

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

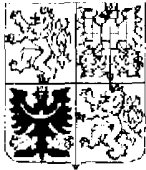
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) číslo dokumentu:

## 4070-97

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17. 12. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.12.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/033561**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15. 07. 98**  
(Věstník č. 7/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

<b>C 07 K</b>	<b>14/47</b>
<b>A 61 K</b>	<b>38/17</b>
<b>C 12 N</b>	<b>15/12</b>
<b>C 12 N</b>	<b>1/21</b>

(71) Přihlášovatel:

ELI LILLY AND COMPANY, Indianapolis, IN,  
US;

(72) Původce:

Beals John Michael, Indianapolis, IN, US;  
Chance Ronald Eugene, Westfield, IN, US;  
Hoffmann James Arthur, Greenwood, IN, US;  
Millican Rohn Lee Jr., Indianapolis, IN, US;

(74) Zástupce:

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

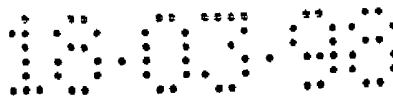
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Anti-obezitní proteiny, způsob jejich  
výroby a farmaceutický prostředek s  
jejich obsahem**

(57) Anotace:

Anti-obezitní proteiny, které pokud jsou  
podávány pacientovi, regulují tukovou tkáň.  
Uvedené proteiny proto dovolují pacientovi  
překonat obezitní handicap a žít normální  
život s podstatně sníženým rizikem diabetu  
typu 2, kardiovaskulárních onemocnění a ra-  
koviny.

CZ 4070-97 A3



**Anti-obezitní proteiny, způsob jejich výroby a farmaceutický prostředek s jejich obsahem**

**Oblast techniky**

Vynález se týká humánní medicíny, především použití léčiv pro léčení obezity a poruch, spojených s obezitou. Vynález se obzvláště týká anti-obezitních peptidů které, pokud jsou podávány pacientovi, regulují tukové tkáně.

**Dosavadní stav techniky**

Obezita, speciálně obezita horní části těla, je běžný a velmi vážný veřejný zdravotní problém jak ve Spojených státech, tak i po celém světě. Podle současných statistik je více než 25 % populace ve Spojených státech a 27 % populace v Kanadě zasaženo nadváhou (Kuczmarski, R.J., *Amer. J. of Clin. Nutr.* 55: 495S-502S (1992); Reeder, B.A. a kol., *Can. Med. Assoc. J.*, 146:2009-2019 (1992) ). Obezita horní části těla je nejsilnější známý rizikový faktor pro osoby s diabetem typu 2 a je také silný rizikový faktor pro kardiovaskulární onemocnění a rakovinu. Současné odhady pro lékařské náklady spojené s obezitou činí po celém světě 150.000.000.000 dolarů. Problém se stal natolik závažným, že hlavní lékař (Spojených států) zahájil iniciativu boje proti stále silící tělesné tloušťce, zasahující americkou společnost.

Mnoho z této obezitou indukované patologie může být připsáno silné asociaci na dyslipidemii, hypertensi a odolnosti proti insulinu. Mnoho studií prokázalo, že snížení obezity pomocí diety a tělesného cvičení redukuje dramatickým způsobem toto rizika. Naneštěstí je tento postup značně neúspěšný s pravděpodobností neúspěchu dosahující 95 %. Tento neúspěch může být způsobován skutečností, že stav je silně asociován s geneticky vrozenými faktory, které přispívají zvýšené chuti k jídlu, preferování vysoce kalorické potravy, snížené fyzické aktivitě a zvýšenému lipogenickému metabolismu. To indikuje, že osoby, které zdědily tyto genetické znaky, jsou náchylné k tomu stát se obézní bez ohledu na jejich úsilí tento stav překonat. Z tohoto důvodu je potřebné farmakologické činidlo, které by mohlo korigovat tento handicap tělesné tloušťky a dovolilo by lékařům úspěšně léčit obézní pacienty i přes jejich genetické vlohy.

Fyziologové po léta předpokládali, že pokud se savec přejídá, výsledný přebytek tuku signalizuje mozku, že tělo je obézní, což dále způsobuje, že tělo požívá méně potravy a spaluje více zdrojů (Hervey, G.R., *Nature* 222: 629-631 (1969) ). Tento „zpětnovazební“ model je podporován parabiotickými experimenty, které implikují obíhající hormon, ovládající tělesnou tloušťku.

Myš *ob/ob* je model obezity a diabetu, o němž je známo, že nese autosomální recesivní znak, vázaný k mutaci v šestém chromosomu. Nedávno Zhang, Y. a spolupracovníci publikovali poziční klonování myšího genu, vázaného k tomuto stavu (Zhang, Y. a kol., *Nature* 372:425-432 (1994)). Tato zpráva



odhaluje gen, kódující protein o 167 aminokyselinách se signálním peptidem o 21 aminokyselinách, který je exprimován výhradně v tukové tkáni. Následně byl klonován a exprimován gen obezity krysy (Murakami, T. a kol., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209:944-952 (1995)). Nyní se spekuluje o tom, že protein, který zřejmě kóduje ob gen, je regulační hormon tukové tkáně.

Protein, kódovaný ob genem je farmakologicky účinný, ale fyzikální vlastnosti tohoto proteinu jsou méně vhodné. Například lidský protein je náchylný k precipitaci a agregaci jak ve farmaceutických přípravcích, tak i za fyziologických podmínek. Proteinové přípravky, obsahující precipitát nebo přípravky, které dovolují precipitaci po injekci, zvyšují riziko vytváření imunologické odezvy u pacienta, což může vést k podráždění v místě injekce. V souladu s tím přetrvává potřeba vyvinout farmakologická činidla, která vykazují farmakologickou účinnost a mají lepší fyzikální a chemickou stabilitu.

#### Podstata vynálezu

Přihlašovatelé objevili, že agregace, pozorovaná u přírodního lidského proteinu je částečně způsobovaná hydrofobní interakcí povrchu proteinu, obzvláště zbytků v polohách 100 a 138. Přihlašovatelé dále objevili, že substitucí těchto poloh nabitými aminokyselinami je dramaticky redukována náchylnost ob proteinu k agregaci, čímž se získá značně zlepšený farmakologický přípravek. V souladu s tím předkládaný vynález podává biologicky účinný obezitní protein. Takový přípravek dovoluje pacientovi

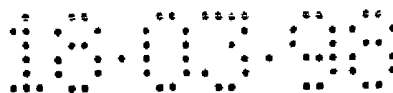
překonat jeho obezitní handicap a žít normální život s normalizovaným rizikem u diabetu typu 2, kardiovaskulárních chorob a rakoviny.

Přehled vynálezu

Vynález se týká proteinu obecného vzorce (I):

(SEQ ID NO:1)

	5	10	15
Val	Pro	Ile	Gln
Lys	Val	Gln	Asp
Asp	Thr	Lys	Thr
Leu	Ile	Lys	Thr
	20	25	30
Ile	Val	Thr	Arg
Ile	Xaa	Asp	Ile
Ser	His	Thr	Xaa
Ser	Val	Ser	Ser
	35	40	45
Lys	Gln	Lys	Val
Thr	Gly	Leu	Asp
Phe	Ile	Pro	Gly
Leu	His	Pro	Ile
	50	55	60
Leu	Thr	Leu	Ser
Lys	Met	Asp	Gln
Thr	Leu	Ala	Val
Tyr	Gln	Gln	Ile
	65	70	75
Leu	Thr	Ser	Met
Pro	Ser	Arg	Xaa
Xaa	Ile	Gln	Ile
Ser	Asn	Asp	Leu
	85	90	95
Glu	Asn	Leu	Arg
Asp	Leu	Leu	His
Val	Leu	Ala	Phe
Ser	Lys	Ser	Cys
	100	105	110
His	Leu	Pro	Trp
Ala	Ser	Gly	Leu
Glu	Thr	Leu	Asp
Ser	Leu	Gly	Gly



115

120

125

Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg

130

135

140

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro

145

Gly Cys

ve kterém

Xaa v poloze 22 je Asn nebo Ser;

Xaa v poloze 28 je Gln nebo chybí;

Xaa v poloze 72 je Asn, Gln, Glu, nebo Asp;

Xaa v poloze 73 je Val nebo Met;

a protein zahrnuje alespoň jednu z následujících substitucí:

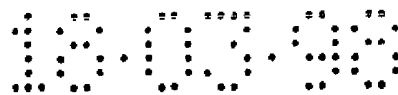
Trp v poloze 100 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

Trp v poloze 138 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

Vynález se dále týká prostředků, použitelných pro léčení obezity nebo stavů, asociovaných s obezitou, přičemž jejich použití zahrnuje podávání proteinu obecného vzorce (I) savci, který má jeho potřebu.

Vynález se dále týká farmaceutického přípravku, který



zahrnuje protein obecného vzorce (I) spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými ředidly, nosiči nebo excipienty.

Vynález se dále týká proteinů obecného vzorce (I), které mají navíc leader sekvenci, vázanou k N-konci proteinu obecného vzorce (I). Takové proteiny jsou užitečné pro jejich anti-obezitní účinek a slouží také jako mezistupeň při přípravě proteinů obecného vzorce (I).

Vynález se dále týká DNA, kódující protein obecného vzorce (I) nebo protein obecného vzorce (I), který obsahuje leader sekvenci.

Dodatkové provedení vynálezu je způsob přípravy proteinu obecného vzorce (I), který zahrnuje:

- a) transformaci hostitelské buňky pomocí DNA, která kóduje protein obecného vzorce (I) nebo protein obecného vzorce (I) s leader sekvencí;
- b) kultivaci hostitelské buňky v podmínkách, dovolujících expresi proteinu;
- c) získání exprimovaného proteinu; a popřípadě
- d) získání proteinu obecného vzorce (I) enzymatickým odštěpením leader sekvence.

Vynález se dále týká proteinu pro léčení obezity nebo stavů, spojených s obezitou a také proteinu pro výrobu léčiv pro léčení obezity nebo stavů spojených s obezitou.

Podrobný popis vynálezu

Pro potřeby popisu předkládaného vynálezu, jak vyplývá z popisu a patentových nároků, jsou používány následující pojmy a zkratky:

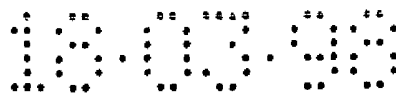
Pár bází (pb) - se vztahuje k DNA nebo RNA. Označení A, C, G a T odpovídají 5'-monofosfátové formě nukleotidů (deoxy)adenin, (deoxy)cytidin, (deoxy)guanin respektive (deoxy)thymin, pokud se vyskytují v DNA molekule. Označení U, C, G a T odpovídají 5'-monofosfátové formě nukleosidů uracil, cytidin, guanin respektive thymin, pokud se vyskytují v RNA molekule. V DNA se dvěma vlákny odpovídá pár bází spojení A s T nebo C s G. V DNA/RNA heteroduplexu pár bází odpovídá spojení T nebo U a A nebo C s G.

Fmoc - zkratka pro 9-fluorenylmethoxykarbonyl.

Imunoreaktivní protein(y) - termín, užívaný pro kolektivní popis protilátek, fragmentů protilátek, schopných vázat antigeny a majících podobnou povahu jakou má molekula protilátky, z níž jsou odvozeny a polypeptidové vazebné molekuly s jednoduchým řetězcem (Bird., E.R., a kol., PCT přihláška č. PCT/US 87/02208, Mezinárodní publikace č. WO 88/01649, publikovaná 10. března 1988).

Plasmid - extrachromosomální samoreplikující genetický prvek.

PAM - zkratka pro 4-hydroxymethylfenylacetamidomethyl.



PMSF - zkratka pro fenylmethylsulfonylfluorid.

Čtecí rámeček - nukleotidová sekvence, ze které dochází k translaci „čtením“ tripletů translačním mechanismem tRNA, ribosomů a souvisejících faktorů, přičemž každý triplet odpovídá konkrétní aminokyselině. Jelikož triplety jsou navzájem různé a mají tutéž délku, délka kódující sekvence musí být dělitelná třemi. Vložení nebo vynechání páru bází (nazývané mutace posunu rámce) může vést ke vzniku dvou různých proteinů, kódovaných tímž segmentem DNA. Na ochranu proti tomu musí být tripletové kodony, odpovídající požadované vlastnosti, seskupeny v násobcích tří počínaje iniciálním kodonem, to jest musí být udržován správný „čtecí rámeček“.

Rekombinantní DNA klonovací vektor - libovolný rekombinantní DNA klonovací vektor, ve kterém je zahrnut promotor.

