból, és előnyösebben egérből származó Dkk-1-et kódoló nukleinsavakat alkalmazhatunk az embertől eltérő transzgénikus vagy bináris transzgénikus állatok generálására, amelyek azonban, alkalmasak terápiásan hasznosítható reagensek kifejlesztésére és szkrínelésére. A Dkk-1 „knockout" egér embrionálisan letális [Mukhopadhyay és mtsai., Dev. Cell. 1, 423-434 (2001)].

Transzgénikus állat sejtjei transzgént tartalmaznak, amelyeket az állatba vagy az állat elődjébe születés előtti, például embrionális, stádiumban vittünk be. Transzgénnek az olyan DNS-t nevezzük, amely azon sejt genomjába integrálódott, amelyből az állat kifejlődik.

A találmány egyik megvalósítási módjában, transzgénikus állatot generálunk a Dkk-1 transzgénnek az embertől eltérő állat ivarsejtjeibe. Transzgénikus állatok, különösen olyan állatok, mint az egér generálására szolgáló eljárások a technikában hagyományossá válnak, és az irodalomban le vannak írva [lásd például, US 4.736.866 sz. és US 4.870.009 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok]. Dkk-1-et kódoló, állati eredetű cDNS, mint például egéreredetű cDNS, vagy annak megfelelő szekvenciája alkalmazható Dkk-1-et kódoló genomi DNS, jól megalapozott eljárásokkal történő klónozására, és a genomi szekvenciákat alkalmazhatjuk Dkk-1-et kódoló DNS-t tartalmazó sejteket tartalmazó transzgénikus állatok generálására. Jellemzően, a transzgén, szövetspecifikus enhancerekkel történő bevitelével konkrét sejteket célozhatunk meg, ennek következtében irányíthatjuk a Dkk-1 túlexpresszióját. Az embrionális korban az állat ivarsejtjeibe bevitt, Dkk-1-et kódoló transzgén kópiáját tartalmazó transzgénikus állat alkalmazható a Dkk-1-et kódoló DNS fokozott expressziója hatásának vizsgálatára.

Különböző fejlődési stádiumban lévő embrionális célsejteket alkalmazhatunk a transzgének bevitelére. Különféle eljárásokat alkalmazhatunk az embrionális célsejtek fejlődési állapotától függően. Bármely, a találmány gyakorlatba vételénél alkalmazott, specifikus állat-tenyészvonalat általános jó egészség, jó embrió-kitermelés, az embrióban a jó pronukleáris láthatóság, és jó szaporodási készség szempontjából választjuk ki. Ezenfelül, jelentős faktor a halotípus. Például, transzgénikus egér generálásakor gyakran alkalmazunk olyan törzseket, mint a C57BL/6 vagy FVB vonalak. A találmány gyakorlatba vételénél alkalmazott vonal(ak) lehetnek saját maguk is transzgénikusak, és/vagy „knockout"-ok (azaz, származhatnak olyan állatokból, amelyekben egy vagy több gén részlegesen vagy teljesen szuppresszált).

A transzgénikus konstrukciót bevihetjük egyetlen fázisú embrióba. Mikroinjektálásra a zigóta a legjobb célpont. A zigóták géntranszferre célpontként történő alkalmazásának meg van az a lényeges előnye, hogy legtöbb esetben az injektált DNS-t az első hasadást megelőzően építjük be a gazda génjébe [Brinster és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438-4442 (1985)]. Ennek következtében, a transzgénikus állat minden sejtje hordozni fogja a beépített transzgént. Ez általában a transzgénnek az alapító állatba történő hatékony transzmissziójában tükröződik vissza, mivel az ivarsejtek 50%-a hordozni fogja a transzgént.

Normális esetben, a megtermékenyített embriókat alkalmas tápoldatban a pronukleusz megjelenéséig inkubáljuk. Körülbelül ebben az időben, a transzgént tartalmazó nukleotidszekvenciát nőstény vagy hím pronukleuszba visszük be. Bizonyos fajok, mint

például egér, esetében a hím pronukleusz előnyös. Az exogén genetikai anyagot a zigóta DNS hímeredetű komplementeréhez adhatjuk azelőtt, hogy azt a petesejt nukleusza vagy a zigóta női pronukleusza átalakítaná.

Így, az exogén genetikai anyagot a hímeredetű komplementer DNS-hez vagy bármely más komplementer DNS-hez adhatjuk azelőtt, hogy arra hatást gyakorolhatna a női pronukleusz, amely egyébként akkor történik meg, amikor a hím és női pronukleusz jól elkülönül és mindkettő a sejtmembránhoz közel helyezkedik el. Esetleg, az exogén genetikai anyagot a spermium nukleuszához adhatjuk, majd ezután azt indukáljuk, hogy dekondenzáción menjen keresztül. Az exogén genetikai anyagot tartalmazó spermiumot a petesejthez adhatjuk vagy először a dekondenzált spermiumot adhatjuk a petesejthez, majd amilyen gyorsan csak lehetséges a transzgénikus konstrukciót.

Bármilyen, a sejtmag genetikai állományához az exogén genetikai anyag hozzáadását lehetővé tevő eljárás alkalmazhatunk, amennyiben az eljárás nem károsítja a sejtet, a sejtmag membránját, vagy létező sejtes vagy genetikai struktúrát. Az embrióba a transzgénikus nukleotidszekvenciát bevihetjük bármely, a technikában ismert eljárással, mint például mikroinjektálással, elektroporációval, vagy lipofekcióval. Az exogén genetikai anyagot előnyösen mikroinjektálással illesztjük a sejtmag genetikai állományába. Sejtek és sejtes struktúrák mikroinjektálása a technikában ismert és alkalmazott. Az egér esetében, a hím pronukleusz mérete eléri a körülbelül 20 mikrométer átmérőt, amely lehetővé teszi, hogy abba 1-2 pl DNS-oldatot reprodukálhatóan beinjektáljunk. A transzgénikus nukleotidszekvencia embrióba történt bevitele után, az embriót különböző hosszúságú ideig *in vitro* inkubálhatjuk, vagy pótgazdába ültethetjük vissza, vagy mindkettő. Az érettségig tartó *in vitro* inkubáció a találmány oltalmi körébe tartozik. Egy általánosan elterjedt eljárás szerint, az embriókat a fajtól függően körülbelül 1-7 napig inkubáljuk *in vitro*, majd pótgazdába ültetjük vissza.

A zigótához adott transzgénikus konstrukció kópiaszáma függ a hozzáadott exogén genetikai anyag teljes mennyiségétől, és e mennyiségnek akkorának kell lennie, amely a genetikai transzformáció bekövetkezését lehetővé teszi. Elméletileg egy kópia is elég, azonban, általában a transzgénikus konstrukció számos, például 1000-20000 kópiáját alkalmazzuk, annak biztosítására, hogy egyetlen kópia működőképes legyen. A találmányra vonatkozóan, előnyös lehet, ha a beillesztett exogén DNS-ből egynél több kópia van a DNS fenotípusos expresszálásának fokozására.

Az előd gazda transzgénikus utódait bármilyen alkalmas eljárással szkrínelhetjük a transzgén jelenlétére és/vagy expressziójára. A szkrínelést gyakran Southern-blot vagy

Northern-blot analízissel végezzük, amelyben a transzgénnek legalább egy részével komplementer próbát alkalmazunk. A transzgén termék jelenlétének szkrínelésére alternatív vagy további eljárás a Western-blot analízis, amelyben a transzgén által kódolt Dkk-1 elleni antitestet alkalmazunk. Jellemzően, DNS-t preparálunk a farok valamely szövetéből és Southern analízissel vagy PCR-rel a transzgénre nézve analizáljuk. Esetleg, a transzgént feltehetően a legmagasabb szinten expresszáló szöveteket vagy sejteket a transzgén jelenlétére és expressziójára nézve tesztelünk Southern analízissel vagy PCR-rel, bár erre az analízisre bármilyen szövet vagy sejttípus alkalmazható.

A transzgén jelenlétének kimutatására szolgáló alternatív vagy további eljárások közé tartoznak - minden korlátozás nélkül – alkalmas biokémiai vizsgálatok, mint például enzim és/vagy immunológiai vizsgálatok, egy adott konkrét marker vagy enzim aktivitására irányuló hisztológiai festések, áramlási citometriás analízis, és hasonlók. A vér analízise szintén alkalmas lehet a vérben a transzgén jelenlétének kimutatására, és a transzgén vérösszetevők, például glükóz, szintjeire gyakorolt hatásának értékelésére.

A transzgénikus állat szaporulatára úgy tehetünk szert, hogy a transzgénikus állatot alkalmas partnerrel pároztatjuk, vagy a transzgénikus állattól származó petesejttel vagy spermiummal *in vitro* megtermékenyítés végzünk. Ha valamilyen partnerrel történő pároztatást végzünk, a partner lehet vagy nem, lehet transzgénikus és/vagy knockout; ha transzgénikus, akkor tartalmazhatja ugyanazt vagy valamilyen más transzgént, vagy mindkettőt. Esetleg, a partner lehet parentális vonal. Ha *in vitro* megtermékenyítést alkalmazunk, a megtermékenyített embriót beültethetjük pótgazdába, vagy inkubálhatjuk *in vitro*, vagy mindkettő. Bármely eljárást is alkalmazzuk, az utódot a fentiekben leírt, vagy más alkalmas eljárásokkal értékelni kell a transzgén jelenlétére nézve.

A találmánnyal összhangban előállított transzgénikus állat exogén genetikai anyagot, azaz DNS-szekvenciát, fog tartalmazni, amely genetikai anyag a Dkk-1 termelődését eredményezi. A szekvenciát működőképesen kapcsolhatjuk valamilyen transzkripcionális szabályozó elemhez, például promóterhez, amely előnyösen lehetővé teszi a transzgén termékének specifikus sejttípusban történő expresszióját. A legelőnyösebb ilyen szabályozó elem olyan, izomspecifikus promóter, amely izomszövetben lehetővé teszi a *dkk-1* nukleinsav (például, DNS) túlexpresszióját. Ilyen promóter például az alábbi 1. példában leírt promóter, vagy amely s *smoothelin* A vagy B expresszióját hajtja meg, vagy ehhez hasonló más promóter [lásd például, WO 01/18048 sz. nemzetközi közzétételi irat (2001. március 15.].

Retrovirális fertőzést is alkalmazhatunk a transzgén, embertől eltérő állatba történő bevitelére. A fejlődő, embertől eltérő embriót *in vitro* tenyészthetjük a blasztocita stádiumig. Ezen idő alatt, a blasztomerek lehetnek az retrovirális fertőzés céljai [Jaenich, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1260-1264 (1976)]. A blasztomereket úgy lehet hatékonya fertőzni, ha enzimes kezeléssel eltávolítjuk a *zona pellucida*-t [Manipulating the Mouse Embryo, szerk.: Hogan, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1986)]. A transzgén beviteléra alkalmazandó vírusvektor jellemzően, a transzgént hordozó, replikációra nézve károsított retrovírus [Jahner és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6972-6981 (1985); Van der Putten és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-6152 (1985)]. A transzfekciót könnyen és hatékonyan végezhetjük, ha a blasztomereket egyrétegű, vírust termelő sejteken tenyésztjük [Van der Putten és mtsai., mint fenn; Stewart és mtsai., EMBO J. 6, 383-388 (1987)]. Esetleg, a fertőzés történhet késői stádiumban. Vírust vagy vírust termelő sejteket injektálhatunk a blasztocölbe [Jahner és mtsai., Nature 298, 623-628 (1982)]. A legtöbb alapító állat a transzgénre nézve mozaikos, mivel a beépülés a sejteknek csak egy részében történik meg, és csak e sejtek transzgénikusak az embertől eltérő állatban. Továbbá, az alapító állat tartalmazhat a transzgénből származó különféle retrovirális inzerciókat a genom különféle részein, amelyek a szaporulatban szegregálódni fognak. Ezenfelül, transzgént vihetünk be az ivarsejtekbe oly módon, hogy a vemhesség középidejében járó embriót a méhen belül fertőzünk retrovírussal [Jahner és mtsai., mint fenn].

A transzgénnel történő indukálás harmadik típusú célsejtje az embrionális őssejt (ES). ES sejteket nyerhetünk olyan beültetés előtti, *in vitro* tenyésztett embriókkal, amelyeket más embriókkal fuzionáltattunk [Evans és mtsai., Nature 292, 154-156 (1981); Bradley és mtsai., Nature 309, 255-258 (1984); Gossler és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9065-9069 (1986); Robertson és mtsai., Nature 322, 445-448 (1986)]. Transzgéneket DNS-transzfekcióval vagy retrovírus által közvetített transzdukcióval tudunk hatékonyan bevinni ES sejtekbe. Ilyen transzformált ES sejteket azután kombinálhatunk az embertől eltérő állatból származó blasztocisztákkal. Azt követően az ES sejtek kolonizálják az embriót és beépülnek az eredményül kapott kiméra állat ivarsejt-vonalába [Jaenisch, Science 240, 1468-1474 (1988)].

Állatokban a génexpresszió valamilyen feltételhez kötött, például időszakos vagy térbeli, szabályozását elérhetjük bináris transzgénikus rendszerek alkalmazásával, amelyekben valamilyen effektorfehérje-termék és a kérdéses transzgén kölcsönhatása szabályozza a génexpressziót. E kölcsönhatásokat állati tenyészvonalak (például rágcsáló, pél-

dául egér tenyészvonalak) keresztezésével, vagy valamilyen exogén indukáló hozzáadásával vagy eltávolításával szabályozzuk [Lewandoski, Nature Rev. Genet. 2, 743-755 (2001)].

A bináris transzgénikus rendszerek két kategóriába sorolhatók, Az egyik a transzkripcionális transzaktiváción alapul, és funkciónyeréses kísérletekben jól alkalmazható a transzgének aktiválására. A másik, helyspecifikus DNS rekombináción alapul, és transzgének aktiválására vagy szövetspecifikus „knockout"-ok és sejtvonal-markerek generálására alkalmazható.

A leginkább elterjedt transzkripcionális rendszerek az *E. coli*-ból származó, tetraciklin-rezisztenciát biztosító operonon alapul. E rendszer effektorai két kategóriába esnek attól függően, hogy egy adott tetraciklin vegyület (általában doxiciklin) beadása vagy kiürítése esetén történik meg a transzkripció aktiválása. A Gal4-en alapuló rendszer olyan transzaktivációs rendszer, amely nem igények indukálót, de a Gal4 transzkripciós aktiválás szabályozható szintetikus szteroidokkal, ha mutált ligandumkötő-domént építünk be egy adott Gal4 kiméra transzaktivátorba.

A leginkább alkalmazott helyspecifikus DNS rekombinációs rendszer a P1 bakteriofágból származó Cre rekombinázt alkalmazza, bár az *S. cerevisiae*-ből származó Flp rekombinázt is adaptálták már állatikban, mint például egerekben, történő alkalmazásra.

A szövetspecifikus promóterek szabályozása alatt expresszált Cre vagy Flp rekombinázokra hatni képes, módosított endogén géneket hordozó bináris transzgénikus állatok előállítására szolgáló, gént célbajuttató eljárások alkalmazásával helyspecifikus rekombinációt használhatunk specifikus endogén gének, térben szabályozott inaktiválására.

Cre/Flp aktivitás még időben is szabályozható oly módon, hogy vírusvektorokkal *cre*/FLP-t kódoló transzgéneket visszünk be, exogén szteroidokat adunk be a mutált ligandumkötő-doménhez fuzionált *cre* gént tartalmazó kiméra transzgént hordozó állatoknak, vagy a *cre*/FLP expresszió szabályozására transzkripcionális transzaktivációt alkalmazunk. A helyspecifikus rekombináció irreverzibilitása teszi egyedülállóan alkalmassá ezen eljárást olyan új típusú analízisekre, amelyekben tranziens szövetspecifikus *cre*/FLP expressziót alkalmazunk valamilyen riporter célgén állandó aktiválására sejtvonalakkal végzett kísérletek esetében.

