P02 141

Felületaktív mesterséges peptidek és alkalmazásuk mesterséges felületaktív anyag előállítására

K I V O N A T

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Felületi aktivitású SP-C-analóg mesterséges peptideket tárunk fel és azok alkalmazását mesterséges felületaktív anyag előállítására, amelyek respiratórikus disztressz szindrómával (RDS) kapcsolatos felületaktív-anyag hiány és rendellenes működés kezelésére alkalmasak.

BOROS ISTVÁN

Aktaszámunk: 95067-4023/LT

P02 141

A2

Felületaktív mesterséges peptidek és alkalmazásuk mesterséges felületaktív anyag előállítására

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány tárgyát mesterséges felületaktív peptidek képezik. A találmány tárgya előnyösen SP-C-analógok, amelyek megfelelő lipidekkel kombinálva különösen hatásosak a felületi feszültség csökkentésére a levegő-folyadék határfelületen.

A találmány szerinti peptidek tehát lipidekkel kombinálva, vagy opcionálisan SP-B-vel vagy annak aktív analógjával vagy helyettesítőjével kombinálva alkalmazhatók mesterséges felületaktív anyagok előállítására, amelyek respiratórikus disztressz szindróma (RDS) és egyéb tüdőbetegségekkel - mint például tüdőgyulladás, bronhitisz, asztma, mekónium aspirációs szindróma - és más betegségekkel is - mint például súlyos középfülgyulladás (ragadós fül) - kapcsolatos felületaktív-anyag hiány és rendellenes működés kezelésére alkalmasak.

A tüdőben található felületaktív anyag csökkenti a felületi feszültséget a léghólyagok falán lévő levegő-folyadék határfelületen, megakadályozva a tüdő összeesését teljes kilégzéskor. A felületaktív-anyag hiányosság gyakori rendellenesség koraszülöttekben ami respiratórikus disztressz szindrómát (RDS) okoz, amelyet hatásosan kezelhető állati tüdőből extrahált természetes felületaktív anyagokkal [Fujiwara, T. és Robertson, B., „Pulmonary Surfactant:

From Molecular Biology to Clinical Parctice", 561-592. old., szerk.: Roberson, B., van Golde, l.M.G. és Batenburg, B., kiad.: Elsevier, Amsterdam (1992)]. A felületaktív készítmények fő komponensei foszfolipidek, mint például 1,2,-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-foszfokolin (DPPC), foszfatidilglicerol (PG) és a B és C jelű hidrofób felületaktív fehérjék (SP-B és SP-C). Az SP-A és SP-D hidrofil felületaktív fehérjék, amelyek C-típusú (Ca^{2+}-függő) kollagénszerű lektinek, és amelyekről úgy tartják, hogy elsősorban a gazda-védelmi rendszerben játszanak szerepet, rendes körülmények között nem részei a felületaktív készítményeknek az alkalmazott szerves oldószeres extrakciós eljárások miatt.

SP-B és SP-C csak körülbelül 1-2%-át teszik ki a teljes felületaktív anyag mennyiségnek, de még így is képesek jelentős javulást kifejteni a felületi aktivitásra a tiszta lipidkészítményekhez hasonlítva [Curstedt, T. és mtsai., Eur. J. Biochem. 168, 255-262. old. (1987); Takahashi, A., Nemoto T. és Fujiwara, T., Acta Paediatr. Jap. 36, 613-618. old. (1994)]. Az SP-B és SP-C elsődleges és másodlagos szerkezetét, valamint az SP-C harmadlagos szerkezetét meghatározták. Az SP-B-t két azonos, 79 aminosavból álló polipeptidlánc alkotja, amelyeket egy láncközti diszulfidhíd kapcsol össze [Curstedt, T. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 2985-2989. old. (1990); Johansson, J., Curstedt, T. és Jörnvall, H., Biochemistry 30, 6917-6921. old. (1991)]. Mindkét monomer láncban három láncon belüli diszulfid-híd, és legalább négy amfipatikus hélix van, amelyek egy poláros és egy apoláros oldalt alkotnak,

amelyen keresztül az SP-B két lipid-kettősréteggel léphet kölcsönhatásba, és hozhatja azokat közel egymáshoz [Andersson, M. és mtsai., FEBS Lett. 362, 328-332. old. (1995)]. SP-C 35 aminosavból álló lipoprotein, egy, a 9-34. oldalláncok közötti α-hélixszel [Johansson, J. és mtsai., Biochemistry 33, 6015-6023. (1994)]. A hélixet főként valil-oldalláncok alkotják, és lipid-kettősrétegbe van beágyazva a lipidek acil-láncaival párhuzamosan [Vandenbussche és mtsai, Eur. J. Biochem. 203, 201-209. old. (1992)]. A peptid N-terminális végén az 5. és 6. ciszтein oldallánchoz két palmitoil-csoport van kovalensen kötve [Curstedt, T. és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 2985-2989. old. (1990)]. A 11. és 12. helyen lévő két konzervált pozitíven töltött oldallánc, arginin és lizin, valószínűleg a lipid membrán negatív töltésű fejcsoportjaival van kölcsönhatásban, ezáltal növelve annak merevségét. A lipid-peptid kölcsönhatás merevsége csökkenhet a C-terminális felé, mivel az csak kicsi vagy hidrofób oldalláncokat tartalmaz, potenciálisan mozgékonyabbá téve ezt a részt a foszfolipid-kettősrétegben. Úgy gondolják, hogy az SP-C befolyásolja a körülötte lévő lipidek vastagságát és folyékonyságát a rendkívül stabil poli-valil-hélix révén [Johansson, J. és Curstedt, T., Eur. J. Biochem. 244, 675-693. old. (1997)].

Mivel az állati szövetekből nyert felületaktív anyag preparátumoknak számos hátránya van, mint a kis mennyiségben való elérhetőségük és annak a lehetősége, hogy fertőző anyagokat tartalmaznak, valamint immunológia reakciót vál-

tanak ki, történtek próbálkozások mesterséges felületaktív anyagok készítésére [Johansson, J. és Curstedt, T., Eur. J. Biochem. 244, 675-693. old. (1997); Johansson, J. és mtsai., Acta Paediatr. 85, 642-646. old. (1996)], általában szintetikus lipidekből és hidrofób fehérjékből.

Korábbi munkák feltárták, hogy a szintetikus SP-C nem veszi fel az optimális felületi aktívitáshoz szükséges α-hélix konformációt, mint a természtes peptid [Johansson, J. és mtsai., Biochem. J. 307, 535-541. old. (1995)], és ezáltal nem megfelelő a kölcsönhatása a felületaktív lipidekkel.