Replikon - DNA sekvence, která ovládá a dovoluje autonomní replikaci plasmidu nebo dalšího vektoru.

TFA - zkratka pro trifluoroctovou kyselinu.

Transkripce - proces, při kterém je informace, obsažená v nukleotidové sekvenci DNA přenášena na komplementární RNA sekvenci.

Translace - proces, při kterém je genetická informace informační RNA používána ke specifikaci a přímé syntéze polypeptidového řetězce.

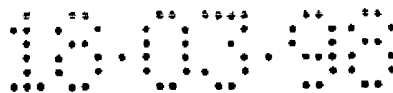
Tris - zkratka pro tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Léčení - popisuje péči o pacienta s cílem potlačit nemoc, stav nebo poruchy a zahrnuje podávání sloučeniny podle předkládaného vynálezu s cílem zabránit vzniku symptomů nebo komplikací, přinést úlevu symptomů nebo komplikací nebo odstranit nemoc, stav nebo poruchu. Léčení obezity proto zahrnuje inhibici příjmu potravy, inhibici přírůstku váhy a indukci úbytku váhy u pacienta, který toho má potřebu.

Vektor - replikon, používaný pro transformaci buňky při genové manipulaci, nesoucí polynukleotidovou sekvenci, odpovídající příslušné proteinové molekule který, pokud je kombinován s vhodnou kontrolní sekvencí propůjčuje hostitelské buňce, která má být transformována, specifické vlastnosti. Plasmidy, viry a bakteriofágy jsou vhodné vektory, neboť jsou svou vlastní povahou replikony. Umělé vektory jsou konstruovány štěpením a spojováním DNA molekul z různých zdrojů použitím restričních enzymů a ligáz. Vektory zahrnují rekombinantní DNA klonovací vektory a rekombinantní DNA vektory exprese.

X-gal - zkratka pro 5-brom-4-chlor-3-indolyl beta-D-galaktosid.

Zkratky aminokyselin přijímá jako přípustné United States Patent and Trademark Office, jak je stanoveno v 37 C.F.R. § 1.822 (b)(2) (1993). Pokud není výslovně uvedeno, jsou aminokyseliny v L konfiguraci.



Jak bylo uvedeno výše, předkládaný vynález se týká proteinu obecného vzorce (I):

5	10	15	
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr			
20	25	30	
Ile Val Thr Arg Ile Xaa Asp Ile Ser His Thr Xaa Ser Val Ser Ser			
35	40	45	
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile			
50	55	60	
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile			
65	70	75	80
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Xaa Xaa Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu			
85	90	95	
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys			
100	105	110	
His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Gln Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly			
115	120	125	
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg			
130	135	140	
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro			

145

Gly Cys (SEQ ID NO:1)

(I)

ve kterém

Xaa v poloze 22 je Asn nebo Ser;

Xaa v poloze 28 je Gln nebo chybí;

Xaa v poloze 72 je Asn, Gln, Glu, nebo Asp;

Xaa v poloze 73 je Val nebo Met;

a protein zahrnuje alespoň jednu z následujících substitucí:

Trp v poloze 100 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

Trp v poloze 138 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl.

Výhodné proteiny podle předkládaného vynálezu jsou ty proteiny obecného vzorce (I), ve kterém

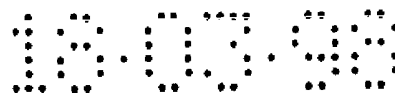
Xaa v poloze 22 je Asn;

Xaa v poloze 28 je Gln;

Xaa v poloze 72 je Asn nebo Asp; a

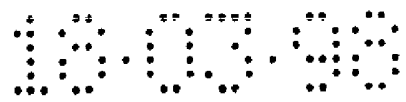
Xaa v poloze 73 je Val.

Další výhodné proteiny jsou ty, ve kterých Trp v poloze 100 je nahrazen Glu nebo Asp; Trp v poloze 138 je nahrazen Glu nebo Asp. Obzvláště výhodné jsou proteiny obecného vzorce I, ve kterých Xaa v poloze 72 je Asp. Další výhodné proteiny jsou ty, ve kterých Trp v poloze 100 je nahrazeno His, Lys nebo Arg. Další výhodné proteiny jsou ty, ve kterých Trp v poloze 100 je nahrazeno Lys nebo Arg nebo Trp v poloze 138 je nahrazeno Lys nebo Arg.



Nejvýhodnější proteiny podle vynálezu jsou proteiny s jednou ze sekvencí SEQ ID NO:2-12:

5 10 15  
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr  
20 25 30  
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser  
35 40 45  
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile  
50 55 60  
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile  
65 70 75 80  
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu  
85 90 95  
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys  
100 105 110  
His Leu Pro Asp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly  
115 120 125  
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg



130 135 140  
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro

145  
Gly Cys (SEQ ID NO:2)

5 10 15  
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile Lys Thr

20 25 30  
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser

35 40 45  
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile

50 55 60  
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile

65 70 75 80  
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu

85 90 95  
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys

100 105 110  
His Leu Pro Glu Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly

115 120 125  
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg









180098

115 120 125  
Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu Ser Arg

130 135 140  
Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro

145  
Gly Cys (SFQ ID NO:7)

5 10 15  
Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Tor Leu Ile Lys Thr

20 25 30  
Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val Ser Ser

35 40 45  
Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His Pro Ile

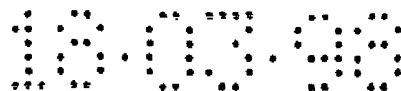
50 55 60  
Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln Gln Ile

65 70 75 80  
Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn Asp Leu

85 90 95  
Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys Ser Cys

100 105 110  
Ser Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Gln Thr Leu Asp Ser Leu Gly Gly





115 120 125  
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu

130 135 140  
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu

145  
Ser Pro Gly Cys (SEQ ID NO:9)

5 10 15  
Met Arg Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

20 25 30  
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val

35 40 45  
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His

50 55 60  
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln

65 70 75 80  
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asp Val Ile Gln Ile Ser Asn

85 90 95  
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys

100 105 110  
Ser Cys His Leu Pro Asp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu

15.05.99

115 120 125  
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Gln Val Val Ala Leu

130 135 140  
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu

145  
Ser Pro Gly Cys (SEQ ID NO:10)

5 10 15  
Met Arg Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

20 25 30  
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val

35 40 45  
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His

50 55 60  
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln

65 70 75 80  
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asp

85 90 95  
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys

180399

100 105 110  
Ser Cys His Leu Pro Glu Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu

115 120 125  
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Trp Glu Val Val Ala Leu

130 135 140  
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu

145  
Ser Pro Gly Cys (SEQ ID NO:11)

5 10 15  
Met Arg Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

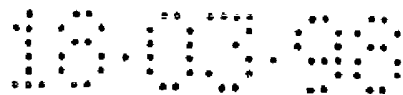
20 25 30  
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val

35 40 45  
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His

50 55 60  
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln

65 70 75 80  
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asn Val Ile Gln Ile Ser Asn

85 90 95  
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys



100 105 110  
Ser Cys His Leu Pro Asp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu

115 120 125  
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu

130 135 140  
Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu

145  
Ser Pro Gly Cys (SEQ ID NO:12)

Předkládaný vynález se týká biologicky aktivních proteinů, které přinášejí účinné léčení obezity. Přihlašovatelé objevili, že specifická substituce do hydrofobních residuí na povrchu proteinu má za následek zlepšení vlastností. Tato residua nemohou být předem určena z primárních sekvencí. Proteiny s těmito substitucemi jsou farmakologicky aktivní a mají redukovanou náchylnost k agregaci, pokud jsou porovnány s myšími nebo lidskými formami proteinů. Předkládaný vynález dovoluje, aby byly obezitní proteiny lépe formulovatelné ve vyšších koncentracích a zvyšuje farmaceutickou eleganci jejich použití, neboť jsou použitelné spolu s běžně užívanými farmaceutickými látkami.

Proteiny podle vynálezu jsou získány rekombinantními technikami. Způsoby pro vytváření substitučních mutací v předem daných místech DNA, které mají známou sekvenci jsou dobře známy, jako je například M13 primérová mutagenese. Mutace, které mohou být provedeny v DNA kódování

existujících anti-obezitních proteinů nesmí umístit sekvenci mimo čtecí rámec a výhodně nevytvoří komplementární oblasti, které by mohly vytvářet sekundární mRNA strukturu (DeBoer, H.A. a kol., publikace Evropského patentu č. 75,444 A2, publikováno 30. března 1983).

Sloučeniny podle předkládaného vynálezu mohou být produkovány buď rekombinantní DNA technologií nebo známými chemickými procedurami, jako je syntéza proteinů v roztoku nebo v pevné fázi nebo semisyntéza v roztoku započatá proteinovým fragmentem, vázaná konvenčními roztokovými metodami.

#### A. Pevná fáze

Syntéza nárokovaných proteinů může být prováděna syntézou peptidů v pevné fázi nebo rekombinantními metodami. Principy chemické syntézy polypeptidů v pevné fázi jsou dobře známy odborníkům a mohou být nalezeny v obecných textech, pojednávajících o této oblasti jako je Dugas, H. a Penney, C., *Bioorganic Chemistry*, Springer Verlag, New York, (1981), 54-59. Peptidy mohou být například syntetizovány způsobem v pevné fázi, používající peptidový syntetizátor PE-Applied Biosystemt 433A (Perkin Elmer - Applied Biosystems Division, Foster City, California) a cykly syntézy, dodávané společností Applied Biosystems. Boc-aminokyseliny a další reagenty jsou komerčně dostupné od společnosti PE-Applied Biosystems a dalších společností, dodávajících chemické produkty. Sekvenční boc chemie, používající dvojvazné protokoly je aplikována na výchozí p-methyl benzhydryl aminovou pryskyřici pro výrobu C-terminálních karboxamidů.

Pro výrobu C-terminálních kyselin je používána odpovídající PAM pryskyřice. Arginin, asparagin, glutamin, histidin a methionin jsou vázány s použitím předběžně vytvořených hydroxy benzotriazolových esterů. Mohou být používány následující způsoby ochrany postranních řetězců:

- Arg, tosyl
- Asp, cyklohexyl nebo benzyl
- Cys, 4-methylbenzyl
- Glu, cyklohexyl
- His, benzyloxymethyl
- Lys, 2-chlorbenzyloxykarbonyl
- Met, sulfoxid
- Ser, benzyl
- Thr, benzyl
- Trp, formyl
- Tyr, 4-bromkarbobenzoxy

Odstranění chránicí skupiny Boc může být provedeno pomocí trifluoroctové kyseliny (trifluoroacetic acid - TFA) v methylenchloridu. Odstranění formylu z Trp je provedeno působením 20% piperidinu na peptidylovou pryskyřici v dimethylformamidu po 60 minut při 40 °C. Met(O) může být redukován působením na peptidylovou pryskyřici pomocí TFA/dimethylsulfid/ koncentrovaná HCl (95/5/1) při 250 °C po dobu 60 minut. Pomocí výše uvedených předběžných zpracování mohou být peptidy dále zbaveny ochrany a odštěpeny od pryskyřice bezvodým fluorovodíkem, obsahujícím směs 10 % m-kresolu nebo m-kresolu a 10 % p-thiokresolu nebo směs m-kresol/p-thiokresol/dimethylsulfid. Štěpení skupiny nebo skupin, chránících postranní řetězce a štěpení řetězců od

pryskyřice může být prováděno při teplotě 0 °C nebo nižší, výhodně při teplotě -20 °C po třicet minut a potom po třicet minut při 0 °C. Po odstranění fluorovodíku jsou peptid/pryskyřice promývány ve vodě. Peptid je extrahován ledovou kyselinou octovou a lyofilizován. Purifikace se provádí reverzní fázovou C18 chromatografií v 0,1 % TFA s gradientem vzrůstající koncentrace acetonitrilu, například v 2,2 cm x 25 cm koloně Vydac™ (The Separation Group, Inc. Hesperia, California).

Odborníkovi v oboru je zřejmé, že syntéza v pevné fázi také může být prováděna FMOC strategií a TFA/štěpicí směsí.

