

P0105004

CÖZZÉVETÉSI
PÁLDÁNY

U. S. S. R.

Csontstimuláló faktor

K I V O N A T

A találmány tárgyát csontnövekedést stimuláló polipeptidek képezik. A találmány tárgyát közelebbről neutrofil aktiváló peptid (NAP-2) bizonyos mutánsai [NAP-2V-(13-26; gln²⁵-glu²⁵) és NAP-2V-(15-22)] védett változatainak csontstimuláló aktivitású fragmensei képezik.

A találmány szerinti megoldás alkalmas csontnövekedés serkentésére alkalmazható gyógyászati készítmények előállítására.

jellemezésére ábr. Ø

Benon

Csontstimuláló faktor

A találmány tárgyát csontnövekedést stimuláló polipeptidek képezik. A találmány tárgyát közelebbről neutrofil aktiváló peptid (NAP-2) bizonyos mutánsai [NAP-2V-(13-26; gln²⁵-glu²⁵) és NAP-2V-(15-22)] védett változatainak csontstimuláló aktivitású fragmensei képezik.

A találmány szerinti megoldás alkalmas csontnövekedés serkentésére alkalmazható gyógyászati készítmények előállítására.

A bejelentés igényli az 1999. január 13-án benyújtott USSN 09/229,304 sz. bejelentés elsőbbségét, mely bejelentés az 1998 március 26-án benyújtott USSN 09/048,058 sz. bejelentés részben folytatólagos bejelentése. E bejelentések tartalmát a kitanítás részeként kell tekinteni.

A csontnövekedéssel és csonterősséggel kapcsolatos ismereteink évről évre növekednek, amelyek összefoglalása megtalálható például a PCT/CA 94/00144. számú nemzetközi közzétételi iratban (közzétéve 1994. szeptember 15., WO 94/20615. közzétételi számon), PCT/CA 96/00653. számú nemzetközi közzétételi iratban (közzétéve 1997. április 3., WO 97/12036. közzétételi számon), 5,320,970. számú USA-beli szabadalmi leírásban és a 92 302 446. számú európai közzétételi iratban (közzétéve 1992. szeptember 23., 505 210. számon), amely bejelentések tartalmát a kitanítás részének tekintjük.



A találmány szerinti megoldás háttereként, az alábbiakban leírtak alapján a neutrofil aktiváló peptid (NAP-2; 1. azonosítószámú szekvencia) és NAP-2 egy variánsa, melyet „NAP-2V”-nek jelölnek (2. azonosítószámú szekvencia), egy ideje már ismert volt [Walz, A. és M. Baggiolini, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 969 (1989)]. 2 231 872. számú brit szabadalmi leírásban (feltalálók: M. Baggiolini, K. J. Clemetson és A. Walz, közzétéve 1990. június 14.) ismertetik a NAP-2 aminosav-szekvenciáját és három látszólag természetesen előforduló variánst, köztük a NAP-2V-t. Két másik variáns további négy (3. azonosítószámú szekvencia) és három (4. azonosítószámú szekvencia) aminosavval rendelkezik a NAP-2-szevencia N-terminálisánál. A NAP-2 a β -tromboglobulin (β -TG; 5. azonosítószámú szekvencia) alszekvenciája, amely további 11 aminosavval rendelkezik az N-terminális végnél. β -TG maga a kötőszöveti aktiváló peptid (CTAP-III; 6. azonosítószámú szekvencia) alszekvenciája, amely további 4 aminosavval rendelkezik az N-terminális végnél. CTAP-III a vérlemezke bázikus fehérje (PBP; 7. azonosítószámú szekvencia) alszekvenciája, amely további 9 aminosavval rendelkezik az N-terminális végnél.

NAP-2-t az interleukin-8-al (humán IL-8; 8. azonosítószámú szekvencia; sertésből származó IL-8; 9. azonosítószámú szekvencia) és melanoma-növekedést stimuláló aktivitással (MGSA) együtt ahhoz az alcsaládhoz sorolták, amely α -kemokinek néven ismeretes. Az α -kemokinek közösek abban, hogy négy ciszteinnel rendelkeznek olyan nagymértékben konzervatív helyzetekben, amelyek a molekulák központi

(„core”) régióját veszik körül [Brandt és mtsai., J. Biol. Chem. 270, 6338 (1995)]. Brandt és munkatársai azt találták, hogy látszólag természetesen előforduló, C-terminálisnál rövidített NAP-2-variáns, amelyből hiányzik a NAP-2 utolsó négy aminosava, fokozott mértékben képes neutrofil degranulációt stimulálni. Brandt és munkatársai olyan variánst is szintetizáltak, amelyekből hiányzott a NAP-2 utolsó egy, kettő, három, öt és hat, C-terminális aminosava. C-terminálisnál rövidített, valamennyi polipeptid NAP-2-nél mérsékelten nagyobb hatást volt képes kifejteni, kivéve azt a szekvenciát, amely NAP-2-nek csak az első 64 aminosavával rendelkezett. Brandt és munkatársai tárgyalták a szekvenciamódosítások lehetséges jelentőségét a NAP-2 szerkezete és funkciója vonatkozásában.

A 4. vérlemezke faktor (PF4; 10. azonosítószámú szekvencia) hetven aminosavból álló polipeptid [Hermanson, M. és mtsai., J. Biol. Chem. 252, 6276 (1977); Morgan, F. J., Thromb. Haemost. 42, 1652 (1979)]. Kimutatták, hogy a PF4 két, Saos-2- és G-292-jelű, oszteoblaszt oszteoszarkóma sejtvonal proliferációját gátolta [5,304,542. számú USA-beli szabadalmi leírás, feltalálók: D. M. Tatakis, megadva: 1994. április 19.]. Indometacin látszólag nem volt hatással a sejtproliferáció PF-4-indukált gátlására. Feltételezzük, hogy az alábbi, konkrét fragmensek szintén alkalmazhatók: PF4(58-70), PF4(47-70) és monomer, alacsony affinitású PF4(LAPF4), amely 50%-ban homológ PF4-el és α -helikális C-terminálissal rendelkezik. Tehát PF4-ről és rokon szerkezetű polipeptidekről leírták, hogy oszteoblasztok proliferá-

ciójának gátlására szolgáló eljárásban alkalmazhatók, többek között csontritkulásban szenvedő embereken.

NAP-2V első 70 aminosava és a PF4 szekvenciája mintegy 51%-ban homológ, és a négy cisztein helyzete konzervatív a két polipeptidben.

Korábban kimutatták, hogy a NAP-2, NAP-2V, valamint a NAP-2V bizonyos alszekvenciái csontstimuláló hatásokat képesek kifejteni, míg bizonyos alszekvenciák nem képesek csontstimuláló hatásokat kifejteni. Azt találták, hogy a NAP-2V-(1-26) (11. azonosítószámú szekvencia) és NAP-2V-(13-26; $\text{gln}^{25} \rightarrow \text{glu}^{25}$) (12. azonosítószámú szekvencia) növelte a csont megfigyelt felépülési sebességét, az utóbbi hatékonyabb volt, mint az első. Úgy tűnik, hogy NAP-2V-(10-26) (13. azonosítószámú szekvencia) kismértékű növekedést okozott a csont megfigyelt felépülési sebességében, bár a megfigyelt növekedés statisztikai szignifikanciája kérdéses. Azt találták, hogy NAP-2V-(11-26) (14. azonosítószámú szekvencia) és NAP-2V-(12-26) (15. azonosítószámú szekvencia) nem volt hatással az ásványi anyag csontba való, megfigyelt beépülési sebességére.

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során azt találtuk, hogy NAP-2V-(13-26; $\text{gln}^{25} \rightarrow \text{glu}^{25}$) (17. azonosítószámú szekvencia) és NAP-2V-(15-22) (18. azonosítószámú szekvencia) védett verzióinak csontstimuláló aktivitása van.

A találmány tárgyát képezi tehát polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, a fragmens legfeljebb 13 egymást követő aminosavból áll, a 12., 19. azonosítószámú aminosav-

szekvenciából, vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsából kiválasztva.

A találmány tárgya másik vonatkozásában olyan polipeptid, amely legfeljebb 12 egymást követő aminosavból áll, a 12., 19. azonosítószámú aminosav-szekvenciából, vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsából kiválasztva.

Ezzel alternatív módon, a fragmens legfeljebb 11, 10, 9 vagy 8 egymást követő aminosavból áll, a 12., 19. azonosítószámú aminosav-szekvenciából, vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsából kiválasztva.

Megjegyezzük, hogy a 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia 14-tagú szekvencia, amely megfelel a 12. azonosítószámú szekvenciának, de közvetlenül a természetesen előforduló szekvenciára, azaz a 2. azonosítószámú szekvenciára alapul.

Az aminosav-szekvencia, amelyből a polipeptid aktivitása származik, előnyösen legalább 8 aminosav hosszúságú. A szekvencia előnyösen a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia (vagy N- és/vagy C-terminális védett verziójának) alszekvenciája, vagy annak konzervatív szubsztituált variánsa. Legelőnyösebben, az alszekvencia a 18. azonosítószámú szekvenciát (a leírásban az aminosav-szekvenciára önmagában véve utalunk) vagy konzervatív szubsztituált variánsát tartalmazza. Sőt, még előnyösebben, az alszekvencia a 18. azonosítószámú szekvencia.

A találmány tárgya másik vonatkozásában polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő poli-

peptid-fragmenst tartalmaz, a fragmens legfeljebb 13 egymást követő aminosavból áll, a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvenciából kiválasztva.

A találmány tárgya másik vonatkozásában olyan polipeptid, amely legfeljebb 12 egymást követő aminosavat tartalmazhat a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvenciából kiválasztva, vagy legfeljebb 11, 10, 9 vagy 8 egymást követő aminosavat a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvenciából kiválasztva.

A fragmens előnyösen legalább 8 aminosav hosszúságú és a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy konzervatívan szubsztituált variánsát tartalmazza.

A találmány tárgya másik vonatkozásában izolált polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, a fragmens olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy konzervatívan szubsztituált variánsát tartalmazza. Előnyösebben az izolált polipeptid olyan polipeptid-fragmenst tartalmaz, amely emlősszervezetekben elősegít csontnövekedést, a fragmens olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy konzervatívan szubsztituált variánsát tartalmazza.