Nem emberi, bináris transzgénikus és transzgénikus állatokat tesztállatként alkalmazhatunk inzulinnal szembeni rezisztencia, hiper- vagy hipoinzulinémia, elhízottság, vagy izom-degeneráció ellen feltehetően védelmet nyújtó reagensek tesztelésére. A talál-

mány egyik szempontja szerint, például, *dkk-1* nukleinsavat (mint például cDNS-t) sejtjeiben (például izomsejtjeiben) túlexpresszáló, nem emberi állatokat alkalmazhatunk drogjelöltek (fehérjék, peptidek, polipeptidek, kisméretű molekulák, stb.) például az alábbiakra irányuló szkrínelésére: inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésének, vagy inzulinszintek fokozásának indikálására, hipoinzulinémia kezelésének indikálására a glükóz vérből történő kiürülésének fokozására gyakorolt hatás, vagy az izmok regenerálására irányuló kezelés indikálására izomsejtek differenciálódása.

A találmány egy másik szempontja szerint, dkk-1-et kódoló nukleinsav expressziója tekintetében megváltoztatott, nem emberi, bináris transzgénikus állatokat alkalmazhatunk a fentiekben ismertetett drogok szkrínelésére az alábbiak vonatkozásában: például magas zsírtartalmú táplálék fogyasztása esetén a testtömeg-csökkentése, adipociták csökkentése indikálja az elhízottság kezelését, vagy inzulinszintek csökkentése jelzi a hiperinzulinémia kezelését.

A reagenssel/droggal kezelt olyan állat, amelyben a betegség – a bináris vagy közönséges transzgént hordozó, kezeletlen állatokhoz képest – csökkent mértékben jelentkezik, jelezhet potenciális terápiás beavatkozást a kérdéses betegséget illetően. Csökkent mértékben jelentkező betegség tulajdonságainak vizsgálatára szolgáló eljárásokat a fentiekben és az alábbi példákban ismertetünk.

Az alábbi példák mindössze a találmány jobb megértését szolgálják, és természetesen a találmányt semmiben sem korlátozzák. A találmány bizonyos változatai a technikában ismertek, ideértve mindazon ezzel egyenértékű változatokat, amelyek most ismertek vagy később kerültek kifejlesztésre, és ezek mindegyike a találmány oltalmi körébe tartozik. Minden idézett hivatkozásban ismertetett feltárás a kitanítás részét képezi.

PÉLDÁK

1. példa

A Dkk-1 *in vivo* és *in vitro* hatásai

ANYAGOK ÉS ELJÁRÁSOK

L6 sejttenyészet

L6 mioblasztokat 10% borjúeredetű szérumot tartalmazó MEM-α tápoldatban (Gibco-BRL) szaporítottunk. Az összefolyás elérése előtt, a sejteket tripszinnel szétoszlattuk és friss tápoldatba vittük át. Mioblasztfúziót indukáltunk úgy, hogy összefolyáskor a tápoldatot differenciálódási tápoldatra (2% borjúeredetű szérumot tartalmazó MEM-α) cseréltük. A sejteket ebben a tápoldatban 3-9 napig, Dkk-1 kezelések céljából 28 óránál

tovább szaporítottuk, és ilyenkor a tápoldathoz *dkk-1*-t [Krupnik és mtsai., mint fenn; WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi irat] kódoló DNS-t adtunk ehhez a tápoldathoz. A 28 óránál rövidebb kezeléseket 0,5% borjúeredetű szérumot tartalmazó MEM-α-ban végeztük.

Rekombináns Dkk-1 expresszálása

A Dkk-1 emberi homológját (hDkk-1), amelynek C-terminálisához 8X His toldalékot fuzionáltattunk [Krupnik és mtsai., mint fenn; WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi irat, ahol a Dkk-1-et PRO1008 néven van elnevezve], bakulovírusban expresszáltuk és nikkeloszlopon végzett affinitáskromatográfiával tisztítottuk. A tisztított fehérje azonosságát N-terminális szekvenciaanalízissel igazoltuk. A tisztított fehérjében 0,3 EU/ml endotoxin-szintek voltak.

2-DOG felvétel

Kontrol sejteket és *dkk-1*-el kezelt sejteket 0,5 μCi 2-deoxi[^{14}C]-glükózt tartalmazó, Krebs-Ringer féle foszfát-HEPES pufferben (KRHB) [130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM $CaCl_2$, 1,3 mM $MgSO_4$, 10 mM Na_2HPO_4, 25 mM HEPES, pH 7,4] inkubáltuk 20 percig, 37°C-on, 0,5 μM inzulin jelenlétében vagy hiányában. A sejteket KRHB-vel kétszer mostuk, 100 mM NaOH-ban lizáltuk és az sejtlizátumokban található intracelluláris 2-deoxi[^{14}C]-glükózt folyadékszintillációval (LSC) mértük.

A génexpresszió mennyiségi meghatározása

Teljes RNS-t izoláltunk (tenyésztett sejtek esetében) Rneasy Mini reagenskészlettel (Qiagen) vagy (izom esetében) Trizol reagenssel, majd Dnáz I-el (Amplification Grade, Gibco-BRL) kezeltük. Génexpressziós analízist végeztünk valósidejű kvantitatív PCR-rel (RTQ-PCR) ABI PRISM® 7700 szekvenáló-detektáló rendszer (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) alkalmazásával [Gibson és mtsai., Genome Res. 6, 995-1001 (1996); Heid és mtsai., Genome Res. 6, 986-994 (1996)]

Glikogénszintézis

Glikogénszintézist [^{14}C]-glükóz glikogénbe történő beépítésével határoztunk meg. Kontrol sejteket és *dkk-1*-el kezelt sejteket szérummentes, [U^{14}C]-glükóz tartalmazó MEM-α-ban (5 mM glükóz, 1,25 μCi/ml) inkubáltunk 2 órán át, 0,5 μM inzulin jelenlétében vagy hiányában. A kísérletet a tápoldat eltávolításával állítottuk le, és a sejteket jéghideg PBS-sel háromszor gyorsan mostuk, és 20%-os KOH-dal (w/v) lizáltuk, amelyet 1 órával később 1 M HCl hozzáadásával semlegesítettünk. A lizátumokat 5 percig forraltuk, centrifugálással ülepítettük, és a sejtben található glikogént izopropanollal lecsaptuk (0°C,

2 óra, 1 mg/ml hideg glikogén, mint hordozó). A lecsapott glikogént centrifugálással elválasztottuk, 70%-os etanollal mostuk, vízben visszaoldottuk, és a [^{14}C]-glükóz glikogénbe történő beépülését LSC-vel határoztuk meg.

Kinázaktivitás vizsgálata

Kinázokat csaptunk le és vizsgáltunk az Upstate Biotechnologies, Inc. (Lake Placid, NY) cégtől származó reagensekkel, amellyel a ^{32}P specifikus, peptidszubsztrátumba való beépülésének abszolút szintjeit mértük. Speciálisan, sejteket mostunk szérummentes tápoldattal és azokat a vizsgálat előtt 3-5 órán át inkubáltuk. A sejteket 30 nM inzulinnal 30 percig serkentettük, jéghideg PBS-sel mostuk, majd jéghideg szolubilizációs pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 7,7, 0,5% NONIDET P-40™ (4-nonilfenolpolietilénglikol, alacsony habzású, felületaktív anyag (Roche Diagnostics GmbH)) 2,5 mM EDTA, 10 mM NaF, 0,2 mM Na_3VO_4, 1 mM Na_3MoO_4, 1 μg/ml mikrocisztin-LR, 0,25 mM fenilmetilszulfonil-fluorid, 1 μM pepstatin, 0,5 μg/ml leupeptin, 10 μg/ml szójaeredetű tripszininhibitor) lizáltuk. A kérdéses peptid elleni antitestet (2 μg) 40 μl protein G Sepharose gyöngyökhöz kötöttük 12 órán át, 4°C-on, majd a gyöngyöket friss szolubilizációs pufferrel háromszor mostuk. A lizátumokat centrifugálással (20.000 g, 1 perc) ülepítettük, és a felülúszókat protein G-hez kötött antitestekkel inkubáltuk 2 órán át, folyamatos keverés mellett. A gyöngyöket szolubilizációs pufferrel háromszor és egyszer pedig kinázpufferrel (20 mM HEPES, pH 7,2, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 1 mM Na_3VO_4, 0,5 μg/ml leupeptin) mostuk. A gyöngyöket 30 μl, a specifikus peptidszubsztrátumot is tartalmazó kinázpufferben felszuszpendáltuk. Ehhez ATP oldatot (5 μl)(200 μM ATP, 10 μCi ^{32}P-ATP kinázpufferben) adtunk és 15 percig 30°C-on inkubáltuk. A reakciókat úgy állítottuk le, hogy a reakciókeverékből 20 μl-t P81 szűrőpapírra cseppentettünk fel, majd a papírt 1%-os (v/v) foszforsavval intenzíven mostuk és LSC-vel megmértük a kötött radioaktivitást.

Az Akt aktivitását izomdarabokból úgy határoztuk meg, hogy izomdarabokat inkubáltunk 30 percig 35°C-on, 8 mM glükózt, 32 mM mannitolt és 0,1% BSA-t tartalmazó, O_2/CO_2 (95%/5%) keverékkel telített KRHB-ben, majd hagytuk felépülni. A darabokat inzulinnal (33 nM és 100 nM) 10 percig serkentettük, majd az izmokat hirtelen lefagyasztottuk, szolubilizációs pufferben homogenizáltuk és centrifugálással ülepítettük. Azonos mennyiségű, lizátumokból származó fehérjéket alkalmaztunk az Akt immunprecipitálására és az Akt aktivitásának fentiekben leírtak szerinti mérésére.

3T3/L1 adipocita-tenyészet

3T3/L1 fibroblasztokat összefolyásig és adipocitákká történt differenciálódásig szaporítottunk [Rubin és mtsai., J. Biol. Chem. 253, 7570-7578 (1978)]. A differenciálódás indukálása után, a differenciálódott sejteket 72 órán át Dkk-1-el kezeltük. A Dkk-1 3T3/L1 sejtek differenciálódására gyakorolt hatásának vizsgálatára, 40 nM Dkk-1-et adtunk a tápoldathoz a differenciálódás megindulásakor és ezt a koncentrációt fenntartottuk a kísérlet során.

Glükózbeépülés lipidekbe

Kontrol és kezelt 3T3/L1 sejteket 0,2 μCi/ml D-[U-^{14}C]glükózzal inkubáltuk szérummentes MEM-α tápoldatban 2 órán át, 37°C-on, 0,5 μM inzulin jelenlétében vagy hiányában. A sejteket jéghideg PBS-sel kétszer mostuk és 100 mM NaOH-ban lizáltuk. A lizátumokat 100 mM sósavval semlegesítettük és a sejtek lipidtartalmát n-heptánba extraháltuk és a LSC-vel megmértük az extrahált lipidbe beépült [^{14}C]glükóz mennyiségét.

Állatok és tápok

Az összes eljárást Institutional Use and Care Comittee engedélyezte. Hacsak másként nem jeleztük, az egereket standard laboratóriumi étrenden, hőmérséklet és páratartalom tekintetében szabályozott környezetben tartottuk. Tizenkét órás (6.00 d.e./ 6.00 d.u) megvilágítási ciklust alkalmaztunk.

A standard egértáp PURINA 5010™ márkajelzésű táp (Halen Teklab, Madison, WI) volt. A magas zsírtartalmú (58% kJ zsír) és alacsony zsírtartalmú (10,5% kJ) izokalóriás táp az irodalomban leírtakon [Surwit és mtsai., Metabolism 44, 645-651 (1995)] alapult és ezeket a Research Diets cégtől (New Brunswick, NJ) szereztük be.

Az emberi eredetű *dkk-1* cDNS-t [Krupnik és mtsai., mint fenn] a pRK vektorban a miozineredetű könnyűlánc promóterét megelőző splice donor/akceptor helytől 3' irányba illesztettük be [Shani és mtsai., Nature 314, 283-286 (1985)]. A *dkk-1* cDNS-t az emberi növekedésihormont kódoló gén negyedik és ötödik exonja között lévő splice donor/akceptor hely [Stewart és mtsai., Endocrinology 130, 405-414 (1992)] követte. A teljes expressziós fragmentumot megtisztítottuk a szennyező vektorszekvenciáktól és FVBxFVB pároztatásokból származó, egéreredetű egysejtes petébe injektáltuk. A transzgénikus egereket a farokból származó szövetminták PCR-analízisével azonosítottuk.

In vivo metabolitikus mérés és a szérum analízise

Glükóztolerancia tesztet (GTT) végeztünk úgy, hogy egyes egerekbe testtömeggrammonként intraperitoneálisan 1,5 mg glükózt injektáltunk. Inzulintolerancia tesztet

(ITT) végeztünk úgy, hogy egyes egerekbe intravénásan testtömeg-kilogrammonként 0,6 E inzulint injektáltunk. Mindkét teszt esetében, LIFESCAN Fast Take™ glükózmérő teszt alkalmazásával, meghatározott időpontokban a teljes vér glükóztartalmát. Az inzulin és leptin szérumban mérhető szintjeit ELISA készletekkel (Crystal Chem, Chicago, IL) vizsgáltuk. A szabad zsírsavak szintjeit NEFA C™ nem észterifikált zsírsavakat vizsgáló reagenskészlet (WAKO Chemicals USB, Inc.), a trigliceridekét pedig Sigma Triglyceride, INT™ reagenskészlet (Sigma) alkalmazásával vizsgáltuk.

Adatok analízise

Hacsak másként nem jeleztük, minden adatot a (plusz és mínusz) standard eltérésekkel együtt mutattunk be. A kontrol és kezelt sejtek, illetve a transzgénikus és vad típusú egerek közötti összehasonlításokat nem párosított Stundent-féle t-teszt alkalmazásával végeztük.

Eredmények

A *dkk-1* relatív expressziós szintjeit határoztuk meg különféle, felnőttkori emberi szövetekből valós idejű kvantitatív PCR alkalmazásával [Gibson és mtsai., mint fenn; Heid és mtsai., mint fenn] Az 1. ábrán bemutatott eredmények jelzik, hogy a dkk-1 elterjedten expresszálódik a felnőttkori emberi szövetekben, különösen a lépben, herékben és méhben, és legkülönösebben a méhben.

Amikor az emberi Dkk-1 fehérjét bakulovírusban expresszáltuk, a fehérje belső összekapcsolásával egy 16 kDa hasítási terméket készítettünk. A 2. ábrán bemutatott gélen, az (a) sáv a TLNSVLNSNAI (a szekvencialistában 1. azonosítószámon megadott szekvencia) N-terminális szekvenciájú, a szignálpeptid lehasítási helyének megfelelő SVLNSNAIKNL (a szekvencialistában 2. azonosítószámon megadott szekvencia) szekvenciát hordozó teljes hosszúságú fehérjének, míg a (b) sáv az SKMYHTKGQE (a szekvencialistában 3. azonosítószámon megadott szekvencia) N-terminális szekvenciájú összekapcsolt fehérjének felel meg.

Az L6 izomsejtek Dkk-1-el történt kezelése eredményeként az alapszintű és az inzulinnal serkentett glükózfelvétel lecsökkent a sejtekben. A Dkk-1 hatása már 2 óra múltán tapasztalható volt (3A. ábra). A rövid idejű kezelés hatása 2-6 órás kezelés eredményeként volt a legjelentősebb. A hosszú időtartamú kezelésekkel (3B. ás 3C. ábrák) együtt, az inzulintól függő glükózfelvétel csökkenése jelentősebb volt a 96. órában ($p=0,001$), bár a hatás már a 48. órában megfigyelhető volt ($p=0,05$).

A Dkk-1 glükózfelvételre gyakorolt hatása függ a sejtek differenciálódási stádiumától és tapasztalható még olyan sejtek esetében is, amelyek éppen elkezdtek monocitákká differenciálódni (4A. ábra). A Dkk-1 glükózfelvételre gyakorolt hatása függ a dózistól. A 4B. ábra bemutatja, hogy már 10 nM koncentrációjú Dkk-1-el végzett 48 órás kezelés eredményeként bekövetkezik a csökkenés az alapszintű és inzulinnal serkentett glükózfelvételben.

