PATENTOVÝ SPIS

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 1998-3426
(22) Přihlášeno: 05.05.1997
(30) Právo přednosti: 03.05.1996 US 1996/643219
03.04.1997 US 1997/832087
(40) Zveřejněno: 12.05.1999
(Věstník č. 5/1999)
(47) Uděleno: 28.06.2007
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: 08.08.2007
(Věstník č. 32/2007)
(86) PCT číslo: PCT/US1997/007700
(87) PCT číslo zveřejnění: WO 1997/041824

(11) Číslo dokumentu:
298 260
(13) Druh dokumentu: **B6**
(51) Int. Cl.:

C07K 14/00	(2006.01)
C12N 15/57	(2006.01)
C12N 9/68	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
C12P 21/06	(2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
WO 97/23500; WO 95/29243.
McCance, S.G. et al.: „Amino acid residues of the Kringle-4 and Kringle-5 domain s of human plasminogen that stabilize their interactions with omega-amino acid ligands", Journal of Biological Chemistry 269(51), 32405-32410 1994; Menhart, N. et al.: „Functional independence of the Kringle 4 and Kringle 5 regions of human plasminogen", Biochemistry 32, 8799-8806, 1993; Thewes, T. et al.: „Isolation, purification and 1H-NMR characterization of a Kringle 5 domain fragment from human plasminogen", Biochimica et Biophysica Acta 912 (2), 254-269, 1987; O'Reilly, M.S. et al.: „Angiostatin a novel anigiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma", Cell 79, 315-328, 1994.

(73) Majitel patentu:
ABBOTT LABORATORIES, Abbott Park, IL, US
THE CHILDREN'S MEDICAL CENTER CORPORATION, Boston, MA, US

(72) Původce:
Davidson Donald J., Gurnee, IL, US
Wang Jieyi, Gurnee, IL, US
Gubbins Earl J., Libertyville, IL, US
Cao Yihai, Stockholm, SE
Folkman Judah M., Brookline, MA, US
O'Reilly Michael S., Missouri City, TX, US

(74) Zástupce:
JUDr. Ing. Michal Guttmann, Nad Štolou 12, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:
Antiangiogenní peptidy, způsob jejich přípravy, polynukleotidy je kódující

(57) Anotace:
Řešení popisuje sloučeninu vzorce A-B-C-X-Y, nebo její farmaceuticky přijatelnou sůl nebo ester, kde symbol A není přítomen nebo představuje skupinu chránící dusík; symbol Y není přítomen nebo představuje skupinu chránící karboxylovou kyselinu; symboly B-C-X jsou vybrány ze skupiny sestávající ze sekvencí definovaných následujícími polohami aminokyselin z SEQ ID NO:1
(a) sekvence z pozice aminokyseliny 355 do pozice 543; (b) sekvence z pozice aminokyseliny 355 do pozice 546; (c) sekvence z pozice aminokyseliny 443 do pozice 543; (d) sekvence z pozice aminokyseliny 449 do pozice 543; (e) sekvence z pozice aminokyseliny 454 do pozice 543; (f) sekvence z pozice aminokyseliny 443 do pozice 546; (g) sekvence z pozice aminokyseliny 449 do pozice 546; (h) sekvence z pozice aminokyseliny 454 do pozice 546; (i) sekvence z pozice aminokyseliny 525 do pozice 535; (j) sekvence z pozice aminokyseliny 529 do pozice 535; (k) sekvence z pozice aminokyseliny 530 do pozice 535; (l) sekvence z pozice aminokyseliny 529 do pozice 534; (m) sekvence z pozice aminokyseliny 531 do pozice 534; (n) sekvence z pozice aminokyseliny 450 do pozice 543.
Také se popisuje kompozice obsahující uvedenou sloučeninu a farmaceuticky přijatelný excipient. Způsob přípravy uvedené sloučeniny zahrnuje kroky: (a) vystavení savčího plazminogenu účinkům elastázy v poměru přibližně 1:100 až přibližně 1:300 za vzniku směsi uvedeného plazminogenu a uvedené elastázy; (b) inkubace uvedené směsi; a (c) izolace uvedené sloučeniny z uvedené směsi.

CZ 298260 B6

Antiangiogenní peptidy, způsob jejich přípravy, polynukleotidy je kódující

Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti chemie peptidů. Vynález zvláště popisuje přípravu a použití peptidů, které obsahují aminokyselinové sekvence v podstatě podobné sekvencím odpovídajícím oblasti smyčky 5 savčího plazminogenu, dále se popisují farmaceutické kompozice, které obsahují peptidy, protilátky specifické pro receptor angiostatinu, způsoby detekce a měření angiostatinu, cytotoxická činidla spojená s proteiny angiostatinu a léčba onemocnění, které způsobuje nebo zesiluje angiogeneze.

Dosavadní stav techniky

Angiogeneze je proces tvoření nových krevních cév. Tento proces je nezbytný pro normální tělní aktivity, jako je reprodukce, vývoj a hojení ran. Ačkoli tento proces není zcela objasněn, věří se, že zahrnuje vzájemné působení molekul, které regulují růst endoteliálních buněk (primární buňky krevních kapilár). Za normálních podmínek tyto molekuly udržují po dlouhou dobu mikrovaskularizaci ve stadiu klidu (to znamená netvoří se další kapiláry), což může trvat týdny nebo ve stejných případech dekády. Když je to nezbytné (např. během hojení ran), se tyto buňky začnou rychle množit, přičemž tato změna proběhne během 5 dnů (Folkman, J. a Shing, Y., The Journal of Biological Chemistry, 267 (16), 10931–10934, a Folkman, J. and Klagsbrun, M., Science, 235, 442–447 (1987).

Ačkoli angiogeneze je za normálních podmínek vysoce regulovaný proces, řada onemocnění (které jsou charakterizovány jako angiogenní onemocnění) se řídí trvalou neregulovanou angiogenezí. Jinak řečeno neregulovaná angiogeneze může buď způsobit určité onemocnění přímo nebo zhoršit existující patologické podmínky. Například oční neovaskularizace se uvádí jako jeden z nejběžnějších důvodů slepoty a dominuje přibližně při 20 onemocněních očí. Při určitých onemocněních, jako je artritida, se v kloubech tvoří nové krevní kapiláry, jež poškozují chrupavku. Při cukrovce se nové kapiláry tvoří v sítnici, prorůstají do sklivce, krvácejí a způsobují slepotu. Růst a metastázy pevných nádorů také závisí na angiogenezi (Folkman, J., Cancer research, 46, 467–473 (1986), Folkman, J., Journal of the National Cancer Institute, 82, 4–6 (1989). Ukázalo se například, že nádory, které dosahují velikosti větší než 2 mm, musí mít svůj vlastní přívod krve a proto indukují růst nových krevních kapilár. Jestliže uvedené nové krevní cévy jednou v nádoru vzniknou, je to způsob jak nádorové buňky vstupují do krevního systému a metastázují ve vzdálených místech, jako jsou játra, plíce nebo kosti (Weidner, N., et al., The New England Journal of Medicine, 324 (1): 1–8 (1991)).

Do dnešní doby se popsalo a charakterizovalo několik přirozeně se vyskytujících angiogenních faktorů (Fidler, J. I. and Ellis, L. M., Cell, 79: 185–189 (1994)). O'Reilly a kol. izoloval a purifikoval ze séra a moče myší, které nesou nádor, protein o molekulové hmotnosti 38 kDa, jenž inhibuje proliferaci endoteliálních buněk (O'Reilly, M., et al., Cell, 79: 315–328 (1994) a mezinárodní přihláška WO 95/29242, zveřejněná 2. listopadu 1995). Mikrosekvenční analýza uvedeného endoteliálního inhibitoru vykazuje 98% sekvenční homologii s interním fragmentem myšího plazminogenu. Angiostatin, jak se pojmenoval myší inhibiční fragment, je peptid, který zahrnuje první čtyři smyčkové oblasti myšího plazminogenu. Fragment peptidu ze stejné oblasti lidského plazminogenu (to znamená, že obsahuje smyčky 1 až 4) také silně inhibuje proliferaci endoteliálních buněk kapilár *in vitro* a *in vivo*. Neporušený plazminogen, ze kterého se uvedený peptidový fragment získal, nevykazuje tak silný inhibiční účinek.

V současné době se vyvíjí několik inhibitorů angiogeneze za účelem použití při léčbě angiogenních onemocnění (Gasparini, G. and Harris, A. L., J. Clin. Oncol., 13 (3): 765–782, (1995)), ale jsou zde nevýhody související s těmito sloučeninami. Suramin je například silný inhibitor angiogeneze, ale způsobuje u lidí silnou systémovou toxicitu, když se aplikuje v dávkách, které jsou

nutné při protinádorové aktivitě. Látky jako jsou retinoidy, interferony a antiestrogeny jsou pro lidi bezpečné, ale mají slabé angiogenní účinky. Příprava jiných látek je stále obtížná nebo drahá.

Proto je nutné získat látky pro léčbu angiogenních onemocnění u savců. Přesněji je nutné získat inhibitory angiogeneze, které jsou bezpečné při léčebném použití a které vykazují selektivní toxicitu s ohledem na patologické podmínky, jako je selektivní inhibice proliferace endoteliálních buněk, zatímco nevykazují žádný stupeň toxicity nebo nízkou toxicitu k normálním buňkám (to znamená k nekarcinogenním buňkám). Příprava takových látek by měla být jednoduchá a laciná.

Podstata vynálezu

Ve svém základním provedení vynález popisuje látku obsahující smyčku 5 peptidu, která je reprezentována strukturním vzorcem A–B–C–X–Y (I) nebo její farmaceuticky přijatelnou solí, esterem nebo proléčivem, kde A, B, C, X a Y mají význam definovaný v nároku 1.

Vynález také zahrnuje použití sloučeniny obsahující fragment peptidu smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5 pro přípravu léčebného prostředku pro ošetření pacienta při potřebě takového ošetření.

Vynález také zahrnuje kompozici pro léčbu pacienta, který potřebuje antiangiogenní léčbu. Tato kompozice zahrnuje látku obsahující peptidový fragment smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5, receptorové agonisty a antagonisty smyčky 5 a antagonisty smyčky 5 spojené s cytotoxickými činidly, buď samotnými nebo v kombinaci s farmaceuticky přijatelným excipientem a/nebo s volitelně uvolňovanými látkami za vzniku terapeutické kompozice.

Vynález dále popisuje kompozici pro léčbu onemocnění vybraných ze skupiny zahrnující rakovinu, artritidu, makulární degeneraci a diabetickou retinopatii, přičemž tato kompozice obsahuje peptidový fragment smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5.

Vynález také zahrnuje kompozici obsahující izolovanou jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou polynukleotidovou sekvenci, která kóduje peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5. Takovým polynukleotidem je výhodně molekula DNA. Vynález také zahrnuje vektor obsahující sekvenci DNA kódující peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5, kde vektor je schopný exprimovat peptidový fragment smyčky nebo fúzní protein smyčky 5, je-li přítomen v buňce, přičemž buňka obsahuje kompozici, jež začleňuje vektor, který obsahuje sekvenci DNA kódující peptidový fragment smyčky nebo fúzní protein smyčky 5. Vynález dále zahrnuje buňku podle nároku 14.

Vynález také zahrnuje způsob přípravy peptidového fragmentu smyčky 5 zahrnující kroky: (a) vystavení savčího plazminogenu lidské nebo prasečí elastáze v poměru přibližně 1 : 100 až přibližně 1 : 300 za vzniku směsi uvedeného plazminogenu a uvedené elastázy; (b) inkubace uvedené směsi a (c) izolace peptidového fragmentu smyčky 5 z uvedené směsi.

Vynález také zahrnuje způsob přípravy peptidového fragmentu smyčky 5 obsahující kroky: (a) vystavení savčího plazminogenu lidské nebo prasečí elastáze v poměru elastáza : plazminogen přibližně 1 : 100 až přibližně 1 : 300 za vzniku směsi uvedeného plazminogenu a uvedené elastázy; (b) inkubace uvedené směsi a (c) izolace proteinového konjugátu peptidového fragmentu smyčky 5 z uvedené směsi; (d) vystavení uvedeného proteinového konjugátu peptidového fragmentu smyčky 5 pepsinu v poměru přibližně 1 : 0,2 za vzniku směsi uvedeného pepsinu a uvedeného plazminogenu a (d) izolace uvedeného peptidového fragmentu smyčky 5 ze směsi. V jiném případě peptidový fragment smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5 se může připravit způsobem, který obsahuje kroky: (a) izolace polynukleotidu, který kóduje uvedený peptidový fragment smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5; (b) klonování polynukleotidu do expresivního vektoru; (c) transformace vektoru do vhodné hostitelské buňky; a kultivace hostitelské buňky za

podmínek vhodných pro expresi rozpustného peptidového fragmentu smyčky 5 nebo fúzního proteinu smyčky 5.

Přehled obrázků na výkrese

Obr. č. 1 zobrazuje aminokyselinovou sekvenci lidského plazminogenu (SEQ ID NO: 1).

Obr. č. 2 zobrazuje komparativní homologii aminokyselinových sekvencí lidské (SEQ ID NO: 34), myší (SEQ ID NO: 35), makak rhesus (SEQ ID NO: 36), hovězí (SEQ ID NO: 37) a prasečí (SEQ ID NO: 38) smyčky 5.

Obr. č. 3 zobrazuje sekvenci DNA (SEQ ID NO: 12) lidského plazminogenu.

Obr. č. 4 zobrazuje graf anti–proliferační aktivity jedné dávky různých fragmentů smyčky na bovinní kapilární endoteliální buňky (BCE), které se testovaly *in vitro* v testu proliferace buněk.

Obr. č. 5 zobrazuje mapu expresivního vektoru pHil–D8, která obsahuje vedoucí sekvenci pro sekreci rekombinantního proteinu.

Obr. č. 6 zobrazuje fotografii SDS–PAGE gel obarvený Coomassieovou modří supernatantů (do jedné dráhy se naneslo 10 μl) kultury *Pichia pastoris* exprimující peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5– Dráhy 1, 6 a 10 obsahují negativní kontroly, dráhy 2, 3 a 4 obsahují tři odlišné klony exprimující K5A; dráha 5 obsahuje klon exprimující K5F; dráhy 7 a 8 obsahují klony exprimující K4–5A; dráha 9 obsahuje klon exprimující K4–5F. Šipky indikují pruhy proteinů K5A (přibližná molekulová hmotnost je 11 000) a K4–5F (přibližná molekulová hmotnost je 20 000). Markery molekulových hmotností jsou naneseny v drahách, které předcházejí drahám 1 a 10.

Obr. č. 7 zobrazuje naskenovaný SDS–PAGE gel odbarvený Coomasie blue kmenů *E. coli* exprimující peptidový fragment a fúzní protein smyčky 5. Není-li jinak uvedeno každá dráha obsahuje 10 μl kultury, která je ekvivalentní hodnotě 10 absorbance při vlnové délce 600 nm. Dráha 1 obsahuje markery nízkých molekulových hmotností. Dráha 2 obsahuje celkovou kulturu K5A/pET32a; dráha 3 obsahuje celkovou kulturu K5A/pET32a (nanesla se 1/10 množství, které je obsaženo v dráze 2); dráha 4 obsahuje rozpustnou frakci K5A/pET32a; dráha 5 obsahuje nerozpustnou frakci K5A/pET32a; dráha 6 obsahuje celkovou kulturu K4–5A/pET32a; dráha 7 obsahuje celkovou kulturu K4–5A/pET32a (nanesla se 1/10 množství, které je obsaženo v dráze 6); dráha 8 obsahuje rozpustnou frakci K4–5A/pET32a; dráha 9 obsahuje nerozpustnou frakci K4–5A/pET32a; dráha 10 obsahuje celou kulturu K4–5A/pGEX–4T–2; dráha 11 obsahuje rozpustnou frakci K4–5A/pGEX–4T–2; dráha 12 obsahuje nerozpustnou frakci K4–5A/pGEX–4T–2; dráha 13 standard smyčky 5; dráha 14 obsahuje markery vysokých molekulových hmotností.

Termín „smyčka 5" (K5) znamená oblast savčího plazminogenu, která má tři disulfidové můstky, které se podílejí na specifické třídimenziální konformaci definované oblastí smyčky 5 molekuly savčího plazminogenu. Jeden takový disulfidový můstek se váže na cysteinové zbytky, které se nacházejí v pozicích aminokyselin 462 a 541, druhý můstek se váže na cysteinové zbytky umístěné v pozicích aminokyselin 483 a 524 a třetí se váže na cysteinové zbytky umístěné v pozicích aminokyselin 512 a 536. Na obr. č. 1 (SEQ ID NO: 1) je zobrazena aminokyselinová sekvence celé molekuly savčího plazminogenu (molekula lidského plazminogenu).

Termín „fragment peptidu smyčky 5" znamená peptid mezi aminokyselinami 4 a 104 (včetně) s podstatnou sekvenční homologií s odpovídajícím peptidovým fragmentem savčího plazminogenu, jehož α–N–konec se nachází přibližně v aminokyselinové poloze 443 intaktního savčího plazminogenu a α–C–konec je v poloze 546. Celková délka peptidového fragmentu smyčky 5 může být různá v závislosti na způsobu, kterým se peptid smyčky 5 získal nebo se může lišit sekvencí v závislosti na species, ze kterých se získal. Jisté formy peptidových fragmentů smyčky 5 se mohou produkovat proteolytickým štěpením glu–plazminogenu, lys–plazminogenu nebo miniplazminogenu za použití enzymů lidské nebo prasečí elastázy. Když se připravují uvedeným

způsobem, α–C–konec peptidových zbytků se nachází okolo aminokyseliny 543 SEQ ID NO: 1, ale α–N–konec aminokyseliny může začínat v pozici aminokyseliny 443, 449 nebo 454. Fragment peptidu smyčky 5, jestliže je výsledek štěpení glu–plazminogenu, lys–plazminogenu nebo miniplazminogenu lidskou nebo prasečí elastázou, může mít celkovou délku 101, 95 nebo 90 aminokyselin. Souhrn těchto fragmentů peptidu smyčky 5 je uveden v tabulce č. 1. Když se postupuje shora uvedeným způsobem, získá se směs těchto tří fragmentů, kde přibližně 60 % fragmentů má délku 95 aminokyselin, přibližně 35 % fragmentů má délku 101 aminokyselin a přibližně 5 % fragmentů má délku 90 aminokyselin. Je-li to nutné tyto různé fragmenty se mohou dále čistit na HPLC s reverzní fází, což je metoda dobře známá v oboru. Nehledě na tyto odlišnosti v délce, peptidový fragment K5 podle vynálezu zahrnuje buď sekvenci Lys–Leu–Tyr–Asp (to znamená z pozice aminokyseliny 531 až do pozice aminokyseliny 534 sekvence SEQ ID NO: 1) nebo Asn–Pro–Asp–Gly–Asp–Val–Gly–Gly–Pro–Trp (to znamená z pozice aminokyseliny 514 až do pozice aminokyseliny 523 sekvence SEQ ID NO: 1) nebo jeho analogy.

Termín „fúzní protein smyčky 5" znamená polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci získanou ze dvou nebo více jednotlivých proteinů, přičemž jeden z nich je peptidový fragment K5. Fúzní protein se tvoří expresí polynukleotidu, jehož kódující sekvence fragmentu peptidu smyčky 5 je spojena s kódující sekvencí jednoho dalšího polypeptidu tak, že v rámci jsou dva (nebo více) čtecích rámců. Preferují se ty fúzní proteiny smyčky 5, kde fragment peptidu smyčky 5 se fúzoval s odpovídající sekvencí lidského plazminogenu, jako je smyčka 4 (K4), smyčky 3 až 4 (K3–4), smyčky 2 až 4 (K2–4) a smyčky 1 až 4 (K1–4). Preferovaný fúzní protein K5 je tvořen smyčkami 4 až 5 (K4–5). Jiné příklady fúzních proteinů smyčky 5 podle vynálezu zahrnují peptidový fragment K5 nebo K4–5 připojený k biologické značce („tag"). Takové fúzní proteiny mohou nebo nemusí být štěpitelné na jednotlivé proteiny, z kterých se získaly.

