



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **334189**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 5/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 13/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 39/02 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20035231	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2002.05.24 PCT/CA2002/00759
(22)	Inng.dag	2003.11.25	(85)	Videreføringsdag	2003.11.25
(24)	Løpedag	2002.05.24	(30)	Prioritet	2001.05.25, US, 293156
(41)	Alm.tilgj	2004.01.26			
(45)	Meddelt	2014.01.13			
(73)	Innehaver	Nymox Corp, 9900 Cavendish Boulevard, Suite 306, CA-QCH4M2V2 SAINT LAURENT, Canada			
(72)	Oppfinner	Paul A Averbach, 383 Lakeshore Road, CA-QCH9W4J1 BEACONSFIELD, Canada			
(74)	Fullmektig	Plougmann & Vingtoft, Postboks 1003 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Peptider og nukleinsyrer derivert fra neurale trådproteiner, samt anvendelse av disse.
(56)	Anførte publikasjoner	US 5948634 A
(57)	Sammendrag	

Det beskrives fremgangsmåter for å behandle tilstander som krever fjerning eller destruksjon av skadelige eller uønskede celler i en pasient, så som benigne og maligne tumorer, ved anvendelse av peptider avledet fra aminosyresekvensene av neurale trådproteiner og beslektede molekyler.

Bakgrunn for oppfinnelsen

1. Område for oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et peptid, karakterisert ved at det er et neuralt trådprotein (NTP) som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEKV ID NR 10-52, og en nukleinsyre, karakterisert ved at den koder for en aminosyresekvens korresponderende til et sådant peptid.

Oppfinnelsen vedrører videre en sammensetning, karakterisert ved at den omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og minst et peptid som definert ovenfor eller en eller flere nukleinsyrer som definert ovenfor.

Sluttelig vedrører oppfinnelsen anvendelse av et peptid eller en nukleinsyre som definert ovenfor for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av en tilstand som krever fjerning eller destruksjon av celler i et pattedyr.

Ved anvendelsen behandles tilstander som krever fjerning eller ødeleggelse av celleelementer, så som benigne eller maligne tumorer i mennesker. Behandlingen inkluderer, men er ikke begrenset til, administrering av forbindelsene intramuskulært, oralt, intravenøst, intratekalt, intratumoralt, intranasalt, topikalt, transdermalt, etc., enten alene eller sammen med en bærer.

2. Beskrivelse av beslektet teknikk

Mange medisinske behandlinger og prosedyrer involverer fjerning eller ødeleggelse av skadelig eller uønsket vev.

Eksempler på slike viktige behandlingsmetoder inkluderer kirurgisk

fjerning av cancervekster, ødeleggelse av metastatiske tumorer gjennom kjemoterapi, og reduksjonen av glandulær (f.eks. prostata) hyperplasi. Andre eksempler inkluderer fjerningen av uønsket hår, fjerningen av vorter, og fjerningen av uønsket fettvev. Mange av disse behandlinger er enten invasive gjennom komplisert og farlig kirurgi, eller ødelegger annet friskt vev som ikke var målet gjennom ikke-invasive teknikker.

Det er et behov for et effektivt middel som vil ødelegge og enten:

- 1) fremme, uten kirurgi, fjerning av; eller
- 2) inhibere den videre vekst av skadelige eller uønskede celler og vev, men som kun i hovedsak vil ha lokale effekter og minimal eller ingen systemisk toksisitet.

Neurale trådproteiner og deres beslektede molekyler er én klasse av slike midler som beskrives i US-Patentsøknad med Serienummer US 2003/0054990, med tittel "Methods of Treating Tumors and Related Conditions Using Neural Thread Proteins, av 8. mars 2002.

Kreft er en abnormitet i en celledes interne regulatoriske mekanismer som resulterer i ikke-regulert vekst og reproduksjon av cellen. Normale celler utgjør vev, og idet disse celler mister sine evner til å oppføre seg som spesifiserte, regulerte og koordinerte enheter (de-differensiering) vil skaden føre til et disarrangement i cellepopulasjonen. Idet dette forekommer, dannes en tumor.

Benign overvekst av vev er abnormiteter hvor det er ønskelig å fjerne celler fra en organisme. Benigne tumorer er cellulære proliferasjoner som ikke metastatiserer gjennom kroppen, men som imidlertid forårsaker sykdomssymptomer. Slike tumorer kan være letale dersom de er lokalisert i utilgjengelige områder i organer,

så som i hjernen. Benigne tumorer eksisterer i mange andre organer inkluderende lunge, hud, hypofyse, thyroide, adrenal cortex og medulla, eggstokk, livmor, testikkel, bindevev, muskel, tarm, øre, nese, hals, mandler, munn, lever, galleblære, bukspyttkjertel, prostata, hjerte og andre organer.

Kirurgi er ofte det første trinn i behandlingen av cancer. Formålet med kirurgien varierer. Noen ganger anvendes den for å fjerne så mye som mulig av den åpenbare tumor, eller i det minste å «debulke» den (fjerne hovedmengden av tumoren slik at det er mindre behov for å behandle med andre metoder). Avhengig av cancertype og lokalisasjon kan kirurgi også gi noe symptomatisk lindring for pasienten. F.eks. dersom en kirurg kan fjerne en stor del av en ekspanderende hjernetumor, vil trykket på innsiden av hodeskallen bli redusert, noe som fører til forbedring i pasientens symptomer.

Ikke alle tumorer er medgjørilige for kirurgi. Noen kan være lokalisert i deler av kroppen som gjør det umulig å fjerne dem fullstendig. Eksempler på slike vil være tumorer i hjernestammen (en del av hjernen som kontrollerer pusting), eller en tumor som har vokst og rundt et hovedblodkar. I disse tilfeller er funksjonen til kirurgi begrenset pga. den høye risiko assosiert med fjerning av tumor.

I noen tilfeller anvendes kirurgi ikke for å fjerne tumor-masse fordi det ganske enkelt ikke er nødvendig. Et eksempel er Hodgkin's Lymfom, en cancertype i lymfenodene som responderer godt til kombinasjoner av kjemoterapi og bestrålingsterapi. I Hodgkin's Lymfom er kirurgi sjelden nødvendig for å oppnå helbredelse, men anvendes omtrent alltid for å etablere en diagnose.

Kjemoterapi er en annen vanlig form for cancerbehandling. I hovedsak involverer det anvendelsen av medisiner (vanligvis gitt gjennom munn eller injisering) som spesifikt angriper hurtig delende celler (så som de som finnes i en tumor) gjennom kroppen. Dette gjør kjemoterapi til en nyttig behandling av cancer som allerede er metastatisert, og likeledes for tumorer som har en høy sannsynlighet for å spre seg gjennom blodet og lymfesystemet, men som ikke er fremkommet i tillegg til den primære tumor. Kjemoterapi kan også anvendes for å forsterke responsen av lokaliserte tumorer til kirurgi og bestrålingsterapi. Dette er f.eks. tilfellet for noen typer cancere i hodet og nakke.

Dessverre vil andre celler i den menneskelige kropp som normalt deles hurtig (så som ved foringen på mage og hår) også påvirke kjemoterapien. Av denne grunn vil kjemoterapeutiske midler (om ikke alle) indusere kvalme og hårtap. Disse bi-effekter er temporære, og leger har medisineringer som kan tilveiebringe en lindring for mange av disse bi-effekter. Således vil generelt kjemoterapeutiske behandlinger bli godt tolerert av pasienter. Idet vår kunnskap har fortsatt å øke, har forskerne kommet frem til nye kjemoterapeutiske midler som ikke bare er bedre for å drepe cancerceller, men som også har færre bi-effekter for pasienten.

Kjemoterapi administreres til pasienten på en rekke forskjellige måter. Noen er piller som tas daglig eller 1 gang pr. uke, eller i et annet tidsintervall, og noen administreres ved intravenøs injisering. For injiserbar kjemoterapi går en pasient til legens kontor eller sykehus for behandling. Andre kjemoterapeutiske midler krever kontinuerlig infusjon inn i blodstrømmen, 24 t pr. dag. For disse typer kjemoterapi vil en mindre kirurgisk prosedyre utføres for å implantere en liten pumpe som bæres av pasienten. Pumpen administrerer deretter langsomt medisineringen. I mange tilfeller

plasseres en permanent port i pasientens vene for å eliminere behovet for repeterende nålestikk.

Bestrålingsterapi er et annet vanlig våpen i kampen mot kreft. Bestråling dreper cancer ved å ødelegge DNA i tumorcellene. Bestrålingen «appliseres» på 2 forskjellige måter. Den første og mest vanlige involverer peking av en bestrålingsstråle til pasienten på en høyt presis måte, fokusert på tumoren. For å utføre dette ligger pasienten på et bord og strålene beveges rundt ham/henne. Dette tar kun et par minutter, men utføres 5 dager pr. uke i 3-6 uker (avhengig av type tumor), for å oppnå en bestemt total foreskrevet «dosering».

En annen bestrålingsmetode som noen ganger benyttes som kalles «brachy-terapi», involverer at man tar radioaktive pelletter («såkorn») eller vaiere og implanterer disse inn i kroppen i området for tumoren. Disse implantater kan være temporære eller permanente. For permanente implantater vil bestrålingen i såkornene «avta» eller utslukkes over en periode på dager eller uker, slik at pasienten ikke er radioaktiv. For temporære implantater vil den fullstendige dose av bestråling vanligvis avgis i ca. 2 dager, og pasienten må bli på sykehuset i løpet av denne tid. For begge typer «brachy-terapi», vil bestrålingen generelt avleveres til et svært målrettet område for å få lokal kontroll over en cancer (i motsatt fall til behandling av hele kroppen, som i tilfellet kjemoterapi).

Noen utvalgte pasienter kan behandles med benmargstransplantasjon. Denne prosedyre utføres vanligvis enten fordi en pasient har en cancer som er spesielt aggressiv, eller pga. at de har en cancer som har tilbakefall etter å være behandlet med konvensjonell terapi. Benmargstransplantasjon er en komplisert prosedyre. Det er mange typer, og de varierer i sine potensialer for å forårsake bieffekter og helbredelse. Mange transplantasjoner utføres ved spesielle sentre, og i mange tilfeller vurderes deres anvendelse

som forskningsmessig.

Ytterligere terapier eksisterer, selv om de fleste av disse for tiden utforskes i kliniske forsøk og er ikke blitt standardbehandling. Eksempler inkluderer anvendelse av immunoterapi, monoklonale antistoff, antiangio-genetiske faktorer, og genterapi.

Immunoterapi: Forskjellige teknikker er blitt konstruert for å hjelpe pasientens eget immunsystem til å bekjempe mot cancer, noe som er ganske forskjellig fra bestråling eller kjemoterapi. For å oppnå et mål, injiserer forskerne ofte til pasienten en spesifikk avledet vaksine. Det meste forskningsarbeid innen dette området er blitt utført på melanom, selv om andre cancertyper også er blitt undersøkt.

Monoklonale antistoff: Dette er små proteiner som er spesielt konstruert for å angripe cancerceller (og ikke normale celler) ved å dra fordel av forskjellene mellom cancer- og ikke-cancerceller i deres cellemembraner. Før administrering av antistoffene til pasienten, «tagges» (merkes) de til forskjellige cytotoksiske forbindelser eller de gjøres radioaktive, slik at antistoffet fortrinns-vis går mot de canceraktige cellene, og dermed avgir de toksiske midler til de ønskede celler.

Anti-angiogenesefaktorer: Idet cancerceller hurtig deles når tumoren vokser, kan de fort vokse ut av deres blodforsyning. For å kompensere for dette utskiller tumorene en forbindelse som er blitt vist å hjelpe og indusere vekst av blodkar i deres nærhet, noe som sikrer at cancer-cellene får en kontinuerlig forsyning av næringsstoffer. I det siste har forskere studert måter å unngå dette på ved å stoppe vekst av blodkar og/eller ved å hindre ytterligere blod fra å nå cancercellene.

Genterapi: Cancer er et produkt av en serie mutasjoner som til slutt fører til produksjonen av en cancercelle og dens utstrakte proliferasjon. Cancere kan behandles ved å introdusere gener til cancerceller som enten vil virke for å kontrollere eller stoppe cancerens proliferasjon, slå på cellens programmerte cellemekanisme for å ødelegge cellen, forsterke immungjenkjennelsen av cellen, eller uttrykke et pro-medikament som omdannes til en toksisk metabolitt eller et cytokin som inhiberer tumorvekst.

Benigne tumorer og feilformasjoner kan også behandles med en rekke metoder inkluderende kirurgi, radioterapi, medikament-terapi, termale- eller elektriske ablasjoner, kryoterapi og andre. Selv om benigne tumorer ikke metastatiserer kan de vokse seg store, og de kan fremkomme på nytt. Kirurgisk ekstirpasjon av benigne tumorer har vanskeligheter og bieffekter med kirurgi generelt, og må mange ganger repeteres for noen benigne tumorer, så som for adenomaer i hypofyse, meningeomaer i hjerne, prostata-tisk hyperplasi, og andre.

Andre tilstander involverer uønskede cellulære elementer hvor selektiv cellulær fjerning er ønskelig å inkludere, f.eks. hjertesykdommer og slag. Disse tilstander forårsakes typisk av aterosklerose, en proliferativ skade i fibrofett og modifiserte glatte muskelelementer som ødelegger blodkarveggen, innsmalner lumen, hemmer blodstrømmen, predisponerer for fokale blod-klotter, og til slutt fører til blokkering og infarkt. Behandlinger for arteriosklerose inkluderer bypass-transplantanter; artifisielle transplantater, angioplasti med rekanalisering, kyrretasje, bestråling, laser eller annen fjerning; farmakoterapi for å inhibere arterioskleriose gjennom lipidreduksjon; anti-klottingsterapier; og generelle forholdsregler med hensyn til diett, mosjon og livsstil. En metode for å fjerne aterosklerose-skader uten risiko og bieffekter forbundet med kirurgiske prosedyrer

er nødvendig.

Andre eksempler på uønskede cellulære elementer hvor selektiv cellulær fjerning er ønskelig, inkluderer virusindusert vekst, så som vorter. Et eksempel er hypertropisk-inflammatoriske masser som finnes under betennelsestilstander, og hypertropiske arr eller keloider. Ytterligere eksempler finnes i en kosmetisk sammenheng så som fjerning av uønsket hår, f.eks. ansiktshår, eller for krymping av uønskede vevsarealer for kosmetiske formål, så som ansiktsdermis og bindevev, eller i dermis og bindevev i ekstremitetene.

