

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

289 864

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1999 - 3618

(22) Přihlášeno: 25.08.1995

(30) Právo přednosti:
26.08.1994 DK 1994/983

(40) Zveřejněno: 13.08.1997
(Věstník č. 8/1997)

(47) Uděleno: 14.02.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17.04.2002
(Věstník č. 4/2002)

(86) PCT číslo: PCT/DK95/00343

(87) PCT číslo zveřejnění: WO 96/06861

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/575
A 61 K 38/22
A 61 P 1/00

(73) Majitel patentu:

NOVO NORDISK A/S, Bagsvaerd, DK;

(72) Původce vynálezu:

Thim Lars, Gentofte, DK;
Wöldike Helle Fabricius, Lyngbe, DK;
Nielsen Per Franklin, Vaerlose, DK;

(74) Zástupce:

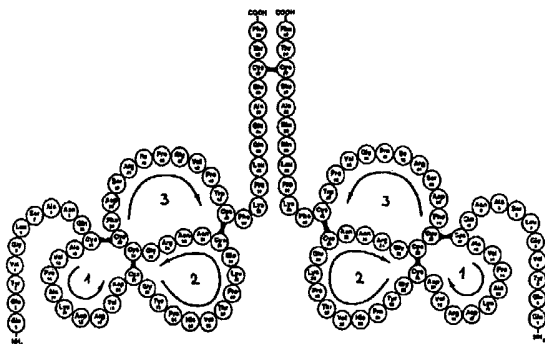
PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;

(54) Název vynálezu:

**Trojlistkový peptid, způsob přípravy,
farmaceutický prostředek a použití
trojlistkového peptidu**

(57) Anotace:

Trojlistkový peptid ve skutečně čisté formě obsahující
intestinální trojlistkový faktor - ITF, který se skládá ze dvou
ITF monomerů spojených disulfidickou vazbou mezi dvěma
cysteinovými zbytky obou monomerů v pozici 57 každého
monomeru. Způsob přípravy trojlistkového peptidu a jeho
použití pro přípravu léčiva pro profylaxi nebo léčení poruch
trávicí soustavy.



CZ 289864 B6

Trojlistkový peptid, způsob přípravy, farmaceutický prostředek a použití trojlistkového peptidu

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká trojlistkových peptidů, způsobu jejich přípravy, farmaceutických prostředků, které je obsahují a jejich použití pro léčení gastrointestinálních poruch.

10

Dosavadní stav techniky

Trojlistkové peptidy tvoří skupinu, která se vyskytuje hlavně ve spojení s gastrointestinálním traktem. Trojlistkové peptidy savců obsahují jednu nebo několik trojlistkových domén (Thim a kol. 1989), kde je každá tvořena 38 nebo 39 aminokyselinami, se šesti cysteiny spojenými v konfiguraci 1–5, 2–4 a 3–6 za vzniku charakteristické trojlistkové struktury (Thim 1989).

Dosud známé trojlistkové peptidy savců obsahují jednu nebo dvě trojlistkové domény (přehled viz. Thim, 1994, Poulsom a Wright, 1993, Hoffmann a Hauser, 1993). Jsou popsány žabí (*Xenopus leavis*) peptidy a proteiny obsahující jednu (Hauser a Hoffmann 1991), dvě (Hauser a kol. 1992a), čtyři (Hoffmann 1988) nebo šest (Hauser a Hoffmann 1992b) trojlistkových domén. Trojlistkové peptidy savců obsahující jednu doménu jsou s rakovinou prsu spojený pS2 peptid lidský (Jakowlev a kol. 1984, Prud homme a kol. 1985) a myší (Lefebvre a kol. 1993), intestinální faktor známý z lidí (Podolsky a kol. 1993, Hauser a kol. 1993) a krys (Suemori a kol. 1991, Chinnery a kol. 1992). U lidí (Tomasetto a kol. 1990), prasat (Thim a kol. 1982) a myší (Tomasetto a kol. 1990) byl popsán spasmolytický polypeptid (SP), který obsahuje dvě trojlistkové domény. Za normálních podmínek jsou v lidském gastrointestinálním traktu tvořeny tři trojlistkové peptidy hpS2, hITF a hSP; hSP a hpS2 ve výstelkové mukózní vrstvě žaludku (Tomasetto a kol. 1990, Rio a kol. 1988) a hITF ve výstelkové mukózní vrstvě tenkého a tlustého střeva (Podolsky a kol. 1993).

Fyziologická funkce trojlistkových peptidů není dobře známá. Za určitých podmínek jako je např. mukózní poškození při zánětu střev (Rio a kol. 1991, Poulsom a kol. 1992, Wright a kol. 1993) a žaludečních vředech a vředech dvanácterníku (Rio a kol. 1991, Hanby a kol. 1993, Wright a kol. 1990) byla pozorována zvýšená exprese trojlistkových peptidů v trávicí soustavě. To bylo podnětem pro názor, že trojlistkové peptidy mají mukózní regenerační funkci. Důkaz o tom byl v současné době podán Dignassem a kol. 1994, Playford a kol. 1994 a Babyatsky a kol. 1994. Mechanismus, kterým trojlistkové peptidy urychlují svou regenerační funkci, může být vazba mezi řetězy mucin-glykoproteinů za vzniku viskózního elastického gelu odolného proti trávicím enzymům (Thim 1994, Gajhede a kol. 1993).

V patentu WO 92/14 837 je popsáno klonování jedné krysí a lidské domény intestinálního trojlistkového faktoru pro léčení poruch trávicí soustavy.

45

Podstata vynálezu

Trojlistkový peptid v čisté formě obsahuje intestinální trojlistkový faktor – ITF, který se skládá ze dvou ITF monomerů spojených disulfidickou vazbou mezi dvěma cysteinovými zbytky obou monomerů v pozici 57 každého monomeru.

Byla objevena možnost přípravy trojlistkových faktorů s pouze jednou trojlistkovou doménou a se zajímavými farmakologickými vlastnostmi.

55

Předkládaný vynález se tedy týká trojlístkových peptidů obsahujících jednu trojlístkovou doménu.

Jak je uvedeno výše, trojlístkové peptidy se považují za příspěvek k léčbě vředů trávicího ústrojí a jiných mukózních poruch, a to stabilizaci mukózní vrstvy v trávicí soustavě. Mechanismus této stabilizace není dosud známý. Rentgenová struktura porcínového pankreatického spasmolytického polypeptidu (PSP) ale ukázala (srov. Gajhede a kol. 1993), že tento má dvě trojlístkové domény a že většina zachovaných zbytků přispívá k 8 až 10 Å velké štěrbině, která se nachází v každé trojlístkové doméně. Předběžné spojovací pokusy ukázaly, že se štěrbina může přizpůsobit části olisacharidového řetězce např. připojeného k mucinovému glykoproteinu. Pokud se skutečně jedná o tento případ, PSP se dvěma takovými štěrbinami je schopný spojení řetězců mucinů za pomoci jim k tvorbě ochranného gelu u kraje mukózního epitelu. Dosud není známo, zda trojlístkové peptidy s jednou trojlístkovou doménou (jako ITF a pS2) tvoří in vivo dimery pro uplatnění stejné funkce nebo zda mají různé mechanismy působení. Má se ale za to, že dimery takových trojlístkových peptidů mohou opravu spojuvat řetězce mucinů, a tak tvořit aktivní formu peptidu.

V jiném aspektu se předkládaný vynález týká způsobu přípravy trojlístkového peptidu obsahujícího jednu trojlístkovou doménu. Způsob zahrnuje kultivaci vhodných hostitelských buněk transformovaných DNA sekvenčním kódováním trojlístkového peptidu obsahujícího jednu trojlístkovou doménu za podmínek připouštějících produkci peptidu a izolaci vzniklého trojlístkového peptidu z kultury.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká farmaceutického prostředku obsahujícího trojlístkový peptid, obsahující jednu trojlístkovou doménu, spolu s farmaceuticky vhodným ředidlem nebo přísadou.

V dalším aspektu se předkládaný vynález týká trojlístkového peptidu obsahujícího jednu trojlístkovou doménu pro použití jako léku a pro přípravu léků pro profylaxi nebo léčení poruch trávicí soustavy.

Faktor je konkrétně lidský ITF s monomerní aminokyselinovou sekvencí

ZEYVGLSANQCAVPAKDRVDCGYPPIVTPKECNNGCCFDSRIPGVPWC FKPLQEAECT
F

kde Z je Glu, Gln nebo pyrGlu,

nebo jeho homolog schopný dimerace a vykazují podobnou aktivitu,

nebo lidský pS2 s monomerní aminokyselinovou sekvencí

ZAQTETCTVAPRERQNCGFCTVTPSQCAN KGCCFDDTVRGVPWC FYPTID

VPPEEECEF

kde Z je Glu, Gln nebo pyrGlu,

nebo jeho homolog schopný ace a vykazující podobnou aktivitu.

Homology ITF nebo pS2 obsahují stejný cysteinový vzor a disulfidové uspořádání (obr. 1) a vykazují některé homologní sekvence (myslí se v odpovídajících pozicích buď identické aminokyseliny nebo tradiční substituce) v místech 1, 2 a 3. Stejně sekvence v aktivních místech obsahují 1 až 10 aminokyselinových zbytků a počet aminokyselinových zbytků v každém místě (nehledě na cystein) je 7 až 12, s výhodou 9 až 10.

Homolog pS2 má jednu nebo několik substituovaných, vynechaných nebo přidaných aminokyselin. Tyto změny jsou výhodně takové, aby substituce významně neovlivnila stavbu a aktivitu proteinu. Typické je vynechání 1 až 3 aminokyselin v aktivním místě a 1 až 10 aminokyselin v N a C koncových částech, přidání jedné amino nebo karboxy koncovky (jako aminokoncový methionin, malý spojovací peptid do 10 aminokyselin nebo malá část, která usnadňuje čištění jako polyhistidinová oblast), antigenního epitopu nebo vazebné domény (Ford a kol., Protein Expression and Purification 2: 95–107, 1991). Příklady konzervativní substituce jsou v rámci bázeckých aminokyselin (arginin, lysin, histidin), kyselých (glutamová a asparagová kyselina), polárních (glutamin a asparagin), hydrofobních (leucin, izoleucin, valin), aromatických (fenylalanin, tryptofan, tyrosin) a malých aminokyselin (glycin, alanin, serin, threonin, methionin).

Odborníkům v této oblasti je zřejmé, že takovou substituci lze provést mimo rozhodující oblasti pro funkci molekuly a tak, aby výsledný polypeptid neztratil aktivitu. Aminokyseliny nezbytné pro aktivitu předkládaných trojlístkových polypeptidů, a tedy nesubstituovatelné se stanoví známými postupy jako je lokální mutagenese nebo alaninová skenovací mutagenese (Cunningham a Wells, Science 244, 1081–1085, 1989). Podle novější techniky se pro každou aminokyselinu v molekule připraví mutace a produkt se testuje na biologickou aktivitu (např. mukózní léčba a léčba vředů trávicí soustavy) za stanovení aminokyselin rozhodujících pro aktivitu molekuly.

Homology jsou buď allelové varianty (tj. alternativní forma genu, která vzniká mutací) nebo změněné peptidy kódované mutovaným genem, ale s téměř stejnou aktivitou jako původní peptid. Proto může být mutace latentní (bez změn kódovaného peptidu), nebo kóduje peptidy se změněnými aminokyselinovými sekvencemi.