Termín „konjugát peptidového fragmentu K5" znamená fragment peptidu smyčky K5, který je chemicky spojen s jiným proteinem za vzniku konjugátu. Příklady konjugátů peptidových fragmentů smyčky 5 zahrnují peptidový fragment smyčky 5 spojený s albuminem nebo s peptidovým fragmentem z jiné oblasti smyčky savčího plazminogenu. Molekulové hmotnosti konjugátů peptidových fragmentů smyčky 5 jsou v rozsahu přibližně od 1000 a 25 000.

Termín „podstatná sekvenční homologie" znamená přibližně 60% shodnost aminokyselin, preferuje se alespoň přibližně 70% shodnost aminokyselin, více se preferuje přibližně 80% shodnost aminokyselin, nejvíce se preferuje přibližně 95% shodnost aminokyselin odpovídající peptidové sekvence lidského plazminogenu. Sekvence, které vykazují podstatnou sekvenční homologii s lidským plazminogenem, jsou označovány jako „homologní". Vedle podstatné sekvenční homologie vykazují homology podle vynálezu podobnou biologickou aktivitu (to znamená anti–angiogenní aktivitu) jako zde popsaňé fragmenty peptidů K5. Protože aminokyselinové sekvence nebo počet aminokyselin v peptidovém fragmentu smyčky 5 se může lišit v závislosti na species nebo v závislosti na metodě, která se použila při produkci, je obtížné stanovit přesné celkové množství aminokyselin v peptidovém fragmentu smyčky 5. Je-li dáno, že tyto sekvence jsou svými aminokyselinami identické ze 73 %, rozumí se, že aminokyselinová sekvence peptidového fragmentu smyčky 5 je v podstatě mezi species podobná a že způsoby produkce peptidových fragmentů smyčky 5 poskytují peptidové fragmenty smyčky 5 s podstatnou sekvenční homologií k odpovídajícím aminokyselinovým sekvencím lidského plazminogenu. Obr. č. 2 zobrazuje srovnání aminokyselinové sekvence peptidového fragmentu lidské smyčky 5, která má 95 aminokyselin (SEQ ID NO: 34) se sekvencemi fragmentů smyčky 5 pocházející z plazminogenu myší (SEQ ID NO: 35), makak rhesus (SEQ ID NO: 36), hovězího dobytka (SEQ ID NO: 37) a prasete (SEQ ID NO: 38).

Vynález dále uvádí sekvence aminokyselinových zbytků, které jsou analogy zde uvedených sekvencí tak, že tyto sekvence (analogy) demonstrují podobnou biologickou aktivitu peptidových fragmentů smyčky 5 a jejich fúzních proteinů. Je dobře známo, že k modifikacím a změnám může dojít, aniž se podstatně změní biologické funkce takového peptidu. Při takových změnách se mohou provést substituce podobných aminokyselinových zbytků na základě relativní podob-

nosti substituentů vedlejšího řetězce, např. jejich velikost, náboj, hydrofobicita, hydrofilicita a podobně. Popsané změny se mohou provést zvýšením potence peptidu nebo jeho stability vzhledem k působení enzymů nebo farmakokinetiky. Uvažované sekvence podle vynálezu zahrnují ty analogové sekvence charakterizované změnou sekvence aminokyselinových zbytků nebo typ, kde změna nemění základní podstatu a biologickou aktivitu dříve zmíněných peptidových fragmentů K5 a/nebo fúzních proteinů.

Peptidový fragment K5 nebo fúzní protein K5 podle vynálezu se může charakterizovat na základě potence, kdy se testovala jeho schopnost inhibovat růst bovinních kapilárních buněk (BCE) *in vitro*. Data v tabulce č. 1 a na obr. č. 4 ukazují, že peptidový fragment K5 má sekvenci od pozice aminokyseliny 443 do pozice aminokyseliny 543 SEQ ID NO: 1, což ukazuje na přibližně 300násobné zvýšení aktivity (to znamená aktivity při inhibici proliferace buněk BCE) ve srovnání s peptidovým fragmentem, který má sekvenci od pozice aminokyseliny 443 do pozice aminokyseliny 546 sekvence SEQ ID NO: 1 a přibližně 800násobné zvýšení aktivity ve srovnání s peptidovými fragmenty 1 až 4.

Termín „izolovaný" znamená, že se materiál odstranil ze svého původního prostředí (např. jestliže jde o přirozeně se vyskytující materiál odstraňovaný z přirozeného prostředí). Například přirozeně se vyskytující polynukleotid nebo polypeptid přítomný v živých organizmech není izolován, ale je izolován stejný polynukleotid nebo DNA nebo polypeptid, který se separoval z některého nebo ze všech koexistujících materiálů v přirozeném systému. Takový polynukleotid může být součástí vektoru a/nebo takový polynukleotid nebo polypeptid může být součástí kompozice a stále se může izolovat, i když vektor nebo kompozice není částí jeho přirozeného prostředí.

Termín „primer" znamená specifickou oligonukleotidovou sekvenci komplementární s cílovou nukleotidovou sekvencí, která primer používá při hybridizaci s cílovou nukleotidovou sekvencí a slouží jako počáteční bod polymerizace nukleotidů, která je katalyzována buď DNA polymerázou, RNA polymerázou nebo reverzní transkriptázou.

Termín „sonda" znamená definovanou část nukleové kyseliny (nebo část analogu nukleové kyseliny, tj. PNA), která se může použít k identifikaci specifické DNA přítomné ve vzorcích, které nesou komplementární sekvenci.

Termín „rekombinantní polypeptid" znamená alespoň polypeptid, který svým původem nebo manipulací není spojen s celým nebo s částí polypeptidu, se kterým je v přírodě spojován a/nebo je spojen s jiným polypeptidem, než je ten, se kterým je spojován v přírodě. Není nezbytné, aby rekombinantní nebo odvozený polypeptid byl translatován z určené sekvence nukleové kyseliny. Toho lze také dosáhnout libovolným způsobem, který zahrnuje chemickou syntézu nebo expresi rekombinantního expresivního systému.

Termín „syntetický peptid" se zde užívá ve smyslu polymerní formy aminokyselin v libovolné délce, která může být syntetizována chemicky způsoby, které jsou dobře známy v oboru. Tyto syntetické peptidy se mohou použít při různých aplikacích.

„Čištěný polynukleotid" znamená polynukleotid nebo jeho fragment, který je v podstatě volný, to znamená, že obsahuje méně než 50 %, s výhodou méně než asi 70 % a upřednostňuje se méně než asi 90 % proteinu, se kterým je polynukleotid přirozeně spojován. Způsoby čištění požadovaných polynukleotidů jsou dobře známy v oboru a zahrnují například distribuci buněk obsahujících polynukleotid s chaotropním činidlem a separaci polynukleotidu(ů) a proteinů ionexovou chromatografií, afinitní chromatografií a sedimentací podle hustoty. Termín „čištěný polypeptid" pak znamená polypeptid nebo jeho fragment, který je v podstatě volný, což znamená, že obsahuje méně než asi 50 %, s výhodou méně než asi 70 % a upřednostňuje se méně než asi 90 % buněčných složek, se kterými je požadovaný polynukleotid přirozeně spojován. Způsoby čištění jsou v oboru dobře známy.

Termín „polypeptid" znamená molekulový řetězec aminokyselin, přičemž neříká nic o specifické délce produktu. Tudíž do definice peptidu spadají peptidy, oligopeptidy a proteiny. Tento termín se také vztahuje na post–expresivní modifikace polypeptidu, například glykosylace, acetylace, fosforylace a podobně.

Termín „rekombinantní hostitelské buňky", „hostitelské buňky", „buňky", „buněčné linie", „buněčné kultury" a jiné takové termíny označující mikroorganizmy nebo buněčné linie vyšších eukaryontů kultivované jako unicelulární entyty, které znamenají buňky, jež mohou být nebo mohou mít nebo se mohou používat jako recipienty rekombinantního vektoru nebo jiné transferované DNA a zahrnují původní progen původní buňky, která se transferovala.

Termín „replikon" znamená libovolný genetický element, jako je plazmid, chromozom nebo virus, který se v buňce chová jako autonomní jednotka replikace polynukleotidů.

Termín „vektor" je replikon, ve kterém se připojí jiný polynukleotidový segment tak, aby došlo k replikaci a/nebo expresi připojeného segmentu.

Termín „řídicí sekvence" pak zahrnuje polynukleotidové sekvence, které jsou nezbytné k ovlivnění exprese kódujících sekvencí, do kterých jsou ligovány. Podstata takových řídicích sekvencí se liší v závislosti na hostitelském organizmu. U prokaryontů takové řídicí sekvence obecně zahrnují promotor, ribozomální vazebné místo a terminátory; u eukaryontů takové kontrolní sekvence obecně zahrnují promotory, terminátory a v některých případech zesilovače. Termín „řídicí sekvence" tedy zahrnuje minimálně všechny komponenty, jejichž přítomnost je nezbytná při expresi a může také zahrnovat další komponenty, jejichž přítomnost je výhodná například vedoucí sekvence.

Termín „operabilně spojená" popisuje situaci, kde popsané komponenty jsou ve vztahu, který jim umožňuje fungovat zamýšleným způsobem. Tak například kontrolní sekvence „operabilně spojená" s kódující sekvencí se ligovala tak, že exprese kódující sekvence je dosažena za podmínek kompatibilních s řídicími sekvencemi.

Termín „otevřený čtecí rámec" nebo „ORF" znamená oblast polynukleotidové sekvence, která kóduje polypeptid; tato oblast může reprezentovat část kódující sekvence nebo celou kódující sekvenci.

Termín „kódující sekvence" je polynukleotidová sekvence, která se, je-li řízena vhodnou regulační sekvencí, přepisuje na mRNA a překládá se do polypeptidu. Hranice kódující sekvence jsou určeny kodonem počátku translace na 5'–konci a translačním stop kodonem na 3'–konci. Kódující sekvence může zahrnovat mRNA, cDNA a rekombinantní polynukleotidové sekvence.

Termín „transformace" znamená začlenění exogenního polynukleotidu do hostitelské buňky bez ohledu na způsob začlenění inzertu. Transformace může být provedena přímým pohlcením, transdukcí nebo f–spojením. Exogenní polynukleotid se může udržet jako neintegrovaný vektor, například plazmid, nebo v jiném případě se může integrovat do hostitelského genomu.

Termín „čištěný produkt" znamená přípravu produktu, který se separoval od buněčných konstituentů, se kterými je produkt normálně spojen a od jiných typů buněk, jež se mohou vyskytovat ve vzorku.

Všechny peptidové sekvence jsou popsány podle obecně přijaté úmluvy, přičemž na levé straně je aminokyselinový zbytek α–N–konce a na pravé straně je aminokyselinový zbytek α–C–konce. Termín „α–N–konec" znamená volnou alfa–aminoskupinu aminokyseliny v peptidu a termín „α–C–konec" znamená konec volné alfa–karboxylové kyseliny aminokyseliny peptidu.

Termín „N–chránicí skupina“ znamená ty skupiny, které chrání α–N–terminální aminokyselinu nebo peptid nebo jiný způsob ochrany aminoskupiny aminokyseliny peptidu před nežádoucími reakcemi během syntetických postupů. Běžně používané N–chránicí skupiny jsou uvedeny v publikaci Greene, „Protective Groups In Organic Synthesis“ (John Wiley and Sons, New York (1981).

Chránicí skupiny se mohou navíc použít jako proléčiva, která se snadno štěpí *in vivo* například enzymatickou hydrolýzou, přičemž se uvolňuje biologicky aktivní mateřská sloučenina. N–chránicí skupiny obsahují nižší alkanoylové skupiny, jako je formyl, acetyl („Ac“), propionyl, pivaloyl, t–butylacetyl a podobně; jiné acylové skupiny zahrnují 2–chloracetyl, 2–bromacetyl, trifluoracetyl, trichloracetyl, ftalyl, o–nitrofenoxyacetyl, α–chlorbutyryl, benzoyl, 4–chlorbenzoyl, 4–brombenzoyl, 4–nitrobenzoyl a podobně; sulfonylové skupiny, jako je benzensulfonyl, p–toluensulfonyl a podobně; skupiny tvořící karbamát, jako je benzyloxykarbonyl, p–chlorbenzyloxykarbonyl, p–methoxybenzylkarbonyl, p–nitrobenzyloxykarbonyl, 2–nitrobenzyloxykarbonyl, p–brombenzyloxykarbonyl, 3,4–dimethoxybenzyloxykarbonyl, 3,5–dimethoxybenzyloxykarbonyl, 2,4–dimethoxybenzyloxykarbonyl, 4–dimethoxybenzyloxykarbonyl, 2–nitro–4,5–dimethoxybenzyloxykarbonyl, 3,4,5–trimethoxybenzyloxykarbonyl, 1–(p–bifenylyl)–1–methylethoxykarbonyl, α,α–dimethyl–3,5–dimethoxybenzyloxykarbonyl, benzhydryloxykarbonyl, t–butyloxykarbonyl, diizopropylmethoxykarbonyl, izopropyloxykarbonyl, ethoxykarbonyl, methoxykarbonyl, allyloxykarbonyl, 2,2,2–trichlorethoxykarbonyl, fenoxykarbonyl, 4–nitrofenoxykarbonyl, fluorenyl–9–methoxykarbonyl, cyklopentyloxykarbonyl, adamantyloxykarbonyl, cyklohexyloxykarbonyl, fenylthiokarbonyl a podobně; arylalkylové skupiny jako je benzyl, trifenylmethyl, benzyloxymethyl, 9–fluorenylmethyloxykarbonyl (Fmoc) a podobně a silylové skupiny, jako je trimethylsilyl a podobně. Preferovanými N–chránicími skupinami jsou formyl, acetyl, benzoyl, pivaloyl, t–butylacetyl, fenylsulfonyl, benzyl, t–butyloxykarbonyl (Boc) a benzoyloxykarbonyl (Cbz). Lysin může být například chráněn na α–N–konci skupinou, která je labilní v kyselém prostředí (např. Boc) a na ε–N–konci skupinou, která je labilní v zásaditém prostředí (např. Fmoc), pak se mohou tyto chránicí skupiny odstranit selektivně během syntézy.

Termín „karboxy–chránicí skupina“ znamená esterovou nebo amidovou skupinu chránicí karboxylovou kyselinu. Tyto uvedené skupiny blokují nebo chrání funkčnost karboxylové kyseliny, zatímco se do reakce zapojují jiná funkční místa sloučeniny. Karboxy–chránicí skupiny jsou uvedeny v publikaci Greene, „Protective Groups In Organic Synthesis“ s. 152–186 (1981). Skupiny chránící karboxylovou skupinu se mohou navíc použít jako proléčiva, která se snadno štěpí *in vivo* například enzymatickou hydrolýzou za uvolnění biologicky aktivní mateřské sloučeniny. Takové karboxy–chránicí skupiny jsou dobře známy v oboru, používají se ve velkém rozsahu při ochraně karboxylových skupin u penicilinu a cefalosporinu, jak se popisuje v publikacích US 3 840 556 a US 3 719 667. Reprezentativní karboxy–chránicí skupiny jsou C_1–C_8 nižší alkyl (např. methyl, ethyl nebo t–butyl); arylalkyl, jako je fenethyl nebo benzyl a jejich substituované deriváty, jako je alkoxybenzylové nebo nitrobenzylové skupiny; arylalkenyl, jako je fenylethenyl; aryl a substituované deriváty, jako je 5–indanyl; dialkylaminoalkyl, jako je dimethylaminoethyl a podobně; alkanoyloxyalkylové skupiny, jako je acetoxymethyl, butyryloxymethyl; valeryloxymethyl, izobutyryloxymethyl, izovaleryloxymethyl, 1–(propionyloxy)–1–ethyl, 1–(pivaloyloxyl)–1–ethyl, 1–methyl–1–(propionyloxy)–1–ethyl, pivaloyloxymethyl, propionyloxymethyl; cykloalkanoyloxyalkylové skupiny, jako je cyklopropylkarbonyloxymethyl, cyklobutylkarbonyloxymethyl, cyklopentylkarbonyloxymethyl, cyklohexylkarbonyloxymethyl; aroyloxyalkyl, jako je benzoyloxymethyl, benzoyloxyethyl; arylalkylkarbonyloxyalkyl jako je benzylkarbonyloxymethyl, 2–benzylkarbonyloxyethyl; alkoxykarbonylalkyl nebo cykloalkyloxykarbonylalkyl, jako je methoxykarbonylmethyl, cyklohexyloxykarbonylmethyl, 1–methoxykarbonyl–1–ethyl; alkoxykarbonyl oxyalkyl nebo cykloalkyloxykarbonyloxyalkyl, jako je methoxykarbonyloxymethyl, t–butyloxykarbonyloxymethyl, 1–ethoxykarbonyloxy–1–ethyl, 1–cyklohexyloxykarbonyloxy–1–ethyl; aryloxykarbonyloxyalkyl, jako je 2–(fenoxykarbonyloxy)ethyl, 2–(5–indanyloxykarbonyloxy)ethyl; alkoxyalkylkarbonyloxyalkyl, jako je 2–(1–methoxy–2–methylpropan–2–oyloxy)ethyl; arylalkyloxykarbonyloxyalkyl, jako je 2–(benzyloxykarbonyloxy)ethyl; arylalkenyloxykarbonyloxyalkyl, jako je 2–(3–fenylpropen–2–yloxykarbonyloxy)–

ethyl; alkoxykarbonylaminoalkyl, jako je t–butyloxykarbonylaminomethyl a podobně; alkylaminokarbonylaminoalkyl, jako je methylaminokarbonylaminomethyl; alkanoylaminoalkyl, jako je acetyl aminomethyl; heterocyklický karbonyloxyalkyl, jako je 4–methylpiperazinylkarbonyloxymethyl; dialkylaminokarbonylalkyl, jako je dimethylaminokarbonylmethyl, diethylaminokarbonylmethyl; (5–(nižší alkyl)–2–oxo–1,3–dioxolen–4–yl)alkyl, jako je 5–*t*–butyl–2–oxo–1,3–dioxolen–4–yl)methyl; a (5–fenyl–2–oxo–1,3–dioxolen–4–yl)alkyl, jako je (5–fenyl–2–oxo–1,3–dioxolen–4–yl)methyl.

Reprezentativní amidové skupiny chránicí karboxylovou skupinu jsou aminokarbonylové a nižší alkylaminokarbonylové skupiny.

Preferované sloučeniny s chráněnou karboxylovou skupinou podle vynálezu jsou sloučeniny, kde chráněná karboxylová skupina je nižší alkyl, cykloalkyl nebo arylalkylester, např. methylester, ethylester, propylester, izopropylester, butylester, sekundární butylester, izobutylester, amylester, izoamylester, oktylester, cyklohexylester, fenylethylester a podobně nebo alkanoyloxyalkyl, cykloalkanoyloxyalkyl, aroyloxyalkyl nebo arylalkylkarbonyloxyalkylester. Preferované amidové skupiny chránící karboxylovou skupinu jsou nižší alkylaminokarbonylové skupiny. Například α–C–konec kyseliny aspartové se může chránit skupinou, která je labilní v kyselém prostředí (t–butylová skupina), a β–C–konec je chráněn skupinou, která je selektivně odstranitelná hydrogenací (např. benzylová skupina) během syntézy.

Termín „nižší alkylaminokarbonyl" znamená skupinu $–C(O)NHR^{10}$, která chrání α–C–konec syntetického peptidového fragmentu smyčky 5, kde R^{10} je C_1 až C_4 alkyl.

Termín „aminokarbonyl" znamená skupinu $–C(O)NH_2$, která chrání α–C–konec syntetického peptidového fragmentu smyčky 5.

Termín „proléčivo" znamená sloučeninu, která se rychle transformuje *in vivo* za vzniku mateřské sloučeniny, např. enzymatickou hydrolýzou v krvi (T. Higuchi and V. Stella, Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 A.C.S. Symposium Series a Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987).

Termín „farmaceuticky přijatelné proléčivo" znamená (1) ta proléčiva sloučenin podle vynálezu, která z hlediska medicíny mohou přijít do kontaktu s lidskou tkání a s tkání nižších zvířat, aniž mají, toxický, dráždivý, alergický účinek a podobně, vykazující vhodný poměr výhoda ku riziku a jejich použití je účinné a (2) tam, kde je to možné, zwiteriontové formy mateřské sloučeniny.

Termín „aktivovaný esterový derivát" znamená kyselé halogenidy, jako jsou chloridy kyselin a aktivované estery zahrnující anhydridy odvozené od kyseliny mravenčí a octové, anhydridy odvozené od alkoxykarbonilhalogenidů, jako je izobutyloxykarbonylchlorid, estery odvozené od N–hydroxysukcinimidu, estery odvozené od hydroxyftalimidu, estery odvozené od N–hydroxybenzotriazolu, estery odvozené od N–hydroxy–5–norbornen–2,3–dikarboxamidu, estery odvozené od 2,4,5–trichlorfenolu.