A találmány szerinti polipeptidek N-terminális vagy C-terminális aminosavai közül az egyik vagy a másik vagy mindkettő védőcsoporttal lehet ellátva.

A találmány tárgyát egy másik vonatkozásában egy első polipeptidként definiáljuk, amely emlősszervezetekben elő-

segít csontnövekedést, és olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 13 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, a második polipeptid fentebb leírt polipeptid-fragmens, így az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

Egy ilyen első polipeptid állhat legfeljebb 12, 11, 10, 9 vagy 8 aminosavból, és előnyösen legalább 8 aminosav hosszúságú.

Előnyösen a találmány szerinti polipeptid lényegében tiszta, és a polipeptid molekulatömege mintegy 1000 és mintegy 4000 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 3000 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 1800 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 1800 közötti tartományban van.

A találmány tárgya a fentebb leírt, találmány szerinti polipeptidet tartalmazó ágens csont leépülésével kapcsolatos betegség prevenciójára és kezelésére való alkalmazásra.

A találmány tárgyát képezi csontnövekedést elősegítő gyógyászati készítmény, amely találmány szerinti polipeptid terápiásan hatásos mennyiségét tartalmazza.

A találmány tárgyát képezi eljárás csontnövekedés mértékének fokozására emlősszervezetben, a találmány szerinti polipeptid terápiásan hatásos mennyiségének beadásával.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti polipeptid alkalmazása csontritkulás kezelésére.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti polipeptid alkalmazása csontnövekedés elősegítésére emlősszer-

vezetben.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti polipeptid alkalmazása gyógyszer előállítására, csont növekedésének elősegítésére vagy csontritkulás kezelésére történő alkalmazásra.

A találmány tárgyát képezi diagnosztikai reagenskészlet a találmány szerinti polipeptid jelenlétének meghatározására, amely a polipeptid ellen termeltetett, riporter-rendszerhez kötött ellenanyagot tartalmaz, ahol a riporter-rendszer detektálható választ ad akkor, ha előre meghatározott mennyiségű polipeptid és az ellenanyag összekapcsolódik.

A találmány tárgyát képezi izolált DNS-fragmens, amely találmány szerinti bármilyen polipeptid expresszióját kódolja, és olyan DNS, amely a genetikai kód degeneráltsága következtében különbözik a fragmenstől.

A találmány tárgya vektor, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely expresszálhatóan kódolja a találmány szerinti polipeptidet.

A találmány tárgyát képezi eljárás találmány szerinti polipeptid előállítására, amelyben

a) előállítjuk a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmazó DNS-fragmenst;

b) a DNS-fragmenst beépítjük expressziós vektorba, így olyan rekombináns DNS-fragmenshez jutunk, amely tartalmazza a DNS-fragmenst, és képes replikálódni;

c) gazdasejtet transzformálunk a rekombináns DNS-fragmenssel olyan transzformánsok izolálása céljából, amelyek

képesek expresszálni a polipeptidet; és

d) úgy tenyésztjük a transzformánsokat, hogy lehetővé váljon, hogy a transzformánsok a polipeptidet termeljék, és kinyerjük a polipeptidet az eredményül kapott, tenyésztett keverékből.

A találmány tárgyát képezi olyan vegyület, amely találmány szerinti bármilyen polipeptidből „származik”.

A találmány tárgya tehát olyan polipeptid, amelynek aminosav-szekvenciája lényegében az alábbiakból áll:

(i) a 18. azonosítószámú szekvenciának megfelelő aminosav-szekvencia;

(ii) az (i)-pontban említett aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptid variánsa, amely az aminosav-szekvenciából többet tartalmaz; vagy

(iii) az (i) vagy (ii) pontban említett polipeptid konzervatív szubsztituált variánsa.

Walz és munkatársai által közölt, NAP-2V DNS-szekvenciáját (2 231 872. számú brit szabadalmi leírás. Feltalálók: M. Baggiolini, K. J. Clemetson és A. Walz, közzétéve: 1990. június 14., "Neutrophil-activating peptide-2 and processes for the production of NAP-2, B-TG, CTAP-III és PBP) a leírásban 16. számú szekvenciaként azonosítjuk.

A „szelektíven hibridizálódik” kifejezés a leírásban arra utal, hogy nukleinsav-molekulák megfelelően sztringens hibridizációs körülmények között képesek hibridizálódni, duplexet képezni vagy lényegében csak egymáshoz kötődni, ha előre meghatározott szekvenciákkal rendelkező molekulák (azaz második polipeptid) jelen vannak a DNS- vagy RNS-



preparátumban. Nukleinsavmolekulák tervezése és összehibridizálási körülmények tárgyalása céljából, lásd például Sambrook és munkatársai, „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (2. kiadás), 1-3. rész, Cold Spring Harbor Laboratory (1989); vagy „Current Protocols in Molecular Biology”, szerk. F. Ausubel és munkatársai, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987).

„Sztringens hibridizációs körülmények” kifejezést a leírásban szakember által általánosan ismert jelentésében alkalmazzuk. Szakember által ismert módszer szerint, megfelelően sztringens körülmények olyanok, amelyek például 6 x nátrium-klorid/nátrium-citrát (SSC) oldatban, mintegy 45°C-on elősegítenek nukleinsav-hibridizációt. Az alábbi példák megtalálhatók „Current Protocols in Molecular Biology” című könyvben [John Wiley & Sons, NY (1989), 6.3.1.-6.3.6.]: 50 ml, első alkalmas hibridizációs oldat elkészítéséhez összekeverünk 24 ml formaldehidet, 12 ml 20 x SSC-t, 0,5 ml 2 M Tris-HCl pH 7,6, 0,5 ml 100 x Denhardt-féle oldatot, 2,5 ml ionmentes vizet, 10 ml 50%-os dextrán-szulfátot és 0,5 ml 10%-os SDS-t. Egy második alkalmas hibridizációs oldat 1% kristályos BSA-t (V. frakciót), 1 mM EDTA-t, 0,5 M Na₂HPO₄-et (pH 7,2) és 7% SDS-t tartalmazhat. A sókoncentrációt a mosási lépésben választhatjuk kismértékben sztringens körülményektől (mintegy 2 x SSC 50°C-on) nagymértékben sztringens körülményekig (mintegy 0,2 x SSC 50°C-on). Mindkét esetben a mosóoldat 0,1% SDS-t tartalmazhat. Továbbá, a hőmérsékletet a mosási lépésben meg lehet emelni kismértékben sztringens körülményekről (szobahőmérséklet, mintegy

22°C) nagymértékben sztringens körülményekre (mintegy 65°C). Az idézett hivatkozások megadnak több részletet, de a megfelelő mosási sztringencia a homológia fokától és a próba hosszától függ. Ha a homológia 100%, magas hőmérsékletet (65°C-tól 75°C-ig) alkalmazhatunk. Ha a homológia alacsony, alacsony mosási hőmérsékleteket szabad alkalmazni. Azonban, ha a próba nagyon rövid (<100 bp), alacsony hőmérsékleteket kell alkalmazni, még 100%-os homológia esetén is. Általában alacsony hőmérsékleteken (37°C és 40°C között) kezdjük a mosást, és a hőmérsékletet 3-5°C-os intervallumonként emeljük, amíg a háttér elég alacsony, hogy ne zavarja az autoradiográfiát.

A találmány tárgyát képezi bármennyi kiméra csontstimuláló faktor, amelyeket úgy állítunk elő, hogy a találmány szerinti polipeptidek aminosav-szekvenciáit tartalmazzák.

A találmány tárgya másik vonatkozásában hatóanyagként találmány szerinti bármilyen polipeptidet vagy polipeptideket tartalmazó ágens csont leépülésével kapcsolatos betegség prevenciójára és kezelésére való alkalmazásra.

A találmány tárgyát képezi a polipeptid vagy polipeptidek alkalmazása gyógyszer előállítására, csont növekedésének elősegítésére vagy csonttritkulás kezelésére történő alkalmazásra.

A találmány tárgyát képezi ellenanyag, amely a 11., 12. vagy 13. azonosítószámú aminosav-szekvenciából vagy konzerватívan szubsztituált variánsaiból álló polipeptid alkalmazásával lett szintetizálva.

Az 1. ábrán grafikusan szemléltetjük az ásványi anyag csontba való megfigyelt beépülési sebességeit ($\mu\text{m}/\text{nap}$) olyan patkányokban, amelyeket kémiailag szintetizált, 17. (második oszlop) és 18. (harmadik oszlop) azonosítószámú szekvenciával rendelkező polipeptiddel oltottunk, kontroll-hoz (első oszlop) viszonyítva. A hibából adódó szórás ± 1 S.E.

A 2. ábrán grafikusan szemléltetjük az ásványi anyag csontba való beépülési sebességeinek ($\mu\text{m}/\text{nap}$) dóziszfüggését, melyet olyan patkányokban találtunk, amelyeket jelölt mennyiségű, 18. (harmadik oszlop) azonosítószámú szekvenciával rendelkező polipeptiddel oltottunk. A hibából adódó szórás ± 1 S.E.

A 3. ábrán bemutatjuk a tesztelt polipeptidek aminosav-szekvenciáját, a megfelelő aminosavakat egymás alá rendezve, az aktív peptideket fölöttük húzott vonallal jelöltük, és azokat a szekvenciákat, amelyekről azt találtuk, hogy nem stimulálnak csontnövekedést, alattuk húzott vonallal jelöltük. A megközelítő molekulatömegeket a szekvenciaazonosító számok alatt mutatjuk.

Az 1., 2., 11., 12. és 13. azonosítószámú szekvenciákkal rendelkező polipeptidekről korábban azt találták, hogy csontnövekedést stimulálnak.

Kísérleteket végeztünk abból a célból, hogy meghatározzuk, a 17. és 18. azonosítószámú szekvenciákkal rendelkező polipeptidek rendelkeznek-e csontstimuláló aktivitással. A polipeptideket kémiailag szintetizáltuk szakember által ismert, standard módszerek szerint. A 12. azonosítószámú

szekvenciákkal rendelkező polipeptid, amelyről korábban kimutatták, hogy csontnövekedést stimuláló aktivitással rendelkezik, két plazmin-peptidáz hasítóhelyet tartalmaz a lizin-treonin és lizin-aszparagin között, sorrendben.