Következésképpen a szintetikus SP-C-analógok sem veszik fel a megfelelő konformációt, mint a természtes peptid, és nem megfelelő a kölcsönhatásuk a felületaktív lipidekkel. E probléma kikerülésére érdekében számos próbálkozás történt a szekvencia módosítására, például a természetes SP-C hélixének összes Val-oldalláncának Leu-val történő helyettesítésével, ami erősen kedvez az α-hélix konformációnak. A megfelelő transzmembrán analóg, SP-C(Leu) jó szétterülést mutatott a levegő-folyadék határfelületen DPPC:PG:PA (68:22:9) (w/w/w) elegyével kombinálva. Azonban ciklikus felszíni kompresszió során a maximális felületi feszültség értéke (γ_{max}) szignifikánsan magasabb volt, mint a természetes felületaktív anyagé. Ezenfelül nem volt lehetséges 20 mg-ml-nél töményebb lipid-peptid elegyeket készíteni, valószínűleg peptid-oligomerek kialakulása miatt [Nilsson, G. és mtsai., Eur. J. Biochem. 255, 116-124. old. (1998)]. Mások különböző hosszúságú bioaktív poli-leucin

SP-C-analógokat szintetizáltak [Takei, T. és mtsai., Biol. Pharm. Bull. 19, 1550-1555. old. (1996)]. Ez utóbbi tanulmányokban sem oligomerizációt, sem nagy lipid-koncentrációjú minták elkészítésével kapcsolatos problémákat nem jeleztek.

Különböző közlemények foglalkoznak természetes felületaktív anyagok peptidanalógjai előállításának problémájával, számos különböző megoldást javasolva. E közlemények közül a WO 93/21225. számú nemzetközi közzétételi irat, az EP 733 645. számú európai közzétételi irat és a WO 96/17872. számú nemzetközi közzétételi irat (Tokyo Tanabe) a természetes SP-C peptidanalógjait tárja fel, amelyek általában az N-terminális szekvenciát illetően különböznek a természetes peptidtől.

A Scripps Research Institute WO 89/06657. és WO 92/22315. számú nemzetközi közzétételi iratai SP-B-analógot tárnak fel, amelyek felváltva hidrofób és hidrofil aminosav-oldalláncokat tartalmaznak. Egyebek közt lizint és leucint váltakozva tartalmazó peptidet (KL_4) is igényelnek.

Clercx, A. és mtsai. [Eur. J. Biochem. 229, 465-472. old. (1995)] a sertés SP-C, valamint a sertés SP-C-ből és bakteriorodopszinból származó hibrid peptidek N-terminálisának megfelelő különböző hosszúságú peptideket tárnak fel.

Johansson, J. és mtsai. [Biochem. J. 307, 535-541. old. (1995)] a sertés SP-C-től néhány aminosav helyettesítésével eltérő szintetikus peptideket tárnak fel.

WO 89/04326. számú nemzetközi közzétételi irat (California Biotechnology - Byk Gulden) és a WO 91/18015. számú nemzetközi közzétételi irat (California Biotechnology - Scios Nova) olyan SP-C-analógot tár fel, amelyben a természetes SP-C kezdeti N-terminális szekvenciájának két Cys-oldalláncát két Ser helyettesíti.

Azt találtuk, hogy az alábbi jellemzőket kombináló SP-C-analógok különösen előnyös felületi feszültséget csökkentő tulajdonságokat mutatnak: i) Val-oldalláncokat más semleges és hidrofób oldalláncok helyettesítik; ii) Cys-oldalláncokat Ser-oldalláncok helyettesítik; iii) néhány semleges aminosav-oldalláncot nagyméretű vagy poláros oldalláncok helyettesítenek. Azt találtuk, hogy különösen az utóbbi jellemző, a poláros oldalláncok által okozott pozitív töltések vagy a nagyméretű helyettesítők miatti térbeli gátlás segít elkerülni az oligomerizációt.

Az alábbi első megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezik az (I) általános képlettel megadott SP-C-analógok (az egybetűs aminosavkód alkalmazásával):

$$F_eG_fPZZPVHLKR(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_dGALLMGL \qquad (I)$$

ahol:

X jelentése a V, I, L vagy Nle (norleucin) aminosavak bármelyike;

B jelentése az Ornitin, K, I, W, F, Y, Q vagy N aminosavak bármelyike;

Z jelentése az S, C vagy F aminosavak bármelyike, ahol Ser- vagy Cys-oldalláncokhoz opcionálisan 12-22 szénatomot

tartalmazó acil-csoportok vannak kötve észter- vagy tioészter-kötéssel.

a értéke egész szám 1 és 19 között

b értéke egész szám 1 és 19 között

c értéke egész szám 1 és 21 között

d értéke egész szám 0 és 20 között

e értéke 0 vagy 1

f értéke 0 vagy 1

n értéke 0 vagy 1

m értéke 0 vagy 1

azzal a feltétellel, hogy

- $n + m > 0$,

- $f \geq e$;

- $(X_aB)_n(X_bB)_n(X_cB)_mX_d$ maximum 22 aminosavat, előnyösen 10-22 aminosavat tartalmazó szekvencia,.

Az (I) általános képlet szerinti előnyös peptidek az alábbiak:

(Ia) $FGIPSSPVHLKRX_4BX_4BX_4BXGALLMGL$

(Ib) $FGIPSSPVHLKRX_5BX_5BX_4GALLMGL$

(Ic) $FGIPSSPVHLKRX_4BX_{11}GALLMGL$

(Id) $FGIPSSPVHLKRX_8BX_7GALLMGL$

(Ie) $FGIPSSPVHLKRX_{11}BX_4GALLMGL$

Az (Ia) - (Ie) szekvenciák közül azok előnyösek, amelyekben B jelentése Lys vagy Phe és X jelentése Leu, Ile vagy Nle.

Előnyös megvalósítási módok szerint az (Ia)-(If) általános képlettel megadott peptidek szekvenciája sorrendben a következő:

FGIPSSPVHLKRLLILKLLLLKILLLKLGALLMGL [SP-C (LKS)]

FGIPSSPVHLKRLLILLKLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C $(LKS)_1$]

FGIPSSPVHLKRLLILKLLLLLILLLILGALLMGL [SP-C $(LKS)_2$]

FGIPSSPVHLKRLLILLLLLKLILLLILGALLMGL [SP-C $(LKS)_3$]

FGIPSSPVHLKRLLILLLLLLLLIKLLILGALLMGL [SP-C $(LKS)_4$]

FGIPSSPVHLKRLLILFLLLLFILLLFLGALLMGL [SP-C (LFS)]

A találmány egy még előnyösebb megvalósítási módja szerint a Ser-oldalláncokhoz 12-22 szénatomot tartalmazó acil-csoportok vannak kovalensen kötve.

Az (I) általános képlettel megadott peptideket szintetikus vagy rekombináns úton állíthatjuk elő.

Hagyományos szintetikus eljárások találhatók például az alábbi publikációkban: Schroeder és mtsai., „The peptides", 1. kötet, kiad.: Academic Press (1965); Bodanszky és mtsai., „Peptid synthesis", kiad.: Interscience Publisher (1996); Baramy és Merrifield, „The Peptides; Analysis, Synthesis, Biology", 2. kötet, 1. fejezet, kiad.: Academic Press (1980). Az eljárások tartalmazzák peptidek szintézisét szilárd fázison, oldatban, szerves kémiai eljárásokkal, vagy azok bármilyen kombinációjával.