Homology předkládaného trojlístkového peptidu mohou být i druhové homology, tj. polypeptidy s podobnou aktivitou odvozené od jiných druhů, např. myši, krysy, králíků, krav, prasat nebo žab.

Při výhodném provedení má trojlístkový peptid v souladu s předkládaným vynálezem přibližnou molekulovou hmotnost 13 000 a skládá se ze dvou monomerních trojlístkových peptidů spojených disulfidickou vazbou mezi dvěma cysteiny v pozici 58 monomeru typu pS2.

Trojlístkové peptidy se s výhodou připravují rekombinací DNA. DNA sekvence kódující trojlístkové peptidy lze izolovat přípravou genomické nebo cDNA knihovny a vyhledáním DNA sekvencí kódujících celý nebo část peptidu hybridizací s použitím syntetických oligonukleotidových sond podle standardních technik (srov. Sambrook a kol., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989). Pro naše účely je DNA sekvence kódující peptid s výhodou lidského původu, tj. odvozena z lidské genomické DNA nebo cDNA knihovny.

DNA sekvenci kódující trojlístkový peptid lze také připravit standardními metodami synteticky, např. fosfoamiditovou metodou (Beaucage a Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859–1869 nebo Matthes a kol., EMBO Journal 3 (1984), 801–805). Fosfoamiditovou metodou se připraví oligonukleotidy (čištění, ztužení, vázání, klonování na vhodné vektory v automatickém DNA syntetizátoru).

DNA sekvenci lze také připravit polymerační řetězovou reakcí s použitím specifických základů (např. US 4 683 302, Saiki a kol., Science 239 (1988), 487–491 nebo Sambrook a kol. supra.)

DNA sekvence kódující trojlístkový peptid se obvykle zavádí do rekombinantního vektoru (jakýkoliv vektor, který může být snadno podroben rekombinačním postupům DNA). Výběr vektoru často záleží na hostitelských buňkách, do kterých se má zavádět. Vektor tak může být autonomně replikační (existuje jako extrachromozomální jednotka, jejíž replikace je nezávislá na replikaci chromozomu), např. plazmid, nebo je, pokud se zavádí do hostitelských buněk,

integrován do genomu hostitelských buněk a replikován spolu s chromozomy, do kterých byl zaveden.

5 S výhodou se zde jedná o expresní vektor, kde je DNA sekvence kódující trojlístkový peptid operativně spojena s dalším segmentem nutným pro transkripci DNA. Obecně je expresní vektor odvozen od plazmidu nebo virové DNA, nebo obsahuje prvky obou. Termín „operativně spojena“ znamená, že jsou segmenty uspořádány tak, že je jejich funkce správná pro jejich účel určení, tj. transkripce začíná v promotoru a pokračuje přes DNA sekvenci kódující polypeptid.

10 Promotorem může být jakákoliv DNA sekvence s transkripční aktivitou ve vybrané hostitelské buňce a může být odvozena z genů kódujících homologní nebo heterologní bílkoviny hostitelské buňky.

15 Příklady vhodných promotorů pro řízení transkripce DNA kódující trojlístkový peptid jsou SV40 promotor (Subramani a kol., Mol. Cell Biol. 1 (1981), 854–864). MT–1 promotor (metalothioneinový gen) (Palmiter a kol., Science 222 (1983), 809–914) nebo hlavní promotor adenoviru 2.

20 Příklady vhodných promotorů pro použití v buňkách hmyzu jsou polyhedrinový promotor (US 4 745 051; Vasuvedan a kol., FEBS Lett. 311, (1992) 7–11), P10 promotor (J. M. Vlák a kol., J. Gen. Virology 69, 1988, 765–775), Autographa enliformia promotor základního proteinu polyhidrozního viru Autographa californica (EP 397 485), promotor přímého raného genu 1 baciloviru (US 5 155 037; US 5 162 222) nebo promotor zpožděného raného genu baciloviru 39K (US 5 155 037; US 5 162 222).

25 Příklady vhodných promotorů pro použití v buňkách kvasinek zahrnují promotory z glykolytických genů kvasinek (Hitzeman a kol., J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073–12080; Alber a Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419–434) nebo geny alkoholdehydrogenázy (Young a kol., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender a kol., eds.), Plenum Press, New York, 1982) nebo TPI1 (US 4,599,311) nebo ADH2–4c (Russell a kol., Nature 304 (1983), 652–654) promotory.

35 Příklady vhodných promotorů pro použití v buňkách vláknitých hub jsou např. promotor ADH3 (McKnight a kol., The EMBO J. 4 (1985), 2093–2099) nebo tpiA promotor. Příklady vhodných promotorů jsou tyto odvozené od genu kódujícího A. oryzae TAKA amylázu, Rhizomucor miehei aspartovou proteinázu, A. niger neutrální –amylázu, A. niger kyselinovzdornou a–amylázu, A. niger nebo A. awamori glukoamylázu (gluA), Rhizomucor miehei lipasue, A. oryzae alkalickou proteázu, A. oryzae triosa–fosfát izomerázu nebo A. nidulans acetamidázu. Vhodné jsou promotory TAKA–amylázy a gluA (uvedeny např. v EP 238 023 a EP 383 779).

40 DNA sekvence kódující trojlístkový peptid může být také spojena s vhodným ukončením jako je ukončení lidského růstového hormonu (Palmiter a kol., Science 222, 1983, 809–814) nebo (pro houbovitě hostitele) TPI1 (Alber a Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, 419–434) nebo ADH3 (McKnight a kol., The Embo J. 4, 1985, 2093–2099) ukončení. Vektory mohou dále obsahovat prvky jako polyadenylační signály (např. z oblasti SV40 nebo adenoviru 5 Elb), sekvenci transkripčního zlepšení (např. SV40 promotor) a translačního zlepšení (např. kódující RNA adenoviru VA RNA).

50 Rekombinované vektory dále obsahují DNA sekvence umožňující vektoru replikaci v příslušných hostitelských buňkách. Příkladem takové sekvence (pro savčí buňky) je SV40 počátek replikace SV40.

Pokud jsou hostitelské buňky kvasinky, jsou vhodné sekvence umožňující vektoru replikaci kvasinkové plazmidy 2 replikačního genu REP 1–3 a počátek replikace.

55

Vektor také obsahuje volitelný značkovač (např. gen, jehož produkt doplňuje defekt v hostitelských buňkách) jako gen kódující dihydrofolátreduktázu (DHFR) nebo *Schizosaccharomyces pombe* TPI gen (viz. P. R. Russell, *Gene* 40, 1985, 125–130) nebo gen způsobující odolnost proti lékům např. ampicillinu, kanamycinu, tetracyklinu, chloramfenikolu, neomycinu, hygromycinu nebo methotrexatu. Pro vláknité houby jsou volitelné značkovače *amdS*, *pyrG*, *argB*, *nieD* nebo *sC*.

Pro zavedení trojlístkového peptidu v souladu s předkládaným vynálezem do sekrečního kanálu hostitelské buňky lze v rekombinačním vektoru zajistit sekreční signální sekvenci (známou i jako řídicí, *repro* nebo *pre* sekvenci). Tato sekreční signální sekvence je spojena s DNA sekvencí kódující trojlístkový peptid ve správné čtecí části. Sekreční signální sekvence je obvykle v pozici 5 k DNA sekvenci kódující peptid. Sekreční signální sekvence může být normálně spojena s peptidem, nebo tvořit gen kódující jiný sekreční protein.

Produkcí kvasinkami kóduje sekreční signální sekvence jakýmkoliv signálním peptidem, který zajišťuje účinné zavedení trojlístkového peptidu do sekrečního kanálu buňky. Signální peptid je přírodní forma, jeho část nebo syntetický peptid. Vhodné signální peptidy jsou –faktor signální peptidy (srovnej US 4 870 008), signální peptid amylázy myších slin (srovnej O. Hagenbuchle a kol., *Nature* 289, 1981, 643–646), modifikovaný signální peptid karboxypeptidázy (L. A. Vallas a kol., *Cell* 48, 1987, 887–897), signální peptid kvasinek BAR1 (WO 87/02670) nebo signální peptid aspartové proteázy 3 kvasinek (YAP3) (M. Egel–Mitani a kol., *Yeast* 6, 1990, 127–137).

Pro účinnou produkci kvasinkami lze sekvenci kódující řídicí peptid zavést i za signální sekvenci a nad DNA sekvenci kódující trojlístkový peptid. Funkce řídicího peptidu je produkováný peptid zavést z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu a dále do sekreční dutiny pro sekreci do kultivačního média (tj. export trojlístkového peptidu přes buněčnou stěnu nebo alespoň přes buněčnou membránu do periplazmatického prostoru buňky kvasinky). Řídicí peptid je např. –faktor řídicí peptid kvasinek (jehož použití je popsáno např. v US 4 546 082, US 4 870 008, EP 16 201, EP 123 294, EP 123 544 a EP 163 529). Alternativně je řídicí peptid syntetický, tj. nevyskytující se v přírodě. Syntetický řídicí peptid lze konstruovat např. podle WO 89/02 463 nebo WO 92/11 378.

Pro použití u vláknitých hub lze signální peptid pohodlně odvodit od genu kódujícího *Aspergillus* sp. a amylázu nebo glukamylázu, genu kódujícího *Rhizomucor miehei* lipázu nebo proteázu nebo *Humicola lanuginosa* lipázu. Signální peptid je s výhodou odvozen od genu kódujícího *A. oryzae* TAKA amylázu, *A. niger* neutrální –amylázu, *A. niger* kyselinostálou amylázu nebo *A. niger* glukamylázu. Vhodné signální peptidy jsou uvedeny např. v EP 238 023 a EP 215 594.

Pro použití v buňkách hmyzu lze signální peptid pohodlně odvodit od genu hmyzu (WO 90/05783) jako je adipokinetický hormonální prekurzor signálního genu motýla *Manduca sexta* (US 5 023 328).

Postupy použité pro vázání DNA sekvencí kódujících trojlístkový peptid, promotoru a volitelně ukončení a/nebo sekreční signální sekvence a jejich zavedení do vhodného vektoru obsahujícího informaci nezbytnou pro replikaci jsou odborníkům v této oblasti dobře známé (např. Sambrook a kol., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York, 1989).

Hostitelská buňka, do které se zavádí DNA sekvence kódující trojlístkový peptid, je jakákoliv buňka schopná produkce peptidu v její formě a zahrnuje buňky kvasinek, hub a vyšší eukaryotické buňky.

Příklady vhodných spojení savčích buněk jsou COS (ATCC CRL 1650), BHK (ATCC CRL 1632, ATCC CCL 10), CHL (ATCC CCL39) nebo CHO (ATCC CCL 61). Způsoby transfekce savčích buněk a exprese DNA sekvencí zavedených do buněk popsali např.

Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601–621; Southern a Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327–341; Loyter a kol., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982), 422 – 426; Wigler a kol., Cell 14 (1978), 725; Corsaro a Pearson Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham a van der Eb, Virology 52 (1993), 456; a Neumann a kol., EMBO J. 1 (1982), 841–845.