Az L6 izomsejtek Dkk-1-el történt kezelése eredményeként fokozódik a glükóz beépülése a glikogénbe. Ahogyan az 5. ábra bemutatja, a Dkk-1 serkentő hatása már 48 órán belül megfigyelhető (p=0,003).

Mivel a Dkk-1 hatásait hosszú időtartamú kezelés után figyeltük meg – anélkül, hogy bármilyen elmélethez ragaszkodnánk – lehetséges, hogy a fehérje az L6 sejtek differenciálódásának befolyásolásával fejti ki hatását. TAQMAN® Primer and Probe Design (láncindító- és próbatervezés) (Applied Biosystems) alkalmazásával RT-PCR analízist végeztünk a miogenezisben résztvevő gének – mint amilyen, a miozineredetű nehézlánc (MHC), miozineredetű könnyűlánc (MLC), miogenin, Pax3, Myf5, és MyoD - expressziós szintjeinek meghatározására Dkk-1-el kezelt L6 sejtekben. A 6A. ábra bemutatja, hogy a Dkk-1 kezelés eredményeként a differenciálódás 4-6. napja között a MyoD szintjei megnőttek, a 6B., 6C., és 6D. ábra szerint a differenciálódás 4-6. napja között az MLC2, MHC, és miogenin expressziója lecsökkent, 6E. ábra szerint azonban a nem volt változás a Pax3 expressziójában. Eszerint, a Dkk-1 szabályozza a miogenezist L6 sejtekben.

Mivel a Dkk-1 lényegesen nem befolyásolja az L6 sejtek differenciálódását, RT-PCR analízist (TAQMAN® Primer and Probe Design) végeztünk annak meghatározására, hogy a Dkk-1 befolyásolja-e glükóz metabolizmusban résztvevő gének expressziós szintjeit. Úgy találtuk, hogy a Dkk-1 az L6 izomsejtekben befolyásolja az inzulin szignálútvonalában résztvevő gének expresszióját. Ahogyan a 7. ábra bemutatja, Dkk-1-el végzett 48 órás kezelés különösen a foszfoinozit-3-kináz p85 alegységének expresszióját növelte szignifikánsan (8,3 szorosára), de jelentős hatással nem volt a többi vizsgált gén expressziójára.

L6 izomsejtek kezelése Dkk-1-el nem volt hatással a PDK-1 (8A. ábra), GSK3β (8B. ábra), vagy S6 kináz (8C. ábra) aktivitására, de 48 órás kezelés után jelentősen csökkentette az Akt aktivitását (8D. ábra), amely egybecseng a glükózfelvételben bekövetkezett csökkenéssel.

A Dkk-1 befolyásolja a glükóz metabolizmusát az adipocitákban. Specifikusan, Dkk-1-el kezelt 3T3L1 sejtekben az alapszintű és az inzulinnal serkentett glükózfelvétel megnőtt (9A. és 9B. ábrák), emellett Dkk-1-el kezelt 3T3L1 sejtekben az inzulinnal végzett serkentést követően fokozódott a glükóz lipidekbe történő beépülése (9C. és 9D. ábrák). Az inzulintól függő glükózfelvételben, 48 órás kezelés eredményeként tapasztalt növekedés kifejezettebb volt a 96 órás kezelés után ($p=0,04$), és ehhez hasonlót mértünk a glükóz lipidekbe történő, inzulintól függő beépülése esetében ($p=0,003$, 96 órás kezelés után).

A Dkk-1 befolyásolja az adipociták differenciálódását. Specifikusan, Dkk-1-el kezelt 3T3L1 sejtekben megnőtt a PPAPγ és C/EBPα transzkriptumok szintje a differenciálódás során (10A. és 10B. ábrák), bár nem volt hatással az adipociták differenciálódásának egyéb markereire, mint az AP2-re és a zsírsavszintázra (FAS).

Rekombináns Dkk-1 egerekbe történ intravénás befecskendezése a glükóztolerancia gyengülését és az inzulintermelés csökkenését eredményezte. Specifikusan, a DKK-1 transzgénikus egerekben tapasztalható *in vivo* hatásainak alátámasztására, nőstény FVB egereknek 8 napon keresztül Dkk-1-et adtunk be intravénásan injekcióval (napi egyszeri injekció, 0,05 és 0,2 mg/kg/nap). A Dkk-1 glükóztoleranciára gyakorolt hatását az injektálás kezdetétől számított 48 órával, illetve 8 nappal mértük. Az első 48 órában az i.v. kezelés nem volt hatással a glükóztoleranciára, azonban a 8 napig tartó, naponként 0,05 vagy 0,2 mg/kg/nap Dkk-1-el injektált állatokban úgy találtuk, hogy a glükóz kitisztulása véráramból – a sóoldattal injektált kontrol állatokhoz képest - csökkent arányban történt (11. ábra). A szérumban az inzulin glükózzal indukált szintjeit, a glükózinjekció i.p. beadása után 30 perccel, a GTT alatt gyűjtött szérumból mértük. A Dkk-1-el oltott állatokban a szérum inzulin szintjei – a kontrol állatokkal összehasonlítva - jelentős mértékben csökkentek, és ez a csökkenés mértéke függött a DKK-1 dózisától (11B. ábra). A Dkk-1-el injektált állatokban a Dkk-1 nem volt hatással az inzulinnal szembeni toleranciára, a triglicerídek, FFA és leptin szintjeire a szérumban.

Amikor rekombináns Dkk-1-et intravénásan injektáltunk egerekbe, az izomra specifikus gének expressziója megváltozott és csökkent az inzulinnal serkentett Akt aktivitás az izomban *in vivo*. Specifikusan, kontrol és Dkk-1-el injektált állatokat 12-16 órán át éheztettünk, majd az i.v. injekció után 8 nappal elöltük. Quadriceps izomból teljes RNS-t extraháltunk és RT-PCR-t alkalmaztunk a Dkk-1-nek az izom differenciálódásának különféle markereire – mint például, MyoD, miogenin, MLC2, MLC1/3, myf5, pax3, dezmin, és miozineredetű nehézlánc – gyakorolt hatásainak mérésére. Azt figyeltük meg, hogy a Dkk-

1-el injektált állatokban a miogenin, MLC2, MLC1/3, myf5, pax3 és izomeredetű kreatinkináz (MuCK) expressziója lecsökkent, ezzel szemben a MyoD expressziója fokozódott (12A. ábra). E megfigyelés ellentmondásmentes az L6 sejtekben megfigyeltekkel, és – anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötődnénk – szerintünk a Dkk-1 hatással van az izmok differenciálódására *in vivo*. Dkk-1-el injektált állatokban, a Dkk-1 az inzulin-jelátvitelben résztvevő gének expressziós szintjeit csak kissé befolyásolta, ami – anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötődnénk – azt veti fel, hogy ezek a hatások másodlagosak az izmok differenciálódására gyakorolt hatásokhoz képest.

Kontrol és Dkk-1-el kezelt állatokból talpemelő izmot izoláltunk a fentiekben leírtak szerint, és Akt aktivitást mértünk nem kezelt és inzulinnal kezelt talpemelő izomból származó darabokból [Oku és mtsai., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280, E816-24 (2001)]. Ahogyan a 12B. ábra mutatja, Dkk-1 kezelés eredményeként az Akt inzulin általi aktiválása lecsökkent, ez egybecseng a tenyésztett L6 sejtek esetén megfigyelt hatásokkal.

A Dkk-1- egerekben történő túlexpresszálása hatással volt a növekedésre, a test összetételére, és a metabolizmusra. Különösen,

A dkk-1 transzgént az MLC promóter szabályozása alatt túlexpresszáló, transzgénikus FVB egereket generáltunk [Shani, mint fenn]. Kontrol és transzgénikus állatok testtömegeit heteken át feljegyeztük. Ahogyan a 2. táblázatban látható, hagyományos tápon tartott transzgénikus állatok testtömege lecsökkent a kontrolhoz képest. E hatások egyértelművé váltak már a 10 napos állatok esetében (13A. ábra) és meglehető volt a 22 hetes korig (13B. ábra).

2. táblázat

Fiziológiai jellemző	Kontrol szokásos táp (hímek, n=8)	Kontrol szokásos táp (nőstények, n=4)	Dkk-1 transzgénikus szokásos táp (hímek, n=4)	Dkk-1 transzgénikus szokásos táp (nőstények, n=8)
Testtömeg 16 hetes korban	30,6±2,2	24,1±3,2	28,9±0,9	22,7±1,5
Éhezési FFA szint (nM/5 µl)	20,84±3,93	15,71±3,11	18,26±3,28	16,32±4,19
Etetett állatok FFA szintje (nM/5 µl)	10,54±1,85	10,93±1,83	9,95±0,66	10,42±1,86
Triglicerid alapszint (mg/ml)	1,17±0,14	1,21±0,07	1,15±0,08	1,13±0,13
Triglicerid szint (18 órás éheztetés) (mg/ml)	1,96±0,6	1,56±0,41	1,62±0,36	1,57±0,49

Inzulin a szérumban (ng/ml) (i.p. glükóz után 30 min)	2,55±1,25	2,22±9,6	1,89±1,56	1,47±8,5
Inzulin a szérumban (ng/ml) (alapszint)	8,7±2,1	4,97±2,9	6,4±2,1	4,7±2,5
Inzulin a szérumban (18 órás éhezés) (ng/ml)	1,3±0,3	1.68±0,1	1,6±0,3	1,48±0,3
Leptinszintek a szérumban (ng/ml) (etetett)	16,15±5,0	22,0±2,7	9,89±5,1	11,77±5,7
Leptinszintek a szérumban (ng/ml) (20 órás éhezés)	4,84±3,2	10,07±2,4	2,55±2,5	4,30±2,6

Különféle szervek (máj, vese, lép) és zsírpárnák (barna zsírszövet, retroperitoneális zsír, és perirenális zsír) tömegének mérése felfedte, hogy a transzgénikus állatok vitális szerveinek mérete arányosan lecsökkent. Azonban, a szokásos vagy magas zsírtartalmú tápon tartott transzgénikus állatok zsírpárnáinak tömege jelentősen (40-50%-kal) kisebbek, mint a kontrolé (14A. és 14B. ábrák). Trigliceridek, szabad zsírsavak (FFA) és leptin szintjeit mértük a szérumban éhezési és etetési körülmények között. Bár a trigliceridek és zsírsavak szintjei a transzgénikus és kontrol állatokban hasonló, a transzgénikus állatokban csaknem 50%-kal alacsonyabb szintű leptin kering (14C. és 14. D ábrák, 2. táblázat).

A Wnt-jelátvitel gátolja az adipogenesist. Annak meghatározására, hogy vajon a Dkk-1 hatással van-e a test összetételére, néhány állatot magas zsírtartalmú tápon tartottunk 24 hétig. Magas zsírtartalmú tápon tartott, Dkk-1-re nézve transzgénikus állatok testtömege jelentősen lecsökkent a vad típusú kontrolhoz képest (15A. ábra), és hasonlóan lecsökkent a vitális szervek tömege is. A szokásos tápon tartott állatoknál megfigyeltekhez hasonlóan, a transzgénikus állatokban a zsírpárnák tömege 40-50%-kal kisebb, és hasonlóképpen lecsökkentek a keringő leptin szintjei (15C. ábra). A trigliceridek és szabad zsírsavak szintjei a transzgénikus és kontrol állatokban hasonlóak (3. táblázat).

3. táblázat

Fiziológiai jellemző	Kontrol magas zsírtartalmú táp (hímek=12)	Kontrol magas zsírtartalmú táp (nőstények=8)	Dkk-1 TG magas zsírtartalmú táp (hímek=6)	Dkk-1 TG magas zsírtartalmú táp (nőstények=5)
Testtömeg 16 hetes korban	40,3±6,6	34,7±7,1	36,7±4,8	29,2±5,1
Etetett állatok FFA szintje (nM/5 μl)	9,06±3,3	10,92±2,4	9,13±2,4	10,13±0,68
Triglicerid szint (etetett) (mg/ml)	1,08±0,16	1,14±0,1	1,12±0,12	1,19±0,15
Inzulin a szérumban (pg/ml) (i.p., rásegítő glükóz után 30 min)	907,0±645,1	327,6±181,2	623,0±490,1	243,8±103,3
Inzulin a szérumban (20 órás éhezés) (pg/ml)	917,5±726,0	714,8±228,4	938,0±427,3	845,8±606,1
Leptinszintek a szérumban (ng/ml) (alapszint)	33,5±10,1	36,8±0,6	23,6±18,2	24,7±10,3

A Dkk-1 glükózmetabolizmusra gyakorolt *in vivo* hatásainak meghatározására, alapító transzgénikus egerekből két különálló, glükózra és inzulinra nézve toleráns vonalat generáltunk, és ezeken méréseket végeztünk. Szokásos tápon, vagy magas zsírtartalmú tápon tartott transzgénikus hím és nőstény egerekben, glükóz intraperitoneális beadását követően a glükózürülés jelentős mértékben csökkent a vad típusú kontrolhoz képest (16A. ás 16B. ábrák). A szokásos tápon tartott állatokban mért inzulintolerancia változatlan maradt (16C. és 16D. ábrák). A szérumban a glükózzal indukált inzulinszintek a transzgénikus állatokban, az intraperitoneális glükózinjekció után 30 perccel, ELISA mérések szerint, jelentős mértékben csökkentek a kontrol állatokhoz képest (16E. ábra).

Értékelés

Izomsejtekben a Dkk-1 különböző hatásokat gyakorol a glükózfelvételre *in vitro*. Dkk-1-el kezelt izomsejtek rezisztensek az inzulinnal végzett kezeléssel szemben, és e hatásokat már 18 óra múlva tapasztalhatjuk. A 2. típusú diabetesre jellemző, inzulinnal szembeni rezisztencia az inzulin által közvetített jelátvitelben résztvevő fehérjék

expressziós szintjeivel, foszforilációjával és aktivitásával befolyásolható. Ezért, izomban a Dkk-1 hatásait egyaránt vizsgáltuk *in vivo* és *in vitro*.

A Dkk-1 izomsejtekre gyakorolt legdrámaibb hatása az Akt (az inzulin által közvetített jelátvitel kulcsszerepet betöltő kinázа), inzulinnal serkentett aktiválásában bekövetkezett 50%-os csökkenés volt. Dkk-1-et túlexpresszáló transzgénikus állatok izmaiban a szérumból történő glükózürülés lecsökkent, jóllehet az inzulinnal szembeni tolerancia változatlan maradt. Ezen állatok növekedése visszamaradt és esetükben arányosan alacsonyabb hús- és zsírtömeget, illetve kisebb vitális szerveket találtunk a vad típusú kontrolhoz képest. A Dkk-1 glükózürülésre és az Akt, inzulinnal serkentett aktiválására gyakorolt hatásait megfigyelhettük olyan állatokban, amelyek 8 napon át Dkk-1 injekciókat kaptak i.v.. Ezen állatokban a szérum inzulinszintjei lecsökkentek, bár a transzgénikus egerek szérumban mérhető inzulinszintjeivel kapcsolatban nem tapasztaltunk ilyen hatást. Dkk-1 csökkentette az alapszintű és inzulinnal serkentett glükózfelvételt L6 sejtekben oly módon, hogy gátolta az Akt-t, amely az inzulin által közvetített jelátvitelben kulcsszerepet betöltő intermedier. A Dkk-1 e hatásait csak, a Dkk-1-el végzett 18 órás kezelés után tapasztaltuk.

A Dkk-1 jelentősen befolyásolta az izomsejtek differenciálódását *in vitro* és *in vivo*, amely azt mutatja, hogy a Dkk-1 valamilyen antagonistáját az izomregenerálásban és izom-helyreállításban alkalmazni lehet.