Kilenc, nőtény, Sprague-Dawley-féle patkányt (átlagos tömegük mintegy 300 g) három csoportra osztottunk, amelyek egyenként 3-3 patkányból álltak. Az első, kontroll csoportban minden patkányt 400 µl puffer-oldattal (50 mM nátrium-acetát, pH-ja 4,5-re állítva), közvetlenül ezután 200 µl, 1 M tetraciklin-hidroklorid-oldattal oltottunk. Minden oldatot intramuszkulárisan adtuk be a jobb farizomba. A második csoportban lévő patkányokat hasonlóan oltottuk 400 µl pufferrel, amely 100 nmol, 17. azonosítószámú szekvenciával rendelkező, kémiaailag szintetizált polipeptidet tartalmazott, közvetlenül ezután 200 µl, 1 M tetraciklin-hidroklorid-oldattal oltottunk. A második csoportban lévő patkányokat 400 µl pufferrel oltottuk, amely 100 nmol, 18. azonosítószámú szekvenciával rendelkező, kémiaailag szintetizált polipeptidet tartalmazott, közvetlenül ezután 200 µl, 1 M tetraciklin-hidroklorid-oldattal oltottunk.

Mintegy 48 óra múlva egy második dózis tetraciklin-oldatot adtunk be minden egyes patkánynak. Mintegy további 24 óra múlva a patkányokat szén-dioxidos nekrozissal elpusztítottuk.

A jobb combcsont (femur) alsó metafízisének metszeteit alkalmaztuk az ásványi anyag csontba való beépülési sebességének mérésére. Közvetlenül a boncolás után csontmintát 10% formaldehid-oldatban (pH 7,4) fixáltuk. Később, ugyane-

zen a napon a formaldehid-oldatot kicseréltük 1:1-arányú víz-aceton-oldatra. Ezt a következő napon kétszer cseréltük acetonnal. Ezt a következő napon kicseréltük 1:1-arányú aceton/Spurr-féle tápközeg oldatára, melyet később, ugyanezen a napon kicseréltünk Spurr-féle tápközegre. A következő napon az egyes mintákat frissen cserélt Spurr-féle tápközegbe tettük, és 60°C-on, 24 óra hosszáig kezeltük, azután 80°C-on, 24 óra hosszáig kezeltük.

Az egyes kezelt blokkokat 400 µm vastagságú szeletekre vágtuk, fűrészkes mikrotóma (Leitz) alkalmazásával, amely gyémántbetétes vágólappal volt felszerelve. A viszonylag vékony szeleteket őrléssel tovább vékonyítottuk mintegy 10 µm végső vastagságra, két üveg őrlőlap között, melyek karborundum-porral voltak előérdesítve. A vékony szeleteket megszárítottuk és festés nélkül Permount-ban (Fisher) montíroztuk.

A méréseket pásztázó fénymikroszkópos fotométer (MPV-CD, Leitz) alkalmazásával végeztük, a metszetek 16 X nagyítással, a PCT/CA94/00144. számú nemzetközi közzétételi iratban leírtak szerint. Az így kapott eredményeket bemutatjuk az 1. ábrán.

1. táblázat: Csont átlagos felépülési sebességeinek ($\mu\text{m}/\text{nap}$) összehasonlítása különböző csoportokban, amelyeknek 17., 18. azonosítószámú szekvenciával (az.sz.szek.) rendelkező polipeptideket vagy kontroll-oldatokat adtunk

	<i>Kontroll</i>	17. az.sz.szek.	18. az.sz.szek.
Átlag	1.256 $\mu\text{m}/\text{nap}$	1,859 $\mu\text{m}/\text{nap}$	2,406 $\mu\text{m}/\text{nap}$
S.E.	0,06	0,10	0,25
N	3	3	3

Egy másik kísérletsorozatban az ásványi anyag csontba való, mért beépülési sebességének dóziszfüggését értékeltük ki, a 18. azonosítószámú szekvenciával rendelkező polipeptid mennyiségének függvényében. Huszonnyolc nőtény, Sprague-Dawley-patkányt (átlagos testtömegük mintegy 300 g) elosztottunk hét csoportra, amelyekbe egyenként 4-4 patkány került. A patkányokat az előző kísérletsorozatban leírtak szerint kezeltük, kivéve azt, hogy a tesztelt polipeptid mennyisége az alábbiak szerint változott: 25, 50, 100, 200, 400 és 800 nmol. Az eredményeket bemutatjuk a 2. táblázatban és a 2. ábrán.

2. táblázat: Csont felépülési sebességének ($\mu\text{m}/\text{nap}$) dózisfüggése 18. azonosított számú polipeptid mennyiségétől							
	Kontroll	25 nmol	50 nmol	100 nmol	200 nmol	400 nmol	800 nmol
Átlag	1,320	1,686	1,753	1,907	2,209	2,123	2,139
S.E.	0,04	0,08	0,03	0,03	0,08	0,06	0,03
N	4	4	4	4	4	4	4

2. táblázat: Csont felépülési sebességének ($\mu\text{m}/\text{nap}$) dózisfüggése 18. azonosított számú polipeptid mennyiségétől							
	Kontroll	25 nmol	50 nmol	100 nmol	200 nmol	400 nmol	800 nmol
Átlag	1,320	1,686	1,753	1,907	2,209	2,123	2,139
S.E.	0,04	0,08	0,03	0,03	0,08	0,06	0,03
N	4	4	4	4	4	4	4



Amint grafikusan bemutatjuk az 1. ábrán, védett amino- és karboxi-terminálissal rendelkező, NAP-2V-(15-22) (18. azonosítószámú szekvencia) nagyobb mértékű csontstimuláló aktivitással rendelkezik, mint a hasonlóan védett NAP-2V-(13-26; gln²⁵→glu²⁵) (17. azonosítószámú szekvencia).

NAP-2V-(15-22) vagy NAP-2V-(13-26; gln²⁵→glu²⁵) szekvenciák közül egyikben sem található cys¹⁰ és cys¹². Az összes ilyen NAP-2V-alszekvenciából hiányzik a szülői NAP-2V-ben megtalálható cys³⁶ és cys⁵². Lehet, hogy NAP-2V-(10-26), NAP-2V-(11-26) és NAP-2V-(12-26) csökkent aktivitása spontán intramolekuláris diszulfid-kötésre vezethető vissza, amely megakadályozza a csontstimuláló hatáshoz szükséges polipeptid-receptor-kölcsönhatást, de ez még teljes bizonyossággal nem ismeretes.

A NAP-2V-(13-26; gln²⁵→glu²⁵) szekvenciája eltér a megfelelő NAP-2V-alszekvenciától a 25. helyzetben, glutaminsav van glutamin helyett. Természetesen várható, hogy a glutamint tartalmazó alszekvencia, ahogyan NAP-2V-ben előfordul, szintén képes csontnövekedést stimulálni emlősszervezetekben.

Kiindulási feltétel, hogy NAP-2 két belső diszulfid-kötést tartalmazzon Cys-5 és Cys31, valamint Cys-7 és Cys-47 között, sorrendben (Baggiolini, M., Clemetson, K. J., Walz, A., PCT/EP89/01389. számú nemzetközi közzétételi irat, közzétéve 1990. június 14., WO90/06321. számon). Tágabb értelemben, a találmány szerinti szekvenciák és alszekvenciák, amelyek tartalmazzák a megfelelő ciszteineket, valószínűleg hasonló kötéseket tartalmaznak.



Természetesen nyilvánvaló, anélkül, hogy ezzel bármit is korlátozni kívánnánk, hogy sokféle más aminosav-szubsztitúcióra van lehetőség, miközben megmarad a találmány szerinti, NAP-2V-alszekvencia csontstimuláló hatásáért felelős struktúra. Konzervatív szubsztitúciókat a szabadalmi irodalomban leírtak, például az 5,264,558. számú USA-beli szabadalmi leírásban. Tehát várakozások szerint, például apoláros alifás semleges aminosavak, például glicin, alanin, prolin, valin és izoleucin között lehetséges a csere. Ehhez hasonlóan, poláros alifás semleges aminosavak, szerin, treonin, metionin, aszparagin és glutamin között lehetségesek szubsztitúciók. Töltött, savas aminosavak, aszparaginsav és glutaminsav között valószínűleg lehetségesek szubsztitúciók, mint ahogyan töltött bázikus aminosavak, lizin és arginin között lehetségesek szubsztitúciók. Aromás aminosavak között, például fenilalanin, hisztidin, triptofán és tirozin között valószínűleg szintén lehetségesek szubsztitúciók. Szubsztitúciók és egymás közötti cserék ilyen csoportosítása szakember számára ismert. Más szubsztitúciók szintén lehetségesek. Olyan aminosav-szekvenciát tartalmazó peptid, amely a 17. vagy 18. azonosítószámú szekvencia alá rendezhető, és azzal 100%-nál kisebb homológiával rendelkezik, legalább részben megtarthatja annak csontstimuláló aktivitását. Természetesen az is várható, hogy nagyobb százalékos homológia, mondjuk 70%, 80%, 90%, vagy több, megnövelheti a megtartott csontstimuláló aktivitás mértékét.



„Szekvencia azonosság és homológia” kifejezés a leírásban két polipeptid-molekula közötti vagy két nukleinsav-molekula közötti hasonlóság. Ha például egy pozíciót mindkét, összehasonlított polipeptid-szekvenciában ugyanaz az aminosav foglal el (például, ha mindkét polipeptid-molekulában egy pozícióban alanin van), akkor a molekulák homológok vagy a szekvenciák azonosak ebben a pozícióban. A két molekula közötti százalékos homológia vagy a két szekvencia közötti százalékos szekvencia-azonosság ilyen, a két szekvenciában megegyező pozíciók számának a függvénye, elosztva az összehasonlított összes pozíció számával $\times 100$. Például, ha a két szekvenciában 10 közül 6 pozíció megegyezik, akkor a két 60%-ban homológ vagy 60%-ban szekvencia-azonos. Például a METLIA és MPTWIF polipeptid-szekvenciák 50%-ban homológok vagy szekvencia-azonosak. Általában az összehasonlításhoz a két szekvenciát úgy rendezzük egymás alá, hogy az maximális homológiát adjon.