#### B. Rekombinantní syntéza

Proteiny podle předkládaného vynálezu také mohou být vyráběny rekombinantními metodami. Rekombinantní metody jsou preferovány, pokud má být dosaženo vysokého výtěžku. Základní kroky při rekombinantním způsobu přípravy proteinů zahrnují:

- a) konstrukci DNA, kódující protein podle vynálezu, syntetickým nebo semisyntetickým způsobem (nebo izolací z přírodních zdrojů),
- b) integraci kódující sekvence do vektoru exprese způsobem vhodným pro expresi proteinu buď samotného nebo jako fúzaného proteinu
- c) transformaci vhodné eukaryotické nebo prokaryotické hostitelské buňky vektorem exprese a
- d) získání a purifikaci rekombinantně získaného proteinu.

a) Konstrukce genu

Syntetické geny, jejichž *in vitro* nebo *in vivo* transkripce a translace přináší produkci požadovaného proteinu, mohou být konstruovány způsoby, dobře známými odborníkům. Vzhledem k přirozené degeneraci genetického kódu je odborníkovi zřejmé, že může být sestrojeno značné, byť omezené, množství DNA sekvencí, které kódují proteiny podle vynálezu. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je syntézy dosaženo rekombinantní DNA technologií.

Metodologie konstrukce syntetických genů je dobře známa odborníkům (Brown, E.L. a kol., *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, NY, 68:109-151 (1979)). DNA sekvence, odpovídající syntetickým genům proteinů podle vynálezu může být vytvořena pomocí konvenčního přístroje pro syntézu DNA, jako je Applied Biosystems Model 380A nebo 380B DNA Synthetiser (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, California).

V některých aplikacích je žádoucí modifikovat kódující sekvenci proteinu podle vynálezu tak, aby zahrnovala vhodné místo štěpení, citlivé na proteázu, například mezi signální peptid a strukturální protein, které usnadňuje řízenou excizi signálního peptidu od fúzovaného proteinového konstruktů.

Gen kódující protein podle vynálezu také může být vytvořen použitím polymerázové řetězové reakce (PCR). Templátem může být cDNA knihovna (komerčně dostupná od společností CLONETECH nebo STRATACENE) nebo mRNA izolovaná z lidské

tukové tkáně. Tyto metodologie jsou dobře známy odborníkům, viz například Maniatis, T. a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.vydání, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).

#### b. Přímá exprese nebo fúze proteinu

Proteiny podle vynálezu mohou být vytvořeny buď přímou expresí nebo jako fúzované proteiny obsahující protein podle vynálezu s následujícím enzymatickým nebo chemickým štěpením. Je známo množství peptidáz (například trypsin), které štěpí polypeptid ve specifických místech nebo natráví peptid od amino nebo karboxy konce peptidového řetězce (například diaminopeptidáza). Dále existují jisté chemické látky (například kyanogenbromid), které štěpí polypeptidový řetězec ve specifických místech. Odborníkovi jsou zřejmě nutné modifikace sekvence aminokyselin (a syntetických nebo semi-syntetických kódujících sekvencí, pokud jsou použity rekombinantní postupy) pro vložení specifických vnitřních míst štěpení. Viz například Carter, P., Kapitola 13 v *Protein Purification: From Molecular Mechanism to large Scale Processes*, Landisch, M., a kol., (Editoři) American Chemical Society, Washington, D.C. (1990).

#### c. Konstrukce vektoru

Konstrukce vhodných vektorů, obsahujících požadované kódující a řídicí sekvence používá standardní ligační techniky. Izolované plasmidy nebo fragmenty DNA jsou



štěpeny, upraveny a znovu ligovány způsobem, nutným k vytvoření požadovaných plasmidů.

K dosažení translace požadovaného proteinu se vloží zkonstruovaná syntetická DNA sekvence do kteréhokoli z nepřeberného množství vhodných vektorů exprese rekombinantních DNA sekvencí použitím odpovídajících restričních endonukleáz. Syntetická kódující sekvence je navržena tak, aby obsahovala místa štěpitelná restričními endonukleázami na obou koncích transkriptu, aby se usnadnila izolace nebo naopak vložení do vektoru exprese a amplifikace a exprese plasmidů. Izolované cDNA kódující sekvence mohou být snadno modifikovány použitím syntetických spojovníků pro usnadnění vložení této sekvence do požadovaného klonovacího vektoru způsoby dobře známými odborníkům. Konkrétní volba endonukleáz je diktována vzory pro štěpení restričními endonukleázami v použitém vektoru exprese. Restriční místa jsou volena tak, aby správně orientovaly kódující sekvenci s řídicí sekvencí tak, aby bylo dosaženo správného rámcového čtení a exprese proteinu podle vynálezu.

Obecně jsou v uvedených hostitelích používány plasmidové vektory obsahují promotory a řídicí sekvence, které jsou odvozeny z druhů, slučitelných s hostitelskou buňkou. Vektor obvykle nese replikační místo, stejně tak jako sekvenci markeru, která umožňuje provedení fenotypové selekce v transformovaných buňkách. Tak například *E. coli* je typicky transformována použitím pBR322, což je plasmid, odvozený z druhu *E. coli* (Bolivar, F., a kol., Gene 2:95-113 (1977)). Plasmid pBR322 obsahuje geny pro resistenci na ampicilin a tetracyklin a proto poskytuje jednoduché prostředky pro

identifikaci transformovaných buněk. Plasmid pBR322 nebo další mikrobiální plasmid musí také obsahovat nebo být modifikován tak, aby obsahoval určité promotory a další řídicí prvky, které jsou běžně používané v rekombinantní DNA technologii.

Požadovaná kódující sekvence je vložena do vektoru exprese ve vhodné orientaci, aby byla transkribována od promotoru a ribosomového vazebného místa, přičemž oba tyto prvky musí být funkční v hostitelské buňce, ve které má být protein exprimován. Příkladem takového vektoru exprese je plasmid, popsáný v Belagaje, R.M. a kol., U.S. Patent č. 5,304,473 vydaný 19. dubna 1994, který je do popisu předkládaného vynálezu zahrnut jako reference. Gen kódující A-C-B proinsulin, popsáný v U.S. patentu č. 5,304,473 může být odstraněn z plasmidu pRB182 restričními enzymy *NdeI* a *BamHI*. Geny kódující protein podle předkládaného vynálezu mohou být vloženy do hlavního plasmidového řetězce v *NdeI/BamHI* kazetě restričních fragmentů.

#### d. Prokaryotická exprese

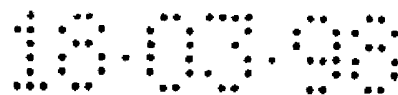
Obecně jsou prokaryota používána pro klonování DNA sekvencí při konstrukci vektorů, použitelných podle předkládaného vynálezu. Například *E. coli* K12 kmen 294 (ATCC č. 31446) je obzvláště vhodný. Další mikrobiální kmeny, které mohou být použity zahrnují *E. coli* B a *E. coli* X1776 (ATCC č. 31537). Tyto příklady jsou ilustrativní a neomezují rozsahu vynálezu.

Prokaryota jsou také používána pro expresi. Mohou být

použity výše uvedené kmeny, stejně tak jako *E. coli* W3110 (prototropní, ATCC č. 27325), bacily jako je *Bacillus subtilis* a další enterobakterie jako je *Salmonella typhimurium* nebo *Serratia marcescans* a různé druhy *Pseudomonas*. Promotory, vhodné pro použití v prokaryotickém hostiteli zahrnují  $\beta$ -laktamázu (vektor pGX2907 [ATCC 39344] zahrnuje replikon a  $\beta$ -laktamázový gen) a laktózoový promotorový systém (Chang, A.C.Y. a kol., *Nature*, 275:617-624 (1978); a Goedel, D.V. a kol., *Nature* 281:544-548 (1979)), alkalickou fosfatázu, tryptofanový (*trp*) promotorový systém (vektor pATH1 [ATCC č. 37695] je navržen s cílem usnadnit expresi otevřeného čtecího rámce jako *trpE* fúzovaný protein pod kontrolou *trp* promotoru) a hybridní promotory jako je *tac* promotor (izolovatelný z plasmidu pDR540 ATCC-37282). Na druhé straně však jiné funkcionální bakteriální promotory, jejichž nukleotidové sekvence jsou obecně známy, dovolují odborníkovi v oboru ligovat je k DNA kódu proteinu použitím linkerů nebo adaptorů pro podporu jakýchkoli požadovaných restričních míst. Promotory, určené k použití v bakteriálních systémech budou také obsahovat Shine-Dalgarno sekvenci operativním způsobem připojenou k DNA kódujícímu proteinu.

#### e. Eukaryotická exprese

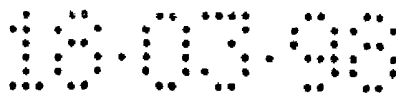
Proteiny mohou být produkovány eukaryotickým způsobem exprese v eukaryotických systémech. Výhodné promotory, ovládající transkripci v savčích hostitelských buňkách mohou být získány z různých zdrojů, jako jsou například genomy virů jako: polyom, Simian virus 40 (SV40), adenovirus, retroviry, virus hepatitidy-B a obzvláště výhodně



cytomegaloviry nebo heterologní savčí promotory, například  $\beta$ -aktin promotor. Rané a pozdní promotory viru SV40 jsou výhodně získány jako SV40 restriční fragment, který také obsahuje SV40 virální počátek replikace [Fiers, W. a kol., *Nature*, 273:113-120 (1978)]. Celý genom viru SV40 může být získán z plasmidu pBRSV, ATCC 45019. Okamžitý raný promotor lidského cytomegaloviru může být získán z plasmidu pCMB $\beta$  (ATCC 77177). Promotory z hostitelské buňky nebo z příbuzných druhů mohou pochopitelně být použity také.

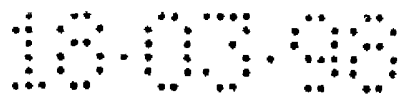
Transkripce DNA kódu nárokovaných proteinů vyššími eukaryoty je zvýšena vložím enhancerové (zesilující) sekvence do vektoru. Enhancery jsou cis-působící prvky DNA, obvykle okolo 10-300 párů bází, které působí na promotor a zvyšují jeho transkripci. Enhancery jsou relativně nezávislé na orientaci a poloze a byly nalezeny u 5' [Laimins, L.A. a kol., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78:464-468 (1981)] a 3' [Luskz, M., a kol., *Mol. Cell. Bio.* 3:1108-1122 (1983)] konce transkripční jednotky, uvnitř intronu [Banerji, J. a kol., *Cell*. 33:729-740(1983)] stejně tak jako uvnitř samotné kódující sekvence [Osborne, T. a kol., *Mol. Cell. Bio.* 4:1293-1305 (1984)]. Nyní je známo mnoho enhancerů ze savčích genů (globin, RSV, SV40, EMC, alostasový albumin,  $\alpha$ -fetoprotein a insulin). Typicky však budou používány enhancery z virů eukaryotických buněk. Příklady zahrnují SV40 pozdní enhancer, enhancer raného promotoru cytomegaloviru, enhancer polyomu na pozdní straně replikačního počátku a enhancery adenoviru.

Vektory exprese, používané v eukaryotických hostitelských buňkách (kvasinky, houby, hmyz, rostliny, zvířata nebo



jaderné buňky z dalších vícebuněčných organismů) budou také obsahovat sekvence, které jsou nutné pro ukončení transkripce, které mohou ovlivnit expresi mRNA. Tyto oblasti jsou transkribovány jako polyadenylované segmenty v netranslatovaných částech mRNA, kódující protein. 3' netranslatované oblasti také zahrnují terminační místa transkripce.

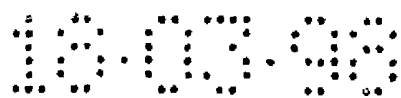
Vektor exprese může obsahovat selekční gen, označovaný také jako selekční marker. Příklady selekčních markerů pro savčí buňky jsou dihydrofolát reduktáza (DHFR, která může být odvozena z *BglIII/HindIII* restrikčního fragmentu pJOD-10 [ATCC 68815]), thymidin kináza (thymidin kináza viru herpes simplex je obsažena v *BamHI* fragmentu vP-5 klonu (ATCC 2028) nebo kmeny, rezistentní na neomycin (G418), které lze získat z pNN414 kvasinkového umělého chromosomového vektoru (ATCC 37682). Pokud jsou takové selekční markery úspěšně přeneseny do savčí hostitelské buňky, transfektovaná savčí buňka může přežít, pokud je umístěna pod selektivní tlak. Existují dvě široce používané odlišné kategorie selekčních režimů. První kategorie je založena na metabolismu buňky a používá mutované buněčné linie, které postrádají schopnost růst bez vhodného doplněného média. Dva příklady jsou: CHO DHFR<sup>-</sup> buňky (ATCC CRL-9096) a myši LTK<sup>-</sup> buňky (L-M(TK-) ATCC CCL-2.3). Tyto buňky postrádají schopnost růst bez přidání takových živin, jako je thymidin nebo hypoxantin. Jelikož tyto buňky postrádají jisté geny, nutné pro úplnou dráhu nukleotidové syntézy, nemohou přežít, pokud chybějící nukleotidy nejsou poskytnuty v podávaném médiu. Alternativou k podávání příslušného doplněného média je vložit neporušený DHFR nebo TK gen do buněk, které tyto geny postrádají a tím



pozměnit jejich růstové požadavky. Jednotlivé buňky, které nebyly transformovány pomocí DHFR, respektive TK genu nebudou schopny přežít v nedoplněném médiu.