S- vagy O-acilált peptideket előnyösen a nem acilált peptidek acil-kloriddal való kezelésével szintetizálhatunk tiszta trifluorecetsavban, Yousefi-Salakdeh és mtsai. [Biochem. J. 343, 557-562. old. (1999)] leírása alapján. Szintézis és tisztítás után a szintetikus peptidek biokémiai és biofizikai tulajdonságait meghatározzuk, amint az alábbi Szabadalmi Példák részben azt bemutatjuk.

A találmány szerinti peptidek felületi feszültséget csökkentő aktivitását lipidekkel és foszfolipidekkel, SP-B és annak helyettesítőivel keverve értékeltük. A peptideket előnyösen DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-foszfoko-lin)-/PG (foszfatidil-glicerol)/PA (palmitinsav) elegyével és polimixinekkel kevertük, SP-B vagy annak aktív analógjának jelenlétében vagy anélkül.

A pulzáló-buborékos felületi aktivitási vizsgálatok eredményei egyértelműen mutatják, hogy a találmány szerinti szintetikus peptidek jelentősen lecsökkentik a minimális és maximális felületi feszültséget (γ_{min} és γ_{max}) ciklikus felszíni kompresszió során olyan értékre, amely a természetes felületaktív anyagok alkalmazásával nyert értékekkel összehasonlíthatók.

SP-B vagy annak aktív analógjának a peptid/lipid-foszfolipid-elegyhez adása különösen előnyös eredményeket adott. Ezenkívül meglepő módon azt találtuk, hogy polimixinek, különösen a polimixin B, helyettesítik SP-B-t, és hozzáadásuk az SP-B alkalmazásával összehasonlítható eredményeket ad.

Második megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát szintetikus felületaktív anyag képezi, amely egy vagy több (I) általános képlettel megadott peptidet tartalmaz, lipidekkel és/vagy foszfolipidekkel és opcionálisan SP-B-vel vagy annak aktív származékával vagy polimixinekkel keverve. Megfelelő lipidek/foszfolipidek a foszfatidilkolinok (előnyösen DPPC), PG, PA, trigliceridek, szfingomielin bármelyike.

A találmány egy még előnyösebb megvalósítási módja szerint olyan peptidet tartalmazó felületaktív anyag elegyet alkalmazunk, amely a Ser-oldallánchoz O-kovalensen kötött palmitoil-láncot tartalmaz. Azt találtuk, hogy az [SP-C(Leu)] referncia-peptid dipalmitoilált formáját tartalmazó felületaktív anyag elegyek nagyobb felületi filmbeli stabilitást és megnövelt felszíni lipid-rezervoár-méretet mutatnak a megfelelő nem palmitoilált peptidet tartalmazó eleggyel összehasonlítva, a visszatartott buborék rendszer mérései alapján. Az 5% dipalmitoilált peptidet tartalmazó mintában γ_{min} 1,5 mN/m alatt volt és a filmek nagyon stabilak voltak, minthogy a felületi feszültség csak 0,5 mN/m-rel növekedett 10 perc alatt, állandó buborék térfogat mellett. Ezzel ellentétben a nem-palmitoilált peptid γ_{min} értéke 5 mN/m volt és a filmek kevésbé voltak stabilak, amit a kis felületi feszültségeknél megfigyelt gyakori buborékelpattanás mutatott. Ezenfelül a szubfázis kimerítése után a nem-palmitoilált peptidet tartalmazó minták zéró-közeli stabil felületi feszültség elérésére vonatkozó képessége elveszett néhány adszorpciós lépés után, míg a diplamitoilált peptidekkel a film minősége nem romlott, még több mint 10 expanziós lépés és több mint két lipidrétegnek megfelelő tartalék-anyag beépítése után sem. A dipalmitoilált peptidek javított felületi feszültségét pulzáló-buborékos felületi feszültségmérővel is igazoltuk. Ezenkívül azt találtuk, hogy az acil-csoportok jelenléte tovább csökkentette az oligomerek képzésére való hajlamot. Ez a felismerés nagyon fontos, mivel mesterséges felületaktív anyagok készí-

E2079

tésekor a peptidek oligomerizációja megakadályozta 20 mg/ml-nél töményebb elegyek készítését [Nilsson, G. és mtsai., Eur. J. Biochem. 255, 116-124. old. (1998)].

A szintetikus felületaktív anyagot petidek és lipidek oldatainak és szuszpenzióinak összekeverésével készíthetjük el, majd az elegyet beszárítjuk.

Az alkalmazáskor a száraz elegyet felszuszpendálhatjuk, diszpergálhatjuk vagy porként adhatjuk be felületaktív anyag-hiány miatt kezelésre szoruló alanyoknak.

A szintetikus felületaktív anyagot előnyösen légcsövön keresztül vagy aeroszolként adhatjuk be. A beadás utóbbi formája a felületaktív anyag kis részecskéinek megfelelő inert hajtógázzal való keverését igényelheti. A beadás más formái, mint például stabil oldatok/szuszpenziók porlasztása vagy permetezése szintén a találmány oltalmi körébe tartozik.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgyát képezi a feltárt peptidek alkalmazása felületaktív reagens készítésére, amely tüdőbetegségekkel - mint például tüdőgyulladás, bronhitisz, asztma, mekónium aspirációs szindróma - és más betegségekkel is - mint például súlyos középfülgyulladás (ragadós fül) - kapcsolatos minden felnőtt és újszülött felületaktív-anyag hiány és rendellenes működés kezelésére alkalmas.

Tipikusan a felületaktív reagenst - előnyösen légcsövön keresztül beadva - respiratórikus disztressz szindróma kezelésére alkalmazhatjuk, ami gyakran fordul elő koraszülött csecsemőknél.

5079

Az alábbi példákkal részletesen bemutatjuk a találmányt.

1. példa

Peptidek szintézise és tisztítása

SP-C(LKS)-t, az SP-C analógját (1. ábra) szakaszos szilárdfázisú módszer és *terc*-butiloxikarbonil kémia alkalmazásával szintetizáltuk [Kent, S.B.H., Annu. Rev. Biochem. 57, 957-989. old. (1988)] *Applied Biosystems 430A* készüléken. A gyanta és peptid közti kötés lehasítása és a védőcsoportok eltávolítása vízmentes hidrogénfluorid/metoxibenzol/dimetilszulfid 10:1:1 (v/v/v) elegyével történt 1,5 órán át 0°C-on. A védőcsoportokat és gyökfogókat dietiléterrel való ismételt extrakcióval távolítottuk el, majd a peptidet diklórmetán/trifluorecetsav (TFA) 3:1 (v/v) elegyével extraháltuk ki a gyantából, és rotációsan bepároltuk. A nyers peptid extraktumot újra feloldottuk 100 mg/ml koncentrációban kloroform/metanol 1:1 (v/v) 5% vizet tartalmazó elegyében. Egy 10 mg-os alikvotot *Sephadex LH-60* oszlopra (40 x 1 cm) vittünk fel ugyanebben az oldószerben [Curstedt, T. és mtsai., Eur. J. Biochem. 168, 255-262. old. (1987)]. 2,5 ml-es frakciókat gyűjtöttünk és 214 nm-en és 280 nm-en mértük az adszorbanciát. Az azonosítást és mennyiségi meghatározást aminosav-elemzéssel végeztük.