Szekvenciák összehasonlítását és két szekvencia közötti százalékos homológia meghatározását matematikai algoritmus alkalmazásával lehet elvégezni. Az egymás alá rendezést két módszerrel végezhetjük, a Clustal-módszerrel és a J. Hein-módszerrel. Ezek közül a Clustal-módszert részesítjük előnyben.

A Clustal-algoritmus (az itt alkalmazott szoftver rendelkezésre áll a DNASTAR Inc. cégnél, 1228 South Park Street, Madison, Wisconsin, USA, 1994) alkalmazása olyan szekvenciák egymás alá rendezéséhez ajánlott, amelyek hasonlósága nem szükségszerűen evolúciós. Az algoritmust Higgins,

D. G. és munkatársai írták le [CABIOS 5, 151 (1989)]. Ugyanilyen szoftver-programot biztosít szekvenciák egymás alá rendezésére a Jotun Hein módszer, amely nagymértékben kifejlett családokhoz tartozó, olyan szekvenciák egymás alá rendezéséhez ajánlott, amelyek nyilvánvaló evolúciós rokonságban vannak. Az algoritmust Hein, J. írta le [Methods I Enzimology 183, 626 (1990)]. A programot alapbeállításokkal (standard paraméterekkel) alkalmazzuk. Aminosavak evolúciós szubsztitúciós mintázatok, töltés, strukturális és kémiai hasonlóság alapján történő súlyozása esetén PAM250 alapbeállítást alkalmazunk. Fehérjék egymás alá rendezése esetén, páronkénti egymás alá rendezésre alkalmazott paraméterek: „Ktuple” = 1, „Gap penalty” = 3, „Window” = 5 és „Diagonals Saved” = 5.

Amennyiben egy vagy több aminosav delécióját tekintjük, valószínű, hogy bármely szekvencia végeiről kis számú aminosav deléciójára van lehetőség, emlékezve arra a megfigyelésre, hogy azok a deléciók, amelyekkel a 14. és 15. azonosítószámú szekvenciákhoz jutottunk, olyan polipeptideket eredményeztek, amelyek nem fokozták a csontnövekedés mértékét.

Nagyon valószínű, hogy lehetséges aminosavak addíciója a szekvencia végeihez, és a deléciókhoz hasonlóan, szimmetrikus vagy közel szimmetrikus addíciókra is van lehetőség csontstimuláló aktivitással rendelkező szekvencia karboxi- és amino-terminálisához.

A találmány szerinti polipeptid javítható proteázok jelenléte miatt, a testben bekövetkező, esetleges lebomlásá-

nak vonatkozásában, például a polipeptid C-terminálisának, N-terminálisának, vagy a C-terminális és N-terminális egyidejű védelmével.

A leírásban „védett” terminális aminocsoport kifejezés olyan terminális (N-terminális) aminocsoportra utal, amely peptidszintézisben alkalmazható, különféle amino-terminális védőcsoportok bármelyikéhez kapcsolódik. Alkalmas csoportok lehet például bármilyen acil-védőcsoport, például formil, acetil, benzoil, trifluoracetil, szukcinil vagy metoxiszukcinil; aromás uretán-védőcsoportok, például benzoiloxi-karbonil; és alifás uretán-védőcsoportok, például t-butoxi-karbonil vagy adamantiloxi-karbonil [szerk. Gross és Mienhofer, "The Peptides", 3. rész, 3-88. old., Academic Press, New York (1981)].

A leírásban a „védett” terminális karboxil-csoport kifejezés olyan terminális (C-terminális) aminocsoportra utal, amely peptidszintézisben alkalmazható, különféle karboxi-terminális védőcsoportok bármelyikéhez kapcsolódik. Szakember számára nyilvánvaló, hogy alkalmas csoportok lehetnek például t-butil, benzil vagy más elfogadható csoportok, amelyek a terminális karboxilcsoporthoz észter- vagy éterkötésen keresztül kapcsolódnak.

A találmány tárgyát képező vegyületeket kémiaiilag lehet szintetizálni, szakember által ismert módszerekkel, például szilárd fázisú peptidszintézissel. A szintézist a peptid karboxi-terminálisánál végénél kezdik α -amino-védett aminosav alkalmazásával. Terc-butiloxi-karbonil (Boc) védőcsoportokat vagy más, alkalmas védőcsoportokat lehet alkalmaz-



ni [Stewart és mtsai., "Solid-Phase Peptide Synthesis", W. H. Freeman Co., San Francisco (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154 (1963); Vale és mtsai., Science 213, 1394-1397 (1981); és Marke és mtsai., J. Am. Chem. Sci. 103, 3178 (1981)]. Leírtak szintetikus módszereket is [szerk. M. Bodansky, "Principles of Peptide Synthesis", Springer-Verlag (1984)]. Ezeket és más, peptidszintézisre szolgáló példákat leírnak a 3,862,925, 3,842,067, 3,972,859, 4,105,602, 4,683,291, 4,244,946 és 4,305,872. számú USA-beli szabadalmi leírásban.

A vegyületeket manuális vagy automatizált technikák alkalmazásával is lehet szintetizálni, például Applied BioSystems 430A peptidszintetizátor (Foster City, California), vagy Biosearch SAM 11 automata peptidszintetizátor (Biosearch, Inc., San Rafael, California) alkalmazásával.

Polipeptidből „származó” vegyületen értünk konkrét aminosav-szekvenciával rendelkező, bármilyen olyan molekuláris entitást, amely azonos, lényegében homológ, vagy más módon funkcionálisan vagy strukturálisan ekvivalens a polipeptiddel. Tehát, egy adott polipeptidből származó molekula rendelkezhet a polipeptid, a polipeptid bármilyen részének, vagy más olyan molekuláris entitás aminosav-szekvenciájával, amely csontnövekedés stimulátoraként képes működni. Ilyen kötődomból származó molekula mimetizálja azt a polipeptidet, amelyből az származik. Ilyen molekuláris entitások lehetnek peptidmimetikumok és hasonlóak.

A „peptidmimetikumok” olyan struktúrák, amelyek peptid helyettesítésére szolgálnak akceptormolekulákkal való

kölcsönhatásban [lásd például Morgan és mtsai., Ann. Reports Med. Chem. 24, 243-252 (1989), összefoglaló irodalom peptidmimetikumokról]. A leírásban peptidmimetikumokon szintetikus struktúrákat értünk, amelyek aminosavakat és/vagy peptidkötéseket tartalmazhatnak vagy nem tartalmazhatnak, de megtartják olyan peptidek strukturális és funkcionális tulajdonságait, amelyekből származnak. A „peptidmimetikumok” kifejezésen értünk peptoidokat és oligopeptoidokat, amelyek N-szubsztituált aminosavakból származó peptidek vagy oligomerek [Simon és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9367-9371 (1972)]. Peptidmimetikumok közé tartoznak továbbá peptidkönyvtárak, amelyek adott aminosav-hosszúságú peptidekből álló, tervezett peptid-gyűjtemények, és minden ezeknek megfelelő, elképzelhető aminosav-szekvenciát tartalmaznak.

Két polipeptid-szekvencia „lényegében homológ”, ha a nukleotidok vagy aminosavak legalább mintegy 85%-a (előnyösen legalább mintegy 85%-90%-a, és legelőnyösebben legalább mintegy 95%-a) egyezik egy meghatározott hosszúságú polipeptid-szakaszon. A leírásban a „lényegében homológ” kifejezés olyan szekvenciákra is utal, amelyek a specifikált polipeptid-szekvenciával azonosságot mutatnak.

A találmány szerinti csontstimulátor aktivitással rendelkező polipeptideket strukturálisan és funkcionálisan mimetizáló peptidmimetikumokat is alkalmazhatjuk a találmány szerinti megoldásban, és előállíthatjuk azokat az alábbi stratégiákat és eljárásokat követve. Mimetikumokat általában L-aminosavak D-aminosavakra való szisztematikus cseré-

jével, oldalláncok metil-csoportra vagy eltérő elektronikus tulajdonságokkal rendelkező pszeudoizosztérikus csoportokra való cseréjével [lásd Hruby és mtsai., *Biochem. J.* 268, 249-262 (1990)], és a fentebb leírt peptidinhibitorokban peptidkötések amidkötésekre való szisztematikus cseréjével nyert információk alapján tervezünk. Például amidkötést tartalmazó helyettesítő analógokat lehet alkalmazni a peptid szerkezete és funkciója közötti összefüggések vizsgálatára, például a vázban lévő forgási szabadság, intra- és intermolekuláris hidrogénhid-kötések mintázatainak, lokális és az egész molekulát érintő polaritás és hidrofobicitás módosításának és orális biológiai hozzáférhetőség vizsgálataira.

Lokális konformációs korlátozásokat is bevihetünk csontstimulátor aktivitással rendelkező, potenciális peptidmimetikum aktivitásához szükséges konformációs igények meghatározása céljából. Például β,β -elhelyezkedésű aminosavakat alkalmazhatunk konformációs korlátok peptidaktivásra kifejtett hatásainak vizsgálatára [lásd például Manning és mtsai., *J. Med. Chem.* 25, 408-414 (1982); Mosberg és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 506-512 (1983); Pelton és mtsai., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 23-239 (1985)].

A mimetikumok tartalmazhatnak izosztérikus amidkötéseket, például $\Psi[\text{CH}_2\text{S}]$, $\Psi[\text{CH}_2\text{NH}]$, $\Psi[\text{CNH}_2]$, $\Psi[\text{NHCO}]$, $\Psi[\text{COCH}_2]$ és $\Psi[(\text{E}) \text{ vagy } (\text{Z}) \text{ CH}=\text{CH}]$, összefoglaló irodalomként lásd Spatola, "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins", VII. kötet (1983), szerk.