A *dkk-1* transzgént expresszáló állatok testmérete. és ezzel arányosan a vitális szerveik tömege lecsökkent. Anélkül, hogy ragaszkodnánk bármilyen elmélethez, a Dkk-1 e hatásait feltehetően az inzulin (és valószínűleg IGF-1) által serkentett Akt aktivitás csökkentésén keresztül fejti ki. Erre a feltételezésre közvetlen bizonyíték olyan egereken végzett kísérletekből származik, amely egerekben az Akt1 gént megszüntették [Chen és mtsai., Genes Dev. 15, 2203-2208 (2001)]. Ezen állatok kisebb méretűek és születéskori testtömegük is kisebb, szaporodási rátájuk alacsonyabb, bár glükózmetabolizmusuk változatlan. Ezenfelül, az Akt közvetíti a növekedési hormon receptora és a sejtmag közötti jelátvitelt [Piwien-Pilipuk és mtsai., J. Biol. Chem. 276, 19664-19671 (2001)]. Esetleg – anélkül, hogy bárkinek az elméletéhez kötődnénk – a *dkk-1*-re transzgénikus állatok csökkent növekedési üteme ezen állatok esetében a csökkent glükózfelvétel másodlagos következménye, és az ebből eredően a tápanyag elérhetőségének, és a metabolizmus rátájának megváltozására vezethető vissza. Az Akt szabályozza az izmok túlnövekedését és megakadályozza azok sorvadását [Bodine és mtsai., Nature Cell Biol. 3, 1014-1019 (2001); Rommel és mtsai., Nature Cell Biol. 3, 1009-1013 (2001)], és – anélkül, hogy bárkinek az elméletéhez

kötődnénk – valószínű, hogy a Dkk-1 a testméretre gyakorolt hatását az izmok Akt által irányított differenciálódásán és/vagy regenerálódásán keresztül fejti ki.

A Dkk-1-re transzgénikus egereknek csökkent zsírpárnái vannak, amely azt a lehetőséget veti fel, hogy a Dkk-1 befolyásolja az adipociták differenciálódását. Anélkül, hogy bárkinek az elméletéhez kötődnénk, e folyamat részben az Akt – az adipogenesis ismert szabályzója - gátlásán keresztül történik [Magun és mtsai., Endorinology 137, 3590-3593 (1996)].

Primer 3T3L1 preadipocitákat serkentettünk Dkk-1 jelenlétében vagy hiányában, a differenciálódás kezdetétől különböző napokon sejteket gyűjtöttünk, és a transzkriptumokat az adipociták differenciálódását jelző gének – mint például, AP2, PPARγ, C/EBPα és FAS - expressziós szintjeire nézve analizáltuk. A Dkk-1-el végzett kezelés nem változtatta meg a FAS és AP2 szintjeit, azonban a Dkk-1-el kezelt sejtekben a PPARγ szintjei körülbelül kétszeresen , a C/EBPα szintjei pedig körülbelül egyszeresen csökkentek a differenciálódás 5-8. napja között.

A PPARγ az adipociták kialakulásának kulcsfontosságú szabályzója [Hu és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 9856-9860 (1995); Hallakou és mtsai., Diabetes 46, 1393-1399 (1997)] és ennek mutációja révén megnövekedett transzkripcionális aktivitású receptort azonosítottak számos súlyosan elhízott páciensben [Ristow és mtsai., N. Engl. J. Med. 339, 953-959 (1998)]. Ezenfelül, az izmokban a PPARγ kulcsfontosságú szerepet tölt be az inzulinnal szembeni érzékenység szabályozásában. A PPARγ expressziója megváltozik a 2. típusú diabeteses páciensek vázizomzatában [Lovisacach és mtsai., Diabetologia 43, 304-311 (2000)], és ennek transzkripcionális aktivitását károsító mutációkat azonosítottak súlyos inzulinrezisztenciában és 2. típusú diabetesben szenvedő egyedekben [Barroso és mtsai., Nature 402, 880-883 (1999)]. Azonban a PPARγ-nak a 2. típusú diabetesben betöltött szerepét igazoló legteljesebb bizonyíték az emberi 2. típusú diabetes kezelésére engedélyezett tiazolidindion (TZD) drogok csoportjának (glitazonok) (rosiglitazon/Avandia és pioglitazon/Actos) alkalmazásából származik. E drogok olyan, szelektív PPARγ agonisták [Forman és mtsai., Cell 83, 803-812 (1995)], amelyek enyhítik az inzulinnal szembeni rezisztenciát és csökkentik a glükózszintet anélkül, hogy különféle mechanizmusok útján fokozva a vázizmok glükóz-felhasználásával serkentenék az inzulin szekrécióját [Olefsky és Saltiel, Trends Endo. Metab. 11, 362-367 (2000); Willson és mtsai., Annu. Rev. Biochem. 70, 341-367 (2001)].

Az adipociták differenciálódását lényegesen serkenti az aktív Akt [Magun és mtsai., Endocrinology 137, 3590-3593 (1996)]. A szérumban lévő leptin szintjei a zsírszövetek tömegétől függenek és ezeket az Akt fokozólag szabályozza [Barthel és mtsai., Endocrinology 138, 3559-3562 (1997)]. Anélkül, hogy bármilyen elmélethez ragaszkodnánk, a *dkk-1* transzgénikus állatokban keringő leptinszintek lecsökkent szintjét közvetlenül a csökkent zsírtömeg és/vagy a zsírszövetben lecsökkent Akt aktivitás hatása eredményezi.

Az Akt leginkább tanulmányozott funkciója, a glükóz metabolizmusában betöltött szerepe. Az inzulinra adott válaszként az Akt szabályozza az IRS-1 működését [Paz és mtsai., J. Biol. Chem. 274, 28816-28822 (1999)], a GSK3β foszforilációját és aktivitását [Ross és mtsai., Mol. Cell. Biol. 19, 8433-8441 (1999); Summers és mtsai., J. Biol. Chem. 274, 17934-17940 (1999)], foszforilálja a GLUT-4 vezikulumok komponenseit, és szabályozza a GLUT4 sejtfelszínre irányuló transzlokációját [Kupriyanova és Kandor, J. Biol. Chem. 274, 1458-1464 (1999); Wang és mtsai., Mol. Cell. Biol. 19, 4008-4018 (1999)]. Az Akt csökkent foszforilációját [Krook és mtsai., mint fenn] figyelték meg bizonyos, 2. típusú diabeteses alanyok vázizomzatában, és elhízott állatokban [Carvalho és mtsai., Diabetologia 43, 1107-1115 (2000); Kim és mtsai., mint fenn; Shao és mtsai., J. Endocrinol. 167, 107-115 (2000)]. Ezenfelül, az olyan egerek, amelyekben az Akt gén károsodott, a 2. típusú diabetikus fenotípus figyelhető meg [Cho és mtsai., Science 292, 1728-1731 (2000)]. Továbbá, az Akt aktivitását számos körülmény befolyásolja *in vivo*, amelyek hatására megváltozik a glükóz metabolizmusa, ilyen például a hiperglikémia [Kurowski és mtsai., Diabetes 48, 658-663 (1999); Nawano és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 266, 252-256 (1999); Oku és mtsai., mint fenn], az izomkárosodás [Del Aguila és mtsai., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279, E206-212 (2000)], a glikogéntartalom [Derave és mtsai., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279, E947-955 (2000)], és a magas zsírtartalmú diéta [Tremblay és mtsai., Diabetes 50, 1901-1910 (2001)].

A differenciálódásban és a glükóz metabolizmusában betöltött szerepe mellett, az Akt feltehetően kulcsszerepet játszik az inzulint szekretáló, hasnyálmirigy-eredetű β-sejtek a proliferációjában [Holst és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 250, 181-186 (1998); Trumper és mtsai., Ann. N. Y. Acad. Sci. 921, 242-250 (2000); Tuttle és mtsai., Nat. Med. 7, 1133-1137 (2001); Bernal-Mizrachi és mtsai., J. Clin. Invest. 108, 1631-1638 (2001)] és túlélésében [Aikin és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 277, 455-461 (2000)]. Továbbá, az inzulin jelátvitel korai lépéseinek károsodása esetében a β-sejtek túl-

élése lecsökkenhet és az inzulin antiapoptotikus hatásával szembeni rezisztenciát okozhat a PI3 kináz/Akt túlélési útvonal befolyásolásával [Federici és mtsai., FASEB J. 15, 22-24 (2001)]. Az Akt túlexpresszálása β-sejtekben a β-sejtek méretének és a teljes szigetecske tömegének szignifikáns növekedését eredményezi, és ezzel együtt a szérumban megnövekednek az inzulinszintek, javul a glükózzal szembeni tolerancia, és streptozotocinnal indukált diabetessel szemben rezisztencia lép fel [Tuttle és mtsai., mint fenn; Bernal-Mizrachi és mtsai, mint fenn].

A Dkk-1 injektálás 8 napját követően a szekretált inzulin szintjeinek lényeges csökkenését, és a *dkk-1*-et az izmokban túlexpresszáló transzgénikus állatokban pedig kisebb hatásokat figyeltük meg. Anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötnénk magunkat, az állatokban tapasztalt erősebb hatás az Akt gátlása folytán, a hasnyálmirigy β-sejtjeinek túlélésére gyakorolt közvetlen hatás következménye, míg a transzgénikus állatokban kisebb különbségek lehetnek az inzulinszintekben a kompenzációs mechanizmus miatt, vagy az izmokban a Dkk-1 korlátozottabb hatása következtében. Mivel az Akt-ról ismert, hogy serkenti a szigetecskék sejtjeinek proliferációját és az inzulintermelést, és mivel az itt közölt adatok először mutatják be, hogy az injektált Dkk-1 hatására és a transzgénikus egerekben alacsonyabbak az inzulinszintek, a Dkk-1 egy adott antagonistáját alkalmasnak találtuk a hipoinzulinémia kezelésére, viszont a Dkk-1-et alkalmasnak találtuk a hiperinzulinémia kezelésére.

Következtetések

A Dkk-1 befolyásolta a glükóz metabolizmusát az L6 izomsejtekben és a fehérjét az izomban túlexpresszáló transzgénikus állatokban. Izomsejtek kezelése Dkk-1-el az alapszintű és az inzulinnal serkentett glükózfelvétel lecsökkenését eredményezte. E hatást megfigyeltük mind a rövidtávú és mind pedig a hosszútávú kezelés során, amely - anélkül, hogy bármilyen elmélethez kötnénk magunkat - azt veti fel, hogy a Dkk-1 befolyásolja az inzulin jelátviteli útvonal fehérjéinek expressziós szintjeit és azok aktivitását is. E megfigyeléssel összhangban, a fehérjét túlexpresszáló transzgénikus egerek glükóztoleranciája lecsökkent, bár a szérum inzulinszintjeire a fehérje nem volt hatással. Továbbá, a Dkk-1-el injektált állatokban alacsonyabb inzulinszinteket mértünk. A Dkk-1 előmozdította az izomsejtek differenciálódását is. Végül, úgy tűnik, hogy a Dkk-1 csökkenti a testsúlyt és a zsírpárnákat. A fenti megfigyelések bemutatták, hogy a Dkk-1 izomdegenerálódást, inzulinnal szembeni rezisztenciát (amely a NIDDM legtöbb formáinak kulcsfontosságú tulajdonsága), és hipoinzulinémiát indukál, és elősegíti a súlyvesztést vagy a zsírszövetek és –sejtek csökkenését. Így, a Dkk-1 elleni valamilyen antagonista alkalmas lehet az inzulinnal szem-

beni rezisztencia, hipoinzulinémia, és izomdegeneráció kezelésére, és a Dkk-1 alkalmas az elhízottság és hiperinzulinémia kezelésére, és emellett diagnosztikai markerként alkalmas az ilyen állapotok vizsgálatára. Emellett, a Dkk-1 elleni valamilyen antagonista feltehetően gátolja a diabetes fenotípus kifejlődését az US 6.187.991 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban ismertetett transzgénikus modellekben.

2. példa

Dkk-1 elleni monoklonális antitestek kifejlesztése

Öt nőstény Balb/c egeret (Charles River Laboratories, Wilmington, DE) Ribi adjuvánsban (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO) hígított, tisztított, rekombináns, polihisztidin toldalékkal (HIS8) ellátott, bakulovírusban expresszált [WO 99/46281 sz. nemzetközi közzétételi irat], emberi Dkk-1-el hiperimmunizáltunk. Az állatokat hetente kétszer, 50-50 µl oldattal, a talppárnán át immunizáltuk. Öt injekciót követően, az öt – magas, Dkk-1 elleni antitest-titereket mutató - egér nyirokcsomóiból származó B-sejteket egéreredetű mielóma sejtekkel (X63.Ag8.653; American Type Culture Collection, Manassas, VA) fuzionáltattunk az irodalomban ismert [Kohler és Milstein, mint fenn; Hongo és mtsai., Hybridoma 14, 253-260 (1995)] eljárás alkalmazásával. Tíz-tizennégy nap múlva, a felülúszókat összegyűjtöttük és antitest-termelésre nézve, közvetlen ELISA-val szkríneltük. A korlátozott hígítással végzett szubklónozás második körében a legmagasabb immunkötést mutató hét pozitív klónt (amelyeket az ATCC-nél letétbe helyeztünk, lásd fent) PRISTANE™ 2,6,10,14-tetrametilpentakán (Aldrich Chemical Co.) vegyülettel kezelt egerekbe [Freund és Blair, J. Immunol 129, 2826-2830 (1982)] injektáltuk *in vivo* Mab termelés céljából. Az ascitesfolyadékokat összegyűjtöttük és Protein A affinitáskromatográfiával (Pharmacia™ gyors fehérje-folyadékkromatográfia (FPLC), Pharmacia és Upjohn) tisztítottuk a Hongo és munkatársai által leírtak [Hongo és mtsai., mint fenn] szerint. A tisztított antitest-preparátumokat sterilre szűrtük (0,2 µm pórusméret, Nalgene, Rochester, NY) és 4°C-on, foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) tároltuk.

Western immunblottokban mind a hét antitest-preparátum kötötte a Dkk-1-et.

L6 sejteket differenciáltattunk és 48 órán Dkk-1 hiányában (kontrol) vagy 40 nM Dkk-1 (plusz vagy mínusz Dkk-1 elleni antitest1G1.2D12.2D11 (ATCC katalógusszám: PTA-3086), 0,5 µg/ml) jelenlétében inkubáltuk. L6 sejtek alapszintű és inzulinnal serkentett glükózfelvételét az 1. példában leírtak szerint mértük. A 17. ábra bemutatja, hogy az inzulin jelenlétében és hiányában, a monoklonális antitest semlegesítette az L6 sejtek glükózfelvételének Dkk-1 által közvetített csökkenését.

Anyagok letétbe helyezése

Az alábbi anyagokat helyeztük letétbe az American Type Culture Collection-nál (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Megnevezés	ATCC letéti szám	A letét időpontja
DKK1.MAB3139.8C11.2G11.1D1	PTA-3084	2001. február 21.
DKK1.MAB3143.4C7.2H10.2G1	PTA-3085	2001. február 21.
DKK1.MAB3142.1G1.2D12.2D11	PTA-3086	2001. február 21.
DKK1.MAB3141.5B12.2C5.2A5	PTA-3087	2001. február 21.
DKK1.MAB3138.7C11.2H6.2A8	PTA-3088	2001. február 21.
DKK1.MAB3140.7B2.2A6.2H4	PTA-3089	2001. február 21.
DKK1.MAB3144.5A2.2A8.1C3	PTA-3097	2001. február 21.

A letéteket a „mikroorganizmusok szabadalmi eljárás céljából történő letétbe helyezése nemzetközi elismeréséről szóló Budapesti Szerződés Végrehajtási Szabályzatának" (Budapesti Szerződés) rendelkezési szerint helyeztük el. E szerződés a letétbe helyezett életképes tenyészet fenntartását biztosítja a letétbe helyezés dátumától kiindulva 30 évig. A letétet az ATCC által elérhetővé tettük a Budapesti Szerződés rendelkezései szerint, és ezek a Genentech Inc. és az ATCC közötti egyezség tárgyát képezik, amely biztosítja a letétbe helyezett tenyészetből származó utódok állandó és korlátlan elérhetőségét a nagyközönség számára a vonatkozó USA szabadalom megadás vagy bármely vonatkozó USA-beli vagy külföldi szabadalmi bejelentés közrebocsátása után (amelyik korábbi), és biztosítja az utód hozzáférhetőségé az USA Szabadalmi és Védjegyhivatalának elnöke által meghatározott személyek számára az USA 35. sz. törvénykönyvének (35 USC) 122. szakasza és a Hivatal elnöke által kibocsátott vonatkozo szabályozás [pl. a 37. sz. Szövetségi Szabálygyűjtemény (37 CFR) 1.14. szakasza, különösen a 886 OG 638) alapján.

