

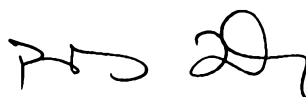
K I V O N A T

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**Ezrin szabályozó/kihajtogató peptidek**

A találmány tárgyát olyan töltéssel rendelkező molekulák képezik, amelyek képesek a Heparinreceptorhoz kötődni, és a Heparinreceptor egy részével azonos aminosav szekvenciával rendelkeznek. A találmány különösen olyan peptidekre vonatkozik, amelyek 5-13 aminosav hosszúak és a Heparinreceptor A és B Doménjeinek egy részével azonos aminosav szekvenciával rendelkeznek.

A találmány szerinti peptidek felhasználhatók fertőző betegségek és rák kezelésére immunválasz indukálása útján.

nincs jellemző ábra

**BOROS ISTVÁN**

A2

Ezrin szabályozó/kihajtogató peptidek

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A találmány olyan töltéssel rendelkező peptid molekulákra vonatkozik, amelyek a Hpreceptor egy részével azonos aminosav szekvenciával rendelkeznek.

A találmány háttere

A találmány területe a fertőző betegségek és a rák kezelésére vonatkozik a betegséget leküzdő immunválasz indukálásával. Az antibiotikumokra rezisztens patogén baktériumok új törzseinek növekvő problémája, a krónikus vírusos és gombás fertőzésekkel szemben hatékony vegyületek korlátozott választéka és a hatékony rákellenes kezelések hiánya olyan vegyületek iránt támaszt szükségletet, amelyek képesek fokozni az ilyen orvosi problémákkal szemben a gazda védekezését. A találmány olyan új, töltéssel rendelkező molekulákra vonatkozik, amelyek az általam izolált új, humán ezrinben lévő aktív helyhez, a Hpreceptorhoz kötődve immunválaszt stimulálnak. Az előnyös, töltéssel rendelkező molekulák új peptidek, amelyek a humán ezrinben lévő Hpreceptorral azonos szekvenciával rendelkeznek.

Az ezrin az ERM (ezrin-radixin-moezin) család fehérjéinek tagja, amely szerkezeti és szabályozó szerepet játszik a különféle sejttípusok széles körében. A meglévő nagyszámú bizonyíték azt mutatja, hogy az ezrin a sejtfelszíni topográfia irányítása érdekében a kortikális citoskeleton (sejtváz) szerkezetét szabályozza. Az ezrin két fő konformációs alakot vesz fel: 1) egy



oldható hajtogatott formát, amely a citoplazmában található és 2) egy kihajtogatott és megnyújtott formát, amely a sejtmembrán citoplazma felőli felszínéhez csatlakozva, különösen a mikrobolyhokkal és más aktivációval összefüggő szerkezeti elemekkel együtt található. A fehérje N-terminális része a membrán citoplazma felőli felületéhez csatlakozik, míg a C-terminális rész az aktin citoskeletonhoz kötődik. Az ezrin molekula egy tirozin-kináz szubsztrát, a T-sejtekben és az EGF receptor epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor, EGF) általi stimulálásának eredményeként tirozin foszforilált. Az ezrin N-terminális része megnyújtott konformációjában PIP_2 jelenlétében a CD44 citoplazmatikus végéhez kötődik. Az ezrin kötődhet továbbá az ICAM-2 (intracellular adhesion molecule, intracelluláris adhéziós molekula) citoplazmatikus végéhez is. Az ezrin fehérje nagyon érzékeny a szabályozó proteázokra, ilyen a kalpain, és sejtaktiváció alatt gyorsan megfordul (Anthony Bretscher és mtsai., (1997); *Journal of Cell Science* 110: 3011-3018).

Az ezrin fehérje másodlagos szerkezetének részletes vizsgálata azt mutatja, hogy három fő szerkezeti egységgel rendelkezik: az 1-300 aminosavig terjedő N-terminális egység, egy erősen töltött alfa egység a 300-470 aminosavakig és a 470-585 aminosavakig terjedő C-terminális egység. A szerkezeti modellezés azt sugallja, hogy az ezrin oldható globuláris formájában az alfa-egység két antiparallel hélixbe van hajtogatva, jóllehet a csavarodás helyét nem tudták azonosítani. A megnyújtott foszforilált forma modelljében az ezrin az N-terminális egység segítségével a sejtmembrán belső felszínéhez csatlakozik, a két



ezrin molekula alfa egységei antiparallel dimerekké párosodnak és a sejt felületi membránja alatt helyezkednek el. Ebben a ki-nyújtott formában az ezrin a 353-as tirozinnál (Yp 353) tirozin foszforilált (Ossi Turunen és mtsai., (1998), *Biochimica et Biophysica Acta* 1387: 1-16).

Korábban az US 5,773,573 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban (Rupert Holms, 1998, június 30.) ismertetem a HEP1 peptid 14 aminosavból álló szekvenciáját (a 28. azonosító számú szekvencia (SEQ ID NO.): TEKKRRETEREKE, amely azonos a humán ezrin 324-337-ig terjedő aminosavaival), amely 70 % azonosságot mutat az in vivo emberben HIV replikációt gátolni képes gp120 C-terminális részével. Akkor úgy gondoltam, hogy a HEP1 peptid megfigyelt HIV-ellenes hatása az orálisan beadott HEP1 miatt következett be, amely immunológiai toleranciát idéz elő a gp120 C-terminális részével komplementer HIV szekvencia által indukált autoreaktív immunválasszal szemben.

Most kimutattam, hogy a HEP1 HIV-ellenes aktivitását egy új immunológiai útvonal aktiválódása okozza, amelyben a HEP1 a Hепreceptor B egységében lévő vele komplementer szekvenciához kötődik (a HEP1 azonos a Hепreceptor A egységének egy részével).

A találmány összefoglalása

A találmány a humán ezrinben lévő új szabályozó helyet (Hепreceptort) és olyan töltéssel rendelkező molekulákat ír le, amelyek immunválassz létrehozására e helyhez kötődnek. Meghatároztam, hogy az ezrin oldható formájában a Hепreceptor (a humán ezrin 308-373 aminosavait foglalja magában) két szomszédos alfa-



helikális egységből áll, amelyek a kapocsrégiónál (M339-M340) csavarodnak egybe két antiparallel hélixszé, melyet az elsődleges aminosav szekvencia komplementer oldallánc töltései stabilizálnak (lásd 1. táblázat és 1. ábra). Meghatároztam, hogy az ezrin membránnal kapcsolt, kihajtogatott konformációjában a Hpreceptor átkerül a sejtmembránon, és a sejt külső felszínére kerül (lásd 2. ábra). Ez a nem várt felfedezés ellentmond a mai tudományos publikációkban ismertetett membrán-szerveződési modelleknek, amelyek az ezrin alfa-egységének egyik részét sem tüntetik fel a külső sejtfelszínen. A találmányom lényege, hogy a Hpreceptor részeivel azonos aminosav szekvenciával rendelkező peptidek a Hpreceptor komplementer részeihez kötődnek, amely orvosilag hasznos immunológiai választ eredményez. A találmány lényege továbbá, hogy bármely e helyhez kötődő töltéssel rendelkező molekula orvosilag hasznos immunválaszt fog előidézni. E töltéssel rendelkező molekulákat szájon át, illetve a különféle fertőző betegségek és a rák kezelésére szolgáló egyéb módokon adhatjuk be.

1. Táblázat: Aminosavak, hárombetűs kódjaik, egybetűs kódjaik és oldallánc töltéseik

AZ AMINOSAV OLDALLÁNCOKON LÉVŐ TÖLTÉSEK FIZIOLÓGIÁS pH-N				
Aminosav	Hárombetűs kód	Egybetűs kód	Töltés	Jele
Glicin	Gly	G	nincs	
Alanin	Ala	A	nincs	
Valin	Val	V	nincs	



Izoleucin	Ile	I	nincs	
Leucin	Leu	L	nincs	
Szerin	Ser	S	nincs	
Treonin	Thr	T	nincs	
Aszparaginsav	Asp	D	negatív	--
Glutaminsav	Glu	E	negatív	--
Foszfotirozin	Tyr (P)	Yp	negatív	--
Aszparagin	Asn	N	gyengén negatív	-
Glutamin	Gln	Q	gyengén negatív	-
Lizin	Lys	K	pozitív	+
Arginin	Arg	R	pozitív	+
Hisztidin	His	H	gyengén pozitív	+
Prolin	Pro	P	nincs	
Triptofán	Trp	W	nincs	
Fenilalanin	Phe	F	nincs	
Tirozin	Tyr	Y	nincs	
Metionin	Met	M	nincs	
Cisztein	Cys	C	nincs	

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra a következő molekulák elsődleges aminosav szekvenciáinak egymás utáni diagramja:

a) az oldható ezrinben lévő Heparin receptor hajtogatott antiparallel



kapcsolt hélicei;

- b) a membrán-kapcsolt ezrinben lévő Heparceptor kihajtogatott hélice egy peptid ligandum példán bemutatva;
- c) két sejt közötti kölcsönhatás alatt az antiparallel kapcsolt hélixek dimerjét képező két kihajtogatott Heparceptor.

A 2. ábra az ezrinen lévő Heparceptor, annak ligandumai, a sejtmembránok, a sejtfelszíni receptorok és a citoszkéletális komponensek közötti kapcsolat ábrázolása.

A szekvenciák rövid leírása

Az 1. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 2. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 3. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 4. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

Az 5. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 6. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 7. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 8. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 9. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid



aminosav szekvencia.

A 10. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 11. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 12. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 13. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 14. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 15. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 16. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 17. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 18. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 19. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 20. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 21. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 22. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.



A 23. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 24. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 25. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 26. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 27. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A 28. azonosító számú szekvencia a találmány szerinti peptid aminosav szekvencia.