Termín „antiangiogenní aktivita" znamená schopnost molekuly inhibovat růst krevních cév.

Termín „inhibiční aktivita vůči endoteliálním buňkám" znamená obecně schopnost molekuly inhibovat angiogenezi, což znamená např. inhibici růstu nebo migrace bovinních kapilárních endoteliálních buněk v kultuře v přítomnosti fibroblastového faktoru růstu nebo jiných známých růstových faktorů.

Termín „ED_{50}" je zkratka pro dávku peptidového fragmentu smyčky 5 nebo fúzního proteinu, která je účinná při inhibici růstu krevních cév nebo při inhibici růstu bovinních kapilárních endoteliálních buněk v kultuře v přítomnosti fibroblastového růstového faktoru nebo jiných známých

růstových faktorů nebo inhibice migraci endoteliálních buněk poloviční dávkou než jaký by byl růst nebo migrace v nepřítomnosti inhibitoru.

Ve většině případů se ve vynálezu používají jména přirozeně se vyskytujících aminokyselin nebo aminoacylových zbytků ve shodě s pravidly IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry a the IUPAC–IUB Commission on Biochemical Nomenclature, jak se uvádí v publikaci Nomenclature of α–Amino Acids (Recommendetions, 1974), Biochemistry, 14 (2), (1975). Termíny „Ala", „Arg", „Asn", „Asp", „Cys", „Gln", „Glu", „Gly", „His", „Ile", „Leu", „Lys", „Met", „Phe", „Pro", „Ser", „Thr", „Trp", „Tyr" a „Val" znamená aminokyseliny alanin, arginin, asparagin, kyselina aspartová, cystein, glutamin, kyselina glutamová, glycin, histidin, izoleucin, leucin, lysin, metionin, fenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin a valin, a jejich odpovídající aminoacylové zbytky v peptidech v jejich L–, D– nebo D, L– formách. V případě uvedení nespecifické konfigurace bude odborníkovi jasné, α–uhlík aminokyselin a aminoacylových zbytků v peptidech popsaných v popisné části a v patentových nárocích se vyskytuje v přirozené formě nebo v „L" konfiguraci. Výjimku tvoří achirální molekula glycinu a libovolné aminokyseliny, které jsou achirální nebo označené jako „D–„.

Termín „3–I–Tyr" znamená L–, D– nebo D,L–tyrosylový zbytek, kde vodíkový radikál, který je v orto poloze vůči hydroxylu fenolu je nahrazen jodidovým radikálem. Jodidový radikál může být radioaktivní nebo neradioaktivní.

Vynález také popisuje aminokyselinové zbytky s vedlejšími řetězci, které se nevyskytují přirozeně, jako je homofenylalanin, fenylglycin, norvalin, norleucin, ornitin, thiazoylalanin (substituovaný v poloze 2–, 4–, a 5–).

Rozumí se, že vynález zdůrazňuje libovolné deriváty peptidových fragmentů a fúzních proteinů smyčky 5, které mají antiangiogenní aktivitu a zahrnují celou třídu zde popsaných peptidových fragmentů smyčky 5 a fúzních proteinů a homology nebo analogy těchto fragmentů a proteinů. Navíc vynález nezávisí na způsobu produkce peptidového fragmentu nebo fúzního proteinu smyčky 5, to znamená (1) proteolytickým štěpením izolovaného savčího plazminogenu, (2) expresí rekombinantní molekuly, která má polynukleotid kódující aminokyselinovou sekvenci peptidového fragmentu nebo fúzního proteinu smyčky 5 a (3) syntézou na pevné fázi. Tyto způsoby produkce jsou dobře známy v oboru.

V jednom provedení vynálezu se popisují peptidy, které mají obecnou strukturu B–C–X, kde B je 88–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{443} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 odpovídá předchozí definici, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 9–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Ala^{543} sekvence SEQ ID NO:1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 82–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{449} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1, C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 9–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinovou Ala^{543} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 77–merový peptid, který začíná aminokyselinou Val^{454} a končí aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 9–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Ala^{543} sekvence SEQ ID NO:1.

V dalším provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 88–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{443} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je

leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 12–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Phe^{546} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 82–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{449} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 12–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Phe^{546} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 77–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{454} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 12–merní peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Phe^{546} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 176–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{355} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 12–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Ala^{543} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou B–C–X, kde B je 176–merový peptid začínající aminokyselinou Val^{355} a končící aminokyselinou Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a X je 12–merový peptid začínající aminokyselinou Tyr^{535} a končící aminokyselinou Phe^{546} sekvence SEQ ID NO: 1.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–C–Y, kde A je acetylová skupina; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–C–X–Y, kde A je acetylová skupina; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; X je tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–Y, kde A je acetylová skupina; B je dipeptid začínající aminokyselinou v pozici Pro^{529} a končící aminokyselinou v pozici Arg^{530}; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–Y, kde A je acetylová skupina; B je dipeptid začínající aminokyselinou v pozici Pro^{529} a končící aminokyselinou v pozici Arg^{530} sekvence SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–X–Y, kde A je acetylová skupina; B je hexypeptid začínající aminokyselinou v pozici Tyr^{525} a končící aminokyselinou v pozici Arg^{530} SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; X a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–X–Y, kde A je acetylová skupina; B je arginylová skupina; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora

definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; X je tyrosylová skupina a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–X–Y, kde A je acetylová skupina; B je dipeptid začínající aminokyselinou v pozici Pro^{529} a končící aminokyselinou v pozici Arg^{530} SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; X je 3–I–tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

V jiném provedení vynálezu se popisují peptidy s obecnou strukturou A–B–C–X–Y, kde A je acetylová skupina; B je dipeptid začínající aminokyselinou v pozici Pro^{529} a končící aminokyselinou v pozici Arg^{530} SEQ ID NO: 1; C je 4–merový peptid, kde R^1 a R^4 mají shora definovaný význam, R^2 je leucylová skupina a R^3 je tyrosylová skupina; X je tyrosylová skupina; a Y je aminokarbonylová skupina.

Reprezentativní sloučeniny podle vynálezu zahrnují sloučeniny, kde A je acetyl a Y je aminokarbonyl a B–C–X je

(a) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 355 do pozice 543;

(b) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 355 do pozice 546;

(c) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 443 do pozice 543;

(d) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 449 do pozice 543;

(e) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 454 do pozice 543;

(f) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 443 do pozice 546;

(g) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 449 do pozice 546;

(h) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 454 do pozice 546;

(i) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 525 do pozice 535;

(j) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 529 do pozice 535;

(k) sekvence pocházející ze sekvence SEQ ID NO: 1 od pozice aminokyseliny 530 do pozice 535;

Fragmenty K5 nebo fúzní proteiny K5 se mohou získány expresí rekombinantní molekuly obsahující polynukleotid, jehož sekvence kóduje protein nesoucí peptidový fragment smyčky 5 a čištěním exprimovaného peptidového produktu (viz Menhart, N., et al., Biochemistry, 32: 8799–806 (1993). Sekvence DNA lidského plazminogenu se publikovala (Browne, M. J. et al., Fibrinolysis, 5 (4): 257–260 (1991) a je zobrazena na obr. č. 3 (a až b) (sekvence SEQ ID NO:1 12). Polynukleotidová sekvence kódující smyčku 5 začíná přibližně v pozici nukleotidu 1421 sekvence SEQ ID NO: 12 a končí přibližně v pozici nukleotidu 1723.

Gen kódující peptidový fragment K5 nebo fúzní protein K5 se může izolovat z buněk nebo tkání, které exprimují vysoké množství lidského plazminogenu nebo fúzních proteinů K5 (1) izolací

mediátorové RNA z tkáně nebo buněk, (2) použitím reverzní transkriptázy za vzniku odpovídající sekvence DNA a (3) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s vhodnými primery pro amplifikaci sekvence DNA, která kóduje aktivní aminokyselinovou sekvenci K5 nebo její fúzní protein. Polynukleotid kódující peptidový fragment K5 nebo fúzní protein K5 se může klonovat do libovolného běžně dostupného expresivního vektoru (jako jsou pBR322, pUC vektory a podobně) nebo expresivních/čisticích vektorů (jako je fúzní vektor GST (Pharmacia®, Piscataway, NJ)) a pak exprimován ve vhodném prokaryontním, virovém nebo eukaryontním hostiteli. Čištění pak může být provedeno konvenčním způsobem nebo v případě běžného expresivního/čisticího systému se postupuje podle instrukcí výrobce.

Peptidový fragment K5 nebo fúzní protein K5 se může syntetizovat standardními chemickými metodami na pevné fázi, které jsou v oboru dobře známy. Peptidové fragmenty smyčky 5 se například mohou syntetizovat postupem, který se popisuje v publikaci Stewarda and Younga (Steward, J. M. and Young, J. D. Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, (1984) za použití syntetizátoru (Applied Biosystem synthetizer). Podobně se může syntetizovat více fragmentů, které jsou spojeny dohromady a tvoří větší fragmenty. Tyto syntetické peptidové fragmenty se mohou také připravit substitucemi aminokyselin ve specifických lokacích za účelem testování anti–angiogenní aktivity *in vitro* a *in vivo*. Pro syntézu peptidů na pevné fázi se hodí řada metod, které se popisují v publikacích J. M. Stewart and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co. (San Francisco), 1963 a J. Meienhofer, Hormonal Proteins and Peptides, vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1973. Klasická syntéza v roztoku se popisuje v publikaci G. Schroder and K. Lupke, The Peptides, Vol. 1, Academic Press (New York). Tyto metody obecně zahrnují sekvenční adici jedné nebo více aminokyselin nebo vhodně chráněných aminokyselin za účelem tvorby peptidového řetězce. V normálním případě je chráněna amino nebo karboxylová skupina první aminokyseliny vhodnou chránicí skupinou. Chráněná nebo derivatizovaná aminokyselina je pak buď připojena k inertní pevné podložce nebo je v roztoku a za podmínek vhodných pro vytvoření amidové vazby se k sekvenci aduje další aminokyselina, která má vhodně chráněnou komplementární (amino– nebo karboxylovou skupinu) skupinu. Chránicí skupina se pak z nově připojeného aminokyselinového zbytku odstraní a přidá se další (vhodně chráněná) aminokyselina atd. Poté, co se z aminokyselin složí správná sekvence, odstraní se sekvenčně nebo konkurenčně libovolné zbývající chránicí skupiny (a také pevné podpory) za vzniku konečného polypeptidu. Jednoduchou modifikací tohoto obecného postupu je v jednom okamžiku možné přidat více jak jednu aminokyselinu. Například párováním (za podmínek, které neracemizují chirální centra) chráněného tripeptidu se správně chráněným dipeptidem za vzniku (po odstranění chránicích skupin) pentapeptidu.

Zvláště preferovaným způsobem přípravy sloučenin podle vynálezu je syntéza peptidů na pevné fázi, kde aminokyselina α–N–konce je chráněna skupinou citlivou na kyselé nebo bazické prostředí. Taková chránicí skupina by měla být stabilní za podmínek, kdy se tvoří peptidová vazba, přičemž by se měla dát snadno odstranit, aniž se poruší rostoucí peptidový řetězec nebo aniž dojde k acemizaci jakéhokoliv vzniklého chirálního centra. Vhodné chránicí skupiny jsou 9–fluorenylmethyloxykarbonylová (Fmoc), t–butyloxykarbonylová (Boc), benzyloxykarbonylová (Cbz), bifenylizopropyloxykarbonylová, t–amyloxykarbonylová, izobornyloxykarbonylová, α,α–dimethyl–3,5–dimethoxybenzyloxykarbonylová, o–nitrofenylsulfenylová, 2–kyano–*t*–butylkarbonylová skupina. Při syntéze peptidových fragmentů smyčky 5 se zvláště preferuje 9–fluorenylmethyloxykarbonylová (Fmoc) chránicí skupina. Jinými preferovanými skupinami, které chrání aminoskupiny vedlejšího řetězce jako je lysin a arginin, jsou 2,2,5,7,8–pentamethylchroman–6–sulfonylová skupina (pmc), nitroskupina, p–toluensulfonylová skupina, 4–methoxybenzensulfonylová skupina, Cbz, Boc a adamantyloxykarbonylová skupina; v případě tyrosinu to je benzylová skupina, o–bromobenzyloxykarbonylová skupina, 2,6–dichlorobenzylová, izopropylová, t–butylová (t–Bu), cyklohexylová skupina, cyklopentylová a acetylová skupina (Ac); v případě serinu to je t–butylová, benzylová a tetrahydropyranylová skupina, v případě histidinu to je tritylová, benzylová skupina, Cbz, p–toluensulfonylová a 2,4–dinitrofenylová skupina; v případě tryptofanu to je formylová skupina; v případě kyseliny aspartové a glutamové to je benzylová a

t–butylová skupina a v případě cysteinu to je trifenylmethylová (tritylová) skupina. Při syntéze peptidu na pevné fázi je aminokyselina s α–C–koncem vázána k vhodnému pevnému nosiči nebo pryskyřici. Vhodné pevné nosiče použitelné při shora uvedené syntéze jsou ty materiály, které jsou inertní vůči činidlům a reakčním podmínkám reakcí zahrnujícím kondenzaci a odstranění chránicích skupin, a které jsou nerozpustné v používaném médiu. Preferovaný pevný nosič pro syntézu peptidů s α–C–koncovými karboxy–skupinami je 4–hydroxymethylfenoxymethyl–kopoly(styren–1%divinylbenzen). Preferovaný pevný nosič pro peptidy s α–C–koncovými amidovými skupinami, je 4–(2',4'–dimethoxyfenyl–Fmoc–aminomethyl)fenoxyacetamidoethylová pryskyřice dostupná u firmy Applied Biosystems (Foster City, CA). Aminokyselina s α–C–koncem je připojena k pryskyřici pomocí N,N'–dicyklohexylkarbodiimidu (DCC), N,N'–diizopropylkarbodiimidu (DIC) nebo O–benzotriazol–1–yl–N,N,N',N'–tetramethyluronium–hexafluorofosfátu (HBTU) s pomocí nebo bez 4–dimethylaminopyridinu (DMAP), 1–hydroxybenzotriazolu (HOBT), benzotriazol–1–yloxy–*tris*(dimethylamino)fosfonium–hexafluorofosfátu (BOP) nebo bis(2–oxo–3–oxazolidinyl)fosfinchloridu (BOPCl). S těmito činidly se kondenzace provádí po dobu 1 až 24 hodin při teplotě v rozmezí od 10 °C do 50 °C v prostředí rozpouštědla, např. dichlormethanu nebo DMF. V případě, že pevným nosičem je 4–(2',4'–dimethoxyfenyl–Fmoc–aminomethyl)fenoxy–acetamidethylová pryskyřice, skupina Fmoc je před kondenzací s α–C–koncovou aminokyselinou, jak se popisuje shora v textu, štěpena sekundárním aminem, výhodně piperidinem. Preferovaným způsobem kondenzování k nechráněné 4–(2',4'–dimethoxyfenyl–Fmoc–aminomethyl)fenoxy–acetamidetylové pryskyřici je kondenzace s O–benzotriazol–1–yl–N,N,N',N'–tetramethyluroniumhexafluorofosfátem (HBTU, 1 ekviv.) a 1–hydroxybenzotriazolem (HOBT, 1 ekviv.) v DMF. Kondenzace úspěšně chráněných aminokyselin se provádí na automatizovaném syntetizátoru polypeptidů, který je dobře znám v oboru. V preferovaném provedení jsou α–N–konce aminokyselin rostoucího peptidového řetězce chráněny skupinou Fmoc. Odstranění chránicí skupiny Fmoc z α–N–konce rostoucího peptidu je provedeno reakcí se sekundárním aminem, výhodně piperidinem. Každá chráněná aminokyselina se pak používá v asi třínásobném molárním přebytku a kondenzace se provádí výhodně v DMF. Kondenzační činidlo je běžně O–benzotriazol–1–yl–N,N,N',N'–tetramethyluroniumhexafluorofosfát (HBTU, 1 ekviv.). Na konci syntézy na pevné fázi je polypeptid odstraněn z pevného nosiče a zbaven chránicích skupin reakcemi, které po sobě následují, nebo jedinou operací, štěpicím činidlem obsahujícím thianizol, vodu, ethandithiol a kyselinu trifluoroctovou. V případech, kde α–C–konec polypeptidu je alkylamid, se pryskyřice štěpí aminolýzou alkylaminem. V jiném případě se peptid může odstranit transesterifikací, např. methanolem, po čemž následuje aminolýza, nebo přímá transamidace. Chráněný peptid se může v tento okamžik čistit a nebo se může použít přímo v dalším stupni. Odstranění skupin, které chrání vedlejší řetězce, se provede za použití shora popsaného koktejlu určeného pro štěpení. Peptid s kompletně odstraněnými chránicími skupinami se čistí řadou chromatografických stupňů, kde se používají libovolné nebo všechny následující typy chromatografií: výměna iontů na slabě bazické pryskyřici (acetátová forma); hydrofobní adsorpční chromatografie na nederivatizovaném polystyrendivinylbenzenu (např. Amberlite XAD); adsorpční chromatografie silikagelu, ionexu, chromatografie na karboxymethylcelulóze; rozdělovací chromatografie, např. na Sephadexu G–25, LH–20 nebo chromatografie v protiproudovém uspořádání; vysokovýkonná kapalinová chromatografie (HPLC), zvláště HPLC na reverzní fázi, přičemž náplní kolony je fáze vázaná na oktyl– nebo oktadecylsilyl. Molekulové hmotnosti těchto peptidových fragmentů smyčky 5 se určují za použití hmotnostní spektroskopie FAB (Fast Atom Bombardment Mass Spektroscopy). Syntéza peptidového fragmentu smyčky 5 na pevné fázi se popisuje v příkladu 1 až 12.

V závislosti na způsobu produkce se peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5 může vyskytovat s nebo bez dříve uvedených disulfidových můstků oblasti smyčky 5 savčího plazminogenu nebo v případě fúzního proteinu s jinými oblastmi savčích smyček s nebo bez disulfidových vazeb těchto odpovídajících oblastí nebo mohou existovat s disulfidovými vazbami za vzniku terciární struktury, která se liší od terciární struktury nativního savčího plazminogenu. Peptidové fragmenty smyčky 5 vznikající enzymatickým štěpením Glu–, Lys– nebo miniplazminogenu elastázou a/nebo pepsinem (enzymy, které štěpí místa spojení cysteinu) obsahují nativní

terciární strukturu proteinu smyčky 5; peptidové fragmenty smyčky 5 připravené syntézou na pevné fázi mohou nebo nemusí obsahovat cystylaminoacylové zbytky a peptidové fragmenty smyčky 5 připravené expresí mohou obsahovat disulfidové můstky v odlišných polohách, než v peptidových fragmentech, které vznikly enzymatickým štěpením.