A bejelentés jogosultja hozzájárult ahhoz, hogy ha a letétbe helyezett anyag tenyészete, az alkalmas körülmények alatt végzett tenyésztés ellenére elpusztul vagy azt elpusztítják, az anyagot bejelentés esetén rögtön pótoljuk ugyanolyan anyaggal. A letétbe helyezett anyagok hozzáférhetőségét nem szabad úgy értelmezni, mint engedélyt a találmány gyakorlatbavételére; ebben a tekintetben bármely kormánynak az adott ország szabadalmi törvényei alapján fennálló fennhatósága szerint biztosított jogok a mérvadóak.

A fenti leírás kielégítő kitanítást ad szakember számára a találmány gyakorlatbavételére. A találmány tárgya nem korlátozódik a letétbe helyezett konstrukciókra; mivel a

letétbe helyezés csupán a találmány néhány szempontjának szemléltetéseképpen mutat be néhány megvalósítási módot, és bármely funkcionálisan ekvivalens konstrukció a találmány tárgyát képezi. A letétbe helyezett anyag nem jelenti annak beismerését, hogy a leírás ne lenne elegendő arra, hogy feltárja a találmány bármely szempontját, beleértve azok legelőnyösebb megvalósítási módját, és nem is értelmezhető úgy, mintha az igénypontok oltalmi körét az így szemléltetett megvalósítási módokra korlátozná. Valójában a találmány különböző módosításai lehetségesek a bemutatottakhoz és leírtakhoz képest, amelyek szakmber számára nyilvánvalók a leírás alapján és az igénypontok által meghatározott oltalmi körbe tartoznak.

A találmány bármely elve, előnyös megvalósítási módjai és gyakorlatba vételének különböző módjait a bejelentés kellékei feltárják. Az oltalmazandó találmányt azonban nem szabad úgy érteni, mintha a konkrét feltárt formákra korlátozódna, mivel azok szemléltető és nem korlátozó jellegűek. Szakember az egyes megvalósítási módok különböző változatait dolgozhatja ki és módosíthatja azokat anélkül, hogy eltérne a találmányi gondolattól.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A Dickkopf-1 (Dkk-1) valamely antagonistájának alkalmazása inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

2. Inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 elleni antagonistát tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást az antagonista alkalmazására inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésében.

3. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy 2. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az emlős nem inzulintól függő diabetes mellitusban (NIDDM) szenved.

4. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy 2. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az emlős ember és az antagonista emberi Dkk-1 elleni antagonista.

5. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás vagy 2. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az antagonista Dkk-1-et kötő antitest.

6. A 5. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az antitest monoklonális antitest.

7. A 6. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az antitest az ATCC-nél PTA-3084, PTA-3085, PTA-3086, PTA-3087, PTA-3088, PTA-3089, vagy PTA-3097 katalógusszámon letétbe helyezett hibridómából előállított antitest.

8. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer szisztémás beadásra szolgál.

9. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer inzulinnal szembeni rezisztencia kezelése esetén inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágens hatékony mennyiségével emlősnek történő együttes beadásra, hipoinzulinémia kezelése esetén pedig inzulin hatékony mennyiségével történő együttes beadásra van kiszerelve.

10. A 2. igénypont szerinti készlet, amely inzulinnal szembeni rezisztencia kezelése esetén inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágenst, hipoinzulinémia kezelése esetén pedig inzulint tartalmazó tárolóedényt is tartalmaz.

11. Eljárás inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására emlősben *azzal jellemezve*, hogy:

(a) az emlősből származó mintában megmérjük a Dickkopf-1 (Dkk-1) mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, és az (a) lépésben mért Dkk-1 megnövekedett mennyiségét inzulinnal szembeni rezisztenciára vagy hipoinzulinémiára utaló jelnek tekintjük.

12. Eljárás elhízottság vagy hiperinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására emlősben *azzal jellemezve*, hogy

(a) az emlősből származó mintában megmérjük a Dickkopf-1 (Dkk-1) mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, és az (a) lépésben mért Dkk-1 csökkent mennyiségét elhízottságra vagy hiperinzulinémiára utaló jelnek tekintjük.

13. A 11. vagy 12. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a mérést immunvizsgálatban a Dkk-1 elleni antitest alkalmazásával végezzük.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a Dkk-1 elleni antitest jelölést hordoz.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a jelölés fluoreszcens jelölés, radioaktív jelölés, vagy enzimet tartalmazó jelölés.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az immunvizsgálat radioimmunológiai vizsgálat, enzimes immunológiai vizsgálat, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat, szendvics immunvizsgálat, precipitációs vizsgálat, immunradioaktív vizsgálat, fluoreszcens immunológiai vizsgálat, protein A immunvizsgálat, vagy immunelektroforézises vizsgálat.

17. A 11. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az inzulinnal szembeni rezisztencia nem inzulintól függő diabetes mellitus.

18. A 11. vagy 12. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és emberi Dkk-1-et mérünk.

19. Az ATCC-nél PTA-3084, PTA-3085, PTA-3086, PTA-3087, PTA-3088, PTA-3089, vagy PTA-3097 katalógusszámon letétbe helyezett hibridóma.

20. A 19. igénypont szerinti hibridómák bármelyikéből előállított antitest.

21. A Dickkopf-1 (Dkk-1) alkalmazása elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

22. Elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1-et tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást a Dkk-1 alkalmazására elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésében.

23. A 21. igénypont szerinti alkalmazás vagy a 22. igénypont szerinti készlet alkalmazása, ahol az emlős ember és a Dkk-1 emberi Dkk-1.

24. A 21. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer szisztémás beadásra szolgál.

25. A 21. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a gyógyszer hatékony mennyiségű fogyasztószerrel történő együttes beadásra van kiszerelve.

26. A 22. igénypont szerinti készlet, amely elhízottság kezelése esetén fogyasztószert, hiperinzulinémia kezelése esetén pedig diazoxidot is tartalmaz.

27. Inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, elhízottság vagy hiperinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló diagnosztikai készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dickkopf-1 (Dkk-1) –et kötő antitestet tartalmazó tárolóedény;

(b) Dkk-1-et tartalmazó standard mintát tartalmazó tárolóedény; és

(c) útmutatás az antitest és a standard minta alkalmazására inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, hiperinzulinémia, vagy elhízottság kimutatására, ahol vagy a Dkk-1-et kötő antitest a kimutatható antitest, amely kimutatható módon van jelezve és köti a Dkk-et vagy köti a Dkk-1-et kötő antitestet.

28. A 27. igénypont szerinti készlet, amelyben a Dkk-1-et kötő antitest monoklonális antitest.

29. A 27. igénypont szerinti készlet, amelyben a Dkk-1 emberi Dkk-1, és a készlettel nem inzulintól függő diabetest vagy elhízottságot mutatunk ki.

30. A Dickkopf-1 (Dkk-1) valamely antagonistájának alkalmazása emlősben izom-helyreállításra vagy –regenerálásra szolgáló gyógyszer előállítására.

31. A 30. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az antagonista Dkk-1-et kötő antitest.

32. A 30. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az emlős ember és az antitest emberi Dkk-1-et köt.

33. A 30. igénypont szerinti alkalmazás, ahol az antitest monoklonális antitest.

34. Izomhelyreállításra vagy izomregenerálásra szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 elleni antagonistát tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást az antagonista izomhelyreállításra vagy izomregenerálásra történő alkalmazására emlősben.

35. Monoklonálisantitestet-preparátum, amely egerek adjuvánsban hígított, toldalékolt Dkk-1-el történő hiperimmunizálásával, a Dkk-1 elleni antitest-titereket mutató egerekből származó B-sejtek egéreredetű mielóma sejtekkel történő fuzionáltatásával, ezekből felülúszó nyerésével, a felülúszók összegyűjtésével, az antitest-termelés azonosítására az összegyűjtött felülúszókon szűrővizsgálat végzésével, majd a második szubklónozási kör után a legmagasabb immunkötést mutató pozitív klónok elsődlegesen aktivált („primed") egerekbe monoklonális antitestek *in vivo* előállítása céljából történő injektálásával, az egerekből származó aszcites folyadékok egyesítésével, és az egyesített aszcites folyadékok tisztításával, ezáltal antitestpreparátum előállításával állítható elő.

36. Eljárás feltételezetten gyógyhatású drog inzulinrezisztenciára, hipoinzulinémiára, vagy izom-helyreállításra gyakorolt hatásának értékelésére *azzal jellemezve*, hogy a drogot embertől különböző, *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drog hatását a glükóz-kiürítésre az állat véréből, az állat keringési rendszerében keringő inzulinszintekre, vagy az izom differenciálódására.

37. Eljárás feltételezetten gyógyhatású drog elhízásra és hiperinzulinémiára kifejtett hatásának értékelésére *azzal jellemezve*, hogy a drogot embertől különböző, *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drognak az elhízottság valamelyik jellemzőjére vagy a kérdéses állat inzulinszintjére gyakorolt hatását.

38. *Dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, embertől eltérő állat.

39. A 38. igénypont szerinti állat, amely rágcsáló.

40. A 38. igénypont szerinti állat, amely egér.

A meghatalmazott:
DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Dr. Svingor Ádám
szabadalmi ügyvivő

81 oldal leírás
17 oldal rajz
1 oldal igénypont
99 oldal

SZABADALMI IGÉNYPONTOK (EREDETI)

1. Eljárás inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésére emlősökben *azzal jellemezve*, hogy az azt igénylő emlősnek Dickkopf-1 (Dkk-1) valamely antagonistájának hatékony mennyiségét adjuk be.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős nem inzulintól függő diabetes mellitusban (NIDDM) szenved.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és az antagonista emberi Dkk-1-et antagonizáló antagonista.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az antagonista Dkk-1-et kötő antitest.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az antitest monoklonális antitest.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az antitestet a PTA-3086 számmal letétbe az ATCC-nél letétbe helyezett hibridómából készítettük.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a beadás szisztémás.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy inzulinnal szembeni rezisztencia kezelése esetén, az emlősnek hatékony mennyiségű inzulint is beadunk.

9. Az 1. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy hipoinzulinémia kezelése esetén az emlősnek hatékony mennyiségű inzulint is beadunk.

10. Eljárás inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására egy adott emlősben *azzal jellemezve*, hogy:

(a) az emlősből származó mintában megmérjük a Dickkopf-1 (Dkk-1) mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, és az (a) lépésben mért Dkk-1 megnövekedett mennyiségét inzulinnal szembeni rezisztenciára vagy hipoinzulinémiára utaló jelnek tekintjük.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a mérést immunvizsgálatban a Dkk-1 elleni antitest alkalmazásával végezzük.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a Dkk-1 elleni antitest jelölést hordoz.

13. A 12. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a jelölés fluoreszcens jelölés, radioaktív jelölés, vagy enzimes jelölés.

14. A 11. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az immunvizsgálat radioimmunológiai vizsgálat, enzimes immunológiai vizsgálat, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat, szendvics-immunvizsgálat, precipitációs vizsgálat, immunradioaktív vizsgálat, fluoreszcens immunológiai vizsgálat, protein A immunvizsgálat, vagy immunelektroforézises vizsgálat.

15. A 10. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az inzulinnal szembeni rezisztencia nem inzulintól függő diabetes mellitus.

16. A 10. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és emberi Dkk-1-et mérünk.

17. Inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 elleni antagonistát tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást az antagonista alkalmazására inzulinnal szembeni rezisztencia vagy hipoinzulinémia kezelésében.

18. A 17. igénypont szerinti készlet, amelyben az antagonista, Dkk-1-et kötő antitest.

19. A 18. igénypont szerinti készlet, amelyben az antitest monoklonális antitest.

20. A 18. igénypont szerinti készlet, amelyben az antitest emberi Dkk-1-et köt.

21. A 17. igénypont szerinti készlet a nem inzulintól függő diabetes mellitus kezelésére.

22. A 17. igénypont szerinti készlet, amely inzulinnal szembeni rezisztencia kezelése esetén inzulinnal szembeni rezisztencia kezelésére szolgáló ágenst, hipoinzulinémia kezelése esetén pedig inzulint tartalmazó tárolóedényt is tartalmaz.

23. Az ATCC-nél PTA-3084, PTA-3085, PTA-3086, PTA-3087, PTA-3088, PTA-3089, vagy PTA-3097 katalógusszámon letétbe helyezett hibridóma.

24. A 23. igénypont szerinti, PTA-3086 ATCC katalógusszámú hibridóma.

25. A 23. igénypont szerinti hibridómából előállított antitest.

26 Eljárás elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére emlősökben *azzal jellemezve*, hogy az azt igénylő emlősnek Dickkopf-1 (Dkk-1) hatékony mennyiségét adjuk be.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és a Dkk-1 emberi Dkk-1.

28. A 26. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a beadás szisztémás.

29. A 26. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy hatékony mennyiségű fogyasztószert is beadunk.

30. Eljárás elhízottság vagy hiperinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására egy adott emlősben *azzal jellemezve*, hogy

(a) az emlősből származó mintában megmérjük a Dickkopf-1 (Dkk-1) mennyiségét; és

(b) összehasonlítjuk az (a) lépésben meghatározott mennyiséget a Dkk-1 egy adott standard mintában jelenlévő mennyiségével, és az (a) lépésben mért Dkk-1 csökkent mennyisége elhízottságot vagy hiperinzulinémiát jelez.

31. A 30. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a mérést immunvizsgálatban a Dkk-1 elleni antitest alkalmazásával végezzük.

32. A 31. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a Dkk-1 elleni antitest jelölést hordoz.

33. A 32. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy a jelölés fluoreszcens jelölés, radioaktív jelölés, vagy enzimet tartalmazó jelölés.

34. A 31. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az immunvizsgálat radioimmunológiai vizsgálat, enzimes immunológiai vizsgálat, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálat, szendvics immunvizsgálat, precipitációs vizsgálat, immunradioaktív vizsgálat, fluoreszcens immunológiai vizsgálat, protein A immunvizsgálat, vagy immunelektroforézises vizsgálat.

35. A 30. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és emberi Dkk-1-et mérünk.

36. Elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésére szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1-et tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást a Dkk-1 alkalmazására elhízottság vagy hiperinzulinémia kezelésében.

37. A 36. igénypont szerinti készlet, amelyben a Dkk-1 emberi Dkk-1.

38. A 36. igénypont szerinti készlet, amely elhízottság kezelése esetén fogyasztószert, hiperinzulinémia kezelése esetén pedig diazoxidot is tartalmaz.

39. Inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, elhízottság vagy hiperinzulinémia jelenlétének vagy kezdetének kimutatására szolgáló diagnosztikai készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dickkopf-1 (Dkk-1) –et kötő antitestet tartalmazó tárolóedény;

(b) Dkk-1-et tartalmazó standard mintát tartalmazó tárolóedény; és

(c) útmutatás az antitest és a standard minta alkalmazására inzulinnal szembeni rezisztencia, hipoinzulinémia, hiperinzulinémia, vagy elhízottság kimutatására, ahol a Dkk-1-et megkötni képes antitest kimutatható jelölést hordoz, vagy a készlet tartalmaz egy másik tárolóedényt is, amelyben kimutatható jelölést hordozó és a Dkk-1-et megkötni képes vagy a Dkk-1-et megkötni képes antitestet megkötni képes második antitest van.

40. A 39. igénypont szerinti készlet, amelyben a Dkk-1-et kötő antitest monoklonális antitest.

41. A 39. igénypont szerinti készlet, amelyben a Dkk-1 emberi Dkk-1, és a készlettel nem inzulintól függő diabetest, vagy elhízottságot mutatunk ki.

42. Eljárás izomhelyreállításra vagy izomregenerálásra emlősben *azzal jellemezve*, hogy az azt igénylő emlősnek a Dkk-1 valamely antagonistájának hatékony mennyiségét adjuk be.