A találmány részletes leírása

Az ezrin citoplazmában található oldható konformációja két szomszédos alfa-helikális doménből áll, amelyek az elsődleges aminosav szekvencia komplementer oldalláncainak töltései által stabilizálódva a kapocsrégiónál (M339-M340) hajtogatódnak össze két antiparallel hélixszé. A találmány tárgya, hogy a Heparin A Domén aminosav szekvenciájának pozitívan és negatívan töltött oldalláncai komplementerek a Heparin B Domén aminosav szekvenciájának pozitívan és negatívan töltött oldalláncaival. Az ezrin aktivált felnyitott konformációjában a két különböző ezrin molekula Heparin A Doménje és B Doménje közötti kölcsönhatás lehetővé teszi az antiparallel dimerek kialakulását. A sejtfelszín alatt képződő ezrin antiparallel dimereken felül meghatároztam azt, hogy a dimerek képződhetnek



az egyik sejt felületére kikerült Heparinreceptor és egy másik sejt felületére kikerült Heparinreceptor között is. Amikor a két Heparinreceptor kapcsolatot létesít, a két sejtfelszín közeli kapcsolódása alatt aktivációs jel indul el mindkét sejtben (2. ábra). Bármely töltött molekula, amely a Heparinreceptorok A Doménjének és B Doménjének oldallánc töltései közötti kölcsönhatást részlegesen utánozza, orvosilag hasznos biológiai választ fog előidézni.

A Heparinreceptor A Domén (a humán ezrin 308-339 aminosavai) a következő 32 aminosavból áll (a szekvenciákat az egybetűs kód alkalmazásával soroljuk fel a polipeptid N-terminálisa felől a C-terminálisa felé haladva. Az Yp a foszfortirozin formát jelenti, amelyet *in vivo* figyeltünk meg): 1. azonosító számú szekvencia: AREEKHQKQLERQQLETEKKRRETVEREKEQM. Az US 5,773,573 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban a HEP1 (28. azonosító számú szekvencia) HIV-elleni aktivitását ismerttettem, amelyről most kimutattam, hogy a Heparinreceptor A Domén egy részének szekvenciájával azonos szekvenciával rendelkezik (a humán ezrin szekvencia 324-337 aminosavait átérő aminosavak). A fenti szabadalmi leírásban azt a feltételezést tettem, hogy a HIV-elleni aktivitást a HIV gp120 C-terminálisa által indukált autoreaktív immunválaszra immunológiai tolerancia előidézése okozza. Most már kijelenthetem, hogy a HEP1 HIV-elleni aktivitását annak Heparinreceptor B Doménhez történő kötődése és egy újfajta immunválasz előidézése okozza. A találmány tárgyát tehát az ezrin Heparinreceptorból származó új peptidek képezik, amelyek jelentősen magasabb HEP1-aktivitással rendelkeznek.



A Heparin receptor B Domén (a humán ezrin 340-373 aminosavai) a következő 34 aminosavból áll (a 353-as Tirozin (Y) az ezrin membránnal kapcsolt konformációjában foszfortirozinná [Yp] foszforiláltak lehetnek): 2. azonosító számú szekvencia: MREKEELMLRLQDY_(P)EEKTKKAERELSEQIQRALQ. Megállapítottam, hogy a Heparin receptor B Domén az a hely az ezrinen, ahova a HIV gp120 kötődik az agy fertőzése során. (A HIV gp120 a Heparin receptor B Doménhez annak töltött C-terminális aminosavainak felhasználásával kötődik, amely a Heparin receptor A Doménjének egy részével 70 %-ban azonosságot mutat). Az új, töltéssel rendelkező molekulák, amelyek a Heparin receptorhoz kötődnek a HIV-vel összefüggő elmebaj kezelésére használhatók (Claudia Hecker és mtsai., (1997), *Virus Research* 49: 215-223).

Az 1A. példában bemutatom, hogy a Heparin receptor peptidek jelentős adjuváns aktivitással rendelkeznek és ezt egerekben az Ovalbuminnal szembeni IgG antitest válasz fokozódásával mutatom be HEP1, Rupe312, Rupe1014, Rupe1024 és Rupe2032 felhasználásával. Az 1B. példában bemutatom továbbá a Heparin receptor peptidek aktivitását az egérben bárány vörösvérsejtekkel (sheep red blood cells, SRBC) szembeni csecsemőmirigyben indukálódó antitestfüggő citotoxikus válasz fokozódása során HEP1, Rupe312, Rupe15, Rupe 1014, Rupe1024 és Rupe2032 felhasználásával.

A 2. példában bemutatom, hogy a heparin receptor peptidek jelentős antitumor aktivitással rendelkeznek és ezt az egerekben a gyorsan növekvő átültetett szarkómák és a lassabban növekvő átültetett kéri rák növekedési sebességének Heparin receptor peptidek általi csökkentésével mutatom be Rupe312 és Rupe414 alkalmazásá-



val.

A 3. példában bemutatom, hogy a HEP1 terápia (10 mg/nap szájon át beadva vagy 30 napig, vagy 90 napig) 21 HIV fertőzött betegben olyan immunválaszt idéz elő, amely klinikai javuláshoz vezet a terápia után következő hat hónap alatt, amint azt a CD4 T-limfocita populáció növekedésével és az opportunisták fertőzések csökkenésével, a HIV-fertőzőképesség csökkenésével és a T-limfociták CD38, CD8 populációinak csökkenésével mértem (az AIDS előrehaladottságának egy elfogadott prognosztikai markere) (M. Levancher és mtsai., (1992), *Clinical Experimental Immunology* 90: 376-382).

Megfigyeltem a T-limfociták CD44 és MHCII expressziójának szintjében bekövetkező átlagos növekedést, amely látszólag szintén összefüggésben van a klinikai javulással. A HEP1 beadásakor nem mutattam ki semmilyen toxicitást. Az MHCII és CD44 expresszió növekedése a memória T-sejtek és az MHCII által korlátozott sejtközvetített immunitás növekedésével van összefüggésben (S. Oehen és mtsai., (1998), *The Journal of Immunology* 161: 5338-5346).

A vizsgálat eredményei azt mutatják, hogy egy peptid vagy egy töltéssel rendelkező molekula, amely a HEP1 receptor egészét vagy egy részét utánozza egy aktivációs jelet idézhet elő, ami végső fokon az immunrendszer homeosztázisában történő változásokhoz vezet és a sejtközvetített, illetve a humorális immunitást hosszú távon serkenti. A 4. példában bemutatom továbbá, hogy az akut és krónikus Candida (sarjadzógomba) fertőzés nőknél a HEP1 receptor stimulálásból eredő immunválasszal kezelhető és gyógyítható. Az 5. példában mutatom be, hogy a HEP1 receptorból



származó peptidek monocitákat és makrofágokat aktiválhatnak az egérben, mind *in vitro* mind *in vivo*, amelyek védekező immunválaszhoz vezetnek. A találmány szerinti peptidek jelentősen magasabb aktivitással rendelkeznek, mint a HEP1. A Hепreceptor stimuláció az emberi periférikus vér egymagvú sejtjeinek aktiválásához is vezet, amelyet a radioaktív tríciummal jelzett timidin növekvő sejtek DNS-ébe történő beépülésének mérésével mutatok be a 6. példában. Az új peptidek, a Hепreceptor A Doménből származó Rupe312 és Rupe414 tízszer nagyobb aktivitással rendelkeznek, mint a HEP1.

Kimutattam továbbá, hogy az emberi fehérvérsejtek (white blood corpuscles, WBC) Hепreceptorból származó peptidekkel történő 24 órás inkubálása az MHC1 sejtfelszíni expressziójának lecsökkenését, amely valószínűleg a sejtaktiválás és a receptor internalizáció miatt következik be, és az MHC1-et expresszáló makrofágok teljes populációjának növekedését eredményezi. Ez megegyezik a HEP1 terápiát követő hat hónap alatt a HIV betegekben tapasztalható MHC1-et expresszáló sejtek populációjának hosszú távú növekedésével. A 7. példában ismertetett vizsgálati rendszerben a Rupe312 és Rupe314 jelentősen magasabb aktivitással rendelkezik, mint a HEP1.

A 8. példában bemutatom, hogy a Hепreceptor peptidek jelentős szuppresszív hatással rendelkeznek az IL-8 expresszálására. Az IL-8 gátlás szerepet játszhat a Hепreceptor peptidek szelektív aktivitásában a monociták/makrofágok aktiválására nézve.

A 9. példában bemutatom, hogy a Hепreceptor peptidek nagyon alacsony dózisa (1-100 ng/egér) megvédi az egereket a Salmonella



tryphimurium általi akut fertőzéstől.

A 10. példában bemutatom, hogy a Hепreceptor peptidek nagyon alacsony dózisa (1-1000 ng/egér) fokozza a túlélési időt az egér halálos herpesz vírus fertőzési modelljében.

A találmány olyan töltéssel rendelkező molekulákat ismertet, amelyek specifikusan kötődnek a Hепreceptorral. Az új, töltéssel rendelkező peptidek három csoportját terveztem meg, amelyek a Hепreceptor komplementer doménjeinek aminosav szekvenciáival azonos szekvenciákat tartalmaznak, és amelyek vagy a Hепreceptor B Doménhoz (3-16. azonosító számú szekvenciák), vagy mind az A mind a B Doménhez (17. azonosító számú szekvencia), vagy az A Doménhez (18-27. azonosító számú szekvenciák) kötődnek. A találmány tárgyát képező peptidek valószínűleg a sejtfelületre kikerült Hепreceptorokhoz kötődnek és stabilizálják az ezrin kihajtogatott konformációját, illetve immunmodulátor hatást idéznek elő. Az előnyös peptidek 5 és 13 aminosavból állnak és előnyösen a következő szekvenciával rendelkeznek.