Ytterligere eksempler vil være åpenbare for fagkyndige innen feltet. I alle, eller i de fleste av disse eksempler er det et behov for behandling som kan fjerne eller ødelegge cellulære elementer uten risiko og bieffekter forbundet med konvensjonelle terapier. Det er også et behov for å fjerne de ønskede cellulære elementer med en større nøyaktighet.

Neurale trådproteiner (NTP) er en familie av nylig karakteriserte proteiner fra hjerne. Ett medlem av denne familie, AD7C-NTP, er at ca. 41kD membran-assosiert fosforprotein med funksjoner assosiert med neuritisk spiring (de la Monte et al., *J.Clin.Invest.*, vol 100, pp 3093-3104 (1997); de la Monte et al., *Alz., Rep.*, vol 2, pp 327-332 (1999); S.M. de la Monte og J.R. Wands, *Journal of Alzheimer's Disease*; vol 3, pp 345-353 (2001)). Genet som koder for AD7C-NTP og predikert proteinsekvens for AD7C-NTP er blitt identifisert og beskrevet (de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, vol 100, pp 3093-3104 (1997)). I tillegg til de ca. 41kD-formene er andre former av neurale trådproteiner (ca. 26kD, ca. 21kD, ca. 17kD, og ca. 15 kD) blitt identifisert og assosiert med neuroektodermale tumorer, astrocytomaer og glio-blastomaer og med skadet pga. hypoksi, schema, eller celebralt infarkt (Xu et al.,

Cancer Research, vol 53, pp 3823-3829 (1993), de la Monte et al., *J. Neurolpathol. Exp. Neurol.*, vol 55(10), pp 1038-50 (1996), de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, vol 138(1-2), pp 26-35 (1996); de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, vol 135(2), pp 118-25(1996); de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, vol 100, pp 3093-3104 (1997); og de la Monte et al., *Alz., Rep.*, vol 2, pp 327-332(1999).

Former av neurale trådproteiner er blitt beskrevet og er gjort krav på i US-Patent Nr. 5.948.634, 5.948.888 og 5.830.670, alle for «Neural trådprotein gen-ekspressjon og deteksjon av Alzheimer's Sykdom» og i US-Patent Nr. 6.071.705 for «Fremgangsmåte for å detektere neurologisk sykdom eller dysfunksjon». Som beskrevet deri blir NTP opp-regulert og produsert under celledød. Således beskrives døde og døende nerveceller som overproduserende av NTP, og således vil deres nærvær indikere død av nerveceller og start av Alzheimer's Sykdom (AD).

Andre former for neurale trådproteiner er blitt identifisert som andre produkter av AD7C-NTP-genet (f.eks. 112-aminosyre-protein beskrevet i NCBI Entrez-proteindatabase-katalog #XP_032307 PID g15928971) eller å være tilsvarende til neurale trådproteiner (f.eks. 106-aminosyreprotein), beskrevet i NCBI Entrez-proteindatabasekatalog #AAH14951 PID g 15928971, et annet 106-aminosyreprotein, beskrevet i NCBI Entrez-proteindatabase-katalog #XP_039102 PID g818599339 og et 61 aminosyreprotein beskrevet i NCBI Entrez-proteindatabase-katalog #AAH02534 PID g12803421.

Neurale trådproteiner som er assosiert med AD og NTP oppreguleres i forbindelse med celledød i AD. AD7C-NTP mRNA oppreguleres i AD-hjerne sammenlignet med kontroller; AD7C-NTP-protein-nivåer i hjerne og i CSF er høyere i AD enn kontroller; og AD7C-NTP-immunoreaktivitet finnes i senile plaque, i neurofibrillære

tangiler (NFT); i degenererende neuroner, neurofile tråder og dystropisk neurotiske spirer i AD og Down's Syndrom-hjerner (Ozturk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 86, pp 419-423 (1989); de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, vol 86(3) pp 1004-13 (1990); de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, vol 113(2), pp 152-64 (1992); de la Monte et al., *Ann. Neurol.*, vol 32(6) pp 733-42(1992); de la Monte et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol 55(10) pp 1038-50 (1996), de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, vol 138 (1-2) pp 26-35 (1996); de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, vol 100, pp3093-3104 (1997); og de la Monte et al., *Alz. Rep.*, vol 2, pp 327-332 (1999)). NTP er lokalisert inne i celler, med fine prosesser innen neuropilen, eller er ekstracellulær både i AD og Down's Syndrom-hjerner. de la Monte et al., *Ann. Neurol.*, 32(6):733-42 (1992).

Eleverte nivåer av AD7C-NTP-protein er blitt funnet både i CSF og urin i AD-pasienter (de la Monte og Wands, *Front Biosci.* vol 7, pp 989-96(2002); de la Monte og Wands, *Journal of Alzheimer's Disease*, vol 3, pp 345-353(2001); Munzar et al., *Alzheimer's Reports* vol 4, pp 61-65(2001); Kahle et al., *Neurology*, vol 54, pp 1498-1504(2000) og Averbach *Neurology* vol 55, p 1068(2000); Munzar et al., *Alzheimer's Reports* vol 3, pp 155-159(2000); de la Monte et al., *Alzheimer's Reports* vol 2, pp 327-332 (1999); Ghanbari et al., *J.Clin.Lab.Anal.* vol 12, pp 285-288 (1998); Ghanbari et al., *J.Clin.Lab.Anal.*, vol 12, pp 223-226 (1998); Ghanbari et al., *Journal of Contemporary Neurology* (1998), vol 4A, pp 2-6, og de la Monte et al., *J. Clin. Invest.*, vol 100, pp 3093-3104 (1997).

Overuttrykking av NTP er også blitt koblet til prosessen med celledød i Alzheimer's Sykdom (de la Monte og Wands, *J. Neuropatho.*, og *Exp. Neuro.*, vol 60, pp195-207 (2001); de la Monte og Wands, *Cell Mol. Life Sci.*, vol 58, pp 844-49 (2001). AD7C-NTP

er også blitt identifisert i Down's Syndrom-hjernevev (Wands et al., Internasjonal Patentpublikasjon Nr W090/06993; de la Monte et al., *J. Neurol. Sci.*, vol 135, pp 118-25(1996); de la Monte et al., *Alz.Rep.*, vol 2, pp 327-332 (1999)). Noen bevis tyder på at overuttrykking av NTP også kan være assosiert med normal tensjonsglaukoma (Golubnitschaja-Labudova et al., *Curr. Eye Res.*, vol 21, pp 867-76 (2000)).

NTP er vist å være et effektivt middel for å forårsake celledød både *in vitro* i glioma og neuroblastomcellekulturer og *in vivo* i normale muskelvev fra gnager, subkutenøst bindevev og dermis, og i en rekke forskjellige tumorer av human- eller ikke-human opprinnelse, inkluderende brystkarsinom, hudkarsinom og papilloma, tarmkarsinom, hjerneogliom, og andre i gnager-modeller. Se US-Patentsøknad med nr. US 2003/0054990, *Methods of Treating Tumors and Related Conditions Using Neural Thread Proteins*.

Sammendrag av oppfinnelsen

Det er fremdeles et behov innen fagfeltet for nye mindre toksiske behandlinger for å behandle uønskede cellulære elementer. Foreliggende oppfinnelse vedrører den overraskende oppdagelse at peptider som inneholder aminosyresekvenser korresponderende til deler av aminosyresekvensen i neurale trådproteiner kan fungere som slike midler.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et peptid, karakterisert ved at det er et neuralt trådprotein (NTP) som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEKV ID NR 10-52, og en nukleinsyre, karakterisert ved at den koder for en aminosyresekvens korresponderende til et sådant peptid.

Oppfinnelsen muliggjør fremgangsmåter for å behandle uønskede cellulære proliferasjoner, så som benigne og maligne tumorer, glandulære (f.eks. prostata) hyperplasi, uønsket hårvekst, vorter og uønsket fettvev. En slik metode omfatter administrering til et pattedyr i behov av en slik behandling, en terapeutisk effektiv mengde av et peptid omfattende aminosyresekvensene korresponderende til deler av aminosyresekvensen av neuralt trådprotein (NTP).

Et slikt peptid («NTP-peptid») kan administreres alene eller konjugert til en bærer eller et antistoff. NTP-peptidet kan administreres intramuskulært, oralt, intravenøst, intraperitonealt, intracerebralt (intraparenkymalt), intracerebroventrikulært, intratumoralt, intralesjonalt, intradermalt, intratekalt, intranasalt, intraokulært, intraarterielt, topikalt, transdermalt, via en aerosol, infusjon, bolusinjisering, implanteringsanordning, frigivelsessystem for forlenget frigivelse etc., enten alene eller konjugert til en bærer. Alternativt kan NTP-peptidet uttrykkes *in vivo* ved å administrere et gen som uttrykker peptidet, ved å administrere en vaksine som induserer slik produksjon, eller ved å introdusere celler, bakterier eller virus som uttrykker peptidet *in vivo*, enten pga. genetisk modifisering eller på annen måte.

I tillegg kan NTP-peptidet anvendes i konjunksjon med andre terapier for behandling av benigne og maligne tumorer og andre uønskede eller skadelige cellulære vekster.

Både den foregående generelle beskrivelse og den påfølgende detaljerte beskrivelse er eksemplifisert og tiltenkt å tilveiebringe ytterligere forklaring på oppfinnelsen slik den er gjort krav på. Andre formål, fordeler og nye trekk vil være åpenbare for fagkyndige innen feltet ut fra den påfølgende detaljerte beskrivelse av oppfinnelsen.

Kort beskrivelse av figurene

Fig. 1: Viser den fullstendige aminosyresekvens og nukleinsyresekvens av AD7C-NTP-genet og AD7C-NTP-proteinproduktet av genet (sekvenser 120 og 121 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888; de la Monte *et al.*, *J. Clin. Invest.*, vol 100 pp 3093-3104 (1997); NCBI Entrez-proteindatabasekatalog #AAC08737; PID g3002527 [SEKV ID NR 1].

Fig. 2: Viser den fullstendige aminosyresekvens av det 122-aminosyre-neurale trådprotein (Sekvens 40 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888; NCBI Entrez-protein-databasekatalog #AAE25447 PID g10048540 [SEKV ID NR 2].

Fig. 3: Viser den fullstendige aminosyresekvens av det 112-aminosyre-neurale trådprotein (NCBI Entrez-protein Databasekatalog #XP 032307 PID g15928971 [SEKV ID NR 3].

Fig. 4: Viser fullstendige aminosyresekvenser av et 106-aminosyre-neuralt trådprotein-lignende protein (NCBI Entrez-proteindatabasekatalog #AAH14951 PID g15928971 [SEKV ID NR 4].

Fig. 5: Viser fullstendige aminosyresekvenser av et 106-aminosyre-neuralt tradprotein-lignende protein (NCBI Entrez-proteindatabasekatalog #XP 039102 PID g18599339 [SEKV ID NR 5].

Fig. 6: Viser de fullstendige aminosyresekvenser av det 98-aminosyre-neurale trådprotein (Sekvens 30 fra US--Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888; (NCBI Entrez-Proteindatabasekatalog #AAE25445, PID g10048538 [SEKV ID NR 6].

Fig. 7: Viser fullstendige aminosyresekvenser for det 75-

aminosyre-neurale trådprotein (Sekvens 48 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888; (NCBI Entrez-protein-databasekatalog #AAE25448, PID g10048541 [SEKV ID NR 7]).

Fig. 8: Viser den fullstendige aminosyresekvens for det 68-aminosyre-neurale trådprotein (Sekvens 36 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.830.670, 5.948.634 og og 5.948.888; (NCBI Entrez-proteindatabasekatalog #AAE25446, PID 810048539 [SEKV ID NR 8]).

Fig. 9: Viser fullstendige aminosyresekvenser for det 61-aminosyre-neurale trådproteinlignende protein (NCBI Entrez-proteindata-basekatalog #AAH02534, PID 812803421 [SEKV ID NR 9]).

Detaljert beskrivelse av foretrukne utførelser

Termen «AD7C-NTP» benevner det tilnærmede 41 dD-proteinet og nukleinsyresekvensen som koder for det beskrevet i de la Monte et al., *J.Clin.Invest.*, vol 100, pp 3093-104 (1997) i Sekvenser 120 og 121 i US-Patentsøknaderne med nr. 5.948.634, 5.948.888 og 5.830.670 og i GenBank #AF010144, hvis nukleinsyre- og aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 1. Termen «AD7C-NTP» inkluderer også biologisk aktive fragmenter, varianter, derivater, homologer og etterligninger av AD7C-NTP.

Termen «NTP» eller «neuralt trådprotein» angir neurale trådproteiner og beslektede molekyler (inkluderende pankreatisk trådprotein) og nukleinsyresekvensene som koder for disse proteiner, og inkluderende (men ikke begrenset til) de følgende proteiner og nukleinsyresekvensene som koder for aminosyre-sekvensene for disse proteiner:

(a) AD7C-NTP;

- (b) de ca. 42, ca. 26, ca. 21, ca. 17, og ca. 8kDformene av det neurale trådprotein beskrevet i US-Patent Nr 5.948.888, 5.830.670 og 6.071.705 og i de la Monte et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol 55(10), pp 1038-50 (1996), de la Monte et al., *J.Neurol.Sci.*, vol 138(1-2), vol 26-35 (1996); de la Monte et al., *J.Neurol.Sci.*, vol 135(2), pp 118-25 (1996), de la Monte et al., *J.Clin.Invest.*, vol 100, pp3093-3104 (1997) og de la Monte et al., *Alz., Rep.*, vol 2, pp 327-332 (1999);
- (c) proteiner spesifikt gjenkjent av monoklonalt antistoff nr 2, deponert ved The American Type Culture Collection, Manassas, Va., under katalog nr. HB-12546 eller monoklonalt antistoff nr 5 deponert ved The American Type Culture Collection, Manassas, Va., under katalognr. HP-12545;
- (d) proteiner kodet for av AD7C-NTP-genet;
- (e) det 122-aminosyre-neurale trådprotein beskrevet i Sekvens 40 fra US-Patent Nr. 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888 og angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAE25447, PID g10048540, hvis amino-syresekvenser er illustrert i Fig. 2;
- (f) det 112-aminosyre-neurale trådprotein angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #XP 032307, PID g14725132, hvis aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 3;
- (g) et 106-aminosyre-neurale trådproteinlignende protein angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAH14951 PID g15928971, hvis aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 4;
- (h) et 106-aminosyre-neurale trådproteinlignende protein angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #XP_039102 PID

g18599339, hvis aminosyresekvens er illustrert i Fig. 5;

- (i) det 98-aminosyre-neurale trådprotein protein angitt i Sekvens 30 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888 og angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAE25445, PID g100448538, hvis aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 6;
- (j) det 75-aminosyre-neurale trådprotein beskrevet i Sekvens 48 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888 og angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAE25448, PID g100448541, hvis aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 7;
- (k) det 68-aminosyre-neurale trådprotein beskrevet i Sekvens 36 fra US-Patent Nr 5.830.670, 5.948.634 og 5.948.888 og angitt i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAE25446, PID g10048539, hvis aminosyresekvenser er illustrert i Fig. 8;
- (l) det 61-aminosyre-neurale trådproteinlignende protein beskrevet i NCBI Entrez-proteinkatalog #AAH02534, PID g12803421, hvis aminosyre-sekvenser er illustrert i Fig. 9;
- (m) pankreatisk trådprotein;
- (n) det neurale pankreatiske trådprotein (nPTP) beskrevet i US-Patent Nr 6.071.705; og
- (o) proteiner spesifikt gjenkjent av antistoffer produsert av et hybridom fra gruppen som består av HB9934, HB9935 og HB9936 deponert ved American Type Culture Collection.

