

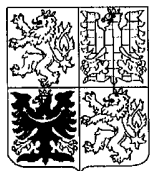
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3848

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.04.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **29.04.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/120733**

(33) Země priority: **IL**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.06.2000**
(Věstník č. 6/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/IL98/00196**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/48831**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/33

A 61 P 35/00

(71) Přihlašovatel:

YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT
COMPANY LIMITED, Rehovot, IL;

(72) Původce:

Barkan Dalit, Rehovot, IL;
Cohen Batya, Tel Aviv, IL;
Rubinstein Menachem, Givat Shmuel, IL;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1,
110 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití účinných látek a farmaceutický
prostředek**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití účinných látek ze skupiny leptin, fúzní bílkoviny, leptinové muteiny, látky s agonistickým účinkem na leptinový receptor, účinné fragmenty nebo frakce těchto složek a jejich účinné analogy a deriváty a jejich soli a směsi jako inhibitorů proliferace nádorových buněk. Součástí řešení tvoří také farmaceutické prostředky, které uvedené látky obsahují.

CZ 1999 - 3848 A3

Použití účinných látek a farmaceutický prostředek

O b l a s t t e c h n i k y

Předložený vynález se vztahuje na leptin, cytokin produkovaný adipocyty; a ovlivňující různé druhy buněk a tkání. Mnohem podrobnější popis předloženého vynálezu se týká nové aplikace leptinu v oblasti onkologie.

Dosavadní stav techniky

Leptin, od adipocytů odvozený cytokin, regulující tělesnou hmotnost, byl identifikován pozičním klonováním murinového ob genu; (Zhang se sp.; 1994); a bylo prokázáno, že ovlivňuje jak příjem potravy, tak thermogenezi; (Campfield se sp.; 1995; Collins se sp.; 1996; Halaas se sp.; 1995; Pelleymounter se sp.; 1995; Weigle se sp.; 1995).

Vysoká afinita leptinových vazebných poloh byla lokalizována v choroides plexus; (cévnatka); expresivním klonováním cDNA z uvedené tkáně předpokládaným receptorem, (OB-R); (Tartaglia se sp.; 1995).

Známa působení leptinu jsou zprostředkovány jeho receptorem v hypothalamu. Expres leptinových receptorů se vyskytuje i v dalších orgánech, zejména v ledvinách, plicích, a játrech; (Cioffi se sp.; 1996; Lee se sp.; 1996; Tartaglia se sp.; 1995). Kromě toho se různý repertoár variací receptorového sestřihu (receptor -splice), líšících se v jejich cytoplazmatické doméně, se u myši projevuje expresí specifickým tkáňovým způsobem; (Lee se sp.; 1996). Proto, kromě kontroly příjmu potravy a tělesné teploty, může leptin vykazovat další

fyziologické funkce.

I když je leptin produkován adipocyty, nedávné zjištění korelace mezi přebytkem tuku, a vysokými hladinami leptinu v séru, bylo v rozporu s názorem, že leptin redukuje příjem potravy a tělesnou hmotnost; (Considine se sp.; 1996; Frederick se sp.; 1995; Lonnquist se sp.; 1995; Maffei se sp.; 1995). Tato korelace, a spolehlivé doložení vztahů mezi obezitou, a rezistencí vůči inzulinu; (Felber a Goley; 1995); naznačily, že leptin může modulovat inzulinem regulované odpovědi.

Ve skutečnosti bylo ale nedávno oznámeno, že leptin signifikantně redukuje bazální a s inzulinem redukovanou tyrosinovou fosforylaci inzulinového receptorového substrátu-1 ; (IRS-1). Toto působení leptinu na IRS-1 fosforylaci bylo specifické, protože tyrosinová fosforylace beta-řetězce inzulinového receptoru; (IR), nebyla potlačena; (Cohen se sp.; 1996).

Tyrosinová fosforylace IRS-1 s kinázou IR je klíčovým stupněm v rámci inzulinové receptorové signální kaskády, vedoucí ku četným známým působením inzulinu; (Araki se sp.; 1994; Cheatham a Kahn, 1995; Myers se sp.; 1994; Myers se sp.; 1994; Myers a White; 1993; Rose se sp.; 1994; Tamemoto se sp.; 1994; White a Kahn; 1994).

Směr signálního působení IRS-1 je zprostředkován několika asociovanými proteiny, z nichž jeden je GRB-2 = protein vázající se na receptor růstového faktoru-2 = growth-factor receptor associated binding protein-2; (Cheatham a Kahn; 1995).

Inzulinový receptor; (IR); je považován za metabolický receptor, zprostředkující působení inzulinu na homeostázu glukosy, a jako takový je vylučován na terminálně odlišných tkáních, jako je na př. adipózní (tuková) tkáň; játra; a svaly. Četné studie však prokázaly, že IR je silně účinný mitogenní receptor in vitro a in vivo v případě, kdy je vylučován v tumorových buňkách.

Funkční inzulinové receptory byly na příklad identifikovány v několika liniích rakoviny prsu, jak bylo zjištěno tyrosinovou fosforylací inzulinového receptoru, při reakci na léčbu inzulinem. Kromě toho zprostředkovává inzulinový receptor v těchto buňkách mitogenickou odpověď, jak bylo zjištěno inkorporací ^3H -thymidinu; (Milazzo se sp.; 1997; Milazzo se sp.; 1992).

Až dosud nebylo popsáno použití leptinu v oblasti onkologie obecně, a zejména leptin nebyl popsán jako použitelný pro inhibici proliferace buněk, zejména proliferace rakovinných buněk.

Podstata vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je použití leptinu jako inhibitoru buněčné proliferace, na příklad použití leptinu, jako inhibitoru proliferace rakovinných buněk.

Dalším cílem vynálezu je použití samotného leptinu, nebo jeho kombinace s dalšími terapeutickými látkami, pro léčbu různých maligních bujení.

Dalším cílem předloženého vynálezu je použití leptinu; leptinových fúzních proteinů; leptinových muteinů; agonistů leptinového receptoru, účinných fragmentů ^{nebo frakcí} jakékoliv ze zmíněných složek; účinných analog nebo derivátů jakékoliv ze zmíněných složek; a solí, jakékoliv ze zmíněných složek; a směsí jakékoliv ze zmíněných složek; pro léčbu různých typů maligního bujení.

Dalším předmětem předloženého vynálezu je použití farmaceutických prostředků, obsahujících jeden, nebo více leptinů; leptinových fúzních proteinů; leptinových muteinů, agonistů leptinového receptoru, účinných fragmentů ^{nebo frakcí} jakékoliv ze zmíněných složek, účinných analog nebo derivátů jakékoliv ze zmíněných složek; a solí jakékoliv ze zmíněných složek; pro léčbu různých typů maligního bujení.

Další cíle předloženého vynálezu jsou uvedeny dále, nebo budou snadno patrné z následujícího popisu :

Předložený vynález se týká použití leptinu jako inhibitoru buněčné proliferace. Leptin může být použitelný buď samotný, nebo v kombinaci s jinými terapeutickými látkami, nebo postupy, pro léčbu různých typů maligního bujení.

Výhodné provedení vynálezu spočívá v použití leptinu pro inhibici proliferace buněk humánního karcinomu prsu. Proliferace mnohých typů tumorových buněk je zvýšena za přítomnosti různých růstových faktorů, jako je na příklad inzulin; a IGF-1; (inzulinu podobný růstový faktor-1). Stimulační růstové působení inzulinu a IGF-1 na buňky je zprostředkováno, alespoň zčásti, prostřednictvím dráhy IRS-1/GRB-2 ; (Myers se sp.; 1993).

Tato dráha je inhibována s leptinem. Kromě toho je IRS-1 substrátem pro receptorové kinázy dalších růstových faktorů, a cytokinů, včetně IL-4; (interleukin-4); a IL-9; (interleukin-9); (Pernis se sp.; 1995; Yin se sp.; 1995; Yin se sp.; 1994).

Leptin může tudíž inhibovat mitogenické odpovědi některých, nebo všech zmíněných růstových faktorů a cytokinů, stejně jako ostatních růstových faktorů, a tedy inhibovat proliferaci různých typů tumorových buněk.

Příklady zahrnují inhibici proliferace indukované s IGF-1; a s inzulinem indukovanou proliferaci buněčných T-47D a MCF7 linií humánní rekoviny prsu.

Předložený vynález se také týká použití leptinu, leptinových fúzních proteinů, leptinových muteinů, agonistů leptinového receptoru, nebo účinných fragmentů a frakcí jakékoliv ze zmíněných složek, nebo solí jakékoliv ze zmíněných složek, stejně jako farmaceutických prostředků, obsahujících leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisty leptinového receptoru, účinné fragmenty nebo frakce, jakékoliv ze zmíněných složek, nebo sole jakékoliv ze zmíněných složek, pro léčbu různých typů maligního bujení.

Mnohem specifičtěji se předložený vynález týká použití účinné látky, vybrané ze skupiny obsahující leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisty leptinového receptoru, účinné fragmenty nebo frakce jakékoliv ze zmíněných složek, účinná analoga nebo deriváty jakékoliv ze zmíněných složek, sole jakékoliv ze zmíněných složek, a směsi jakékoliv ze zmíněných složek, jako inhibitoru proliferace tumorových buněk.

Provedení výše zmíněných aspektů předloženého vynálezu zahrnuje:

- I) Použití účinné látky jako inhibitoru buněčné proliferace pro léčbu maligního bujení u savců
- II) Použití účinné látky jako inhibitoru tumorů, závislých na růstovém faktoru
- III) Použití účinné látky jako inhibitoru proliferace buněk humánního karcinomu prsu.
- IV) Použití účinné látky pro léčbu humánních karcinomů prsu.