Sloučeniny podle vynálezu zahrnují sloučeniny popsané v příkladech vykazující anti–angiogenní aktivitu. Jako inhibitory angiogeneze se tyto látky používají pro léčbu primárních a metastázovaných pevných nádorů a karcinomů prsu, tlustého střeva, konečníku, orhofarynxu, esofagu, žaludku, pankreatu, jater, žlučníku, žlučovodu, tenkého střeva, močového systému včetně ledvin, močového měchýře a urotelia, ženských genitálií včetně děložního čípku, dělohy, vaječníků, choriokarcinomu a gestacionálního trofoblastového onemocnění, mužských genitálií včetně prostaty, chámovodů, varlat a nádorů zárodečných buněk; žláz s vnitřní sekrecí, které zahrnují štítnou žlázu, adrenální žlázu a podvěsek mozkový; kůže včetně hemangiomů, melanomů, sarkomů vznikajících v kostech nebo v měkkých tkáních a Kaposiho sarkomu; nádory mozku, nervů, očí a mozkových blan, které zahrnují astrocytomy, gliomy, glioblastomy, retinoblastomy, neuromy, neuroblastomy, Schwannomy a meningiomy; pevné nádory vznikající z hematopoietických maligních nádorů, jako jsou leukemie, zahrnující chloromy, plazmacytomy, plaky a nádory mukózy fungoides a kožní mykóza T–buněčného lymfomu/leukemie; lymfomy zahrnující Hodkinsův nebo non–Hodkinsův nebo non–Hodkinsův lymfom; při profylaxi autoimunitního onemocnění, jako je revmatitida, imunitní a degenerativní artritida; oční onemocnění, jako je diabetická retinopatie, retinopatie při předčasné dospělosti, odmítnutí implantátu rohovky, retrolentální fibroplazie, neovaskulární glaukom, rubeosis, retinální neovaskularizace způsobená maskulární degenerací a hypoxie; abnormální neovaskularizace u očí; kožní onemocnění, jako je psoriáza; onemocnění krevních žil, jako jsou hamagiomy a proliferace kapilár s arteosklerotickými plaky; Osler–Webberův syndrom; myokardiální angiogeneze; plaková neovaskularizace; telangiectasia; hemofiliální klouby; angiofibrom; granulace poranění; onemocnění charakterizované nadměrnou nebo abnormální stimulací endoteliálních buněk, jako je intestinální adheze, Crohnova nemoc, ateroskleróza; skleroderma a hypertrofie jizev (tj. keloidy) a onemocnění, které má angiogenezi jako patologický rys, mezi něž patří onemocnění kočičího škrábnutí (*Rochele minalia quantosa*) a vředy (*Helicobacter pylori*). Dále se mohou použít jako antikoncepce, která inhibuje ovulaci a vznik placenty.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou použít při prevenci tvorby metastáz shora popsaných nádorů, buď když se používají samostatně nebo v kombinaci s radioterapií a/nebo s jinými chemoterapeutickými ošetřeními, které se běžně aplikují u pacientů při léčbě angiogenních onemocnění. Když se uvedené látky podle vynálezu používají při léčbě pevných nádorů, mohou se aplikovat s chemoterapeutickými činidly, jako je alfa interferon, COMP (cyklofosfamid, vinkristin, metotrexata a prednison), etoposid, mBACOD (metotrexát, bleomycin, doxorubicin, cyklofosfamid, vinkristin a dexametason), PRO–MACE/MOPP (prednison, metotraxát „w/leucin rescue", toxorubicin, cyklofosfamid, taxol, etoposid/mechloretamin, vinkristin, prednison a prokarbazin) vinkristin, vinblastin, angioinhibiny, TNP–470, pentosanpolysulfát, faktor 4 krevních destiček, angiostatin, LM–609, SU–101, CM–101, Techgalan, talidomid, SP–PG a podobně. Mezi jiná chemoterapeutická činidla patří alkylační činidla, jako jsou dusíkaté yperity, které zahrnují mechloetamin, melfan, chlorambucil, cyklofosfamid a ifosfamid; nitromočoviny, které zahrnují karmustin, lomustin, semustin a streptozocin; alkylsulfonáty zahrnující busulfan; triaziny zahrnující dekarbazin; ethyleniminy, jako je tiotepa a hexamethylmelamin; analogy kyseliny listové, jako je metotrexat; analogy pyrimidinu, jako je 5–fluoruracil, cytosinarabinóza; analogy purinu, jako je 6–merkaptopurin a 6–thioguanin; protinádorová antibiotika, jako je aktinomycin D; antracykliny, jako je doxorubicin, bleomycin, mitomycin C a metramycin; hormony a antagonisty hormonů, jako je tamoxifen a kortikosteroidy a rozmanitá činidla, která zahrnují cisplatinu a brequinar. Nádor se může léčit běžným způsobem chirurgicky, zářením nebo chemoterapií a aplikací smyčky 5 s následnou další aplikací smyčky 5, aby došlo k prodloužení stadia latence mikrometastáz a stabilizaci a inhibici růstu libovolného reziduálního primárního nádoru.

Cytotoxická činidla, jako je ricin se mohou vázat na peptidové fragmenty, přičemž poskytují nástroj pro destrukci buněk, které váží smyčku 5. Peptidy, které se váží na cytotoxická činidla, se mohou zavádět infuzí způsobem, který maximalizuje zavedení do požadované oblasti. Fragmenty smyčky 5 s vysokou afinitou, na které je navázán ricin, se mohou zavádět prostřednictvím kanyl přímo do cílové oblasti nebo do cév, které zásobují cílové místo. Taková činidla se mohou také zavádět řízeným způsobem prostřednictvím osmotických pump, které jsou připojeny na infuzní kanyly. Kombinace antagonistů smyčky 5 se může aplikovat se stimulátory angiogeneze, přičemž dochází ke zvýšení vaskularizace tkáně. Tato léčba může být úspěšný způsob odstraňování metastázované rakoviny.

Sloučeniny podle vynálezu se mohou použít ve formě farmaceuticky přijatelných solí odvozených od anorganických nebo organických kyselin. Termín „farmaceuticky přijatelná sůl" znamená ty soli, které jsou podle lékařského pohledu vhodné pro kontakt s lidskou tkání a tkání nižších zvířat, aniž vyvolají toxickou, iritační, alergickou odezvu a podobně, a vykazují přijatelný poměr přínos/riziko. Farmaceuticky přijatelné soli jsou v oboru dobře známy, viz publikace S. M. Berge, et al., J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66: 1 et seq.

Soli se mohou připravit in situ během konečné izolace a čištění sloučenin podle vynálezu nebo odděleně reakcí volné báze s vhodnou organickou kyselinou. Reprezentativní adiční soli kyselin jsou například acetát, adipát, alginát, citrát, aspartát, benzoát, benzensulfonát, bisulfát, butyrát, kamforát, kamforsulfonát, diglukonát, glycerolfosfát, hemisulfát, heptanoát, hexanoát, fumarát, hydrochlorid, hydrobromid, hydrojodid, 2–hydroxyethansulfonát (isetionát), laktát, maleát, methansulfonát, nikotinát, 2–naftalensulfonát, oxalát, pamoát, pektinát, persulfát, 3–fenylpropionát, pikrát, pivalát, propionát, sukcinát, tartrát, thiokyanát, fosfát, glutamát, hydrogenuhličitan, p–toluensulfonát a undekanoát. Skupiny obsahující bazický dusík se mohou kvarternizovat činidly, kterými jsou halogenidy nižších alkylů, jako je methyl, ethyl, propyl a butylchloridy, bromidy a jodidy, dialkylsulfáty, jako jsou dimethyl, diethyl, dibutyl a diamylsulfáty; halogenidy s dlouhým řetězcem, jako jsou decyl, lauryl, myristyl a stearylchloridy, bromidy a jodidy; arylalkylhalogenidy, jako jsou benzyl a fenethylbromidy a jiné soli. Tímto způsobem se připraví vodné nebo v oleji rozpustné nebo dispergovatelné produkty. Příklady kyselin, které se mohou použít při tvorbě farmaceuticky přijatelných adičních solí kyselin, jsou anorganické kyseliny, jako jsou kyselina chlorovodíková, bromovodíková, sírová a fosforečná a organické kyseliny, jako jsou kyselina oxalová, maleinová, sukcinová a kyselina citronová.

Bazické adiční soli se mohou připravit *in situ* během konečné izolace a čištění peptidových fragmentů smyčky 5 reakcí látek, které obsahují karboxylovou kyselinu s vhodnou bází, jako je hydroxid, karbonát nebo bikarbonát farmaceuticky přijatelného kationtu kovu nebo amoniak nebo organický primární, sekundární nebo terciární amin. Farmaceuticky přijatelné soli zahrnují kationty alkalických kovů nebo kovů alkalických zemin, jako jsou soli lithia, sodíku, draslíku, vápníku, hořčíku a hliníku a podobně a netoxických kvartérních amoniových solí a aminových kationtů, které zahrnují amonium, tetramethylamonium, tetraethylamonium, methylamin, dimethylamin, trimethylamin, triethylamin, diethylamin, ethylamin a podobně. Jiné reprezentativní organické aminy, které jsou použitelné při tvoření bazických adičních solí, zahrnují ethylendiamin, ethanolamin, diethanolamin, piperidin, piperazin a podobně. Preferované soli sloučenin podle vynálezu zahrnují fosforečnan, tris a acetát.

Peptidové fragmenty smyčky 5, antiséra smyčky 5, receptorové agonisty smyčky 5, receptorové antagonisty smyčky 5 nebo jejich kombinace se mohou použít společně s farmaceuticky přijatelnou postupně se uvolňující matricí, jako jsou biodegradovatelné polymery, za vzniku terapeutických kompozic. Postupně se uvolňující matrice je připravená z materiálů obvykle z polymerů, které jsou rozložitelné enzymy nebo bazickou nebo kyselou hydrolýzou nebo rozpuštěním. Když se matrice zavede do těla, působí na ní enzymy a tělní tekutiny. Požaduje se, aby postupně se uvolňující matrice byla vybrána z biokompatibilních materiálů, jako jsou lipozomy, polylaktidy (polymery kyseliny mléčné), polyglykolid (polymer kyseliny glykolové), polyanhydridy polylaktid–ko–glykolidu (kopolymer kyseliny mléčné a kyseliny glykolové), poly(orto)estery, poly-

peptidy, kyselina hyaluronová, kolagen, chondroitinsulfát, karboxylové kyseliny, mastné kyseliny, fosfolipidy, polysacharidy, nukleové kyseliny, polyaminokyseliny, aminokyseliny, jako je fenylalanin, tyrosin, izoleucin, polynukleotidy, polyvinylpropylen, polyvinylpyrrolidon a silikon. Preferovaná biodegradovatelná matrice je matrice zhotovená buď z polylaktidu, polyglykolidu nebo z polylaktid–ko–glykolidu (kopolymery kyseliny mléčné a kyseliny glykolové).

Peptidové fragmenty smyčky 5, fúzní proteiny smyčky 5, receptorové agonisty smyčky 5, receptorové antagonisty smyčky 5 nebo jejich kombinace se mohou aplikovat společně s farmaceuticky přijatelnými excipienty nebo nosiči za vzniku terapeutických kompozic. Farmaceuticky přijatelný nosič nebo excipient znamená netoxické, pevné, semi–pevné nebo kapalné plnidlo, rozpouštědlo, materiál pro tvorbu kapsulí nebo pro tvorbu čípků libovolného typu. Kompozice se aplikují parenterálně, pod jazyk, intracisternálně, intravaginálně, intraperitoneálně, rektálně, bukálně nebo povrchově (ve formě prášku, masti, kapek, transdermálních náplastí nebo pomocí iontoforézních přístrojů).

Termín „parenterální" znamená model aplikace, který zahrnuje intravenózní, intramuskulární, intraperitoneální, intrasternální, podkožní a intraartikulární injekce a infuze. Farmaceutické kompozice vhodné pro parenterální injekci obsahují farmaceuticky přijatelné sterilní vodné nebo nevodné roztoky, disperze, suspenze nebo emulze, stejně jako sterilní prášky, které se rekonstituují do injektovatelných roztoků nebo disperzí bezprostředně před použitím. Příklady vhodných vodných a nevodných nosičů, rozpouštědel, ředidel zahrnují vodu, ethanol, polyoly (jako je glycerol, propylenglykol, polyethylenglykol a podobně), karboxymethylcelulózu a jejich vhodné směsi, rostlinné oleje (jako je olivový olej) a injektovatelné organické estery, jako je ethyloleát. Vhodná tekutost se udržuje například použitím vhodných potahových materiálů, jako je lecitin, udržováním požadované velikosti částic v případě disperzí a použitím povrchově aktivních látek. Tyto kompozice mohou také obsahovat adjuvans, jako jsou konzervační činidla, smáčecí činidla, emulgátory a disperzní činidla. Prevence proti působení mikroorganizmů se může zaručit inkluzí různých antibakteriálních a anti–fungálních činidel, jako je paraben, chlorobutanol, kyselina fenolsorbová. Může být také nutné zahrnout izotonická činidla, jako je cukr, chlorid sodný a podobně. Prodloužené absorpce injektovatelné farmaceutické formy se může dosáhnout inkluzí činidel, jako je monostearát hlinitý a želatina, což jsou látky, které zpožďují absorpci. Injektovatelné depotní formy se připravují tvořením mikrokapsulových matric léčiv v biodegradovatelných polymerech, jako je polylaktidpolyglykolid, poly(ortoestery) a poly(anhydridy). Rychlost uvolňování léčiva se může řídit v závislosti na poměru léčiva a polymeru a podstatě použitého polymeru. Depotní injektovatelné formulace se připravují zachycením léčiva do lipozomů nebo mikroemulzí, které jsou kompatibilní s tělními tkáněmi. Injektovatelné formulace se sterilizují, například filtrací přes filtr zachycující bakterie nebo přidáním sterilizačního činidla ve formě sterilních pevných kompozic, které se rozpustily nebo dispergovaly ve sterilní vodě nebo v jiném sterilním injektovatelném médiu těsně před použitím.

Povrchová aplikace zahrnuje aplikaci na kůži, sliznici a povrch plic a do očí. Kompozice, které jsou vhodné k povrchové aplikaci, zahrnují formy použitelné pro inhalaci, které se připraví jako suchý stlačený nebo nestlačený prášek. V kompozicích, kde prášek není stlačen, se aktivní látka může použít ve formě směsi s farmaceuticky přijatelným inertním nosičem o větší velikosti, jenž zahrnuje partikule, jejichž velikost je například až 100 mikrometrů v průměru. Vhodné inertní nosiče jsou cukry, jako je laktóza. Je nutné, aby nejméně 95 % hmotnosti částic aktivní látky mělo účinnou velikost partikulí v rozmezí 0,01 až 10 mikrometrů. Při povrchové aplikaci do očí se látka podle vynálezu zavede na farmaceuticky přijatelném oftalmickém nosiči tak, že látka se udržuje v kontaktu s povrchem oka dostatečně dlouhou dobu, aby se umožnilo látce proniknout do vnitřních oblastí oka a rohovky, jako například přední komora oční, zadní komora, tělo sklivce, komorová voda, voda ve sklivci, rohovka, duhovka/řasy, čočka, choroidea/sítnice a oční bělmo. Farmaceuticky přijatelný oftalmický nosič je například mast, rostlinný olej nebo enkapsulační materiál. V jiném případě se látky podle vynálezu mohou přímo zavést injekcí do komorové nebo sklivcové vody.

Kompozice se může uchovávat pod tlakem. Může tedy obsahovat stlačený plyn, jako je dusík nebo kapalný nebo plynový propelent. Preferuje se zkapalněné rozprašovací médium a samozřejmě taková celková kompozice, kde aktivní látka není rozpuštěna v podstatném množství. Kompozice uchovávaná pod tlakem může také obsahovat povrchově aktivní činidlo, jako je kapalné nebo pevné neiontové povrchově aktivní činidlo nebo to může být aniontové povrchově aktivní činidlo. Preferuje se použití pevného aniontového povrchově aktivního činidla ve formě sodné soli.

Z kompozic vhodných pro rektální a vaginální aplikaci se preferují čípky, které se mohou připravovat smícháním látek podle vynálezu s vhodnými neiritujícími excipienty nebo nosiči, jako je kakaové máslo, polyethylenglykol nebo vosk, což jsou materiály, které jsou pevné při teplotě místnosti, ale kapalné při teplotě těla a proto tají v rektu nebo ve vaginální dutině a tím se uvolňuje aktivní látka.

Látky podle vynálezu se mohou také aplikovat ve formě lipozomů. Jak je známo v oboru, lipozomy se obecně odvozují z fosfolipidů nebo jiných lipidových látek. Lipozomy se tvoří mono– nebo multi–lamelárními hydratovanými kapalnými krystaly, které se dispergovaly ve vodném roztoku. Může se použít libovolný netoxický fyziologicky přijatelný a metabolizovatelný lipid schopný tvořit lipozomy. Kompozice v lipozomové formě mohou obsahovat vedle látek podle vynálezu stabilizátory, konzervační činidla, excipienty a podobně. Preferovanými lipidy jsou fosfolipidy a fosfatidylcholiny (lecitiny), jak přirozené tak syntetické. Metody pro tvorbu lipozomů jsou dobře známy v oboru (Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33 et seq.).

Při shora uvedené léčbě nebo při jiném druhu léčby se použije terapeuticky účinné množství jedné z kompozic podle vynálezu v čisté formě nebo v případě, že takové formy existují, ve formě farmaceuticky přijatelné soli a s nebo bez farmaceuticky přijatelného nosiče. „Terapeuticky přijatelné množství“ látky podle vynálezu znamená dostatečné množství látky pro léčbu angiogenního onemocnění (např. omezení růstu nádoru, zablokování nebo zpomalení vzniku metastáz nádoru) při přijatelném poměru přínos/riziko, který se dá aplikovat na libovolný způsob léčby. Rozumí se však, že mód aplikace by měl určit lékař. Specifická terapeuticky účinná dávka pro libovolného pacienta závisí na různých faktorech, které zahrnují druh léčené poruchy a stadium poruchy; aktivitu použité specifické látky; použitou specifickou látku; věk; tělesnou hmotnost, obecný zdravotní stav, pohlaví a dietetické návyky pacienta; čas aplikace; způsob aplikace; rychlost exkrece specifické použité látky; trvání léčby; kombinace použitých medikamentů a specifických látek podle vynálezu a podobných faktorů, které jsou dobře známy v oboru. Odborníkovi je známo, že, aby se dosáhlo požadovaného terapeutického účinku, je vhodné začít s nižší dávkou, která se postupně zvyšuje, až se dosáhne požadovaného účinku. Celková denní dávka peptidových fragmentů nebo fúzních proteinů smyčky 5, které se lidem nebo jinému savčímu hostiteli aplikují lokálně nebo systematicky v jedné nebo v rozdělených dávkách, se např. pohybuje v rozmezí od 0,0001 do 200 mg/kg tělesné hmotnosti a nebo více obvykle v rozmezí od 1 do 300 mg/kg tělesné hmotnosti. Je-li to nutné účinná denní dávka se může rozdělit pro účely aplikace do více dávek. Kompozice podávaná v jedné dávce může obsahovat takové množství nebo jeho násobek menší než jedna, aby se dala aplikovat denní dávka.

Rozumí se, že činidla, která se mohou kombinovat s látkou podle vynálezu vhodnou pro inhibici, léčbu nebo profylaxi angiogenních onemocnění nejsou omezena na látky uvedené shora v textu, ale v principu zahrnují libovolná činidla pro léčbu nebo profylaxi angiogenních onemocnění.

Vynález také popisuje izolované polynukleotidy, které kódují savčí peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5, který vykazuje aktivitu inhibující angiogenezi. Takové polynukleotidy se mohou použít při expresi rekombinantních peptidových fragmentů smyčky 5 nebo při genové terapii (jak se popisuje dále v textu).

Polynukleotid podle vynálezu se může vyskytovat ve formě mRNA nebo DNA. V tomto vynálezu se také popisují polynukleotidy ve formě DNA, cDNA, genomové DNA a syntetické DNA.

DNA může být dvouřetězcová nebo jednořetězcová a jestliže je jednořetězcová může se jednat o kódující (sense) řetězec nebo nekódující (anti–sense) řetězec. Polynukleotid podle vynálezu může být v nemodifikované formě nebo zahrnuje modifikace jako je methylace nebo úprava čepičkou.

Kódující sekvence, která kóduje polypeptid může být stejná jako zde popisovaná kódující sekvence nebo se může lišit, jako výsledek redundance a degenerace genetického kódu, přičemž kóduje stejný polypeptid jako zde popsaná DNA. Tento polynukleotid může zahrnovat pouze kódující sekvenci pro polypeptid nebo kódující sekvenci pro polypeptid a další kódující sekvenci, jako je vedoucí nebo sekreční sekvence nebo pro–proteinová sekvence nebo kódující sekvence polypeptidu (a další kódující sekvenci) a nekódující sekvenci, jako je nekódující sekvence 5′ a/nebo 3′kódující sekvence polypeptidu.

Navíc vynález zahrnuje různé polynukleotidy obsahující modifikace, jako je jsou delece polynukleotidů, substituce nebo adice; a libovolné modifikace polypeptidu, které vznikají z různých polynukleotidových sekvencí. Polynukleotid podle vynálezu může mít kódující sekvenci, která je přirozeně se vyskytující alelová varianta zde popsané kódující sekvence.