Termen «biologisk aktiv» angir et protein, polypeptid, fragment, variant, derivat, homolog eller peptidetter-ligning

som har evnen til å ødelegge, og dermed enten fremme fjerning av- eller inhibere ytterligere vekst av skadelige eller uønskede celler og vev og inkluderer, (men er ikke begrenset til) evnen til å drepe, eller nedsette levedyktigheten av celler i cellekulturcytotoksisitets-analyse ifølge Eks. 1 heri, evnen til å forårsake celletap og/eller vevsnekrose i *in vivo*-vevsanalysen i Eks. 2 heri, eller evnen til å forårsake celletap, vevsnekrose eller tumorkrymping i tumoranalysen i Eks. 3 heri.

Aminosyrer og aminosyre-enheter beskrevet heri kan refereres til i samsvar med den aksepterte 1- eller 3 bokstavskoden gitt i tabellen nedenfor.

Tabell 1

Aminosyre	1-bogstavsymbol	2-bogstavsymbol
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsyre	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsyre	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu

Lysin	K	Lys
Metionin	M	Met
Fenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Treonin	T	Thr
Tryptofan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Termen «NTP-peptid» angir de følgende aminosyresekvenser av NTP:

NTP peptid nr 1 [SEKV ID NR 10], AD7C-NTP p1-15

MEFSLLLPRLECNGA

Met-Glu-Phe-Ser-Leu-Leu-Leu-Pro-Arg-Leu-Glu-Cys-Asn-Gly-Ala

NTP peptid nr 2 [SEKV ID NR 11], AD7C-NTP p14-28 GAISAHNRNLRPLPGSS

Gly-Ala-Ile-Ser-Ala-His-Arg-Asn-Leu-Arg-Leu-Pro-Gly Ser-Ser

NTP peptid nr 3 [SEKV ID NR 12], AD7C-NTP p29-45

DSPASASPVAGITGMCT

Asp-Ser-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Pro-Val-Ala-Gly-Ile-ThrGly-Met-Cys-Thr

NTP peptid nr 4 [SEKV ID NR 13], AD7C-NTP p43-58 MCTHARLILYFFLVEM

Met-Cys-Thr-His-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Tyr-Phe-Phe-LeuVal-Glu-Met

NTP peptid nr 5 [SEKV ID NR 14], AD7C-NTP p52-62 YFFLVEMEFLH

Tyr-Phe-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Glu-Phe-Leu-His

NTP peptid nr 6 [SEKV ID NR 15], AD7C-NTP p63-73

VGQAGLELPTS

Val-Gly-Gln-Ala-Gly-Leu-Glu-Leu-Pro-Thr-Ser

NTP peptid nr 7 [SEKV ID NR 16], AD7C-NTP p74-90

DDPSVSASQSARYRTGH

Asp-Asp-Pro-Ser-Val-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Arg-TyrArg-Thr-Gly-His

NTP peptid nr 8 [SEKV ID NR 17], AD7C-NTP p88-101

TGHHARLCLANFCG

Thr-Gly-His-His-Ala-Arg-Leu-Cys-Leu-Ala-Asn-Phe-CysGly

NTP peptid nr 9 [SEKV ID NR 18], AD7C-NTP p97-113

ANFCGRNRVSLMCPSWS

Ala-Asn-Phe-Cys-Gly-Arg-Asn-Arg-Val-Ser-Leu-Met-CysPro-Ser-Trp-Ser

NTP peptid nr 10 [SEKV ID NR 19], AD7C-NTP p114-132

PELKQSTCLSLPKCWDYRR

Pro-Glu-Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-LysCys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 11 [SEKV ID NR 20], AD7C-NTP p116-132

LKQSTCLSLPKCWDYRR

Leu-Lys-Gln-Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-TrpAsp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 12 [SEKV ID NR 21], AD7C-NTP p119-132 STCLSLPKCWDYRR

Ser-Thr-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 13 [SEKV ID NR 22], AD7C-NTP p122-132 LSLPKCWDYRR

Leu-Ser-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 14 [SEKV ID NR 23], AD7C-NTP p126-138

KCWDYRRAAVPGL

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu

NTP peptid nr 15 [SEKV ID NR 24], AD7C-NTP p126-144

KCWDYRRAAVPGLFILFFL

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-LeuPhe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu

NTP peptid nr 16 [SEKV ID NR 25], AD7C-NTP p126-149

KCWDYRRAAVPGLFILFFLRHRC

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-LeuPhe-Ile-Leu-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro

NTP peptid nr 17 [SEKV ID NR 26], AD7C-NTP p126-163

KCWDYRRAAVPGLFILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

Lys-Cys-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Ala-Ala-Val-Pro-Gly-Leu-Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

NTP peptid nr 18 [SEKV ID NR 27], AD7C-NTP p128-132, p241-245

WDYRR

Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 19 [SEKV ID NR 28], AD7C-NTP p139-151 FILFFLRHRCPTL

Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu

NTP peptid nr 20 [SEKV ID NR 29], AD7C-NTP p139-163

FILFFLRHRCPTLTQDEVQWCDHSS

Phe-Ile-Leu-Phe-Phe-Leu-Arg-His-Arg-Cys-Pro-Thr-LeuThr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-Ser

NTP peptid nr 21 [SEKV ID NR 30], AD7C-NTP p146-174

HRCPTLTQDEVQWCDHSSLQPSTPEIKHP

His-Arg-Cys-Pro-Thr-Leu-Thr-Gln-Asp-Glu-Val-Gln-Trp-Cys-Asp-His-Ser-

Ser-Leu-Gln-Pro-Ser-Thr-Pro-Glu-Ile-Lys-His-Pro

NTP peptid nr 22 [SEKV ID NR 31], AD7C-NTP p175-188 PASASQVAGTKDMH
Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Val-Ala-Gly-Thr-Lys-Asp-Met-His

NTP peptid nr 23 [SEKV ID NR 32], AD7C-NTP p186-203
DMHHYTWLIFIFIFNFLR
Asp-Met-His-His-tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-
Leu-Arg

NTP peptid nr 24 [SEKV ID NR 33], AD7C-NTP p189-207
HYTWLIFIFIFNFLRQSLN
His-Tyr-Thr-Trp-Leu-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Asn-Phe-Leu-Arg-Gln-
Ser-Leu-Asn

NTP peptid nr 25 [SEKV ID NR 34], AD7C-NTP p208-252
SVTQAGVQWRNLGSLQPLPPGFKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF
Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Arg-Asn-Leu-Gly-
Ser-Leu-Gln-Pro-Leu-Pro-Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-
Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe

NTP peptid nr 26 [SEKV ID NR 35], AD7C-NTP p227-245
PGFKLFSCPSLLSSWDYRR
Pro-Gly-Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-SerSer-Trp-Asp-Tyr-
Arg-Arg

NTP peptid nr 27 [SEKV ID NR 36], AD7C-NTP p229-252
FKLFSCPSLLSSWDYRRPPRLANF
Phe-Lys-Leu-Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-
Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-Asn-Phe

NTP peptid nr 28 [SEKV ID NR 37], AD7C-NTP p232-245
FSCPSLLSSWDYRR

Phe-Ser-Cys-Pro-Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 29 [SEKV ID NR 38], AD7C-NTP p236-245

SLLSSWDYRR

Ser-Leu-Leu-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 30 [SEKV ID NR 39], AD7C-NTP p239-243,
p339-343

SSWDY

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr

NTP peptid nr 31 [SEKV ID NR 40], AD7C-NTP p239-245

SSWDYRR

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg

NTP peptid nr 32 [SEKV ID NR 41], AD7C-NTP p239-263

SSWDYRRPPRLANFFVFLVEMGFTM

Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Arg-Arg-Pro-Pro-Arg-Leu-Ala-AsnPhe-Phe-Val-Phe-
Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

NTP peptid nr 33 [SEKV ID NR 42], AD7C-NTP p253-263 FVFLVEMGFTM

Phe-Val-Phe-Leu-Val-Glu-Met-Gly-Phe-Thr-Met

NTP peptid nr 34 [SEKV ID NR 43], AD7C-NTP p259-281

MGFTMFARLILISGPCDLPASAS

Met-Gly-Phe-Thr-Met-Phe-Ala-Arg-Leu-Ile-Leu-Ile-Ser-
Gly-Pro-Cys-Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser

NTP peptid nr 35 [SEKV ID NR 44], AD7C-NTP p270-274

ISGPC

Ile-Ser-Gly-Pro-Cys

NTP peptid nr 36 [SEKV ID NR 45], AD7C-NTP p275-291

DLPASASQSAGITGVSH

Asp-Leu-Pro-Ala-Ser-Ala-Ser-Gln-Ser-Ala-Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His

NTP peptid nr 37 [SEKV ID NR 46], AD7C-NTP p288-304 GVSHHARLIFNFCLFEM
Gly-Val-Ser-His-His-Arg-Leu-Ile-Phe-Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met

NTP peptid nr 38 [SEKV ID NR 47], AD7C-NTP p298-307
NFCLFEMESH

Asn-Phe-Cys-Leu-Phe-Glu-Met-Glu-Ser-His

NTP peptid nr 39 [SEKV ID NR 48], AD7C-NTP p308-353
SVTQAGVQWPNLGSLQPLPPGLKRFSCLSLPSSWDYGHLPHPANF
Ser-Val-Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Pro-Asn-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-Pro-
Leu-Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-
Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe

NTP peptid nr 40 [SEKV ID NR 49], AD7C-NTP p326-344
PPGLKRFSCLSLPSSWDYG
Pro-Pro-Gly-Leu-Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-
Asp-Tyr-Gly

NTP peptid nr 41 [SEKV ID NR 50], AD7C-NTP p332-345 FSCLSLPSSWDYGH
Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His

NTP peptid nr 42 [SEKV ID NR 51], AD7C-NTP p335-343
LSLPSSWDY
Leu-Ser-Leu-Pro-Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly

NTP peptid nr 43 [SEKV ID NR 52], AD7C-NTP p339-375
SSWDYGHLPHPANFCIFIRGGVSPYLSGWSQTPDLR
Ser-Ser-Trp-Asp-Tyr-Gly-His-Leu-Pro-Pro-His-Pro-Ala-Asn-Phe-Cys-

Ile-Phe-Ile-Arg-Gly-Gly-Val-Ser-Pro-Tyr-Leu-Ser-Gly-Trp-Ser-Gln-Thr-Pro-Asp-Leu-Arg.

XXXX

Et NTP-peptid kan fremstilles i samsvar med kjente rekombinante DNA-teknologimetoder så som de som er angitt i Sambrook et al., (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1989] og/eller Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons, N.Y. [1994]).

Et gen eller cDNA som koder for et NTP-peptid kan f.eks. oppnås ved screening av et genomisk eller -cDNA-bibliotek, eller ved PCR-mangfoldiggjøring. Prober eller primere som er nyttige for screening av biblioteket kan genereres basert på sekvensinformasjon fra andre kjente gener eller genfragmenter fra det samme eller beslektet familie av gener, så som f.eks. konserverte motiver som finnes i andre NTP-proteiner. I tillegg, der hvor et gen som koder for et er blitt identifisert fra én art, kan alle eller en del av dette genet anvendes som en probe for å identifisere homologe gener fra andre arter. Probene eller primerne kan anvendes for å screene cDNA-biblioteker fra forskjellige vevskilder antatt å uttrykke et NTP-gen. Typisk vil betingelser med høy stringens benyttes for å screen'e for å minimere antallet av falske positiver oppnådd fra screen'et.

En annen måte å fremstille et gen som koder for et NTP-peptid er å benytte kjemisk syntese ved anvendelse av metoder som er godt kjent for fagkyndige, så som de som er beskrevet av Engels et al. (*Angew.Chem.Intl.Ed.*, vol 28, pp 716-734 [1989]). Disse metoder inkluderer, *inter alia*, fosfotriester, fosforamiditt, H-fosfonatmetoder for nukleinsyresyntese. En foretrukket metode for slik kjemisk syntese er polymerstettet syntese ved anvendelse av

standard fosforamidittkjemi. Typisk vil DNA som koder for et NTP-peptid være flere 100 nukleotider langt. Nukleinsyrer større enn ca. 100 nukleotider kan syntetiseres som flere fragmenter ved anvendelse av disse metoder. Fragmentene kan deretter liggeres sammen for å danne full-lengde NTP-peptidet. Vanligvis vil DNA-fragmentet som koder for amino-terminus av proteinet ha en ATG, som koder for en metioninenhet. Denne metionon kan, eller kan ikke, foreligge på den modne form av NTP-proteinet eller NTP-peptidet, avhengig av om proteinet produsert i vertcellen er konstruert til å kunne utskilles fra cellen.