43. A 42. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az antagonista Dkk-1-et kötő antitest.

44. A 43. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az emlős ember és az antitest emberi Dkk-1-et köt.

45. A 42. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy az antitest monoklonális antitest.

46. Izomhelyreállításra vagy izomregenerálásra szolgáló készlet, amely az alábbiakat tartalmazza:

(a) Dkk-1 elleni antagonistát tartalmazó tárolóedényt; és

(b) útmutatást az antagonista izomhelyreállításra vagy izomregenerálásra történő alkalmazására emlősben.

47. Monoklonálisantitestet-preparátum, amely egerek adjuvánsban hígított, toldalékolt Dkk-1-el történő hiperimmunizálásával, a Dkk-1 elleni antitest-titereket mutató egerekből származó B-sejtek egéreredetű mielóma sejtekkel történő fuzionáltatásával, ezekből felülúszó nyerésével, a felülúszók összegyűjtésével, az antitest-termelés azonosítására az összegyűjtött felülúszókon szűrővizsgálat végzésével, majd a második szubklónozási kör után a legmagasabb immunkötést mutató pozitív klónok elsődlegesen aktivált („primed") egerekbe monoklonális antitestek *in vivo* előállítása céljából történő injektálásával, az egerekből származó aszcites folyadékok egyesítésével, és az egyesített aszcites folyadékok tisztításával, ezáltal antitestpreparátum előállításával állítható elő.

48. Eljárás feltételezetten gyógyhatású drog inzulinrezisztenciára, hipoinzulinémiára, vagy izom-helyreállításra gyakorolt hatásának értékelésére *azzal jellemezve*, hogy a drogot embertől különböző, *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drog hatását a glükóz-kiürítésre az állat véréből, az állat keringési rendszerében keringő inzulinszintekre, vagy az izom differenciálódására.

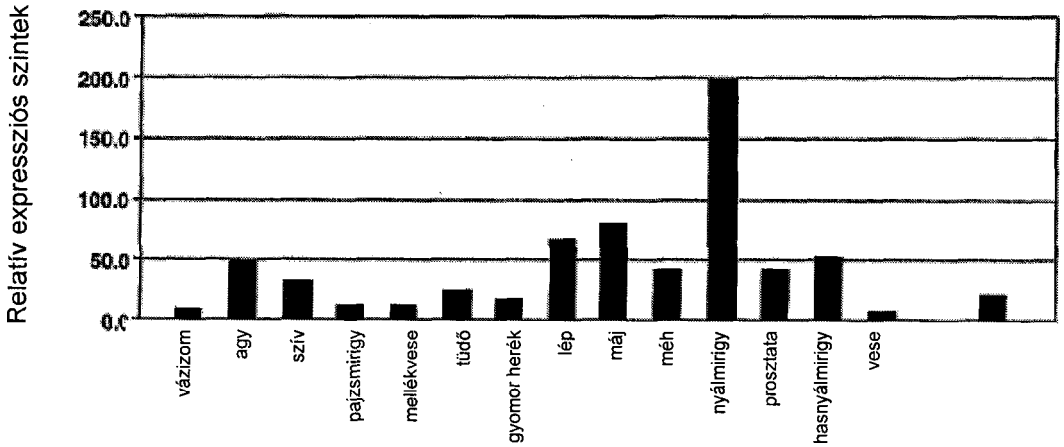
49. Eljárás feltételezetten gyógyhatású drog elhízásra és hiperinzulinémiára kifejtett hatásának értékelésére *azzal jellemezve*, hogy a drogot embertől különböző, *dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, transzgénikus állatnak adjuk be és meghatározzuk a drognak az elhízottság valamelyik jellemzőjére vagy a kérdéses állat inzulinszintjére gyakorolt hatását.50. *Dkk-1* nukleinsavat túlexpresszáló, embertől különböző állat.

51. Az 50. igénypont szerinti állat, amely rágcsáló.

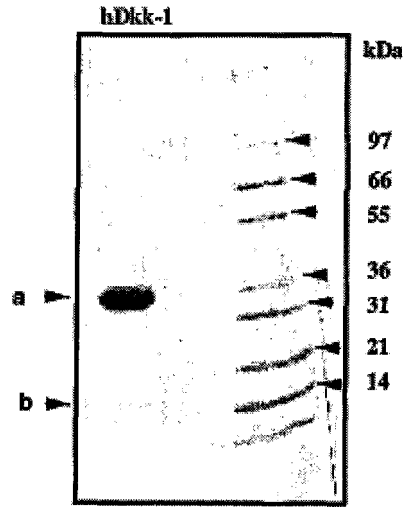
52. Az 50. igénypont szerinti állat, amely egér.

P03 03194 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY 34139 A2

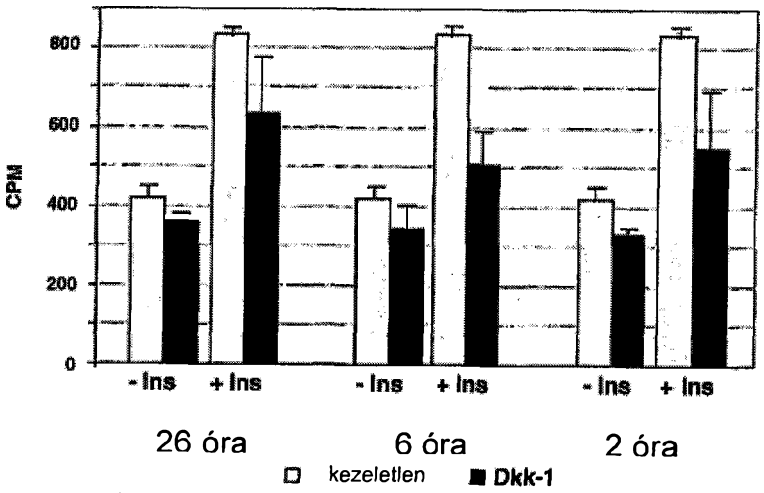
1. ábra



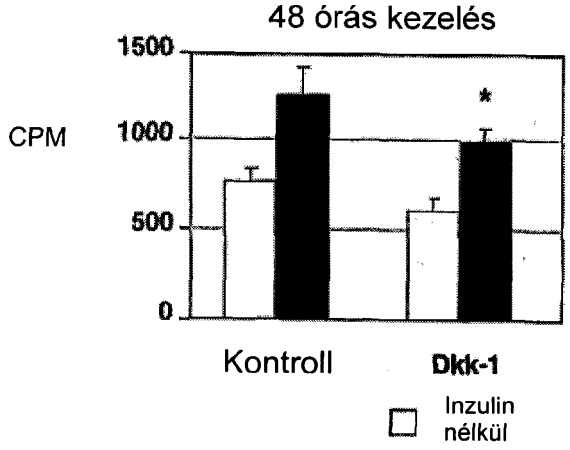
2. ábra



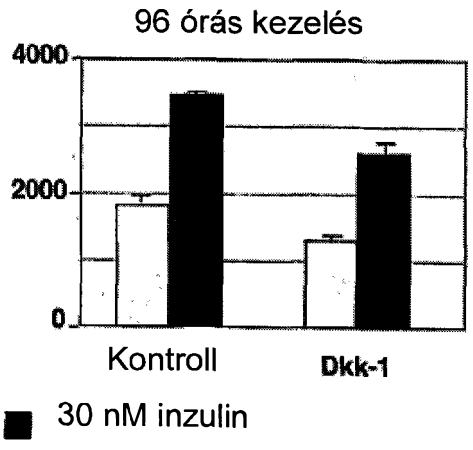
3A ábra



3B ábra

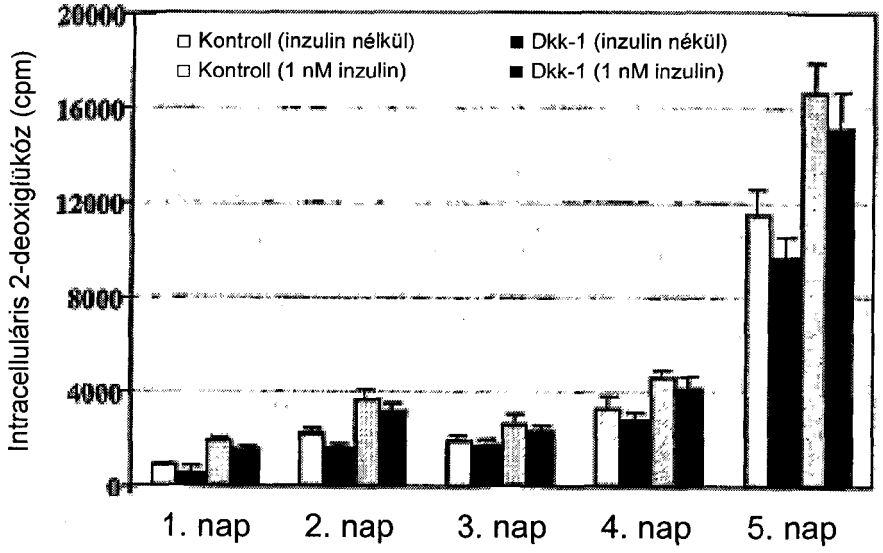


3C ábra

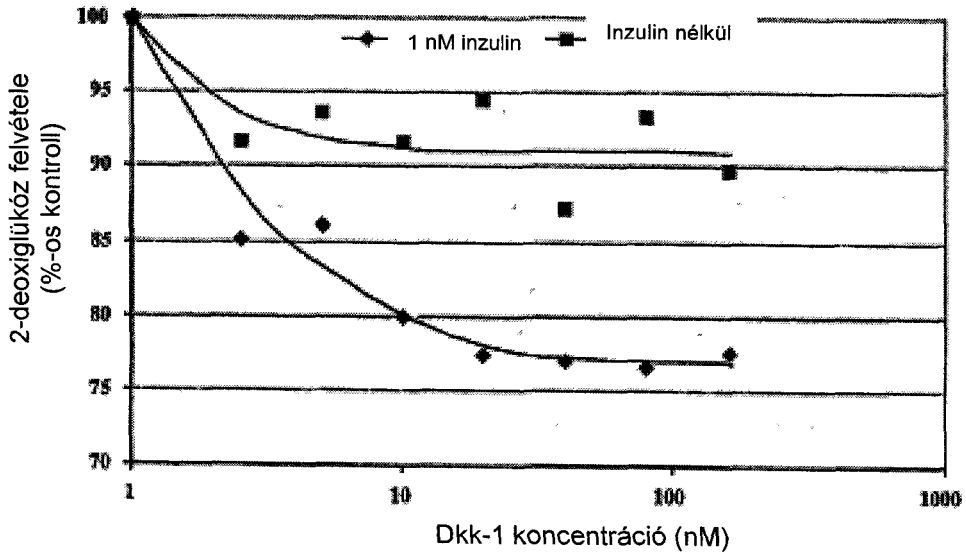


4. ábra

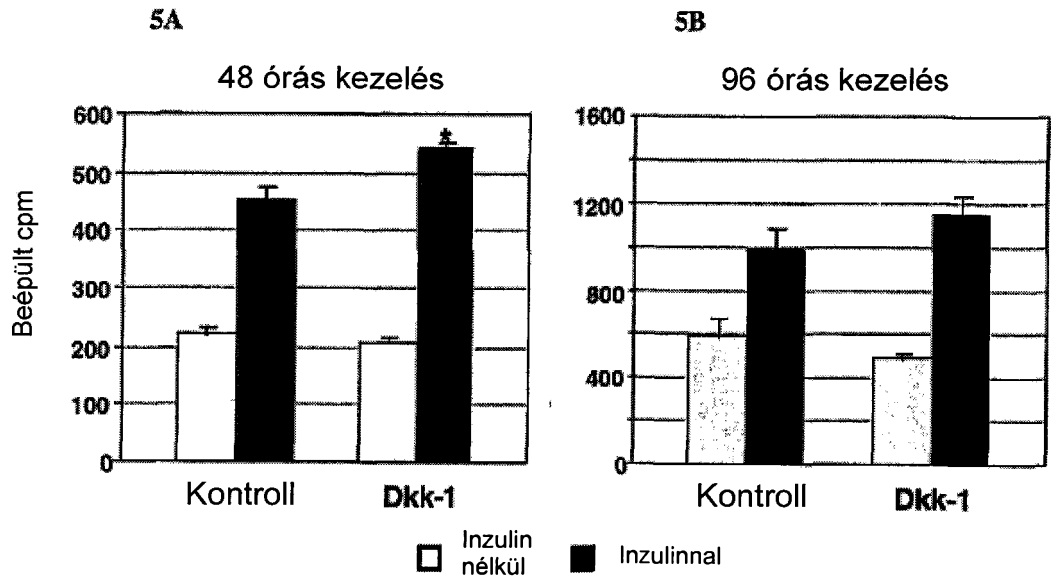
4A


20000
16000
12000
8000
4000
0
Intracelluláris 2-deoxiglükóz (cpm)
□ Kontroll (inzulin nélkül)
□ Kontroll (1 nM inzulin)
■ Dkk-1 (inzulin nékül)
■ Dkk-1 (1 nM inzulin)
1. nap
2. nap
3. nap
4. nap
5. nap

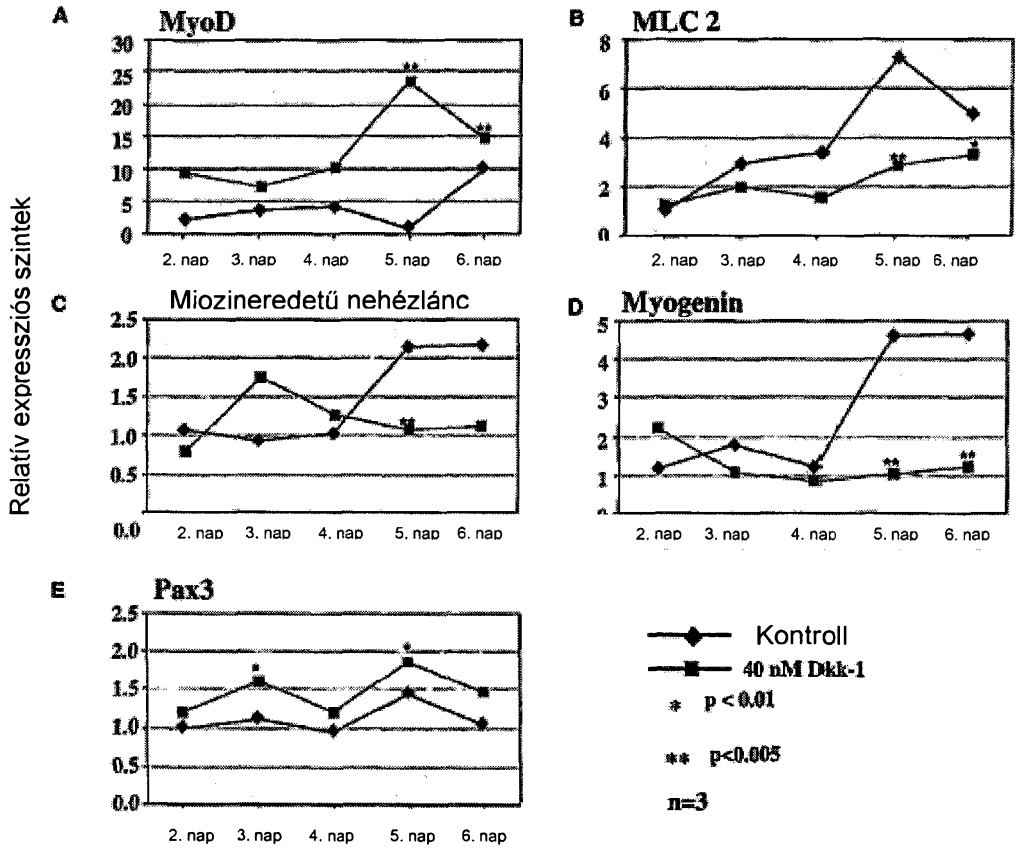
4B


100
95
90
85
80
75
70
2-deoxiglükóz felvétele (%-os kontroll)
1 nM inzulin
Inzulin nélkül
1
10
100
1000
Dkk-1 koncentráció (nM)