5

Příklady vhodných buněk kvasinek jsou *Saccharomyces* spp. nebo *Schizosaccharomyces* spp., zejména pak kolonie *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces kluyveri*. Způsoby transformace kvasinek heterologní DNA a následná produkce heterologních polypeptidů je popsána v US 4 599 311, US 4 931 373, US 4 870 008, 5 037 743 a US 4 845 075 uvedených zde jako reference. Transformované buňky se vyberou podle fenotypu stanoveného volitelným značkovačem, běžné odolnosti proti lékům a schopnosti růstu bez přítomnosti jednotlivých živin, např. leucinu. Výhodný vektor pro použití u kvasinek je POT1 uvedený v US 4 931 373. DNA sekvence kódující trojlístkový peptid je předcházena signální sekvencí a volitelně např. výše zmíněnou řídicí sekvencí. Další příklady vhodných kvasinek jsou kolonie *Kluyveromyces* jako *K. lactis*, *Hansenula*, např. *H. polymorpha* nebo *Pichia*, např. *P. pastoris* (Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, 3459–3465; US 4,882,279).

15

Dalšími příklady jsou vláknité houby, např. *Aspergillus* spp., *Neurospora* spp., *Fusarium* spp. nebo *Trichoderma* spp., zejména kolonie *A. oryzae*, *A. nidulans* nebo *A. niger*. Použití *Aspergillus* spp. pro expresi proteinů je popsáno např. v EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. Transformaci *F. oxysporum* lze např. provést podle Malardiera a kol., 1989, Gene 78: 147–136. Transformaci *Trichoderma* spp. lze např. provést podle EP 244 234.

20

Pokud se jako hostitelské buňky použijí vláknité houby, mohou být transformovány pomocí DNA v souladu s předkládaným vynálezem, a to pohodlně integrací konstrukční DNA chromozomu hostitelské buňky za získání rekombinované formy. Tato integrace je výhodná, protože DNA sekvence je pak v hostitelské buňce stabilnější. Integraci konstrukční DNA hostitelského chromozomu lze provést konvenčně např. homologní nebo heterologní rekombinací.

25

Transformaci buněk hmyzu a produkci heterologních polypeptidů lze pak provádět podle US 4 745 051; US 4 879 236; US 5 155 037; 5 162 222; EP 397 485, které jsou zde uvedeny jako reference. Buňky hmyzu, které lze použít jsou např. *Lepidoptera* jako *Spodoptera fugiperda* nebo *Trichoplusia ni* (US 5,077,214). Vhodné podmínky kultivace jsou uvedeny např. v WO 89/01 029 nebo WO 89/01 028 nebo v dříve uvedených pracích.

30

Výše popsané transformované hostitelské buňky se pak kultivují ve vhodné výživě za podmínek dovolujících expresi trojlístkového peptidu. Potom lze veškerý nebo část výsledného peptidu získat z kultury v její formě. Médium použité pro kultivaci buněk je běžný materiál – jednoduché nebo složené médium obsahující vhodné doplňky. Vhodná média jsou komerčně dostupná nebo připravená podle publikovaných předpisů (např. American Type Culture Collection). Trojlístkový peptid vyprodukovaný buňkami se pak z kultury získává běžnými postupy zahrnujícími separaci hostitelských buněk z média odstředěním nebo filtrací, srážení bílkovinných složek roztoku nebo filtrátu solemi (např. síran amonný) a čištění různými chromatografickými technikami (např. iontově výměnná, gelová, afinitní, atd. chromatografie) podle příslušného typu polypeptidu.

40

Ve farmaceutickém prostředku v souladu s předkládaným vynálezem je trojlístkový peptid v různých farmaceutických formách popsaných např. v Remington s Pharmaceutical Science, 1985. Prostředek je ve formě vhodné pro soustavné podávání v injekcích nebo infuzích, a tedy se sterilní vodou nebo izotonickým nebo glukózovým roztokem. Prostředky lze sterilizovat běžnými technikami. Výsledný vodný roztok lze balit pro použití nebo filtrovat za aseptických podmínek a lyofilizovat. Lyofilizovaný prostředek lze před podáváním kombinovat se sterilním vodným roztokem. Prostředek obsahuje farmaceuticky vhodné přísady podle požadavků na napodobení

50

fyziologických podmínek jako pufrů, tonika, atd. např. octan sodný, laktát sodný, chlorid sodný, chlorid draselný, chlorid vápenatý, atd.

- 5 Farmaceutický prostředek v souladu s předkládaným vynálezem lze přizpůsobit i pro nosní, transdermální a rektální podávání. Jako farmaceuticky vhodný nosič nebo ředidlo prostředku lze použít jakýkoliv běžný pevný nosič. Příklady pevných nosičů jsou laktóza, terra alba, sacharóza, mastek, želatina, agar, pektin, klovatina, stearat hořečnatý a kyselina stearová. Nosič nebo ředidlo podobně obsahuje živiny uvolňující látky jako glycerylmonostearát nebo glyceryldistearát nebo jejich směs s voskem. Množství pevného nosiče je 25 mg až 1 g.
- 10 Koncentrace trojlístkového peptidu v prostředku je 5 až 100 % hmotnostních. Výhodná je koncentrace 50 až 100 % hmotnostních. Podávaná jednotka prostředku je 1 až 200 mg, s výhodou 25 až 75 mg, nejvýhodněji 50 mg peptidu.
- 15 Jak je uvedeno výše, trojlístkový peptid v souladu s předkládaným vynálezem se považuje za aktivní formu peptidu, a takto se považuje za výhodné jeho použití pro prevenci nebo léčení poruch trávicí soustavy. Konkrétněji je určen pro léčení žaludečních vředů a vředů trávicího ústrojí, zánětu střev, Crohnovy choroby nebo poruch trávicího ústrojí způsobených léčením zářením, bakteriálních nebo jiných infekcí atd. Dávkování polypeptidu podávaného pacientům
- 20 záleží na typu a závažnosti léčených poruch, ale obecně je 0,1 až 1 mg na kg váhy těla.

Přehled obrázků na výkresech

- 25 Předkládaný vynález je dále detailněji popsán na příkladech s odkazem na připojené obrázky, kde je:
- Obr. 1 navržená struktura lidského trojlístkového faktoru ITF. Primární aminokyselinová sekvence je převzata od Hausera a kol., 1993, a disulfidická vazba umístěna homologně podle PSP a pS2 (Thim, 1988).
- 30 Obr. 2 HPLC roztoku z kvasinek HW756 pro expresi kryšho ITF na reverzní fázi – koloně Vydac 214TP54
- 35 Obr. 3 iontově výměnná chromatografie na Fast Flow SP–sefaraže částečně čištěného lidského ITF. Množství hITF (monomeru) a hITF (u) bylo stanoveno analytickou HPLC. Čárky značí frakce spojené pro další čištění monomerní a jiné formy. Čárkovaná čára značí koncentraci NaCl v elučním roztoku.
- 40 Obr. 4 reverzní HPLC čištěného kryšho ITF (A), lidského ITF monomeru (B) a lidského ITF (C) na koloně Vydac 214TP54 C4. Čárkované čáry značí koncentraci acetonitrilu v elučním roztoku.
- Obr. 5 rekonstruované hmotnostní spektrum čištěného kryšho ITF (A), lidského ITF monomeru (B) a lidského ITF (C).
- 45 Obr. 6 struktura formy lidského ITF.
- Obr. 7 mapa omezení plazmidu KFN 1003.
- 50 Obr. 8 struktura plazmidu pHW756.
- Obr. 9 struktura plazmidu pHW1066.

Příklady provedení vynálezu

Materiály a metody

5

Klonování krysího ITF (rITF) a lidského ITF (hITF)

Klonování krysího a lidského ITF bylo prováděno podle WO 92/14837 a Suemori a kol., 1991 a Chineri a kol., 1992 (kryší ITF) a Podolsky a kol., 1993 a Hauser a kol., 1993 (lidský ITF).

10

Tvorba rITF a hITF expresních plazmidů

Expresní plazmidy pHW756 pro sekreci krysího ITF a pHW 1066 pro sekreci lidského ITF byly vytvořeny jak je uvedeno na obr. 7–9. Kvasinkový expresní vektor pKFN1003 (WO 90/10 075) je odvozen od plazmidu CPOT (Kawasaki, G. International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, Sept. 17–24, 1984, Edinburgh, Scotland, Abstr. str. 15.). Jako výběrový značkovací (Russell, P. R., Gene 40 (1985), 125–130) má *Schizosaccharomyces pombe* TPI gen (POT), jako promotor *S.cerevisiae* triosafosfátizomerázu (TPI) a ukončení pro kontrolu exprese (Alber, T. and Kawasaki, G. J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 419–434).

20

Kryší ITF gen byl nejdříve klonován do Bluescript II KS(–) (Stratagene), ze kterého byl propagován podle obr. 8. Pomocný vektor pSX54 zajišťující klonovací polohy se skládá z pUC1B a pDN1050 (Diderichsen, B., Poulsen, G. B., Jorgensen, S. T. Plasmid 30 (1993), 312–315). Syntetická DNA spojka Nco1–PflM1 má následující sekvenci:

25

1858 : 5'–CATGGCTGAA.AGATTGGAAAAGAGACAAGAGTTCGTTGGTTTGTCTCCAT-
CCCAATGT–3' 58 bp

30

1862 : 5'–TTGrGGATGGAGACAAACCAACGAACCTTGTCTCTTTCCAATCTTTCAGC–
3' 52 bp

Spojka kóduje C–koncové (8) aminokyseliny pro řídicí sekvenci jak popsali Thim, L., Norris, K., Norris, F., Nielsen, P. F., Bjorn, S., Christensen, M., Petersen, J. FEBS Lett. 318, (1993), 345–352, s několika změnami ve výběru kodónu a N–koncovou část krysího ITF genu: QEFVGLSPSQC. Řídicí a signální aminokyselinová sekvence je popsána tamtéž.:

35

MKAVFLVLSLIGFCWAQPVTGDESSVEIPEESLIIAEMAERLEKR.

Lidský ITF gen byl klonován do PUC19 a propagován podle obr. 9.

40

Syntetická DNA spojka Nco1–BsaA1 má následující sekvenci:

2292 : 5'–CATGGCTGAAAGATTGGAAAAGAGAAGAATAC–3' 34 bp

45

2287 : 5'–GTATTCTTCTCTCTTTTCCAATCZ'TTCAGC–3' 30 bp

Spojka kóduje C–koncové (8) aminokyseliny pro řídicí sekvenci, jak je popsáno pro rITF tvorbu a 3 N–koncové aminokyseliny pro hITF gen: EEY. Řídicí a signální aminokyselinová sekvence je stejná jako výše.

50

Expresní plazmidy byly transformovány do *S.cerevisiae* MT 663 (E2–7B X E11–36 a/, tpi/tpi, pep 4–3/pep 4–3) výběrem pro růst na glukóze jako živné půdě.

Transformované kvasinky pro expresi krysího a lidského ITF byly nazvány W756 a HW 1066.

Fermentace

Výše popsané transformované buňky byly kultivovány při 30 °C, 72 h ve kvasinkové peptonové dextróze (Sherman a kol., 1981), doplněné dalším kvasinkovým extraktem (60 g/l). Na konci fermentace byly dosaženy pro HW756 (rITF) a HW1066 (hITF) OD hodnoty 153 a 232 při 660 nm. na konci fermentace bylo pH upraveno pomocí 1M kyseliny fosforečné na 2,5 a kvasinky byly separovány odstředěním při 3000 ot/min. po dobu 15 min.

10 Čištění recombinantu rITF

Koncentrace rITF ve fermentačním extraktu kvasinek a frakcích získaných během čištění byla měřena analytickou HPLC. Alikvoty (obvykle 50–200 l) byla nastříkovány na Vydac 214TP54 reverzní C4 HPLC kolonu (0,46 x 25 cm) temperovanou na 30 °C při průtoku 1,5 ml/min s 0,1 % (objemově) TFA v 15 % (objemově) acetonitrilu. Po 10 min. izokratické eluce byla koncentrace acetonitrilu v elučním roztoku zvýšena během 40 min na 55 % objemových. Absorbance byla měřena při 214 nm, formu rITF reprezentovaly tři píky (26,5 min, 27,3 min, 28,2 min), viz. obr. 2. Kvantita byla stanovena pomocí kalibrovaného hSP standardu (Thim a kol., 1993).