Genet, cDNA, eller fragment derav som koder for NTP-proteinet eller NTP-peptidet kan innsettes i en egnet ekspresjons- eller mangfoldiggjøringsvektor ved anvendelse av standard ligeringsteknikker. Vektoren velges typisk til å være funksjonell i den bestemte vertcelle som benyttes, (dvs. vektoren er kompatibel med vertcellemaskineriet slik at mangfoldiggjøring av genet og/eller ekspresjon av genet kan forekomme). Genet, cDNA eller fragment derav som koder for NTP-proteinet eller NTP-peptidet kan mangfoldiggjøres/uttrykkes i prokaryoter, gjær, insekt (baculovirussystemer) og/eller eukaryote vertceller. Seleksjon av vertcellen vil avhenge delvis av om NTP-proteinet eller peptidet skal glykosileres og/eller fosforyleres. Dersom dette er tilfellet vil gjær, insekt eller mammalske vertceller være foretrukket.

Typisk vil vektorene anvendt i noen av vertcellene inneholde minst en 5'-flankeringssekvens (også angitt som en «promotor») og andre regulatoriske elementer og likeledes forsterkere, et replikasjonsorigo-element, et transkripsjonsterminerings-element, en komplett intronsekvens inneholdende en donor og et akseptorspleisesete, en signalpeptidsekvens, et ribosombindende sete-element, en polyadenyleringssekvens, en polylinkerregion for

innsetting av nukleinsyren som koder for polypeptidet som skal uttrykkes, og et selekterbart markørelement. Hvert av disse elementer er diskutert nedenfor. Valgfritt kan vektoren inneholde en «markør»-sekvens, dvs. et oligonukleotidmolekyl lokalisert ved 5'- eller 3'-enden av NTP-proteinkodingssekvensen; oligonukleotidmolekylet som koder for polyHis (så som hekshaHis), eller annen «markør», så som FLAG, HA (hemagglutinin influensavirus) eller myc hvorfor tilgjengelig antistoff eksisterer. Denne markør fusjoneres typisk til polypeptidet ved ekspresjon fra polypeptidet, og kan fungere som middel for affinitetsrensning av NTP-proteinet eller NTP-peptidet fra vertcellen. Affinitetsrensning kan utføres f.eks. ved kolonnekromatografi ved anvendelse av antistoff mot tag'en som en affinitetsmatriks. Valgfritt kan tag'en deretter fjernes fra det rensede NTP-protein eller NTP-peptid på forskjellige måter så som ved anvendelse av visse peptidaser.

Det humane immunoglobulin «hengsel»- og Fc-region kan enten fusjoneres ved N-terminus eller C-terminus i NTP-proteinet eller NTP-peptidet av fagkyndige. Det påfølgende Fcfusjonsprotein kan renses ved anvendelse av en Protein Affinitetskolonne. Fc er kjent for å utvise en lang farmakokinetisk halveringstid *in vivo* og proteiner fusjonert til Fc er funnet å utvise en vesentlig større halveringstid *in vivo* enn den ikke-fusjonerte motpart. Videre vil fusjon til Fc-regionen muliggjøre dimerisering/multimerisering av molekylet som kan være nyttig for bioaktiviteten til visse molekyler.

5'-flankeringssekvensen kan være homolog (dvs. fra den samme art og/eller stamme som vertcellen), heterolog (dvs. fra en art som er forskjellig fra vertcelle-arten, eller -stammen), hybrid, dvs. en kombinasjon av 5'-flankeringssekvenser fra mer enn en kilde), syntetisk, eller det kan være

det native NTP-protein eller peptidgen 5'-flankerings-sekvens. Således kan kilden for 5'-flankeringssekvensen være enhver unicellulær prokaryotisk eller eukaryotisk organisme, enhver vertebrat- eller invertebrat organisme, eller enhver plante, gitt at 5'-flankeringssekvensen er funksjonell og kan aktiveres av, vertcellemaskineriet.

5'-flankeringssekvensene som er nyttige i vektorer ifølge oppfinnelsen kan oppnås med enhver av flere metoder kjent innen fagfeltet. Typisk vil 5'-flankeringssekvensene som er nyttige heri, som ikke er NTP-genflankeringssekvensene, tidligere være identifisert ved kartlegging og/eller ved restriksjonsendonukleaseoppkutting, og kan således isoleres fra den egnede vevskilde ved anvendelse av egnede restriksjonsendonukleaser. I noen tilfeller kan den fullstendige nukleotidsekvens av 5'-flankeringssekvensen være kjent. Her kan 5'-flankerings-sekvensen syntetiseres ved anvendelse av metoder beskrevet ovenfor for nukleinsyresyntese eller kloning.

Der hvor hele eller kun en del av 5'-flankeringssekvensen er kjent, kan den oppnås ved anvendelse av PCR og/eller ved screening av et genomisk bibliotek med egnet oligonukleotid og/eller 5'-flankeringssekvensfragmenter fra den samme eller andre former.

Der hvor 5'-flankeringssekvensen ikke er kjent, kan et fragment av DNA som inneholder en 5'-flankeringssekvens isoleres fra en større del av DNA som kan inneholde f.eks. en kodesekvens eller et annet gen eller gener. Isolering kan utføres ved restriksjonsendonuklease-oppkutting ved anvendelse av én eller flere forsiktig selekterte enzymer for å isolere det egnede DNA-fragment. Etter oppkutting kan det ønskede fragment isoleres ved agarosegelrensing, Qiagen®-kolonne, eller

andre metoder kjent for fagkyndige. Seleksjon av egnede enzymer for å utføre dette vil være åpenbare for fagkyndige innen feltet.

Replikasjonsorigoelementet er typisk en del av prokaryote ekspresjonsvektorer som er kommersielt tilgjengelige, og bevirker amplifisering av vektoren i en vertcelle. Amplifisering av vektoren til et bestemt kopi-antall kan, i noen tilfeller, være viktig for optimal eks-presjon av NTP-proteinet eller NTP-peptidet. Dersom den valgte vektor ikke inneholder et replikasjonsorigosete, kan det kjemisk syntetiseres et slikt sete basert på en kjent sekvens, og dette kan ligeres inn i vektoren. Transkripsjons-termineringselement er typisk lokalisert 3' i forhold til enden av NTP-proteinet/peptidet som koder for sekvensen og fungerer for å terminere transkripsjonen av NTP-proteinet, eller -peptidet. Vanligvis er transkripsjonstermine-ringselementet i prokaryote celler et G-C-rikt fragment etterfulgt av en poly-T-sekvens. Idet elementet enkelt kan klonas fra et bibliotek eller også innkjøpes kommersielt som en del av en vektor, kan det også enkelt syntetiseres ved anvendelse av metoder for nukleinsyre-syntese, så som de som er beskrevet ovenfor.

Et selekterbart markørgenelement koder for et protein som er nødvendig for overlevelse og vekst av vertcellevekst i et selektivt dyrkningsmedium. Typisk seleksjonsmarkørgener koder for proteiner som gir resistens mot antibiotika eller andre toksiner, f.eks. ampicillin, tetracyklin eller kanamycin for prokaryote vertceller,

(a) komplemente auxotrofe mangler i cellen; eller

(b) forsyning av kritiske næringsstoffer som ikke er tilgjengelige fra det komplekse medium.

Foretrukne selekterbare markører er kanamycin-resistensgen,

ampicillin-resistensgen, og tetracyklin-resistensgen.

Ribosombindingselement, vanligvis benevnt Shine-Dalgarno-sekvensen (prokaryote) eller Kozak-sekvensen (eukaryote) er vanligvis nødvendig for translasjonsinitiering av mRNA. Elementet er typisk lokalisert 3' i forhold til promotoren og 5' i forhold til kodesekvensen av NTP-peptidet som skal syntetiseres. Shine-Dalgarno-sekvensen varierer, men er typisk et polypurin (dvs. som har et høyt A-G-innhold). Mange Shine-Dalgarnosekvenser er blitt identifisert, og hver av disse kan syntetiseres ved anvendelse av metoder angitt ovenfor, og angitt i en prokaryotisk vektor.

I de tilfeller hvor det er ønskelig for NTP-peptidet å skulle utskilles fra vertcellen, kan en signal-sekvens anvendes for å dirigere NTP-proteinet eller peptidet ut av vertcellen hvor det syntetiseres, og den karboksy-terminale del av proteinet kan deleteres for å hindre membranforankring. Typisk er signal-sekvensen posisjonert i koderegionen i NTP-genet eller cDNA, eller direkte ved 5'-enden av NTP-genkoderegionen. Mange signalsekvenser er blitt identifisert, og enhver av disse kan fungere i selekterte vertceller og anvendes i forbindelse med NTP-genet eller cDNA. Derfor kan signalsekvensen homolog eller heterolog til NTP-genet eller cDNA, og kan være homolog eller heterolog til NTP-genet eller cDNA. I tillegg kan signal-sekvensen kjemisk syntetiseres ved anvendelse av metoder anvendt ovenfor. I de fleste tilfeller vil sekresjon av polypeptidet fra vertcellen via nærvær av et signalpeptid resultere i fjerning av det aminoterminalle metionin fra polypeptidet.

I mange tilfeller kan transkripsjon av NTP-genet eller cDNA økes ved nærvær av én eller flere introner i vektoren; dette er spesielt tilfellet hvor NTP-proteinet eller NTP-peptidet produseres i eukaryote vertceller, spesielt mammalske vertceller. Intronene

anvendt kan være naturlig forekommende innen NTP-genet, spesielt hvor genet anvendt er en full-lengde genomisk sekvens eller et fragment derav. Der hvor intronene ikke er naturlig forekommende i genet (som for de fleste cDNA'er), kan intron(er) oppnås fra en annen kilde. Posisjonen av intron med hensyn til flankeringssekvens og NTP-genet er relativt viktig, idet intronet må transkriberes for å være effektivt. Således, idet NTPgenet innsettes inn i ekspresjons-vektoren er et cDNAmolekyl, vil den foretrukne posisjon for intronet være 3' i forhold til transkripsjonsstartsetet, og 5' i forhold til polyA-transkripsjonstermineringssekvens. Fortrinnsvis for NTP-cDNA vil intron, eller introner være lokalisert ved én side eller på den andre side (dvs. 5' eller 3') av cDNA'en slik at den ikke påvirker dens kodesekvens. Ethvert intron fra enhver kilde, inkluderende virale, prokaryote og eukaryote (planter eller dyr) organismer, kan anvendes for å praktisere oppfinnelsen, gitt at det er kompatibelt med vertcellen hvortil det skal innsettes. Også inkludert heri er syntetiske introner. Valgfritt kan mer enn ett intron anvendes i vektoren.

Der hvor ett eller flere av elementene angitt ovenfor ikke allerede er til stede i vektoren som skal anvendes, kan de oppnås individuelt og ligeres inn i vektoren. Metoder anvendt for å oppnå hvert av disse elementer er godt kjent for fagkyndige og er sammenlignbare til metoder angitt ovenfor (dvs. syntese av DNA'en, biblioteks-screening o.l.).

De finale vektorer anvendt for å praktisere denne oppfinnelse kan konstrueres fra utgangsvektorer så som en kommersielt tilgjengelig vektor. Slike vektorer kan, eller trenger ikke, inneholde noen av elementene som skal inkluderes i den fullstendige vektor. Dersom ingen av de ønskede elementer foreligger i

utgangsvektoren, kan hvert element individuelt liggeres inn i vektoren ved å kutte vektoren med egnede restriksjonsendonukleaser slik at endene til elementene kan liggeres inn, og hvor endene til vektoren er kompatible for ligering. I noen tilfeller kan det være nødvendig å «blunte» endene som skal liggeres sammen for å oppnå en tilfredsstillende ligering. Blunting utføres ved først å fylle inn «sticky ends» ved Klenow-DNA-polymerase, eller T4-DNA-polymerase av alle 4 nukleotider. Denne prosedyre er godt kjent innen fagfeltet og er beskrevet i Sambrook et al., *supra*. Alternativt kan 2 eller flere av elementene som skal innsettes i vektoren først liggeres sammen (dersom de skal posisjoneres tilgrensende i forhold til hverandre) og deretter liggeres inn i vektoren.

En annen metode for å konstruere vektoren er å utføre alle ligeringer av de forskjellige elementer samtidig i én reaksjonsblanding. Her vil mange nonsense eller ikkefunksjonelle vektorer generere pga. uhensiktsmessig ligeering eller innsetting av elementene, men den funksjonelle vektor kan identifiseres og selekteres ved restriksjonsendonuklease-oppkutting.

Foretrukne vektorer for praktisering av oppfinnelsen er de som er kompatible med bakterielle celler, insektceller og mammalske vertceller. Slike vektorer inkluderer, *inter alia*, pCRII, pCR3, og pcDNA3.1 (Invitrogen Company, San Diego, Calif.), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, Calif.), pET115b (Novagen, Madison, Wis.), PGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, Calif.), pETL (BlueBacII; Invitrogen) og pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, N.Y.).

Etter at vektoren er blitt konstruert og et nukleinsyre-molekyl som koder for full lengde eller trunktert NTP-peptid er blitt innsatt på egnet sete i vektoren, kan den komplette vektor innsettes i en egnet vertcelle for mangfoldiggjøring og/eller

polypeptidokspresjon. Vertcellene kan være prokaryotiske vertceller (så som *E.coli*) eller eukaryotiske vertceller (så som gjærcele, en insektcelle, eller en vertebratcelle). Vertcellen, idet den dyrkes under egnede betingelser, kan syntetisere NTP-peptidet som deretter kan samles fra dyrkningsmedium (dersom vertcellen utskiller det i medium eller direkte fra vertcellen som produserer det (dersom det ikke utskilles)).

Etter innsamling kan NTP-peptidet renses ved anvendelse av metoder så som molekylær siktekromatografi, affinitets-kromatografi o.l. Seleksjon av vertcellen fra NTP-peptidproduksjon vil avhenge delvis av om NTP-peptidet skal glykosyleres eller fosforyleres (i hvilket tilfelle eukaryote vertceller er foretrukket), og på hvilken måte vertcellen er i stand til å «foldes» proteinet til dets native tertiære struktur (f.eks. hensiktsmessig orientering av disulfidbroer, etc.) slik at biologisk aktivt protein fremstilles av NTP-peptidet som har biologisk aktivitet, idet NTP-proteinet eller NTP-peptidet kan «foldes» etter syntese ved anvendelse av egnede kjemiske betingelser som beskrevet nedenfor. Egnede celler eller cellelinjer kan være mammalske celler, så som eggstokkceller fra kinesisk hamster (CHO), humane embryoniske nyreceller (HEK)293 eller 293T-celler, eller 3T3-celler. Seleksjonen av egnede mammalske vertceller og metoder for transformasjon, dyrkning, mangfoldiggjøring, screening og produktproduksjon og rensing er kjent innen fagfeltet. Andre egnede mammalske cellelinjer er COS-1- og COS-7-cellelinjene fra ape, og CV-1-cellelinjen. Ytterligere representative mammalske vertceller inkluderer rimatcellelinjer og gnagercellelinjer, inkluderende transformerte cellelinjer. Normale diploide celler, celler som er avledet fra *in vitro*-dyrkning av primærvev, og likeledes primære eksplan-tater, er også egnet. Kandidatceller kan genotypisk mangle seleksjonsgenet, eller kan inneholde et dominantvirkende

seleksjonsgen. Andre egnede mammalske cellelinjer inkluderer, men er ikke begrenset til, neuroblastom N2A-celler fra mus, HeLa, mus L-929-celler, 3T3-linjer avledet fra Swiss, Balb-c eller NIH-mus, BHK- eller HaK-hamstercellelinjer.