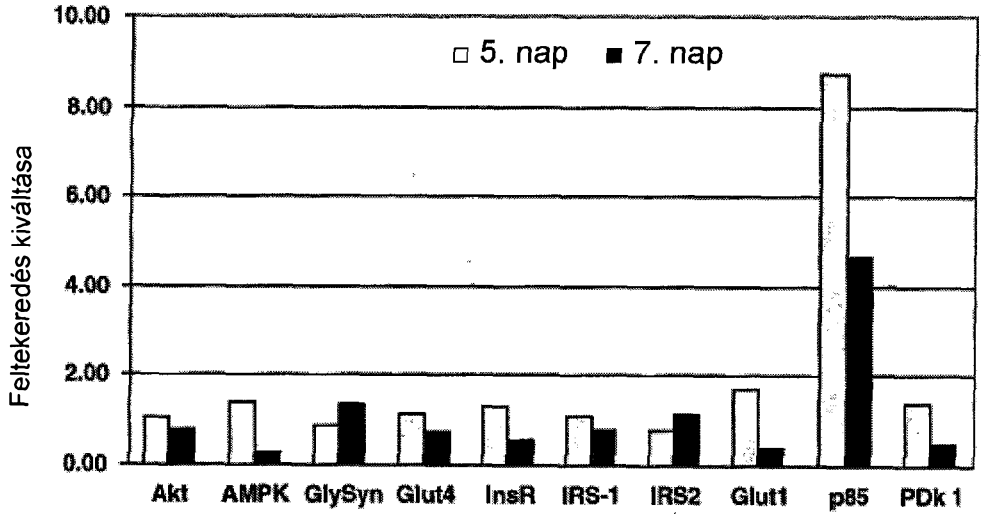
5. ábra


5A
48 órás kezelés
Beépült cpm
600
500
400
300
200
100
0
Kontroll
Dkk-1
5B
96 órás kezelés
1600
1200
800
400
0
Kontroll
Dkk-1
Inzulin nélkül
Inzulinnal

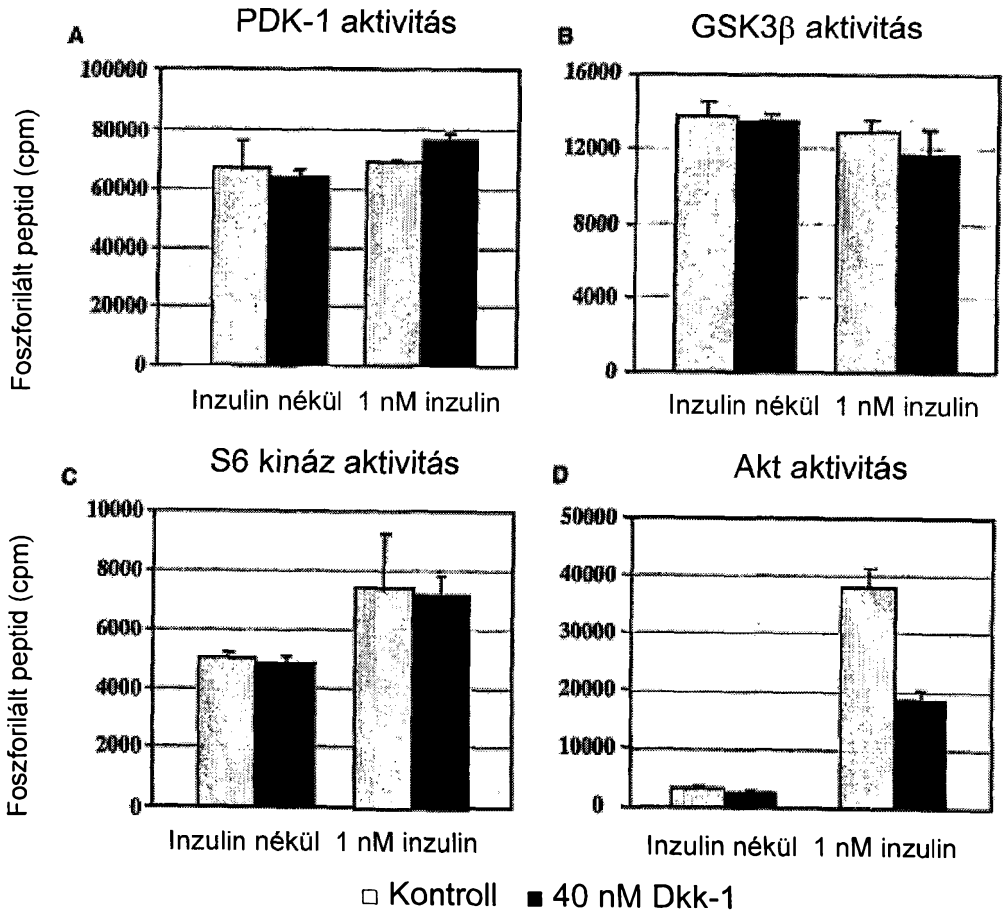
6. ábra


A
MyoD
B
MLC 2
C
Miozineredetű nehézlánc
D
Myogenin
E
Pax3
Relatív expressziós szintek
2. nap
3. nap
4. nap
5. nap
6. nap
Kontroll
40 nM Dkk-1
* p < 0.01
** p<0.005
n=3

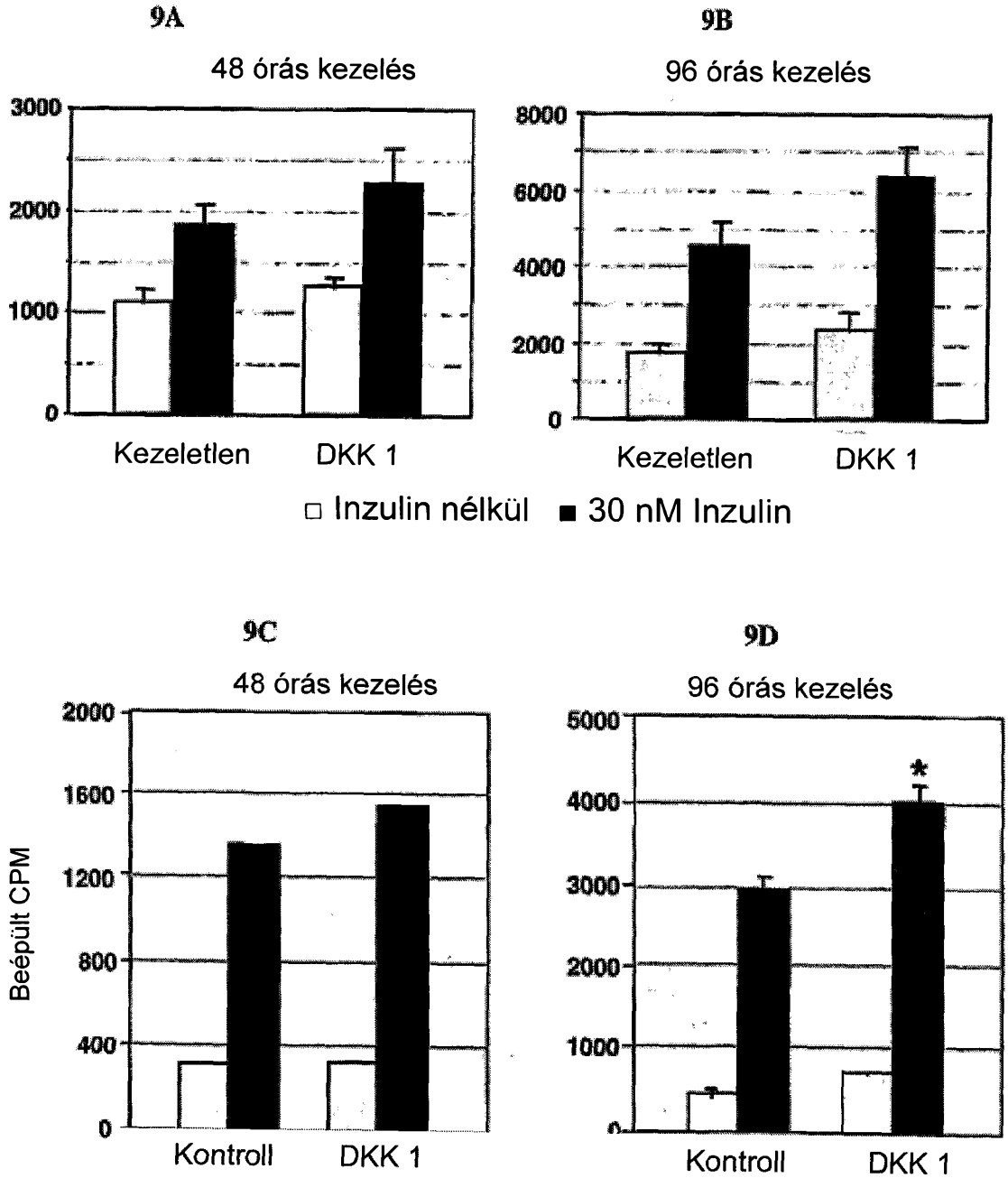
7. ábra


10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
Feltekeredés kiváltása
□ 5. nap ■ 7. nap
Akt
AMPK
GlySyn
Glut4
InsR
IRS-1
IRS2
Glut1
p85
PDk 1

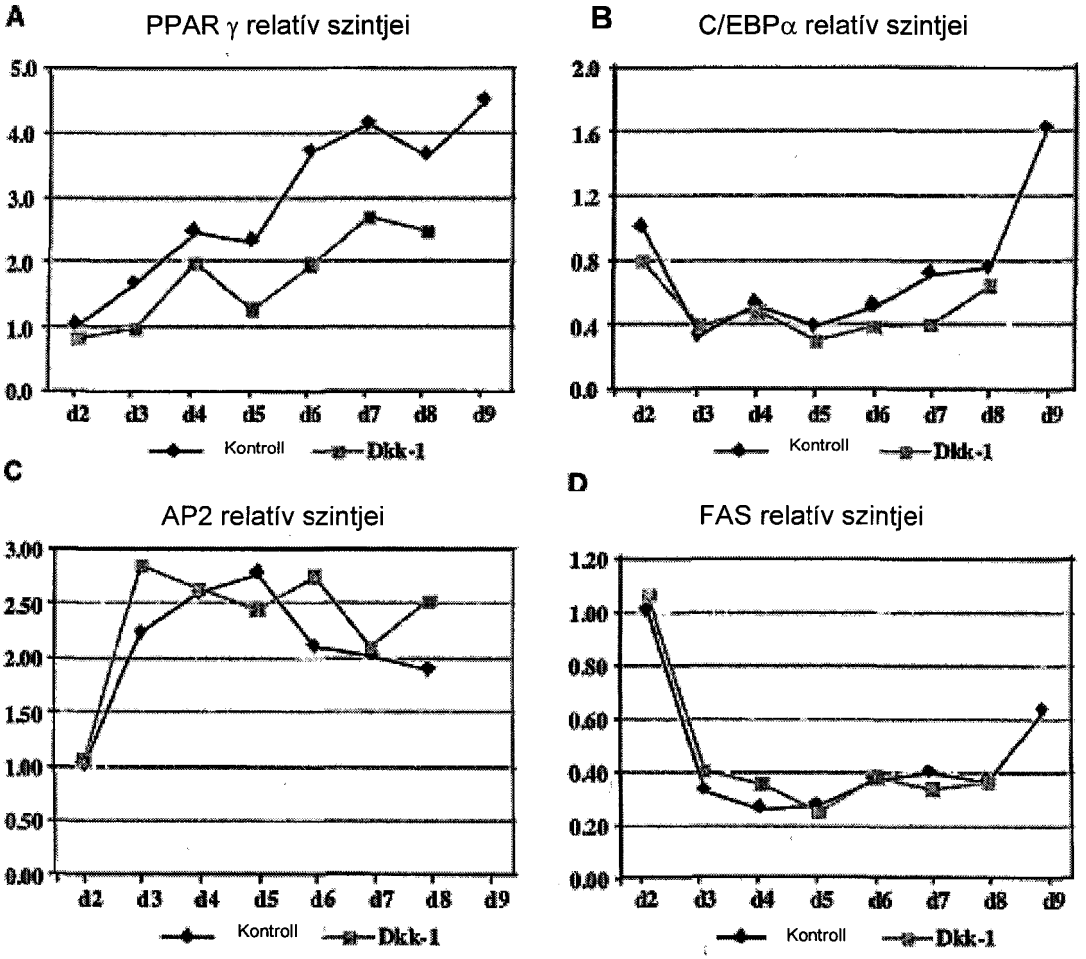
8. ábra


A
PDK-1 aktivitás
Foszforilált peptid (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
Inzulin nékül
1 nM inzulin
B
GSK3β aktivitás
16000
12000
8000
4000
0
Inzulin nékül
1 nM inzulin
C
S6 kináz aktivitás
Foszforilált peptid (cpm)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Inzulin nékül
1 nM inzulin
D
Akt aktivitás
50000
40000
30000
20000
10000
0
Inzulin nékül
1 nM inzulin
□ Kontroll ■ 40 nM Dkk-1

9. ábra

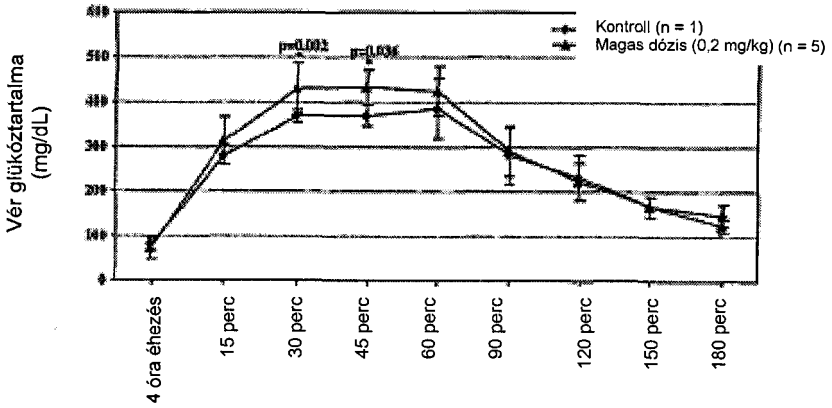

9A
48 órás kezelés
3000
2000
1000
0
Kezeletlen
DKK 1
9B
96 órás kezelés
8000
6000
4000
2000
0
Kezeletlen
DKK 1
□ Inzulin nélkül ■ 30 nM Inzulin
9C
48 órás kezelés
Beépült CPM
2000
1600
1200
800
400
0
Kontroll
DKK 1
9D
96 órás kezelés
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
Kontroll
DKK 1
□ Inzulin nélkül ■ 30 nM Inzulin

10. ábra


A
PPAR γ relatív szintjei
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9
Kontroll
Dkk-1
B
C/EBPα relatív szintjei
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9
Kontroll
Dkk-1
C
AP2 relatív szintjei
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9
Kontroll
Dkk-1
D
FAS relatív szintjei
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9
Kontroll
Dkk-1