- V) Použití účinné látky jako inhibitoru růstového stimulačního působení inzulinu; a IGF-1; na tumorové buňky, zprostředkované, alespoň z části, drahou inzulinového receptorového substrátu 1; (IRS-1/GRB-2).
- VI) Použití účinné látky jako inhibitoru mitogenních odpovědí v tumorových buňkách, vůči jedné, nebo více receptorových kináz; růstových faktorů; a cytokinů, ze skupiny obsahující IL-4; a IL-9; pro všechny, u kterých IRS-1 je substrátem; pro léčbu tumorů.
- VII) Použití účinné látky jako inhibitoru bazální; a IGF-1 indukované; a s inzulinem indukované proliferace tumorových buněk pro léčbu humánních rakovin prsu.
- VIII) Použití účinné látky, kde výše zmíněná účinná látka je leptin, a leptin je použit jako inhibitor, nebo pro léčbu.

Podobně se předložený vynález týká také účinné látky, zvolené ze skupiny, obsahující leptin; leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny; agonisty leptinového receptoru; účinné fragmenty, nebo frakce jakékoliv ze zmíněných složek; účinná analoga nebo deriváty jakékoliv ze zmíněných složek; sole jakékoliv ze zmíněných složek; a směsí jakékoliv ze zmíněných složek, pro použití při výrobě léčiva, určeného pro inhibici proliferace tumorových buněk.

Provedení z tohoto aspektu vynálezu zahrnuje :

- II) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro léčbu maligního bujení u savců.
- III) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro inhibici tumorů závislých na růstovém faktoru.
- III) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro inhibici proliferace buněk humánního karcinomu prsu.
- IV) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro léčbu humánních karcinomů prsu.
- V) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro inhibici růstového stimulačního působení IGF-1; a inzulínu; na tumorových buňkách, zprostředkovaného alespoň zčásti, drahou IRS-1/GRB-2.
- VI) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro inhibici mitogenních odpovědí v tumorových buňkách, vůči jedné, nebo více receptorových kináz; růstových faktorů; a cytokinů; ze skupiny, obsahující IGF-1; IL-4; a IL-9; pro všechny, u kterých je IRS-1 substrátem; pro léčbu tumorů.
- VII) Použití účinné látky pro výrobu léčiva, určeného pro inhibici bazální; a IGF-1 indukované; a s inzulinem indukované, proliferace tumorových buněk; pro léčbu humánních rakovin prsu.
- VIII) Použití účinné látky, kde účinná složka je leptin; a leptin je použit pro výrobu výše zmíněného léčiva.

Podobně i z jiného aspektu, se předložený vynález týká farmaceutického prostředku, obsahujícího jako účinnou složku účinnou látku, a farmaceuticky vhodný nosič, ředidlo, nebo pomocnou látku, určeného pro inhibici proliferace tumorových buněk.

Z tohoto aspektu provedení vynálezu zahrnuje :

- I) Farmaceutický prostředek určený pro léčbu maligního bujení u savců.
- II) Farmaceutický prostředek určený pro inhibici tumorů závislých na růstovém faktoru.
- III) Farmaceutický prostředek, určený pro inhibici proliferace buněk humánního karcinomu prsu; a tudíž i pro léčbu humánního karcinomu prsu.
- IV) Farmaceutický prostředek, určený pro inhibici růstového stimulačního působení IGF-1; a inzulinu; na tumorových buňkách; a zprostředkovanou alespoň zčásti, drahou IRS-1/GBR-2.
- V) Farmaceutický prostředek, určený pro inhibici mitogenních odpovědí v tumorových buňkách, vůči jedné nebo více receptorových kináz; růstových faktorů; a cytokinů, ze skupiny, obsahující IL-4; a IL-9; pro všechny, u kterých je IRS-1 substrátem, a tudíž i pro léčbu tumorů.
- VI) Farmaceutický prostředek, určený pro inhibici bazální, a s IGF-1 indukované a s inzulinem indukované proliferace

tumorových buněk; a tudíž i pro léčbu humánních rakovin prsu.

VII) Farmaceutický prostředek, ve kterém účinná složka je leptin.

Předložený vynález se také týká postupu pro léčbu tumorů u savců, nebo pro inhibici proliferace tumorových buněk u savců, zahrnujícího aplikaci farmaceutického prostředku pacientovi, dle předloženého vynálezu, jak je poznamenáno výše, ve vhodné lékové formě; a vhodnými způsoby aplikace.

Takové lékové formy; a způsoby aplikace, jsou obvykle určovány praktickými lékaři; po následném vyšetření pacienta.

Ostatní aspekty a provedení předloženého vynálezu, jsou vysvětleny, nebo budou snadno patrné z následujícího podrobného popisu vynálezu.

Přehľad obrázků na výkrese

O b r á z e k 1)

Demonstruje závislost proliferace T-47D buněk na inzulinu, jak bylo zjištěno barvením s MTT = (3-/4,5-dimethylthiazol-2-yl/-2,3-difenylyltetrazoliumbromid);

O b r á z e k 2)

Demonstruje závislost proliferace T-47D buněk na IGF-1; jak bylo zjištěno barvením s MTT.

O b r á z e k 3)

Demonstruje inhibici s inzulinem indukované proliferace T-47D buněk v 10%ním séru hovězího zárodku; (FBS); murinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s MTT.

O b r á z e k 4)

Demonstruje inhibici s inzulinem indukované proliferace T-47D buněk ve 2%ním FBS; murinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s krystalovou violetí.

O b r á z e k 5)

Demonstruje inhibici proliferace T-47D buněk ve 10%ním FBS; murinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s MTT.

O b r á z e k 6)

Demonstruje inhibici s IGF-1 indukované proliferace T-47D buněk ve 2%ním FBS; purinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s krystalovou violetí.

O b r á z e k 7)

Demonstruje inhibici s IGF-1 indukované proliferace T-47D buněk ve 2%ním FBS; humánním leptinem, jak bylo zjištěno barvením s krystalovou violetí.

O b r á z e k 8)

Demonstruje inhibici s inzulinem indukované proliferace MCF7 buněk; v séru prostém mediu, murinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s krystalovou violetí.

O b r á z e k 9)

Demonstruje inhibici s IGF-1 indukované proliferace MCF7 buněk, v séru prostém mediu, s murinovým leptinem, jak bylo zjištěno barvením s krystalovou violetí.

Předložený vynález se týká použití leptinu jako inhibitoru proliferace tumorových buněk.

Je charakteristické, že buněčné linie humánního původu, odvozené od různých typů tumorů, mohou být kultivovány v kulturách za přítomnosti růstového média, doplněného sérem hovězího zárodku; (FBS); v objemové koncentraci cca 10%. Za uvedených podmínek je buněčná proliferace dále definována jako „bazální buněčná proliferace“. Růst četných tumorových linií je signifikantně zvýšen v případě, kdy jsou ku výše zmíněnému kultivačnímu mediu, doplněnému sérem, přidány různé růstové faktory, jako na př. inzulin; epidermální růstový faktor, nebo IGF-1.

Po přidání leptinu do růstového média v rozmezí nanomolárních koncentrací od 3 do 600; snižuje se bazální buněčná proliferace; a buněčná proliferace; závislá na růstovém faktoru.

Výsledky pokusů s buněčnými kulturami, uvedeným v rámci příkladů, publikovanými dále, naznačují použitelnost leptinu pro inhibici růstu různých typů tumorů, a leptin může být tudíž použitelný pro léčbu různých typů maligního bujení.

V rámci výhodného provedení předloženého vynálezu, je leptin používán pro inhibici proliferace buněk rakoviny prsu. V případě, že je leptin přidán ku kulturám T-47D buněk humánního karcinomu mléčných vývodů prsu; (American Type Culture Collection; Rockville; MD; kmen číslo ATCC HTB 133); je rozsah jejich proliferace potlačen.

Podobně i v případě, kdy je leptin přidán ku kulturám MCF7 buněk humánního adenokarcinomu prsu; (American Type Culture Collection; Rockville; MD; číslo ATCC HTB 22); je rozsah jejich proliferace redukován. Leptin inhibuje jak bazální, tak i s IGF-1 indukovanou proliferaci, tak i s inzulinem indukovanou proliferaci T-47D; a MCF7 buněk.

Leptin může být tedy specificky použitelný pro léčbu karcinomů prsu.

Růstové stimulační působení inzulinu a IGF-1 na buňky, je zprostředkováno alespoň zčásti, prostřednictvím tyrosinové fosforylace IRS-1; a následnou asociací IRS-1; s GRB-2; která má za následek mitogenní odpověď. Antimitogenní působení leptinu může být důsledkem jeho schopnosti redukovat bazální; inzulinem indukovanou, a s IGF-1 indukovanou, tyrosinovou fosforylací IRS-1; mající za následek snížení vazeb GRB-2 ku IRS-1.

Kromě toho je IRS-1 substrátem receptorových kináz ostatních růstových faktorů a cytokinů; včetně IL-4 a IL-9; (Pernis se sp.; 1995; Yin se sp.; 1995; Yin se sp.; 1994).

Leptin může tudíž inhibovat mitogenické odpovědi některých, nebo všech zmíněných růstových faktorů, a cytokinů; a stejně jako ostatních mitogenů, a tím tedy i inhibovat proliferaci různých typů tumorových buněk.

Předložený vynález se dále vztahuje na leptinové deriváty a analoga, včetně leptinových fúzních proteinů; leptinových muteinů; agonistů leptinového receptoru, nebo účinných fragmentů nebo frakcí zmíněných složek; a solí zmíněných složek, a farmaceutických prostředků, obsahujících leptin; leptinové fúzní proteiny; leptinové muteiny; agonisty leptinového receptoru, účinné frakce zmíněných složek, nebo solí ^{všech} zmíněných složek, pro léčbu různých typů rakovin.

V předloženém textu používaný výraz „muteiny“; se vztahuje na analoga leptinu; ve kterých jeden, nebo více zbytků aminokyseliny, je nahrazen odlišnými zbytky aminokyseliny, nebo jsou vypuštěny; nebo jeden, nebo více zbytků aminokyseliny, jsou připojeny ku původní sekvenci leptinu, aniž dochází ku významné změně účinnosti výsledných produktů, ve srovnání s divokými typy leptinu, nebo jeho účinných fragmentů, nebo frakcí.

Zmíněné muteiny jsou připravovány známými synthetickými postupy, a/nebo polohově směřovanými technikami mutagenéze,

nebo nějakými jinými. známými vhodnými technikami.