Tilsvarende nyttig som vertcellene egnet for foreliggende oppfinnelse er bakterielle celler. F.eks. de forskjellige stammer av *E.coli* (f.eks. HB101, DH5.alfa., DH10, og MC1061) er godt kjent som vertceller innen fagfeltet bioteknologi. Forskjellige stammer av *B.subtilis*, *Pseudomonas* spp., andre *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., o.l., kan også benyttes i foreliggende fremgangsmåte. Mange stammer av gjærceller kjent for fagkyndige er også tilgjengelige som vertceller for ekspresjon av polypeptidene ifølge oppfinnelsen.

Videre, dersom ønskelig, kan insektcellesystemer benyttes i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Slike systemer er f.eks. beskrevet i Kitts et al. (*Biotechniques*, vol 14, pp 810-817 [1993], Lucklow (*Curr.Opin.Biotechnol.*, vol 4, pp 564-572 [1993], and Lucklow et al. (*J.Vdrol.*, vol 67, pp 4566-4579 [1993]). Foretrukne insektceller er Sf-9 og Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, Calif.).

Innsetting (også benevnt som «transformasjon» eller «transfeksjon») av vektoren inn i den selekterte vertcellen kan utføres ved anvendelse av metoder så som kalsiumklorid, elektroporering, mikroinjisering, lipofeksjon eller DEAE-dekstranmetoden. Den metode som velges vil delvis være en funksjon av typen vertcelle som skal anvendes. Disse metoder og andre egnede metoder er godt kjent for fagkyndige, som angitt, f.eks. i Sambrook et al., *supra*.

Vertcellene som inneholder vektoren (dvs. de transformerte eller transfekterte) kan dyrkes ved anvendelse av standard dyrknings-medium som er kjent for fagkyndige. Mediumet vil vanligvis

inneholde alle næringsstoffer som er nødvendige for vekst og overlevelse av cellene. Egnede medium for dyrkning av *E.coli*-celler er f.eks. Luria Broth (LB) og/eller Terrific Broth (TB). Egnede medium for dyrkning av eukaryote celler er RPMI 1640, MEM, DMEM, og alle kan tilsettes serum og/eller vekstfaktorer som er nødvendig for den bestemte cellelinje som skal dyrkes. Et egnet medium for insektkulturer er Grace's medium tilsatt gjærtolat, laktalbuminhydrolysat og/eller føtalt kalveserum dersom nødvendig. Typisk tilsettes et antibiotikum eller andre forbindelser som er nyttige for selektiv vekst av de transformerte celler til mediumet. Forbindelsen som skal anvendes vil detekteres av det selekterte markørelement som er til stede på plasmidet hvormed vertcellen ble transformert. F.eks. der hvor det selekterbare markørelement er anamycin-resistent kan forbindelsen som skal tilsettes til dyrkningsmediumet være kanamycin.

Mengden av NTP-peptid produsert i vertcellen kan bestemmes ved anvendelse av standardmetoder kjent innen fagfeltet. Slike metoder inkluderer, uten begrensning, Western-blot-analyse, SDS-polyakrylamidgelelektroforese, ikke-denaturerende gelelektroforese, HPLC-separasjon, massespektroskopi, immunprecipitering og/eller aktivitetsanalyser så som DNA-bindingsgelskiftanalyse.

Dersom NTP-peptidet er blitt konstruert for å kunne utskilles fra vertcellen, vil hovedandelen av NTP-proteinet eller peptidet kunne finnes i celledyrkningsmediet. Proteiner fremstilt på denne måte vil typisk ikke oppvise et aminoterminalt metionin, idet det er fjernet under sekkrering fra cellen. Dersom NTP-peptidet ikke utskilles fra vertcellen, vil det imidlertid foreligge i cytoplasma og/eller i kjernen (for eukaryote vertceller) eller i cytosol'et (for gramnegative bakterielle vertceller) og kan ha et aminoterminalt metionin. For NTP-peptid som er i

vertcellecytoplasma og/eller kjerne, vil vertcellen typisk først ødelegges mekanisk eller med detergent for å frigi det intracellulære innhold til den bufrede løsning. NTP-peptid kan deretter isoleres fra denne løsning.

Rensing av NTP-peptid fra løsning kan utføres med en rekke kjente teknikker. Dersom proteinet er blitt syntetisert slik at det inneholder en markør såsom hekshaHistidin (NTP-protein-/hekshaHis) eller et annet mindre peptid så som FLAG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) eller kalmodulin-bindende peptid (Stratagene, La Jolla, CA) enten ved dets karboksyl- eller aminotermus, kan det i hovedsak renses i en 1-trinnsprosess ved å passere løsningen gjennom en affinitetskolonne hvor kolonnematrisksen har en høy affinitet for markøren eller for proteinet direkte (dvs. et monoklonalt antistoff som spesifikt gjenkjenner NTP-protein eller NTP-peptidet). F.eks. binder polyhistidin med stor affinitet og spesifisitet til nikkel, sink og kobolt; og således kan immobilisert metallion-affinitetskromatografi som benytter en nikkel-basert affinitetsresin (som anvendt i Qiagens's Qia-X-press-system eller Invitrogen's X-press-system) eller en kobolt-basert

affinitetsresin (som anvendt i BD Bioscience-CLONTECH's Talon-system) anvendes for rensing av NTP-protein/polyHis. (Se f.eks. Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Section 10.11.8, John Wiley & Sons, New York [1993]).

Der hvor NTP-peptidet fremstilles uten en markør festet til, og ingen antistoff er tilgjengelige, kan andre godt kjente prosedyrer for rensing anvendes. Slike prosedyrer inkluderer, uten begrensning, ionebytte-kromatografi, hydroksyapatitt-kromatografi, hydrofobisk interaksjonskromatografi, molekyl-siktkromatografi, HPLC, nativ gelelektroforese i kombinasjon med geneluering, og

preparativ isoelektrisk fokusering («Isoprime»-maskin/teknikk, Hoefer Scientific). I noen tilfeller kan 2 eller flere av disse teknikker kombineres for å oppnå økt renhet.

Det antas at NTP-peptidet vil kunne finnes i primært intracellulært, intracellulært materiale (inkluderende inklusjonslegemer for gram-negative bakterier) kan ekstraheres fra vertcellen ved anvendelse av enhver standard teknikk kjent for fagkyndige. F.eks. kan vertcellen lyseres for å frigi innholdet i periplasma/ cytoplasma med French press, homogenisering og/eller sonikering etterfulgt av sentrifugering. Dersom NTP-proteinet eller NTP-peptidet har dannet inklusjons-bodies i cytosol, kan disse ofte binde til de indre og/eller ytre cellulære membraner og vil således primært finnes i pellett-materialet etter sentrifugering. Pellett-materialet kan deretter behandles med pH-ekstremiteter, eller med kaotropiske midler så som en detergent, guanidin, guanidinderivater, urea eller ureaderivater i nærvær av et reduserende middel så som ditiotreitol ved alkalisk pH eller triskarboksyetylfosfin ved sur pH for å frigjøre, bryte fra hverandre, og solubilisere inklusjonslegemene. NTP-peptidet er nå i løselig form og deretter analyseres ved anvendelse av gelelektroforese, immunoprecipitering o.l.

Dersom det er ønskelig å isolere NTP-peptidet kan isolering utføres ved anvendelse av standardmetoder så som de som er angitt i Marston et al. (*Meth.Enz.*, vol 182, pp 264-275 [1990]). I noen tilfeller kan NTP-proteinet eller -peptidet ikke være i dets biologisk aktive form ved isolering.

Forskjellige metoder for «refolding» eller omdannelse av polypeptidet til dets tertiære struktur og generere disulfidkoblinger kan anvendes for å gjenvinne biologisk aktivitet. Slike metoder inkluderer eksponering av det

solubiliserte polypeptid til en pH vanligvis over 7 og i nærvær av en bestemt konsentrasjon av en kaotrop. Utvelgelse av kaotropen er svært tilsvarende som valget for inklusjonslegemets solubilisering, men vanligvis ved en lavere konsentrasjon, og det er ikke nødvendig at den samme kaotrop anvendes for solubilisering. I de fleste tilfeller vil refolding/oksidasjonsløsningen også inneholde et reduserende middel eller det reduserende middel pluss dets oksiderte form i et spesifikt forhold for å generere et bestemt redokspotensial som muliggjør disulfid-shuffling til å forekomme i dannelsen av proteinenes cysteinbro(er). Noen av de vanlige anvendte redokspar inkluderer cystein/cystamin, glutation (GSH)/ditiobis GSH, kobberklorid, ditiotreitol (DTT)/ditiol DTT, 2-merkaptoetanol (βME)/ditiob-(βME). I mange tilfeller er et koløsemiddel nødvendig for å øke effektiviteten av refoldingen, og det mest vanlige reagens anvendt for dette formål inkluderer glyserol, polyetylen glykol av forskjellige molekylvekter, og arginin.

Dersom NTP-peptid-inklusionslegemer ikke dannes i vesentlig grad i vertcellen, vil NTP-peptidet primært finnes i supernatanten etter sentrifugering av cellehomogenatet, og NTP-proteinet eller NTP-peptidet kan isoleres fra supernatanten ved anvendelse av metodene så som de som er angitt nedenfor.

I de situasjoner hvor det er foretrukket å delvis eller fullstendig isolere NTP-peptidet, kan rensing utføres ved anvendelse av standardmetoder godt kjent for fagkyndige. Slike metoder inkluderer, uten begrensning, separering ved elektroforese etterfulgt av elektro-eluering, forskjellige typer kromatografi (immunoaffinitet, molekylær sikt og/eller ionebytting), og/eller høytrykksvækekromatografi. I noen tilfeller er det foretrukket å anvende mer enn én av disse metoder for full-

stendig rensing.

I tillegg til preparering og rensing av NTP-peptid ved anvendelse av rekombinante DNA-teknikker, kan NTP-peptidene fremstiles ved kjemiske syntesemetoder (så som fastfasepeptidsyntese) ved anvendelse av teknikker kjent innen fagfeltet, så som de som er angitt i Merrifield et al., (*J.Am.Chem.Soc.*, vol 85, p 2149[1985], and Stewart and Young (*Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, III [1984])).

Slike polypeptider kan syntetiseres med eller uten metionin på aminotermius. Kjemisk syntetiserte NTP-peptider kan oksideres ved anvendelse av metoder angitt i disse referanser for å danne disulfid-broer. NTP-peptidene forventes å ha biologisk aktivitet sammenlignbar med NTP-peptidene produsert rekombinant eller rensset fra naturlige kilder og disse kan anvendes om hverandre med rekombinant, eller naturlig NTP-peptid.

NTP-peptider kan fremstilles ved anvendelse av konvensjonelle peptidsynteseteknikker kjent for fagkyndige. Disse teknikker inkluderer kjemiske koblingsmetoder (cf. E. Wunsch: «*Methoden der organischen Chemie*», Volume 15, Band 1+2, *Synthese von Peptiden*, Thime Verlag, Stuttgart(1974), og G. Barrany, R.B. Merrifield: «*The Peptides*», eds. E. Gross, J. Meienhofer, Volume 2, Chapter 1, pp 1-284, Academic Press(1980)), enzymatiske koblingsmetoder (cf. F. Widmer, J.T. Johansen, Carlsberg Res.Comm., Vol 44, pp 37-46 (1979)), og W. Kullmann: «*Enzymatic Peptide Synthesis*», CRC Press Inc. Boca Raton, Fla.(1987), og F. Widmer, J.T. Johansen i «*Synthetic Peptides in Biology and Medicines*; eds. K. Alitalo, P. Partanen, A. Varieri, pp 79-86, Elsevier, Amsterdam (1985), eller en kombinasjon av kjemiske og enzymatiske metoder dersom dette er fordelaktig for prosessdesign og økonomi.

Den foreliggende oppfinnelse muliggjør nye fremgangsmåter for å behandle tilstander som krever fjerning av celler, så som benigne og maligne tumorer, glandulære (f.eks. prostata) hyperplasi, uønsket ansiktshår, vorter, uønsket fettvev. En slik metode omfatter administrering til et pattedyr i behov av behandling en terapeutisk effektiv mengde av NTP-peptid.

Tilstanden kan f.eks. være tumorer i lunge, bryst, mage, pankreas, prostata, blære, ben, eggstokk, hud, nyre, sinus, tarm, tynntarm, mage, rektum, esofagus, blod, hjerne og dens omslutninger, ryggmarg og dens omslutninger, muskel, bindevev, adrenal, parathyroid, thyroid, livmor, testis, hypofyse, reproduktive organer, lever, galleblære, øye, øre, nese, hals, mandler, munn, lymfenoder og lymfesystem, og andre organer.

Som anvendt heri er termen «malign tumor» tiltenkt å omfatte alle former for humane karsinomer, sarkomer og melanomer som forekommer i svakt differensierte, moderat differensierte og godt differensierte former.

Oppfinnelsen tilfredsstiller et behov innen fagfeltet for behandlinger som kan fjerne benigne tumorer med mindre risiko, og færre av de uønskede bieffekter som er forbundet med kirurgi. En fremgangsmåte for å fjerne benigne tumorer i kirurgisk farlige områder så som i dype lokalisasjoner i kroppen (f.eks. hjerne, hjerte, lunge og andre) er spesielt nødvendig.

Fremgangsmåten for å behandle tilstandene hvor celler må fjernes kan anvendes i forbindelse med konvensjonelle metoder for behandling av slike situasjoner så som kirurgiske utsnitt, kjemoterapi og bestråling. NTP-peptider kan administreres før, under og etter slike konvensjonelle behandlinger.