Druhou kategorií je dominantní selekce, která se odvolává na selekční schéma, použité u libovolného buněčného typu a nevyžaduje použití mutované buněčné linie. Toto schéma typicky používá chemickou látku pro zastavení růstu hostitelské buňky. Ty buňky, které mají nový gen jsou schopny exprimovat protein, poskytující jim odolnost proti uvedené látce a tudíž přežít selekci. V příkladech takové dominantní selekce se jako chemická látka používá neomycin [Southern, P.J. a kol., *J. Molec. Appl. Genet.* 1:327-341 (1982)], mykofenolová kyselina [Mulligan, R.C. a kol., *Science* 209:1422-1427 (1980)] nebo hygromycin [Sudgen, B. a kol., *Mol. Cell. Biol.* 5:410-413 (1985)]. Tyto tři příklady podané výše používají bakteriálních genů pod eukaryotickou kontrolou k předání resistance na odpovídající látku, například G418, neomycin (geneticin), xgpt (mykofenolová kyselina) nebo hygromycin.

Výhodný vektor pro eukaryotickou expresi je pRc/CMV. pRc/CMV je komerčně dostupný od společnosti Invitrogen Corporation, San Diego, CA. Pro potvrzení správné sekvence v konstruovaném plasmidu je použita ligační směs pro transformaci *E. coli* K12 kmen DH5a (ATCC 31446) a úspěšné transformanty jsou selektovány, pokud je to potřebné, antibiotickou rezistencí. Z transformantů jsou připraveny plasmidy, analyzovány restrikcí a/nebo sekvencovány způsobem podle článku Messing, J. a kol., *Nucleic Acid Res.* 9:309-321 (1981).



Hostitelské buňky mohou být transformovány vektory exprese podle vynálezu a kultivovány v konvenčních živných médiích, jak je vhodné pro indukci promotorů, selekci transformantů nebo amplifikaci genů. Kultivační podmínky, jako je teplota, pH a podobně jsou ty, které byly dříve použity u hostitelských buněk, zvolených pro expresi a jsou zřejmé každému odborníkovi v oboru. Techniky transformace buněk výše uvedenými vektory jsou dobře známy odborníkům a mohou být nalezeny v takových obecných referencích, jako je Maniatis, T. a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989) nebo *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) a dodatky.

Výhodné hostitelské buňky použitelné pro expresi vektorů, kódujících proteiny podle vynálezu ve vyšších eukaryotech zahrnují: ledvinové buňky africké zelené opice transformované pomocí SV40 (COS-7, ATCC CRL-1651), transformované lidské primární embryonální buněčné linie 293 [Graham, F.L. a kol., *J. Gen. Virol.* 36:59-72 (1977); Harrison T. a kol., *Virology* 77:319-329 (1977); Graham, F.L. a kol., *Virology* 86:10-21 (1978)]; ledvinové buňky mláďete křečka [BHK-21 (C-13), ATCC CCL-10; MacPherson, I. a kol., *Virology* 16:147-151 (1962)]; ovariální buňky čínského křečka [CHO/DHER (ATCC CRL-9096)]; mz39 Sertoliho buňky [TM4, ATCC CRL-1715; Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23:243-252 (1980)]; ledvinové buňky africké zelené opice (VERO 76, ATCC CRL-1587); lidské cervikální epiteloidní karcinomové buňky (HeLA, ATCC CCL-2); psi ledvinové buňky (MDCK, ATCC CCL-34); krysí jaterní buňky (BRL 3A, ATCC CRL-1442). lidské

diploidní plicní buňky (WI-38, ATCC CCL-75); lidské hepatocelulární karcinomové buňky (Hep G2, ATCC HB-8065) a myší buňky nádoru prsní žlázy (MMT 060562, ATCC CCL51).

#### f. Exprese v kvasinkách

Kromě prokaryotických a savčích hostitelských buněk mohou být jako hostitelské buňky použity také kvasinky. *Saccharomyces cerevisiae*, běžné pekařské kvasnice, představují nejčastěji užívaný eukaryotický organismus pro expresi heterologních proteinů, i když je k dispozici řada dalších kmenů. Pro expresi v *Saccharomyces* je příkladem běžně užívaného vektoru plasmid YRp7 [ATCC-40053, Stinchcomb, D. T. a kol., *Nature* 282:39-43 (1979); Kingsman, A. J. et al., *Gene* 7:141-152 (1979); Tschumper, G. et al., *Gene* 10:157-166 (1980)]. Tento plasmid již obsahuje *trp* gen, který poskytuje selekční marker pro mutovaný kmen kvasinek, postrádající schopnost růstu v tryptofanu [například ATCC 44076 nebo PEP4-1; Jones, E. W., *Genetics* 85:23-33 (1977)].

Vhodné sekvence promotorů pro použití v kvasinkovém hostiteli zahrnují promotory pro 3-fosfoglycerát kinázu, který se nachází v plasmidu pAP12BD ATCC 53231 [Patel, A. et al., U.S. Patent No. 4,935,350, vydaný 19. června 1990] nebo další glykolytické enzymy, jako je enoláza která se nachází v plasmidu pAC1 (ATCC 39532), glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, derivovaná z plasmidu pHcGAPC1 (ATCC 57090, 57091), *Zymomonas mobilis* [Ingram, I.O. a kol., Patent č. 5,000,000 vydaný 19. března 1991], hexokináza, pyruvát dekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukóza-6-fosfát

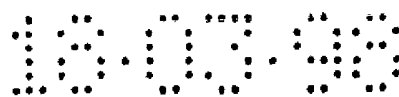


isomeráza, 3-fosfoglycerát mutáza, pyruvát kináza, triosefosfát isomeráza, fosfoglukózová isomeráza, a glukokináza.

Další kvasinkové promotory, což jsou indukovatelné promotory, které mají další výhodu v tom, že transkripce je řízena růstovými podmínkami, jsou promotorové oblasti pro alkohol dehydrogenázu 2, isocytochrom C, kyselou fosfatázu, degradativní enzymy asociované s dusíkovým metabolismem, metalothionein, který je obsažen v plasmidovém vektoru pCL28XhoLHBPV [ATCC 39475; Reddy, V. B. a kol., U.S. Patent No. 4,840,896, vydaný 20. června 1989], glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenáza a enzymy odpovídající za použití maltózy a galaktózy, jako je GAL1 promotor, který se nachází v plasmidu pRY121 (ATCC 37658). Vhodné vektory a promotory pro použití při expresi v kvasinkách jsou dále popsány v Hitzeman, R. A., a kol., Evropský patent č. 73,657A1, vydaný 9. března 1983. Kvasinkové enhancery jako je UAS Gal z *Saccharomyces cerevisiae*, který se nachází spolu s CYC1 promotorem na plasmidu YEpsc-hIlbeta (ATCC 67024) jsou také výhodně používány s kvasinkovými promotory.

#### Příklady provedení vynálezu

Následující příklady poskytují ilustraci způsobů výroby nárokovaných proteinů podle předkládaného vynálezu. Rozsah předmětu však není omezen následujícími příklady, ale vyplývá výhradně z příložených patentových nároků.



Příklad 1

**Konstrukce vektoru**

Gen o SEQ ID NO:13 je složen ze dvou segmentů o asi 220 párech bází a asi 240 párech bází, které jsou odvozeny z chemicky syntetizovaných oligonukleotidů.

(SEQ ID NO:13)

```
1  CATATGAGGG TACCTATCCA AAAAGTACAA GATGACACCA AAACACTGAT
51  AAAGACAATA GTCACAAGGA TAAATGATAT CTCACACACA CAGTCAGTCT
101 CATCTAAACA GAAAGTCACA GGCTTGGACT TCATACCTGG GCTGCACCCC
151 AACTGACAT TGTCTAAAAT GGACCAGACA CTGGCAGTCT ATCAACAGAT
201 CTTAACAAGT ATGCCTTCTA GAAACGTGAT ACAAATATCT AACGACCTGG
251 AGAACCTGCG GGATCTGCTG CACGTGCTGG CCTTCTCTAA AAGTTGCCAC
301 TTGCCATGGG CCAGTGGCCT GGAGACATTG GACAGTCTGG GGGGAGTCCT
351 GGAAGCCTCA GGCTATTCTA CAGAGGTGGT GGCCCTGAGC AGGCTGCAGG
401 GGTCTCTGCA AGACATGCTG TGGCAGCTGG ACCTGAGCCC CGGGTGCTAA
451 TAGGATCC
```

Segment o 220 párech bází se nachází od místa NdeI k místu XbaI v poloze 220 v kódující oblasti a je vytvořen ze sedmi překrývajících se oligonukleotidů, jejichž délky jsou od 34 do 83 bází. Segment o 240 párech bází, který se nachází od místa XbaI do místa BamHI je také vytvořen ze sedmi překrývajících se oligonukleotidů jejichž délky jsou v rozmezí od 57 do 92 bází.

Pro vytvoření těchto fragmentů bylo sedm odpovídajících oligonukleotidů smícháno v ekvimolárním množství, obvykle v koncentracích asi 1-2 pikomolů na mikrolitr. Před spojením

byly všechny oligonukleotidy s výjimkou těch, které se nacházejí na 5'konci segmentu, fosforylovány v standardním kinázovém pufru s T4 DNA kinázou za podmínek specifikovaných dodavatelem látky. Směs byla zahřívána na 95 °C a potom ponechána pomalu ochladit na pokojovou teplotu po dobu 1-2 hodin, aby bylo zajištěno správné zpracování oligonukleotidů. Oligonukleotidy byly potom ligovány navzájem a do odpovídajícího klonovacího vektoru, jako je pUC18 nebo pUC19 použitím T4 DNA ligázy. Pufry a podmínky, které byly použity, se shodovaly s doporučenými podmínkami dodavatele enzymu. Vektor pro fragment o 220 párech bází byl natráven pomocí *NdeI* a *XbaI*, zatímco vektor pro fragment o 240 párech bází byl před použitím natráven pomocí *XbaI* a *BamHI*. Pro transformaci buněk *E. coli* DH10B (komerčně dostupných od Life Technologies, výrobce produktů GIBCO/BRL, Grand Island, NY) byly použity ligační směsi a transformované buňky byly umístěny na trypton-kvasinkové (TY - tryptone-yeast) misky (TY, Difco, Detroit, MI), obsahující 100 µg/ml ampicilinu, X-gal a IPTG. Kolonie, které přes noc vyrostly, byly pěstovány v tekutém médiu TY s 100 µg/ml ampicilinu a byly použity pro izolaci plasmidu a DNA sekvenační analýzu. Plasmidy se správnou sekvencí byly ponechány pro sestavení úplného genu. Toho bylo dosaženo gelovou purifikací fragmentů s 220 páry bází a fragmentů s 240 páry bází a ligací těchto dvou fragmentů do vektoru exprese jako je pRB182 ze kterého byla vynechána sekvence kódující A-C-B proinsulin a který byl před použitím natráven pomocí *NdeI* a *BamHI*.

Alternativně může být natráven plasmid pET30 (Novagen, Madison, WI) pomocí *NdeI* a *BamHI* a požadovaná DNA sekvence,

kódující proteiny podle předkládaného vynálezu, může být vložena procedurami podle stavu techniky, které jsou zde popsány. Zdrojem DNA jsou syntetické oligonukleotidy, které jsou spojeny způsobem podle stavu techniky, který je zde popsán.