20 Expresní úroveň pro rekombinant krysího ITF byla v předkládaném systému 113 mg/l.

Z 10 l fermentoru bylo odstředěním získáno 8,7 l fermentačního roztoku, který byl zředěn 14,8 l destilované vody na menší vodivost. Vzorek byl čerpán na Fast Flow S–sefarázovou kolonu (Pharmacia) 5 x 42 cm při průtoku 600 ml/h. Před použitím byla kolona vyrovnána 50 mM pufrém (kyselina mravenčí) na pH 3,7. Krysí ITF byl vymýván z kolony 50 mM kyselinou mravenčí (pH 3,7) obsahující 50 mM NaCl. Při průtoku 600 ml/h byly odebírány a na obsah rITF analyzovány 100 ml frakce. Frakce z předešlého kroku obsahující rITF byly spojeny (2,3 l) a čerpány na Amberchromovou (G–71) kolonu 5 x 10 cm. Před použitím byla kolona vyrovnána při průtoku 0,1 l/h na pH 4,8 pomocí 10 mM (octan amonný) pufru obsahujícího 60 % objemových ethanolu. Byly odebírány 10 ml frakce a spojeny podle obsahu rITF. Koncentrace ethanolu byla ve spojeném roztoku přidáním dvou objemů ethanolu (99,99 % objemových) zvýšena ze 60 % objemových na 87 % objemových a rITF byl vysrážen ochlazením směsi na –25 °C po dobu 16 h.

35 Sraženina byla odstředěna (1h, 10 000 g, –25 °C) a při laboratorní teplotě rozpuštěna ve 130 ml mravenčí kyseliny (20 mM) s pH 3,0. Vzorek byl čerpán na Fast Flow S–sefarázovou kolonu (Pharmacia) 5 x 20 cm při průtoku 50 ml/h. Před použitím byla kolona vyrovnána na pH 3,0 pomocí 20 mM kyseliny mravenčí. Peptidy byly z kolony vymyty lineárním gradientem (1,5 l 50mM kyseliny mravenčí, pH 3,0 až 1,5 l 50mM kyseliny mravenčí, pH 3,0 obsahující 0,5 M NaCl). Při průtoku 80 ml/h byly odebírány 10 ml frakce a absorbance byla měřena při 280 nm. Frakce byly testovány na obsah rITF a podle něj spojeny. Krysí ITF byl dále čištěn preparativní HPLC. Spojené frakce (900 ml) byly čerpány na preparativní HPLC kolonu Vydac 214TP54 C4 (2,2 x 25 cm) vyrovnanou v 0,1 l (objemových) TFA. Peptidy byly vymyty při 25 °C a průtoku 5 ml/min lineárním gradientem (540 ml) vytvořeným z MeCN/H₂O/TFA (10 : 89,9 : 0,1 objemově) a MeCN/H₂O/TFA (65 : 34,9 : 0,1 objemově). UV absorpce byla sledována při 280 nm a byly odebírány frakce po 10 ml a analyzovány na obsah rITF. Frakce obsahující rITF byly spojeny a objem zmenšen vakuovou centrifugou na 30 %. Z výsledného roztoku byl rITF izolován lyofilizací. Celkový výtěžek rITF z 8,7 l fermentačního média byl 236 mg odpovídající celkovému výtěžku čištění 24 %.

50

Čištění rekombinantu hITF

- Koncentrace rITF ve fermentačním extraktu kvasinek a frakcích získaných během čištění byla měřena HPLC systémem stejným jako u rITF. Pomocí tohoto systému byly hmotnostní spektrometrií a sekvencí analýzou identifikovány dva píky (21,2 min. a 27,1 min.) jako a monomer hITF. Expresní úroveň pro rekombinant lidského ITF byla v předkládaném systému 90 mg/l.
- Z 10 l fermentoru bylo odstředěním získáno 8,0 l fermentačního roztoku. Vzorek byl třikrát dialyzován (vždy 24 h) proti 40 l 10 mM kyseliny mravenčí s pH 2,5. Vzorek byl čerpán (0,25 l/h) na Fast Flow S-sefarázovou kolonu (Pharmacia) 5 x 40 cm při průtoku 600 ml/h. Kolona byla promyta 5 l 20 mM pufru (kyselina mravenčí) s pH 2,5 a vymyta lineárním gradientem tvořeným 5 l 20 mM pufru (kyselina mravenčí) s pH 2,5 a 5 l 20 mM pufru (kyselina mravenčí) s pH 2,5 obsahující 1 M NaCl. Byly odebrány a na obsah hITF analyzovány 100 ml frakce (obr. 3). Z kolony byly vymyty dvě formy hITF: jedna reprezentovala monomer hITF (vymyta 0,5 M NaCl) a druhá (vymyta 0,78 M NaCl). Frakce obsahující stejnou formu byly spojeny.
- Každá frakce byla rozdělena na tři stejné díly po 700 ml a čerpána na kolonu Vydac 214TP54 C4 (2,2 x 25 cm) vyrovnanou v 0,1 % objemově TFA. Peptidy byly vymyty při průtoku 4 ml/min lineárním gradientem (540 ml) vytvořeným z MeCN/H₂O/TFA (10 : 89,9 : 0,1 objemově) a MeCN/H₂O/TFA (65 : 34,9 : 0,1 objemově). UV absorpce byla sledována při 280 nm a byly odebrány frakce po 10 ml a analyzovány na obsah hITF.
- Frakce z předešlého kroku obsahující hITF (monomer) a hITF dimer byly odděleně spojeny a pH upraveno na 3,0. Vzorky byly odděleně čerpány na SP-sefarázovou HiLoad 16/10 (Pharmacia) kolonu (1,6 x 10 cm) pomocí 20 mM kyseliny mravenčí (pH 3,0) obsahující 40 % objemových ethanolu. Kolona byla promyta 80 ml vyrovnávacího pufru a vymyta lineárním gradientem při 4 ml/min tvořeným 200 ml 20 mM kyseliny mravenčí s pH 3,0; 40 % objemových ethanolu a 200 ml 20 mM kyseliny mravenčí s pH 3,0; 40 % objemových ethanolu obsahující 1 M NaCl. Byly odebrány a na obsah hITF analyzovány 5 ml frakce.
- Frakce obsahující stejnou formu byly spojeny a peptid vysrážen zvýšením koncentrace ethanolu na 90 % objemových a ochlazením směsi na - 25 °C po dobu 72 h. Sraženina byla odstředěna a lyofilizována. Celkový výtěžek z 8 l fermentačního roztoku byl 256 mg hITF (monomer) a 133 mg hITF (), což odpovídá celkovému výtěžku čištění 50 % pro monomer a 65 % pro ().
- Hmotnostní spektra byla měřena na API III LC/MS/MS (Sciex, Thornhill, Ont., Canada). Přístroj s trojitým kvadrupólem má m/z rozsah 2400 a je osazen pneumatickým elektrosprej (ion-sprej) interface (Bruins et al., 1987; Covey a kol., 1988). Vzorky byly nastříkány stříkačkovou infuzní pumpou (Sage Instruments, Cambridge, MA) přes žhavenou kapiláru (75 m) při průtoku kapaliny 0,5 až 1 l/min. Stupnice (m/z) přístroje byla kalibrována amonným aduktem polypropylenglykolů (PPG) s nábojem 1 při jednotkovém rozlišení. Přesnost měření hmotnosti je obecně lepší než 0,02 %.
- Obr. 4 uvádí analytické HPLC chromatogramy čištěného rITF (obr. 4A) a hITF (obr. 4B a 4C). Rekombinovaný rITF obsahuje směs 3 velmi příbuzných peptidů, které jsme se nepokoušeli rozdělit. Při analýze elektrosprejovou MS byly nalezeny tři hlavní molární hmotnosti odpovídající 13112,2; 13096,6 a 13078,8 (obr. 5A). Vypočtena molární hmotnost monomeru rITF, kde Cys-57 obsahuje volnou SH skupinu, je 6558,3. Vypočtená molární hmotnost u rITF (s S-S můstkem mezi Cys-57) je 13114,5. Z nalezených molárních hmotností rekombinovaného rITF je zřejmé, že všechny 3 peptidy reprezentují dimerní formu rITF. Z jiných trojlístkových peptidů s Gln jako N-koncovou aminokyselinu např. PSP (Thim a kol., 1985 a Tomasetto a kol., 1990) je známo, že tyto zbytky mají tendenci k cyklizaci za vzniku pyrrolidonové karboxylové

kyseliny (pyrGlu). V případě rITF s předpovídanou N-koncovou sekvencí Gln-Glu-Phe-Val-Gly se jeví logické předpokládat, že N-koncový Gln mohl rovněž cyklizovat na pyrGlu formu. Taková změna by vedla ke snížení molární hmotnosti rITF o 17 (1 pyrGlu) nebo 34 (2 pyrGlu) jednotek. Pozorované molární hmotnosti 13096,6 a 13078,8 (obr. 5) odpovídají rITF s jedním resp. dvěma zcyklizovanými N-koncovými Gln. Vypočtená molární hmotnost těchto forem je 13097,6 a 13080,6 a je v dobré shodě s experimentálními údaji. Závěrem z HPLC (obr. 4A) a MS analýzy (obr. 5A) tedy je, že rekombinovaný rITF obsahuje 3 různé dimery: první s dvěma N-koncovými Gln, druhý s jedním N-koncovým Gln a jedním N-koncovým pyrGln a třetí se dvěma N-koncovými pyrGln. Tabulka I uvádí aminokyselinové složení rITF v dobré shodě s očekávanými hodnotami. Obr. 5A a 5B ukazují čistotu monomeru a hITF podle analytické HPLC (obr. 5C) jenž je poměrně čistý, zatímco monomer (obr. 5B) vykazuje znečištění látkami vymytými před peptidem, ale i po opětovné chromatografii látky s hlavním píkem byl získán podobný chromatogram (není uveden). To ukazuje spíše než na nečistoty na atypické chování monomeru hITF na nevezní fázi. Dříve jsme pozorovali podobné chování vysoce čištěného porcinu PSP a rekombinovaného hSP (Thim a kol., 1993).

MS analýza monomeru ITF molární hmotnost hlavního píku 6694,0 (obr. 5B). Molární hmotnost vypočtená pro aminokyselinovou sekvenci (obr. 1) s předpokladem volné SH skupiny na Cys-57 je 6574,4. Analýza aminokyselinové sekvence v tabulce II ukazuje očekávanou N-koncovou sekvenci Glu-Glu-Tyr-Val-Gly. Analýza aminokyselinového složení (tabulka I) ukazuje kromě přítomnosti 7,3 (8) cysteinů očekávané hodnoty. Další cystein připojený k Cys-57 hITF monomeru zvýší molární hmotnost na 6694,7, což je velmi blízko experimentální hodnotě 6694,0. Proto předpokládáme disulfidické spojení Cys-57 monomeru hITF s dalším cysteinem. Minoritní pík v hmotnostním spektru (obr. 5B) může reprezentovat jiný derivát Cys-57 nebo nečistotu.