Tilstanden som skal behandles kan også være hyperplasi, hypertrofi, eller overvekst av et vev valgt fra gruppen som består av lunge, bryst, mage, pankreas, prostata, blære, ben, eggstokk, hud, nyre, sinus, tarm, tynntarm, mage, rektum, esofagus, hjerne og dens omslutninger, ryggmarg og dens omslutninger, muskel, bindevev, adrenal, parathyroid, thyroid, livmor, testis, hypofyse, reproduktive organer, lever, galleblære, øye, øre, nese, hals, mandler, munn og lymfenoder og lymfesystem.

En annen tilstand som kan behandles ved anvendelse av fremgangsmåten er et viralt-, bakteriologisk- eller parasittisk forandret vev valgt fra gruppen som består av lunge, bryst, mage, pankreas, prostata, blære, ben, eggstokk, hud, nyre, sinus, tarm, tynntarm, mage, rektum, esofagus, hjerne og dens omslutninger, ryggmarg og dens omslutninger, muskel, bindevev, adrenal, parathyroid, thyroid, livmor, testis, hypofyse, reproduktive organer, lever, galleblære, øye, øre, nese, hals, mandler, munn og lymfenoder og lymfesystem.

Tilstanden som skal behandles kan også være en malformasjon av et vev valgt fra gruppen som består av lunge, bryst, mage, pankreas, prostata, blære, ben, eggstokk, hud, nyre, sinus, tarm, tynntarm, mage, rektum, esofagus, hjerne og dens omslutninger, ryggmarg og dens omslutninger, muskel, bindevev, adrenal, parathyroid, thyroid, livmor, testis, hypofyse, reproduktive organer, lever, galleblære, øye, øre, nese, hals, mandler, munn og lymfenoder og lymfesystem.

Nærmere bestemt kan tilstanden som skal behandles være tonsillar hypertrofi, prostatisk hyperplasi og hemorroider. Betingelsen som skal behandles kan være en vaskulær sykdom, så som aterosklerose eller arteriosklerose, eller en vaskulær sykdom så som varikosevener. Betingelsen som skal behandles kan også være en kosmetisk modifisering i et vev, så som hud, øye, øre, nese, hals, munn, muskel, bindevev, hår eller brystvev.

Terapeutiske materialer med NTP-peptider er innenfor rammen av foreliggende oppfinnelse. Slike materialer kan omfatte en terapeutisk effektiv mengde av NTP-peptidet i samblanding med en farmasøytisk akseptabel bærer. Bærematerialet kan være vann for injisering, fortrinnsvis tilsatt andre materialer som er vanlige i løsninger for administrering til pattedyr. Typisk vil et NTP-peptid for terapeutisk anvendelse administreres i form av et materiale som omfatter rensset NTP-peptid sammen med en eller flere fysiologisk akseptable bærere, eksipienter eller fortynningsstoffer. Nøytralt bufret saltløsning eller saltløsning blandet med serumalbumin er representative egnede bærere. Fortrinnsvis formuleres produktet som et lyofilisat ved anvendelse av egnede eksipienter (f.eks. sukrose). Andre standardbærere, fortynningsmidler og eksipienter kan inkluderes dersom ønskelig. Materialene omfatter buffere kjent for fagkyndige med et egnet pH-verdiområde, inkluderende Tris-buffer av ca. pH 7,0-8,5 eller acetatbuffer av ca. pH 4,0-5,5, som videre kan inkludere sorbitol eller et egnet substitutt derfor.

Anvendelsen av NTP-peptidene konjugert bundet eller koblet til et antistoff, antistoff-fragment, antistofflignende molekyl, eller et molekyl med en høy affinitet til en spesifikk tumormarkør, så som en cellulær reseptor, signal-peptid eller over-uttrykt enzym, for å målrette til de uønskede cellulære elementer er også omfattet innenfor rammen av oppfinnelsen. Antistoffet, antistoff-fragmentet, antistofflignende molekyl, eller molekyl med en høy affinitet til en spesifikk tumormarkør anvendes for å målrette NTP-peptidkonjugatet til at spesifikt cellulært- eller vevsmål. F.eks. kan en tumor med et distinktivt overflateantigen eller uttrykt antigen målrettes med antistoffet, antistoff-fragmentet, antistofflignende bindende molekyl og tumorcellene kan drepes av NTP-peptidet. En slik løsning som anvender antistoffmålretting har anticiperte

fordeler for å redusere dosering, øke sannsynligheten for binding og opptak til målcellene, og øke nytteverdier for målretting og behandling av metastatiske tumorer og tumorer av mikroskopisk størrelse.

Foreliggende oppfinnelse omfatter også anvendelse av NTPpeptidene i samsvar med oppfinnelsen konjugert eller bundet eller koblet til et protein eller annet molekyl for å danne et materiale som, ved spalting ved eller nær sete(r) av tumoren eller de andre uønskede celler av et tumor- eller setespesi-fikt enzym eller protease, eller av et antistoffkonjugat som målretter tumoren eller andre uønskede celler, frigjør NTPpeptidet ved, eller nær sete(ne) av tumoren eller de andre uønskede celler.

Oppfinnelsen vedrører også anvendelse av NTP-peptidene konjugert eller koblet eller bundet til et protein eller annet molekyl for å danne et materiale som frigjør NTP-peptidet ved eksponering av vevet som skal behandles til lys (som i laserterapi eller andre fotodynamiske eller fotoaktiverende terapier), andre former for elektromagnetisk bestråling så som infrarød bestråling, ultrafiolett bestråling, røntgen eller gammabestråling, lokalisert varme, alfa- eller betabestråling, ultralydsemissjoner eller andre kilder for lokalisert energi.

NTP-peptidene kan benyttes alene, sammen eller i kombinasjon med andre farmasøytiske materialer, så som cytokiner, vekstfaktorer, antibiotika, apoptoseinduserende midler, anti-inflammatoriske midler og/eller kjemoterapeutiske midler som er egnet for den indikasjon som behandles.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også terapeutiske materialer av NTP-peptider som benytter dendrimerer, fullerener og andre syntetiske molekyler, polymerer og makromolekyler hvor NTP-peptidet er konjugert med-, festet til- eller omsluttet molekylet,

polymer eller makromolekyl, enten ved seg selv eller sammen med andre former av molekylet så som en tumorspesifikk markør. F.eks. tilveiebringer US Patent Nr 5.714.166, *Bioactive and/or Targeted Dendimer Conjugates*, en fremgangsmåte for å fremstille og anvende, *inter alia*, dendrittiske polymerkonjugater sammensatt av minst én dendrimer med en måldirektor(er) og minst ett aktivt middel konjugert til dette.

Oppfinnelsen vedrører også terapeutiske materialer av NTP- peptider og medikamentavgivelsesvehikler så som lipidemul-sjoner, micelle-polymerer, polymermikrosfærer, elektroaktive polymerer, hydrogeler og liposomer.

Anvendelsen av klonede rekombinante NTP-peptidantistoff-konjugater; klonede rekombinante NTP-peptidantistoff-fragmentkonjugater; og klonede rekombinante NTP-antistofflignende proteinkonjugater er også omfattet av rammen av foreliggende oppfinnelse. Fordelene med et klonet NTP-peptid kombinert med målrettet konjugat (så som et antistoff, antistoff-fragment, antistofflignende molekyl eller et molekyl med en høy affinitet til en cancerspesifikk reseptor eller andre tumormarkører) er at et slikt molekyl kombinerer de målrettede fordeler beskrevet ovenfor i tillegg til fordelene med fremstilling og standardisert produksjon av det klonede konjugerte molekyl.

Faste doseringsformer for oral administrering inkluderer, men er ikke begrenset til, kapsler, tabletter, piller, pulvere og granuler. I slike faststoffdoseringsformer samblendes den aktive forbindelse med minst én av følgende:

- (a) en eller flere inerte eksipienter eller bærere, så som natriumcitrat eller dikalsiumfosfat;
- (b) fyllstoff eller ekstendere, så som stivelser, laktose,

sukrose, glukose, mannitol og silisisk syre;

- (c) bindingsstoff så som karboksymetylcellulose, alginater, gelatin, polyvinylpyrrolidon, sukrose og akacia;
- (d) humektanter, så som glyserol,
- (e) desintegrerende midler så som agar-agar, kalsiumkarbonat, potet- eller tapiokastivelse, alginisk lyre, visse komplekse silikater og natriumkarbonat;
- (f) løsningshemmere så som parafin;
- (g) absorpsjonsakseleratorer så som kvaternære ammoniumforbindelser;
- (h) fuktmidler så som acetylalkohol og glyserol monostearat;
- (i) adsorbenter, så som kaolin og bentonitt; og
- (j) smøremidler så som talk, kalsiumstearat, magnesiumstearat, faststoff polyetylenglykoler, natriumlaurylsulfat eller blandinger derav.

For kapsler, tabletter og piller kan doseringsformene også omfatte buffermidler.

Væskeformige doseringsformer for oral administrering inkluderer farmasøytisk akseptable emulsjoner, løsninger, suspensjoner, siruper og eliksirer. I tillegg til de aktive forbindelser kan væskedoseringsformene omfatte inerte fortynningsmidler som vanligvis anvendes innen fagfeltet, så som vann eller andre løsemidler, solubiliserende midler og emulsifiserende midler. Eksempler på emulsifiserende midler er etylalkohol, isopropylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzylbenzoat, propylenglykol, 1,3-butylenglykol, dimetylformamid, oljer så som bomullsfrøolje, jordnøttolje, hvetefrøolje, olivenolje, castorolje,

sesamolje, glyserol, tetrahydrofurfurylalkohol, polyetylglykoler, fettsyreestere av sorbitan, eller blandinger av disse substanser, o.l.

I tillegg til slike inerte fortynningsmidler kan materialene også inkludere adjuvaner, så som fuktmidler, emulsifiserende- og suspenderende midler, søtningsmidler, makstilsetningsmidler og luktmidler.

Aktuelle doseringsnivåer av aktive ingredienser i materialene ifølge oppfinnelsen kan varieres for å oppnå en terapeutisk effektiv mengde av NTP-peptidet som er effektivt for å oppnå en ønsket terapeutisk respons for et bestemt materiale og fremgangsmåte for administrering. De valgte doseringsnivåer avhenger derfor av den ønskede terapeutiske effekt, administrasjonsrute, den ønskede varighet av behandlingen, størrelsen på individet eller dyret som behandles, og andre faktorer.

For pattedyr, inkluderende mennesker, kan de effektive mengder administreres på basis av kroppsoverflateområdet. Forholdstall for doseringer for dyr av forskjellig størrelse, species og mennesker (basert på mg/M^2 -kroppsoverflate) er beskrevet i E.J. Freireich et al., *Cancer Chemother.Rep.*, vol 50(4), p 219 (1966).

Kroppsoverflateareal kan omtrentlig bestemmes fra høyde og vekt av et individ (se f.eks. Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, N.Y., pp 537-538 (1970)). Ved anvendelse av teknikkene kjent på fagfeltet, og anvendelse av retningslinjer og beskrivelser gitt heri, vil en fagkyndig være i stand til å bestemme den terapeutisk effektive mengde av NTP-peptid for anvendelse ifølge foreliggende oppfinnelse.

Den totale daglige dosering av NTP-peptidet administrert til en vert kan være i en enkelt- eller delte doseringer. Doseringsenhetsmaterialet kan inneholde slike mengder av slike under-deler

derav nødvendig for å utgjøre en daglig dosering. Det skal imidlertid forstås at det spesifikke doseringsnivå for enhver bestemt pasient vil avhenge av en rekke faktorer, inkluderende kroppsvekt, generelle helse, kjønn, diett, tid og rute for administrering, potensen til det administrerte medikament, absorpsjons- og utskilleleseshastigheter, kombinasjon med andre medikamenter og alvorligheten av den bestemte sykdom som behandles.

En fremgangsmåte for å administrere et NTP-peptidmateriale i samsvar med foreliggende oppfinnelse inkluderer, men er ikke begrenset til, administrering av forbindelsene intra-muskulært, oralt, intravenøst, intraperitonealt, intra-cerebralt (intraparenkymalt), intracerebroventrikulært, intratumoralt, intralesjonalt, intradermalt, intratekalt, intranasalt, intraokulært, intra-arterielt, topikalt, transdermalt, via en aerosol, infusjon, bolusinjeksjon, implanteringsanordning, system for forlenget frigivelse, etc.

En annen metode for administrering av et NTP-peptid ifølge oppfinnelsen er ved en transdermal- eller transkutenøs rute. Ett eksempel på en slik utførelse er anvendelsen av en lapp.

Fortrinnsvis kan en lapp fremstilles med en fin suspensjon av NTP-peptid i f.eks. dimetylsulfoksid (DMSO), eller en blanding av DMSO med bomullsfrøolje og brakt inn i kontakt med huden til det tumorbærende pattedyr i en aystand fra tumorlokaliseringssetet på innsiden av en hudlomme. Andre medier eller blandinger derav med andre løsemidler og faststoffstøttemedia vil også virke.

Lappen kan inneholde NTP-peptidforbindelsen i form av en løsning eller en suspensjon. Lappen kan deres appliseres til huden til pasienten f.eks. ved å innsette den i en hudlomme til pasienten dannet av folding eller holding av huden sammen ved hjelp av sting, klips eller andre holde-anordninger. Lommen kan benyttes

på en slik måte at man får kontinuerlig kontakt med huden, uten innblanding fra pattedyret. I tillegg til å anvende en hudlomme kan enhver anordning anvendes som sikrer en god plassering av lappen i kontakt med huden. F.eks. kan en adhesiv bandasje anvendes for å holde lappen på plass på huden.

NTP-peptidet kan administreres i en formulering eller pre-parat for forlenget frigivelse. Egnede eksempler på forlenget frigivelsespreparater inkluderer semipermeable polymermatriser i form av formede artikler, f.eks. filmer eller mikrokapsler. Forlengede frigivelsesmatriser inkluderer polyestere, hydrogeler, polyaktider (US-Patent Nr 3.773.919, EP nr 58.481), kopolymerer av L-glutaminsyre og gammaetyl-L-glutamat (Sidman et al., *Biopolymers*, vol 22, pp 547-556 [1983]), poly(2-hydroksyetyl-metakrylat) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, vol 15, pp 167-277 [1981] og Langer, *Chem. Tech.*, vol 12, pp 98-105 [1982]) etylenvinylacetat (Langer et al., supra) eller poly-D-(-)-3-hydroksysmørsyre (EP Nr 133.988). Forlengde frigivelses-materialer kan også inkludere liposomer, som kan fremstilles med enhver kjent fremgangsmåte innen fagfeltet (f.eks. Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, vol 82, pp 3688-3692 [1985]; EP Nr 36.676; EP Nr 88.046; og EP Nr 143.949).