Jakýkoliv z těchto muteinů, má výhodnou sekvenci aminokyselin, dostatečně duplicitní k leptinu, takže v podstatě vykazuje podobné působení jako leptin, nebo jeho účinné fragmenty, nebo frakce.

Lze tedy pomocí rutinního experimentování posoudit, zda nějaký určitý mutein, na příklad jednoduchou metodou buněčné proliferace), který blokuje buněčnou proliferaci, vykazuje dostatečnou účinnost leptinu, a proto tedy alespoň jedno z popsaných použití leptinu; a tedy v podstatě i podobnou účinnost.

V rámci výhodného provedení je každý takový mutein, alespoň ze 40%; identický nebo homologický se sekvencí jednoho z leptinů.

Mnohem výhodněji vykazuje alespoň 50,0%; alespoň 60,0%; alespoň 70,0%; alespoň 80,0%; nebo nejvýhodněji alespoň 90,0% identity, nebo homologie.

Muteiny leptinu, nebo jeho účinné fragmenty, nebo frakce, mohou být proto použity dle předloženého vynálezu, nebo kódování nukleové kyseliny, včetně konečného uspořádání, odpovídajícího v podstatě sekvencím jako substituce peptidů, nebo nukleotidů, které mohou být rutinně získávány, bez zbytečného experimentování, jedním z běžných postupů v této oblasti, založeném na poznatcích a pokynech, uvedených v předloženém textu.

Podrobnější popis chemie proteinů, a struktur; je uveden v následujících odborných publikacích; citovaných dále v literárních odkazech; t.j. Schulz G.E. se sp.; Principles of Protein Structure; Springer-Verlag; New York; 1978; a Creighton T.E.; Proteins Structure and Molecular Properties; W.H. Freeman CO.; San Francisco, 1983).

Popis substitucí sekvencí nukleotidů, jako jsou na př. preference kodónů; viz Ausubel se sp.; paragrafy A.1.1. - A.124; (viz literární odkazy uvedené dále), a Sambrook se sp.; Current Protocols in Molecular Biology; Interscience, N.Y.; paragrafy 6.3. a 6.4; (1987, 1992); u dodatků C a D.

Výhodné změny muteinů, týkající se předloženého vynálezu, jsou ty, které jsou známy jako „konzervativní“ substituce. Konzervativní substituce aminokyselin leptinových polypeptidů, nebo proteinů, nebo jejich účinných fragmentů, nebo frakcí, mohou zahrnovat synonymní aminokyseliny; včetně skupin, které mají dostatečně podobné fyzikálně-chemické vlastnosti; takže substituce mezi členy skupiny ochrání biologickou funkci molekuly.

Grantham; Science; Vol. 185; strany 862-864; //1974//.

Je zřejmé, že zebudování, nebo vypuštění aminokyseliny, může být také realizováno ve výše definovaných sekvencích, aniž dochází ku změnám jejich funkce, zejména když zebudování, nebo vypuštění, zahrnuje pouze malý počet aminokyselin; na př. méně než 30; a výhodně méně než 10; a není spojeno s vypuštěním, nebo nahrazením aminokyselin, které jsou kritické pro funkční konformaci; na příklad zbytky cysteinu.

Anfinsen; „Principles That Govern The Folding of Protein Chains; Science; Vol. 181; strany 223 - 230; (1973).

Proteiny, a muteiny, produkované takovým vypuštěním, nebo zebudováním ; jsou v rámci předloženého vynálezu uvedeny.

Výhodné jsou skupiny synonymních aminokyselin, uváděné dále v Tabulce I).

Výhodnější jsou skupiny synonymních aminokyselin, uváděné dále v Tabulce II).

Nejvýhodnější jsou skupiny synonymních aminokyselin, uváděné dále v Tabulce III).

T A B U L K A I M

Výhodné skupiny synonymních aminokyselin :

Aminokyselina:

Synonymní skupina :

Ser	Ser, Thr, Gly, Asn;
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His;
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu;
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro;
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr;
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala;
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val;
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly;
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe;
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr;
Cys	Ser, Thr, Cys;
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His;
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln;
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn;
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys;
Asp	Glu, Asn, Asp;
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu;
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met;
Trp	Trp;

T A B U L K A II)

Výhodnější skupiny synonymních aminokyselin :

Aminokyselina:

Synonymní skupina ::

Ser	Ser;
Arg	His, Lys, Arg;
Leu	Leu, Ile, Phe, Met;
Pro	Ala, Pro;
Thr	Thr;
Ala	Val, Met, Ile;
Val	Val, Met, Ile;
Gly	Gly;
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu;
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe;
Tyr	Phe, Tyr;
Cys	Cys, Ser;
His	His, Gln, Arg;
Gln	Glu, Gln, His;
Asn	Asp, Asn;
Lys	Lys, Arg;
Asp	Asp, Asn;
Glu	Glu, Gln;
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu;
Trp	Trp;

T A B U L K A III)

Nejvýhodnější skupiny synonymních aminokyselin :

Aminokyselina:

Synonymní skupina :

Ser	Ser;
Arg	Arg;
Leu	Leu, Ile, Met;
Pro	Pro;
Thr	Thr;
Ala	Ala;
Val	Val;
Gly	Gly;
Ile	Ile, Met, Leu;
Phe	Phe;
Tyr	Tyr;
Cys	Cys, Ser;
His	His;
Gln	Gln;
Asn	Asn;
Lys	Lys;
Asp	Asp;
Glu	Glu;
Met	Met, Ile, Leu;
Trp	Met;

Příklady provádění substitucí aminokyselin v proteinech, které mohou být použity pro získání muteinů leptinu, nebo jeho účinných frakcí, v rámci použití předloženého vynálezu, včetně jakýchkoliv známých metodických kroků, uvedených na př. v US patentech RE 33.653; 4,959.314; 4,588.585; a 4,737.462; (Mark se sp.); 5,116.943; (Koths se sp.); 4,965.195; (Namen se sp.); 4,879.111; (Chang se sp.); a 5,017.691; (Lee se sp.); a lysinem substituované proteiny; uvedené v US patentu číslo 4,904.584; (Shaw se sp.).

V rámci jiného výhodného provedení předloženého vynálezu, má jakýkoliv mutein leptinu, nebo jeho účinná frakce, určené pro použití dle předloženého vynálezu, sekvenci aminokyselin, v podstatě odpovídající sekvenci leptinu.

Výraz „v podstatě odpovídající“ je uvažován pro souhrné proteiny, s menšími změnami, vzhledem ku sekvenci přirozeného proteinu; které neovlivňují základní charakteristiky přirozených proteinů, pokud jejich schopnost inhibovat buněčnou proliferaci, je zajímavá.

Typ změn, obecně uvažovaných a zahrnutých do výřezového vyjádření „v podstatě odpovídající“ jsou takové, které by mohly vyplývat z konvenčních technik mutagenéze DNA kódující leptin, a resultující do několika málo modifikací; a prozkoumání (screening) žádané účinnosti způsobem; diskutovaným výše.

Muteiny, v souhlase s předloženým vynálezem, se týkají proteinů zekódovných s nukleovou kyselinou, jako na příklad s DNA; nebo RNA; které hybridizují DNA nebo RNA, kódujících za striktních podmínek leptin; v souhlase s předloženým vynálezem. Takový typ nukleové kyseliny by mohl být nejvhodnějším kandidátem pro určení, zda kóduje polypeptid, který vykazuje dle předloženého vynálezu, funkční účinnost leptinu.

Výraz „striktní podmínky“, se vztahuje na hybridizaci

a následné podmínky promývání, které jsou v rámci odborné praxe konvenčně označovány jako „striktní“.

Viz také Ausubel se sp.; Current Protocols in Molecular Biology; Interscience, N.Y.; paragrafy 6.3. a 6.4.; (1987, 1992); a Sambrook se sp.; viz výše.

Bez omezení zahrnují příklady „striktních podmínek“ podmínky promývání při teplotách 12,0 - 20,0°C; nižších než předpokládaná teplota studovaného hybridu; na př. 2 x SSC; a 0,5% SDS po dobu 5 minut; 2 x SSC a 0,10% SDS po dobu 15 minut; 0,1 x SSC a 0,5% SDS při teplotě 37,0°C po dobu 30 - 60 minut; a poté 0,1 x SSC a 0,5% SDS při teplotě 68,0°C; po dobu 30 - 60 minut.

Běžný odborný přístup v této oblasti předpokládá, že „striktní podmínky“ záleží také na délce sekvence DNA; práb oligonukleotidů; (na příklad 10 až 40 bází), nebo smíšených prábách oligonukleotidů.

V případě použití smíšených práb je výhodné použít tetramethylamoniumchlorid; (TMAC); místo SSC. Viz také Ausubel; citovaný výše.

Výraz „leptinové fúzní proteiny“; nebo jednodušeji „fúzní proteiny“, se vztahuje na polypeptid, obsahující leptin, nebo jeho účinné frakce, nebo muteiny zmíněných složek, zřizované s jiným proteinem, který vykazuje delší dobu zádrže v tělních tekutinách. Leptin, nebo jeho účinné frakce, mohou být fúzovány s jiným proteinem, polypeptidem. nebo podobně.

Výraz „sole“, uváděný v předloženém textu, se vztahuje jak na sole karboxylových skupin, tak kyselé adiční sole aminových skupin leptinu, jeho účinných frakcí; muteinů; nebo jeho leptinových fúzních proteinů.

Sole karboxylové skupiny mohou být připraveny pomocí běžně známých postupů v této oblasti; a zahrnují anorganické sole; na příklad sodné; vápenaté, ^{amonné} vželezité; nebo zinkové sole, a podobně; a sole s organickým bázemi; připravovanými na př.

s aminy; jako je na příklad triethanolamin; arginin; nebo lysin, piperidin; prokain; a podobně.

Kyselé adiční sole zahrnují na příklad sole s minerálními kyselinami, jako je na příklad kyselina chlorovodíková, nebo sírová; a sole s organickými kyselinami; jako je na příklad kyselina octová; a oxalová; (ethandiová kyselina).