A Hепreceptor B Domént kötő peptidek:

Rupe15: 3. azonosító számú szekvencia: TEKKR;

Rupe19: 4. azonosító számú szekvencia: TEKKRRETV;

Rupe111: 5. azonosító számú szekvencia: TEKKRRETVER;

Rupe37: 6. azonosító számú szekvencia: KKRRE;

Rupe310: 7. azonosító számú szekvencia: KKRRETVE;

Rupe312: 8. azonosító számú szekvencia: KKRRETVERE;

Rupe313: 9. azonosító számú szekvencia: KKRRETVEREK;

Rupe314: 10. azonosító számú szekvencia: KKRRETVEREKE;

Rupe411: 11. azonosító számú szekvencia: KRRETVER;



Rupe413: 12. azonosító számú szekvencia: KRRETVEREK;

Rupe414: 13. azonosító számú szekvencia: KRRETVEREKE;

Rupe59: 14. azonosító számú szekvencia: RRETV;

Rupe614: 15. azonosító számú szekvencia: RETVEREKE;

Rupe1014: 16. azonosító számú szekvencia: EREKE;

A Hепreceptor A és B Domént kötő peptid:

Rupe1024: 17. azonosító számú szekvencia: EREKEQMMREKEEL;

A Hепreceptor A Domént kötő peptidek:

Rupe2024: 18. azonosító számú szekvencia: KEELM;

Rupe2032: 19. azonosító számú szekvencia: KEELMLRLQDYEE;

Rupe2032p: 20. azonosító számú szekvencia: KEELMLRLQDY_pEE;

Rupe2132: 21. azonosító számú szekvencia: EELMLRLQDYEE;

Rupe2132p: 22. azonosító számú szekvencia: EELMLRLQDY_pEE;

Rupe2232: 23. azonosító számú szekvencia: ELMLRLQDYEE;

Rupe2232p: 24. azonosító számú szekvencia: ELMLRLQDY_pEE;

Rupe2428: 25. azonosító számú szekvencia: MLRLQ;

Rupe2832: 26. azonosító számú szekvencia: QDYEE;

Rupe2832p: 27. azonosító számú szekvencia: QDY_pEE;

A Hепreceptor A Doménjéhez vagy B Doménjéhez kötődő, vagy az A Domén és B Domén között hidat képező más peptidek vagy más töltéssel rendelkező molekulák is valószínűleg biológiailag aktívak lehetnek. Ezek a peptidek, vagy más töltéssel rendelkező molekulák szájon át, és más a különféle fertőző betegségek, illetve a rák kezelésére szolgáló útvonalakon adhatók be.

A találmány megvalósítása

A találmányban használt peptidek, például Boc vagy Fmoc vé-



dőcsoportokat alkalmazó szilárd fázisú eljárás vagy bármely más, a peptidszintézis szakemberei által ismert, peptidszintézisre szolgáló módszer felhasználásával szintetizálhatók meg.

A Boc-aminosavak lépésről lépésre történő szilárd fázisú szintézise a Merrifield-féle eljárást (*Journal of American Chemical Society* 85: 2149-2154) véve alapul végezhető el. A következő vegyületek használhatók: Novabiochem gyanta: Boc-Glu(OBzl)-PAM; aminosavak: Boc-Lys (2Cl-Z-)OH, Boc-Glu(OBzl)OH, Boc-Arg(Tos)OH, Boc-Val-OH, Boc-Thr (Bzl)-OH, Oldószerek: DMF (Rathburn), diklór-metán (BDH), etil-acetát (BDH); reagensek: HBTU (Phase Separations Ltd.), p-krezol (Lanchester), TFA (Halocarbon Products Corporation), HF(BOC)DIEA (Fluka). A Boc-aminosavakhoz ajánlott reaktív oldalláncokat védő csoportok a következők: Arg (Tos), Asn (Xan), Asp (OCHxl), Glu (OCHxl), Gln (Xan) vagy Gln, His (DNP), Lys (CIZ), Szerin (Bzl), Tyr (BrZ), Trp (CHO). A rövidítéseknek a következő jelentései vannak: DCC = diciklohexil-karbodiimid, DIC = diizopropil-karbodiimid, DCM = diklór-metán, DMF = dimetil-formamid, TFA = trifluorecetsav, Boc = t-butiloxi-karbonil, HOBT = hidroxibenzotriazol, DIEA = diizopropil-etilamin, DCU = diciklohexil-karbamid.

Példaképpen a találmány szerinti peptid Boc-szintézise a következők szerint valósítható meg: 0,5 mmol léptékben HBTU aktivációt/in situ semlegesítést végzünk 0,5 mmol gyantát és háromszoros aktivált Boc-aminosav felesleget alkalmazva. A Boc-aminosavat és az aktiváló reagenst (HBTU) ekvimoláris, azaz 2 mmol mennyiségben kell alkalmazni, amely minden esetben megfelel a háromszoros feleslegnek. DIEA-t használunk, mind a kapcsoló-



dásra szolgáló gyanta semlegesítéshez, mind a Boc aminosav aktiváláshoz. (Ezután 2,5 mmol-t használunk 1 ekvivalens Boc-aminosav és 1 ekvivalens gyanta esetében). Reagensek: 2 mmol = 4 ml 0,5 M HBTU-ból DMF-ben oldva (molekulatömeg = 379, 0,5 M = 18,95 g 100 ml-ben, megjegyzendő, hogy fényre érzékeny) és 2,5 mmol = 0,46 ml DIEA (molekulatömeg = 129, $d=0,742$) szükséges. Az aminosavak aktiválása: A Boc-aminosavat csak közvetlenül a gyantához adás előtt kell aktiválni, különösen az Arg (Tos) esetében. Az összes Boc-aminosav esetén: 2 mmol Boc-aminosavat mérünk egy 20 ml-es üveg mintatartóba. 4 ml 0,5 M HBTU oldatot adunk hozzá, majd a szilárd anyag feloldásához jól összerázzuk. 0,46 ml DIEA-t adunk hozzá és összekeverjük (hasonló színváltozás figyelhető meg). Eljárás: a gyantát DMF-fel mossuk, 100 % TFA-val eltávolítjuk a Boc-védőcsoportot, kétszer 1 percig összerázzuk, közben szárítjuk, megszáritjuk, DMF-et áramoltatva mossuk 1 percig, szárítjuk, hozzáadjuk az aktivált aminosav oldatot, 10 percig rázzuk, ezután mintát veszünk és ninhidrines vizsgálatot végzünk a kapcsolás hatékonyságának megállapítására. A szintézis befejezésével DMF-et, majd DCM-et áramoltatva mossuk, majd szárítjuk. Az első és az összes további peptid szerkezeti egység szintézisét a DMF-ben HBTU által aktivált Boc-aminosavak háromszoros feleslegének alkalmazásával végezzük. Minden kapcsolás esetében a kapcsolási hatékonyságnak 99 %-nál nagyobbak kell lennie, amelyet a mennyiségi ninhidrin vizsgálatokkal mutatunk ki. Az N-terminálisok védőcsoportjainak eltávolítását 100 % TFA-ban végezzük. A gyantához kötött peptidet óvatos árammal mossuk mielőtt és miután a védőcsoportot eltávolítjuk. Az utolsó kapcsolás



és a Boc-védőcsoport eltávolítása után a peptid-gyantát diklórmetánnal mossuk, és levegővel szárítjuk. A peptidet a gyantáról a nagyhatású HF eljárással távolítjuk el (2 g gyanta-peptid, 2 g krezol, 20 ml HF, 1,5 óra -5°C) nyers peptidet eredményezve, amelyet etil-acetáttal (100 ml) csapunk ki és 6 M guanidin-0,1 M TRIS oldatban oldunk fel újra.

A peptidet a következők szerint analitikai HPLC-s elválasztással tisztíthatjuk Vydac C_{18} 5 RAC oszlopon. HPLC tisztaságú acetonitrilt (Aldrich) és vizet szűrünk át egy membránszűrőn és a felhasználást megelőzően buborékmentesítünk hélium átbuborékolásával. Analitikai elválasztást végzünk oldószer gradiensevel, amely 0 % acetonitrillel kezdődik, és folyamatosan emelkedik 60 % acetonitrilre 20 percig, további húsz percig ezen az értéken tartjuk, majd egyenletesen 0 % acetonitril szintre csökkentjük 10 perc alatt 1,2 ml/perc állandó áramlási sebesség mellett. A peptid preparatív elválasztását TSK-GEL preparatív C_{18} oszlopon hajtjuk végre. Az elválasztást oldószer gradiensevel 0 % acetonitril kezdeti értékkel, 60 percig 18 % acetonitrilre, majd 80 percig 60 % acetonitrilre történő folyamatos növeléssel és 30 percig e koncentráción történő tartással végezzük 8 ml/perc állandó áramlási sebesség mellett. A gradienst két mikroprocesszor által irányított Gilson 302 egydugattyús pumpákkal szabályozhatjuk. A vegyületeket Waters 486 beállítható abszorbanciájú detektorral mutathatjuk ki 214 nm hullámhosszúságon és az analitikai kromatogramokat HP Laserjet 5L-segítségével rögzítjük. A Holochrome UV-VIS 220 nm-en mérő detektor esetében a preparatív kromatogramok egy LKB 2210 egycsatornás adatfeldolgozóval rögz-



zíthetők. A kapilláris elektroforézises minőségi ellenőrzést Waters Quanta 4000 berendezés alkalmazásával hajthatjuk végre foszfát-puffert (75 μM , pH 2,5) használva 15 kV-on futtatva, a mintaidő 20 másodperc, amelyet hidrosztatikus injektálással visszünk fel a 60 cm-es oszlopra, ahol a futási idő 12 perc. Az 1 g 0,46 mmol gyanta-szintézis kihozatalának 250 mg tiszta peptid körül kell lennie.

Alternatív oldat szintézises eljárások is használhatók a találmány szerinti peptidok nagyobb mennyiségének előállítására. A védőcsoporttal rendelkező trimer fragmensek lépésről lépésre történő, a peptidszintézis szakterületén jártas szakember számára ismert aktív észterek eljárása általi szintézis alkalmazásával nyerhetők. A fragmenseket ezután a fontos C- és N-terminális védőcsoportok eltávolítását követően DCC/HOBT alkalmazásával illesztjük össze. Az összes védőcsoport eltávolítása után a nyers peptidet részlegesen SP-Sephadex-C25 ioncserélő kromatográfiával tisztítjuk, amelyet preparatív HPLC és liofilizálás követ.