Navíc kódující sekvence polypeptidu se může fúzovat ve stejném čtecím rámci s polynukleotidovou sekvencí, která napomáhá při exprimaci a sekreci polypeptidu z hostitelské buňky. Je to například vedoucí sekvence, která funguje jako sekreční sekvence řídící transport polypeptidu z buňky. Polypeptid mající vedoucí sekvenci je pre–protein a může mít vedoucí sekvenci štěpenou hostitelskou buňkou za vzniku polypeptidu. Polynukleotidy mohou také kódovat pro–protein, který je tvořen proteinem plus dalšími 5′ aminokyselinovými zbytky. Protein, který má pro–sekvenci je pro–protein a může v některých případech být neaktivní formou proteinu. Jestliže je pro–sekvence štěpena, zůstává aktivní protein. Polynukleotid podle vynálezu může kódovat protein nebo protein, který má pro–sekvenci, nebo protein, který má pre–sekvenci (vedoucí sekvenci) a pro–sekvenci.

Polynukleotidy podle vynálezu mohou také mít kódující sekvenci fúzovanou v rámci s markerovou sekvencí, která umožňuje čištění polypeptidu podle vynálezu. Markerová sekvence může být sekvencí GST značky („GST tag“) doplněná vektorem pGEX, přičemž v případě bakteriálního hostitele vzniká za účelem čištění polypeptidu fúzovaného s markerem. Markerová sekvence může být například hemaglutinin („HA tag“), v případě, že se používá savčí hostitel, např. buňky COS–7. Sekvence HA tag koresponduje s epitopem odvozeným od hemaglutininového proteinu viru influenzy (I. Wilson, et al., Cell 37: 767 (1984)).

Polynukleotid se může generovat libovolným způsobem zahrnujícím chemickou syntézu, replikaci, reverzní transkripci nebo transkripcí, která je založena na informaci poskytované sekvencí bází v oblasti (oblastech), ze kterých je odvozen polynukleotid; což může být reprezentant buď sense nebo antisense orientace původního polynukleotidu. Preferovanou metodou vzniku polynukleotidu je polymerázová řetězcová reakce, která se popisuje v patentu US 4 683 195 a US 4 683 202.

Předpokládá se, že polynukleotidy hybridizují se zde popsanými sekvencemi, jestliže vykazují nejméně 50%, s výhodou 70% shodnost mezi polynukleotidem a sekvencí.

Vynález také zahrnuje vektory, které obsahují polynukleotidy podle vynálezu, hostitelské buňky, do kterých se vnáší vektory podle vynálezu a způsoby rekombinantní produkce polypeptidů podle vynálezu. Takové metody zahrnují kultivaci hostitelských buněk za podmínek vhodných pro expresi polynukleotidu odvozeného od smyčky 5 a izolaci polypeptidu z kultury, který je odvozen od smyčky 5.

Polynukleotidy podle vynálezu se mohou použít při produkci polypeptidu postupy genového inženýrství. Polynukleotidová sekvence pak může zahrnovat jeden z expresivních nosičů, zvláště vektorů nebo plazmidů pro expresi polypeptidu. Takové vektory zahrnují chromozomální,

nechromozomální a syntetické sekvence DNA, například deriváty SV40; bakteriální plazmidy, fágovou DNA; kvasinkové plazmidy, vektory získané z kombinace plazmidů a fágové DNA, virové DNA, jako je vakcinie, adenoviry, virus spalniček a virus planých neštovic. Může se však použít libovolný jiný vektor nebo plazmid, který se replikuje v hostiteli a je pro něj vhodný.

Vhodná sekvence DNA se může začlenit do vektoru různými způsoby. Sekvence DNA se začlení do vhodného restrikčního místa postupem, který je dobře znám v oboru. Takové a jiné postupy jsou dobře známy v oboru. Sekvence DNA je v expresivním vektoru operabilně spojena s vhodnou expresivní řídicí sekvencí (sekvencemi) (jako je promotor), aby řídila syntézu mRNA. Reprezentativní příklady takových promotorů zahrnují promotor LTR nebo SV40, promotor lac nebo trp bakterie *E. coli*, promotor fága lambda P sub L a jiné promotory, které kontrolují expresi genů v prokaryontních a eukaryontních buňkách nebo jejich virech. Expresivní vektor také obsahuje ribozomové vazebné místo pro iniciaci translace a terminátor transkripce. Vektor může také zahrnovat vhodné sekvence pro amplifikaci exprese. Expresivní vektory navíc obsahují gen, který poskytuje fenotyp vhodný pro selekci transformovaných hostitelských buněk, jako je dihydrofolát reduktáza nebo v případě kultury eukaryontních buněk jde o rezistenci na neomycin nebo u bakterií *E. coli* je to rezistence na tetracyklin nebo ampicilin.

Vektor obsahující vhodnou sekvenci DNA, která je stejně dobře popsaná jako shora uvedený vektor a řídicí sekvence, se může použít pro transformaci vhodného hostitele, přičemž umožní hostiteli exprimovat protein. Jako reprezentativní vzorky vhodných hostitelů se uvádějí bakteriální buňky, jako je *E. coli, Salmonella typhimurium; Streptomyces spp.*; buňky hub, jako jsou kvasinky; hmyzí buňky, jako je *Drosophila* a *Sf9*; a zvířecí buňky, jako je CHO, COOS nebo Bowes atd. Předmětem vynálezu je také selekce vhodného hostitele.

Vynález také zvláště zahrnuje rekombinantní konstrukty obsahující jednu nebo více zde popsaných sekvencí. Konstrukty obsahují vektor, jako je virový vektor, do kterého se sekvence začlení, buď v přímé nebo obrácené orientaci. V preferovaném provedení vynálezu konstrukt dále obsahuje regulační sekvence například promotor operabilně spojený se sekvencí. V oboru je známo velké množství vhodných vektorů a promotorů a jsou běžně dostupné. Následující vektory se popisují způsobem příkladů. Bakteriální vektory jsou: pSPORT1 (GIBCO BRL, Gaithesburg, MD), pQE70, pQE60, pQE–9 (Qiagen) pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene®, La Jolla, CA); pTrc99A, pKK223–3, pKK233–3, pDR450, pRIT5 (Pharmacia®). Eukaryontní vektory: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene®) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia®). Může se použít libovolný jiný vektor nebo plazmid, pokud je replikovatelný v hostiteli a pokud je pro něj také vhodný.

Promotorové oblasti se mohou vybrat z libovolného požadovaného genu za použití vektorů CAT (chloramfenikol transferáza) a jiných vektorů se selektovatelnými markery. Dva vhodné vektory jsou pKK232–8 a pCM7. Zvláště jmenované bakteriální promotory zahrnují lacI, lacZ, T3, SP6, T7, gpt, lambda P sub R, P sub L, P sub L a trp. Eukaryontní promotory zahrnují časný promotor cytomegaloviru (CMV), thymidin kinázu viru herpes simplex (HSV), časný a pozdní promotor SV 40, promotor LTR z retroviru a myší metallothionein–I. Způsob selekce vhodného vektoru a promotoru je pro odborníka zřejmý.

V dalším provedení vynálezu se popisují hostitelské buňky obsahující shora popsaný konstrukt. Hostitelskou buňkou může být buňka vyššího eukaryonta, jako je savčí buňka, nebo buňka nižšího eukaryonta, jako je kvasinková buňka, nebo hostitelskou buňkou může být prokaryontní buňka, jako je bakteriální buňka. Zavedení konstruktu do hostitelské buňky se může ovlivnit transfekcí s fosforečnanem vápenatým, transfekcí zprostředkovanou DEAE–Dextran nebo elektroporací (L. Davies et al., „Basic Methods in Molecular Biology," 2nd edition, Appleton and Lang, Pramount Publishing, East Norwalk, CT (1994)).

Konstrukty v hostitelských buňkách se mohou použít běžným způsobem za účelem produkce genového produktu rekombinantní sekvencí. V jiném případě polypeptidy podle vynálezu se mohou produkovat syntetickou cestou na běžných peptidových syntetizátorech.

Proteiny se mohou exprimovat v savčích buňkách, kvasinkách, bakteriích nebo jiných buňkách za kontroly vhodnými promotory. Bezbuněčné translační systémy se mohou také použít při produkci takových proteinů za použití RNA odvozených od DNA konstruktů podle vynálezu. Vhodné jsou klonovací a expresivní vektory, které se mohou použít u prokaryontních a eukaryontních hostitelů, jak se popisuje v publikaci Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, (Cold Spring, Harbor, N.Y. 1989).

Transkripce DNA, která kóduje polypeptidy podle vynálezu, ve vyšších eukaryontech se zesiluje inzercí sekvence zesilovače do vektoru. Zesilovače jsou cis–působící elementy DNA, jejichž obvyklá velikost je od 10 do 300 bp, a které působí na promotor, a tím zesilují transkripci. Příklady zahrnují zesilovač SV40 na pozdní straně počátku replikace (bp 70 až 270), zesilovač časného promotoru cytomegaloviru, zesilovač na pozdní straně počátku replikace viru polyoma a adenovirové zesilovače.

Rekombinantní expresivní vektory budou obecně zahrnovat počátky replikace a volitelné markery, které umožňují transformaci hostitelské buňky, například gen rezistence na ampicilin bakterie *E. coli* a gen TRP1 *S. cerevisiae* a promotor ze silně exprimovaného genu, aby řídili transkripci downstream strukturní sekvence. Takové promotory se mohou odvodit z operonů, které kódují glykolytické enzymy, jako je mezi jinými 3–fosfoglycerátkináza (PGK), faktor alfa, kyselá fosfatáza nebo proteiny teplotního šoku. Heterologní strukturní sekvence je uspořádána ve vhodné fázi s iniciačními a terminačními sekvencemi translace a je výhodné, aby vedoucí sekvence byla schopna řídit sekreci translatovaného proteinu do periplazmatického prostoru nebo do extracelulárního média. Heterologní sekvence může kódovat fúzní protein, který zahrnuje N–terminální identifikační peptid, jenž propůjčuje fúznímu proteinu požadované charakteristiky, např. stabilizaci nebo zjednodušené čištění exprimovaného rekombinantního produktu.

Expresní vektory použitelné u bakterií se konstruují inzercí strukturní sekvence DNA, která kóduje požadovaný protein dohromady s vhodnými iniciačními a terminačními signály translace v operabilně čtecí fázi s funkčním promotorem. Vektor bude obsahovat jeden nebo více fenotypických volitelných markerů a původ replikace, aby se zaručilo udržení vektoru a, jestliže je to nutné, vektor umožní amplifikaci v hostiteli. Mezi vhodné prokaryontní hostitele pro transformaci patří *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurin* a různé species rodu *Pseudomonas*, *Streptomyces* a *Staphylococcus*. V praxi se však mohou také použít jiné druhy.

Použitelné expresivní vektory v případě bakterií obsahují volitelný marker a bakteriální počátek replikace, který je odvozen z plazmidů obsahujících genetické elementy dobře známého klonovacího vektoru pBR322 (ATCC37017). Jiné vektory zahrnují PKK223–3 (Pharmacia® Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) a GEMI (Promega Biotec, Madison, WI). Tyto základní sekce plazmidu pBR322 se kombinují s vhodným promotorem a strukturní sekvencí, která se má exprimovat.

Použitelné expresivní vektory mohou také obsahovat fúzního partnera, který umožňuje jednoduché čištění žádaných polypeptidů vynálezu nebo pro produkci rozpustných polypeptidů. Příklady dostupných fúzních vektorů zahrnují vektor pET32a (Novagen, Madison, WI), pGEX–4T–2 (Pharmacia®) a pCYB3 (New England Biolabs, Beverly, MA). Další použitelný fúzní vektor je pHil–D8, jehož struktura a příprava jsou plně publikovatelné v příkladu 19, část B. Za účelem dosáhnout vysokého stupně exprese peptidových fragmentů nebo fúzních proteinů smyčky 5 v bakteriálních buňkách se mohou konstruovat expresivní vektory, které brání použití fúzních partnerů. Vektory se například mohou připravit tak, aby se optimalizovalo translační párování, jak popisuje Pilot–Matias, T. J., et al., in Gene, 128: 219–225 (1993). V jiném případě polynukleotid podle vynálezu se může exprimovat dohromady se separovaným připojeným plazmidem, který kóduje protein nebo peptid napomáhající rozpustnosti prvního peptidu (Makrides, S. C., Microbiological Reviews, 60: 512 (1996)). Jisté peptidové fragmenty smyčky 5 (které vykazují produkci rozpustných fúzních proteinů s thioredoxinem (příklad 20)) se například

mohou exprimovat z nefúzního vektoru současně (to znamená ve stejné hostitelské buňce) jako druhý vektor, jenž exprimuje thioredoxin.

Následuje transformace vhodného hostitelského kmene a jeho kultivace až do dosažení vhodné optické hustoty buněk, přičemž vybraný promotor se potlačuje vhodným způsobem (např. posunem teploty nebo chemickou indukcí) a kultivace buněk pokračuje. Buňky se v typickém případě shromáždí centrifugací, buněčná stěna se poruší fyzikálním nebo chemickým způsobem. Vzniká surový extrakt, který se podrobí dalšímu čištění. Mikrobiální buňky, které se používají při expresi proteinů se mohou porušit libovolnou z běžných metod. Mezi tyto metody patří cyklus rozmrazení a zmrazení, sonikace, mechanické rozrušení nebo použití lyzujícího činidla; takové metody jsou dobře známy v oboru.

Při expresi rekombinantního proteinu se také mohou použít různé kultivační systémy savčích buněk. Příklady savčích expresivních systémů zahrnují buněčné linie COS–7, což jsou fibroblasty opičích ledvin popsané v publikaci Gluzman, Cell 23: 175 (1981) a jiné buněčné linie schopné exprimovat kompatibilní vektor, jako je C127, 3T3, CHO, HeLa a BHK. Savčí expresivní vektory obsahují počátek replikace, vhodný promotor a zesilovač a také, je-li to nezbytné, ribozomální vazebná místa, polyadenylační místo, donorová a akceptorová místa sestřihu, terminační sekvence transkripce a nepřepisované sekvence lemující 5'–konec. Za účelem získání požadovaných nepřepisovaných genetických elementů se mohou použít sekvence DNA odvozené z virového genomu SV40, např. počátek replikace SV40, časný promotor, zesilovač, polyadenylační místa a místa sestřihu. Mezi reprezentanty použitelných vektorů patří pRc/CMV a pcDNA3 (které jsou dostupné u firmy Invitrogen, San Diego, CA).

Sloučeniny, kompozice, vektory a buňky podle vynálezu mohou být používány v souvislosti s genovou terapií, prostřednictvím čehož je regulován gen kódující fragment peptidu nebo konjugát fragmentu peptidu smyčky 5 u pacienta. Různé metody, které umožňují transfer nebo zavádění DNA do buněk za účelem exprese proteinového produktu genu, což se označuje jako genová terapie, se popisují v publikaci Gene Transfer into Mammalian Samatic Cells *in vivo*, N. Yang, Crit. Rev. Biotechn. 12(4): 335–356 (1992). Genová terapie zdůrazňuje inkorporaci polynukleotidových sekvencí do somatických buněk nebo do linie zárodečných buněk, což se dále využívá buď při terapii *ex vivo* nebo *in vivo*. Při genové terapii dochází k výměně genů, aby se dosáhlo normální nebo abnormální genové funkce a dalo se vzdorovat infekčnímu onemocnění a jiným infekčním agents.

Strategie léčby zdravotních problémů pomocí genové terapie zahrnuje terapeutické strategie, jako je identifikace defektivního genu a pak přidání funkčního genu, který buď nahradí funkci defektního genu nebo posílí slabě fungující gen. Nebo jsou to profylaktické strategie, jako je adice genu, který kóduje proteinový produkt. Tento proteinový produkt se použije při léčbě patologických stavů nebo umožní, aby tkáně a orgány byly citlivější na režim léčby. Příkladem profylaktické strategie je, že se gen kódující peptidový fragment smyčky 5 nebo konjugát peptidového fragmentu smyčky 5 zavede do pacienta, čímž se předchází výskytu angiogeneze, nebo se do pacienta může zavést gen, čímž se nádorové buňky mohou stát citlivější k záření, což znamená, že při ozáření nádoru odumře více nádorových buněk.

V tomto vynálezu se popisuje řada protokolů, jež se používají při transferu DNA kódující peptidový fragment smyčky 5 nebo fúzní protein smyčky 5 nebo při transferu regulačních sekvencí DNA peptidového fragmentu smyčky 5 (nebo regulačních sekvencí fúzních partnerů). Genová terapie podle vynálezu také zahrnuje transfekci promotorových sekvencí jiných než jsou ty spojené s peptidovým fragmentem smyčky 5 nebo jiných sekvencí, které zvýší produkci peptidových fragmentů smyčky 5. Příklad této technologie lze nalézt v publikaci Transkaryotic Therapies, Inc., of Cambridge, Massachusetts. Pro inzerci „genového přepínače" se používá metoda homologní rekombinace, která umožňuje přepínání genu erytropoitinu v buňkách, jak se popisuje v publikaci Genetic Engineering News, April 15, 1994. Takové genové přepínače se

mohou použít při aktivaci peptidového fragmentu smyčky 5 (nebo receptoru smyčky 5) v buňkách, které normálně uvedené proteiny neexprimují.

Metody transferu genů při genové terapii se dělí do tří kategorií: (1) fyzikální (např. elektroporace, přímý přenos genů a bombardování částicemi) (2) chemické (např. nosiče založené na lipidech a jiné nevirové vektory) a (3) biologické (např. vektory odvozené od virů). Například nevirové vektory, jako jsou lipozomy potažené DNA, se mohou do pacienta zavést přímo intravenózní injekcí. Věří se, že komplexy lipozom/DNA se koncentrují v játrech, kde DNA vstupuje do makrofágů a Kupfferových buněk. Vektory nebo jiná „nahá" genová DNA se může také přímo zavést injekcí do požadovaného orgánu, tkáně nebo nádoru za účelem cíleného zavádění terapeutické DNA.

Metodologie genové terapie se také popisuje místem zavedení. Základní způsob zavedení genů zahrnuje transfer genu *ex vivo*, transfer genu *in vivo* a transfer genu *in vitro*. Při transferu genu *ex vivo* se buňky odeberou z pacienta a kultivují se v kultuře. Buňky se transfekují DNA a transfekované buňky se pomnoží a implantují se zpět do pacienta. Při genovém transferu *in vivo* transformované buňky jsou buňky rostoucí v kultuře, jako jsou buňky tkáňových kultur, a ne určité buňky z určitého pacienta. Tyto „laboratorní buňky" se transfekují, izolují se transfekované buňky, pomnoží se a implantují se zpět do pacienta nebo se použijí pro jiné účely. Transfer genu *in vivo* zahrnuje zavedení DNA do buněk pacienta, kdy buňky neopouštějí tělo pacienta. Všechny tři shora popsané kategorie se mohou použít při transferu genu *in vivo*, *ex vivo* a *in vitro*.

Mechanické (to je fyzikální) metody zavedení DNA jsou mikroinjekce DNA do zárodečných nebo somatických buněk, pneumatické zavedení partikulí potažených DNA, jako jsou částice zlata, které se používají v tzv. „genových zbraních" přístupy z anorganické chemie, jako je například transfekce fosforečnanem vápenatým. Zjistilo se, že pomocí fyzikální injekce plazmidové DNA do svalových buněk dochází k transfekci velkého procenta buněk a uvedené buňky vykazují stálou expresi markerových genů. Plazmidová DNA se může nebo nemusí integrovat do genomu buněk. Jestliže nedojde k začlenění transfekované DNA, umožňuje to transfekci a expresi genových proteinových produktů v terminálně diferenciovaných, neproliferovaných tkáních po prodlouženou dobu bez nebezpečí mutovaných inzercí, delecí nebo změn v buněčném nebo mitochondriálním genomu. Dlouhodobý, ale ne nezbytně trvalý transfer terapeutických genů do specifických buněk umožňuje léčbu genového onemocnění nebo použití při profylaxi DNA se může zavádět injekcí periodicky, aby se udrželo množství genového produktu, aniž se v genomech recipientních buněk objeví mutace. Jestliže se exogenní DNA nezačlení, je možná přítomnost několika konstrukcí exogenní DNA v jedné buňce s tím, že všechny konstrukty exprimují různé genové produkty.