Všechny takové sole musí vykazovat v podstatě podobnou účinnost jako leptin; nebo jeho účinné frakce.

„Funkční deriváty“; výraz používaný v předloženém textu, se vztahuje na deriváty leptinu; nebo jeho účinné fragmenty; nebo frakce; a jeho muteiny; a leptinové fúzní proteiny, které mohou být připraveny z funkčních skupin, které se vyskytují jako vedlejší řetězce na zbytcích; nebo N-; nebo C-; terminálních skupinách, běžně známými postupy, a jsou zahrnuty do předloženého vynálezu, pokud zpřisťávají stále farmaceuticky akceptovatelné, což na příklad znamená, že nenarušují účinnost proteinu, který je v podstatě svou účinností podobný leptinu; a nevykazují ve farmaceutickém prostředku, který jej obsahuje, toxické působení.

Tyto deriváty mohou zahrnovat na příklad polyethylanglykolové postranní řetězce, které mohou maskovat antigenní polohy; a zvyšovat působení leptinu; nebo jeho účinných frakcí v tělesných tekutinách.

Jiné deriváty zahrnují alifatické estery karboxylových skupin; amidy karboxylových skupin, získané reakcí s amoniakem; nebo s primárními, nebo sekundárními aminy.

N-acylové deriváty volných aminoskupin zbytků aminokyselin se připraví s acylovými podíly; (na př. alkanoylové, nebo karbocyklické aroylové skupiny); nebo O-acylové deriváty volných hydroxylových skupin; (například serylové; nebo threonylové zbytky); připravené s acylovými podíly.

„Aktivní fragmenty nebo frakce“ leptinu; leptinových

muteinů, fúzních proteinů; uváděných v předloženém vynálezu, se týkají jakéhokoliv fragmentu, nebo prekurzorů polypeptidového řetězce leptinu, nebo fúzních proteinů, obsahujících takový fragment samotného leptinu, nebo s asociovanými molekulami^{nebo} zbytků, spojených s výše zmíněnými složkami; jako jsou na příklad cukerné, nebo fosfátové zbytky; nebo shluky, jakéhokoliv ze zmíněných derivátů; za předpokladu, že frakce vykazuje významně podobnou účinnost s leptinem.

Předložený vynález se dále týká přirozených a syntetických agonistů leptinového receptoru, které jsou z hledisek svých vlastností schopné inhibovat buněčnou proliferaci, významně podobnou leptinu. Takový typ agonistů může být vybrán z knihovny peptidů; knihovny analog peptidů; nebo knihovny náhodných organických molekul. Výběr se provádí postupy, běžně známými odborníkům v příslušné oblasti; hlavně na základě vybraných agonistů vázat se ku leptinovému receptoru.

Na příklad knihovna náhodných peptidů může být připravena jako prokaryotická exprese plasmidů, vykazujících kódování DNA u náhodných peptidů, připojených ku proteinu-nosiči.

Další příklad zahrnuje fágový rozvinutý systém, ve kterém expresivní systém představuje fág, obsahující DNA kódující náhodný peptid, zabudovaný do jednoho z fágových proteinů. Kódované fágy pro agonisty fúzních peptidů, nebo antagonistů, jsou izolovány z knihovny fágů; t.j. panorámováním nad povrchy obalenými s leptinovými receptory. Vázané fágy jsou izolovány; a poté amplifikovány v bakteriích.

Několik serií panorámování-amplifikací je obvykle zapotřebí pro získání fágů vylučujících fúzní peptidy, které mají vysokou afinitu pro leptinové receptory. Izolovaný fág je poté amplifikován, a je určena sekvence kódující DNA pro peptid.

Alternativně lze běžnými postupy, známými odborníkům v

příslušné oblasti, připravit knihovny náhodných peptidů, nebo knihovny jiných molekul, syntesou pevné fáze na polymerních perličkách. Perličky s peptidem, nebo jinou molekulou, vykazující afinitu pro leptinový receptor, jsou vybrány z knihovny; na příklad vazbou značeného leptinového receptoru; na příklad fluorescencí značeného leptinového receptoru.

Kladně reagující perličky jsou shromážděny; a je určena struktura peptidu, nebo jiné molekuly, zachycených na perličce. V případě, že perlička je nosičem peptidu, je stanovena sekvence peptidu analýsou sekvence proteinu.

V případě, že perlička je typická pro náhodné organické molekuly z knihovny, potom je molekula z perličky odštěpena, a její struktura je určena běžnými postupy, známými odborníkům v příslušné oblasti, jako je například hmotnostní spektrometrie; nukleární magnetická rezonance; a podobně.

Pro další studie jsou potom uvažovány peptidy, identifikované na základě jejich afinity ku leptinovému receptoru; a poté jsou dále tříděny na základě schopností inhibovat proliferace už výše zmíněným způsobem.

Leptin, jeho účinné frakce; leptinové muteiny; leptinové fúzní proteiny; agonisté leptinového receptoru; a jejich sole; funkční deriváty; a účinné fragmenty nebo frakce zmíněných sloučenin, indikované pro léčbu různých typů maligního bujení, jsou proto výhodné pro léčbu tumorů závislých na růstovém faktoru; a ještě výhodnější pro léčbu karcinomu prsu.

Předložený vynález se dále vztahuje na použití farmaceutických prostředků, obsahujících farmaceuticky vhodný nosič a leptin, zahrnutý do vynálezu, nebo jeho účinné muteiny, fúzní proteiny, agonisty leptinového receptoru, a jejich sole; funkční deriváty; nebo jejich účinné frakce.

Farmaceutické prostředky, týkající se vynálezu, lze pro

léčebnou aplikaci připravit smíšením leptinu, nebo jeho derivátů, nebo agonistů leptinového receptoru; s fyziologicky vhodnými nosiči; a/nebo stabilizátory; a/nebo pomocnými látkami, a připravenými v lékové formě; na příklad lyofilizací v ampulce.

Způsob aplikace může být realizován buď jakýmkoliv akceptovatelným postupem aplikace u podobných látek; a bude záležet na podmínkách léčby; na příklad intravenózně; subkutánně; lokální injekcí; nebo povrchovou aplikací; nebo kontinuální infúzí; atd.

Množství účinné sloučeniny, která má být aplikována; záleží na způsobu aplikace; nemoci, která má být léčena, a stavu pacienta.

Na příklad lokální injekce vyžaduje, na základě tělesné hmotnosti, menší množství proteinu; než intravenózní infúze. Typická účinná množství leptinu, která mají být aplikována injekčně; se pohybují v rozmezí 0,1 - 1000 mikrogramů/ kg tělesné hmotnosti; a výhodně v rozmezí od 1,0 do 10,0 mikrogramů/kg.

Účinná množství derivátů leptinu a agonistů leptinového receptoru mohou být na molární bázi v podstatě stejná; jako u leptinu.

Leptin může být aplikován pacientům trpícím rakovinou, na příklad injekčně; a to buď samotný, nebo v kombinaci s ostatními terapeutickými látkami; nebo v kombinaci s ostatními terapeutickými postupy.

Vynález může být také demonstrován následujícími, neomezuujícími Příklady, publikovanými na dalších stránkách.

P ř í k l a d y p r o v e d e n í v y n á l e z u

P ř í k l a d 1)

Stanovení buněčné proliferace barvením s MTT.

R e a g e n s :

MTT zásobní roztok :

(3-/4,5-dimethylthiazol-2-yl/-2,5-difenylyltetrazolium bromid;
5,0 mg/ml; ve fosfátem pufovaném fyziologickém roztoku, který
je uchováván před použitím při teplotě minus 20,0°C.

R o z p o u š t ě d l o :

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková; (450 mikrolitrů; ve
100,0 ml; 2-propanolu.

P o s t u p :

Kultura rostoucích buněk na destičkách opatřených 96 jamkami;
za přítomnosti růstových stimulátorů; a růstových inhibitorů.

V požadovaném čase se přidá do každé z jamek destičky
10 mikrolitrů roztoku MTT; a inkubuje se 2,5 až 3,0 hodiny;
při teplotě 37,0°C.

Po odsátí supernatantu za vakua, pomocí čisté kalibrova-
né jehly; se přidá 100,0 mikrolitrů rozpouštědla; (jehož pří-
prava je popsána výše); a odečte se absorbance pomocí odečít-
acího zařízení destiček; při použití filtru 570 nm; a po ode-
čtení pozadí při 630 nm.

P ř í k l a d 2)

Stanovení buněčné proliferace barvením s krystalovou violetí.

P o s t u p ::

Kultura rostoucích buněk v destičkách opatřených 96 jamkami, za přítomnosti různých růstových stimulantů; a růstových inhibitorů.

V požadovaném čase se přidá do každé jednotlivé jamky destiček 40 mikrolitrů 12,5% glutaraldehydu; (40 mikrolitrů), a destičky se inkubují po dobu 30,0 minut, při teplotě místnosti.

Poté byla destička promyta s vodou, vysušena a bylo přidáno 0,10 ml; 0,1%ního roztoku (vodného) krystalové violeti. Mikrodestička byla poté dále inkubována po dobu 30,0 minut; promyta s vodou, a odečtena při 540 nm; s odečtěným pozadím při 630 nm.

P ř í k l a d 3)

Stanovení insulínu závislé proliferaci T47D buněk

Humánní buňky T-47D (Americká sbírka typových kultur = American Type Culture Collection; Rockville; MD; kmen číslo ATCC HTB 133); byly naočkovány do 96 jamek destiček v koncentraci 3×10^5 buněk/ml; v DMEM; a 10% séra hovězího zárodku (FBS); v množství 0,1 ml; v každé jamce.

Poté, co byl do různých jamek přidán ve zvyšujících se koncentracích humánní inzulin; byly destičky inkubovány po

dobu 72 hodin; a počty buněk byly poté stanoveny barvením s MTT; (viz Obrázek 1); publikovaný dále).

Výsledky jsou propočteny z průměrů 8 replikací. Na základě rozsahu buněčné proliferace, jak je demonstrováno dále na Obrázku 1); byla pro další studie použita koncentrace 50 nM/ml IGF-II.