### Příklad 2

Plasmid pOJ722 (NRL, č. B-21,654), obsahující DNA sekvenci kódující požadovaný protein, byl připraven způsobem analogickým příkladu 1. Plasmid byl natráven pomocí *PmlI* a *Bsu36I*. Sekvence rozpoznávaná těmito enzymy leží uvnitř oblasti kódující protein mezi nukleotidovými polohami 275 a 360. Klonovací vektor neobsahuje tuto rozpoznávací sekvenci. Z tohoto důvodu po natrávení restrikcí enzymy *PmlI* a *Bsu36I* byly pozorovány pouze dva fragmenty, jeden odpovídající fragmentu vektoru a druhý fragmentu o asi 85 párech bází, který byl uvolněn z protein kódující sekvence. Tato sekvence byla nahrazena libovolnou DNA sekvencí, kódující aminokyselinovou substitucí podle předkládaného vynálezu. Tyto DNA sekvence byly syntetizovány chemicky jako dva oligonukleotidy s komplementárními bázemi a konci, které jsou kompatibilní s konci, vzniklými natrávením pomocí enzymy *PmlI* a *Bsu36I*. Chemicky syntetizované oligonukleotidy byly smíchány v ekvimolárním množství (1-10 pikomolů na mikrolitr), zahřívány na 95 °C a ponechány chlazený pomalým poklesem teploty na hodnotu 20-25 °C. Takto získané oligonukleotidy byly použity ve standardní ligační reakci. Ligační produkty potom byly transformovány do *E. coli* DH10B buněk (GIBCO BRL) a transformované buňky byly umístěny na TY

misky obsahující 10 mikrogramů na mililitr tetracyklinu (Sigma, St. Louis, MO). Kolonie, které vyrostly přes noc, byly pěstovány v tekutém TY médiu s 10 mikrogramy na mililitr tetracyklinu a byly použity pro plasmidovou izolaci a DNA sekvenční analýzu. Plasmidy se správnou sekvencí byly uchovány.

### Příklad 3

#### **Plasmid exprese pHS787 (Protein SEQ ID NO: 6)**

Vektor pHS692, získaný způsobem analogickým postupu z příkladu 1 (40 µg) byl natráven 20 jednotkami *PmlI* (New England Biolab, Beverly, MA) v pufru „New England Biolab buffer 1“ při teplotě 37 °C po dobu dvě hodiny. Pufrovací sůl byla změněna na „New England Biolab buffer 3“ a bylo přidáno 20 jednotek *BstXI* (New England Biolab), čímž započalo natrávení, které pokračovalo po dobu dvou hodin při teplotě 55 °C. Na natrávenou látku bylo působeno 20 jednotkami alkalické fosfatázy (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) při teplotě 37 °C po dobu 30 minut. Vzniklá natrávená látka byla purifikována na 1 % agarózovém gelu a fragment o 4170 párech bází byl izolován metodou „freeze-squeeze“.

Oligonukleotidy 13824

(5'-TGA GGC TTC CAG GAC TCC CCC CAG ACT' GTC CAA TGT CTC CAG  
GCC ACT GGC CTC TGG CAA GT'G GCA ACT TTT AGA GAA GGC CAG CAC  
-3' (SEQ ID NO:14)

a 13825

(5'-GTG CTG GCC TTC TCT AAA AGT TGC CAC TTG CCA GAC GCC AGT  
GGC CT'G GAG ACA TTG GAC AGT' CTG GGG GGA GTC CTG GAA GCC-3'

(SEQ ID NO:15)

byly kinázovány v přítomnosti 1x kinázového pufru, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATP, 1 mM DTT, and 5 jednotek T4 polynukleotidové kinázy (GIBCO BRL) při 37 °C po 30 minut.

The *PmlI/BstXI* linearizovaný pHS692 vektor a linkery 13824 a 13825 byly ligovány v 1x kinázového pufru, 0.5 mM ATP and 1 jednotky T4 DNA ligázy (GIBCO BRL) při teplotě 16 °C po jednu noc. Ligační produkty byly transformovány do *E. coli* BL21(DE3) (NOVAGEN) a kolonie vypěstované na TY miskách s přidáním 10 µg/ml tetracyklinu byly analyzovány. Byla izolována plasmidová DNA, která byla podrobena DNA sekvenaci na sekvenceru PE-Applied Biosystems 370 DNA sequencer. Plasmidy obsahující očekávané fragmenty od *NdeI* do *BamHI* o okolo 400 párech bází byly uchovány a nazvány pHS787.

#### Příklad 4

##### **Plasmid exprese (Protein SEQ ID NO:3)**

Plasmid pOU722 byl natráven pomocí *PmlI* a *Bsu36I*.

Syntetický DNA fragment, který má sekvenci

5'-SEQ ID NO:16: (SEQ ID NO:16)

TGAGGCTTCCAGGACTCCCCCAGACTGTCCAATGTCTCCAGGCCACTGGCGTCTGGCAA  
GTGGCAACTTTTAGAGAAGGCCAGCAC

zpracovaný se sekvencí

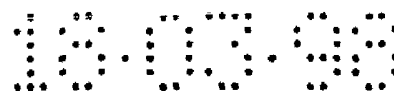
5'-SEQ ID NO:17: (SEQ ID NO:17)

GTGCTGGCCTTCTCTAAAAGTTGCCACTTGCCAGACGCCAGTGGCCTGGAGACATTGGAC  
AGTCTGGGGGGAGTCCTGGAAGCC

byl vložen mezi místa *PmlI* a *Bsu36I*. Po ligaci, transformaci a izolaci plasmidu byla sekvence syntetického fragmentu ověřena DNA sekvenační analýzou.

Techniky pro transformaci buněk výše uvedenými vektory jsou odborníkům dobře známy (Maniatis, T. a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. vyd., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1988); *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) a dodatky). Techniky použité při transformaci buněk *E. coli*, použité při výhodném provedení předkládaného vynálezu, jak jsou zde popsány, jsou dobře známy odborníkům v oboru. Přesné podmínky, za nichž byly transformované buňky *E. coli* kultivovány jsou závislé na povaze linie hostitelských buněk *E. coli* a na použitém vektoru exprese nebo klonovacím vektoru. Například vektory, které zahrnují termoinducibilní oblasti promotor-operátor, jako je *c1857* termoinducibilní lambda fágová oblast promotor-operátor, vyžadují teplotní posun z asi 30 °C na asi 40 °C v kultivačních podmínkách, aby byla indukována syntéza proteinu.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu byly jako hostitelské buňky použity buňky *E. coli* K12 RV308, ale je možné použití i řady dalších buněčných linií, jako jsou v neomezujícím výčtu *E. coli* K 12 L201, L687, L 693, L507, L640, L641, L695, L814 (*E. coli* B). Transformované



hostitelské buňky jsou potom umístěny na vhodnou kultivační půdu pod selektivním tlakem antibiotika, odpovídajícího genu resistance, který je přítomen v plasmidu exprese. Kultury jsou potom inkubovány po dobu a při teplotě, které odpovídají zvolené linii hostitelských buněk.

Proteiny, které jsou exprimovány v bakteriálním systému exprese o vysoké úrovni, typicky agregují v granulích nebo inkluzních tělesech, která obsahují vysokou úroveň hyperexprimovaného proteinu [Kreuger, J.K. a kol., v *Protein Folding*, Gierasch, L.M. a King, J. editoři, publikace American Association for the Advancement of Science č. 89-18S, Washington, D.C., 136-142 (1990)]. Takové proteinové agregáty musí být rozpuštěny, aby byla možná jejich další purifikace a izolace požadovaného proteinového produktu. [Kreuger, J.K. a kol., viz výše]. Pro solubilizaci takových proteinů je používána řada technik, používajících silně denaturující roztoky, jako je guanidin-HCl a/nebo slabě denaturující roztoky jako je močovina. Postupné odstraňování denaturujících činidel (často dialýzou) z roztoku dovoluje denaturovanému proteinu, aby přijal svoji přirozenou konformaci. Konkrétní podmínky denaturace a skládání jsou určeny konkrétním protein exprimujícím systémem a/nebo uvažovaným proteinem.

Výhodně jsou proteiny podle předkládaného vynález exprimovány s leader sekvencí. Odborník v oboru ví, že je možno použít řadu leader sekvencí, avšak leader sekvence je výhodně Met-R<sub>1</sub>-, kde R<sub>1</sub> je jakákoli aminokyselina s výjimkou Pro a nebo chybí, takže exprimované proteiny mohou být snadno konvertovány na proteiny podle předkládaného vynálezu



pomocí Cathepsinu C nebo jiné vhodné aminopeptidázy. R<sub>1</sub> je výhodně Arg, Asp nebo Tyr a obzvláště výhodně jsou proteiny exprimovány se leader sekvencí Met-Arg. Je zajímavé, že leader sekvence neovlivňuje významným způsobem stabilitu nebo aktivitu proteinu. Leader sekvence je však výhodně od proteinu odštěpena. Proteiny obecného vzorce Met-R<sub>1</sub>-SEQ ID NO:1 jsou tedy použitelné jako biologická činidla a výhodně jako meziprodukty.

#### Příklad 5

Protein se sekvencí SEQ ID NO:3, který má Met-Arg leader sekvencí je exprimován v *E. coli*, izolován a složen technikami, analogickými technikám z předchozích příkladů. pH proteinového roztoku je redukováno na pH 2,8. Met-Arg leader sekvence je odštěpena přidáním 5-10 milijednotek dDAP na miligram proteinu (dDAP je zkratka pro dipeptidylaminopeptidázu izolovanou z slizovky *Dictyostelium descoidium*, popsaná Atkinsonem P.R. a kol., U.S. patent 5,565,330, vydaný 15. října 1996). Reakce konverze byla prováděna po dobu 2-8 hodin při pokojové teplotě. Postup reakce byl monitorován vysokovýkonnou chromatografií s reverzní fází (HP-RPC). Reakce byla ukončena upravením pH na 8 přidáním NaOH, des(Met-Arg) protein byl dále purifikován kationtovou ionexovou chromatografií v přítomnosti 7-8 M močoviny a vylučovací chromatografií v PBS. Po finální purifikaci vylučovací chromatografií byl protein koncentrován na 3-3,5 mg/ml v PBS.

Purifikace proteinů podle vynálezu byla prováděna způsoby známými ze stavu techniky, které zahrnují reverzní fázovou

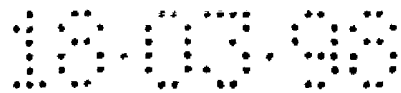
chromatografii, afinitní chromatografii, chromatografii iontovou výměnou a vylučováním podle velikosti.

Proteiny podle vynálezu obsahují dva cysteinové zbytky. Z tohoto důvodu může být použita disulfidová vazba pro stabilizaci proteinu. Předkládaný vynález zahrnuje proteiny obecného vzorce (I), ve kterém Cys v poloze 96 je křížově spojen s Cys v poloze 146 stejně tak jako proteiny bez takovéto disulfidové vazby. Výhodně je Cys v poloze 96 disulfidovým způsobem vázána k Cys v poloze 146. Navíc proteiny podle vynálezu mohou existovat, obzvláště ve farmaceutických přípravcích, jako dimery, trimery, tetramery a další multimery. Takovéto multimery spadají do rozsahu předmětu předkládaného vynálezu.

Předkládaný vynález podává použití proteinů podle vynálezu při léčení obezity. Toto použití zahrnuje podávání účinného množství anti-obezitního proteinu do organismu v dávkách od asi 1 µg/kg do asi 1000 µg/kg. Výhodná dávka je od asi 10 µg/kg do asi 100 µg/kg aktivní složky. Typická denní dávka pro dospělou osobu je od asi 0,5 mg do asi 100 mg. Při použití podle předkládaného vynálezu mohou být sloučeniny obecného vzorce (I) podávány v jednoduché denní dávce nebo ve více dávkách denně. Režim může vyžadovat podávání po dlouhou dobu. Množství podávané látky v jedné dávce nebo celkové podané množství budou určeny lékařem a závisí na takových faktorech, jako je povaha a úpornost nemoci, věk a celkový zdravotní stav pacienta a snášitelnost pacienta k sloučenině.