A találmány alkalmazása

A 0,01-1000 mg liofilizált peptid 1-10 ml desztillált vízben oldható fel és szájon át vagy hüvelyen keresztül adható be. A 0,01-1000 mg peptid pirulában vagy kapszulában vagy végbélkúpban formulázható a pirula vagy kapszula vagy végbélkúp előállításának szakterületén szakember által rendszerint használt hordozókkal együtt, és ezek szájon át vagy hüvelyen át vagy végbélnyíláson át adhatók be. A 0,001 és 100 mg desztillált vízben oldott peptid szűrt sterilizált oldata szubkután vagy intravénásan vagy



intramuszkulárisan fecskendezhető be.

A következő példák kizárólag a találmány bemutatására szolgálnak és semmi módon nem korlátozzák annak oltalmi körét.

1A. PÉLDA

A Hепreceptor peptidek ovalbuminal szembeni IgG szérumban antitest fokozó adjuváns aktivitása egerekben

50 mg ovalbumin és különféle koncentrációjú eltérő Hепreceptor peptidek befecskendezése után két héttel meghatározzuk az IgG választ az egerekben. Az IgG választ az egér szérumban 1-100-szoros hígításának optikai denzitásával (OD) határoztuk meg ovalbumin jelenlétében.

Eredmények

Az optikai denzitásként rögzített IgG válasz

Peptid kód	Kontrol	IP injekció (µg/egér)				Peptid szekvencia
		0,01	0,1	1	10	
	0	0,01	0,1	1	10	
HEP1	0,69	0,45	0,44	0,56	0,57	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	0,69	0,68	0,88	0,55	0,44	KKRRETVERE
Rupe1014	0,127	0,232	0,231	0,477	0,508	EREKE
Rupe1024	0,152	0,250	0,262	0,489	0,445	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	0,127	0,509	0,606	0,327	0,203	KEELMLRLQDYEE

Az optikai denzitásként rögzített IgG válasz, ahol az adatokat átszámoltuk az egyes kontrolokat véve 100-nak.

Peptid kód	Kontrol	IP injekció (µg/egér)				Peptid szekvencia
		0,01	0,1	1	10	
	0	0,01	0,1	1	10	



HEP1	100	65	64	81	83	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	100	99	128	80	64	KKRRETVERE
Rupe1014	100	183	182	376	400	EREKE
Rupe1024	100	164	172	322	293	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	100	401	477	257	160	KEELMLRLQDYEE

Következtetés

Az összes hepreceptor peptid a HEP1-et kivéve adjuváns aktivitást mutat, csak eltérő optimális koncentráció mellett.

1B. PÉLDA

A Hepreceptor peptidek a csecsemőmirigyben juh vörösvérsejtekre (SRBC) adott antitest-függő citotoxikus válaszát fokozó aktivítása egerekben

A Heprceptor peptidek hatását határoztuk meg a juh eritrocitákkal (SRBC) szembeni antitest-képző sejtek aktiválására egerekben (CBA - C57B1 Fi hibridek, 2 hónaposak és 18-22 gramm testtömegűek). Az egereket először intraperitonealisan injektáltuk vagy kontrolként 0,5 ml steril sóoldatot vagy a sóoldattal azonos mennyiségű Hepreceptor peptideket alkalmazva. 30 perccel a Hepreceptor peptidek injektálása után 5 millió SRBC-t tartalmazó sejtszuszpenziót adtunk be interperitonealisan minden egérnek. 4 nappal az immunizálást követően az egereket leöltük a nyak kitekerésével, majd aseptikusan kivettük a lépet. Az összes lépet 2 ml Medium 199-ben homogenizáltuk, majd 100 µl szuszpenziót 1 ml Medium 199-ben elkészített agarózba (48°C-os vízfürdön tároltuk) helyeztünk, SRBC szuszpenziót adtunk hozzá,



melynek eredményeként 1 %-os végső agaróz koncentrációt kaptunk. Az 1 ml agaróz-sejt keveréket összeráztuk, majd petri csészébe vittük át, hogy megkössön. Amikor az agaróz megszilárdul, a petri csészét 1 órán át 37°C-on inkubáltuk, majd 0,5 ml 1:20 arányban hígított Medium 199-ben felvett tengerimalac szérumot adtunk hozzá az agaróz gél tetejére kiegészítő forrásként. Az inkubációt további 1 órát folytattuk. Ezután a csészéket 8x binokuláris mikroszkóp segítségével láthatóvá tettük és megszámláltuk a plakkok számát (mindegyik plakk egy antitest-termelő egér lépsejtnek felel meg). Az eredményeket, mind az antitest-termelő sejtek/millió magvas lépsejt értékeként, mind az antitest-termelő sejtek/teljes lép értékeként fejeztük ki. Mivel sejtosztódást serkentő hatás nem volt megfigyelhető (a hepreceptor peptid beadása normál méretű egér lépeket eredményezett), ezért a két számításnak azonos eredményeket kell adnia.

Az adatok az antitest-képző sejtek/millió magvas lépsejt számának átlaga (30 egértől származó adatok pontonként). Az adatokat átszámoltuk az egyes kontrolokat véve 100-nak.

Peptid kód	Kontrol	IP injekció		Peptid szekvencia
		(µg/egér)		
	0	1	10	
HEP1	100	192	203	TEKKRRETVEREKE
Rupe312	100	317	267	KKRRETVERE
Rupe15	100	255	134	TEKKR
Rupe1014	100	202	325	EREKE



Rupe1024	100	401	397	EREKEQMMREKEEL
Rupe2032	100	236	232	KEELMLRLQDYEE

Következtetés

Az összes Hpreceptor peptid fokozza az antitest-függő citotoxikus választ a csecsemőmirigyben, csak eltérő optimális koncentráció mellett.

2. PÉLDA

A hpreceptor peptidok rákellenes hatása a CBA egerekben kialakított SM-322 anyaméh transzplantált szarkóma növekedésére és a CUC-5 méhnyaki rákra, példaként Rupe312-t és Rupe414-et használva

Anyagok és Módszerek

Transzplantált egér szarkóma SM-322 modell (endothelialis tumor)

Elsődleges méh tumorokat idéztünk elő nőstény egerekben 1,2-dimetil-hidrazinnal. Néhány elsődleges tumort szingén egerekbe transzplantáltunk. Az első látható csomók a transzplantációt követő 4 nappal kezdtek el megjelenni. A transzplantált tumoral rendelkező egerek várható élettartama 22-24 nap.

Transzplantált egér méhnyaki rák modell CUC-5 (epitelialis tumor)

Elsődleges tumorokat idéztünk elő nőstény egerekben metilkolantrénnel. Néhány elsődleges tumort ezután autotranszplantáltunk a méhnyakba. A transzplantált tumoral rendelkező egerek várható élettartama 43 nap.

CBA egerek

A CBA nőstény egerek $21,4 \pm 1,2$ g tömegűek és 2-3 hónaposak. A



tumort 0,5 ml tumor szuszpenzióként (1 g tumor/10 ml Igla közeg) vittük be és mindegyik kezelési csoportban 10 egeret használtunk.

Peptid készítmény és beadás

Liofilizált peptidet steril fiziológiás sóoldatban három koncentrációban oldottuk fel közvetlenül alkalmazás előtt. A kísérlet ideje alatt 0,5 ml oldatot injektáltunk kétszer hetente az egerek hashártyájába. A peptid három különböző koncentrációját használtuk, amely három 10, 1,0, 0,1 µg végső dózis/injekció/egér-hez vezet.

Eredmények

A kontrol csoporthoz viszonyított tumor térfogat csökkenésének átlagos százalékát három időpontban jegyeztük fel. Összehasonlítottuk az egerek élettartamát a kezelt csoportban és a kontrol csoportban és összehasonlítottuk a tumorok szövettanát a kontrol és a kezelt csoport között.

Transzplantált egér szarkóma modell SM-322

Peptid	Koncentráció	A kontrolhoz viszonyított tumor térfogat csökkenés %-ban			Várható élettartam nap
		8. nap	12. nap	15. nap	
	íg/egér				
Rupe312	10	63	54	27	12-27
	1	67	32	38	12-19
	0,1	61	34	59	12-22
Rupe414	10	65	43	43	13-20
	1	68	28	43	12-20



	0,1	68	39	22	12-19
		8. napi térfogata		15. napi térfogata	
Kontrol		1,49	11,2	17,7	12,16

Transzplantált egér méhnyaki rák modell CUC-5

Peptid	Koncentráció	A kontrolhoz viszonyított tumor térfogat csökkenés %-ban			Várható élettartam
		5. nap	12. nap	19. nap	
	10	50	25	49	48-76
	1	50	26	49	47-76
	0,1	50	18	45	42-76
Rupe414	10	50	16	48	36-76
	1	50	16	43	36-76
	0,1	50	18	57	47-76
		5. napi térfogata	12. napi térfogata	19. napi térfogata	
Kontrol		0,06	0,68	1,56	47-76

Következtetés

A Rupe312 és Rupe414 hepreceptor peptidek csökkentik a gyorsan növekedő transzplantált szarkómák növekedési sebességét, amely az élettartam enyhe (3-18 %-os) növekedéséhez vezet.

A Rupe312 és Rupe414 hepreceptor peptidek csökkentik a lassan növekedő transzplantált méhnyaki rák növekedési sebességét, de az élettartamban jelentős növekedés (vagy csökkenés) nem volt kimutatható.



A Rupe312 és Rupe414 hepreceptor peptidek mindkét modell esetében a tumorok közepének vérzéssel nem járó fekélyes pusztulását idézték elő, amely következetesen kisebb tumor térfogatokhoz vezet.