Acilláshoz a tisztított peptidet (tipikusan körülbelül 5 mg-ot) bepároltuk, feloldottuk desztillált TFA-ban (100 µl) és acil-kloridot (10-20 ekviavalens a petidhez képest) adtunk hozzá. 10 perc elteltével a reakciót 80%-os vizes etanollal (1,9 ml) leállítottuk. Az acil-peptidek tisztítását kromatográfiás úton végeztük *Lipidex* 5000 osz-

lopon etilén-klorid/metanol 1:4 (v/v) elegyében, amit fordított-fázisú HPLC követett C18 oszlopon, lineáris gradiens alkalmazásával 2-propanol/0,1% TFA és 60% (vizes) metanol/0,1% TFA vagy 75% (vizes) etanol/0,1% TFA között.

2. példa

Biokémiai jellemzés

A peptid tisztaságát natrium-dodecilszulfát (SDS) poliakrilamid-gélelektroforézissel (PAGE) (*PhastSystem*, Pharmacia, Sweden) és fordított-fázisú magasnyomású folyadék-kromatográfiával (HPLC) ellenőriztük, C_{18}-oszlop és 60% vizes metanol/ 0,1% TFA és izopropanol/ 0,1% TFA közötti lineáris gradiens alkalmazásával [Gustafsson, M. és mtsai., Biochem. J. 326, 799-806. old. (1997)].

A molekulatömegeket „matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight" (MALDI-TOF) tömegspekrometriával határoztuk meg (*Lasermat 2000*, Finnigan MAT), amit vazoaktív intesztinális peptiddel (molekulatömege 3326,8) kalibráltunk.

A peptidek másodlagos szerkezetét cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia alkalmazásával vizsgáltuk (*Jasco-720*, Jasco, Japan). Trifluoroetanolban (TFE) való feloldás után a spektrumokat 260 és 184 nm között vettük fel, 20 nm/perc letapogatási sebességgel és 2 mérés/nm pontossággal. Kiszámítottuk a reziduális moláris ellipticitást, és kdeg x cm^2/dmol értékben fejeztük ki. 208 és 222 nm-nél mért moláris ellipticitást alkalmaztuk a helikális szerkezetek arányának becslésére [Barrow, C.J. és mtsai., J. Mol. Biol. 225, 1075-1093. old. (1992].

Az SP-C(LKS) másodlagos szerkezetének vizsgálata CD-spektroszkópiával α-hélixet tartalmazó peptidek tipikus spektrumát mutatta, és a 208 és 222 nm-es minimumok alapján körülbelül 75%-os α-hélix tartalmat becsültünk. A másodlagos szerkezet stabil maradt vízzel való szakaszos hígítást követően 12% TFE-tartalomig, amennyiben a peptidet tiszta TFE-ben oldottuk fel.

Az SP-C(LKS) SDS-PAGE-n egy csíkot mutatott a természetes SP-C-hez hasonlóan, míg az SP-C(Leu) - amelyben nincs Lys a hélixben - oligomereket alkot. Az SP-C(Leu)/lipid elegyeknél tapasztaltakkal ellentétben - amelyeket nehéz 20 mg/ml-nél töményebben feloldani [Nilsson, G. és mtsai., Eur. J. Biochem. 255, 116-124. old. (1998)] - , lehetséges volt 80 mg/ml lipid-koncentrációjú SP-C(LKS)/lipid elegyet létrehozni 0,03 polipeptid/lipid arány mellett.

3. példa

Peptid/lipid elegyek előállítása

A DPPC-t, PG-t és PA-t a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, MO) szereztük be. A kloroform/ metanol 98:2 (v/v) elegyben feloldott lipideket DPPC:PG:PA 68:22:9 (w/w/w) vagy DPPC/PG 7:3 (w/w) arányban elegyítettük. Felületaktív anyag készítményeket SP-C(LKS)-nek vagy SP-C(LKS)-nek és SP-B-nek a lipid elegyekhez történő hozzáadásával állítottunk elő 0-tól 0,05-üg terjedő végső polipeptid/lipid tömegarányt eredményezve. Az elegyeket nitrogén alatt bepároltuk és újra feloldottuk 10-80 mg/ml lipid koncentrációban 150 mmol/l NaCl-ban vagy 10 mmol/l Hepes pufferben,

E2079

pH=6,9, ami 140 mmol/l NaCl-t és 2,0 mmol/l $CaCl_2$-t tartalmazott. Ismételt fagyasztást és ultrahangos kezelést (50 W, 48 kHz) hajtottunk végre, amíg homogén szuszpenziókat kaptunk. Egyes esetekben a végső szuszpenzókat 45°C-on inkubáltuk 1 órán át.

A 150 mmol/l NaCl-ben felszuszpendált felületaktív anyag készítmények pH-ja 3,5-5,5. Az alacsonyabb 3,5-4,5 pH-értékeket az SP-B-t tartalmazó készítményeknél figyeltük meg. Mivel a természetes SP-B-t savanyított szerves oldószerekkel tisztítják [Curstedt, T. és mtsai., Eur. J. Biochem. 168, 255-262. old. (1987)], kis mennyiségű sav maradhat a preparátumokban. Fiziológiást megközelítő pH-t értünk el a felületaktív anyag készítmények 140 mmol/l NaCl-t és 2,0 mmol/l $CaCl_2$-t tartalmazó 10 mmol/l Hepes pufferben, pH=6,9 való felszuszpendálásával (1. táblázat). A megfelelő nem pufferelt készítményekhez hasonlítva nem volt változás a γ_{min} és γ_{max} értékekben, amikor DPPC=PG 7:3 (w/w) elegyet alkalmaztunk lipidként. Azonban amikor PA-t is tartalmazott a lipid elegy, mind γ_{min}, mind γ_{max} értéke emelkedett magasabb pH-kon (1. és 2. táblázat).

1. Táblázat: Mesterséges felületaktív anyag-készítmények felületi tulajdonságai fiziológiás sóoldatban

A méréseket közvetlenül a minták elkészítése vagy 45°C-on 1 órán át történő inkubálás után végeztük. A foszfolipidek koncentrációja 10 mg/ml volt 150 mmol/l NaCl-ben. Az adatokat pulzáló buborékos felületi feszültségmérővel vettük fel, 37°C-on 50%-s felületi kompresszió és 40 ciklus/perc mellett. Az értékek 3-5 mérés átlaga(szórás). A rövidítéseket a szövegben definiáltuk.