Předkládaný vynález dále podává farmaceutické prostředky,

obsahující sloučeniny podle vynálezu. Proteiny, výhodně ve formě farmaceuticky přijatelné soli, mohou být připraveny pro parenterální podávání pro terapeutické nebo profylaktické účely, týkající se obezity. Sloučeniny obecného vzorce mohou například být smíchány s konvenčními farmaceutickými nosiči a excipienty. Kompozice obsahující proteiny podle vynálezu obsahují od asi 0,1 do asi 85 % hmotnostních aktivního proteinu, výhodně ve rozpustné formě a obecněji od asi 10 do asi 30 %. Dále, proteiny podle vynálezu mohou být podávány samotné nebo v kombinaci s dalšími anti-obezitními činidly nebo činidly, užitečnými pro léčení diabetu. Pro intravenózní (i.v.) podávání může být protein podáván v běžně používaných intravenózních tekutinách a podáván infúzí. Takové tekutiny jsou například fyziologický roztok, Ringerův roztok nebo 5 % roztok dextrózy. Pro intramuskulární podávání může být sterilní přípravek proteinu obecného vzorce (I), výhodně ve formě vhodné rozpustné soli, například soli kyseliny chlorovodíkové, rozpuštěn a podáván ve farmaceutickém ředidle jako je nepyrogenní (destilovaná) voda, fyziologický roztok nebo 5 % roztok glukózy. Vhodná rozpustná forma sloučeniny může být připravena a podávána i jako suspenze na vodné bázi nebo na bázi fyziologicky přijatelného oleje, například jako ester mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, jako je ethyloléát. Do kompozice jsou výhodně přidány farmaceuticky přijatelná konzervační nebo chránící činidla jako je alkymparaben, obzvláště methylparaben, ethylparaben, propylparaben nebo butylparaben a nebo chlorbutanol, aby se umožnilo vícedávkové použití. Je významné, že proteiny podle vynálezu jsou také stabilní v přítomnosti fenolových činidel, jako je m-kresol nebo fenol. Stabilita proteinů



podle vynálezu v přítomnosti fenolových činidel je výhodná ve farmaceutickém použití, které využívá zvýšenou účinnost uvedených činidel. Přípravky jsou výhodně připravovány v nepřítomnosti soli, aby se minimalizoval ionický účinek přípravku.

Schopnost sloučenin podle vynálezu působit na obezitu je demonstrována *in vivo* v následujících příkladech.

### Biologické testy

Parabiotické experimenty naznačují, že protein je uvolňován periferní adipózní (tukovou) tkání a že protein je schopen řídit přírůstek tělesné hmotnosti u normální i u obézní myši [Coleman, D.L., *Diabetologia* 14:141-148 (1978)]. Biologickým testem, který nejvíce odpovídá použití proteinů, je proto injekce testovaného činidla kterýmkoli z více možných způsobů podávání, například intravenózně (i.v.), subkutánně (S.C), intraperitoneálně (i.p.) nebo minipumpou nebo kanylou a následující sledování spotřeby potravy a vody, přírůstek tělesné hmotnosti, chemických vlastností plazmy nebo hormonů (glukóza, insulin, ACTH, kortikosteron, GH, T4) po různé časové intervaly.

Mezi vhodná testovací zvířata patří normální myši (ICR a podobně) a obézní myši (*ob/ob*, *Avy/a*, *KK-Ay*, „tubby“, „fat“). Myši model *ob/ob* obezity a diabetu je obecně přijímán jako indikativní pro obezitní stavy. Byly používány kontrolní vzorky pro určování nesespecifických účinků pomocí vehikula s nebo bez aktivního činidla nebo podobných kompozic u stejných zvířat monitorováním těchto parametrů a

nebo použitím téhož činidla u zvířat, u nichž se předpokládá, že postrádají příslušné receptory (myši db/db, krysy fa/fa nebo cp/cp). Proteiny, vykazující účinnost v těchto modelech budou vykazovat podobnou účinnost u ostatních savců, speciálně u člověka.

Jelikož se předpokládá, že cílová tkáň je hypothalamus, ve kterém je regulován příjem potravy a lipogenní stav, podobný model zahrnuje injekci testované látky přímo do mozku, například injekcí laterálními nebo třetími ventrikuly (i.c.v.) nebo přímo do specifického hypothalamového jádra jako je obloukové, paraventrikulární nebo perifornikální jádro. Mohou být měřeny stejné parametry jako výše uvedené a nebo může být monitorováno uvolňování neurotransmiterů, o nichž je známo, že regulují příjem potravy nebo metabolismus (např. uvolňování NPY, galaninu, norepinefrinu, dopaminu,  $\beta$ -endorfinu).

Reprezentativní proteiny zmíněné v příkladech 6 a 7 byly připraveny způsobem podle popisu a příkladů uvedených výše. Označení Met-Arg- znamená proteiny připravené a testované s připojenou leader sekvencí Met-Arg. Aminokyselinová sekvence proteinů podle příkladů byla potvrzena hmotovou spektroskopií a/nebo aminokyselinovou analýzou. Pro testy byly proteiny konfigurovány s Cys zbytky křížově spojenými disulfidovými můstky. Schopnost proteinů podle vynálezu působit na obezitu u ob/ob myši je dokumentována v Tabulkách 1-3. Podobné studie byly provedeny *in vitro* za použití izolovaných hypothalamických tkání v perifúzní nebo tkáňové lázni. V této situaci bylo monitorováno uvolňování neurotransmiterů a elektrofyziologické změny.

Příklad 6

**Testování Ob proteinů SEQ ID NO:2, 3 a 6 u samců ob/ob myši**

Samci ob/ob myši [Harlan, Ltd. Blackthorn, England] byly chovány ve skupinách po 5 zvířatech a bylo jim podávána *ad libitum* Purina 5008 potrava a voda. Myši byly udržovány při revezním osvětlovacím režimu (světlo vypnuto 9.00 hod a zapnuto v 21.00). Myši byly denně váženy v 8.30. V tutéž dobu byly vyhodnocována jejich spotřeba vody a potravy. Podávání testované látky bylo prováděno, jak je uvedeno níže, po ranním vážení, těsně před vypnutím osvětlení. Myším byla testovaná látka podávána denně po 4 dny.

Skupina	Ošetření (n=5)
1	PBS 0,2 ml denně. S.C.
2	Protein 30 µg/0,2 ml denně, S.C.
3	Protein 300 µg/0,2 ml denně, S.C.

Účinek tohoto působení na spotřebu potravy a kumulativní tělesnou hmotnost jsou ilustrovány pro reprezentativní proteiny podle předkládaného vynálezu v následujících tabulkách 1-3.

Tabulka 1. Účinek proteinu SEQ ID NO:2 na spotřebu potravy a změnu kumulativní tělesné hmotnosti u *ob/ob* myši

Den	Spotřeba potravy (g/den)			Změna tělesné hmotnosti (g)		
	Skup.1	Skup.2	Skup.3	Skup.1	Skup.2	Skup.3
1	4,4	4,1	2,4	+0,5	-0,6	-0,8
2	5,3	4,3	3,0	+0,4	-0,2	-1,3
3	4,8	4,2	2,4	+0,6	-0,2	-2,3
4	5,1	3,8	1,5	+0,9	-0,6	-3,5

Tabulka 2. Účinek proteinu SEQ ID NO:3 na spotřebu potravy a změnu kumulativní tělesné hmotnosti u *ob/ob* myši

Den	Spotřeba potravy (g/den)			Změna tělesné hmotnosti (g)		
	Skup.1	Skup.2	Skup.3	Skup.1	Skup.2	Skup.3
1	5,6	4,9	4,0	+0,3	-0,2	-0,5
2	6,1	4,0	3,1	+0,5	-0,3	-1,0
3	5,9	3,5	2,3	+0,6	-0,5	-2,0

Tabulka 3. Účinek proteinu SEQ ID NO:6 na spotřebu potravy a změnu kumulativní tělesné hmotnosti u *ob/ob* myši

Den	Spotřeba potravy (g/den)			Změna tělesné hmotnosti (g)		
	Skup.1	Skup.2	Skup.3	Skup.1	Skup.2	Skup.3
1	6,2	4,6	4,0	+0,4	-0,1	-0,7
2	6,4	3,9	3,5	+0,4	-0,3	-0,9
3	5,5	3,4	2,1	+0,5	-0,6	-1,7
4	5,5	2,8	1,6	+0,4	-1,3	-2,5

### Příklad 7

#### **Analýza agregace dynamickým rozptylem světla**

#### **(DLS - Dynamic Light Scattering)**

Fyzikální vlastnosti sloučenin podle vynálezu byly demonstrovány následujícím způsobem. V závislosti na dostupnosti látky byl roztok pro analýzu dynamickým rozptylem světla připraven jedním ze dvou způsobů. Materiál byl dodán v roztoku z posledního purifikačního kroku, prováděného vylučovací chromatografií v PBS v koncentraci přibližně 1,5 mg/ml a byl buď koncentrován na 5 mg/ml diafiltrací nebo dialyzován proti vodě, lyofilizován a rekonstituován na 3-5 mg/ml.

V prvním případě byl proteinový roztok s koncentrací přibližně 1,5 mg/ml koncentrován na více než 3-5 mg/ml v nízkoobjemové míchací buňce (10 ml) použitím Amicon YM10 25 mm membrány. Operace byla prováděna za snížené teploty (asi 5 °C). Proteinová koncentrace byla určena UV absorpcí a roztok byl zředěn na 3,0 mg/ml pomocí PBS (10 násobné zředění vodou 10x PBS bez Ca/MG, GIBCO BRL).

Druhá alternativní metoda byla používána v případě, že byla možná lyofilizace a spočívala v dialýze roztoku proteinu proti vodě použitím tří až pěti výměn vody při teplotě asi 4 °C. Typická dialyzační membrána byla Spectra/Por-7 dialyzační membrána s mezní velikostí danou molekulární hmotností 2000 (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA). Materiál byl koncentrován podobně jako výše na 3 až 4

mg/ml a typicky bylo lyofilizováno 2mg v 5 ml nádobce. Pro DLS analýzu byl tento vzorek rekonstituován vodou na více než 3,3 mg/ml nebo na více než 5,5 mg/ml. Najednou bylo typicky používáno několik nádobek. Proteinová koncentrace byla určena UV metodou při špičkovém maximu (typicky 280 nm). Proteinová koncentrace byla zředěna na asi 3 mg/ml nebo na asi 5 mg/ml kombinací vody a 10x PBS (bez Ca/MG, GIBCO BRL), čímž se získala konečná PBS koncentrace 1x.

Proteinový roztok s koncentrací 3 mg/ml nebo 5 mg/ml v 1x PBS byl upraven na pH 7,4 pomocí HCl/NaOH a přefiltrován přes 0,1  $\mu$ m Anotop<sup>TM</sup>-10 filtr (Whatman International, Ltd., Maidstone, England) do DLS komory. Střední kumulativní velikost částice byla měřena na přístroji Brookhaven BI900 DLS (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY) pomocí argon-iontového laseru Lexel každých 15 minut s 30 vteřinovou dobou trvání a úhlem 90°. Byl použit 488 nm filtr s otvorem 400  $\mu$ m. Při inkubační teplotě 37 °C byla použita viskozita 0,6915 centipoise (cP) a refraktivní index 1,333. Střední velikost částic byla určena kumulantovou metodou použitím měřené autokorelační základní úrovně.

Odhadovaný čas, potřebný k tomu, aby různé antiobezitní proteinové sloučeniny dosáhly velikosti částic 50 nm v PBS roztoku při pH 7,4 a teplotě 37 °C jsou ukázány v Tabulce 4. Střední velikost částic byla určena kumulantovou analýzou binodální distribuce složené z monomerní populace a populací vyšších agregačních řádů. Čas, potřebný k dosažení střední agregované velikosti 50 nm byl určován vynášením velikosti jako funkce času. Testované proteiny byly skládány s Cys zbytky křížově vázanými disulfidovou vazbou. Jako reference

15.03.99

jsou podány lidský Ob protein a protein SEQ ID NO:18.  
Označení „u.d.“ znamená nemožnost určit hodnotu a označení  
„n.d.“ znamená hodnotu, která nebyla určována. Protein SEQ  
ID NO:18 má následující sekvenci:

```
      5              10              15
Met Arg Val Pro Ile Gln Lys Val Gln Asp Asp Thr Lys Thr Leu Ile

      20              25              30
Lys Thr Ile Val Thr Arg Ile Asn Asp Ile Ser His Thr Gln Ser Val

      35              40              45
Ser Ser Lys Gln Lys Val Thr Gly Leu Asp Phe Ile Pro Gly Leu His

      50              55              60
Pro Ile Leu Thr Leu Ser Lys Met Asp Gln Thr Leu Ala Val Tyr Gln

      65              70              75              80
Gln Ile Leu Thr Ser Met Pro Ser Arg Asp Val Ile Gln Ile Ser Asn

      85              90              95
Asp Leu Glu Asn Leu Arg Asp Leu Leu His Val Leu Ala Phe Ser Lys

      100             105             110
Ser Cys His Leu Pro Trp Ala Ser Gly Leu Glu Thr Leu Asp Ser Leu

      115             120             125
Gly Gly Val Leu Glu Ala Ser Gly Tyr Ser Thr Glu Val Val Ala Leu
```

130

135

140

Ser Arg Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu

145

Ser Pro Gly Cys (SEQ ID NO:18)

Table 4. Odhadovaný čas (v minutách), nutný k tomu, aby různé anti-obezitní proteiny dosáhly střední velikosti částic 50 nm v PBS roztoku při pH 7.4 a 37 °C.