3. PÉLDA

21 HIV fertőzött betegnek szájon át beadott HEP1, egy hepreceptor peptid (10 mg/nap vagy 30 napig, vagy 90 napig) klinikai javuláshoz vezet. E kísérlet sikere mutatja általánosan a Heparinból származó peptidek felhasználhatóságát és gyakorlatba történő átvitelét

Ezt a kísérletet gyógyászati minőségű HEP1-gyel végeztük, ami egy olyan peptid, amely a Heparin A Doménjének egy részével azonos szekvenciával rendelkezik. HIV fertőzött önkénteseket toboroztunk a kísérlethez a Professzor Ravshan Ataulakhanov irányítása alatt álló moszkvai Immunológiai Intézetből. Mielőtt a kísérletbe belefogtunk a gyógyászati minőségű HEP1 széles körű állat (patkány és nyúl) toxikológiai és előklinikai vizsgálatokon ment keresztül, amelyek azt mutatták, hogy a vegyület biztonságos (a toxicitás előzetes kiértékelése - negatív, az 1000x terápiás dózi hatása - negatív, helyi irritáció - negatív, a CNS-re és a HVS-re kifejtett hatása - negatív, félheveny toxicitás - negatív, mutagén hatások - negatív, krónikus toxicitás - negatív, embriotoxicitás - negatív).

Kísérleti terv

2 ml steril desztillált vízben lévő 10 mg HEP1 oldatát szá-



jon át adtuk be a betegeknek naponta egyszer reggel a reggeli elfogyasztása előtt (az oldatot különálló 10 mg-os adagokban készítettük el és -20°C -on tároltuk). Minden betegnek desztillált víz kódolt placebo oldatát adtuk be 30 napig a kezelést megelőzően. 11 beteg első csoportjának HEP1-et adtunk be 90 napig és 10 beteg második csoportjának HEP1-et adtunk be 30 napig 15 hónappal később, miután az első csoport betegeiből származó adatokat kielemeztük. A kezelés ideje alatt a betegeket megkértük, hogy egyszer egy héten látogassanak el a klinikára, vessék alá magukat orvosi vizsgálatnak és adjanak vérmintát a vizsgálatokhoz. Arra kértük továbbá a betegeket, hogy működjenek együtt a kezelés utáni megfigyelésben is, és hat hónapig egyszer egy hónapban látogassák meg a klinikát a további orvosi vizsgálatok és vérminták adása érdekében. A 21 beteg közül 21 működött együtt abban, hogy a kezelés ideje alatt megfigyeljük és 21 közül 14 beteg értett egyet a kezelés utáni megfigyeléssel. A betegek nem kaptak semmilyen más anti-retrovírusos terápiát a HEP1 kezelés alatt, illetve az azt megelőző egy hónapban.

Betegek

A betegeket a Moszkva körüli klinikákról toboroztuk és írásos hozzájárulásukat adták a kísérletben való részvételhez. A betegeket pozitív ELISA vizsgálattal HIV fertőzötteként azonosítottuk, a betegek pangó T-sejt számmal rendelkeztek, és a HIV-vel kapcsolatos betegségek néhány klinikai megnyilvánulását mutatták. A betegek ezt követően 17 és 801 közötti CD4 sejt/ μl értéket és a nem kimutathatótól 230000 másolat/ml szérumban HIV RNS értéket (Roche Labs Amplicor mennyiségi PCR vizsgálat) mutattak.


A betegek tulajdonságai a vizsgálat kezdetekor

ID Kód	Nem	Kor	A fertőzés be- csült időtartama	CD4sejt /μl	HIV RNS másolat/ml	Opportunista fertőzések	Egyéb
P1	férfi	45	8	219	500	súlyos	
P2	férfi	33	2	192	10000	súlyos	
P3	nő	45	6	481	2000	súlyos	
P4	nő	16	8	237	43000	súlyos	
P5	férfi	27	2	123	<400	mérsékelt	nagyon beteg
P6	nő	23	1	357	10000	mérsékelt	Herpes z
P7	férfi	23	8	139	94000	csekély	Herpes z
P8	nő	38	10	320	22000	csekély	Petefés- zek ciszta
P9	férfi	43	3	17	10000	súlyos	
P10	férfi	19	2	155	21000	súlyos	Ópium kezelés alatt áll
P11	férfi	35	3	188	<400	súlyos	Aktív TB
P12	férfi	32	8	175	13000	súlyos	
P17	férfi	25	1	478	11000	súlyos	
P21	nő	37	10	98	11000	súlyos	
P63	férfi	35	1	651	4000	súlyos	
P67	nő	31	7	124	230000	súlyos	nagyon beteg
P68	nő	51	2	597	<400	súlyos	nagyon beteg
P69	férfi	34	1	192	8000	súlyos	Aktív TB
P72	férfi	33	1	534	25000	súlyos	Aktív TB
P73	férfi	30	1	801	<400	súlyos	Aktív TB
P76	nő	38	7	72	9000	súlyos	



Általános megfigyelések

A betegek nem jeleztek a HEP1-gyel szembeni reakciókat, és 17 beteg jelezte, hogy általában jobban érezte magát és 1,5 kg és 4,5 kg között növekedett a súlya, amíg a HEP1 terápia tartott (egy beteg a placebo ideje alatt is jobban érezte magát).

Káros folyamatok

Káros folyamatok nem voltak kimutathatók. Ehhez klinikai kiértékeléseket végeztünk, beleértve az ultrahangos vizsgálatokat és a biokémiai, haematológiai, immunológiai vérvizsgálatok és vizeletvizsgálatok széles körét.

Opportunista fertőzések

Az opportunista fertőzéseket mikrobiológiai analízissel mutattuk ki és a HEP1-gyel kezelt betegek stabilak voltak új fertőzések nélkül, vagy a fertőzések lecsengtek. Például a kezelés előtt a betegek 38 %-ának súlyos garat *Candida Albicans* fertőzése volt, addig a kezelés után csak 9 %-uk volt komolyan fertőzött. A kezelés előtt a betegek 52 %-ánál volt a garatnak súlyos *S. viridans* fertőzése, addig a kezelés után csak 33 %-uk volt komolyan fertőzött. A kezelés előtt a betegek 33 %-ánál volt a garatnak *S. aureus* fertőzése, addig a kezelés után csak a 19 %-uk volt fertőzött.

CD4 T-limfociták

11 beteg csoportját három hónapig HEP1-gyel kezeltük, melynek során a kezelés végére a T-sejtek számának 9 %-os átlagos növekedését és a kezelés után következő hat hónap múlva 32 %-os átlagos növekedését tapasztaltuk. A Hep1-gyel egy hónapig kezelt tíz fős csoportnál a kezelés végére átlag 3 %-os T-sejtszám nö-



vekedést és a kezelés után következő hat hónap múlva a 20 %-os T-sejtszám növekedést tapasztaltunk. A folyamatos javulás azt sugallja, hogy pozitív immunológiai változás indult el a betegekben.

TCID-vel végzett HIV-fertőzőképességi vizsgálat

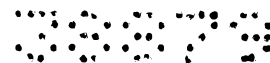
A betegből származó HIV fertőzött Környéki Vér Mononukleáris Sejtjeit (PBMC) nem fertőzött donor PBMC-vel a minta sejtek tenyészszejtekhez viszonyított 1/16 arányában összekeverve és 37 °C-on 14 napig tenyésztve mértük a vírus-terhelést. A tenyészet vírus terhelését egy Innogenetics HIVp24 vizsgálatával mértük és az eredményeket pg HIVp24 antigén/ml egységben rögzítettük.

Három hónapos kezelés

Beteg	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
A vizsgálat kezdetén a fertőzőképesség pg/ml p24 max	1039	315	na	386	515	203	1113	369	1074	na	480
A kezdeti állapotot 100-nak véve	100	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100
0 fázis átlag						130					
1 fázis átlag	7	32		0	28	0	47	0	39		
2 fázis átlag	21	218		198	129	251	70	217	40		835
3 fázis átlag	0	61		0	85	0	48		24		

Egy hónapos kezelés

Beteg	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
A vizsgálat kezdetén a fertőzőképesség pg/ml p24 max	465	0,3	3,1	2,9	6642	6,5	3,2	2	1	4,5



A kezdeti állapotot 100- nak véve	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0 fázis átlag	288							251		
1 fázis átlag	24	0			5		29	0		73
2 fázis átlag	1815	209	6924	659	334	993	28919	115	236	141
3 fázis átlag	5	39	54	51	51		15	57		102

A betegek mindkét csoportjában (P1-P11 és P12-P76) egy általános fertőzőképességi mintázat volt megfigyelhető a fertőző vírus részecskék kimutatására szolgáló TCID vizsgálat során. A HEP1 terápia kezdetekor (0 és 1 fázis) a fertőző HIV vírus terhelés élesen, alacsony szintre csökkent a kezelés első három hétében és a 21 beteg közül 9 esetében legalább egy hétig 0 szintre esett le. Három betegnél tapasztaltuk a fertőzőképesség növekedését a kezelés első hete alatt, mielőtt a második héten 0-ra esett a fertőzőképesség. Az ezt követő második fázisban (2 fázis) a betegek többségénél a HIV fertőzőképesség 2x és 600x közötti értékre emelkedett a kezelés megkezdése után négy és nyolc hét elteltével. Ebben az időszakban a betegek azt jelezték, hogy állapotuk nem romlott. Ezt követte a 3. fázis, ahol a fertőzőképesség a kezelést megelőző szintekre csökkent.

Az 1. fázisban a kezelés előtti alapvonal alatti vírus szintek átlagos maximális csökkenése -80 % volt. A 2. fázisban a vírus szintjének átlagos maximális növekedése 22-szeres volt. A 3. fázisban a kezelés előtti alapvonal alatti vírus szintek átlagos maximális csökkenése -64 % volt. A 3. fázis alatt a vírusos fertőzőképesség 3 beteg esetében csökkent a 0 értékre. A HEP1-gyel történő kezelés után hat hónappal a vírusos fertőzőképesség ál-



talában visszatért a kezelés előtti szintekre.