P ř í k l a d 4)

Stanovení na IGF-1 závislé proliferace T-47D buněk

Do destiček, opatřených 96 jamkami, byly naočkovány humánní T-47D buňky v koncentraci 3×10^5 buněk/ml v DMEM, a 10% séra hovězího zárodku; (FBS), v množství 0,1 ml v každé jamce.

Poté, co byl do různých jamek přidán ve zvyšujících se koncentracích IGF-II , byly destičky inkubovány po dobu 3 dnů; a počet buněk byl stanoven barvením s MTT. (Viz také Obrázek 2), publikovaný dále).

Výsledky jsou propočteny z průměru 8 replikací. Na základě rozsahu buněčné proliferace; jak je demonstrováno dále na Obrázku 2); byla pro další studie použita koncentrace 50 ng/ml.

P ř í k l a d 5)

Inhibice inzulinem indukované proliferace T-47D buněk leptinem.

Buňky T-47D; (3×10^5 buněk/ml); v DMEM; doplněném 10% séra hovězího zárodku, (FBS); byly naočkovány do destiček opatřených 96 jamkami; (0,1 ml v každé jednotlivé jamce). Poté byly buňky smíchány s inzulinem; (50 nM); buď za přítomnosti, nebo absence určených koncentrací murinového leptinu. Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^\circ\text{C}$; v atmosféře 5%ního oxidu uhličitého; po dobu 48 hodin.

Poté byly buňky obarveny s MTT. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní $\pm$ chybou; (SE; $n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s inzulinem indukovanou proliferaci.

Viz Obrázek 3); publikovaný dále.

Buňky T-47D; (3×10^5 buněk/ml); v DMEM, doplněném s 10% séra hovězího zárodku; (FBS); byly naočkovány do destiček, opatřených 96 jamkami; (0,1 ml v každé jednotlivé jamce).

Po uplynutí jednoho dne bylo medium nahraženo s DMEM; doplněném s 2% séra hovězího zárodku; (FBS); a po uplynutí dalšího dne, byly buňky smíchány s inzulinem; (50 nM); buď za přítomnosti, nebo absence určených koncentrací murinového leptinu; ve směsi DMEM; a 2% séra hovězího zárodku (FBS).

Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^\circ\text{C}$; v atmosféře 5%ního oxidu uhličitého; po dobu 48 hodin. Buňky byly poté obarveny s krystalovou violetí. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní $\pm$ chybou ($\pm$ SE, $n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s inzulinem indukovanou buněčnou proliferaci.

Viz Obrázek 4); publikovaný dále.

Inhibice s IGF-I indukované proliferace T-47D buněk leptinem

Buňky T-47D; (3×10^5 buněk/ml); v DMEM; doplněném s 10% séra hovězího zárodku; (FBS); byly naočkovány do destiček, opatřených 96 jamkami; v množství 0,1 ml v každé jednotlivé jamce, a poté byly smíchány s 50 ng/ml; IGF-I, za přítomnosti nebo absence určených koncentrací murinového leptinu. Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^\circ\text{C}$; v atmosféře 5% oxidu uhličitého, po dobu 48 hodin.

Poté byly buňky obarveny s MTT. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní chybou $\pm$ SE; ($n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s IGF-I indukovanou proliferací buněk.

Viz Obrázek 5); publikovaný dále.

Buňky T-47D; (3×10^5 buněk/ml); v DMEM; doplněném s 10% séra hovězího zárodku (FBS); byly naočkovány do destiček, opatřených 96 jamkami, v množství 0,1 ml v každé jednotlivé jamce.

Po uplynutí jednoho dne, bylo medium nahrazeno s DMEM; doplněném s 2% FBS, a po uplynutí dalšího dne, byly buňky smíchány s 50,0 ng/ml IGF-I; buď za přítomnosti, nebo absence určených koncentrací murinového leptinu, ve směsi DMEM s 2% séra hovězího zárodku; (FBS).

Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^\circ\text{C}$, v atmosféře 5%ního oxidu uhličitého, po dobu 48 hodin. Poté byly buňky obarveny s krystalickou violetí. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní $\pm$ chybou (SE; $n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s IGF-I indukovanou buněčnou proliferací.

Viz Obrázek 6), publikovaný dále.

Buňky T-47D; (3×10^5 buněk/ml); v DMEM; doplněném s 10% séra hovězího zárodku; (FBS), byly naočkovány do destiček, opatřených 96 jamkami; v množství 0,1 ml v každé jednotlivé jamce.

Po uplynutí jednoho dne, bylo medium nahraženo s DMEM; doplněném s 2% séra FBS; a po uplynutí delšího dne, byly buňky smíchány s 50 ng/ml IGF-I; za přítomnosti; nebo absence určených koncentrací humánního leptinu; ve směsi DMEM 2% FBS.

Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^{\circ}\text{C}$ v atmosféře 5% ního oxidu uhličitého, po dobu 48 hodin. Poté byly buňky obarveny s krystalovou violetí. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní chybou $\pm$ SE ($n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s IGF-I indukovanou buněčnou proliferaci.

Viz Obrázek 7), publikovaný dále.

P ř í k l a d 8)

Inhibice s inzulinem indukované proliferace MCF-7 buněk leptinem.

Buňky MCF7 humánního adenokarcinomu prsu; (3×10^4 buněk/ml); (Americká sbírka typových kultur = American Type Culture Collection; Rockville; MD; kmen číslo HTB 22); doplněné s 6% FBS; byly naočkovány do destiček, opatřených s 96 jamkami; v množství 0,1 ml; v každé jednotlivé jamce.

Po uplynutí jednoho dne bylo medium nahraženo s DMEM; za absence séra. Po uplynutí delšího dne byly buňky smíchány s 50 nM inzulinu, buď za přítomnosti, nebo absence určených koncentrací murinového leptinu, v séru prostém mediu.

Poté byly destičky inkubovány při teplotě $37,0^{\circ}\text{C}$ v atmosféře 5% ního oxidu uhličitého; po dobu 48 hodin. Poté byly

buňky obarveny s krystalovou violetí. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní chybou $\pm$ SE; ($n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s inzulinem indukovanou buněčnou proliferaci.

Viz Obrázek.8); publikovaný dále.

P ř í k l a d 9)

Inhibice IGF-I indukované proliferace MCF7 buněk s leptinem.

Buňky MCF7 humánního adenokarcinomu prsu; v DMEM; doplněném s 10% séra hovězího zárodku; (FBS); byly neočkovány do destiček, opatřených 96 jamkami; (3×10^4 buněk /ml; v množství 0,1 ml v každé jednotlivé jamce.

Po uplynutí jednoho dne bylo medium nahraženo serum prostým medium; a po uplynutí dalšího dne, byly buňky smíchány s 50 ng/ml; IGF-I; buď za přítomnosti, nebo absence určených koncentrací murinového leptinu; v séru prostém mediu.

Poté byly destičky inkubovány při teplotě 37,0°C; v atmosféře 5%ního oxidu uhličitého, po dobu 96 hodin. Poté byly buňky obarveny s krystalovou violetí. Údaje jsou vyjádřeny s průměrnou standardní chybou $\pm$ SE; ($n = 8$).

Z výsledků vyplývá, že leptin signifikantně inhiboval s inzulinem indukovanou buněčnou proliferaci.

Viz Obrázek 9), publikovaný dále.

Odkazy na odbornou literaturu ::

- 1) Araki E.; Lipas M.A.; Patti M.E.; Bruning J.C.; Heag B.; r.; Johnson R.S.; a Kehn C.R.
Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene.(viz komentář).
Nature, 372; strana 186 - 190;/1994/.
- 2) Ausubel F.M. se sp.
Edice Current Protocols in Molecular Biology
- 3) Campfield I.A.; Smith F.J.; Guisez Y.; Devos R; a Burn P.
Recombinant mouse OB protein. Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.
Science, 169, 546 - 549;/1995/.
- 4) Cheatham B. a Kehn C.R.
Insulin section and insulin signaling network.
Endocr. Rev.; 16; strana 117 - 142;/1995/.
- 5) Cioffi J.A.; Shafer A.W.; Zupencic T.J.; Smith-Gbur J.; Mikhail A.; Platika D.; a Snodgrass H.R.
Novel B219/OB receptor informs. Possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction.
Nature Medicine; 2; 585 - 589;/1996/.
- 6) Cohen B.; Novick D. a Rubinstein M.
Modulation of insulin activities by leptin.
Science; 274; 1185 - 1188; /1996/.
- 7) Collins S.; Kuhn C.M.; Petro A.E.; Swick A.G.; Chruncyk B.A.; a Surwit R.S.
Role of leptin in fat regulation.
Nature; 380; 677;/1996/.

- 8) Cinsidine R.V.; Sinhe M.K.; Heimman M.L.; Kriaucinas A.;
Stephens T.W.; Nyce M.R.; Ohannesian J.P.; Marco C.C.;
McKee L.J.; Bauer T.L.; a Caro J.F.
Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-
weight and obese humans.
N.Engl.J.Med.; 334; 292 - 295; /1996/.
- 9) Felber J.P.; a Golay A.
Regulation of nutrient metabolism and energy expenditure.
Metabolism; 44; Suppl. 2; str. 5 - 9; /1995/.
- 10) Frederick R.C.; Hamann A.; Anderson S.; Lollmann B.;
Lowell B.B.; a Flier J.S.
Leptin levels reflect body lipid content in mice. Eviden-
ce for diet-induced resistance to leptin action.
Nature Med.; 1; 1311 - 1314; /1995/.
- 11) Halaas J.L.; Gajiwala K.S.; Maffei M.; Cohen S.L.; Chait
B.T.; Rabinowitz D.; Lallone R.L.; Burley S.K.; a Fried-
man J.M.
Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by
the obese gene. Viz komentář.
Scinece; 269; strana 543 - 546; /1995/.
- 12) Lee G.H.; Proenca R.; Montez J.M.; Carroll K.M.; Darvi-
shzadeh J.G.; Lee J.I.; a Friedman J.M.
Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice.
Nature; 379; 632 - 635; /1996/.
- 13) Lonquist F.; Arner P.; Nordfors I. a Schalling M.
Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue
of human obese subjects.
Nature Med.; 1; 950 - 953; /1995/.