Protein	Odhadovaný čas pro dosažení 50 nm (min)	
	3 mg/ml	5 mg/ml
Lidský Ob Protein	2	u.d.
SEQ ID NO:2	604	n.d.
SEQ ID NO:3	572	44
SEQ ID NO:6	1356	527
SEQ ID NO:18	124	n.d.

Sloučeniny jsou aktivní v alespoň jednom z výše uvedených biologických testů a představují anti-obezitní činidla. Jako taková mohou být používána v léčení obezity a poruch, zahrnujících obezitu. Proteiny podle předkládaného vynálezu však nejsou užitečná jako terapeutické látky, ale odborníkovi je zřejmé, že proteiny mohou být také používány při výrobě protilátek pro diagnostické použití a jako proteiny jsou také použitelné jako krmná aditiva pro zvířata. Sloučeniny podle vynálezu jsou také použitelné pro

řízení váhy pro kosmetické účely u savců. Kosmetické účely znamenají snahu ovládat tělesnou hmotnost savců pro zlepšení vzhledu těla. Přitom savec nemusí nutně být obézní. Takové kosmetické použití tvoří část předkládaného vynálezu.

Principy, výhodná provedení a způsoby provádění předkládaného vynálezu byly popsány ve výše uvedeném popisu a příkladech. Vynález, který je předkládán k ochraně však není omezen žádnou speciální formou zde popsanou, neboť výše uvedený popis je třeba chápat jako ilustrativní a ne jako restriktivní. Odborník může provést různé změny a variace, aniž by se odchýlil od ducha předkládaného vynálezu.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík v.r.



130

135

140

Leu Gln Gly Ser Leu Gln Asp Met Leu Trp Gln Leu Asp Leu Ser Pro

145

Gly Cys (SEQ ID NO:1)

ve kterém

Xaa v poloze 22 je Asn nebo Ser;

Xaa v poloze 28 je Gln nebo chybí;

Xaa v poloze 72 je Asn, Gln, Glu, nebo Asp;

Xaa v poloze 73 je Val nebo Met;

a protein zahrnuje alespoň jednu z následujících substitucí:

Trp v poloze 100 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

Trp v poloze 138 je nahrazen Glu, Asp, His, Lys nebo Arg;

nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

2. Protein podle nároku 1, ve kterém Cys v poloze 96 je spojen disulfidovým můstkem s Cys v poloze 146.

3. Protein podle nároku 2, ve kterém

Xaa v poloze 22 je Asn;

Xaa v poloze 28 je Gln;

Xaa v poloze 72 je Asn nebo Asp;

Xaa v poloze 73 je Val; a

Trp v poloze 100 je nahrazen Glu nebo Asp.

4. Protein podle nároku 1, který má sekvenci zvolenou ze souboru, zahrnujícího sekvence SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 a SEQ ID NO:8.

5. Protein sestávající z proteinu podle kteréhokoli z nároků 1 až 4 a leader sekvence, která je vázána k N-konci proteinu, nebo jeho farmaceuticky přijatelná sůl.

6. Protein podle nároku 5, ve kterém leader sekvence je Met-R<sub>1</sub>, kde R<sub>1</sub> chybí nebo je to libovolná aminokyselina různá od Pro.

7. Protein podle nároku 6, ve kterém leader sekvence je Met-Arg, Met-Asp nebo Met-Tyt.

8. Protein podle nároku 7 který má sekvenci zvolenou ze souboru, obsahujícího SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11 a SEQ ID NO:12.

9. Farmaceutický prostředek, obsahující jako aktivní činidlo protein podle kteréhokoli z nároků 1 až 8 nebo jeho farmaceuticky přijatelnou sůl, spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými ředidly, nosiči nebo excipienty aktivního činidla.

10. DNA polynukleotidová sloučenina obsahující DNA kódující protein podle kteréhokoli z nároků 1 až 8.

11. Způsob výroby proteinu podle kteréhokoli z nároků 5

až 8, zahrnující následující kroky:

- a) transformace hostitelské buňky pomocí DNA, která kóduje uvedený protein,
- b) kultivace transformované hostitelské buňky taková, že je exprimován uvedený protein,
- c) získání exprimovaného proteinu.

12. Způsob výroby proteinu podle kteréhokoli z nároků 1 až 4, zahrnující kroky způsobu podle nároku 11 a následující kroky:

- d) enzymatické odštěpení leader sekvence exprimovaného proteinu a vytvoření proteinu podle některého z nároků 1 až 4 a
- e) získání proteinu.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík v.r.

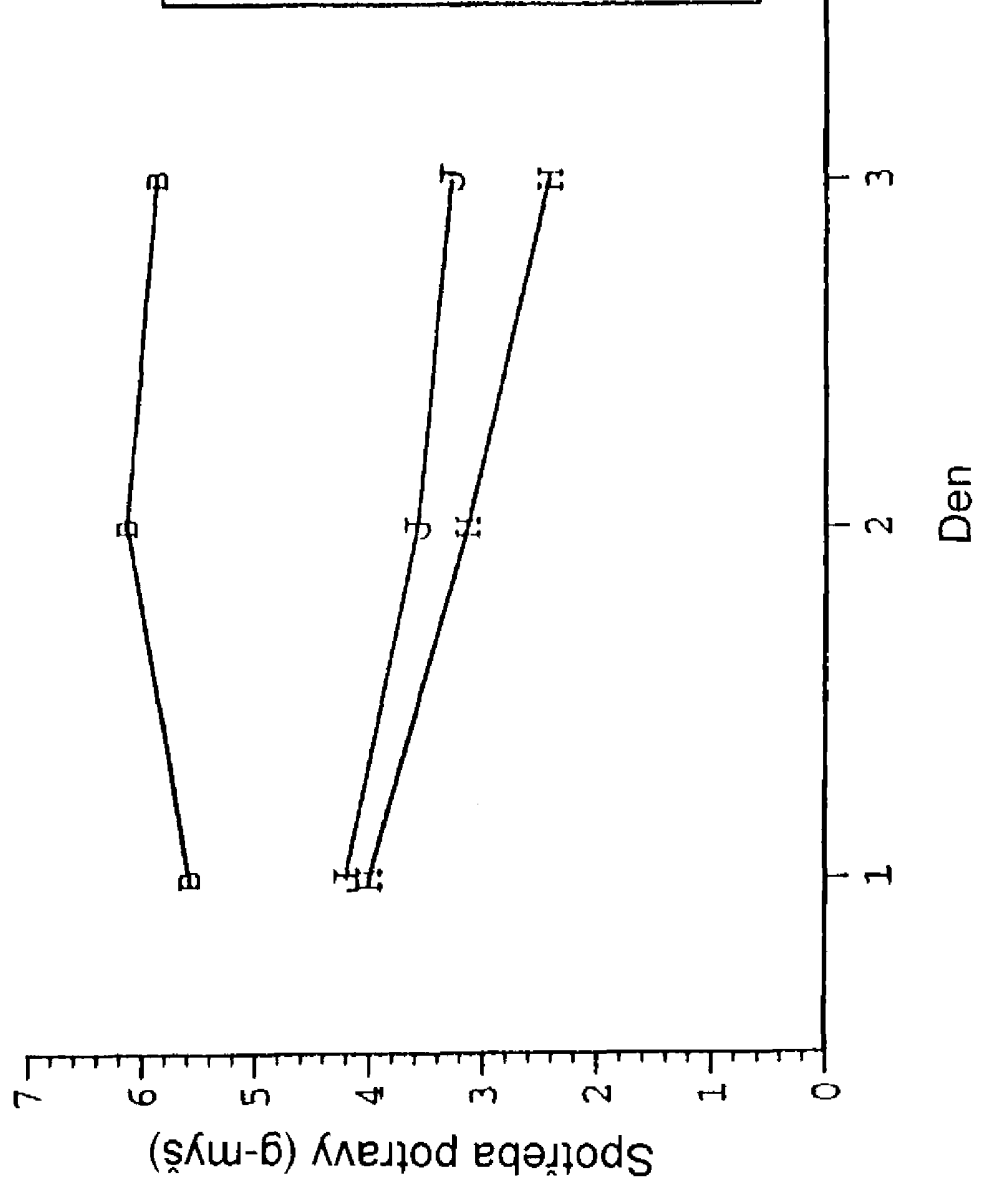
**Anotace**

**Název vynálezu:** Anti-obezitní proteiny, způsob jejich  
výroby a farmaceutický prostředek  
s jejich obsahem

Předkládaný vynález se týká anti-obezitních proteinů které, pokud jsou podávány pacientovi, regulují tukovou tkáň. Uvedené proteiny proto dovolují pacientovi překonat obezitní handicap a žít normální život s podstatně sníženým rizikem diabetu typu 2, kardiovaskulárních onemocnění a rakoviny.

# OBR. 1

Účinek roztoku proteinu SEQ ID NO: 2 na spotřebu potravy myši ob/ob



Legend for the graph:

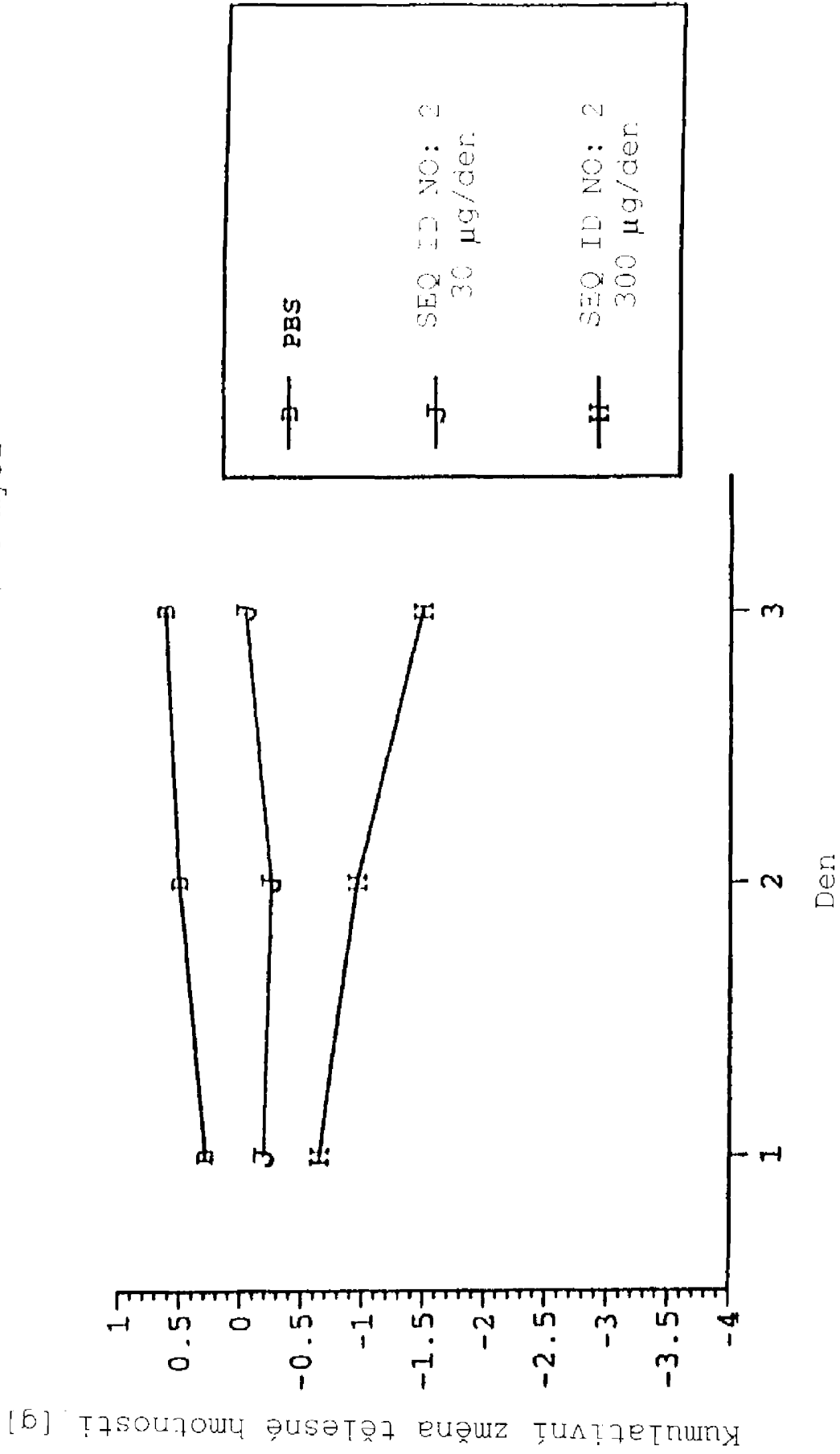
- PBS
- - -□- - SEQ ID NO: 2 30 µg/den
- ...△... SEQ ID NO: 2 300 µg/den