Felületaktív anyag készítmény			Felületi feszültség (mN/m)					
SP-C(LKS) (% w/w)	SP-B (% w/w)	Foszfolipidek	Inkubálási hőmérséklet	7,5 s		1 perc		5 perc	
				γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
3	-	DPPC/PG/PA	-	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(0)
3	-	DPPC/PG/PA	45°C	<1	41(1)	<1	41(1)	<1	41(1)
3	2	DPPC/PG/PA	-	<1	33(2)	<1	33(2)	<1	33(2)
3	2	DPPC/PG/PA	45°C	<1	34(1)	<1	34(2)	<1	25(2)

3	-	DPPC/PG	-	12	39(5)	14(4)	42(4)	9(5)	42(2)
3	-	DPPC/PG	45°C	8(3)	35(5)	9(3)	39(5)	6(4)	42(3)
3	2	DPPC/PG	-	2(1)	31(1)	2(1)	31(3)	2(1)	33(1)
3	2	DPPC/PG	45°C	3(3)	29(3)	1(1)	33(2)	1(0)	36(1)
3	1	DPPC/PG	-	<1	24(4)	1(2)	26(4)	<1	31(1)
3	0,5	DPPC/PG	45°C	4(2)	29(1)	4(3)	29(2)	3(1)	34(2)

2. Táblázat: Mesterséges felületaktív anyag-készítmények felületi tulajdonságai pufferelt sóoldatban

A méréseket 10 mg/ml koncentrációjú foszfolipidet tartalmazó mintákon végeztük 140 mmol/l NaCl-t és 2,0 mmol/l $CaCl_2$-t tartalmazó 10 mmol/l Hepes pufferben, pH=6,9. Az adatokat pulzáló buborékos felületi feszültségmérővel vettük fel, 37°C-on 50%-s felületi kompresszió és 40 ciklus/perc mellett. Az értékek 3-5 mérés átlaga(szórás). A rövidítéseket a szövegben definiáltuk.

Felületaktív anyag készítmény			Felületi feszültség (mN/m)					
SP-C(LKS) (% w/w)	SP-B (% w/w)	Foszfolipidek	7,5 s		1 perc		5 perc	
			γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
3	-	DPPC/PG/PA	4(1)	44(2)	5(2)	47(2)	7(2)	50(1)
3	2	DPPC/PG/PA	3(3)	38(3)	4(4)	40(2)	3(3)	44(2)
3	-	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	2	DPPC/PG	2(2)	26(3)	1(1)	29(3)	<1	35(1)

3. Táblázat: Mesterséges felületaktív anyag-készítmények felületi tulajdonságai polimixin B-vel és anélkül

Az adatokat pulzáló buborékos felületi feszültségmérővel vettük fel, 37°C-on 50%-s felületi kompresszió és 40 ciklus/perc mellett. Az értékek 5-11 mérés átlaga(szórás). A rövidítéseket a szövegben definiáltuk.

Felületaktív anyag készítmény			Felületi feszültség (mN/m)					
SP-C(LKS) (% w/w)	PxB (% w/w)	Foszfolipidek	7,5 s		1 perc		5 perc	
			γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
3	-	DPPC/PG	15(3)	39(4)	16(2)	42(3)	13(3)	44(3)
3	1	DPPC/PG	3(2)	29(3)	2(2)	31(4)	1(1)	34(2)

S2079

5. példa

Biofizikai jellemzés

Felületi szétterjedési kinetikát mértünk 34-37°C-on Wilhelmy-féle felszíni mérleggel (Biegler, Vienna, Austria). A felületi feszültséget 10 percen át követtük feszülés-mérőhöz kötött platinalemezzel, amit 1 mm mélyen teflon-vályúban lévő 20 ml, 150 mmol/l NaCl hipofázisába helyeztünk. Az összesen 1 mg lipidet tartalmazó szuszpenziókat cseppenként adtuk a hipofázishoz, 4 cm-re a platinalemeztől.

DPPC/PG 7:3 (v/v)-ben szuszpendált 3 w%-os SP-C(LKS) Wilhelmy-féle mérleg alkalmazásával történő kinetikus mérése a gyors széttrejedést mutatott 3 másodperc elteltével 28 mN/m felületi feszültség mellett (2. ábra). A szétterjedés valamelyest lassabb volt 1 w%-os SP-C(LKS) alkalmazásával ugyanazon lipid-elegyben (adatokat nem közlünk). 2 w% SP-B hozzáadása nem változtatta meg szignifikánsan a szétterjedési sebességet és az egyensúlyi felületi feszültséget (2. ábra). Nem volt javulás megfigyelhető az elegyek 45°C-on való 1 órás inkubációját követően sem (adatokat nem közlünk). Hasonló eredményeket kaptunk DPPC:PG:PA 68:22:9 (w/w/w) lipid-eleggyel is (adatokat nem közlünk).

A dinamikus felületi feszültséget pulzáló buborékos felületi feszültség-mérővel vettük fel (Surfactometer International, Toronto, Canada), 37°C-on, a buborékfelszín 50%-s felületi kompressziója és 40 ciklus/perc frekvencia mellett. Minden mérést 5 percig végeztünk 10 mg/ml lipidkoncentrációnál. A buborék falának nyomás-gradiensét megha-

5209

tározott időpontokban mértük, és a minimális és maximális buborékméret felületi feszültségének (γ_{min}, illetve γ_{max}) kiszámítására alkalmaztuk.

A pulzáló buborékos felületi feszültség-mérőben a DPPC:PG:PA 68:22:9 (w/w/w)-ben szuszpendált 3 w%-os SP-C(LKS) 1 mN/m-nél kisebb felületi feszültséget hozott létre a minimális buborékátmérőnél (γ_{min}), míg a γ_{min} 9-14 mN/m volt a DPPC/PG 7:3 (v/v)-ben szuszpendált 3 w%-os SP-C(LKS) esetében. A maximális buborékátmérőnél (γ_{max}) mért felületi feszültség körülbelül 40 mN/m volt mindkét esetben. 2 w% SP-B hozzáadása 31-33 mN/m γ_{max} és 0-2 mN/m γ_{min} értékeket adott mindkét lipid-készítmény esetében. Ezek az értékek nagyon hasonlóak a természetes forrásokból izolált felületaktív anyag készítményekéhez [Robertson, B. és mtsai., Prog. Respir. Res. 25, 237-246. old. (1990)]. A készítmények 45°C-on 1 órán át való inkubálásának nem volt szignifikáns hatása a felületi aktivitásra (1. táblázat). Az SP-B mennyiségének 0.5 w%-ra való csökkentése a DPPC/PG 7:3 (v/v) elegyben szuszpendált 3 w%-os SP-C(LKS) γ_{min} értékének növelését okozta, habár az eredmények nem voltak statisztikusan szignifikánsak (1. táblázat). Ellentétben az SP-B-vel, 2 w% KL_4 hozzáadása [Cochrane, C.G. és Revak, S.D., Science 254, 566-568. old. (1991)] a DPPC:PG:PA 68:22:9 (w/w/w) elegyben szuszpendált 3 w%-os SP-C(LKS)-hoz nem csökkentette γ_{max}-ot, ami viszonylag magas maradt, 41-42 mN/m.