Vypočítaná molární hmotnost u hITF, kde jsou dva y spojeny disulfidickou vazbou mezi dvěma Cys-57 zbytky je 13146,8. To je v dobré shodě s experimentální hodnotou 13147 (obr. 5C). Další pík v hmotnostním spektru (13169) pravděpodobně reprezentuje Na^+ adukt u hITF. Sekvenční analýza (tabulka I) i analýza aminokyselinového složení (tabulka II) jsou rovněž v dobré shodě s očekávanými hodnotami.

Tabulka I

Aminokyselinové složení dimeru rITF, monomeru hITF a dimeru hIT

5

Aminokys.	rITF (dimer)		hITF (monomer)		hITF (dimer)	
Asx	11.92	(12)	6.00	(6)	12.01	(12)
Thr ^a	8.00	(8)	2.03	(2)	4.01	(4)
Ser ^a	9.86	(10)	2.04	(2)	4.01	(4)
Glx	15.98	(16)	6.92	(7)	14.00	(14)
Pro ^b	12.48	(12)	n.d. ^c	(6)	n.d. ^c	(12)
Gly	6.02	(6)	4.20	(4)	8.09	(8)
Ala	2.04	(2)	3.91	(4)	7.90	(8)
Val	11.92	(12)	4.92	(5)	9.86	(10)
Met	1.80	(2)	0.00	(0)	0.00	(0)
Ile	1.98	(2)	1.17	(1)	2.13	(2)
Leu	3.92	(4)	2.03	(2)	3.99	(4)
Tyr ^b	2.02	(2)	1.94	(2)	3.92	(4)
Phe	7.88	(8)	2.93	(3)	5.94	(6)
Lys	2.14	(2)	3.07	(3)	6.09	(6)
His	0.00	(0)	0.99	(1)	2.03	(2)
Trp	2.16	(2)	n.d. ^c	(1)	n.d. ^c	(2)
Arg	3.94	(4)	2.96	(3)	6.05	(6)
PE-Cys ^b	12.70	(14)	7.30	(7)	13.80	(14)
Celkem		(118)		(59)		(118)

Hodnoty v závorkách jsou odvozeny z cDNA: rITF (Chinery a kol., 1992), hITF (Hauser a kol., 1993),

10 ^{a)}stanoveno extrapolací na počátek hydrolyzy,

^{b)}stanoveno hydrolyzou ve 4 M methansulfonové kyselině,

^{c)}nebylo stanoveno.

15

Tabulka II

Automatizované Edman-odbourání dimeru rITF, monomeru hITF a dimeru hITF

5

Cyklus č.	rITF (dimer)		hITF (monomer)		hITF (dimer)	
	PTA-A.A.	Výtěžek (pmol)	PTH-A.A.	Výtěžek (pmol)	Výtěžek	(pmol)
1	Glu	989	Glu	1517	Glu	2227
2	Glu	731	Glu	1998	Glu	2361
3	Phe	967	Tyr	2205	Tyr	2528
4	Val	1072	Val	2409	Val	2431
5	Gly	701	Gly	1625	Gly	1803
6	Leu	838	Leu	2318	Leu	2253
7	Ser	497	Ser	852	Ser	904
8	Pro	965	Ala	1729	Ala	1712
9	Ser	406	Asn	1394	Asn	1518
10	Gln	820	Gln	1494	Gln	1499
11	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.
12	Met	581	Ala	1243	Ala	1377
13	Val	971	Val	1468	Val	1356
40	Pro	962	Pro	1223	Pro	1195
15	Ala	529	Ala	1248	Ala	1249
16	Asn	791	Lys	1270	Lys	1050
17	Val	952	Asp	937	Asp	991
18	Arg	331	Arg	891	Arg	964
19	Val	956	Val	1002	Val	1069
20	Asp	476	Asp	847	Asp	932
21	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.	Cys	n.d.
22	Gly	381	Gly	709	Gly	703
23	Tyr	352	Tyr	894	Tyr	792
24	Pro	927	Pro	766	Pro	701
25	Thr	498	His	309	His	236
26	Val	812	Val	755	Val	670
27	Thr	510	Thr	505	Thr	576
28	Ser	225	Pro	458	Pro	473
29	Glu	398	Lys	444	Lys	321
30	Gln	499	Glu	219	Glu	304
31	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.
32	Asn	557	Asn	312	Asn	300
33	Asn	591	Asn	464	Asn	503
34	Arg	196	Arg	325	Arg	294
35	Gly	222	Gly	239	Gly	223
36	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.
37	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.	(Cys)	n.d.
38	Phe	335	Phe	189	Phe	174
39	Asp	275	Asp	133	Asp	137
40	Ser	164	Ser	49	Ser	43
R.Y		97.0%		93.2%		92.5%

Průmyslová využitelnost

Předkládaný vynález se týká trojlístkových peptidů, způsobu jejich přípravy, farmaceutických prostředků, které je obsahují a jejich použití pro léčení gastrointestinálních poruch. Za určitých podmínek jako je např. mukózní poškození při zánětu střev (Rio a kol. 1991, Poulsom a kol. 1992, Wright a kol. 1993) a žaludečních vředech a vředech dvanáctníku (Rio a kol. 1991, Hanby a kol. 1993, Wright a kol. 1990) byla pozorována zvýšená exprese trojlístkových peptidů v trávicí soustavě. To bylo podnětem pro názor, že trojlístkové peptidy mají mukózní regenerační funkci, o čemž byl v současné době podán důkaz Dignassem a kol. 1994, Playford a kol. 1994 a Babyatsky a kol. 1994.

Odkaz na literaturu

- Babyatsky, M. W., Thim, L., Podolsky, D. K. (1994) *Gastroenterology* 106, A43 (abstract).
- Bruins, A. P., Covey, T. R., & Henion, J. D. (1987) *Anal. Chem.* 59, 2642–2646.
- Chinery, R., Poulsom, R., Rogers, L. A., Jeffery, R. E. Longcroft, J. M., Hanby, A. M., & Wright, N. A. (1992) *Biochem. J.* 285, 5–8.
- Covey, T. R., Bonner, R. F., Shushan, B. I., & Henion, J. D. (1988) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2, 249–256.
- Dignass, A., Lynch-Devaney, K., Kindon, H., Thim, L., & Podolsky, D. K. (1994) *J. Clin. Invest.* (in press).
- Friedman, M., Krull, L. H., Cavins, J. F. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 3868–3871.
- Gajhede, M., Petersen, T. N., Henriksen, A., Petersen, J. F. W., Dauter, Z., Wilson, K. S., & Thim, L. (1993) *Structure* 1, 253–262.
- Hanby, A. M., Poulsom, R., Elia, G., Singh, S., Longcroft, J. M., & Wright, N. A. (1993) *J. Pathol.* 169, 355–360.
- Hauser, F., & Hoffmann, W. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 21206–21309.
- Hauser, F., Roeben, C., & Hoffmann, W. (1992a) *J. Biol. Chem.* 267, 14451–14455.
- Hauser, F., & Hoffmann, W. (1992b) *J. Biol. Chem.* 267, 24620–24624.
- Hauser, F., Poulsom, R., Chinery, R., Rogers, L. A., Hanby, A. M., Wright, N. A., & Hoffmann, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 6961–6965.
- Hoffmann, W. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7686–7690.
- Hoffmann, W., & Hauser, F. (1993) *Trends Biochem. Sci.* 7, 239–243.
- Jakowlew, S. B., Breathnach, R., Jeltsch, J.-M., Masiakowski, P., Chambon, P. (1984) *Nucleic Acid Res.* 12, 2861–2878.
- Lefebvre, O., Wolf, C., Kedinger, M. Chenard, M.-P., Tomasetto, C., Chambon, P., & Rio, M. C. (1993) *J. Cell. Biol.* 122, 191–198.

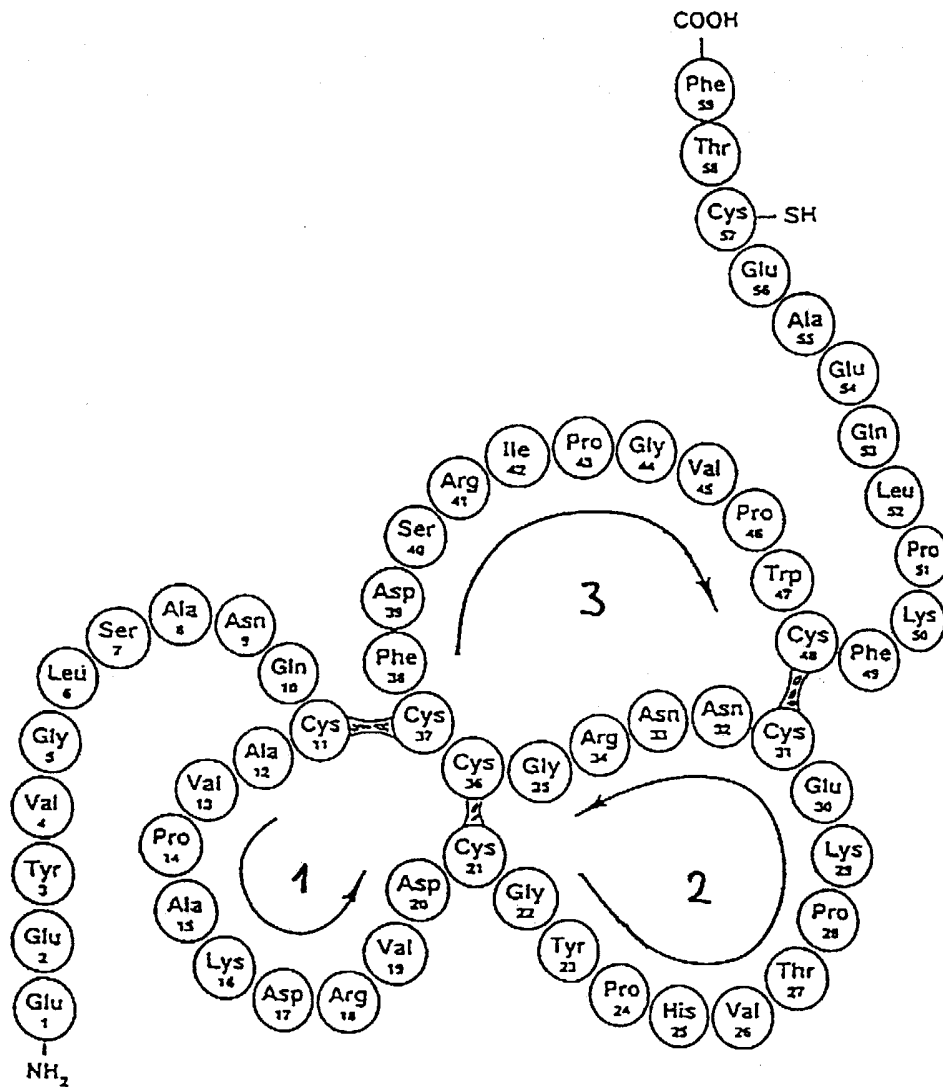
- Playford, R. J., Marchbank, T., Chinery, R., Evison, R., Pignattelli, M., Bolton, R., Thim, L., & Hanby, A. M. (1994) *Gastroenterology* (in press).
- Podolsky, D. K., Lynch-Devaney, K., Stow, J. L., Oates, P., Murgue, B., DeBeaumont, M., Sands, B. E., & Makida, Y. R. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6694-6702.
- Poulsom, R., Chinery, R., Sarraf, C., Lalani, E.-N., Stamp, E., Elia, G., Wright, N. (1992) *Gastroenterology* 27, 17-28.
- Poulsom, R., & Wright, N. A. (1993) *Am. J. Physiol.* 265, G205-G213.
- Prud'homme, J. F., Fridlansky, F., Le Cunff, M., Atger, M., Mercier-Bodart, C., Pichon, M.-F., & Milgrom, E. (1985) *DNA* 4, 11-21.
- Rio, M. C., Bellocq, J. P., Daniel, J. Y., Tomasetto, C., Lathe, R., Chenard, M. P., Batzenschlager, A., & Chambon, P. (1988) *Science* 241, 705-708.
- Rio, M.-C., Chenard, M.-P., Wolf, C., Marcellin, L., Tomasetto, C., Lathe, R., Bellocq, J.-P., & Chambon, P. (1991) *Gastroenterology* 100, 375-379.
- Rüegg, U. Th., & Rudinger, J. (1974) *Isr. J. Chem* 12, 391-401.
- Sherman, F., Fink, G. R., & Hicks, J. B. (1981) *Methods in yeast genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Suemori, S., Lynch-Devaney, K., & Podolsky, D. K. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11017-11021.
- Thim, L., Jørgensen, K. H., & Jørgensen, K. D. (1982) *Regul. Peptides* 3, 221-230.
- Thim, L., Thomsen, J., Christensen, M., & Jørgensen, K. H. (1985) *Biochem. Biophys. Acta* 827, 410-418.
- Thim, L., Hansen, M. T., Norris, K., Hoegh, I., Boel, E., Forstrom, J., Ammerer, G., & Fiil, L. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 6766-6770.
- Thim, Lk. Hansen, M. T., & Soerensen, A. R. (1987) *FEBS Lett.* 212, 307-312.
- Thim, L. (1989) *FEBS Lett.* 250, 85-90.
- Thim, L., Norris, K., Norris, F., Nielsen, P. F., Bjørn, S. E., Christensen, M., Petersen, J. (1993) *FEBS Lett.* 318, 345-352.
- Thim, L. (1994) *Digestion* 55, 353-360.
- Tomasetto, C., Rio, M., Gautier, C., Wolf, C., Hareuveni, M., Chambon, P., & Lathe, R. (1990) *EMBO J.* 9, 407-414.
- Wright, N. A., Pike, C., & Elia, G. (1990) *Nature* 343, 82-85.
- Wright, N. A., Poulsom, R., Stamp, G., van Norden, S., Sarraf, C., Elia, G., Ahnen, D., Jeffery, R., Longcroft, J., Pike, C., Rio, M., & Chambon, P. (1993) *Gastroenterology* 104, 12-20.