Weinstein, Marcel Dekker, New York, 267-357. old. A szintetikus molekulák tartalmazhatnak D-aminosavakat visszakanyarodó konformációk stabilizálására vagy elősegítésére, és a molekula enzimes lebomlásával szembeni stabilizálásának ki segítése céljából [lásd például Freidinger és mtsai., "Peptides: Structure and Function", szerk. Deber és mtsai., Pierce Chem. Co., Rockford, III., 549-552. old.; Sawyer és mtsai., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5754-5758 (1980); Torchiana és mtsai., Arch. Int. Pharmacol. Ther. 235, 170-176 (1978)]. Ciklikus aminosav-analógokat alkalmazhatunk annak akadályozása céljából, hogy aminosavak felvegyenek adott konformációs állapotokat, például $\alpha\alpha'$ - és $\beta\beta'$ -szubsztituált, ciklikus aminosavakat, például 1-aminociklopentán-karbonsav (ciklroleucin) és β,β -ciklopentametilén- β -merkaptopropionsavat [lásd Hruby és mtsai., mint fent].

A mimetikumok olyan szekunder polipeptid-struktúrát/-struktúrákat mimetizálhatnak, amelyek aminosavak 3-dimenziós orientációját képesek modellezni ismert szekunder fehérje-konformációkba, például β -kanyart képesek mimetizálni, ilyen a fenoxatin-gyűrűrendszer, és β -lemezt képesek mimetizálni, ilyenek az epindolidion-struktúrák. Leírták α -hélixet indukáló templát tervezett szintézisét és konformációs analízisét [Kemp és mtsai., Tetrahedron Lett. 29, 4931 (1988); Kemp és mtsai., Tetrahedron Lett. 29, 4935 (1988)].

Potenciális mimetikumot tesztelni vagy előszkrínelni lehet potenciális aktivitására mint csontstimuláló vegyületet úgy, hogy a vegyület affinitását mérjük olyan polipeptid ellen termeltetett ellenanyag irányában, amely-

ből a mimetikum származott. Fentebb, a polipeptidekre leírtak szerint, azok a mimetikumokat, amelyek pozitívan reagálnak a már ismert peptid ellen termeltetett ellenanyaggal, ezután csontstimuláló hatásokra lehet *in vivo* tesztelni, a leírásban például patkányokra leírt rendszer alkalmazásával. A 9. azonosítószámú aminosav-szekvenciával rendelkező polipeptid ellen termeltetett ellenanyagok különösen alkalmasak ebben a vonatkozásban.

A leírásban megtalálható a peptoid kifejezés is. A peptoidok N-szubsztituált aminosavak oligomerjei [Simon és mtsai., mint fent (1972)], és olyan új molekulákat tartalmazó, kémiaailag sokszínű könyvtárak előállítására lehet azokat alkalmazni motívumként, amelyeket azután kötésre vagy csontstimuláló aktivitás tesztelésére lehet alkalmazni. A monomerek bevihetnek t-butyl-alapú oldalláncot és 9-fluorenil-metoxi-karbonil α -amin-védelmet. A peptoid-monomerek oligomerizációját végrehajthajuk például benzotriazol-1-iloxitris(pirrolidino)-foszfónium vagy bróm-trisz-(pirrolidino)-foszfónium-hexafluor-foszfát *in situ* aktiválásával. A többi lépés megegyezik a szokásos peptidszintézisben alkalmazott lépésekkel α -(9-fluorenil-metoxi-karbonil)-aminosavak alkalmazásával. Oligopeptoidokat úgy lehet azonosítani, hogy összemérhető aktivitásokkal rendelkeznek a megfelelő polipeptidekhez, és így potenciálisan csontstimuláló ágensként alkalmazhatók.

Ilyeneket tartalmazó, találmány szerinti vegyületeket és készítményeket számos terápiás és profilaktikus alkalmazásban használhatunk, csont leépülésével kapcsolatos beteg-

ség prevenciójára és kezelésére. A vegyületeket tehát csont növekedését elősegítő kezelésként bármilyen alkalmas módon beadhatjuk, például csontritkulás kezelése során. Az előnyös beadási módok alkalmasak polipeptid-típusú vegyületek célba juttatására az alany véráramába, szem előtt tartva a polipeptidekre előírt, megfelelő tárolási és kezelési körülményeket, például azokat, melyeket a leírásban megemlítettünk.

Tehát a találmány tárgyát képezik a találmány szerinti vegyületek hatásos mennyiségét tartalmazó készítmények is, például azok nem-toxikus addíciós sói, amidjai vagy észterei, amelyek egymagukban a fentebb leírt, jótékony hatású kezelés biztosítására szolgálhatnak. Ilyen készítményeket elállíthatunk úgy is, hogy a hatóanyagot fiziológiailag tolerálható folyadékkal, géllel vagy szilárd hígítószerekkel, adjuvánsokkal vagy segédanyagokkal együtt tartalmazzák.

A fenti példákban, amelyekben NAP-2V-alszekvenciákat alkalmazunk, mintegy 75 nmol polipeptidet adunk be testtömeg-kg-ként az állatnak. A gyakorlatban, különösen, ha az alany ember, a napi dózis 0,01 és 300 mg/testtömeg-kg közötti vagy nagyobb mennyiség. A dózis előnyösebben mintegy 0,1 és mintegy 30 mg/testtömeg-kg közötti mennyiség közelében van. A beadás előnyös gyakorisága lehet több vagy kevesebb napi egyszeri alkalomnál, amely a beadás módjától, kényelmi szempontoktól, a kezelési hatékonyság beadási gyakoriságtól függő változásaitól és a beadásonként alkalmazott mennyiségtől függ. A beadott dózis függ az alanytól is, és attól, hogy a beadás milyen hatást vált ki. Bármelyik vagy

több beadott vegyület dózisa sok faktortól függ, például az alkalmazott konkrét vegyülettől vagy vegyületek kombinációjától, a beadás módjától és a kezelendő emlősszervezettől. Egy adott vegyületet vagy vegyületek kombinációját tartalmazó dózisokat szokásos megfontolások alapján lehet meghatározni; például a vizsgált vegyületek és ismert ágensek differenciális aktivitásainak szokásos összehasonlításával, amely megfelelő farmakológiai eljárás alkalmazásával történik, amelyben például a csontsűrűséget mérjük a idő függvényében.

Gyógyszerkészítmények bármilyen vegyületet tartalmazhatnak injektálható oldatként elkészítve, például közvetlenül felhasználás előtt preparált, injektálható oldatot csontnövekedés elősegítésére és/vagy csontritkulás kezelésére. Injektálható lehet bármilyen folyékony oldat vagy szuszpenzió; szilárd formák is, amelyekből folyadékot lehet preparálni az injektálás előtt oldat vagy szuszpenzió formájában. A készítményt emulgeálni is lehet. Az aktív polipeptidet gyakran keverik hígítószerrel és kötőanyagokkal, amelyek fiziológiásan tolerálhatók és kompatibilisek a polipeptiddel. Alkalmas hígítószer és kötőanyag lehet például víz, nátrium-klorid-oldat, dextróz, glicerin és hasonló, és ezek kombinációi. Továbbá, kívánt esetben a készítmények tartalmazhatnak kisebb mennyiségű segédanyagokat, például nedvesítő vagy emulgeáló ágenseket, stabilizáló vagy pH-pufferelő ágenseket és hasonlókat.

Gyógyászati készítményekben a vegyületeket szokásos kötőanyagokkal keverve alkalmazzuk, azaz olyan gyógyászatilag

elfogadható szerves vagy szervetlen hordozó anyagokkal, amelyek nem reagálnak a vegyületekkel úgy, hogy károsítanák azokat, és amelyek valószínűleg fokozzák a vegyületek tárolási és kezelési stabilitását. A preparatív eljárásban sterilizálhatjuk a gyógyászati készítményeket. A vegyületeket keverhetjük segédágenszekkel, például síkosítószerrel, tartósítószerrel, stabilizátorokkal, ozmotikus nyomást befolyásoló sókkal, stb., amelyek nem reagálnak a vegyületekkel úgy, hogy károsítanák azokat.

A készítményeket szokásos módon parenterálisan injekcióval, például szubkután vagy intravénásan adjuk be. További gyógyszerformák, amelyek más beadási módszerekben alkalmazhatók, például kúpok, intranazális aeroszolok, és néhány esetben orális formák. Kúpok esetén alkalmazott hagyományos kötőanyagok és segédanyagok lehetnek például polialkilén-glikolok vagy trigliceridek; ilyen kúpokat készíthetünk 0,5% és 10% közötti, előnyösen 1% és 2% közötti hatóanyagot tartalmazó keverékből. Orális formákban normális esetben alkalmazott kötőanyag például mannit, laktóz, keményítő, magnézium-sztearát, nátrium-saccharin, cellulóz, magnézium-karbonát és hasonlóak. Ezek a formák lehetnek oldatok, szuszpenziók, tabletták, pirulák, kapszulák, késleltetett felszabadulást biztosító formák, vagy porok, és 10%-95%, előnyösen 25%-70% hatóanyagot tartalmaznak. Ezek az orális formák lehetnek olyan formák, amelyeket úgy terveznek, hogy a peptid védve legyen, amíg abszorbeálódik.

A peptidvegyületeket a készítményekben semleges vagy só-formákra lehet hozni. Gyógyászatiilag elfogadható nem-

toxikus sók lehetnek sav-addíciós sók (szabad aminocsoportokkal képződnek), amelyek szervetlen savakkal, például sósavval vagy foszforsavval képződnek, vagy szerves savakkal, például ecetsavval, oxálsavval, borkősavval, mandulasavval és hasonlókkal képződnek. Szabad karboxicsoporttal rendelkező sókat szervetlen bázisokkal, például nátrium-, kálium-, ammónium-, kalcium- vagy vas-hidroxiddal, és szerves bázisokkal, például izopropilaminnal, trimetilaminnal, 2-etil-amino-etanollal, hisztidinnel, prokainnal és hasonlókkal lehet származtatni.

A találmány szerinti vegyületeket homopolimerizálni lehet önmagukkal (azaz peptid_n), vagy heteropolimerizálni lehet egy másikkal. A vegyületeket biológiailag kompatibilis polimervegyületekhez is, például BIOPOLTM-hoz (WR Grace & Co., Conn.) lehet konjugálni.