6. példa

Palmitoilált és nem-palmitoilált referencia-petideket tartalmazó elegyek összehasonlítása

A felületaktív anyag készítményeket 3 w% SP-C(Leu)-nak vagy dipalmitoilált SP-C(Leu)-nak DPPC:PG:PA 68:22:9 (w/w/w) lipidelegyekhez való hozzáadásával állítottuk elő. Az elegyeket nitrogén alatt bepároltuk és 10 mg/ml lipid koncentrációban 150 mmol/l NaCl-ban újra felszuszpendáltuk. Azokhoz a mintákhoz, amelyekben SP-B-helyettesítőt alkalmaztunk, 1% (w/w) polimixin B-t adtunk.

A dipalmitoilált SP-C(Leu)-t tartalmazó elegyek - polimixin B-vel vagy anélkül is - szignifikáns javulást mutatnak, különösen a γ_{max} csökkentésében 5 percnél és a γ_{min} csökkentésében korábbi időpontoknál.

4. Táblázat: Felületi tulajdonságok

Az elegyek felületi feszültségét pulzáló buborékos felületi feszültségmérővel mértük. Két perc ekvilibrálás után az adatokat 37°C-on 50%-s felületi kompresszió és 40 ciklus/perc mellett vettük fel különböző időközöknél.

Felületaktív anyag készítmény			Felületi feszültség (mN/m)					
SP-C(Leu) (% w/w)	Dipalm. SP-C(Leu) (% w/w)	PxB (% w/w)	7,5 s		1 perc		5 perc	
			γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}	γ_{min}	γ_{max}
1			11	39	6,2	39	2	42
1		1	3	37	3	38	0	40
	1		1	34	1	35	1	36
	1	1	0	29	0	34	0	35

7. példa

***In vivo* jellemzés**

A felületaktív anyag-terápia éretlen tüdő mechanikai tulajdonságaira gyakorolt hatását kilenc - 27 napos vemhesség után - koraszülött nyúlon értékeltük. Az állatokat születéskor légcsőmetszésnek vetettük alá, és közülük öt kapott kétszer 2,5 ml/kg mesterséges felületaktív anyagot légcsőkanülön keresztül. A felületaktív anyag DPPC-t, PG-t és SP-C(LKS)-t tartalmazott a fentiekben megadott arányban, polimixin B-vel vagy anélkül. Az exogén felületaktív anyag totál foszfolipid koncentrációja 40 mg/ml volt. Két, negatív kontrollként szolgáló állat nem kapott semmit a légcsőkanülön keresztül, és két másik, pozitív kontrollként szolgáló állat módosított természetes felületaktív anyagot (Curosurf, Chiesi Farmaceutici Spa, Parma, Italy) kapott ugyanabban a dózisban, 40 mg/ml-re hígítva. Egy állatot DPPC és PG elegyével kezeltünk fiziológiás sóoldatban (fentivel megegyező koncentrációban), 2,5 ml/kg dózissal. Az összes állatot test-pletizmográf dobozban tartottuk 37°C-os hőmérsékleten 60 percen át, és 100% oxigénnel lélegeztettük *Servo Ventillator 900B* (Siemens-Elema, Solna, Sweden) készülék alkalmazásával 40/perc frekvenciára és 50% belélegzési időre állítva. A légzési térfogatokat a pletizmográfokhoz kapcsolt pneumotachigráffal mértük. Az állatokat 8-10 ml/kg-es standardizált légzési térfogattal lélegeztettük pozitív kilégzésvégi nyomás („positive end-expiratory pressure", PEEP) nélkül. A tüdő-mellkasi teljesítményt a

légzési térfogat és a belégzési csúcsnyomás arányaként definiáltuk, és ml/cm H_2o kg egységben fejeztük ki.

A nem kezelt kontroll állatokhoz hasonlítva a teljesítmény szignifikánsan javult a mesterséges felületaktív anyaggal kezelt állatokban, különösen a polimixin B-t tartalmazó felületaktív anyagot kapott állatokban. Figyelemre méltó módon a javulás nagyobb mértékű a hasonló dózisú, módosított természetes felületaktív anyaggal történő kezelésnél megfigyeltnél (3. ábra).

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

Az 1. ábrán az SP-C és analógjai aminosav-szekvenciájának csigavonalas ábrázolását mutatjuk be.

Az emebri SP-C szekvenciáját Johansson, J. és mtsai. [FEBS Lett. 232, 61-64. old. (1998)] közleményéből, az SP-C(Leu) szekvenciáját Nilsson, G. és mtsai. [Eur. J. Biochem. 255, 116-124. old. (1998)] közleményéből vettük. Az SP-C(LKS) az SP-C elsődleges szerkezetén alapul, de minden 16-28 közötti Val-oldalláncot a 17. kivételével Leu-oldalláncal helyettesítettük, Lys-oldalláncokat építettünk be a 17., 22. és 27. helyen, és a palmitoilált Cys-eket az 5. és 6. helyen Ser helyettesíti.

A 2. ábrán a szintetikus felületaktív anyag-készítmények felszíni szétterjedését mutatjuk be.

3 w%-os SP-C(LKS) (teli négyzetek, folyamatos vonallal jelölve) és 3 w%-os SP-C(LKS) 2 w% SP-B hozzáadásával (üres háromszögek, szaggatott vonallal jelölve) szétterjedési kinetikája. Minden készítményt 10 mg/ml koncentrációban vizs-

52079

gáltunk DPPC/PG 7:3 (v/v) elegy és 150 mmol/l NaCl szuszpenziójában. A méréseket Wilhelmy-féle mérleggel végeztük és minden pont három különböző mérés átlaga.

A 3. ábrán az *in vivo* eredményeket mutatjuk be.

Öt - 27 napos vemhesség után - koraszülött, 8-10 ml/kg-es standardizált légzési térfogattal és pozitív kilégzésvégi nyomás (PEEP) nélkül lélegeztetett nyúl tüdő-mellkasi teljesítménye. A teljesítmény szignifikánsan javult a kezelt állatokban. Polimixin B (PxB) hozzáadása növelni látszik a mesterséges felületaktív anyag hatását. A foszfolipidek koncentrációja ugyanaz minden felületaktív anyag-készítményben, 40 mg/ml.