En annen metode for å administrere et NTP-peptid ifølge oppfinnelsen er ved direkte- eller indirekte infusjon av NTP-peptidet inn i tumor eller annet vev som skal behandles. Ett eksempel på en slik utførelse er direkte injisering av NTP-peptidet inn i tumoren eller annet vev som skal behandles. Behandlingen kan bestå av én enkelt injisering, av multiple injiseringer på ett sted, eller en serie injiseringer over en periode på timer, dager eller måneder med regresjon, eller destruksjon av tumoren eller annet vev som skal behandles monitoreres ved hjelp av biopsi, imaging eller andre metoder for

å monitorere vevsvekst. Injiseringen inn i tumoren eller annet vev som skal behandles, kan være ved hjelp av en anordning innsatt i en åpning så som nese, munn, øre, vagina, rektum eller urinrør eller gjennom et innsnitt for å nå tumoren eller vevet *in vivo* og kan utføres i forbindelse med et image eller optisk system så som ultralyd eller fiber-optisk virkefelt for å identifisere det egnede sted for injisering(ene). Et annet eksempel på en slik utførelse er anvendelsen av en anordning som kan tilveiebringe en konstant infusjon av NTP-peptidet til vevet over tid.

En annen metode for å administrere et NTP-peptid ifølge oppfinnelsen er i forbindelse med en kirurgisk eller tilsvarende metode benyttet for fysisk å fjerne, ablatere eller på annen måte drepe eller ødelegge tumor eller annet vev eller cellulære elementer nødvendig eller ønskelig for å fjerne eller ødelegge, hvor et NTP-peptid ifølge oppfinnelsen administreres til det umiddelbare området som omgir områdene hvor tumoren eller vevet ble fjernet for å ødelegge eller nedsette veksten av alle tumorceller eller andre cellulære elementer som ikke er fjernet eller ødelagt med prosedyren.

En annen metode for å administrere et NTP-peptid ifølge oppfinnelsen er ved implantering av en anordning innen tumoren eller det andre vev som skal behandles. Et eksempel på en slik utførelse er implanteringen av et oblat inneholdende et NTP-peptid i tumoren eller det annet vev som skal behandles. Oblatet frigjør en terapeutisk dosering av NTP-peptid inn i vevet over tid. Alternativt, eller i tillegg kan materialet administreres lokalt via implantering til området som er angrepet i en membran, svamp eller annet egnet materiale hvorpå NTP-peptidet er blitt absorbert. Dersom det anvendes en implanteringsanordning kan anordningen være implantert inn i et egnet vev eller organ, og avgivelse av NTP-peptidet kan være direkte gjennom anordningen via

bolus, eller via kontinuerlig administrering, eller via kateter ved anvendelse av kontinuerlig infusjon.

De påfølgende eksempler er gitt for å illustrere foreliggende oppfinnelse. Det skal imidlertid forstås at oppfinnelsen ikke er begrenset til de spesifikke tilstander eller detaljer beskrevet i disse eksempler.

Eksempel 1

Formålet med dette eksempel var å bestemme vekten av NTP-peptid nr 43 på vev ved injeksjonsstedene.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 43 i saltløsning i mengder av 100-400 µl ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/µl avgitt fra plastsprøyter gjennom 26 gauge rustfrie stålnåler.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48 individuelle foki med infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, neddykket i parafin, og farget og undersøkt med standard-histopatologiske metoder.

Tilsvarende grupper av kontrollrotter ble injisert med

- (1) bovint serumalbumin 0,1% i saltløsning,
- (2) normalt humant serum,
- (3) fysiologisk saltløsning,
- (4) ikke-infeksiøse bakterielle proteiner, og
- (5) kontrollpeptider,

og ble deretter rensset og undersøkt og ofret som ovenfor, med de utskilte foki for injiseringsbehandling som ovenfor.

Resultater

Injisering av NTP-peptid nr 43 produserte rikelig akutt nekrose av vev ved injiseringsstedene. Nekrosen var åpenbar i muskelvev, subkutenøst bindevev og dermis ved de steder hvor NTP-peptid nr 43 ble injisert. Etter 24 t ble cellene bleke, innskrukkede og nekrotiske, og det var infiltrering med inflammatoriske celler. Nekrosene korrelerte med injeksjonsområdene, og synes ikke å spres langt bort fra injeksjonsstedene.

I tillegg til de milde områder av inflammasjon, viste kontrollene ingen bevis på nekrose eller celletap. I motsetning til NTP-peptid nr 43 injeksjonene hvor hele felter av muskel-fibersjikt var nekrotiske, viste kontrollene minimal, eller fraværende muskel. Kontrollinjeksjonene hadde milde til minimale akutt inflammasjon ved injiseringsstedene og fokale mikrohemorrhager fra nålene.

Eksempel 2

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP-peptid nr 17 på vev ved injeksjonsstedene. 8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 17 i saltløsning i en mengde 100-400 ml ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål. Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48 individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Injisering av NTP-peptid nr 17 produserte rikelig akutt nekrose i vev ved injiseringsstedene. Nekrosen var åpenbar i muskelvev, subkutenøst bindevev, og dermis i steder hvor NTP-peptidet nr 17 ble injisert. Ved 24 t fremkom cellene ble bleke, innskrumpet og nekrotiske, og de var infiltrert med inflammatoriske celler. Nekrosen korrelerte med områdene for injeksjon og synes ikke å spre seg langt fra injeksjonsstedet.

I tillegg til de milde områder av inflammasjon, viste kontrollene ingen bevis på nekrose eller celletap. I motsetning til NTP-peptid nr 17 injeksjonene var hele felter av muskel-fibersjikt nekrotiske, viste kontrollene minimale eller fraværende muskelforandringer. Kontrollinjiseringene hadde milde til minimal akuttinflammasjon ved injiserings-setene og fokale mikrohemorhager fra nålene.

Eksempel 3

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP peptid nr 20 for vev ved injeksjonsstedene.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 17 i saltløsning i en mengde 100-400 µl ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48 individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard

histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Injeksjon av NTP-peptid nr 20 produserte celledød og nekrose i vev ved injeksjonsstedene. Celledød forelå i muskelvev, subkutenøst bindevev og dermis i steder hvor NTP-peptid nr 20 var injisert. Ved 24 t fremkom cellene ble bleke, innskrunpet og nekrotiske, og de var infiltrert med inflammatoriske celler. Nekrosen korrelerte med områdene for injeksjon og synes ikke å spre seg langt fra injeksjonsstedet.

I tillegg til de milde områder av inflammasjon, viste kontrollene ingen bevis på nekrose eller celletap. I motsetning til NTP-peptid nr 17 injeksjonene var hele felter av muskelfibersjikt nekrotiske, viste kontrollene minimale eller fraværende muskelforandringer. Kontrollinjiseringene hadde milde til minimal akuttinflammasjon ved injiseringsstene og fokale mikrohemorhager fra nålene.

Eksempel 4

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP-peptid nr 19 på vev ved injeksjonsstedet.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 19 i saltløsning i en mengde 100-400 µl ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48

individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Som i eksempler ovenfor produserte injisering av NTP-peptid nr 19 celledød og nekrose i vev ved injeksjonsstedene. Kontroller viste minimale eller fraværende forandringer bestående av akutt inflammasjon ved injeksjonsstedene og fokale mikrohemorhager fra nålene.

Eksempel 5

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP- peptid nr 16 på vev ved injeksjonsstedene.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 16 i saltløsning i en mengde 100-400 µl ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t.

De 48 individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Som i eksemplene ovenfor produserte injeksjon av NTP-peptid nr 16 celledød og nekrose i vev ved injeksjonsstedene. Kontrollene viste minimale eller fraværende forandringer bestående av akutt inflammasjon ved injeksjonsstedene og fokale mikrohemorhager fra nålene.

Eksempel 6

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP-peptid nr 15 i vev ved injeksjonsstedene.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 15 i saltløsning i en mengde 100-400 µl ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48 individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Som i eksempler ovenfor produserte injisering av NTP-peptid nr 15 celledød og nekrose i vev ved injeksjonsstedene.

Kontroller viste minimale, eller fraværende forandringer

bestående av akutt inflammasjon ved injeksjonsstedene og fokale mikrohemorrhager fra nålene.

Eksempel 7

Formålet med dette eksempel var å bestemme effekten av NTP-peptid nr 14 i vev ved injeksjonsstedene.

8 normale rotter ble injisert i huden og subkutenøst, hver i 4 forskjellige foki, og i ekstremitetsskjelettmuskel, hver i 2 forskjellige foki, med NTP-peptid nr 14 i saltløsning i en mengde 100-400 ml ved konsentrasjoner av 0,1-1 mg/ml avgitt fra plastsprøyter gjennom en 26 gauge rustfri nål.

Dyrene ble observert i 24 t og smertefritt ofret ved 24 t. De 48 individuelle foki av infiltrering ble kuttet ut, fiksert i 10% formalin, innstøpt i parafin, og farget og undersøkt med standard histopatologiske metoder.

Kontrollene var de samme som i Eks. 1.

Resultater

Som i eksemplet ovenfor produserte injeksjon av NTP-peptid nr 14 celledød og nekrose i vev ved injeksjonsstedene. Kontroller viste minimale, eller fraværende forandringer bestående av akutt inflammasjon ved injeksjonsstedene og fokale mikro-hemorrhager fra nålene.

Det vil være åpenbart for fagkyndige at forskjellige modifiseringer og varianter kan utføres i fremgangsmåtene og materialene ifølge foreliggende oppfinnelse uten at dette avviker fra oppfinnelsens ramme.

PATENTKRAV

1. NTP-peptid, karakterisert ved at det er et neuralt trådprotein (NTP) som består av en aminosyresekvens valgt fra gruppen som består av SEKV ID NR 10-52.
2. Nukleinsyre, karakterisert v e d at den koder for en aminosyresekvens korresponderende til et peptid i samsvar med krav 1.
3. Sammensetning, karakterisert v e d at den omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer og minst et peptid i samsvar med krav 1 eller en eller flere nukleinsyrer i samsvar med krav 2.
4. Anvendelse av et peptid eller en nukleinsyre i samsvar med et krav 1 eller 2, for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning for behandling av en tilstand som krever fjerning eller destruksjon av celler i et pattedyr.
5. Anvendelse av et peptid eller en nukleinsyre i samsvar med krav 4, hvor den farmasøytiske sammensetningen er egnet til oral, subkutenøs, intradermal, intranasal, intravenøs, intramuskulær, intratekal, intratumoral, topikal eller transdermal administrasjon.
6. Anvendelse av et peptid eller en nukleinsyre i samsvar med krav 4, hvor tilstanden er
 - a) en benign eller malign tumor; og/eller
 - b) hyperplasi, hypertrofi, eller en overvekst; og/eller
 - c) viralt-, bakterielt- eller parasittisk forandret;
og/eller
 - d) en malformasjon;

i et vev valgt fra gruppen som består av lunge, bryst, mage, pankreas, prostata, blære, ben, eggstokk, hud, nyre, sinus, tarm,

tynntarm, mage, rektum, esofagus, hjerte, milt, spyttkjertel, blod, hjerne og dens tilhørende omslutninger, ryggmarg og dens tilhørende områder, muskel, bindevev, adrenal, parathyroid, thyroid, livmor, testis, hypofyse, reproduktive organer, lever, galleblære, øye, øre, nese, hals, mandler, munn, og lymfenoder og lymfesystem.

7. Anvendelse i samsvar med krav 4, hvor tilstanden er tonsillarisk hypertrofi, prostatisk hyperplasi, og/eller en kosmetisk modifisering av et vev.

8. Anvendelse i samsvar med krav 4, hvor vevet er valgt fra gruppen som består av hud, øye, øre, nese, hals, munn, muskel, bindevev, hår og bryst.

9. Anvendelse i samsvar med krav 4, hvor tilstanden er en vaskulær sykdom omfattende aterosklerose og arteriosklerose; og/eller hemorroider; og/eller varikosevener.

10. Anvendelse i samsvar med krav 4, hvor tilstanden er valgt fra en eller flere fra gruppen som består av inflammatorisk sykdom, autoimmun sykdom, metabolsk sykdom, arvet/genetisk sykdom, traumatisk sykdom, fysisk skade, ernæringsmangel-sykdom, infektøs sykdom, amyloid sykdom, fibrosesykdom, lagringssykdom, kongenital malformasjon, enzym-mangelsykdom, forgiftning, intoksisering, miljøsykdom, bestrålingssykdom, endokrin sykdom, degenerativ sykdom og mekanisk sykdom.