Ezeket az eredményeket annak szemléltetéseként értékelem, hogy az 1. fázisban az immunrendszer a HEP1 által aktiválódik a HIV-vel szembeni küzdelemhez. A 2. fázisban az immunrendszer megnövekedett szintű aktivációja a HIV-vel látenszen fertőzött sejtek tartalékának aktivációját stimulálja, amely a fertőző vírusok növekedéséhez vezet. Végül a 3. fázisban az aktivált immunrendszer sikeresen elpusztítja az újonnan aktivált vírus tartalékot. A HEP1-gyel csak egy hónapig kezelt tíz beteg csoportja azt mutatta, hogy a 2. és 3. fázison történő átjutás nem függ a HEP1 jelenlététől.

A mennyiségi plazma HIV RNS PCR-ral meghatározott HIV vírusos terhelés

A vírusos terhelés analízisét Roche Labs PCR vizsgálattal végeztük: Amplicor HIV-1 Monitor.

Beteg	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
HIV plazma RNS 1000 másolat/ml-ben	0,5	10	2	43	<0,4	10	94	22	10	21	<0,4
A kezdeti állapotot 100-nak véve	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0
0 fázis átlag						108	143		101		
1 fázis átlag			38	39	28	37	68	78	90	45	
2 fázis átlag	476	197	103	64	28	223	112	110	1535	92	
3 fázis átlag		85	66	77	0	64	92	52		39	



Beteg	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
HIV plazma RNS 1000 másolat/ml-ben	13	11	11	4	230	<0,4	8	25	<0,4	9
A kezdeti állapotot 100-nak véve	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100
0 fázis átlag										
1 fázis átlag		0			78					55
2 fázis átlag	219	177	273	206	91		142	191		139
3 fázis átlag	135	86		98	63		138	72		72

Mind az egy hónapos, mind a három hónapos kezelést kapott betegek többségében a vírusos szuppresszió (1. fázis), azt követő átmeneti vírusos aktiváció (2. fázis), és szuppresszió (3. fázis) hasonló fázisai voltak megfigyelhetők, amelyek hasonlóak a TCID adatokhoz. Az 1. fázis egy és négy hét közötti ideig tartott és a vírusos terhelés átlag -47 %-kal csökkent. A 2. fázis nyolc és 40 hét közötti ideig tartott (hosszabban tartó időtartam, mint ami a TCID vizsgálatnál volt látható) és a vírus RNS átlagosan 3x-ára növekedett a plazmában. Ezt követte a 3. fázis, amelyben a vírus RNS a kezelés előtti szintek alá esett átlag -19 %-os csökkenéssel a plazmában.

A sejtpopulációk és a sejtfelszíni markerek expressziójának vizsgálata citometriával

A HEP1-gyel egy hónapig kezelt tíz beteg (P12-P76) csoportjának környéki vér mononukleáris sejtjein lévő sejtfelszíni markereket vizsgáltuk részletesen mikroszkóp, fluoreszcensen jelzett antitestek, áramlásos citometria és hasonló eljárások felhasználásával.



A HEP1 kezelésnek a következő hatásai voltak a sejtpopulációkra a 10 beteg csoportjának átlagát véve:

- a) Limfociták: a kezelés alatt a limfociták abszolút száma átlagosan 7 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal a számuk 25 %-kal növekedett.
- b) Leukociták: számuk a kezelés alatt átlagosan 10 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 20 %-kal növekedett.
- c) Természetes ölü sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 10 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 30 %-kal növekedett.
- d) B-sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 5 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 80 %-kal növekedett.
- e) CD3-t expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 15 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 30 %-kal növekedett.
- f) CD8-at expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 15 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 20 %-kal növekedett.
- g) CD44-CD4-et expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 25 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 60 %-kal növekedett.
- h) CD44-CD8-at expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 12 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 30 %-kal növekedett.
- i) A CD4 sejtek HLA I expressziós szintje: a kezelés alatt átlagosan 12 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 30 %-kal növekedett.



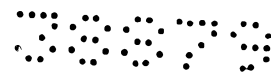
gosan 10 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal körülbelül 70 %-kal növekedett.

- j) A CD8 sejtek HLA I expressziós szintje: a kezelés alatt átlagosan 10 %-kal növekedett és a kezelést követő öt hónappal körülbelül 70 %-kal növekedett.
- k) CD25-CD8-at expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 5 %-kal növekedett az alacsony szintekről és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 100 %-kal növekedett. A CD25-CD4 sejtek nem mutattak szignifikáns változást.
- l) CD38-CD4-et expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 2 %-kal növekedett az alacsony szintekről és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 15 %-kal csökkent.
- m) CD38-CD8-at expresszáló sejtek: számuk a kezelés alatt átlagosan 2 %-kal növekedett az alacsony szintekről és a kezelést követő öt hónappal számuk körülbelül 25 %-kal csökkent (A CD38 jelentős csökkenését a következő szakaszban tárgyaljuk).

Egyéb markerek, például a CD28, HLA-DR, CD45RO, CD45RA, CD57, CD62L nem mutattak jelentős változást vagy egyenletes mintázatot a betegek között.

CD38-CD8 sejtek: az AIDS előrehaladottságának előrejelzője

Jól ismert tény, hogy a CD38-CD8-at expresszáló sejtek populációjának növekvő mérete összefügg az AIDS kifejlődésével a HIV-fertőzött betegekben (M. Levanher és mtsai., (1992), *Clinical Experimental Immunology*, 90: 376-382). Röviden a teljes CD8 populáció százalékában kifejezett CD38-CD8 sejtek számának összefüggése a HIV betegség előrehaladottságával egy olyan megfigyelés, amelyet sok újabb publikációban igazoltak. Az egészsé-



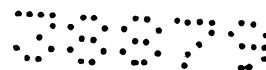
ges emberben a CD38-at is expresszáló CD8 sejtek hányada 30 és 50 % között, az aszimptotikus HIV fertőzött betegek esetében ez 50 és 65 % között, az ARC-ban szenvedő HIV fertőzött betegek esetében 65 és 80 % között és az AIDS-es betegek esetében 80 és 98 % között van. Az egy hónapig szájon át 10 mg HEP1-et kapott 10 beteg következő vizsgálatában 5 beteg adott vérmintákat vizsgálat céljából. E betegek mindegyikében nyilvánvaló volt, hogy a CD38-CD8 sejtek populációja a teljes CD8 populáció hányadában olyan irányban csökkent, hogy az a HIV betegség alacsonyabb kockázatát és jobb egészséget jelez.

A CD38-CD8 sejtek a CD8 sejtek %-ában	Alapvonal	1 hónapos kezelés	2 hónapos	3 hónapos	4 hónapos	5 hónapos	6 hónapos
P12	92	94		79	84	73	72
P17	66	71		69	50	55	57
P21	83	86				66	
P69	90	94		86	79	71	
P76	78	84		77	64	54	50

Anti-HIV antitestek a plazmában

A 10 beteg (P12-P76) HEP1-gyel történő egy hónapos kezelésének végén 5 beteg mutatott jelentősen magasabb antitest titert a különféle HIV antigénekkal szemben (a kezelés előtti titert 100-nak vettük alapul).

	Anti gp120	Anti gp41	Anti-p31	Anti p24	Anti p17
P17	216	93	157	97	101
P21	127	110	71	103	110
P63	110	131	387	146	154



P69	160	274	813	507	116
P72	93	111	147	245	143

Antitest válaszok az opportunistá fertőzésekre

A HEP1 kezelés antitest válaszokat stimulált az opportunistá fertőzésekre (a kezelés előtti antitest titert 100-nak vettük alapul).

Maximális titer a kezelés alatt	P12	P17	P21	P63	P67	P68	P69	P72	P73	P76
Aspergillus IgG	122	97	132	116	89	114	119	190	142	111
Candida IgG	127	100	126	170	447	51	293	214	120	129
CMV IgG	290	81	227	186	118	91	105	112	152	88
CMV IgM	120	141	142	215	159	92	102	148	120	142
HSV1 IgM	113	129	158	134	99	89	116	101	107	106
HSV2 IgM	107	129	109	108	156	158	146	111	300	186
Toxoplasma IgG	105	107	98	108	125	101	104	95	105	98

Az átlagos növekedés az antitest titerben 23 % az Aspergillus IgG, 78 % a Candida IgG, 50 % a CMV IgG, 38 % a CMV IgM, 15 % a HSV1 IgM, 51 % a HSV2 IgM és 5 % a Toxoplasma IgG esetén.

Következtetés

A fenti adatok megegyeznek a találmánnyal, amennyiben a Hpreceptor részének szekvenciájával azonos szekvenciájú peptid az immunrendszer aktivációjához és klinikai előnyökhöz vezet a HIV betegek humán klinikai vizsgálatában.



4. PÉLDA

A súlyos akut és krónikus Candida fertőzés nőkben azzal az immunválasszal gyógyítható, amelyet a Heptareceptor stimuláció eredményez

Klinikai tanulmány: visszatérő mérsékelt Candida fertőzés

Egy frissen kitört kezeletlen Candida fertőzésben szenvedő nő (27 éves) önként jelentkezett a tanulmányhoz. Visszatérő mérsékelt hüvelyi Candida fertőzésről számolt be (6-szor az előző 12 hónapban), amelyet korábban 1 %-os klotrimazol hüvelyen belüli alkalmazásával kezeltek. 5 ml 1 mg/ml-es HEP1 oldatot adott be magának hüvelyen belül egy 5 ml-es fecskendővel két egymást követő napon. Három nap múlva a Candida fertőzés minden klinikai tünete eltűnt és az elkövetkező 12 hónap alatt a Candida fertőzés további visszatérésének megszűnéséről számolt be.

Klinikai tanulmány: súlyos állandó Candida fertőzés

Nearmedic Plus STD klinikai vizsgálatra járó három női beteg jelentkezett Moszkvában a tanulmány céljából, akik súlyos hüvelyi Candida fertőzésben szenvednek, miután különféle húgy- és ivarszervi fertőzésekkel szemben antibiotikumokkal kezelték őket. A betegeket a HEP1 2 mg/ml-es oldatának 5 ml-ével kezeltük három egymást követő napon (semmilyen más gombaellenes kezelést nem alkalmaztunk). A kezelés előtti és a kezelés után három hónappal végzett mikrobiológiai (húgycső-, méhnyaki csatornai- és hüvelyi- tampon tenyészet) és klinikai vizsgálatok összehasonlítása vagy jelentős javulást, vagy a fertőzés megszűnését mutatta.