- 14) Meffei M.; Halaas J.; Ravussin E.; Pratley R.E.; Lee G.H.; Zhang Y.; Fei H.; Kim S.; Lellone R.; Ranganathan S.; Kern P.A. & Friedman J.M.
Leptin levels in human and rodent. Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduces subjects.
Nature Med.; 1; 1155 - 1161;/1995/.

- 15) Milazzo G.; Sciatta L.; Papa V.; Goldfine I.D. & Vigneri R.
ASPB-10 insulin induction of increased mitogenic responses and phenotypic changes in human breast epithelial cells: Evidence for enhanced interaction with the insulin-like growth factor-1 receptor.

- 16) Milazzo G.; Giorgino F.; Demente G.; Sung C.; Stampfer M.R.; Vigneri R.; Goldfine I.; & Belfiore A.
Insulin receptor expression in human breast cancer cell lines.
Cancer, 52, 3924 - 3930;/1992/.

- 17) Myers M.G.Jr.; Sun X.J.; Cheatham B.; Jechna B.R.; Glasheen E.M.; Backer J.M.; & White M.F.
IRS-1 is a common element in insulin and insulin like growth factor-1 signaling to the phosphatidylinositol 3-kinase.
Endocrinology; 132; strans 1421 - 1430;/1993/.

- 18) Myers M.G.Jr.; Sun X.J.; & White M.F.
The IRS-1 signaling system.
Trends Biochem Sci.; 19; strans 289 - 293; /1994/.

- 19) Myers M.G.; Jr.; Wang L.M.; Sun X.J.; Zhang Y.; Yenush L.; Schlessinger J.; Pierce J.,H.; & White M.F.
Role of IRS-1/GRB-2 complexes in insulin signaling.
Mol. Cell Biol.; 14; strans 3577 - 3587;/1994/.

- 20) Myers M.G. Jr.; a White M.F.
The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains.
Diabetes 42; strana 43 - 50;/1993/.
- 21) Pelleymounter M.A.; Cullen M.J.; Baker M.B.; Hecht R.; Winters D.; Boone T. a Collins F.
Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice.(Viz komentář).
Science; 269; strana 540 - 543;/1995/.
- 22) Permis A.; Witthuhn B.; Keegan A.D.; Nelms K.; Garfein E.; Ihle J.N.; Paul W.E.; Pierce J.H.; a Rothman P.
Interleukin 4 signals through two related pathways.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA;92; 7971 - 7975;/1995/.
- 23) Rose D.W.; Saltiel A.R.; Majumdar M.; Decker S.J.; a Olefsky J.M.
Insulin receptor substrate-1 is required for insulin-mediated mitogenic signal transduction.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA;91; strana 797 - 801;/1994/.
- 24) Sambrook se sp.
Molecular cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor; N.Y.
- 25) Tamemoto H.; Kadowaki T.; Tobe K.; Yagi T.; Sakura H.; Hayakawa T.; Terauchi Y.; Uski K.; Aburagi Y.; Satoh S.
se sp.
Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1,(Viz komentář).
Nature; 372; strana 182 - 186;/1994/.

- 26) Tartaglia L.A.; Dembski M.; Weng X.; Deng N.H.; Culpepper J.; Devos R.; Richards G.J.; Campfield L.A.; Clark F.T.; Deeds J.; Muir C.; Senker S.; Moriarty A.; Moore K.J.; Smutko J.S.; Mays G.G.; Woolf E.A.; Monroe C.A. & Tepper R.I.
Identification and expression cloning of leptin receptor.
OB-R.
Cell; 83; 1263 - 1271;/1995/.
- 27) Weigle D.S.; Bukowski T.R.; Foster D.C.; Holderman S.; Kramer J.M.; Lesser G.; Loftonday C.E.; Prunkard D.E.; Raymond C. & Kuijper J.L.
Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse.
J.Clin.Invest.; 96; 2065 - 2070;/1995/.
- 28) White M.F. & Kahn C.R.
The insulin signaling system.
J.Biol.Chem.; 269; strane 1 - 4;/1994/.
- 29) Yin T.G.; Keller S.R.; Quelle F.W.; Witthuhn B.A.; Tseng M.L.S.; Lienhard G.E.; Ihle J.N.; & Yang Y.C.
Interleukin-9 induces tyrosine phosphorylation on insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases.
J.Biol.Chem.; 270; 20497 - 20503;/1995/.
- 30) Yin T.G.; Tseng M.L.S.; & Yang Y.C.
JAK-1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T-lymphocytes.
J.Biol.Chem.; 269; 26614 - 26617;/1994/.
- 31) Thang Y.; Proence R.; Maffei M.; Barone M.; Leopold L.; & Friedman J.M.
Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.
Nature; 372; 425 - 432;/1994/.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici proliferace nádorových buněk.
2. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro léčbu maligního bujení u savců.
3. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici nádorů, závislých na růstovém faktoru.
4. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici proliferace buněk humánního karcinomu prsu.
5. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro léčbu humánního karcinomu prsu.

6. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici růstového stimulačního působení insulínu na nádorové buňky, zprostředkovaného alespoň zčásti drahou IRS-1/GBR-2.
7. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici mitogenních odpovědí nádorových buněk na jednu nebo větší počet receptorových kináz růstových faktorů a cytokinů ze skupiny IGF-1, IL-4 a IL-9, pro něž je substrátem IRS-1.
8. Použití účinných látek ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi pro výrobu farmaceutických prostředků pro inhibici bazální a insulinem indukované proliferace nádorových buněk při léčení humánních zhoubných nádorů prsu.
9. Použití podle nároků 1 až 8, při němž je účinnou látkou leptin.
10. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako účinnou složku obsahuje účinnou látku ze skupiny leptin, leptinové fúzní proteiny, leptinové muteiny, agonisté leptinového receptoru, účinné fragmenty a frakce těchto látek, jejich účinné analogy nebo deriváty, jejich soli a jejich směsi spolu s farmaceutickým nosičem, ředidlem a pomocnými látkami a je určen pro inhibici proliferace nádorových buněk.
11. Farmaceutický prostředek podle nároku 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je určen pro léčbu maligního bujení u savců.

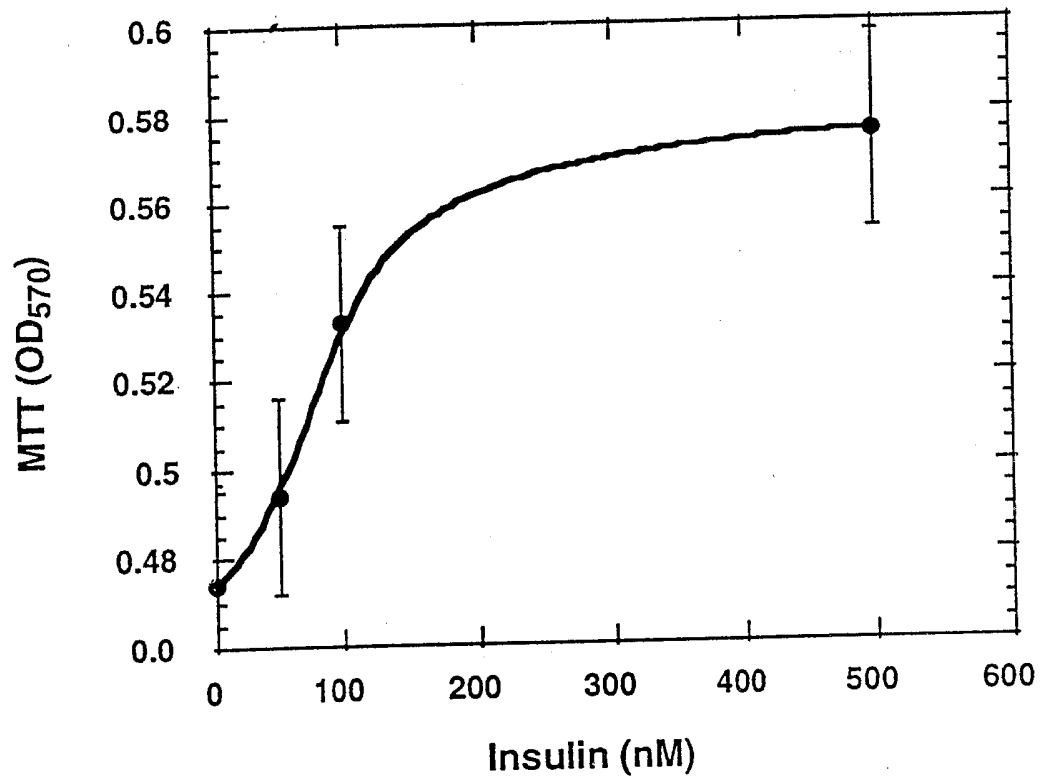
12. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 nebo 11, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je určen pro inhibici nádorů, závislých na
růstovém faktoru.
13. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 až 12, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je určen pro inhibici proliferace buněk
humánního karcinomu prsu při léčení tohoto karcinomu.
14. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 nebo 12, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je určen pro inhibici růstového stimulačního
působení insulínu na nádorové buňky, zprostředkovaného alespoň
zčásti drahou IRS-1/GBR-2.
15. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 nebo 12, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je určen pro inhibici mitogenních odpovědí
nádorových buněk na jednu nebo větší počet receptorových kináz,
růstových faktorů a cytokinů ze skupiny IGF-1, IL-4 a IL-9, pro něž je
IRS-1 substrátem.
16. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 až 15, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že je určen pro inhibici bazální a insulinem
indukované proliferace nádorových buněk při léčení humánních
zhoubných nádorů prsu.
17. Farmaceutický prostředek podle nároku 10 až 16, v y z n a -
č u j í c í s e t í m, že jako účinnou složku obsahuje leptin.