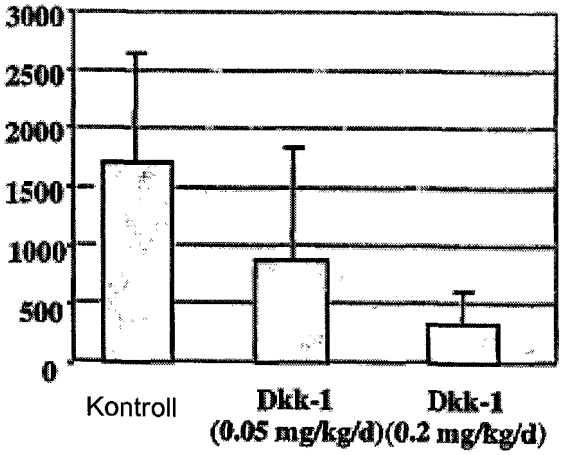
11. ábra

A



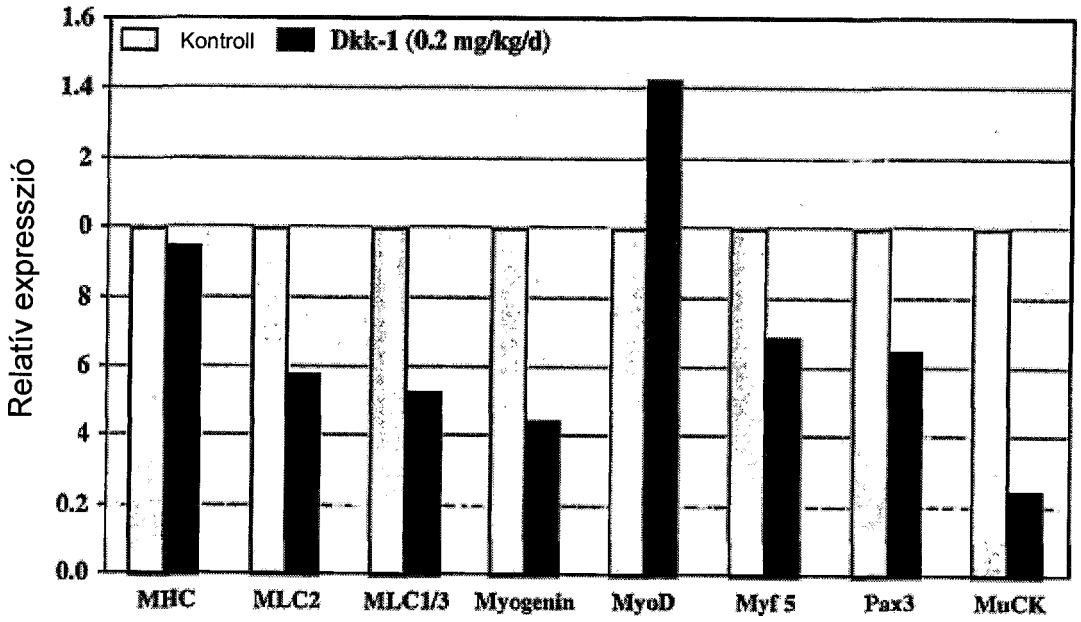
Rásegítő glükózinjekció beadásától eltelt idő

B

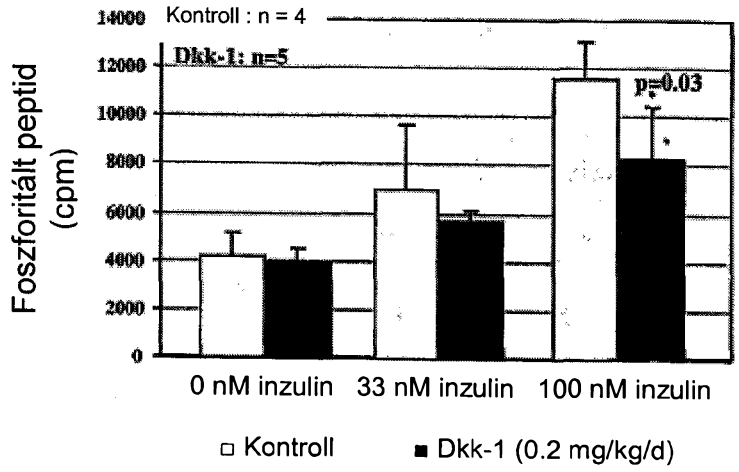


12. ábra

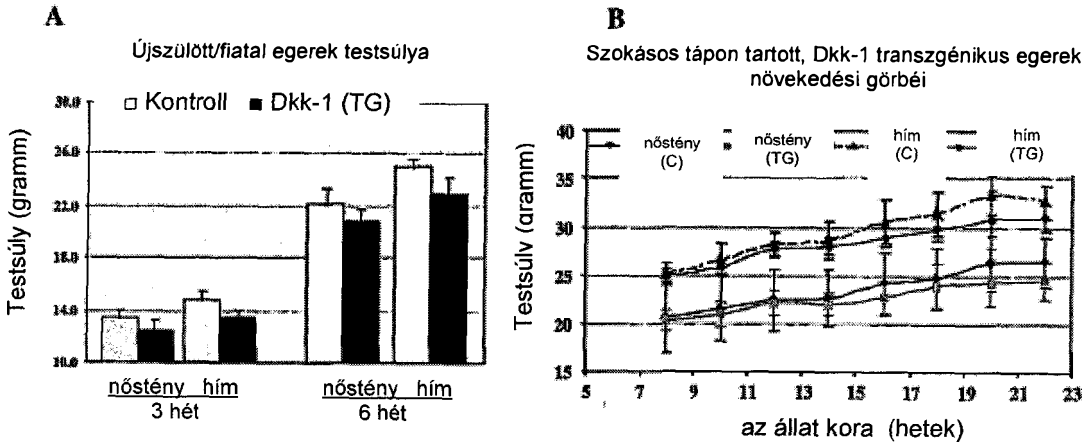
A


Kontroll
Dkk-1 (0.2 mg/kg/d)
Relatív expresszió
1.6
1.4
2
0
8
6
4
0.2
0.0
MHC
MLC2
MLC1/3
Myogenin
MyoD
Myf 5
Pax3
MuCK

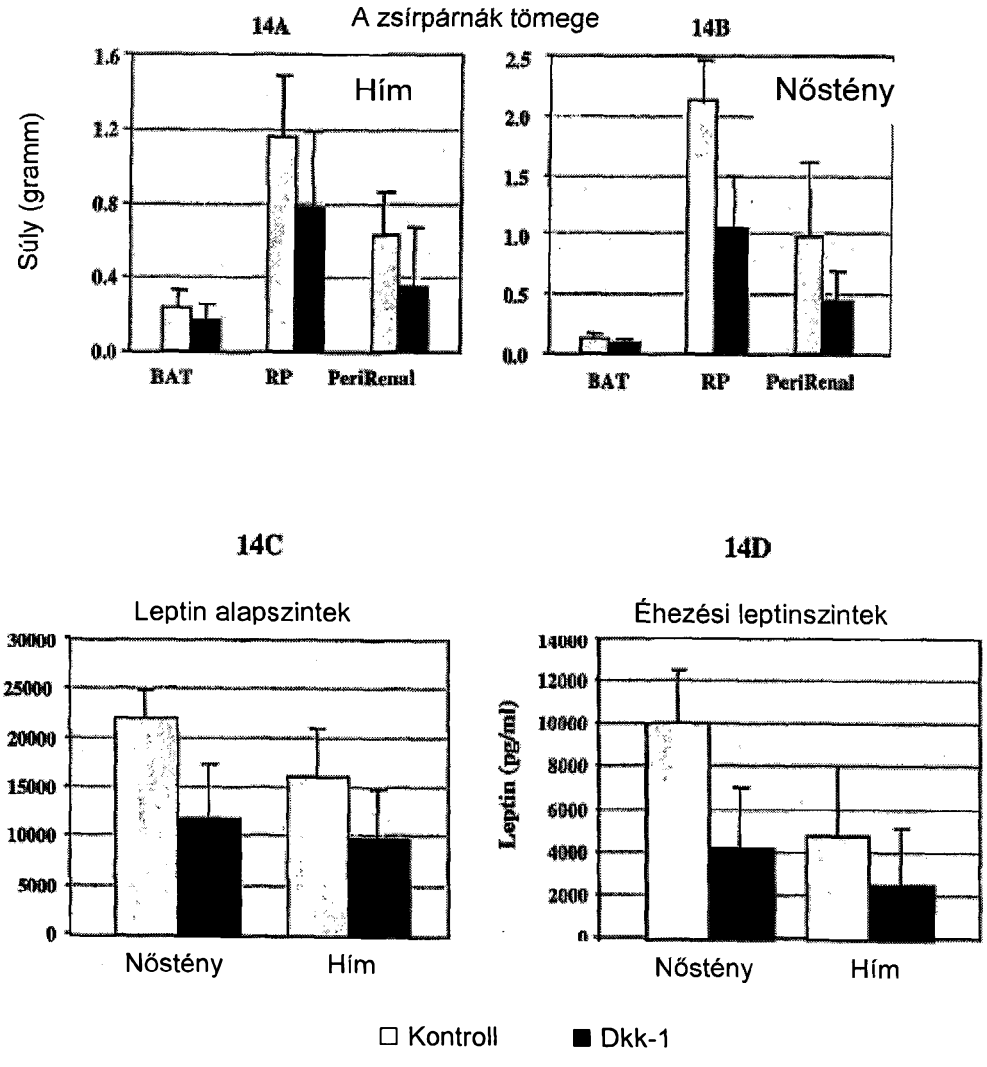
B


Kontroll : n = 4
Dkk-1: n=5
p=0.03
Foszforitált peptid (cpm)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
0 nM inzulin
33 nM inzulin
100 nM inzulin
Kontroll
Dkk-1 (0.2 mg/kg/d)

13. ábra


A
Újszülött/fiatal egerek testsúlya
□ Kontroll ■ Dkk-1 (TG)
Testsúly (gramm)
nőstény hím
3 hét
nőstény hím
6 hét
B
Szokásos tápon tartott, Dkk-1 transzgénikus egerek növekedési görbéi
nőstény (C)
nőstény (TG)
hím (C)
hím (TG)
Testsúlv (aramm)
az állat kora (hetek)

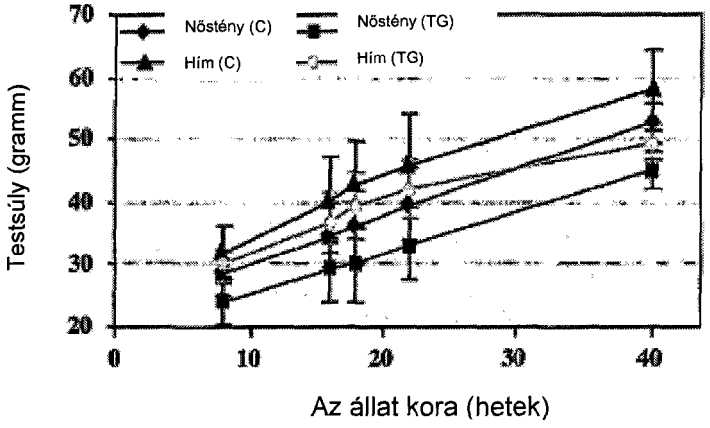
14. ábra


14A
A zsírpárnák tömege
14B
Súly (gramm)
Hím
Nőstény
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BAT
RP
PeriRenal
14C
Leptin alapszintek
14D
Éhezési leptinszintek
Leptin (pg/ml)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
Nőstény
Hím
□ Kontroll
■ Dkk-1

15. ábra

15A

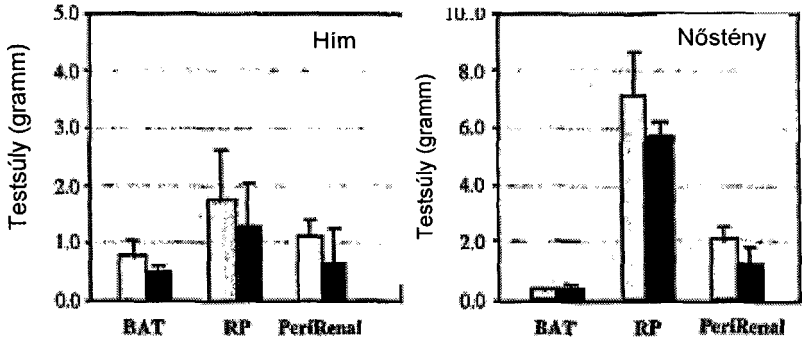
Növekedési görbék



Az állat kora (hetek)

15B **15C**

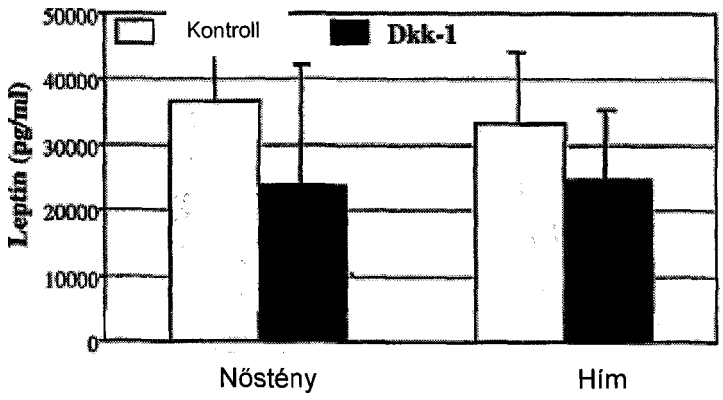
Éheztetési zsírpárna súlya



□ Kontroll ■ Transzgenikus

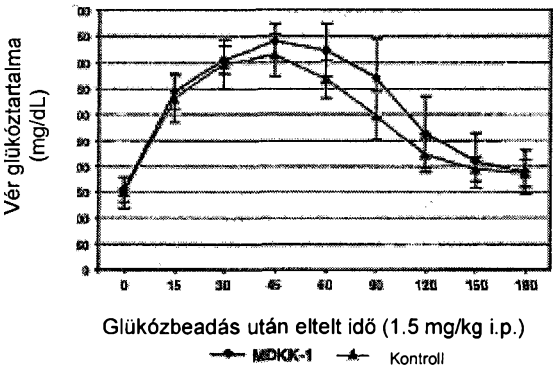
15D

Nem éheztetett egerek leptinszintjei



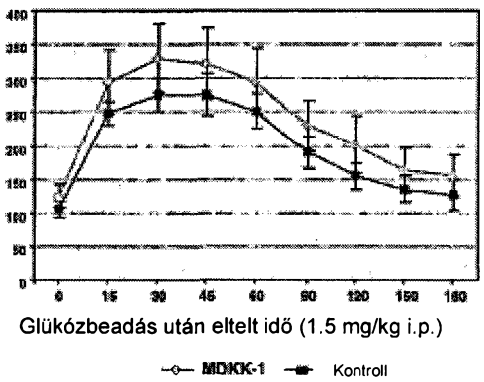
16A

Hímek



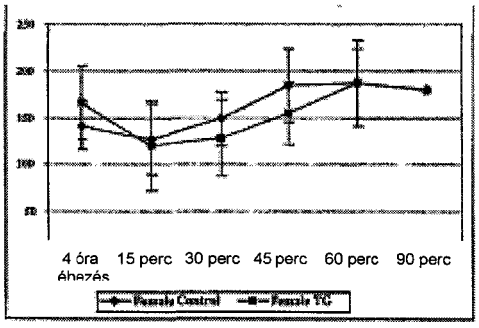
16B

Nőstények



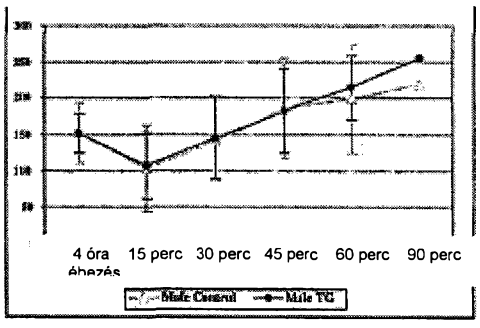
16C

inzulinnal szembeni tolerancia Dkk-1 transzgénikus egerekben



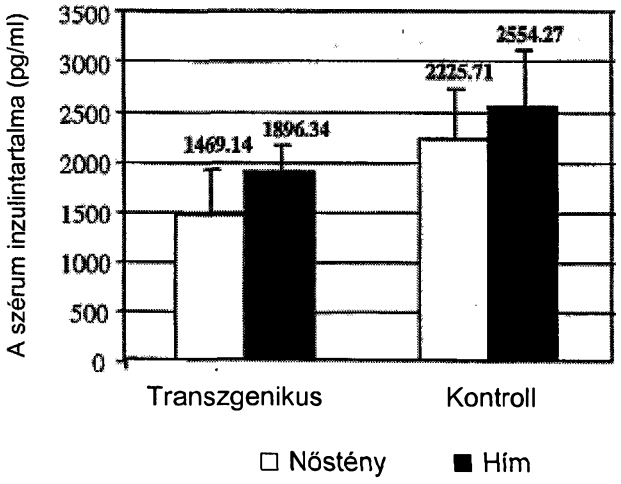
16D

inzulinnal szembeni tolerancia Dkk-1 transzgénikus egerekben



16E

Glükózzal indukált inzulinszintek



A Dkk-1 elleni monoklonális antitest hatása az L6 sejtek Dkk-1 által közvetített glükózfelvételének csökkenésére