Figur 1

AD7C-NTP [SEQ ID NO. 1]

1	tttttttttttggag	ATG GAG TTT TCG CTC TTG TTG CCC AGG CTG GAG TGC AAT GGC GCA ATC	62
1		M E F S L L L P R L E C N G A I	16
63	TCA GCT CAC CGC AAC CTC CGC CTC CCG GGT TCA AGC GAT TCT CCT GCC TCA GCC TCC CCA	122	
17	S A H R N L R L P G S S D S P A S A S P	36	
123	GTA GCT GGG ATT ACA GGC ATG TGC ACC CAC GCT CGG CTA ATT TTG TAT TTT TTT TTA GTA	182	
37	V A G I T G M C T H A R L I L Y F F L V	56	
183	GAG ATG GAG TTT CTC CAT GTT GGT CAG GCT GGT CTC GAA CTC CCG ACC TCA GAT GAT CCC	242	
57	E M E F L H V G Q A G L E L P T S D D P	76	
243	TCC GTC TCG GCC TCC CAA AGT GCT AGA TAC AGG ACT GGC CAC CAT GCC CGG CTC TGC CTG	302	
77	S V S A S Q S A R Y R T G H H A R L C L	96	
303	GCT AAT TTT TGT GGT AGA AAC AGG GTT TCA CTG ATG TGC CCA AGC TGG TCT CCT GAG CTC	362	
97	A N F C G R N R V S L M C P S W S P E L	116	
363	AAG CAG TCC ACC TGC CTC AGC CTC CCA AAG TGC TGG GAT TAC AGG CGT GCA GCC GTG CCT	422	
117	K Q S T C L S L P K C W D Y R R A A V P	136	
423	GGC CTT TTT ATT TTA TTT TTT TTA AGA CAC AGG TGT CCC ACT CTT ACC CAG GAT GAA GTG	482	
137	G L F I L F F L R H R C P T L T Q D E V	156	
483	CAG TGG TGT GAT CAC AGC TCA CTG CAG CCT TCA ACT CCT GAG ATC AAG CAT CCT CCT GCC	542	
157	Q W C D H S S L Q P S T P E I K H P P A	176	
543	TCA GCC TCC CAA GTA GCT GGG ACC AAA GAC ATG CAC CAC TAC ACC TGG CTA ATT TTT ATT	602	
177	S A S Q V A G T K D M H H Y T W L I F I	196	
603	TTT ATT TTT AAT TTT TTG AGA CAG AGT CTC AAC TCT GTC ACC CAG GCT GGA GTG CAG TGG	662	
197	F I F N F L R Q S L N S V T Q A G V Q W	216	
663	CGC AAT CTT GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG TTC AAG TTA TTC TCC TGC CCC AGC	722	
217	R N L G S L Q P L P P G F K L F S C P S	236	
723	CTC CTG AGT AGC TGG GAC TAC AGG CGC CCA CCA CGC CTA GCT AAT TTT TTT GTA TTT TTA	782	
237	L L S S W D Y R R P P R L A N F F V F L	256	
783	GTA GAG ATG GGG TTC ACC ATG TTC GCC AGG TTG ATC TTG ATC TCT GGA CCT TGT GAT CTG	842	
257	V E M G F T M F A R L I L I S G P C D L	276	
843	CCT GCC TCG GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGC GTG AGC CAC CAC GCC CGG CTT ATT	902	
277	P A S A S Q S A G I T G V S H H A R L I	296	
903	TTT AAT TTT TCT TTG TTT GAA ATG GAA TCT CAC TCT GTT ACC CAG GCT GGA GTG CAA TGG	962	
297	F N F C L F E M E S H S V T Q A G V Q W	316	
963	CCA AAT CTC GGC TCA CTG CAA CCT CTG CCT CCC GGG CTC AAG CGA TTC TCC TGT CTC AGC	1022	
317	P N L G S L Q P L P P G L K R F S C L S	336	
1023	CTC CCA AGC AGC TGG GAT TAC GGG CAC CTG CCA CCA CAC CCC GCT AAT TTT TGT ATT TTC	1082	
337	L P S S W D Y G H L P P H P A N F C I F	356	
1083	ATT AGA GGC GGG GTT TCA CCA TAT TTG TCA GGC TGG TCT CAA ACT CCT GAC CTC AGG tgac	1143	
357	I R G G V S P Y L S G W S Q T P D L R	375	
1144	ccacctgcctcagccttccaaagtgcctgggattacaggcgtgagccacctcaccagccggctaatttagataaaaaaat	1223	
1224	atgtagcaaatgggggtcttgcctatgttgccaggctggtctcctcaacttctgggttcattgcaatccttccaaatgagcca	1303	
1304	caacacccagccagtcacatttttcaaacagttacatcttttatttttagtatactagaaagtaataacaataaacatgtcaa	1383	
1384	acctgcaaattcagtagtaacagagttctttttataactttttaacaaagcttttagagca	1442	

Figur 2

NTP[122] [SEQ ID NO. 2]

```

1   Met-Met-Val-Cys-Trp-Asn-Arg-Phe-Gly-Lys-
    M  M  V  C  W  N  R  F  G  K

11  Trp-Val-Tyr-Phe-Ile-Ser-Ala-Ile-Phe-Asn-
    W  V  Y  F  I  S  A  I  F  N

21  Phe-Gly-Pro-Arg-Tyr-Leu-Tyr-His-Gly-Val-
    F  G  P  R  Y  L  Y  H  G  V

31  Pro-Phe-Tyr-Phe-Leu-Ile-Leu-Val-Arg-Ile-
    P  F  Y  F  L  I  L  V  R  I

41  Ile-Ser-Phe-Leu-Ile-Gly-Asp-Met-Glu-Asp-
    I  S  F  L  I  G  D  M  E  D

51  Val-Leu-Leu-Asn-Cys-Thr-Leu-Leu-Lys-Arg-
    V  L  L  N  C  T  L  L  K  R

61  Ser-Ser-Arg-Phe-Arg-Phe-Trp-Gly-Ala-Leu-
    S  S  R  F  R  F  W  G  A  L

71  Val-Cys-Ser-Met-Asp-Ser-Cys-Arg-Phe-Ser
    V  C  S  M  D  S  C  R  F  S

81  Arg-Val-Ala-Val-Thr-Tyr-Arg-Phe-Ile-Thr-
    R  V  A  V  T  Y  R  F  I  T

91  Leu-Leu-Asn-Ile-Pro-Ser-Pro-Ala-Val-Trp-
    L  L  N  I  P  S  P  A  V  W

101 Met-Ala-Arg-Asn-Thr-Ile-Asp-Gln-Gln-Val-
    M  A  R  N  T  I  D  Q  Q  V

111 Leu-Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Glu-Ile-Lys-Arg-
    L  S  R  I  K  L  E  I  K  R

121 Cys-Leu
    C  L

```

Figur 3

NTP[112] [SEQ ID NO. 3]

1 Met-Ala-Gln-Ser-Arg-Leu-Thr-Ala-The-Ser-
M A Q S R L T A T S

11 Ala-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Ile-Leu-Leu-Ser-
A S R V Q A I L L S

21 Gln-Pro-Pro-Lys-Gln-Leu-Gly-Leu-Arg-Ala-
Q P P K Q L G L R A

31 Pro-Ala-Asn-Thr-Pro-Leu-Ile-Phe-Val-Phe-
P A N T P L I F V F

41 Ser-Leu-Glu-Ala-Gly-Phe-His-His-Ile-Cys-
S L E A G F H H I C

51 Gln-Ala-Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Thr-Ser-Gly-
Q A G L K L L T S G

61 Asp-Pro-Pro-Ala-Ser-Ala-Phe-Gln-Ser-Ala-
D P P A S A F Q S A

71 Gly-Ile-Thr-Gly-Val-Ser-His-Leu-Thr-Gln-
G I T G V S H L T Q

81 Pro-Ala-Asn-Leu-Asp-Lys-Lys-Ile-Cys-Ser-
P A N L D K K I C S

91 Asn-Gly-Gly-Ser-Cys-Tyr-Val-Ala-Gln-Ala-
N G G S C Y V A Q A

101 Gly-Leu-Lys-Leu-Leu-Ala-Ser-Cys-Asn-Pro-
G L K L L A S C N P

111 Ser-Lys
S K

Figur 4

NTP[106] [SEQ ID NO. 4]

```

1   Met-Trp-Thr-Leu-Lys-Ser-Ser-Leu-Val-Leu-
    M   W   T   L   K   S   S   L   V   L

11  Leu-Leu-Cys-Leu-Thr-Cys-Ser-Tyr-Ala-Phe-
    L   L   C   L   T   C   S   Y   A   F

21  Met-Phe-Ser-Ser-Leu-Arg-Gln-Lys-Thr-Ser-
    M   F   S   S   L   R   Q   K   T   S

31  Glu-Pro-Gln-Gly-Lys-Val-Pro-Cys-Gly-Glu-
    E   P   Q   G   K   V   P   C   G   E

41  His-Phe-Arg-Ile-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Glu-
    H   F   R   I   R   Q   N   L   P   E

51  His-Thr-Gln-Gly-Trp-Leu-Gly-Ser-Lys-Trp-
    H   T   Q   G   W   L   G   S   K   W

61  Leu-Trp-Leu-Leu-Phe-Ala-Val-Val-Pro-Phe-
    L   W   L   L   F   A   V   V   P   F

71  Val-Ile-Leu-Lys-Cys-Gln-Arg-Asp-Ser-Glu-
    V   I   L   K   C   Q   R   D   S   E

81  Lys-Asn-Lys-Val-Arg-Met-Ala-Pro-Phe-Phe-
    K   N   K   V   R   M   A   P   F   F

91  Leu-His-His-Ile-Asp-Ser-Ile-Ser-Gly-Val-
    L   H   H   I   D   S   I   S   G   V

101 Ser-Gly-Lys-Arg-Met-Phe
    S   G   K   R   M   F

```

Figur 5

NTP [106] [SEQ ID NO. 5]

```

1   Met-Phe-Phe-Val-Leu-Tyr-Arg-Phe-Cys-Phe-
    M   F   F   V   L   Y   R   F   C   F

11  Cys-Phe-Phe-Glu-Thr-Glu-Ser-His-Ser-Leu-
    C   F   F   E   T   E   S   H   S   L

21  Thr-Gln-Ala-Gly-Val-Gln-Trp-Cys-Glu-Leu-
    T   Q   A   G   V   Q   W   C   E   L

31  Gly-Ser-Pro-Gln-Pro-Leu-Pro-Ser-Gly-Phe-
    G   S   P   Q   P   L   P   S   G   F

41  Lys-Arg-Phe-Ser-Cys-Leu-Ser-Leu-Leu-Ser-
    K   R   F   S   C   L   S   L   L   S

51  Ser-Trp-Asp-Tyr-Ser-His-Glu-Pro-Pro-His-
    S   W   D   Y   S   H   E   P   P   H

61  Pro-Val-Ile-Cys-Ser-Phe-Leu-Met-Glu-Lys-
    P   V   I   C   S   F   L   M   E   K

71  Cys-Leu-Ile-Leu-Tyr-Lys-Pro-Asn-Gly-Asp-
    C   L   I   L   Y   K   P   N   G   D

81  Thr-Ile-Gly-Pro-Ile-Leu-Val-Gln-Gln-Gly-
    T   I   G   P   I   L   V   Q   Q   G

91  Lys-Arg-Gln-Lys-Leu-Tyr-Ile-Ser-Ala-Asp-
    K   R   Q   K   L   Y   I   S   A   D

100 Leu-Val-His-Leu-Ile-Ala
    L   V   H   L   I   A

```

Figur 6

NTP[98] [SEQ ID NO. 6]

1 Glu-Ala-Tyr-Tyr-Thr-Met-Leu-His-Leu-Pro-
 E A Y Y T M L H L P

11 Thr-Thr-Asn-Arg-Pro-Lys-Ile-Ala-His-Cys
 T T N R P K I A H C

21 Ile-Leu-Phe-Asn-Gln-Pro-His-Ser-Pro-Arg-
 I L F N Q P H S P R

31 Ser-Asn-Ser-His-Ser-His-Pro-Asn-Pro-Leu-
 S N S H S H P N P L

41 Lys-Leu-His-Arg-Arg-Ser-His-Ser-His-Asn-
 K L H R R S H S H N

51 Arg-Pro-Arg-Ala-Tyr-Ile-Leu-Ile-Thr-Ile-
 R P R A Y I L I T I

61 Leu-Pro-Ser-Lys-Leu-Lys-Leu-Arg-Thr-His-
 L P S K L K L R T H

71 Ser-Gln-Ser-His-His-Asn-Pro-Leu-Ser-Arg-
 S Q S H H N P L S R

81 Thr-Ser-Asn-Ser-Thr-Pro-Thr-Asn-Ser-Phe-
 T S N S T P T N S F

91 Leu-Met-Thr-Ser-Ser-Lys-Pro-Arg
 L M T S S K P R

Figur 7

NTP[75] [SEQ ID NO. 7]

1 Ser-Ser-Ser-Leu-Gly-Leu-Pro-Lys-Cys-Trp-
S S S L G L P K C W

11 Asp-Tyr-Arg-His-Glu-Leu-Leu-Ser-Leu-Ala-
D Y R H E L L S L A

21 Leu-Met-Ile-Asn-Phe-Arg-Val-Met-Ala-Cys
L M I N F R V M A C

31 Thr-Phe-Lys-Gln-His-Ile-Glu-Leu-Arg-Gln-
T F K Q H I E L R Q

41 Lys-Ile-Ser-Ile-Val-Pro-Arg-Lys-Leu-Cys-
K I S I V P R K L C

51 Cys-Met-Gly-Pro-Val-Cys-Pro-Val-Lys-Ile-
C M G P V C P V K I

61 Ala-Leu-Leu-Thr-Ile-Asn-Gly-His-Cys-Thr-
A L L T I N G H C T

71 Trp-Leu-Pro-Ala-Ser
W L P A S

Figur 8

NTP[68] [SEQ ID NO. 8]

1 Met-Phe-Val-Phe-Cys-Leu-Ile-Leu-Asn-Arg-
M F V F C L I L N R

11 Glu-Lys-Ile-Lys-Gly-Gly-Asn-Ser-Ser-Phe-
E K I K G G N S S F

21 Phe-Leu-Leu-Ser-Phe-Phe-Phe-Ser-Phe-Gln-
F L L S F F F S F Q

31 Asn-Cys-Cys-Gln-Cys-Phe-Gln-Cys-Arg-Thr-
N C C Q C F Q C R T

41 Thr-Glu-Gly-Tyr-Ala-Val-Glu-Cys-Phe-Tyr-
T E G Y A V E C F Y

51 Cys-Leu-Val-Asp-Lys-Ala-Ala-Phe-Glu-Cys-
C L V D K A A F E C

61 Trp-Trp-Phe-Tyr-Ser-Phe-Asp-Thr
W W F Y S F D T

Figur 9

NTP[61] [SEQ ID NO. 9]

1 Met-Glu-Pro-His-Thr-Val-Ala-Gln-Ala-Gly-
M E P H T V A Q A G

11 Val-Pro-Gln-His-Asp-Leu-Gly-Ser-Leu-Gln-
V P Q H D L G S L Q

21 Ser-Leu-Leu-Pro-Arg-Phe-Lys-Arg-Phe-Ser-
S L L P R F K R F S

31 Cys-Leu-Ile-Leu-Pro-Lys-Ile-Trp-Asp-Tyr-
C L I L P K I W D Y

41 Arg-Asn-Met-Asn-Thr-Ala-Leu-Ile-Lys-Arg-
R N M N T A L I K R

51 Asn-Arg-Tyr-Thr-Pro-Glu-Thr-Gly-Arg-Lys-
N R Y T P E T G R K

61 Ser
S