Transfer genu zprostředkovaný částicemi se může použít pro injektování DNA do buněk, tkáně a orgánů. Jestliže se používají přístroje pro bombardování částicemi nebo tzv. „genové zbraně", generuje se rychlost, aby se partikulím s vysokou hustotou, potaženým DNA (vhodným materiálem pro partikule jsou zlato a wolfram) udělila vysoká rychlost, která jim umožní vstoupit do cílových orgánů, tkání a buněk. Elektroporace, která je vhodná při transferu genu, používá elektrický proud, aby se buňky nebo tkáně staly přístupné transferu genu. Používá se krátký elektrický impulz s daným silovým polem, aby se zvýšila permeabilita membrány takovým způsobem, že molekuly DNA mohou vniknout do buněk. Způsoby transferu genu prostřednictvím partikulí a elektroporace jsou dobře známy v oboru.

Chemické metody genové terapie zahrnují transfer genu zprostředkovaný nosičem za použití fúzogenních lipidových partikulí, jako jsou lipozomy nebo jiné nosiče pro membránovou fúzi. Nosič nesoucí požadovanou DNA může být vhodně začleněn do tělních tekutin nebo do krevního řečiště a pak je místně specificky řízen do cílového orgánu nebo tkáně v těle. Může se například vyvinout buněčně nebo orgánově specifická DNA, kterou nesou lipozomy a která je absorbovaná těmito specifickými buňkami. Injekce imunolipozomů, které jsou cílené na specifický receptor na určitých buňkách se může použít jako vhodná metoda inzerce DNA do buněk nesoucích receptor.

Jiným použitelným nosičovým systémem je asialoglykoprotein/polylysin konjugační systém, který je vhodný pro zavedení DNA do hepocytů při transferu genu *in vivo*.

Transfekovaná DNA může být také v komplexu s jinými druhy nosičů tak, že DNA se zavede do recipientní buňky, a pak se uloží do cytoplazmy nebo nukleoplazmy. DNA se může párovat s nosičovými jadernými proteiny ve specificky připravených komplexech a vnáší se tak přímo do jádra.

Transfer gen zprostředkovaný nosičem může také zahrnovat použití sloučenin na bázi lipidů, které nejsou lipozomy. Lipofektiny a cytofektiny jsou pozitivní ionty na bázi lipidů, které se váží na negativně nabitou DNA, a tvoří komplex umožňující přenést DNA skrz buněčnou membránu. Jiným způsobem transferu genu zprostředkovaným nosičem je endocytóza založená na receptoru. Při této metodě se vytvoří komplex ligand (který je specifický pro buněčný povrchový receptor) s genem a ten se pak injekcí zavede do krevního řečiště. Cílové buňky, které pak mají buněčný povrchový receptor, se budou specificky vázat na ligand a dochází ke transportu komplexu DNA–ligand do buňky.

Biologické metody genové terapie používají pro zavedení genů do buněk virové nebo nevirové vektory (jako konjugáty ligand–DNA, lipozomy a shora uvedené komplexy ligand–DNA). Transfekované buňky mohou být buňky získané z normální tkáně pacientů, pacientovy nemocné tkáně nebo z buněk, které nepocházejí z pacienta.

Může být žádoucí, aby rekombinantní molekula DNA obsahující sekvenci DNA peptidového fragmentu smyčky 5 nebo sekvenci DNA fúzního proteinu smyčky 5 byla operabilně spojena s expresivní kontrolní sekvencí za vzniku expresivního vektoru schopného exprimovat peptidový fragment nebo fúzní protein smyčky 5. V jiném případě genová regulace peptidového fragmentu smyčky 5 nebo fúzního proteinu smyčky 5 se může uskutečnit aplikací sloučenin, které se váží na gen smyčky 5, fúzní partnerský gen nebo kontrolní oblasti spojené s genem smyčky 5 nebo genem jeho fúzního partnera nebo se váží na odpovídající transkript RNA za účelem modifikace rychlosti transkripce nebo translace.

Virové vektory, které se používaly podle protokolů metod genové terapie, zahrnují retroviry, jiné RNA viry, jako jsou poliovirus nebo virus Sindbis, adenovirus, adeno–asociované viry, herpes virus, SV 40, virus vakcinie a jiné DNA viry. Jako transferové vektory genů se mohou také využívat replikačně defektní myší retrovirové vektory. Retroviry myší leukemie tvoří jednořetězcová RNA, která je v komplexu s proteinem jaderného core a polymerázovými (pol) enzymy. Komplex je opouzdřen proteinovým core (gag) a obklopen glykoproteinovým obalem (env), který určuje rozmezí hostitelů. Genomová struktura retrovirů zahrnuje geny gag, pol a env, které sousedí s 5′ a 3′ dlouhými terminálními repeticemi (LTR). Retrovirové vektorové systémy využívají skutečnost, že minimální vektor obsahující 5′ a 3′LTR a balicí signál je dostatečný, aby umožnil balení vektoru a infekci a integraci do cílových buněk, přičemž virové strukturální proteiny se dostávají *in trans* do balicí se buněčné linie. Základními výhodami retrovirových vektorů při transferu genů je účinná infekce a exprese genu ve většině buněčných typů, integrace vektoru do chromozomální DNA cílové buňky s přesnou jedinou kopií a jednoduchá manipulace retrovirového genomu. Změněné retrovirové vektory se například používají při metodách *ex vivo* při zavedení genů do periferních a nádor infiltrujících lymfocytů, hepatocytů, epidermálních buněk, myocytů nebo jiných somatických buněk (které se pak mohou zavést do pacienta, aby vznikl genový produkt z inzerované DNA).

Adenovirus tvoří lineární dvouřetězcová DNA, která je v komplexu s proteiny core a je obklopena kapsidovými proteiny. Výhody molekulární virologie spočívají ve schopnosti využít biologii těchto organizmů pro vznik vektorů schopných transdukovat nové genetické sekvence do cílových buněk *in vivo*. Vektory založené na adenovirech vykazují silnou expresi genových peptidových produktů. Adenovirové vektory mají vysoce účinnou infekčnost, dokonce při nízkém titru viru. Navíc virus je plně infekční ve formě bezbuněčných virionů, proto není

nezbytné injektovat producenta buněčné linie. Jinou potencionální výhodou adenovirových vektorů je schopnost dosáhnout dlouhodobé exprese heterologních genů *in vivo*.

Virové vektory se také používají pro inzerci genů do buněk za použití protokolů *in vivo*. Při řízení tkáňové specifické exprese cizích genů se mohou používat cis–působící regulační elementy nebo promotory, o kterých se ví, že jsou tkáňové specifické. V jiném případě toho lze dosáhnout použitím *in situ* zavedením DNA nebo virových vektorů do specifických anatomických míst *in vivo*. Přenosu genu do krevních cév *in vivo* se například dosahuje implantací *in vitro* transdukovaných endoteliálních buněk do vybraných míst na arteriálních stěnách. Okolní buňky infikované virem také exprimují produkt genu. Virový vektor se může zavést přímo do místa *in vivo* (například použitím katétru), což umožňuje virem infikovat pouze určité oblasti a dlouhotrvající místně specifickou genovou expresi. Také se demonstroval transfer genu *in vivo* za použití retrovirových vektorů do savčí tkáně a hepatické tkáně tak, že se do krevních cév, které prokrvují orgány, zavede pozměněný virus injekcí.

Peptidové fragmenty smyčky 5 se mohou také produkovat a použít při různých aplikacích. Například různé peptidové fragmenty smyčky 5 se mohou použít (1) jako agonisty a antagonisty, které jsou aktivní ve vazebných místech smyčky 5, (2) jako antigeny pro vývoj specifického antiséra, (3) jako peptidy při použití jako diagnostické kity a (4) jako peptidy spojené s cytotoxickými činidly nebo používané společně s cytotoxickými činidly za účelem cíleného usmrcování buněk, které vážou peptidové fragmenty smyčky 5. Aminokyselinové sekvence, které obsahují uvedené peptidové fragmenty, mohou být vybrány na základě pozic bází v externích oblastech molekuly, které jsou náchylné pro navázání antiséra nebo mají inhibiční účinnost peptidových fragmentů vůči procesům vznikajícím nebo exacerbovaným angiogenezí. Dále se tyto peptidové sekvence mohou srovnat se známými sekvencemi za použití databáze proteinových sekvencí, jako je GenBank, Brookhaven Protein, SWISS–PROT a PIR za účelem stanovení potencionální sekvenční homologie. Tyto informace umožňují eliminovat sekvence, které vykazují vysoký stupeň homologie s jinými molekulami, čímž se zvyšuje potenciál pro vysokou specifitu při vývoji antiséra, agonistů a antagonistů se smyčkou 5.

Peptidové fragmenty a fúzní proteiny smyčky 5 se také mohou použít za účelem izolace receptoru smyčky 5 imobilizací peptidového fragmentu nebo fúzního proteinu smyčky 5 na pevném povrchu například v afinitních kolonách, kterými kultivované endoteliální buňky nebo membránové extrakty procházejí. Jak je známo v oboru, izolace a čištění receptoru smyčky 5 může být následováno sekvenováním aminokyselin za účelem identifikace a izolace polynukleotidů, které kódují receptor smyčky 5. Takové polynukleotidy se pak mohou klonovat do vhodného expresivního vektoru a transfekovat do nádorových buněk. Exprese receptoru transfekovanými nádorovými buňkami může zvýšit odezvu těchto buněk na endogenní nebo exogenní peptidové fragmenty smyčky 5, přičemž se snižuje rychlost růstu metastáz. Rekombinantní exprese tohoto receptoru dále umožňuje, aby se produkovalo větší množství receptoru, například, aby se produkovalo dostatečné množství pro test s vysokou propustností za účelem identifikace menších antagonistů, které mimikují účinky smyčky 5.

Systematická substituce aminokyselin těmito syntetizovanými peptidy vede ke vzniku agonistů peptidu a antagonistů receptoru smyčky 5 se silnou afinitou, které podporují nebo zeslabují navázání peptidového fragmentu smyčky 5 na jeho receptor. Takových agonistů se může použít při potlačení růstu mikrometastáz a tím omezit rozšíření rakoviny. V případech neadekvátní vaskularizace antagonisté peptidových fragmentů smyčky 5 se mohou aplikovat za účelem zablokování inhibičních účinků peptidových fragmentů smyčky 5 a podpoření angiogeneze. Tento typ léčby může mít například terapeutické účinky při podpoře hojení ran u diabetiků.

Peptidové fragmenty nebo fúzní proteiny smyčky 5 nebo konjugáty podle vynálezu se mohou také použít jako antigeny za účelem vzniku polyklonálních nebo monoklonálních protilátek, které jsou specifické pro inhibitor smyčky 5. Takové protilátky se mohou použít při diagnostických metodách a v kitech pro detekci nebo kvantifikaci peptidových fragmentů smyčky 5 v tělních

tekutinách nebo tkáni. Výsledky těchto testů se mohou použít pro diagnostiku nebo stanovení prognostické relevance peptidových fragmentů smyčky 5.

Peptidové fragmenty smyčky 5 nebo fúzní proteiny smyčky 5 se mohou značit radioaktivními izotopy (příklad 13) nebo se mohou chemicky připojit k proteinům za vzniku konjugátů. Konjugáty zahrnují enzymy, nosičové proteiny, cytotoxická činidla, fluorescenční, chemoluminiscenční a bioluminiscenční molekuly, které se používají při provedení testu schopnosti látek, jež obsahují peptidové fragmenty smyčky 5, vázat antiséra smyčky 5, detekovat buněčné typy vykazující receptor peptidového fragmentu smyčky 5 nebo napomáhat čištění peptidových fragmentů smyčky 5. Metoda kondenzace se vybrala na základě funkčních skupin dostupných na aminoskupinách sekvence peptidového fragmentu smyčky 5, které zahrnují alkylovou skupinu, aminoskupinu, sulfhydrylovou, karboxylovou, amidovou, fenolovou, indolylovou a imidazolylovou skupinu. Různá činidla, která se používají, aby ovlivnila párování, zahrnují mezi jinými glutaraldehyd, diazotizovaný benzidin, karbodiimidy a p–benzochinon. Účinnost párovací reakce se stanovila použitím různých metod vhodných pro specifickou reakci. Radioaktivní značení peptidu smyčky 5 nebo jeho biologicky aktivního fragmentu například pomocí I^{125} se může provést použitím chloraminu T a NaI^{125} s vysokou specifickou aktivitou. Reakce se ukončí metabisiřičitanem a ze směsi se odstraní soli na kolonách a jedno použití. Značený peptid je eluován z kolony a shromáždí se frakce. Z každé frakce se odeberou alikvoty a radioaktivita se měří na gama počítači. Tento postup poskytuje radioaktivně značený peptidový fragment smyčky 5 bez nezreagovaného NaI^{125}. V jiném provedení vynálezu se krevní nebo tkáňový extrakt obsahující peptidový fragment smyčky 5 spojený se smyčkou 4 může čistit na afinitní koloně s polylysinovou pryskyřicí, přičemž peptidový fragment smyčky 4 – smyčky 5 se váže na pryskyřici prostřednictvím afinity peptidového fragmentu smyčky 4 pro lysin. Eluce vázaného proteinu poskytne čištěný fragment smyčky 4 – smyčky 5.

Jiná aplikace peptidového konjugátu je produkce polyklonálního antiséra. Produkce antiséra proti peptidovým fragmentům smyčky 5, analogům peptidových fragmentů smyčky 5 a receptoru smyčky 5 se může provést za použití zavedené metody dobře známé v oboru.Peptidové fragmenty smyčky 5 obsahující lysinové zbytky se mohou připojit k čištěnému bovinnímu sérovému albuminu (BSA) za použití glutaraldehydu. Účinnost této reakce se může určit měřením inkorporace radioaktivně značeného peptidu. Nezreagovaný glutaraldehyd a peptid se může separovat dialýzou a konjugát se může použít pro přípravu polyklonálního antiséra v králících, v ovcích, v kozách nebo v jiných zvířatech. Peptidové fragmenty smyčky 5 konjugované s molekulou nosiče, jako je BSA, se může kombinovat se směsí adjuvans, emulgovat a zavést podkožní injekcí do několika míst na zádech, krku, boku a někdy do tlapek vhodného hostitele. Opakované injekce se aplikují v pravidelných intervalech, každé 2 až 4 týdny. Přibližně 7 až 10 dnů po každé injekci. Vzorky se získávají z cév například po dilataci marginálních cév. Vzorky krve se nechávají srážet přes noc při teplotě 4 °C a centrifugují se přibližně při 2 400 X g při teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Sérum se izoluje, rozdělí se do alikvotů a skladuje se při teplotě 4 °C, jestliže se má použít bezprostředně pro následnou analýzu nebo při teplotě –20 °C až –90 °C.

Vzorky séra, které vznikly při přípravě poloklonálního antiséra, nebo vzorky média odebrané při produkci monoklonálního antiséra se mohou analyzovat za účelem stanovení titru protilátek, zvláště při stanovení vysokého titru protilátek. Pak se testuje nejvyšší titr antiséra peptidového fragmentu smyčky 5, aby se zjistily následující hodnoty: a) optimální ředění antiséra, při kterém dochází k největšímu specifickému navázání antigenu a také k jeho nejmenšímu nespecifickému navázání, b) schopnost vázat zvýšená množství peptidových fragmentů smyčky 5 na standardní substituční křivce, c) potenciální zkřížená reaktivita s příbuznými peptidy a proteiny, které zahrnují plazminogen a peptidové fragmenty příbuzných species a d) schopnost detekovat peptidové fragmenty smyčky 5 v buněčném kultivačním médiu a v extraktech plazmy, moče a tkáně. Titr se může stanovit několik způsoby, které jsou dobře známy v oboru, je to například „dot blot“ a analýza hustoty a také precipitací radioaktivně značeného komplexu peptid–protilátka za použití proteinu A, sekundárního protiséra, chlazeného etanolu nebo aktivní uhlí–dextran. Pak následuje měření aktivity na gama počítači. Je-li to nutné antisérum s nejvyšším

titrem se může dále čistit na afinitních kolonách. Peptidové fragmenty smyčky 5 se například mohou spojovat s běžně dostupnými pryskyřicemi a mohou se použít při tvorbě afinitních kolon. Vzorky antiséra pak mohou procházet přes kolonu tak, že protilátky smyčky 5 se vážou (prostřednictvím peptidových fragmentů smyčky 5) na kolonu. Tyto navázané protilátky se následně eluují, izolují a stanovuje se hodnota titru a specifita.

Vynález dále popisuje kitu pro měření peptidových fragmentů smyčky 5 a receptor smyčky 5. Antiséra, která mají nejvyšší titr a specifitu a mohou detekovat peptidové fragmenty smyčky 5 v extraktech plazmy, moče, tkání a buněčného kultivačního média, se mohou použít jako testovací kity pro rychlé, vhodné citlivé a specifické měření a lokalizaci peptidových fragmentů smyčky 5. Uvedené testovací kity se mohou použít, ale nejsou omezeny na následující metody: kompetitivní a nekompetitivní testy, radioimunologické testy, bioluminiscenční a chemoluminiscenční testy, fluorometrické testy, sendvičové testy, dob bloty, testy navázaných enzymů, mezi něž patří ELISA, testy na mikrotitračních destičkách, imunocytochemické testy a stripy potažené protikátkami nebo papírky pro rychlé vyšetření moče nebo krve. V případě každého kitu je nutné stanovit rozmezí citlivost, přesnost, vhodnost, specifitu a reprodukovatelnost stanovení způsobu, které jsou dobře známy v oboru.

Příkladem testovacího kitu, který se běžně užívá ve výzkumu a při klinické praxi je kit pro radiomunologický test (RIA). RIA s peptidovým fragmentem smyčky 5 se může stanovit následujícím způsobem: Po úspěšní radiojodinaci a čištění peptidového fragmentu smyčky 5 se přidají do zkumavek obsahujících relativně konstantní množství radioaktivity, jako je 10 000 cpm, ve vhodném systému pufrů v několika ředěních protilátky proti peptidovému fragmentu smyčky 5. (Pufr nebo preimunitní sérum se přidá do jiných zkumavek za účelem stanovení nespecifického navázání). Po inkubaci při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin se do všech zkumavek přidá protein A a zkumavky se míchají na vortexu, inkubují se při teplotě místnosti po dobu 90 minut a centrifugují se přibližně při 2000 až 2500 X g při teplotě 4 °C k precipitaci komplexů protilátky navázané na značeném antigenu. Supernatant se odsál a radioaktivita pelet se stanovila na gama počítači. Za účelem další charakterizace se vybralo ředění antiséra, které váže přibližně 10 až 40 % značeného peptidu po odečtení nespecifického navázání.

Dále rozmezí ředění (přibližně 0,1 pg až 10 ng) peptidového fragmentu smyčky 5, které se používá při přípravě antiséra, se hodnotí přidáním známého množství peptidu do zkumavek, které obsahují radioaktivně značený peptid a antisérum. Po inkubační době (např. 24 nebo 48 hodin) se přidá protein A a zkumavky se centrifugují. Dále se odstraní supernatant a určí se radioaktivita peletu. Substituce navázání radioaktivně značeného peptidového fragmentu smyčky 5 za neznačený peptidový fragment smyčky 5 vykazuje standardní křivku. Navíc se do testovacích zkumavek může přidat několik koncentrací dalších peptidových fragmentů smyčky 5, plezminogenů, peptidových fragmentů smyčky 5 z různých species a homologní peptidy za účelem charakterizace specifity antiséra proti peptidovému fragmentu smyčky 5.

Extrakty různých tkání zahrnují, ale nejsou omezeny na primární a sekundární nádory, Lewisův karcinom plic, kultury buněk produkujících peptidový fragment smyčky 5, placentu, dělohu a jiné tkáně, jako je mozek, játra a střeva, které se připraví způsobem, jenž se úspěšně použil při extrakci peptidových fragmentů smyčky 5. Po přípravě extraktů tkáně se přidá testovací pufr a různé alikvóty se dají do zkumavek určených pro test RIA. Extrakty buněk produkujících peptidový fragment smyčky 5 vykazují substituční křivky, které jsou paralelní ke standardní křivce, zatímco extrakty tkání, které neprodukují peptidové fragmenty smyčky 5, nesubstituují radioaktivně značené peptidové fragmenty smyčky 5 z antiséra proti peptidovému fragmentu smyčky 5. Takové substituční křivky indikují využití testu peptidového fragmentu smyčky 5 pro měření množství peptidových fragmentů smyčky 5 v tkáních a tělních tekutinách.

Tkáňové extrakty, které obsahují peptidové fragmenty smyčky 5, se mohou také charakterizovat na HPCL s reverzní fází. Shromáždily se eluované frakce, sušily se na zařízení Speed Vac, rekonstituovaly se v pufru RIA a analyzovaly se v testu RIA pro smyčku 5. V tomto případě se

maximální množství imunoreaktivity peptidového fragmentu smyčky 5 nachází ve frakcích, které odpovídají pozici eluce peptidového fragmentu smyčky 5.