Beteg	Kor	Kezelés	Klinikai elemzés	Húgycső tampon	Méhnyaki tampon	Hüvelyi tampon
				A növekedés mértéke		
LLA	34	előtt	súlyos fertőzés	erős	gyenge	gyenge
KEM	28	előtt	súlyos fertőzés	erős	erős	erős
ALN	35	előtt	súlyos fertőzés	erős	erős	erős
LLA	34	utána	tünetmentes	nincs	nincs	nincs
KEM	28	utána	enyhe fertőzés	gyenge	néhány	nincs
ALN	35	utána	tünetmentes	nincs	nincs	nincs

5. PÉLDA

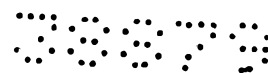
A Rupe312, Rupe414, Rupel11 és Rupe411 erős makrofág aktivációs választ idéz elő az egerekben.

A Heparin receptor A Doménből származó számos peptidet, beleértve a HEP1-et tanulmányoztuk az egerekben.

Az aktivált makrofágok indukciója

22-24 g súlyú három F1 egérből álló (CDAxC57B1) csoportokat abdominálisan injektáltuk az 1,0 µg peptid 0,5 ml fiziológiás sóoldatban oldott peptid oldatok mindegyikével. 24 óra elteltével az egereket leöltük a nyaki gerinc eltörésével és 5 ml Hanks oldatot fecskendeztünk a hasüregbe. A hasüreget 30 másodpercig masszíroztuk, majd a peritoneális folyadékot gyűjtöttük. Az összegyűjtött folyadékot nylon szűrő alkalmazásával egy 1,5 mg/ml EDTA-t tartalmazó szilikonos csőbe szűrtük.

Nihon hemocitóméter alkalmazásával mikroszkópos vizsgálattal



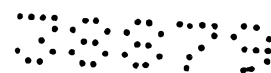
megállapítottuk az 1 µg szűrletben lévő sejtmagot tartalmazó sejtek számát. A sejtekből pelleteket készítettünk 5 perces 800g-n történő centrifugálással, majd a pelleteket borjúmagzat szérumban újraszuszpendáltuk és a sejtszuspenziót üveg mikroszkóp tárgylemezre cseppentettük, megszáritottuk, majd metanolban fixáltuk és Romanovski-féle festékekkel festettük. A peritoneális folyadékgyülem sejtjeinek morfológiai vizsgálatát egy Opton optikai mikroszkóppal végeztük 1600x-os nagyításban. A limfociták, nyugvó makrofágok, aktivált makrofágok, granulociták és más sejttípusok számát állapítottuk meg. Az eredmény az volt, hogy az összes peptid növelte az aktivált makrofágok számát, de a Rupe111, Rupe312, Rupe411 és Rupe414 jelentősen aktívabb volt, mint a HEP1.

1 µg peptid/ egér	Sóoldat	HEP1	Rupe111	Rupe312	Rupe411	Rupe414
Aktivált makrofágok az összes sejt százalékában	1,9	2,2	4,3	13,9	5,5	8,5

6. PÉLDA

A humán perifériás vér mononukleáris sejtjeinek Hpreceptor peptidek általi in vitro aktiválásának bemutatása a radioaktív tríciummal jelzett timidin növekvő sejtek DNS-ébe történő beépülésének mérésével.

Egy egészséges donor perifériás véréből perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) különítettünk el Ficoll gradiensben általános frakcionálási eljárás alkalmazásával. A PBMC-t RPMI1640 közeget, 10 % borjúmagzat szérumot, 1 mM L-glutamint és antibiotikumokat (BM) tartalmazó tenyészközegben szuszpendáltuk.



A sejtszuspenziót egy 96 lyukú mikrotiter lemez lyukaiba helyeztük sejttenyésztés céljából (100 µl 100000 sejtet tartalmazó oldat/lyuk). Ezután 100 µl peptidet tartalmazó BM-et adtunk hozzá (a végleges koncentráció 0,001-10 µg/ml). A negatív kontrol lyuk csak BM-et tartalmazott és peptidet nem. A lemezt 3 napig 37 °C-on inkubáltuk, majd radioaktív ³H-timidint adtunk hozzá 1 µCi/ml végleges koncentrációban. Standard eljárással béta-számláló alkalmazásával mértük a ³H-timidin beépülését a sejtek DNS-ébe. A kísérletet kétszer ismételtük és az eredményeket a két kísérlet átlagaként radioaktív beütés/perc-ben fejeztük ki. Az eredmény azt mutatta, hogy az összes peptid mononukleáris sejtproliferációt aktivált, de a Rupe312 és Rupe414 3 ng/ml aktivitás csúccsal jelentősen aktívabb volt, mint a HEP1.

Peptid µg/ml	Kontrol	HEP1	Rupe19	Rupe312	Rupe414	Rupe411	Rupe111	Rupe614
0,0001	370	410	426	563	493	385	483	464
0,0003	370	500	602	742	580	510	483	503
0,001	370	989	718	976	684	702	710	550
0,003	370	700	756	3222	2087	598	665	752
0,01	370	628	545	656	650	532	537	607
0,03	370	517	586	539	596	500	642	538
0,1	370	456	537	533	485	499	633	596
0,3	370	399	563	611	492	486	668	635
1	370	400	509	472	449	468	529	600
3	370	412	502	455	437	420	486	499
10	370	501	517	405	394	390	470	412



7. PÉLDA

A Heparceptor peptidok hatása az MHC I expressziójára a különféle immunológiai folyamatokban részt vevő sejteken.

A Heparceptorból származó peptidok humán fehérvérsejtekkel (WBC) 24 órás 37 °C-on történő inkubálása csökkenést eredményezett az összes WBC sejtfelszíni HLA expressziójának intenzitásában (a sejt aktiválás és a receptor internalizáció következtében). A Rupe312 aktívabb volt, mint a Rupe414, amely viszont aktívabb volt, mint a HEP1.

A peptidok nélküli kontrol értéket 100-nak véve alapul számítottuk ki az adatokat

A HLA I sejtfelszíni expressziójának sűrűsége					
	Monociták/ Makrofágok	CD8 limfociták	CD4 limfociták	B és NK sej- tek	Granulociták
Kontrol	100	100	100	100	100
HEP1	83	83	80	84	89
Rupe414	83	76	77	77	85
Rupe312	71	72	70	73	81

Az aktiváció sejtspecifikus hatása az MHC I-et expresszáló monocita populáció számának emelkedése és az MHC I-et expresszáló CD8 limfocita populáció számának csökkenése.

A peptidok nélküli kontrol értéket 100-nak véve alapul számítottuk ki az adatokat

A HLA I sejtfelszíni expressziójának sűrűsége					
	Monociták/ Makrofágok	CD8 limfociták	CD4 limfociták	B és NK sej- tek	Granulociták



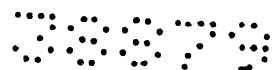
Kontrol	100	100	100	100	100
HEP1	108	91	105	102	100
Rupe414	109	89	105	101	98
Rupe312	119	85	104	105	98

8. PÉLDA

A Heparceptor peptidok elnyomják az IL-8 termelést a fehérvérsejtekben

A Rupe312, egy Heparceptor peptid növekvő koncentrációinak a humán WBC általi IL-8 expresszióra kifejtett szupresszív hatását mutattuk ki 37 °C-on történő 48 órás inkubációt követően. Az IL-8 egy kemotaktikus faktor, amely olyan gyulladáshoz ingerre történő válaszként termelődik, amely vonzza és aktiválja a T-sejteket, neutrofileket, bazofileket, granulocitákat, de a monocitákat/makrofágokat nem. Az IL-8 gátlása fontos szerepet játszik a monociták/makrofágok aktiválása során a Rupe312 szelektív aktivitásában. Az IL-8 mérése a különféle Heparceptorból származó peptidok aktivitásának meghatározására szolgáló vizsgálati módszert biztosít.

Rupe312 koncentráció µg/ml-ben	Az IL-8 koncentráció a tenyészetben pg/ml-ben
0	18900
0,001	13900
0,003	10700
0,01	8984
0,03	7869



0,1	6426
-----	------

(Az IL-8 EIA vizsgálatot az Innogenetics, Belgium által megadottak szerint végeztük).

9. PÉLDA

A Hepreceptor peptidek nagyon alacsony dózisa (1-100 ng/egér) megvédi az egereket az akut Salmonella tryphimurium általi fertőzéssel szemben.

A laboratóriumi egereket (CBAXC57B1 F1 hibridek) 5 csoportra osztottuk fel, amelyek vagy 0,5 ml sóoldatot, vagy 0,5 ml sóoldatot és a különböző Hepreceptor peptidek különféle koncentrációit (1, 10 vagy 100 ng) kapták. 24 órával később az egereket Salmonella tryphimuriummal erősen megfertőztük (10000 vagy 100000 baktériumot fecskendeztünk be intraperitoneálisan egereként). A mindegyik csoportban 20 nap után túlélő egerek százalékát rögzítettük (A halálosan megfertőzött kontrol állatok a fertőzéstől számított három napon belül elpusztultak).

20 nappal a fertőzés után túlélő egércsoportok százaléka.

Peptid kód	1000 baktérium/egér	Kontrol	Hepreceptor peptid			Peptid szekvencia
			ng/egér			
		0	1	10	100	
HEP1	10	0 %	20 %	20 %	40 %	TEKKRRETVEREKE
	100	0 %	0 %	0 %	0 %	
Rupe15	10	0 %	20 %	40 %	40 %	TEKKR
	100	0 %	20 %	20 %	0 %	



Rupe1024	10	0 %	40 %	40 %	40 %	EREKEQMMREKEEL
	100	0 %	0 %	20 %	40 %	

Következtetés

A Hепreceptor peptidek megvédik az állatokat a halálos bakterium-fertőzéstől.