Szekvencialista

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 1

Phe Gly Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Lys Leu Leu Leu Leu Lys Ile Leu Leu Leu Lys Leu Gly Ala Leu Leu

20 25 30

Met Gly Leu

35

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 2

Phe Gly Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Leu Lys Leu Leu Leu Leu Ile Lys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu

20 25 30

Met Gly Leu

35

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 3

Phe Gly Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Lys Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Lez Leu

20 25 30

Met Gly Leu

35

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 4

Phe Gly Il Epro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Lys Leu Ile Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu
20 25 30

Met Gly Leu
35

<210> 5

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 5

Phe Gly Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Lys Leu Leu Ile Leu Gly Ala Leu Leu
20 25 30

5207

Met Gly Leu

35

<210> 6

<211> 35

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<220>

<223> Mesterséges szekvencia leírása: szintetikus peptidek

<400> 6

Phe Gly Ile Pro Ser Ser Pro Val His Leu Lys Arg Leu Leu Ile Leu

1 5 10 15

Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Leu

20 25 30

Meg Gly Leu

35

Szabadalmi igénypontok

1. Az (I) általános képlettel megadott szerkezetű SP-C-analóg, az egybetűs aminosavkód szerint:

$F_eG_fPZZPVHLKR(X_aB)(X_bB)_n(X_cB)_mX_dGALLMGL$ (I)

ahol:

X jelentése I, L vagy Nle (norleucin) aminosavak bármelyike;

B jelentése K, W, F, Y vagy Ornitin aminosavak bármelyike;

Z jelentése S, és opcionálisan 12-22 szénatomot tartalmazó acil-csoporttal kapcsolódhat észter- vagy tio-észter-kötésen keresztül;

a értéke egész szám 1 és 19 között;

b értéke egész szám 1 és 19 között;

c értéke egész szám 1 és 21 között;

d értéke egész szám 0 és 20 között;

e értéke 0 vagy 1;

f értéke 0 vagy 1;

n értéke 0 vagy 1;

m értéke 0 vagy 1;

az alábbi feltételekkel:

- $n + m > 0$;
- $f \geq e$;
- $(X_aB)(X_bB)_n(X_cB)_mX_d$ maximum 22 aminosavból álló szekvencia, előnyösen 10-22 aminosavból álló szekvencia.

2. Az 1. igénypont szerinti SP-C-analógok, amelyek az (Ia) általános képlettel adhatók meg:

(Ia) FGIPSSPVHLKRX$_4$BX$_4$BX$_4$BXGALLMGL

3. Az 1. igénypont szerinti SP-C-analógok, amelyek az (Ib) általános képlettel adhatók meg:

(Ib) FGIPSSPVHLKRX$_5$BX$_5$BX$_4$GALLMGL

4. Az 1. igénypont szerinti SP-C-analógok, amelyek az (Ic) általános képlettel adhatók meg:

(Ic) FGIPSSPVHLKRX$_4$BX$_{11}$GALLMGL

5. Az 1. igénypont szerinti SP-C-analógok, amelyek az (Id) általános képlettel adhatók meg:

(Id) FGIPSSPVHLKRX$_8$BX$_7$GALLMGL

6. Az 1. igénypont szerinti SP-C-analógok, amelyek az (Ie) általános képlettel adhatók meg:

(Ie) FGIPSSPVHLKRX$_{11}$BX$_4$GALLMGL

7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti SP-C-analógok, amelyekben a Ser-oldalláncok aciláltak, előnyösen palmitoil-csoportokkal.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti SP-C-analógok, amelyekben B jelentése lizin vagy fenilalanin és X jelentése leucin, izoleucin vagy norleucin.

9. A 8. igénypont szerinti SP-C-analóg, amely az alábbiak:

[SP-C (LKS)] FGIPSSPVHLKRLLILKLLLLKILLLKLGALLMGL;

[SP-C (LKS)$_1$]

FGIPSSPVHLKRLLILLKLLLLIKLLILGALLMGL;

[SP-C (LKS)$_2$]

FGIPSSPVHLKRLLILKLLLLLILLLILGALLMGL;

[SP-C $(LKS)_3$]

FGIPSSPVHLKRLLILLLLLKLILLLILGALLMGL;

[SP-C $(LKS)_4$]

FGIPSSPVHLKRLLILLLLLLLIKLLILGALLMGL;

[SP-C (LFS)] FGIPSSPVHLKRLLILFLLLLFILLLFLGALLMGL

bármelyike.

10. Szintetikus felületaktív anyag, amely legalább egy, (I) általános képlettel megadott SP-C-analógot tartalmaz lipidekkel és foszfolipidekkel elegyítve.

11. A 10. igénypont szerinti szintetikus felületaktív anyag, amelyben a lipidek/foszfolipidek elegye DPPC-t, PG-t vagy PA-t tartalmaz.

12. A 10 vagy 11. igénypontok szerinti szintetikus felületaktív anyag, amely SP-B-t vagy annak aktív származékát, vagy polimixint is tartalmaz.

13. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti szintetikus felületaktív anyag, oldat, diszperzió, szuszpenzió vagy por alakban.

14. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti SP-C-analóg alkalmazása bármely felületaktív anyag-elégtelenség esetén alkalmazható szintetikus felületaktív anyag előállítására.

15. Polimixin, előnyösen polimixin B alkalmazása bármely felületaktív anyag-elégtelenség és rendellenesség vagy súlyos középfülgyulladás (ragadós fül) kezelésére alkalmas 10-13. igénypontok bármelyike szerinti mesterséges felületaktív anyag előállítására.

52073

16. A 14 vagy 15. igénypontok szerinti alkalmazás, felületaktív anyag-elégtelenségként respiratórikus disztressz szindróma kezelésére alkalmas mesterséges felületaktív anyag előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Molnár Imre