Zastupuje :

17:01:00

PV 1999-3848

1/9

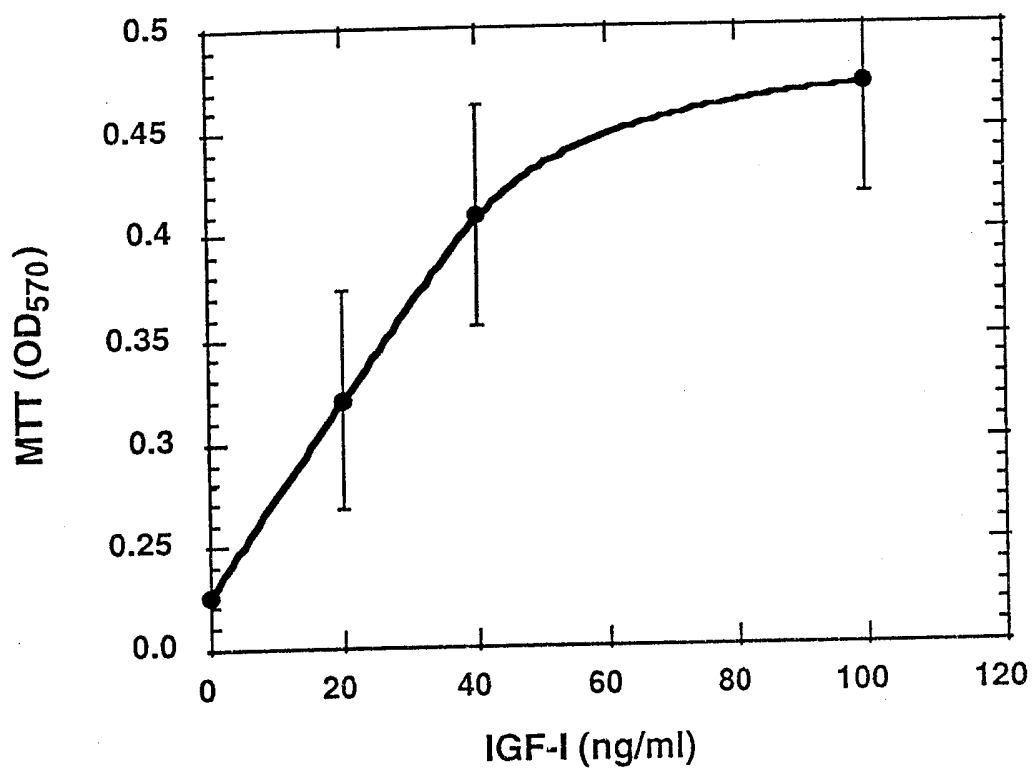


OBR. 1

17.01.00

PI 1999 - 3848

2/9

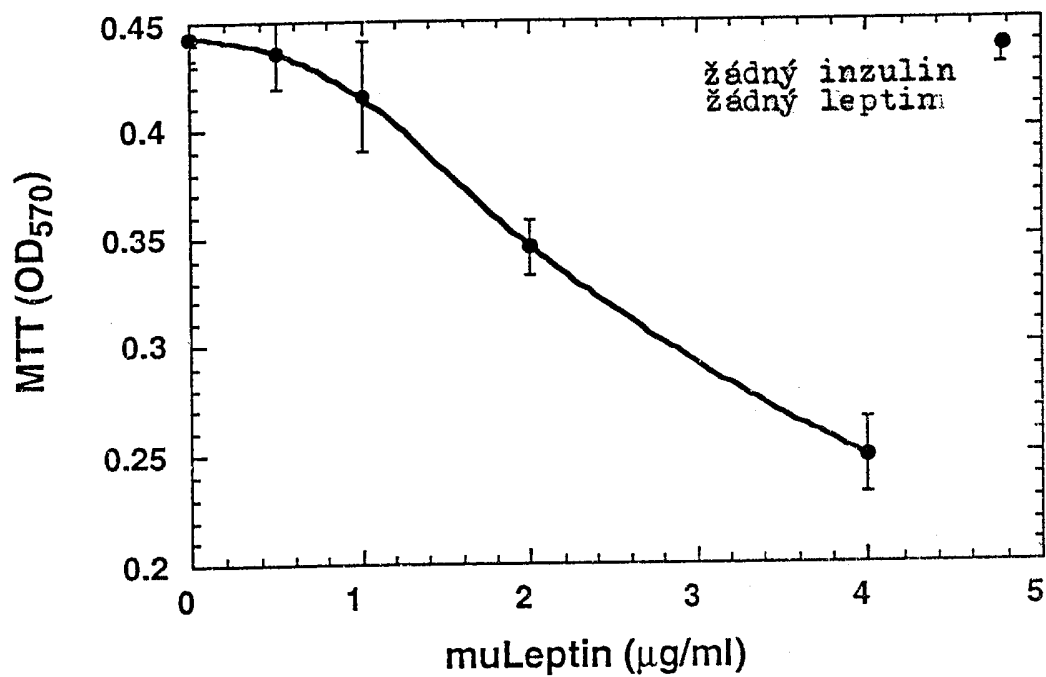


OBR. 2

17.01.00

PV 1999 - 3848

3/9

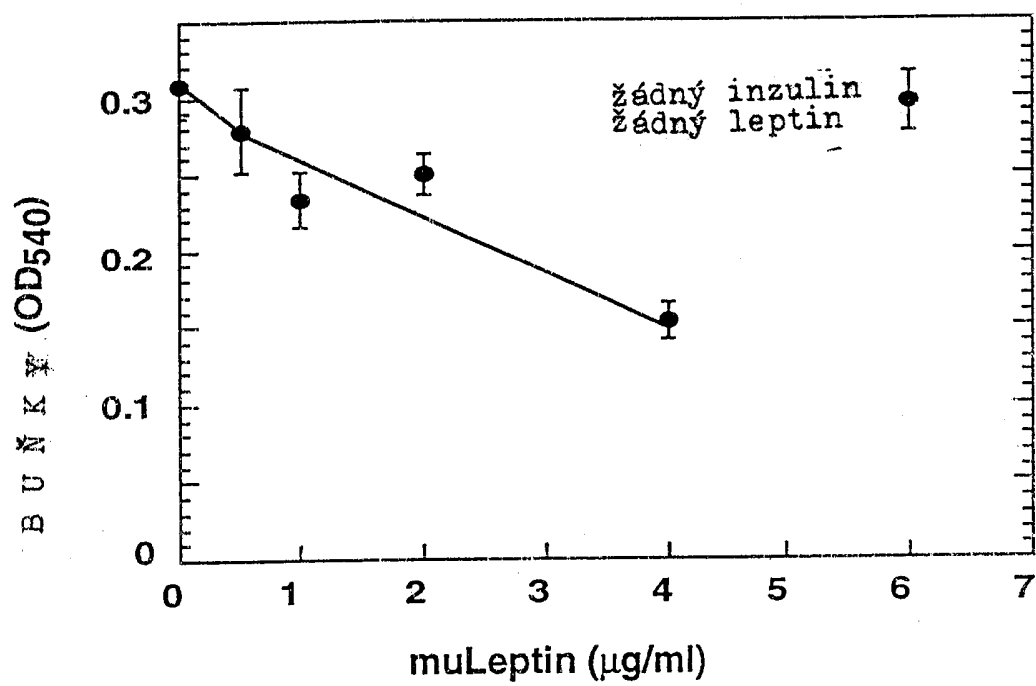


OBR. 3

17.01.00

PV 1999-3848

4/9

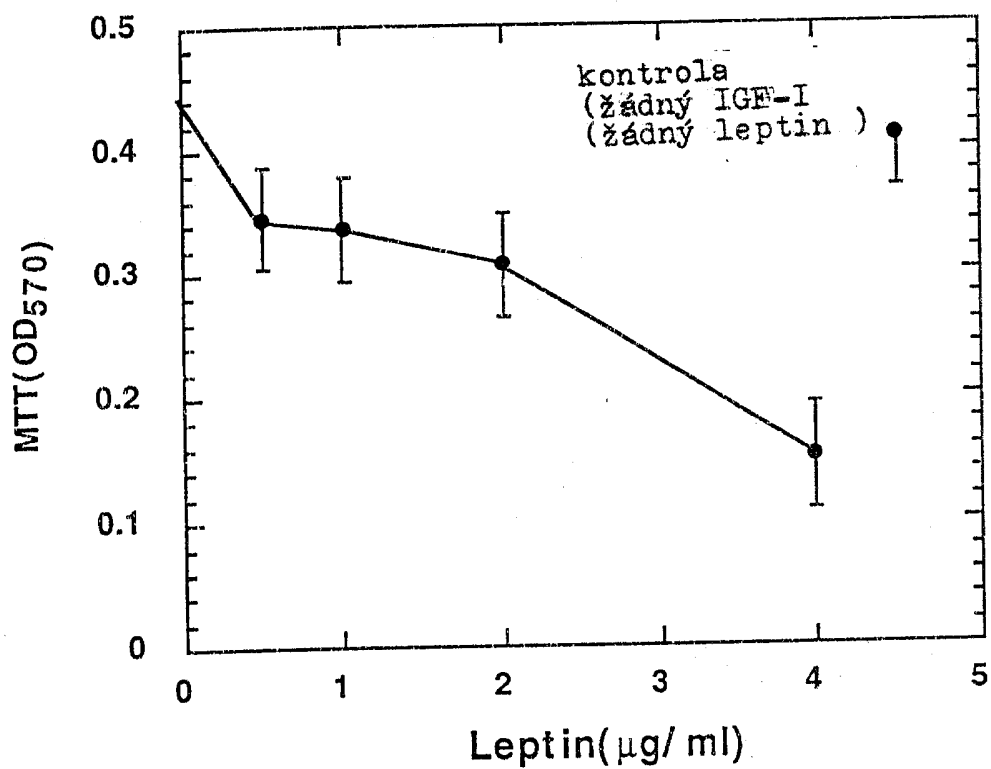


OBR. 4

17.01.00