Ha rekombináns technikákkal állítjuk elő azokat, a találmány szerinti, kívánt polipeptidet kódoló DNS-szekvenciát standard, automatizált technikák alkalmazásával lehet szintetizálni, vagy a kódoló szekvenciákhoz vagy annak részleteihez cDNS- vagy genomi könyvtárakból lehet hozzájutni. Ezt a DNS-t alkalmas expressziós vektorokba ligáljuk, és ezeket a vektorokat megfelelő gazdaszervezetekbe transzformáljuk. Különféle expressziós vektor/gazdaszervezet-rendszereket lehet alkalmazni, például prokarióta és eukarióta tenyésztő rendszereket egyaránt.

A prokariótákat leggyakrabban különféle *E. coli* törzsek képviselik. Azonban más mikroorganizmus-törzseket is lehet alkalmazni, például *Bacillus* nemzetséghez tartozó törzse-

ket, például *Bacillus subtilis*, különböző *Pseudomonas*-fajokat, vagy más baktériumtörzseket. Ilyen prokarióta-rendszerekben, replikációs origót és szabályzó szekvenciákat tartalmazó plazmidvektorok olyan fajból származnak, amely kompatibilis az alkalmazott gazdaszervezettel. Például *E. coli*t tipikusan pBR322 származékaival transzformálunk, amely *E. coli* fajokból származó plazmid [Bolivar és mtsai., *Gene* 2, 95 (1977)]. Általánosan alkalmazott, prokarióta szabályzó szekvenciák, amelyeket a leírásban definiálunk, például promóterek a transzkripció iniciálására, adott esetben operátorral, riboszóma-kötőhely szekvenciáival, ilyen általános alkalmazott promóter például β -laktamáz (penicillináz), laktóz (*lnc*) promóterrendszerek [Chang és mtsai., *Nature* 198, 1056 (1977)], triptofán (*trp*) promóterrendszer [Goeddel és mtsai., *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1990)] és a lambda-származék P_L -promóter és N-génből származó riboszóma kötőhely [Shimatake és mtsai., *Nature* 292, 128 (1981)]. Azonban bármilyen rendelkezésre álló, prokariótákkal kompatibilis promóterrendszert lehet alkalmazni.

A találmány szerinti eukarióta rendszerekben alkalmazható expressziós rendszerek megfelelő eukarióta génekből származó promótereket tartalmaznak. Élesztőben alkalmazható promóterek például glikolitikus enzimek szintézisében szerepet játszó promóterek, például alkohol dehidrogenáz promóterei, glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz promóterei [Holland & Holland, *J. Biol. Chem.* 25, 2596 (1980)], alfa-faktor promótere [Bitter és mtsai., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 81, 5330 (1984)], gal-promóter [Johnston & David, Mol. Cell. Biol. 4, 1440 (1984)], 3-foszfoglicerát kináz promótere [Hitzeman és mtsai., J. Biol. Chem. 256, 1385 (1980)] vagy YEp13-ból származó Leu2-gén promótere [Broach, J. és mtsai., Gene 8, 121 (1978)].

Alkalmas, emlősszervezetben működő promóterek lehetnek SV40-ből származó korai és késői promóterek [Fiers és mtsai., Nature 273, 113 (1978)] vagy más virális promóterek, például poliómából, adenovírus-II-ből, marhaeredetű papillomavírusból vagy majomeredetű szarkómavírusból származó promóterek. Alkalmas virális és emlősszervezetből származó enhanszereket fentebb idéztünk. Növényi sejtek esetén alkalmazott expressziós rendszerben nopalin szintetáz promótere megfelelő [Depicker, A. és mtsai., J. Mol. Appl. Gen. 1, 56 (1982)].

Az expressziós rendszerek replikációs vektorokban találhatóak, vagy rekombináns gazdaszervezet kromoszómájába vannak integrálva. Olyan rendszerek esetén, amelyekben a vektorok replikációs rendszert tartalmaznak, lehetnek alacsony vagy magas kópiaszámban, rendszerint mintegy 1000-nél kevesebb kópiaszámban, bár bizonyos szituációkban „runaway” vektorokat lehet alkalmazni. Akár integrációra szánt vektorban van, akár replikációs rendszerben van, a találmány szerinti polipeptidet kódoló szekvenciát tandem módon lehet ligálni amplifikáló génnel, például dihidrofolát reduktáz, metallotioneinek, timidin kináz vagy hasonlók génjével. Prokarióta rendszerekben, az amplifikáló gént és a célgént egyaránt ugyanazon transzkripciós és transzlációs szabályzó



régiók szabályzása alá lehet helyezni.

A vektor rendszerint tartalmaz olyan markert, amely lehetővé teszi az expressziós rendszert tartalmazó gazdaszervezet sejtjeinek szelekcióját; ezen markerek természete függ a gazdaszervezettől és szakember számára nyilvánvaló. A szükséges szabályzókon, például promótereken kívül további szekvenciákat, például enhanszereket is lehet alkalmazni a transzkripció mértékének fokozására. Ha a polipeptidet szekretálni kívánjuk, szignálpeptidet kódoló, 5'-végi szekvenciát lehet alkalmazni, például olyanokat, amelyeket leírnak a 4,336,336., 4,338,397 és 4,546,082. számú USA-beli szabadalmi leírásokban. A szignálszekvencia enzimesen lehasad, amikor a polipeptid-termék szekretálódik.

Az alkalmazott gazdasejtől függően, transzformációt standard technikák végrehajtásával lehet végezni, amelyek alkalmasak ilyen sejtek esetén. Cohen, S. N. által leírt [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 (1972)], kalcium-kloridot alkalmazó kalciumos kezelést, vagy Maniatis és munkatársai által leírt ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), Cold Spring Harbor Press, 254. old.] RbCl-módszer alkalmazzuk prokariótákra vagy olyan sejtekre, amelyek lényegi sejtfal-gátakat tartalmaznak. *Agrobacterium tumefaciens* alkalmazásával fertőzünk bizonyos növényi sejtek esetén [Shaw, C. H. és mtsai., Gene 23, 315 (1978)]. Sejtfalakkal nem rendelkező emlős sejtek esetén Graham és van der Eb által leírt, kalcium-foszfátos kicsapási módszer előnyös. Élesztőbe való transzformációt, például Van Solingen, P. és munkatársai [J. Bacter. 130, 946 (1977)]



valamint Hsiao, C. L. és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3829 (1979)] által leírt eljárás szerint végzünk.

Alkalmas expressziós rendszer összeállítása után, a rendszert általában megfelelő gazdaszervezetbe transzfektáljuk, és sikeres transzformánsokat szelektálunk az expressziós vektorok által tartalmazott markerek felhasználásával. A sikeresen transzformált kolóniákat azután abból a célból tenyésztjük, hogy a kívánt polipeptidet termeljék. Néha előnyös olyan promótert alkalmazni, amelyet környezeti körülmények szabályzásával lehet kontrollálni, így a sejteket olyan körülmények között lehet növesztetni, amelyben a találmány szerinti, kívánt polipeptidet kódoló gén nem expresszálódik, és azután a körülmények megfelelő manipulálásával lehet indukálni a polipeptid termelődését. Például, ha trp-promótert alkalmazunk *E. coli*-ban, a sejteket triptofán jelenlétében növesztjük, és azután az expressziót a triptofán-koncentráció csökkentésével vagy triptofán-analóg, például indolil-ecetsav hozzáadásával indukáljuk. Ha a gén PL-promóter szabályzása alatt van, a sejteket viszonylag alacsony hőmérsékleten növesztjük, például mintegy 35°C-on, megfelelő sejtsűrűségig, és azután a hőmérsékletet megemeljük a promóter aktiválása céljából. Ha bakteriális gazdaszervezetben termeltetünk érett, intracelluláris polipeptidet, az N-terminális metionin lehasadhat vagy nem hasadhat le. Emlős rendszerekben például metallotionein-promóter alkalmazása lehetővé teszi az indukciót nehézfémek vagy glükokortikoidok hozzáadásával. Ezt a módszert akkor

részesítjük előnyben, ha a polipeptid érés előtti felhalmozódását akarjuk megakadályozni, amely káros lehet a sejt növekedésére.

A polipeptidet termeltethetjük intracellulárisan, vagy szekretált formában olyan vektorok előállításával, amelyekben a peptidet megelőzi a megfelelő gazdaszervezetben működőképes szignálpeptid.

A polipeptidet kinyerjük a tápközegből vagy a sejtekből, szakember által általánosan ismert, megfelelő technikák alkalmazásával, és tisztíthatjuk például ioncserélő kromatográfiával, ammónium-szulfátos kicsapással, gélpermeációs kromatográfiával, és így tovább.

A találmány szerinti eljárások eredményeként rendelkezésre álló polipeptideket ellenük termeltetett antiszérumok előállítására lehet alkalmazni [Stites, D. P. és A. I. Terr., "Basic & Clinical Immunology", 7. kiadás (1991), Appleton and Lange, Norwalk, Connecticut és San Matea, California]. Módszereket és termékeket lehet kifejleszteni polipeptid ellen termeltetett ellenanyag alkalmazásával a polipeptid detektálására, amelyet az ellenanyag képes kötni. Ezt megoldották legalább arra a polipeptidre, amely a CTAP-III szekvenciájával rendelkezik (3. azonosítószámú szekvencia; Baggiolini, M, Clemetson, K. J., Walz, A., PCT/EP89/01389. számú közzétételi irat, közzétéve: WO90/06321. számú nemzetközi közzétételi irat, 1990. június 14.).

Ellenanyagot például kapcsolni vagy konjugálni lehet riporterrendszerrel, amelyet úgy állítunk össze, hogy pozi-

tívan detektálja a polipeptid ellenanyaghoz való kötődését. Jól ismert riporterrendszerek például radioaktív immunológiai vizsgálati eljárások (RIA) vagy immunoradiometrikus vizsgálati eljárások (IRMA). Más módszerként enzimkapcsolt immunológiai vizsgálati eljárást (ELISA) alkalmazhatunk, amely a RIA-val és IRMA-val közös abból a szempontból, hogy viszonylag nagyfokú érzékenységet lehet elérni, de általában nem radioaktív izotópokat alkalmazására épül. Vizuálisan detektálható anyagokat lehet előállítani vagy legalábbis olyanokat, amelyeket spektrofotométerben lehet detektálni. Az enzim által megkötött, vizsgált anyagok fluoreszcenciájára alapuló vizsgálati eljárást is lehet alkalmazni. Nyilvánvaló, hogy számos riporterrendszer létezik egy adott polipeptid jelenlétének detektálására, amelyeket alkalmazni lehet a találmány szerinti megoldásban. Standardizált mintavétellel és mintakezeléssel jól meghatározható egy polipeptid küszöbérték feletti mennyiségben való jelenléte vérszérumban.