szabadalmi ügyvivő

3 lap rajz

BOROS ISTVÁN

P02 141

PCT/EP00/01044

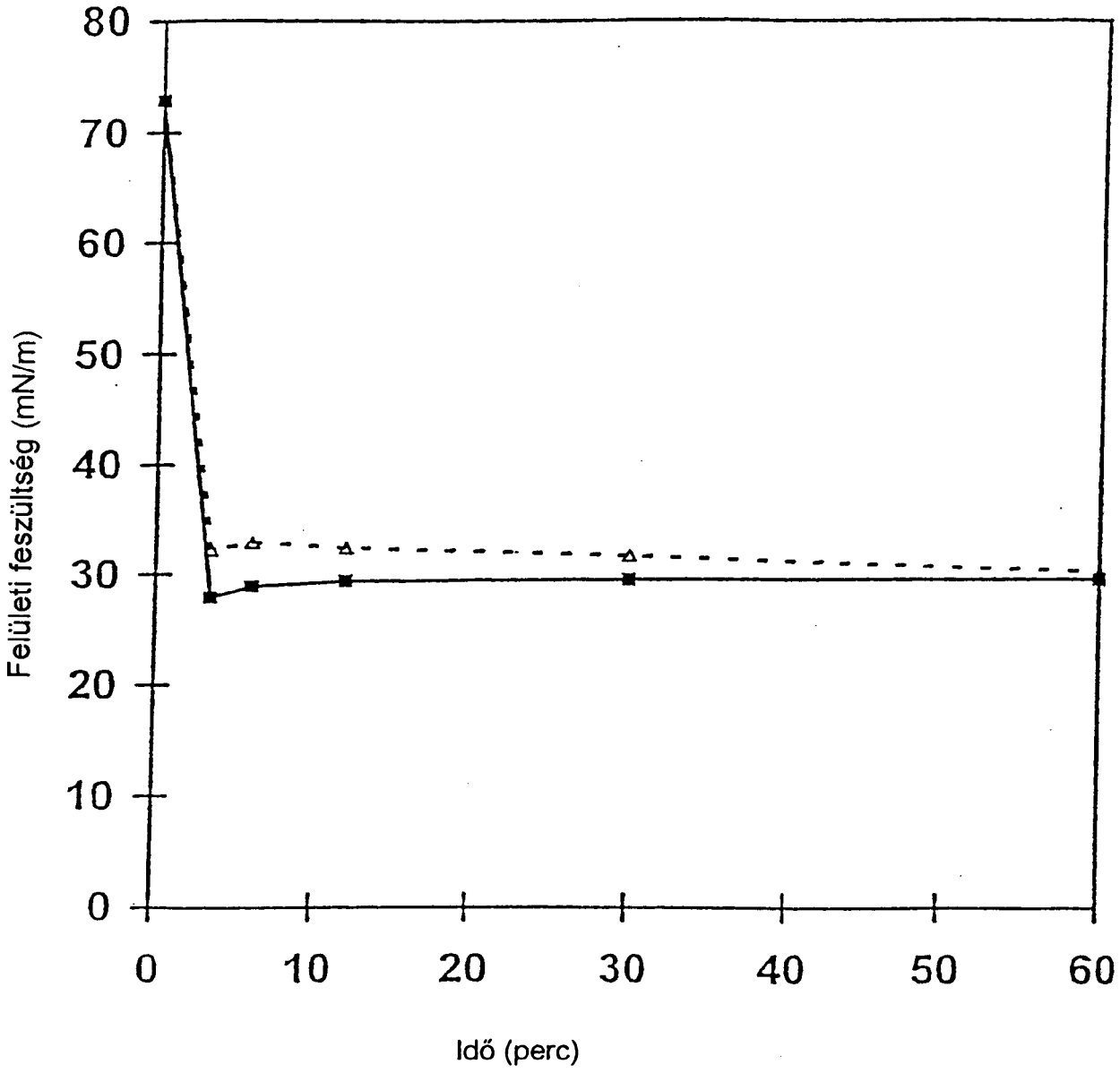
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

```
Emberi SP-C     FGIPCCPVHLKRLLIVVVVVVLIVVVIVGALLMGL
SP-C[LKS]       ----SS--Δ------LLLLLL--LLL-L-------
SP-C(Leu)       ----SS----------LKLLLLK-LLLKL-------
```


1. ábra

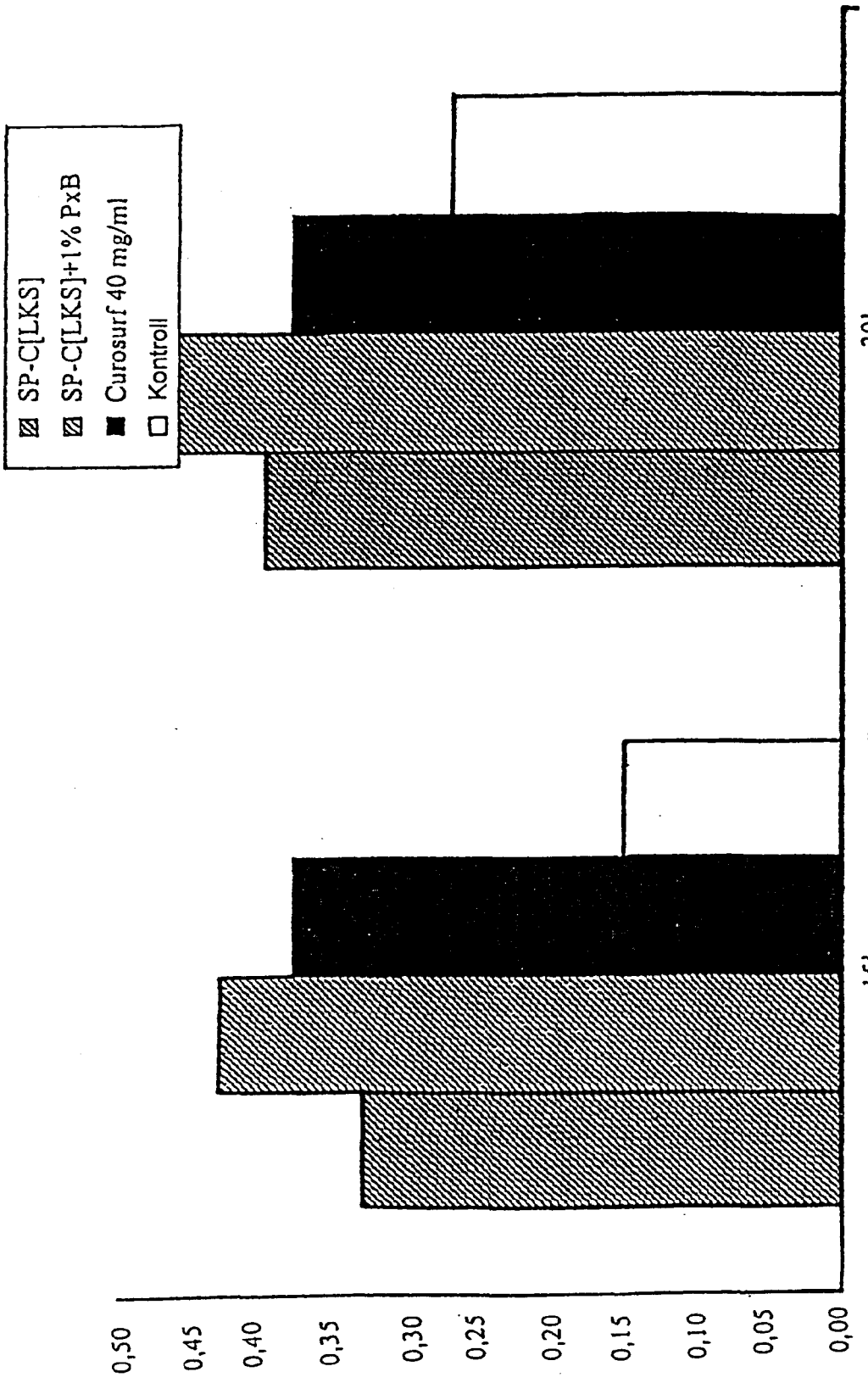
PCT/EP00/01044

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



2. ábra

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3. ábra