PV 1999 - 3848

5/9

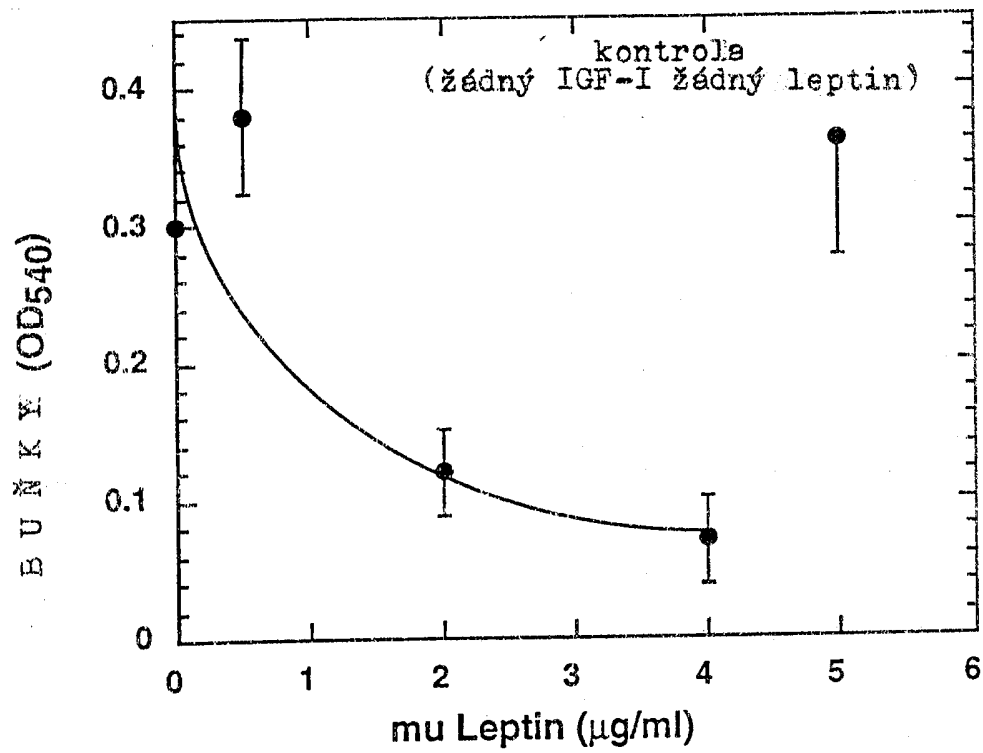


OBR. 5

17.01.00

PV 1999 - 3848

6/9

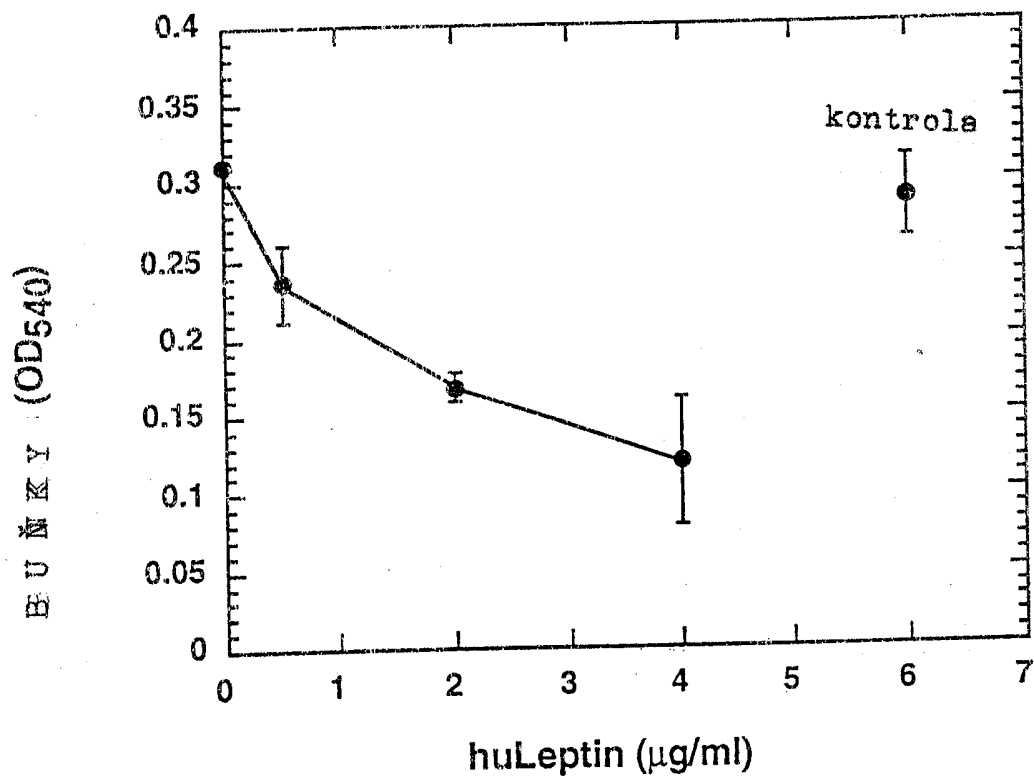


OBR. 6

17.01.00

PV 1999-3848

7/9

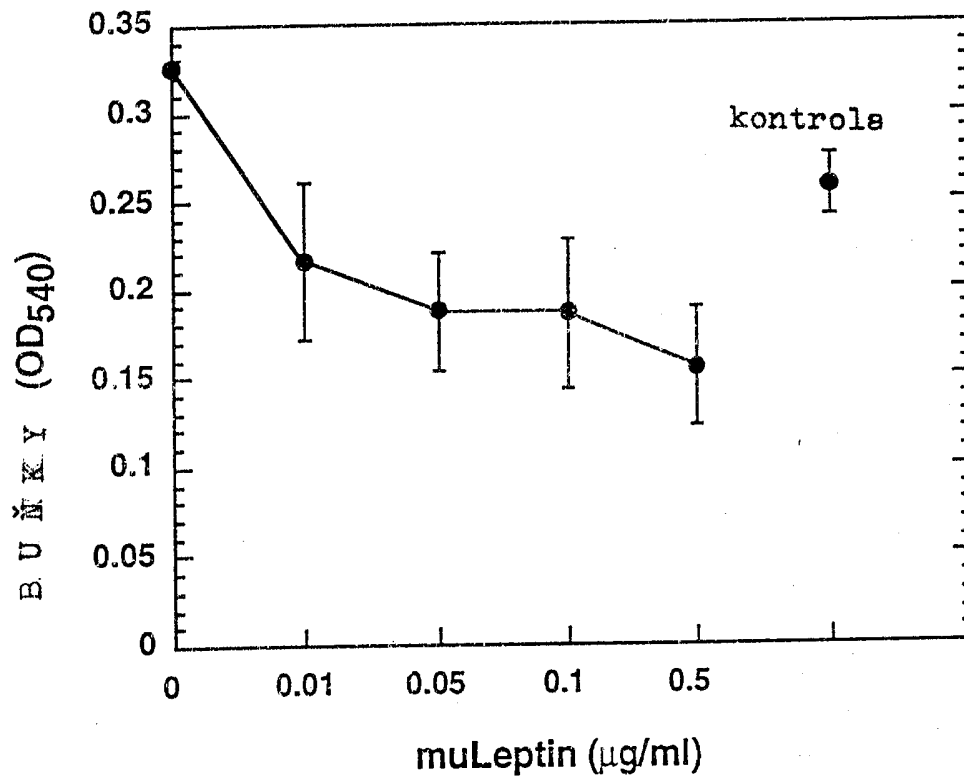


OBR. 7

17.01.00

PV 1999-3848

8/9

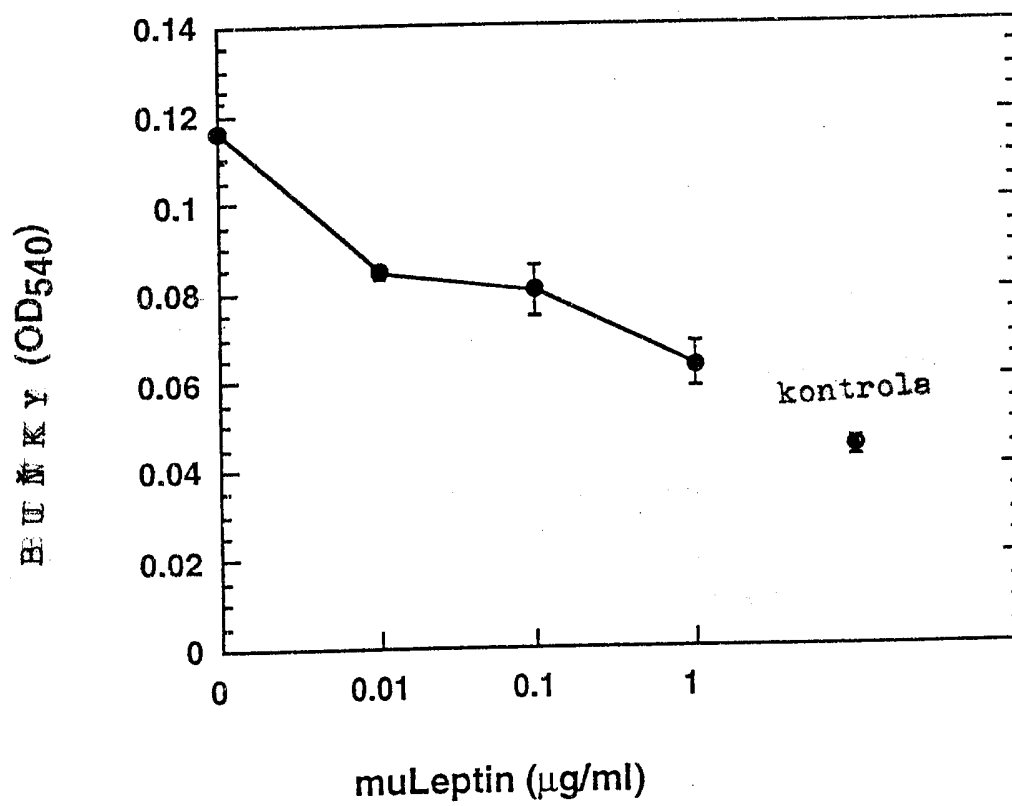


OBR. 8

17.01.00

PV 1999 - 3848

9/9



OBR. 9