Ilyen ellenanyag-kapcsolt riporterrendszert lehet alkalmazni annak meghatározására szolgáló eljárásokban, hogy vajon egy alany vérszéruma alacsony mennyiségben tartalmaz-e a polipeptidet. Ilyen polipeptid adott típusú alany vérszérumában lévő normál küszöbérték-koncentrációját véve, teszt-reagenskészleteket lehet kifejleszteni.

További előnyökhöz juthatunk a fehérje kiméra formáinak alkalmazásával, melyek szakember számára ismertek. Az egész fehérjét vagy a fehérje egy részletét kódoló DNS-szekvenciát kapcsolni lehet például *E. coli*-ból származó β -galaktozi-

dáz C-terminális részét kódoló szekvenciával, fúziós fehérjét előállítva. Például humán, respirációs szincitialis vírusból származó glikoprotein-F és glikoprotein-G expresszáására szolgáló expressziós rendszert leírtak az 5,288,630. számú USA-beli szabadalmi leírásban (megadva 1994. február 22.) és a benne idézett hivatkozásokban.

A leírásban idézett valamennyi hivatkozást a kitanítás részének tekintünk, beleértve a 004,314. sorozatszámú USA-beli szabadalmi bejelentést (benyújtva 1995. szeptember 26.).

46831

SZEKVENCIALISTA

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Glu	Leu	Arg	Cys	Met	Cys	Ile	Lys	Thr	Thr	Ser	Gly	Ile	His	Pro
1				5					10					15	
Lys	Asn	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Ile	Gly	Lys	Gly	Thr	His	Cys	Asn
			20					25					30		
Gln	Val	Glu	Val	Ile	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Arg	Lys	Ile	Cys	Leu
		35					40					45			
Asp	Pro	Asp	Ala	Pro	Arg	Ile	Lys	Lys	Ile	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Ala
	50					55					60				
Gly	Asp	Glu	Ser	Ala	Asp										
65					70										

<210> 2

<211> 75

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ser	Asp	Leu	Tyr	Ala	Glu	Leu	Arg	Cys	Met	Cys	Ile	Lys	Thr	Thr
1				5					10					15	
Ser	Gly	Ile	His	Pro	Lys	Asn	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Val	Ile	Gly	Lys
			20					25					30		
Gly	Thr	His	Cys	Asn	Gln	Val	Glu	Val	Ile	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly
		35					40					45			
Arg	Lys	Ile	Cys	Leu	Asp	Pro	Asp	Ala	Pro	Arg	Ile	Lys	Lys	Ile	Val
	50					55					60				
Gln	Lys	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ser	Ala	Asp					
65					70					75					

46831

<210> 3

<211> 74

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser
 1          5          10          15
Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly
          20          25          30
Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg
          35          40          45
Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln
          50          55          60
Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
65          70

```

<210> 4

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly
 1          5          10          15
Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr
          20          25          30
His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys
          35          40          45
Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys
          50          55          60
Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
65          70