PATENTOVÉ NÁROKY

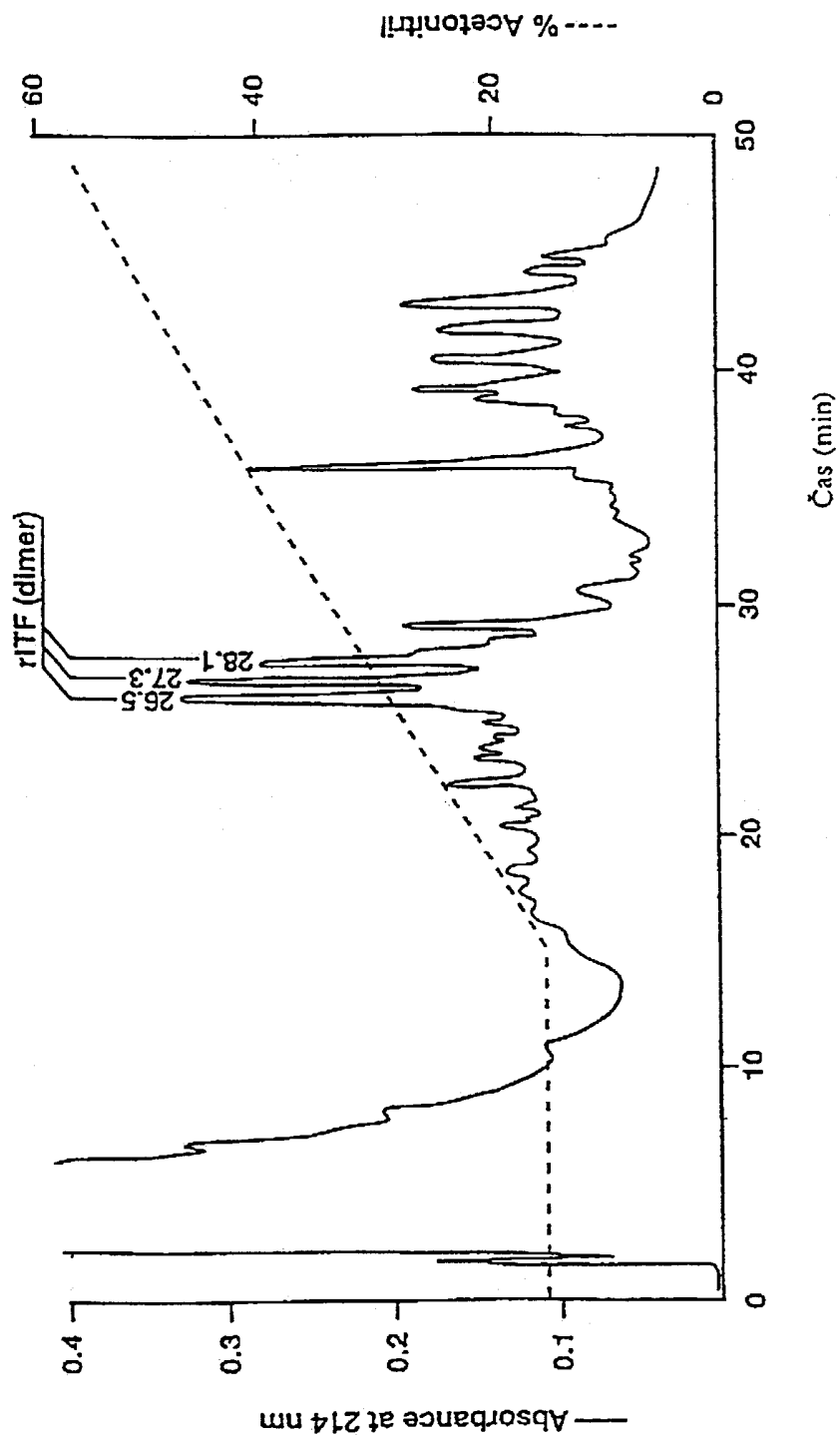
- 5 1. Trojlístkový peptid v čisté formě obsahující intestinální trojlístkový faktor –ITF, který se skládá ze dvou ITF monomerů spojených disulfidickou vazbou mezi dvěma cysteinovými zbytky obou monomerů v pozici 57 každého monomeru.
2. Peptid podle nároku 1, kterým je lidský intestinální trojlístkový faktor – ITF.
- 10 3. Způsob přípravy trojlístkového peptidu podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že se kultivují vhodné hostitelské buňky transformované DNA sekvencí kódující trojlístkový peptid obsahující jednoduchou trojlístkovou doménu a získá se vzniklý dimerní trojlístkový peptid z kultury.
- 15 4. Farmaceutický prostředek, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje trojlístkový peptid podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 spolu s farmaceuticky vhodným ředidlem nebo přísadou.
5. Trojlístkový peptid podle nároku 1 pro použití jako léčivo.
- 20 6. Použití trojlístkového peptidu podle nároku 1 pro přípravu léčiva pro profylaxi nebo léčení poruch trávicí soustavy.