27048

27048

# OBR. 2

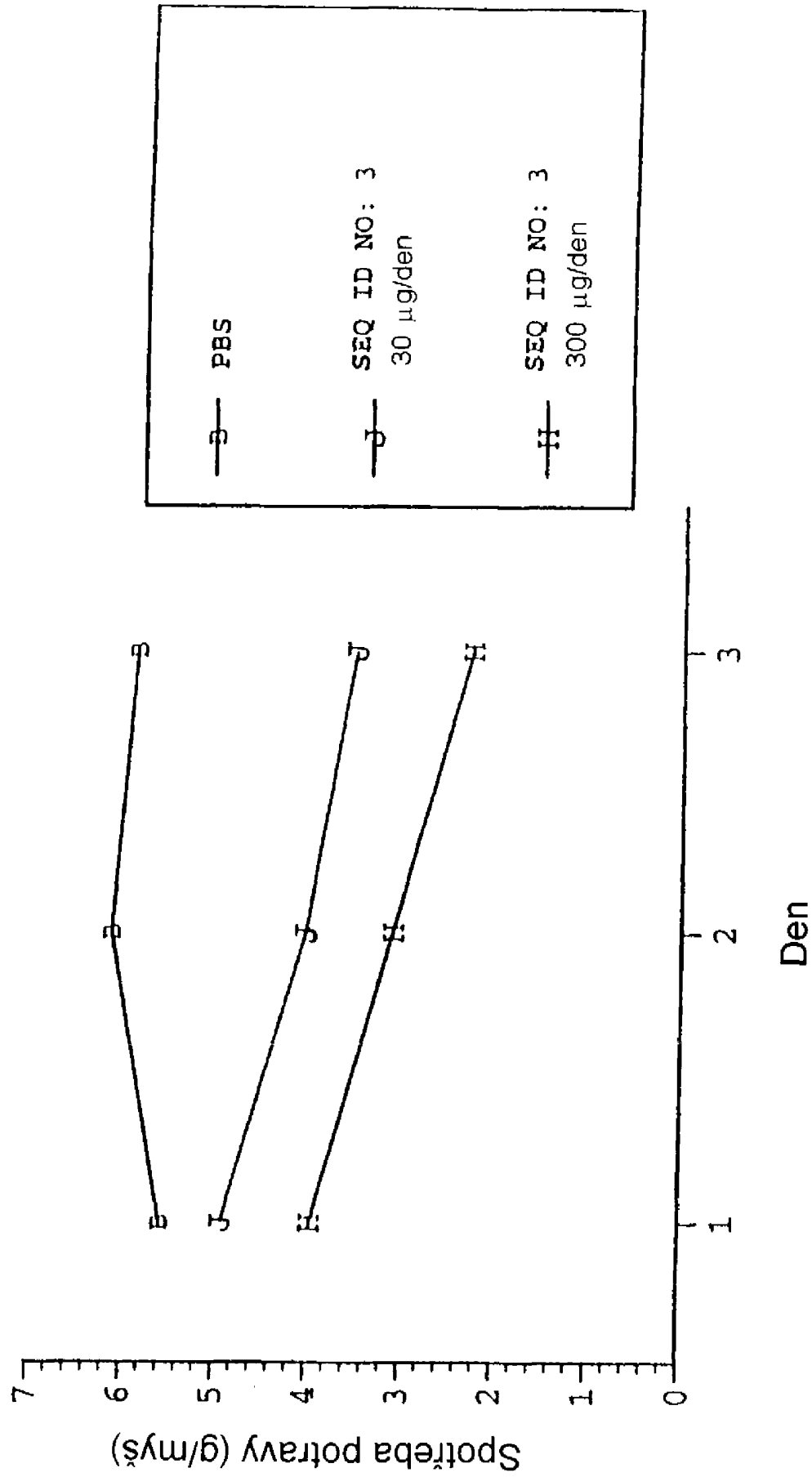
Vliv proteinu SEQ ID NO: 2 na tělesnou hmotnost  
samce ob/ob myši



2020

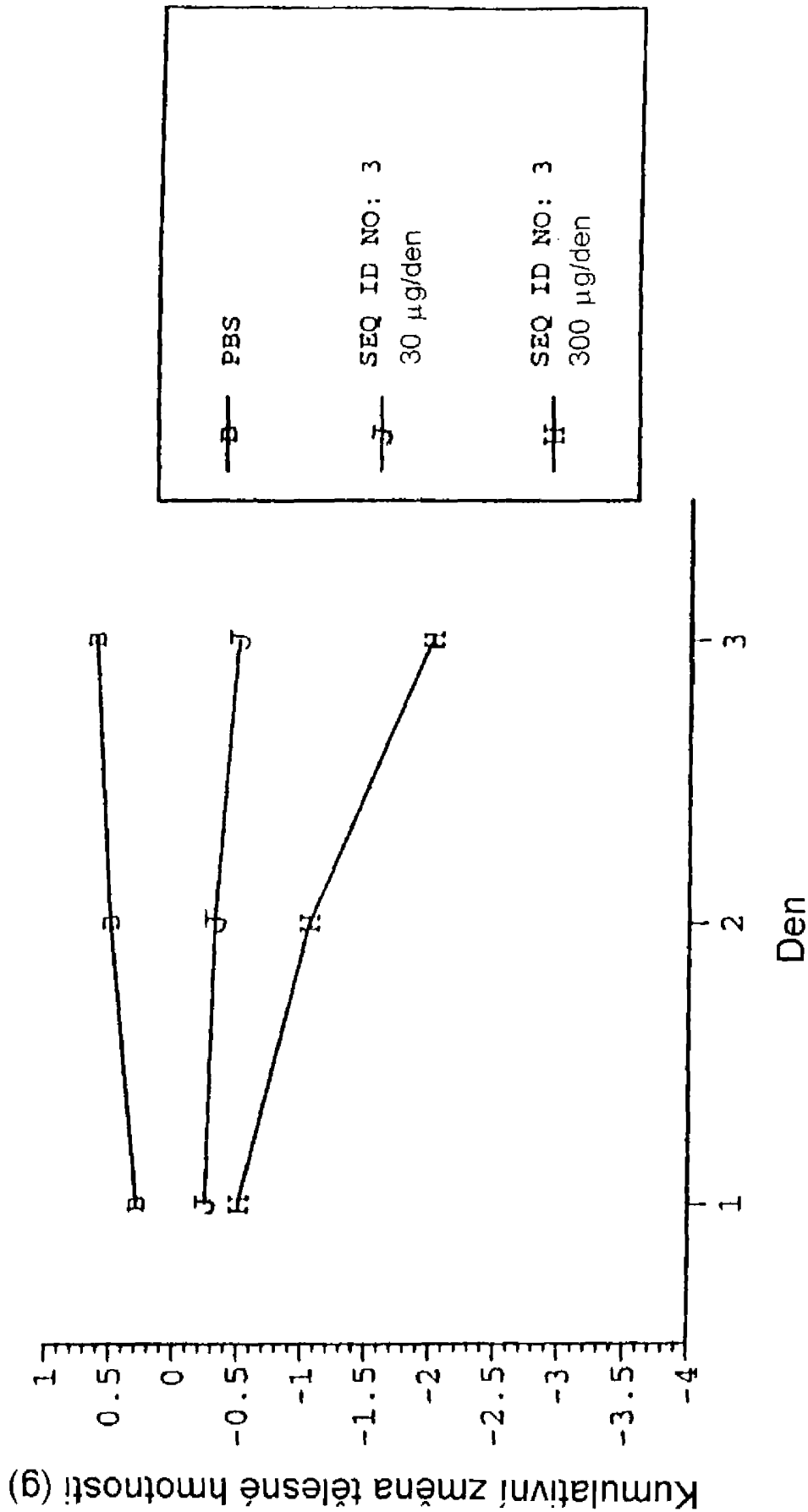
# OBR. 3

Účinek roztoku proteinu SEQ ID NO: 3 na spotřebu potravy samce myši ob/ob

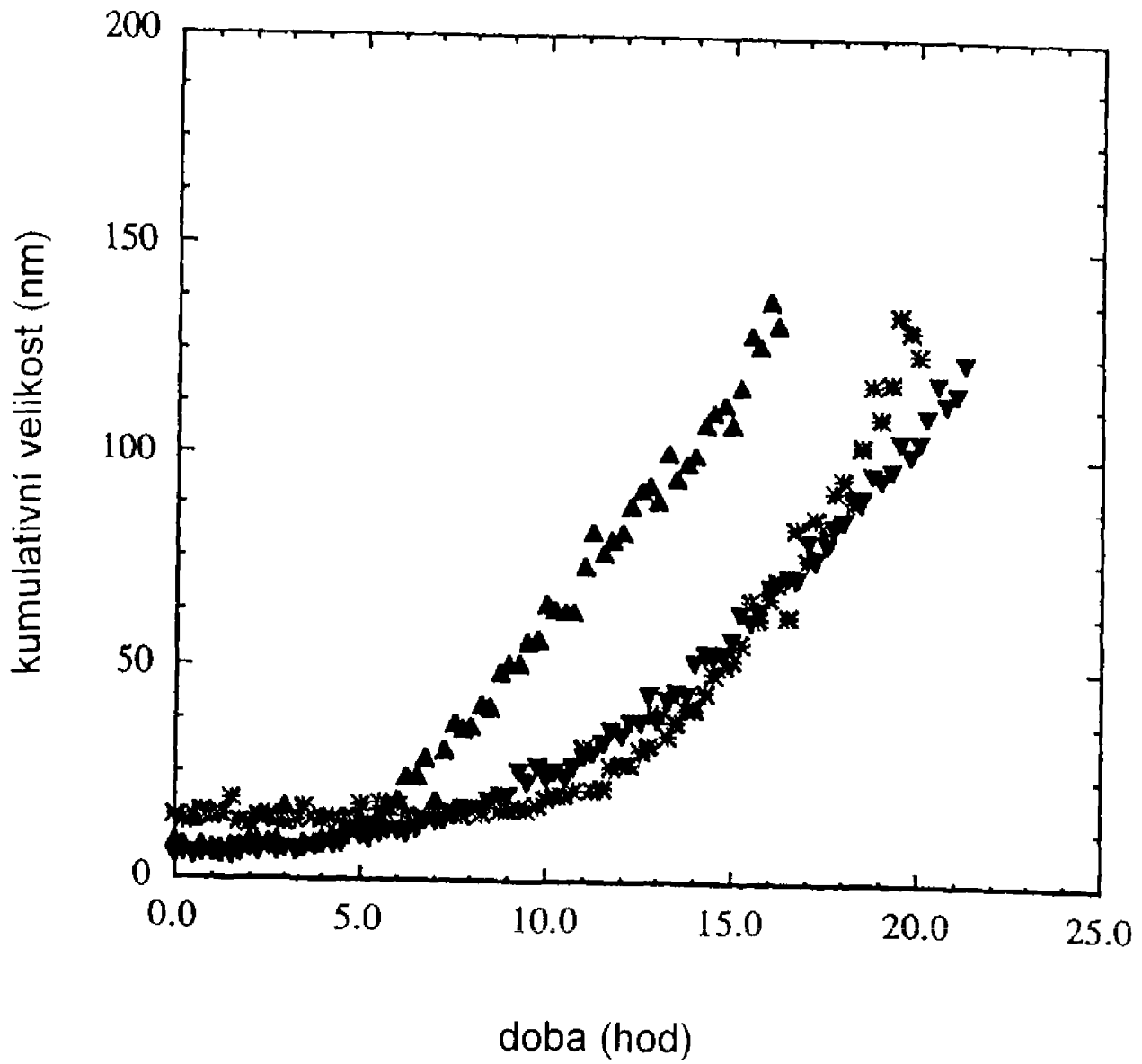


# OBR. 4

Účinek roztoku proteinu SEQ ID NO: 3 na tělesnou hmotnost samce myši ob/ob



OBR. 5



OBR. 6