Shora popsaný testovací kit obsahuje instrukce, antisérum, peptidový fragment smyčky 5 a je možné, aby obsahoval radioaktivně značený peptidový fragment smyčky 5 a/nebo činidla pro precipitaci komplexů peptidový fragment smyčky 5/protilátka smyčky 5. Takový kit se může použít pro měření peptidových fragmentů smyčky 5 v biologických tekutinách a tkáňových extraktech zvířat a lidí s nebo bez nádorů.

Jiný kit se může použít pro vizualizaci nebo lokalizaci peptidových fragmentů smyčky 5 v tkáních a buňkách. Imunohistochemické metody a kity, ve kterých se používají takové metody, jsou dobře známy v oboru. V oboru je také známo, že imunohistochemické kity obsahují antisérum proti peptidovému fragmentu smyčky 5 a pravděpodobně blokovací sérum a sekundární antisérum spojené s fluorescenční molekulou, jako je fluorescinizothiokyanát nebo s jiným činidlem, které se používá při vizualizaci primárního antiséra. Za použití této metody se mohou u biopsií nádorů testovat místa, která produkují peptidový fragment smyčky 5 nebo místa receptoru peptidového fragmentu smyčky 5. V jiném případě kit obsahuje radioaktivně značené nukleové kyseliny, které se používají při *in situ* hybridizaci jako sondy pro mediátorovou RNA peptidového fragmentu smyčky 5.

Látky podle vynálezu se mohou připravovat za použití postupu dobře známého v oboru (např. Sottrup–Jensen et al., Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol 3, Davidson, J.F., Rowan, R., M. Samama, M.M. and Desnoyers, P.C. editors, Raven Press, New York, 1978). Jedním způsobem, jak připravit peptidové fragmenty smyčky 5, je enzymatické štěpení nativního proteinu (glu–plazminogen) nebo jeho variant (což znamená zkrácená forma proteinu v plné délce, který je schopný být štěpen enzymy a který obsahuje nejméně sekvenci smyčky 5, jak se definuje shora v textu, jako je lys–plazminogen nebo miniplazminogen). Tato metoda nejdříve vyžaduje izolaci proteinu z lidské plazmy, aniž jsou přítomny inhibitory plazminu, přičemž se podporuje konverze glu–plazminogenu na lys–plazminogen (Novakhatny, V. and Kudinov, S.A., J. Mol. Biol. 179: 215–232 (1984). Následně je zkrácená molekula ošetřena proteolytickým enzymem v koncentraci, která je dostatečná pro štěpení peptidových fragmentů smyčky 5 z polypeptidu, a pak se čistí od zbývajících fragmentů způsobem, jenž je dobře znám v oboru. Preferovaným proteolytickým enzymem je lidská nebo prasečí elastáza, která štěpí plazminogen a jeho zkrácené varianty mezi oblastmi smyčky 3 až 4 a 4 až 5 (a tím je schopna tvořit peptidové fragmenty, které obsahují smyčky 1 až 3 a 1 až 4 nebo samotné smyčky 4 nebo 5). Lys–plazminogen nebo glu–plazminogen se může například ošetři prasečí nebo lidskou neurofyl-elastázou v poměru okolo 1 : 100 až 1 : 300 lys–plazminogenu : elastáze (upřednostňuje se poměr 1 : 150 až 1 : 250 a více se upřednostňuje poměr 1 : 150 v roztoku pufru, jako je Tris–HCl, NaCl, fosforečnan sodný a podobně. V jiném případě se může nejdříve imobilizovat (například sodný a podobně). V jiném případě se může nejdříve imobilizovat (například na pryskyřici), aby proběhla purifikace štěpeného produktu. Glu–plazminogen nebo lys–plazminogen se obecně ošetřuje lidskou nebo prasečí elastázou při teplotách, které leží v rozmezí od přibližně 10 °C do přibližně 40 °C a po dobu od přibližně 4 do přibližně 24 hodin v závislosti na požadovaném rozsahu štěpení. Za účelem dosažení celkového štěpení glu–plazminogenu, lys–plazminogenu nebo miniplazminogenu lidskou nebo prasečí elastázou je nutné, aby enzym na polypeptidy působil nejméně okolo 12 hodin při teplotě místnosti. Kolísavé pH a doba expozice vede k minimálnímu nebo částečnému štěpení jednoho nebo více přístupných štěpicích míst. Produkty štěpení se pak čistí libovolným způsobem, jenž je dobře znám v oboru (jako je například kolonová chromatografie). Preferované schéma čištění zahrnuje aplikaci produktů štěpení na lysinsepharosovou kolonu, jak se popisuje v příkladu 14.

Příklady provedení vynálezu

Syntéza peptidových fragmentů smyčky 5 na pevné fázi.

Následující příklady mají sloužit k další ilustrací přípravy nových sloučenin vynálezu. Příklady 1–2 nejsou zahrnuty do vynález, ale jsou užitečné k úplnému pochopení přípravy sloučenin vynálezu.

Příklad 1

N – Ac –Val – Leu – Leu – Pro – Asp – Val – Glu – Thr – Pro – Ser – Glu – Glu – Asp – NH_2

Kolona pro syntézu amidu peptidu (Applied Biosystems se umístila do Perkin Elmer/Applied Biosynthesis „Synergy" syntetizátoru peptidu a použily se následující syntetické stupně.

1. Solvatace pryskyřice s DMF po dobu 5 minut;
2. Odstranění skupiny Fmoc z α–N–konce aminokyseliny vázané na pryskyřici za použití 20 % piperidinu v DMF po dobu okolo 15 minut;
3. Promývání pryskyřice s DMF po dobu okolo 15 minut;
4. Aktivace α–C–konce aminokyseliny č. 1 (Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu), 25 μmol) za použití 0,2 M roztoku HBTU (25 μmol) a HOBT (25 μmol) v DMSO–NMP (N–methylpyrrolidin) a 0,4 M roztoku diizopropylethylaminu (25 μmol) v DNS–NMP a navázání aktivované aminokyseliny na pryskyřici;
5. Spojení aktivované aminokyseliny chráněné skupiny Fmoc (připravené v kroku 5) s aminokyselinou vázanou na pryskyřici (připravenou v kroku 2) v roztoku DMF po dobu přibližně 30 minut;
6. Promývání s DMF po dobu 5 minut;
7. Opakování kroku 3 až 6 s následujícími aminokyselinami:

   Č. aminokyselina
   2. Fmoc–Glu(γ–O^{t}Bu)
   3. Fmoc–Glu(γ–O^{t}Gu)
   4. Fmoc–Ser(^{t}Bu)
   5. Fmoc–Pro
   6. Fmoc–Thr(^{t}Bu)
   7. Fmoc–Glu(γ–O^{t}Gu)
   8. Fmoc–Val
   9. Fmoc–Asp(β–O^{t}Gu)
   10. Fmoc–Pro
   11. Fmoc–Leu
   12. Fmoc–Leu
   13. Fmoc–Val

8. Spojení kyseliny octové s a–N–koncem peptidu vázaného na pryskyřici za podmínek uvedených v kroku 4 a 5.
9. Promývání pryskyřice s THF po dobu okolo 5 minut, aby se odstranilo DMF, sražení pryskyřice, sušení pryskyřice v atmosféře argonu po dobu 10 minut a v atmosféře dusíku po dobu dalších 10 minut za vzniku čistého peptidu vázaného na pryskyřici.
10. Odštěpení peptidu z pryskyřice, přičemž dochází k odstranění chránicích skupin z vedlejšího řetězce aminokyselin smícháním se štěpicím činidlem (čerstvě připravený thioanisol (100 μl), voda (50 μl), ethandithiol (50 μl) a kyselina trifluoroctová (1,8 ml) při teplotě –5 °C až –10 °C) při teplotě 0 °C po dobu 10 až 15 minut a pak při teplotě okolí po dalších 1,75 hodiny (plus další půl hodiny pro každý Arg(Pmc), je-li přítomen). Množství použitého štěpicího činidla se stanoví podle následujícího vzorce:

hmotnost pryskyřice s vázaným peptidem (mg)	množství štěpicího činidla (μl)
0 až 10	100
10 až 25	200
25 až 50	400
50 až 100	700
100 až 200	1 200

11. Filtrace a promytí produktu s neředěnou kyselinou trifluoroctovou, přidání filtrátu v 0,5 ml podílech do centrifugační zkumavky, která obsahuje přibližně 8 ml chladného dietyleteru, centrifugace a dekantace. Proces se opakuje až se vysráží všechny peptidy (jestliže se všechny peptidy po přidání éteru nevysráží, směs se extrahuje 30% vodnou kyselinou octovou (3 x 1 ml) a spojené vodné extrakty se lyofilizovaly za vzniku produktu).

12. Použití surového peptidu nebo čištěného peptidu na HPLC (za použití 7 μm Symmetry prep C18 kolony (7,8x 300 mm) se směsí rozpouštědel s gradientem od 5 % do 100 % acetonitril–(voda, 0,1 % TFA) po dobu 50 minut), pak následuje lyofilizace za vzniku 35 mg N –Ac – Val – Leu – Leu – Pro – Asp – Val – Glu – Thr – Pro – Ser – Glu – Glu – Asp – NH_2.

Příklad 2

N – Ac – Met – Phe – Gly – Asn – Gly – Lys – Gly – Tyr – Art – Gly – Lys – Arg – Ala – Thr – Thr – Val – Thr – Gly – Thr – Pro – NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu 1 a jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Pro.

Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č. aminokyselina
2. Fmoc–Thr(^{t}–Bu)
3. Fmoc–Gly
4. Fmoc–Thr(^{t}Bu)
5. Fmoc–Val
6. Fmoc–Thr(^{t}Bu)
7. Fmoc–Thr(^{t}Bu)
8. Fmoc–Ala
9. Fmoc–Arg(Pmc)
10. Fmoc–Lys(Boc)
11. Fmoc–Gly
12. Fmoc–Arg(Pmc)
13. Fmoc–Tyt(^{t}Bu)
14. Fmoc–Gly
15. Fmoc–Lys(Boc)
16. Fmoc–Gly
17. Fmoc–Asn(Trt)
18. Fmoc–Gly
19. Fmoc–Phe
20. Fmoc–Met

za vzniku 35 mg N – Ac – Met – Phe – Gly – Asn – Gly – Lys – Gly – Tyr – Arg – Gly – Lys – Arg – Ala – Thr – Thr – Val – Thr – Gly – Thr – Pro – NH_2.

Příklad 3

Ac – Gln – Asp – Trp – Ala – Ala – Gln – Glu – Pro – His – Arg – His – Ser – Ile – Phe – Thr – Pro – Glu – Thr – Asn – Pro – Arg – Ala – Gly – Leu – Glu – Lys – Asn – Tyr – NH_2(SEQ ID NO: 40)

Sloučenina uvedená v názvu příkladu se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu 1 a za použití Fmoc–Tyr(^{t}Bu) jako aminokyseliny č. 1. Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asn(Trt)
3.	Fmoc–Lys(Boc)
4.	Fmoc–Glu(γ–O^{t}Bu)
5.	Fmoc–Val
6.	Fmoc–Gly
7.	Fmoc–Ala
8.	Fmoc–Arg(Pmc)
9.	Fmoc–Pro
10.	Fmoc–Asn(Trt)
11.	Fmoc–Thr(^{t}Bu)
12.	Fmoc–Glu(γ–O^{t}Bu)
13.	Fmoc–Pro
14.	Fmoc–Thr(^{t}Bu)
15.	Fmoc–Phe
16.	Fmoc–Ile
17.	Fmoc–Ser(^{t}Bu)
18.	Fmoc–His(Trt)
19.	Fmoc–Arg(Pmc)
20.	Fmoc–His(Trt)
21.	Fmoc–Pro
22.	Fmoc–Glu(γ–O^{t}Bu)
23.	Fmoc–Gln(Trt)
24.	Fmoc–Ala
25.	Fmoc–Ala
26.	Fmoc–Trp
27.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
28.	Fmoc–Gln(Trt)

za vzniku 40 mg Ac – Gln – Asp – Trp – Ala – Ala – Gln – Glu – Pro – His – Arg – His – Ser – Ile – Phe – Thr – Pro – Glu – Thr – Asn – Pro – Arg – Ala – Gly – Leu – Glu – Lys – Asn – Tyr – NH_2.

Příklad 4

N – Ac – Arg – Arsn – Pro – Asp – Val – Gly – Gly – Pro – Trp –NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu 1 a jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Trp. Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Pro
3.	Fmoc–Gly

4. Fmoc–Gly
5. Fmoc–Val
6. Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
7. Fmoc–Gly
8. Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
9. Fmoc–Pro
10. Fmoc–Asn (Trt)
11. Fmoc–Arg(Pmt)

za vzniku 20 mg N – Ac – Arg – Asn – Pro – Asp – Val – Gly – Gly – Pro – Trp –NH_2.

Příklad 5

N – Ac – Tyr – Thr – Thr – Asn – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – Tyr – NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1 a jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Leu
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Arg(Pmc)
7.	Fmoc–Pro
8.	Fmoc–Asn(Trt)
9.	Fmoc–Thr(^{t}Bu)
10.	Fmoc–Thr(^{t}Bu)
11.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)

za vzniku 10 mg N – Ac – Tyr – Thr – Thr – Asn – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – Tyr – NH_2.

Příklad 6

N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1 a jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Leu
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Arg(Pmc)
7.	Fmoc–Pro

za vzniku 4 mg N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – Tyr NH_2. MS (FAB) m/z 995 $(M+H)^+$.

Příklad 7

N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – NH_2.

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
3.	Fmoc–Leu
4.	Fmoc–Lys(Boc)
5.	Fmoc–Arg(Pmc)
6.	Fmoc–Leu

za vzniku 6 mg N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – NH_2. MS (ESI) m/z 832 $(M+H)^+$.

Příklad 8

N – Ac – Pro – Glu – Lys – Arg – Tyr – Asp – Tyr – NH_2 (SEQ ID NO: 39).

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Arg(Pmc)
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Glu
7.	Fmoc–Pro

za vzniku 6 mg N – Ac – Pro – Glu – Lys – Arg – Tyr – Asp – Tyr – NH_2. MS (FAB) m/z (1101) $(M+H)^+$.

Příklad 9

N – Ac – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – Tyr – NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Leu
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Arg(Pmc)

za vzniku 8 mg N – Ac – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – Tyr – NH_2.MS (ESI) m/z (898) $(M+H)^+$.

Příklad 10

N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu –3 –I –Tyr –NH_2 (SEQ ID NO: 18)

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–3–I–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Leu
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Arg(Pmc)

7. Fmoc–Pro

za vzniku 2 mg N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu –3 –I –Tyr –NH_2. MS (ESI) m/z (1121) $(M+H)^+$.

Příklad 11

N – Ac –Pro –Arg –Lys –Leu – Tyr –3 –I –Tyr –NH_2 (SEQ ID NO: 6)

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–3–I–Tyr(^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Asp(β–O^{t}Bu)
3.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
4.	Fmoc–Leu
5.	Fmoc–Lys(Boc)
6.	Fmoc–Arg(Pmc)
7.	Fmoc–Pro

za vzniku 2,5 mg N – Ac –Pro –Arg –Lys –Leu – Tyr –3 –I –Tyr –NH_2. MS (ESI) m/z 1121 $(M+H)^+$.

Příklad 12

N – Ac – Lys – Leu – Tyr – Asp – NH_2

Požadovaná sloučenina se připravila za použití syntetického postupu popsaného v příkladu č. 1. Jako aminokyselina č. 1 se použila Fmoc–Asp(O^{t}Bu). Následující aminokyseliny se přidaly za určených podmínek:

Č.	aminokyselina
2.	Fmoc–Tyr(^{t}Bu)
3.	Fmoc–Leu
4.	Fmoc–Lys

za vzniku 2 mg N – Ac – Lys – Leu – Tyr – Asp – NH_2.

Příklad 13

Příprava a separace směsi N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp –3 – I^{125} – Tyr^{535} –NH_2 a N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – 3 – I^{125} – Tyr^{535} –NH_2 (SEQ ID NO: 18) a SEQ ID NO: 6.

Do roztoku s 30 μg N– acetyl –propyl – arginyl – lysyl – leucyl – tyrosyl – aspartyl – tyrosylamid v 80 ml fyziologického roztoku (PBS) pufrovaného fosforečnanem se přidá jedno lože s jódem (Pierce, Rockford, IL) a 100 μCi NaI^{125}. Po 10 minutách se odstraní nadbytek NaI^{125} tím, že se reakční směs nanese na kolonu Water C18–Light SepPack a sloupec se eluuje vodou pak 0,1 % TFA v 1:1 %CH_3CN/voda a sbírají se frakce 3 x 200 μl, aby vznikla směs radioaktivně značených peptidů Tyr^{533} a Tyr^{535}.

Radioaktivní směs peptidů se nanesla injekcí na kolonu C18 HPLC s ekvimolárním roztokem chlazených nosičů N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – 3 –I – Tyr – NH_2 a N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – 3 – I – Tyr – Asp – Tyr – NH_2, eluční časy se předem určily na 36 minut a 38 minut. Kombinovaly se opakované eluce se systémem rozpouštědel z příkladu 1 a lyofilizace: v relevantních frakcích byla požadovaná látka N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – Tyr – Asp – 3 –I –Tyr – NH_2 s minimálním znečištěním s N – Ac – Pro – Arg – Lys – Leu – 3 – I – Tyr – Asp – 3 –I –Tyr – NH_2.

Obecné metody

Příklad 14
Izolace a čištění peptidových fragmentů smyčky 5.

Peptidové fragmenty smyčky 5 se připravily z produktu štěpení Lys–plazminogenu (Lys–HPg, Abott Laboratories, Abbott Park, IL) prasečí elastázou (SIGMA, St. Louis, MO) modifikovanou metodou podle Powell et al. (Arch Biochem. Biophys. 248 (1): 390–400 (1986). 1,5 mg prasečí elastázy se inkubovalo s 200 mg Lys–HPg v 50 mM Tris–HCl pH 8,0 a směs se míchala za stálého houpání přes noc při teplotě místnosti. Reakce se ukončila přidáním DPF (diizopropylfluorofosforečnanu, SIGMA) tak, aby konečná koncentrace byla 1 mM. Směs se míchala na houpací míchačce po dalších 30 minut, dialyzovala se proti 50 mM Tris pH 8,0 přes noc a zakoncentrovala se. Štěpený plazminogen se nanesl na 2,5 cm x 15 cm velkou kolonu lysin–Sepharose 4B (Brockway, W. J. and Castellino, F. J., Arch. Biochem. Biophys. 151: 194–199 (1972) a kolona se ekvilibrovala 50 mM Tris pH 8,0 až se dosáhla hodnota absorbance 0,05 (při vlnové délce 280 nm). Tento krok se uskutečnil, aby se odstranily libovolné fragmenty, které obsahují oblast smyčky 1 a/nebo oblast smyčky 4 (obě oblasti vážou lysin). Neabsorbované peptidové fragmenty smyčky 5 se dialyzovaly proti 50 mM pufru Na_2PO_4, pH 5,0 a pak se nanesly na kolonu BioRad Mono–S, která se ekvilibrovala stejným pufrem. Dominantní frakce obsahující štěpenou část smyčky 5, neštěpený mini–HPg a zbývající proteáza se eluovala 0% až 20%, 20% až 50% a 50% až 70% postupným gradientem roztoku 20 mM fosforečnanu/1 M KCl pH 5,0. Elektroforézou na gelu se zjistili, že peptidové fragmenty smyčky 5 se eluovaly při gradientu 50 %. Sebrané frakce s koncentračním píkem se dialyzovaly přes noc proti 20 mM Tris pH 8,0.

Pomocí chromatografie FPLC a DodSO4/PAGE s barvením stříbrem (Coomassie Blue) se stanovilo, že separované fragmenty smyčky 5 dosahují přinejmenším 95% čistoty. Sekvenční analýza aminoterminální části purifikovaných fragmentů ukázala na přítomnost třech polypeptidů, jež mají α–N–terminační sekvence VLLPDVETPS, VAPPPVVLL a VETPSEED, které korespondují s aminokyselinami v pozicích Val^{449} až Ser^{458}, Val^{443} až Leu^{450} a Val^{454} až Asp^{461} sekvence SEQ ID NO: 1.