```

<210> 5

<211> 81

<212> PRT

<400> 5

Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys
1 5 10 15

Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser
20 25 30

Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile
35 40 45

Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro
50 55 60

Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala
65 70 75 80

Asp

<210> 6

<211> 85

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala
 1          5          10      15
Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys
          20          25          30
Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln
          35          40          45
Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp
 50          55          60
Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly
65          70          75          80
Asp Glu Ser Ala Asp
          85

```

$\langle 210 \rangle$ 7

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

1.6.6.6.1

Ser Ser Thr Lys Gly Gln Thr Lys Art Asn Leu Ala Lys Gly Lys Glu
 1 5 10 15
 Glu Ser Leu Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile
 20 25 30
 Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val
 35 40 45
 Ile Gly Lys Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu
 50 55 60
 Lys Asp Gly Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys
 65 70 75 80
 Lys Ile Val Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp
 85 90

<210> 8

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu Arg Cys Gln Cys
 1 5 10 15
 Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe Ile Lys Glu Leu
 20 25 30
 Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr Glu Ile Ile Val
 35 40 45
 Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro Lys Glu Asn Trp
 50 55 60
 Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala Glu Asn Ser
 65 70 75

<210> 9

<211> 103

<212> PRT

<213> sertés eredetű

<400> 9

10001

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Phe Leu Ala Val Phe Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Cys Glu Ala Asp Val Leu Ala Arg Val Ser Ala Glu Leu
 20 25 30
 Arg Cys Gln Cys Ile Asn Thr His Ser Thr Pro Phe His Pro Lys Phe
 35 40 45
 Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Phe His Cys Glu Asn Ser
 50 55 60
 Glu Ile Ile Val Lys Leu Val Asn Gly Lys Glu Val Cys Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Lys Glu Lys Trp Val Gln Lys Val Val Gln Ile Phe Leu Lys Arg Thr
 85 90 95
 Glu Lys Gln Gln Gln Gln Gln
 100

<210> 10

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ala Glu Glu Asp Gly Asp Leu Gln Cys Leu Cys Val Lys Thr Thr
 1 5 10 15
 Ser Gln Val Arg Pro Arg His Ile Thr Ser Leu Glu Val Ile Lys Ala
 20 25 30
 Gly Pro His Cys Pro Thr Ala Gln Leu Ile Ala Thr Leu Lys Asn Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ile Cys Leu Asp Leu Glu Ala Pro Leu Tyr Lys Lys Ile Ile
 50 55 60
 Lys Lys Leu Leu Glu Ser
 65 70

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

46831

Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr
Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Mesterséges szekvencia

<400> 12

Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Glu Ser

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile
Gln Ser

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln
Ser

4683

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Cys Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser

<210> 16

<211> 228

<212> DNS

<213> Homo sapiens

<400> 16

gac agt gac ttg tat gct gaa ctc cgc tgc atg tgt ata aag aca acc	48
Asp Ser Asp Leu Tyr Ala Glu Leu Arg Cys Met Cys Ile Lys Thr Thr	
1 5 10 15	
tct gga att cat ccc aaa aac atc caa agt ttg gaa gtg atc ggg aaa	96
Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser Leu Glu Val Ile Gly Lys	
20 25 30	
gga acc cat tgc aac caa gtc gaa gtc ata gcc aca ctg aag gat ggg	146
Gly Thr His Cys Asn Gln Val Glu Val Ile Ala Thr Leu Lys Asp Gly	
35 40 45	
agg aaa atc tgc ctg gac cca gat gct ccc aga atc aag aaa att gta	192
Arg Lys Ile Cys Leu Asp Pro Asp Ala Pro Arg Ile Lys Lys Ile Val	
50 55 60	
cag aaa aaa ttg gca ggt gat gaa tct gct gat taa	228
Gln Lys Lys Leu Ala Gly Asp Glu Ser Ala Asp TER	
65 70 75	

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

45531

<221> módosított hely

<222> ...2

<223> /megjegyzés="Xaa jelentése N-acetil-izoleucin"

<220>

<221>

<222> 14...

<223> /megjegyzés="Xaa jelentése N-acetil-izoleucin"

<400> 17

Xaa Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Glu Xaa

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> módosított hely

<222> ...2

<223> /megjegyzés="Xaa jelentése N-acetil-treonin"

<220>

<221> módosított hely

<222> 14...

<223> /megjegyzés="Xaa jelentése lizinamid"

<400> 18

Xaa Thr Ser Gly Ile His Pro Xaa

48831

<210> 19

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ile Lys Thr Thr Ser Gly Ile His Pro Lys Asn Ile Gln Ser

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Polipeptid, amely emlősökben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, amely fragmens a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsa legfeljebb 13 egymást követő aminosavából áll.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan polipeptid-fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsa legfeljebb 12 egymást követő aminosavából áll.

3. A 2. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan polipeptid-fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsa legfeljebb 11 egymást követő aminosavából áll.

4. A 3. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan polipeptid-fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsa legfeljebb 10 egymást követő aminosavából áll.

5. A 4. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan polipeptid-fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy a 12. vagy 19. azonosítószámú szekvencia konzervatív variánsa legfeljebb 9 egymást követő aminosavából áll.

6. Az 5. igénypont szerinti polipeptid, amely, a 12. azonosítószámú aminosav-szekvencia vagy konzervatív variánsa legfeljebb 8 egymást követő aminosavából álló fragmenst tartalmaz.

7. Az 1., 2., 3., 4., 5. vagy 6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amely legalább 8 aminosav hosszúságú fragmenst tartalmaz, amely fragmens a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy konzervatív variánsát tartalmazza.

8. Polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, amely fragmens a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 13 egymást követő aminosavából áll.

9. A 8. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 12 egymást követő aminosavából áll.

10. A 9. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 11 egymást követő aminosavából áll.

11. A 10. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 10 egymást követő aminosavából áll.

12. A 11. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 9 egymást követő aminosavából áll.



13. A 12. igénypont szerinti polipeptid, amely olyan fragmenst tartalmaz, mely a 12. vagy 19. azonosítószámú aminosav-szekvencia legfeljebb 8 egymást követő aminosavából áll.

14. A 8., 9., 10., 11., 12. vagy 13. igénypont bármelyike szerinti polipeptid, amely legalább 8 aminosav hosszúságú fragmenst tartalmaz, amely fragmens a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy konzervatív variánsát tartalmazza.

15. Izolált polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, amely fragmens lényegében a 18. azonosítószámú szekvenciát vagy annak konzervatív szubsztituált variánsát tartalmazó aminosav-szekvenciával bír.

16. Izolált polipeptid, amely emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő polipeptid-fragmenst tartalmaz, amely fragmens lényegében a 18. azonosítószámú szekvenciát tartalmazó aminosav-szekvenciával bír.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, melynek N-terminális vagy C-terminális aminosava - vagy mindkettő - védőcsoporttal van ellátva.

18. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 13 aminosavból áll, és amely egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid az 1. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

19. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 12 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 2. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

20. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 11 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 3. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

21. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 10 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 4. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

22. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 9 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második

polipeptid az 5. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

23. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 8 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 6. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

24. A 18-23. igénypontok bármelyike szerinti első polipeptid, amely legalább 8 aminosav hosszúságú.

25. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 13 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 8. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

26. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 12 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 9. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens

körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

27. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 11 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 10. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

28. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 10 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 11. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

29. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik, amely lényegében legfeljebb 9 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 12. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

30. Emlősszervezetekben csontnövekedést elősegítő, első polipeptid, amely olyan aminosav-szekvenciával rendelkezik,



amely lényegében legfeljebb 8 aminosavból áll, és egy második polipeptid kielégítő mértékű másolata, amely második polipeptid a 13. igénypont szerinti polipeptid-fragmens, és az első polipeptidet olyan DNS kódolja, amely sztringens körülmények között képes hibridizálódni a második polipeptidet kódoló DNS-el.

31. Az 1-30. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid, amely lényegében tiszta és molekulatömege mintegy 1000 és mintegy 4000 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 3000 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 1800 közötti, vagy mintegy 1200 és mintegy 1800 közötti tartományban van.

32. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet hatóanyagként tartalmazó ágens csontleépüléssel kapcsolatos betegség prevenciójára és kezelésére való alkalmazásra.

33. Csontnövekedést elősegítő gyógyászati készítmény, amely 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid terápiásan hatásos mennyiségét tartalmazza.

34. Eljárás csontnövekedés mértékének fokozására emlősszervezetben, *azzal jellemezve*, hogy az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid terápiásan hatásos mennyiségét beadjuk.

35. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid alkalmazása csonttritkulás kezelésére.

36. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid alkalmazása csontnövekedés elősegítésére emlősszervezetben.

37. Az 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid alkalmazása csont növekedésének elősegítésére vagy csont-



ritkulás kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

38. Diagnosztikai reagenskészlet 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid jelenlétének meghatározására, amely a polipeptid ellen termeltetett, riporter-rendszerhez kötött ellenanyagot tartalmaz, ahol a riporter-rendszer detektálható választ ad akkor, ha előre meghatározott mennyiségű polipeptid és az ellenanyag összekapcsolódik.

39. Izolált DNS-fragmens, amely 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid expresszióját kódolja, valamint olyan DNS, amely a genetikai kód degeneráltsága következtében tér el a fragmenstől.

40. Vektor, amely 1-31. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid expresszióját kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

41. Vektor, amely 39. igénypont szerinti DNS-fragmenst tartalmazó, heterológ DNS-szekvenciát tartalmaz.

42. Eljárás az 1-31 igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására, *azzal jellemezve, hogy*

a) előállítjuk a polipeptidet kódoló nukleotid-szekvenciát tartalmazó DNS-fragmenst;

b) a DNS-fragmenst beépítjük expressziós vektorba, így olyan rekombináns DNS-fragmenshez jutunk, amely tartalmazza a DNS-fragmenst, és képes replikálódni;

c) gazdasejtet transzformálunk a rekombináns DNS-fragmenssel olyan transzformánsok izolálása céljából, amelyek képesek expresszálni a polipeptidet; és

d) úgy tenyésztjük a transzformánsokat, hogy lehetővé váljon, hogy a transzformánsok a polipeptidet termeljék, és kinyerjük a polipeptidet az eredményül kapott, tenyésztett

keverékből.

43. Izolált polipeptid, amely a 18. azonosítószámú aminosav-szekvenciából áll.

44. Csontnövekedést elősegítő gyógyászati készítmény, amely 43. igénypont szerint polipeptid terápiásan hatásos mennyiségét tartalmazza.

45. A 43. igénypont szerint polipeptid alkalmazása csontritkulás kezelésére.

46. A 43. igénypont szerint polipeptid alkalmazása csontnövekedés elősegítésére emlősszervezetben.

47. A 43. igénypont szerint polipeptid alkalmazása csontnövekedés elősegítésére vagy csontritkulás kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.


dr. Pethő Árpád

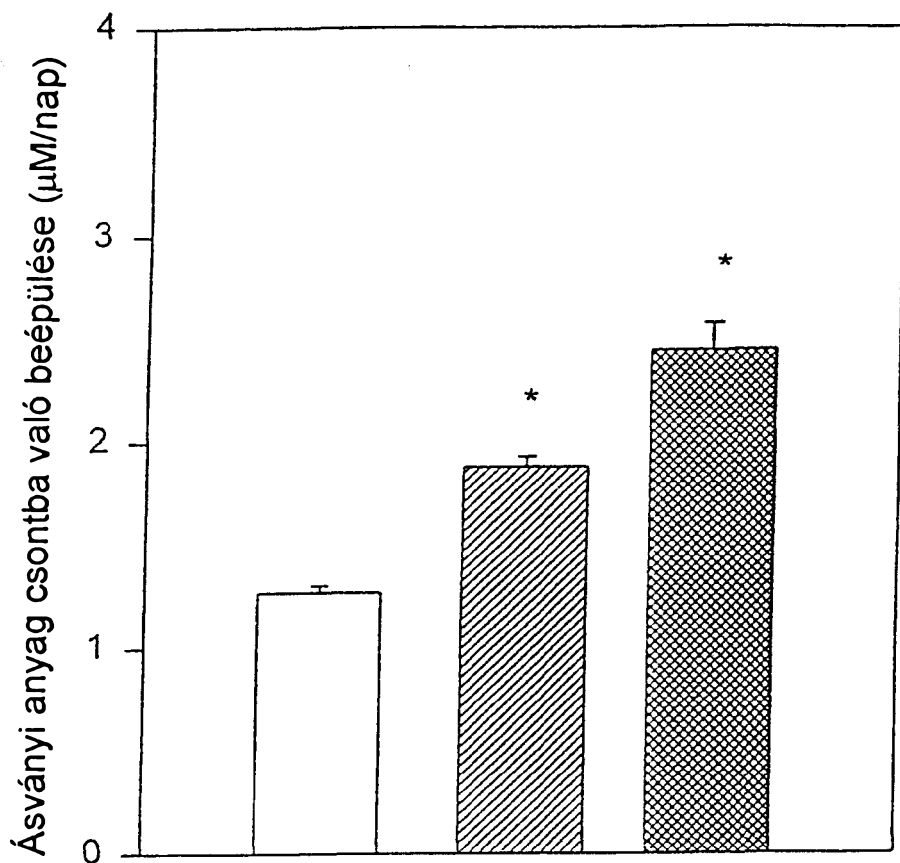
szabadalmi ügyvivő

56 oldal

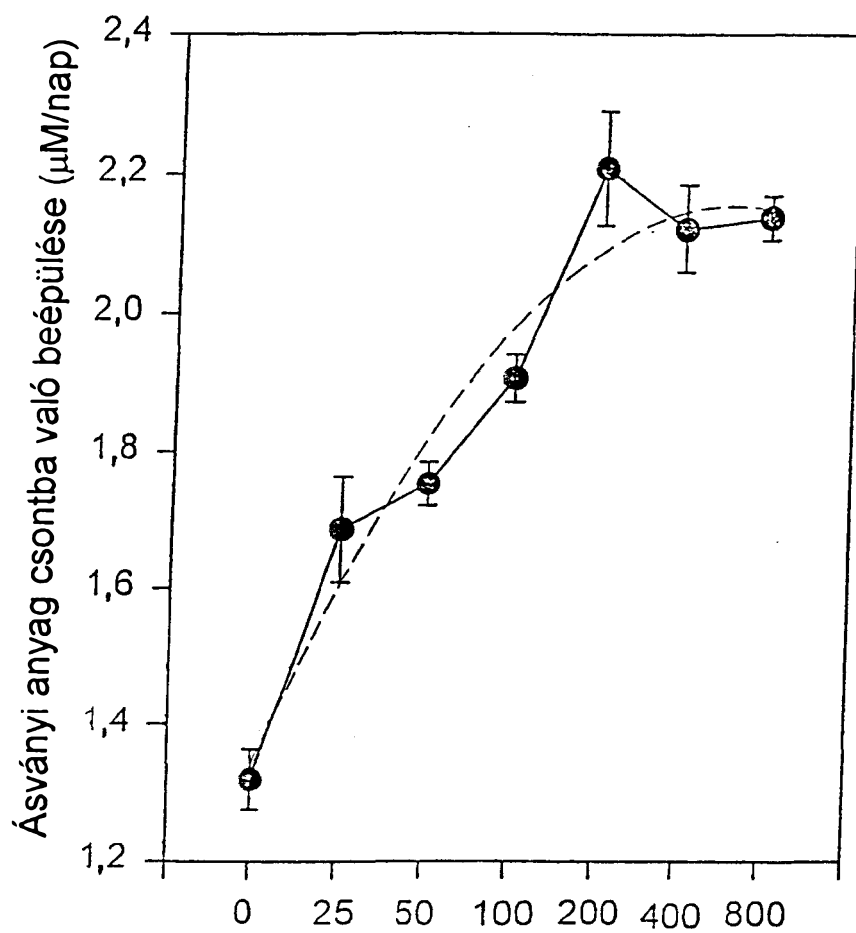
3 oldal rejt

59 oldal

Bevétel



1. ábra



2. ábra

4 5 6 7 8 9

Aktív szekvenciák:

SEQ ID NO:1 (MW=7670)	AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKTHCNQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQKKLAGDESAD	6	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
SEQ ID NO:2 (MW=8218)	DSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKTHCNQVEVIATLKDGRKICLDPDAPRIKKIVQKKLAGDESAD														
SEQ ID NO:11 (MW=2850)	DSDLYAELRCMCIKTTSGIHPKNIQS														
SEQ ID NO:12 (MW=1530)	IKTTSGIHPKNI $\bar{E}$ S														
SEQ ID NO:13 (MW=1862)	CMCIKTTSGIHPKNIQS														
SEQ ID NO:17	AC - IKTTSGIHPKNI $\bar{E}$ S - NH ₂														
SEQ ID NO:18 (MW=1179')	AC - TTSGIHPK - NH ₂														

* védőcsoportok nélkül

Inaktív szekvenciák:

SEQ ID NO:14 (MW=1750)	MCIKTTSGIHPKNIQS
SEQ ID NO:15 (MW=1643)	CIKTTSGIHPKNIQS

3. ábra