25

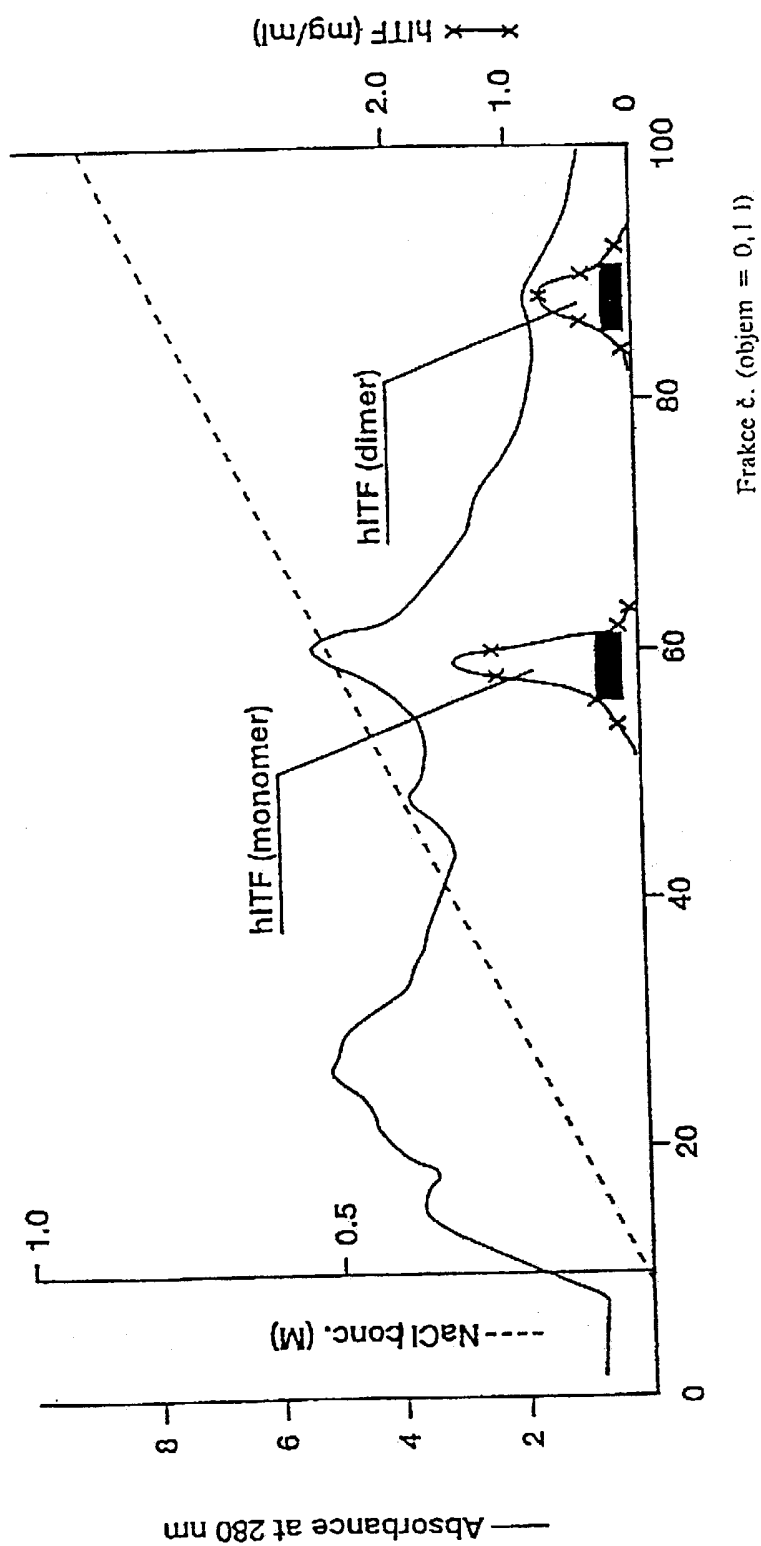
9 výkresů



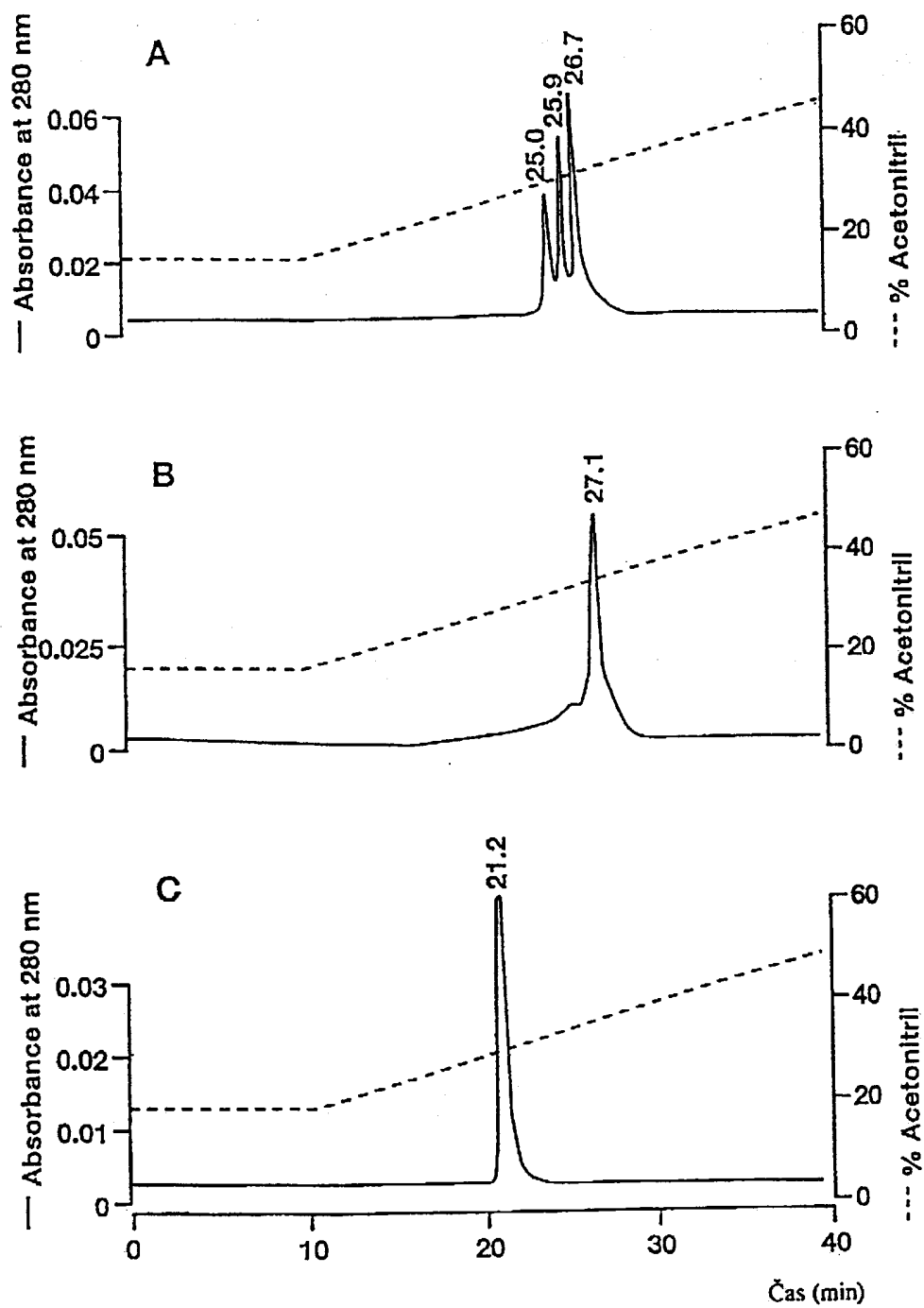
Obr. 1



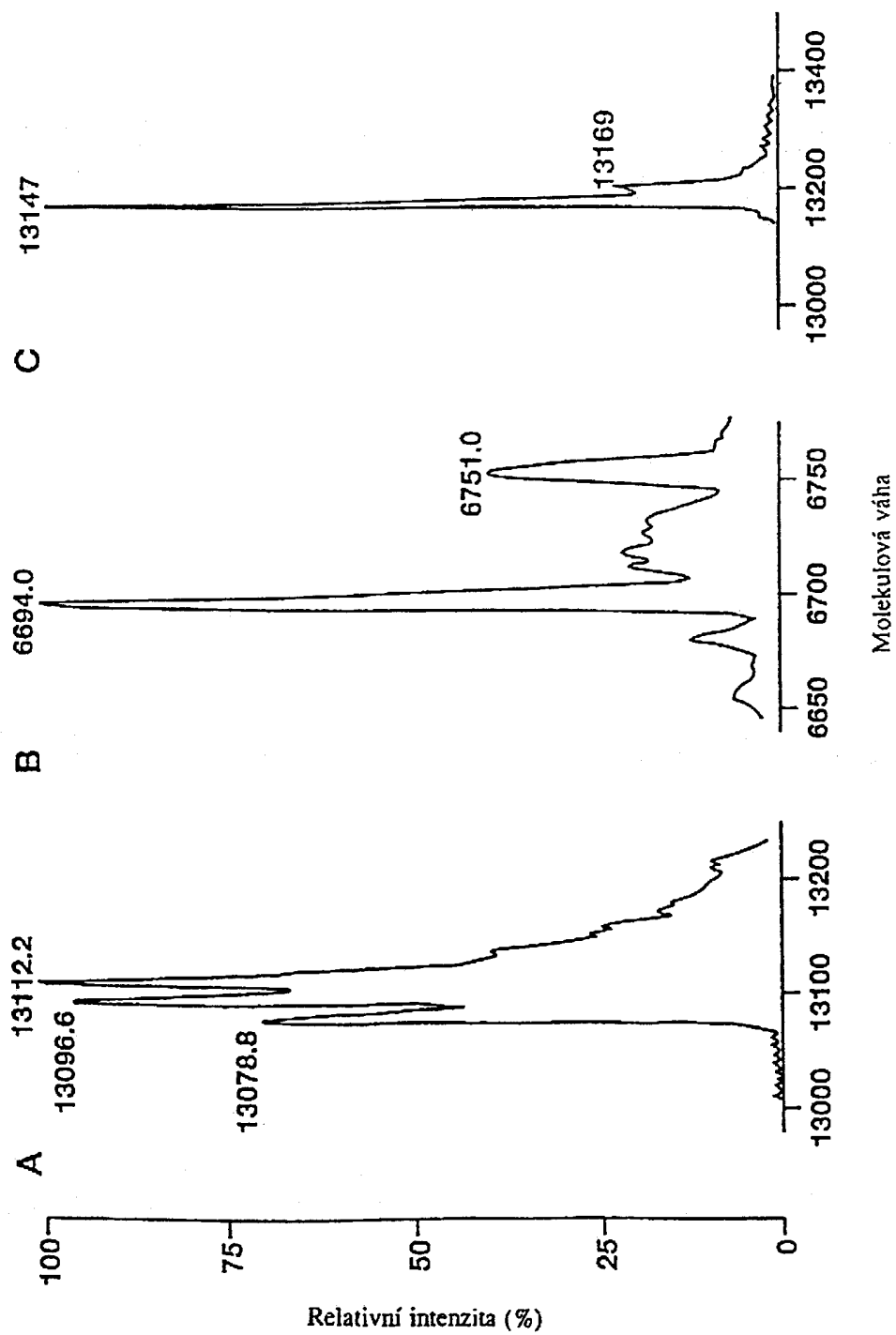
Obr. 2



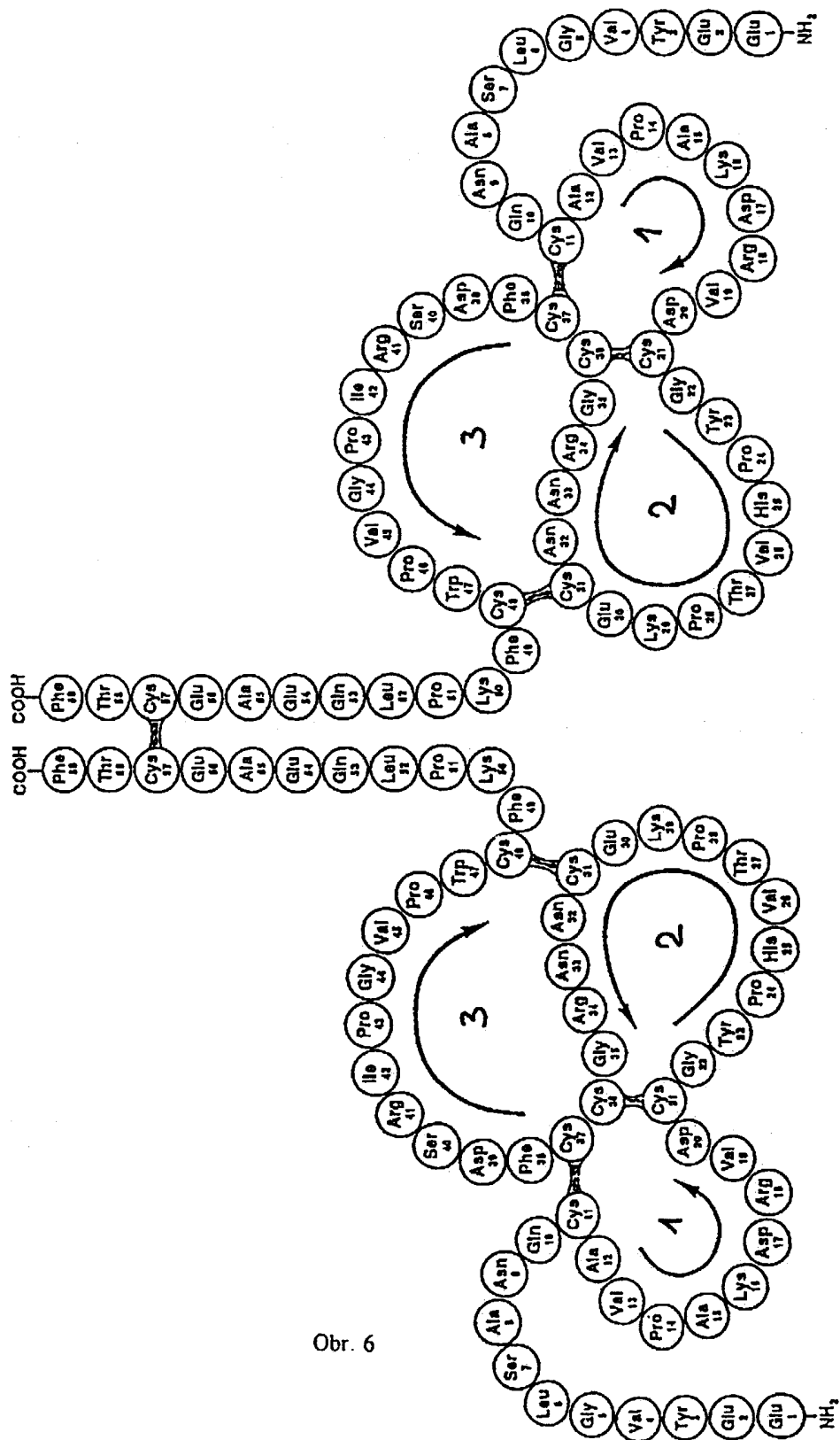
Obr. 3



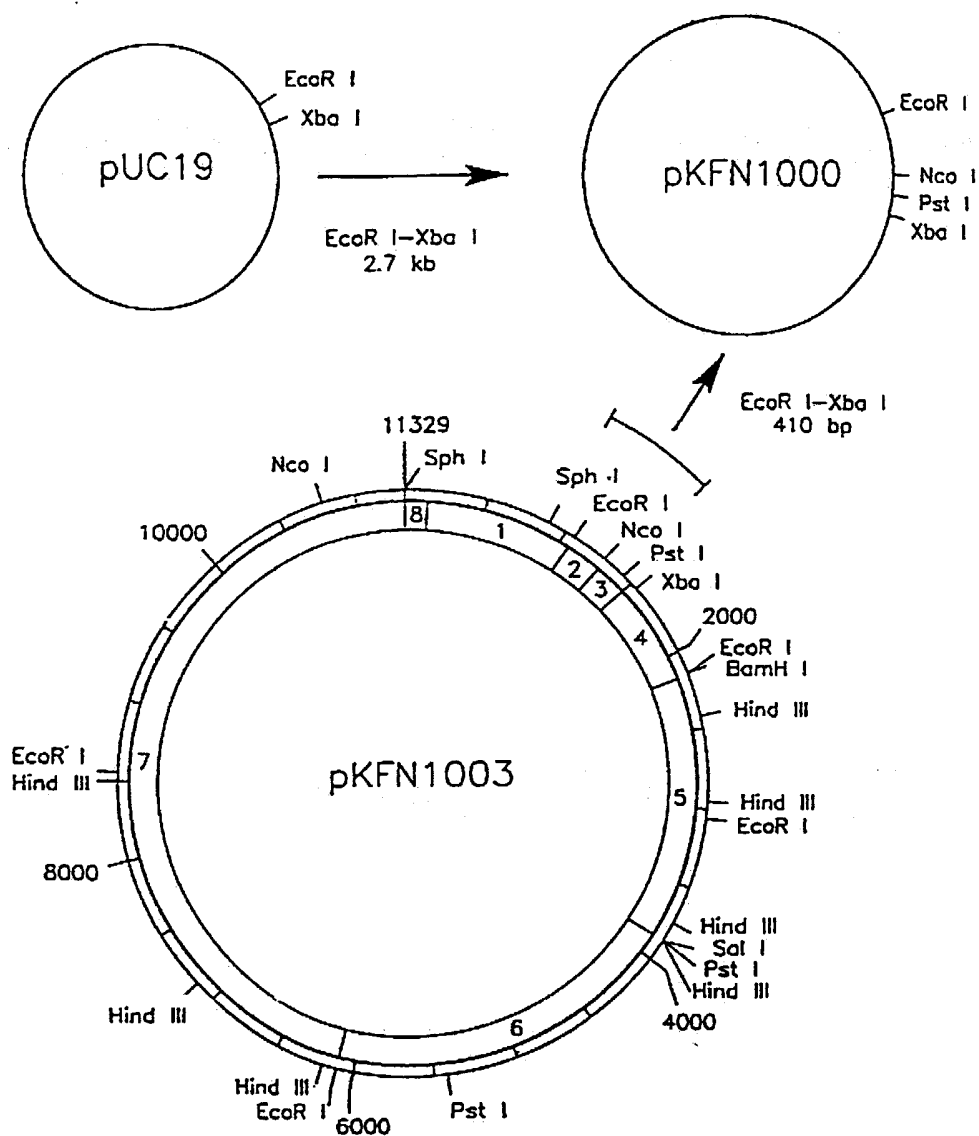
Obr. 4



Obr. 5

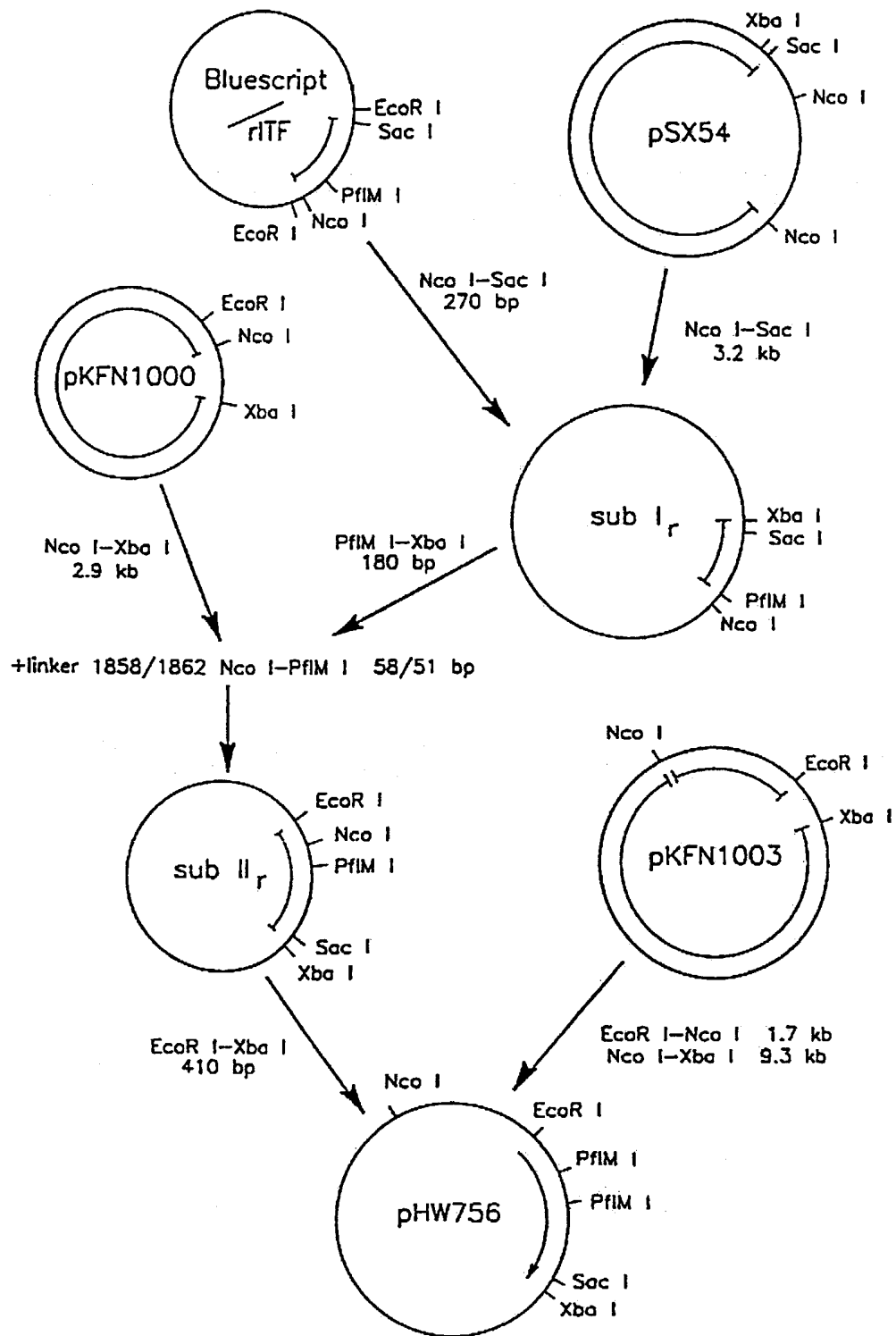


Obr. 6

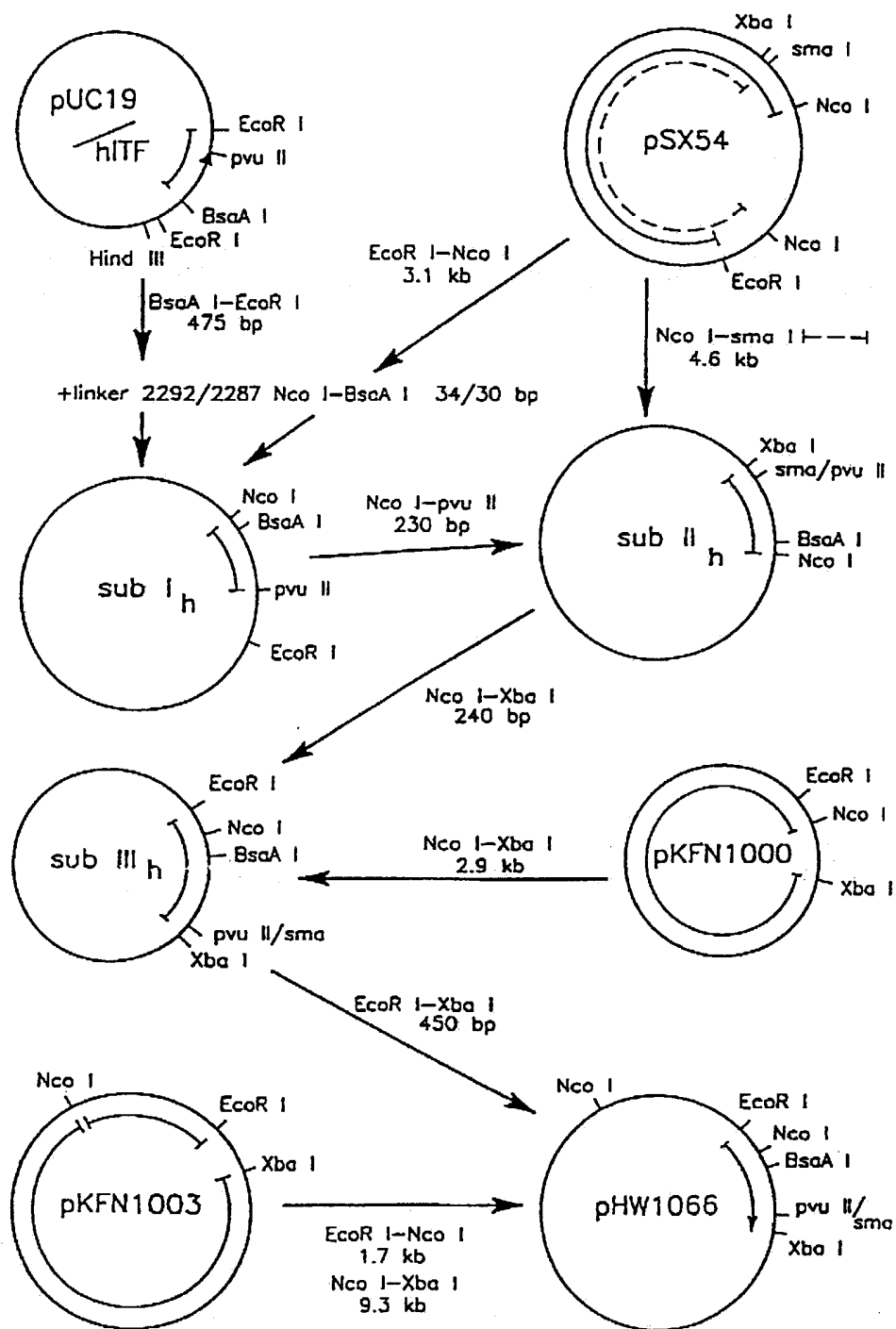


1. TPI promotor ze *S. cerevisiae*
2. Syntetický signálně řídící gen
3. Syntetický aprotininový gen
4. TPI ukončení ze *S. cerevisiae*
5. TPI gen ze *S. pombe*
6. Sekvence z *E. coli* plasmidů pBR322 a pUC13
7. Sekvence ze *S. cerevisiae* 2 μ plasmidu
8. Spojovací sekvence z *E. coli* plasmidu pBR322

Obr. 7



Obr. 8



Obr. 9

 Konec dokumentu