10. PÉLDA

A Hепreceptor peptidek nagyon alacsony dózisa (1-1000 ng/egér) fokozza a túlélési időt a halálos herpesz vírus fertőzések egérmodellekben.

Laboratóriumi fehér B/P egerekbe (5-öt csoportonként) a herpesz vírus 0,2 ml közegben lévő 3,5 LD50 titerének halálos befecskendezése előtt 48 órával és 24 órával Hепreceptor peptidet (1-1000 ng/egér) fecskendeztünk be intraperitoneálisan.

Az átlagos túlélési időt egércsoportonként napokban rögzítettük.

Peptid kód	Kontrol	Hепreceptor peptid ng/egér				Peptid szekvencia
		1	10	100	1000	
	0	1	10	100	1000	
HEP1	10	18	19	27	28	TEKKRRETVEREKE

Következtetés

A Hепreceptor peptidek jelentősen fokozzák a túlélési időt a halálos vírusos fertőzéssel szemben.



SZEKVENCIA LISTA

ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:
SZEKVENCIÁK SZÁMA: 28

1. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 32 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Hepreceptor A Domén

A R E E K H Q K Q L E R Q Q L E T E K K R R E T V E R E K E Q M
1 5 10 15 20 25 30

2. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 34 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Hepreceptor b Domén

M R E K E E L M L R L Q D Y_(p) E E K T K K A E R E L S E Q I Q R
1 5 10 15 20 25 30
A L Q

3. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupel15

TEKKR
1 5

4. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 9 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupel19

TEKKRRETV
1 5



5. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 11 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupell1

TEKKRRETVER

1 5 10

6. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe37

KKRRE

1 5

7. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 8 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe310

KKRRETVE

1 5

8. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 10 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe312

KKRRETVERE

1 5 10

9. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 11 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe313

KKRRETVEREK

1 5 10



10. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 12 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe314

KKRRETVEREKE

1 5 10

11. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 8 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe411

KRRETVER

1 5

12. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 10 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe413

KRRETVEREK

1 5 10

13. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 11 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe414

KRRETVEREKE

1 5 10

14. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe59

RRETV

1 5



15. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 9 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe614

RETVEREKE

1 5

16. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe1014

EREKE

1 5

17. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 14 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe1024

EREKEQMMREKEEL

1 5 10

18. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2024

KEELM

1 5

19. azonosító számú szekvencia
HOSSZÚSÁGA: 13 aminosav
TÍPUSA: aminosav
SZÁLTÍPUS: egyszálú
TOPOLÓGIA: lineáris
MOLEKULA TÍPUS: peptid
SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2032

KEELMLRLQDYEE

1 5 10



20. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 13 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2032p

KEELMLRLQDY_pEE
 1 5 10

21. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 12 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2132

EELMLRLQDYEE
 1 5 10

22. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 12 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2132p

EELMLRLQDY_pEE
 1 5 10

23. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 11 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2232

ELMLRLQDYEE
 1 5 10

24. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 11 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2232p

ELMLRLQDY_pEE
 1 5 10



25. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2428

MLRLQ

1 5

26. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2832

QDYEE

1 5

27. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 5 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: Rupe2832p

QDY_pEE

1 5

27. azonosító számú szekvencia
 HOSSZÚSÁGA: 14 aminosav
 TÍPUSA: aminosav
 SZÁLTÍPUS: egyszálú
 TOPOLÓGIA: lineáris
 MOLEKULA TÍPUS: peptid
 SZEKVENCIA LEÍRÁS: HEP1

TEKKRRETVEREKE

1 5 10



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy töltéssel rendelkező molekula, amely a Hепreceptorhoz kötődik.
2. Egy peptid, amely a Hепreceptor egy részével azonos szekvenciával rendelkezik.
3. A 2. igénypont szerinti peptid, amely 5 és 13 aminosav hosszúságú és a Hепreceptor egy részével azonos szekvenciával rendelkezik.
4. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
A R E E K H Q K Q L E R Q Q L E T E K K R R E T V E R E K E Q M.
5. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
M R E K E E L M L R L Q D Y_(p) E E K T K K A E R E L S E Q I Q R A
L Q.
6. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
TEKKR.
7. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
TEKKRRETV.
8. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
TEKKRRETVER.
9. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KKRRE.
10. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KKRRETVE.
11. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KKRRETVERE.



12. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KKRRETVEREK.
13. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KKRRETVEREKE.
14. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KRRETVER.
15. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KRRETVEREK.
16. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KRRETVEREKE.
17. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
RRETV.
18. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
RETVEREKE.
19. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
EREKE.
20. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
EREKEQMMREKEEL.
21. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KEELM.
22. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KEELMLRLQDYEE.
23. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
KEELMLRLQDY_pEE.
24. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
EELMLRLQDYEE.



25. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
EELMLRLQDY_pEE.
26. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
ELMLRLQDYEE.
27. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
ELMLRLQDY_pEE.
28. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
MLRLQ.
29. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
QDYEE.
30. Egy peptid, amely a következő aminosav szekvenciából áll:
QDY_pEE.

A meghatalmazott

Dr. Láng Tivadárné
szabadalmi ügyvéd
S.B.G & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

2 lap rajz

zs a

2001 NOV. 28



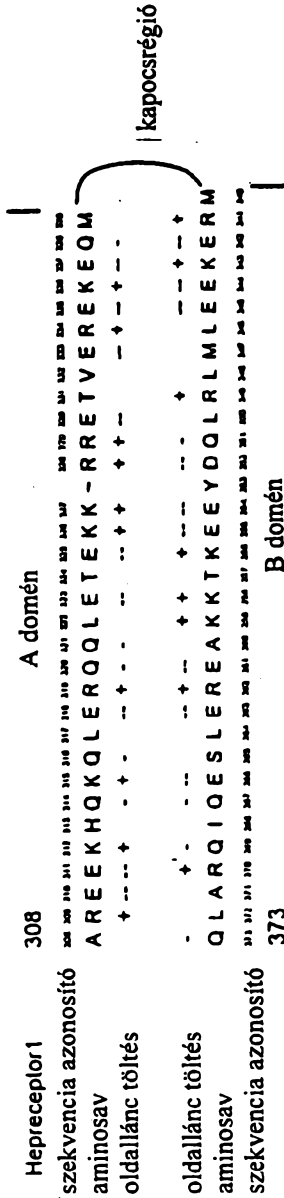
1. ÁBRA

A Hepreceptor elsődleges és másodlagos szerkezete

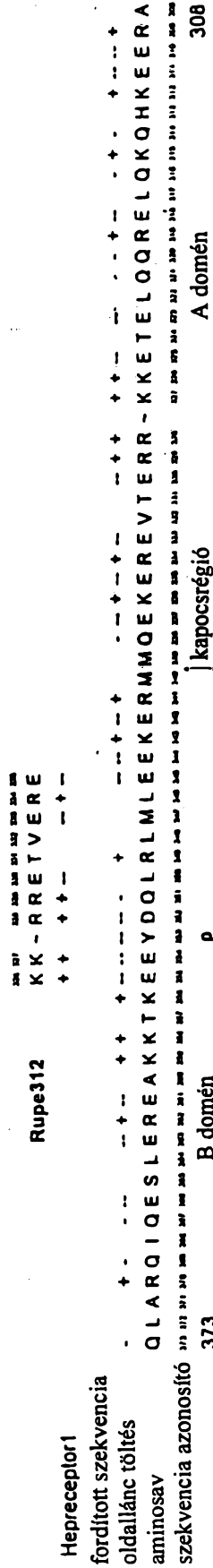
Megfigyelhető, hogy az erősen töltött régiók a pozitív töltéssel a negatív töltésekhez illeszkednek, amikor vagy önmagával, vagy egy szintetikus ligandummal, például a Rupe312-vel, vagy egy másik hepreceptorral kapcsolódnak.

~ = folytonos aminosav szekvencia
 p = foszfát-csoport a tirozinon

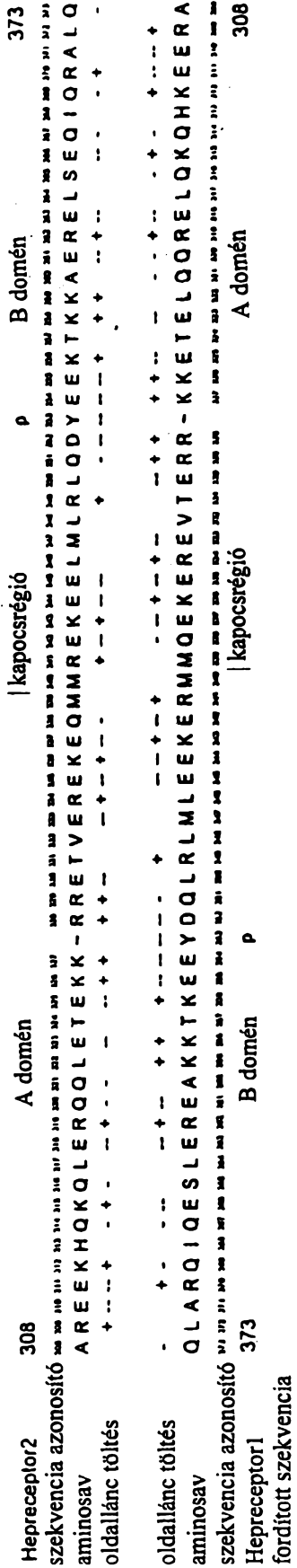
1a ábra: A Hepreceptor inaktív HAJTOGATOTT konformációja



1b ábra: A Hepreceptor ligandumhoz (Rupe312) kötődő aktív NYITOTT konformációja



1c ábra: Két Hepreceptor közötti dimerizáció aktív NYITOTT konformációban





Az ezrin sejthez viszonyított elhelyezkedése és komplexei