Příklad 15
Endoteliální proliferační test.

Proliferace endoteliálních buněk *in vitro* se stanovila podle Lingen, et al., Laboratory Investigation, 74: 476–483 (1996) za použití kitu Cell Titer 96 Aqueous Non–Radioactive Cell Proliferation Assay kit (Promega Corporation, Madison, WI). Bovinní kapilární (adrenální) endoteliální buňky se nanesly na destičky s 96 prohlubněmi v hustotě 1000 buněk na prohlubeň destičky v Dulbecco modifikovaném Eagle médiu (DMEM), které obsahuje 10% donorové telecí sérum a 1% BSA (bovinní sérový albumin, GIBCO BRL, Gaithesburg, MD). Po 8 hodinách se buňky nechaly vyhladovět přes noc v DMEM, které obsahuje 0,1 % BSA, pak se znovu nakrmily médiem, které obsahuje specifikované koncentrace inhibitoru a 5 ng/ml bFGF (základní fibroblastový růstový faktor). Výsledky testu se upravily jak pro nestimulované buňky (to znamená, že se nepřidalo bFGF), což se používá jako základní hodnota, a pro buňky stimulované samotným bFGF (to znamená, že se nepřidal inhibitor) jako maximální proliferace. Když se zkombinovaly výsledky více pokusů, výsledky se prezentovaly jako procento změny v počtu buněk ve srovnání se samotným bFGF.

Příklad 16
Migrační test endoteliálních buněk.

Test migrace endoteliálních buněk se provedl v podstatě podle, P. J. Polverini et al., Methods Enzymol, 198: 440–450 (1991). Bovinní kapilární (adrenální) endoteliální buňky (BCE, které se získaly od Judah Folkman, Harvard University Medical Schol) se nechaly přes noc vyhladovět

v médiu DMEM, které obsahuje 0,1% bovinní sérový albumin (BSA). Buňky se pak uvolnily z podkladu trypsinem, shromáždily se a resuspendovaly se v DMEM s 0,1% BSA v koncentraci 1,5 x 10^6 buněk na ml. Buňky se daly na dno modifikované Boydenovy komory s 48 prohlubněmi (Nukleopore Corporation, Cabin John, MD). Komora se sestavila, obrátila a buňky se nechaly přichytit po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C na polykarbonátové membrány pro chemotaxi (velikost pórů 5 μm), pak se přes noc namočily do 0,1% želatiny a nechaly se uschnout. Komora se pak znovu obrátila a do každé prohlubně horní komory se přidaly testovací látky (přičemž celkový objem je 50 μl); přístroj se pak inkuboval po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Membrány se pak fixovaly a barvily (Diffquick, Fisher Scientific, Pittsburg, PA) a spočítal se počet buněk, které migrovaly do horní komory přes 10 silných silových polí. Odečetla se zpětná migrace do DMEM + 0,1% BSA a data se označila jako počet buněk migrujících přes 10 vysokých silových polí (400x) nebo v případě, že se zkombinovaly výsledky z více experimentů, vyjadřují se jako procento inhibice migrace ve srovnání s pozitivní kontrolou. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Příklad 17

Účinek peptidových fragmentů smyčky 5 na proliferaci endoteliálních buněk *in vitro*.

Stanovil se účinek peptidových fragmentů smyčky 5 na proliferaci endoteliálních buněk *in vitro* za použití shora popsaného testu proliferace endoteliálních buněk. Při těchto experimentech se připravily peptidové fragmenty smyčky 5 podle příkladů 1 až 14 a testovaly se různé koncentrace v rozmezí přibližně 100 až 1000 pM. Jako kontrola maximální proliferace se použilo bFGF. Peptidový fragment smyčky 5 se sekvencí SEQ ID NO: 3 byl účinný při inhibici proliferace buněk BCE v závislosti na dávce. Koncentrace peptidového fragmentu se sekvencí SEQ ID NO: 3, při které se dosáhne 50% inhibice (ED_{50}) je přibližně 300 nM. Naopak ED_{50} u smyček 1 až 4 je 135 nM.

Účinek peptidových fragmentů jiné smyčky na inhibici proliferace buněk BCE se uvádí v tabulce č. 1. Peptidový fragment smyčky 3 vykazuje nejnižší účinek při inhibici proliferace buněk BCE (hodnota ED_{50} je 320 nM), peptidové fragmenty smyček 1 – 4 (hodnota ED_{50} je 135 nM) a peptidové fragmenty smyček 1 – 3 (hodnota ED_{50} je 75 nM). Nejúčinnější při inhibici proliferace buněk BCE je peptidový fragment smyčky 5 s hodnotou ED_{50} 0,3 nM.

Příklad 18

Účinek peptidových fragmentů smyčky 5 na migraci endoteliálních buněk *in vivo*.

Za použití popsaného testu migrace endoteliálních buněk se také stanovil účinek peptidových fragmentů smyčky 5 na *in vitro* migraci endoteliálních buněk. Peptidové fragmenty smyčky 5 inhibovaly migraci buněk BCE v závislosti na dávce, přičemž hodnota ED_{50} je přibližně 300 pM. Koncentrace peptidových fragmentů smyčky 5 nutná pro maximální inhibici buněk BCE, také inhibovala buňky PC–3 a MDA 486. Tento výsledek, když se spojí dohromady s výsledkem z příkladu 2, ukazuje, že inhibice stimulace proliferace a migrace buněk BCE peptidovými fragmenty smyčky 5 je pro endoteliální buňky silná a specifická. To však neplatí v případě normálních a nádorových buněk.

Následující příklady jsou pouze ilustrativní a neomezují vynález na doložené látky. Varianty a změny, které jsou odborníkům v oboru zřejmé, spadají rovněž do rozsahu a charakteru předloženého vynálezu, který je plně definován v přiložených patentových nárocích. V tabulce č. 1 jsou uvedeny hodnoty ED_{50}, které se získaly při inhibici proliferace buněk CBE a migrace buněk fragmenty různých smyček *in vitro*. Peptidové fragmenty uvedené v tabulce se značí vzhledem k jejich odpovídající frekvenční homologii se sekvencí SEQ ID NO: 1. Symbol "*" označuje data převzatá z publikace Marti et al., Eur. J. Biochem., 219: 455–462 (1994) a symbol "–" označuje případy, kde data neexistují.

Tabulka č. 1

Proteinový fragment z SEQ ID NO: 1	Antiproliferační aktivita buněk BCE (ED_{50})	Inhibice migrace buněk HMVEC (ED_{50})
smyčky 1-4 (angiostatin)*	135 nM	160 nM
smyčka 1 (Tyr^{80}-Glu^{163}) *	320 nM	-
smyčka 2 (Glu^{161}-Thr^{245}) *	nemá aktivitu	-
smyčka 3 (Thr^{253}-Ser^{335}) *	460 nM	-
smyčka 4 (Val^{354}-Val^{443}) *	bez aktivity	-
smyčky 1-3 (Tyr^{80}-Pro^{353}) *	75 nM	60 nM
smyčky 2-3 (Glu^{161}-Ser^{335}) *	-	-
smyčka 5 (Val^{443}-Ala^{543}) *	250 pM	200 pM
smyčka 5 (Val^{449}-Ala^{543}) *	-	240 pM
smyčka 5 (Val^{454}-Ala^{543}) *	-	220 pM
smyčka 5 (Val^{443}-Phe^{546}) *	60 nM	55 nM
smyčka 5 (Val^{449}-Phe^{546}) *	-	-
smyčka 5 (Val^{454}-Phe^{546}) *	-	-
smyčky 4-5 (Val^{355}-Ala^{543}) *	-	280 pM
smyčky 4-5 (Val^{355}-Phe^{546}) *	-	-
N-Ac-Val^{449}-Asp^{461}-NH_2	-	> 1 mM
N-Ac-Met^{463}-Pro^{482}-NH_2	-	> 1 mM
N-Ac-Gln^{484}-Tyr^{511}-NH_2	-	> 100 μM
N-Ac-Arg^{513}-Trp^{523}-NH_2	-	500 pM
N-Ac-Tyr^{525}-Tyr^{535}-NH_2	-	200 pM
N-Ac-Pro^{529}-Tyr^{535}-NH_2	-	120 pM
N-Ac-Pro^{529}-Asp^{534}-NH_2	-	123 pM
N-Ac-Pro^{150}-Tyr^{156}-NH_2	-	160 nM
N-Ac-Arg^{530}-Tyr^{535}-NH_2	-	80 pM
N-Ac-Pro -Arg-Lys-Leu-3-I-Tyr-Asp-Tyr-NH_2	-	> 100 nM
N-Ac-Pro -Arg-Lys-Leu-Tyr-Asp-3-I-Tyr-NH_2	-	400 pM
N-Ac-Lys^{531}-Tyr^{534}-NH_2	-	-

Příklad 19

Rekombinantní exprese fragmentů smyčky 5 v *Pichia pastoris*.

A. Produkce cDNA kódující fragmenty smyčky 5 PCR:

PCR se použilo pro generaci cDNA fragmentů, které kódují peptidové fragmenty smyčky 5, jejichž aminokyselinová sekvence leží (1) mezi aminokyselinami sekvence SEQ ID NO: 1 v pozicích 450 až 543 (K5A), jejichž aminokyselinová sekvence leží (2) mezi aminokyselinami sekvence SEQ ID NO: 1 v pozicích 450 až 546 (K5F), (3) jejichž aminokyselinová sekvence leží mezi aminokyselinami v pozicích 355 až 543 (K4–5A) jejichž aminokyselinová sekvence leží (1) mezi aminokyselinami sekvence SEQ ID NO: 1 v pozicích 355 až 546 (K4–5F) a které se používají pro klonování a expresi v eukaryontních a prokaryontních hostitelích. Fragmenty DNA se generovaly za použití cDNA, která kóduje lidský plazminogen (získaly se od Dr. E. Reich, State University of New York, Stony Brook, NY) a která se používá jako templátová DNA, a dopředných a reverzních primerů (získaly se od firmy Operon Technologies, Inc. Alameda, CA), jak je uvedeno dále v textu:

5'-ATTAATGGATCCTTGGACAAGAGGCTGCTTCCAGATGTAGAGACT-3'	SEQ ID NO:2
5'-ATTAATGGATCCTTGGACAAGAGGGTCCAGGACTGCTACCATGGT-3'	SEQ ID NO:3
5'-ATTAATCTCGAGGCATGCTTAGGCCGCACACTGATGGACA-3'	SEQ ID NO:4
5'-ATTAATCTCGAGGCATGCTTAAAATGAAGGGGCCGCACACT-3'	SEQ ID NO:5

Amplifikace PCR se provedla za použití primerů se sekvencemi SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 4 (pro fragment K5A), SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 5 (K5F), SEQ ID NO: 3 a SEQ ID No: 8 (K4–5A) a SEQ ID NO: 3 a SEQ ID NO:5 (K4–5A) za standardních podmínek pro PCR. To znamená, že reakční směs při celkovém reakčním objemu 100 µl obsahuje 200 µM každý dNTP, kde N je A, T, G a C, 0,2 µM každého primeru, přibližně 10 ng templátové DNA a 1 jednotku Vent® DNA polymerázy (New England Biolabs). Amplifikace proběhla celkem v 25 cyklech (1 cyklus = 94 °C po dobu jedné minuty, 48 °C po dobu dvou minut, 72 °C po dobu 1 minuty) na přístroji DNA Therman Cycler 480 (Perkin Elmer, Foster City, CA). Po amplifikaci se produkty PCR čistily na gelu, štěpily restrikčními endonukleázami *BamH I* a *Xho I* (New England Biolabs), ligovaly se do modifikovaného expresivního vektoru *Pichia* (pHil–D8, uvedeno dále v textu), který je štěpen stejnými enzymy a transformuje se elektroporací do buněk HB101 (BioRad). Z individuálních klonů se připravila DNA a štěpila se restrikčními enzymy a podrobila se sekvenční analýze za účelem identifikace klonů, které obsahují inzerty se správnou sekvencí a ve správné orientaci. Plazmidy z pozitivních klonů se transformovaly do kmene GS 115 *Pichia pastoris* (Invitrogen, Carlsbad, CA) s ohledem na instrukce výrobce. Za účelem identifikace pozitivních klonů v *Pichia* se buňky kultivovaly v 5 ml média BMGY (Invitrogen) při teplotě 29 °C, buňky se shromáždily centrifugací a resuspendovaly se za účelem exprese v médiu BMMY (Invitrogen) o objemu 0,5 ml. Po inkubaci při teplotě 29 °C po dobu 2 dní se supernatanty kultury shromáždily a alikvoty se analyzovaly na SDS–PAGE a technikou western blot podle metod, které jsou dobře známy v oboru. SDS–PAGE gel je na obr. č. 6.

B. Konstrukce expresivního vektoru pHil–D8:

Expresivní vektor *Pichia* pHil–D8 se konstruoval modifikací vektoru pHil–D2 (Invitrogen), aby zahrnoval syntetickou vedoucí sekvenci za účelem sekrece rekombinantního proteinu (obr. 5). Vedoucí sekvence 5'–ATGTTCTCTCCAATTTTGTCCTTGGAAATTATTTTAGCTTTGGCTTTGCAATCTGTCTTCGCTCAGCCAGTTATCTGCACTACCGTTGGTTCCGCTGCCGAGGGATCC–3' (SEQ ID NO: 9) kóduje sekreční signál PHO1 (podtrženo jednoduchou čarou) operativně spojený s pro–peptidovou sekvencí (vyznačeno tučným písmem) pro štěpení KEX2. K vytvoření konstruktu pHil–D8 se použilo PCR, kde se jako templát použil pHil–S1 (Invitro-

gen), protože tento vektor obsahuje sekvence kódující PHO1, dopředný primer (SEQ ID NO: 7) odpovídá nukleotidům 509 až 530 pHil–S1 a reverznímu primeru (SEQ ID NO: 8), jehož nukleotidová sekvence kóduje pozdní část sekrečního signálu PHO1 (nukleotidy 45 až 66 sekvence SEQ ID NO: 9) a pro–peptidovou sekvenci (nukleotidy 67 až 108 sekvence SEQ ID NO: 9). Sekvence primeru (získaného z firmy Operon Technologies, Inc. Alamede, CA) jsou uvedeny dále v textu:

5'-GAAACTTCCAAAAGTCGCCATA-3'	SEQ ID NO: 7
5'-ATTAATGAATTCCTCGAGCGGTCCGGGATCCCTCGGCAGCGGAACCAACGGTAGTGCAGATAACTGGCTGAGCGAAGATTGCAAAGTA-3'	SEQ ID NO: 8

Amplifikace se uskutečnila v 25 cyklech, jak se popisuje v příkladu 19. Produkt PCR (přibližně 500 bp) se čistil na gelu, štěpil se restrikčními endonukleázami *BlpI* a *EcoRI* a ligoval se do vektoru pHil–D2, který se štěpil stejnými enzymy. DNA se transformovala do buněk bakterií *E.coli* HB 101 a štěpením restrikčními enzymy a sekvenční analýzou se identifikovaly pozitivní klony. Jeden klon, který vykazuje správnou sekvenci se označil pHil–D8.

Příklad 20

Rekombinantní exprese peptidových fragmentů smyčky 5 v bakterii.

Restrikční a jiné modifikující enzymy stejně jako jiná činidla se získala z komerčních zdrojů. Primery se syntetizovaly v Abbott Laboratories na automatickém syntetizátoru podle standardního postupu, který je dobře znám v oboru.

DNA peptidových fragmentů smyčky 5 se také generovaly PCR amplifikací za účelem klonování a exprese do bakteriálních buněk (*E. coli*). Základní přístup byl vytvořit fragmenty PCR požadovaných kódujících sekvencí s nebo bez terminačních kodonů, kinázových konců a klonování fragmentů přímo do zvolených vektorů. Vektorové konstrukty se pak transformovaly do vhodných hostitelských buněk a kolonií, které se testovaly PCR s primery vektoru za účelem potvrzení přítomnosti inzertu. Za účelem stanovení orientace inzertu se v reakcích PCR vykazujících přítomnost inzertu v klonech provedla přímá PCR za použití jednoho vektorového primeru a jednoho primeru inzertu.

A. Příprava fosfatizovaných vektorů s tupými konci:

Popis expresivních vektorů, které jsou použitelné při bakteriální produkci peptidových fragmentů smyčky 5, se uvádí v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2

vektor	zdroj	restrikční enzymy	fúze
UpET	modifikovaný pET21d podle Abbotta	*SapI*	není
UpET-HTh	modifikovaný pET21d podle Abbotta	*SapI*	rozeznává N-terminální His6-trombin
UpET-Ubi	modifikovaný pET21d podle Abbotta	*SapI*	rozeznává N-terminální His6-ubiquitin-enterokinázu
pET32a	Novagen	*NcoI + XhoI*	rozeznává thioredoxin, a enterokinázu
pGEX-4T-2	Pharmacia®	*EcoRI + Not I*	GST
pCYB3	New England Biolabs	*NcoI + SapI*	C-terminální intein

Všechny vektory se nejdříve izolovaly na kolonách Qiagen v souladu s instrukcemi výrobce (QIAgen, Inc., Santa Clarita, CA). Vektorová DNA (1 μg) se štěpila vhodnými restrikčními enzymy (tabulka č. 2) ve 20 μl pufru NEB4 (New England Biolabs), který obsahuje 100 μg/ml bovinního sérového albuminu (BSA). Reakce se rychle centrifugovala a do směsi se přidalo 20 μl deionizované vody, 0,4 μl směsi dNTP (Pharmacia®; 20 mM každého dNTP) a 0,25 μl klonované DNA polymerázy *pfu* (Stratagene®; 2,5 jednotek/μl) a vše se inkubovalo při teplotě 65 °C po dobu 20 minut, přičemž dojde k zaplnění konců vektoru. Reakční směs se znovu krátce centrifugovala a přidalo se 4 μl ředěné telecí intestinální fosfatázy (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD; celkem 5 jednotek). Směs se pak inkubovala při teplotě 50 °C po dobu jedné hodiny. Do reakce se přidalo 5 μl 10% SDS, 2 μl 5 M NaCl, 2 μl 0,5 M EDTA a 45 μl vody a vše se krátce centrifugovalo a pak se inkubovalo při teplotě 65 °C po dobu 20 minut. Reakce se extrahovala třikrát pufrem saturovanou směsí fenol–chloroform (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD;) a jednou chloroformem. Vodná fáze se čistila na koloně CHROMA SPIN™ 1 000 TE (CLONTECH, Palo Alto, CA).

B. Tvorba DNA fragmentů PCR:

Připravily se primery PCR na základě publikované sekvence pro lidský plazminogen (SEQ ID NO: 12) a jejich sekvence je uvedena dále v textu:

5'- GTCCAGGACTGCTACCAT-3'	SEQ ID NO: 10
5'- CTGCTTCCAGATGTAGAGA-3'	SEQ ID NO: 11
5'- TTATTAGGCCGCACACTGAGGGA-3'	SEQ ID NO: 13

Jestliže není uvedeno jinak, všechny PCR se provedly DNA polymerázou *pfu* a v pufru (Stratagene®) za použití 200 μM každého dNTP a 1 μM každého primeru. Používaná sada primerů má sekvence SEQ ID NO: 11 a SEQ ID NO: 13 (v případě K5A) a SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO:13 (v případě K4–5A). Jako templát se použil vektor pHil–D8, který obsahoval K4–K5A (popsaný v příkladu 19). Před tím než se použil jako templát, uvedená DNA se štěpila restrikčním enzymem *DraI* (který štěpí DNA na několika místech vně smyčkových oblastí) za účelem eliminovat pozadí způsobené vektorem pHil–D8 při transformacích. Do reakce PCR o objemu 50 μl se použilo přibližně 10 ng templátu. Reakce PCR proběhly při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak 15 cyklů při teplotě 94 °C po dobu 30 sekund; 49 °C, 1 min.; 72 °C, 4 minuty; a 72 °C po dob u7 minut. Po PCR reakci se přidalo 0,5 μl 100 mM ATP a 5 jednotek T4 kinázy a reakce se inkubovala při teplotě 37 °C po dobu 20 minut za účelem upravit konce kinázou. Směs se pak zahřála na teplotu 68 °C po dobu 15 minut a čistila se na koloně S400–HR (Pharmacia®) za účelem ligace.

C. Ligace fragmentů PCR do expresivních vektorů:

Šest rekombinantních konstruktů (specificky (i) K5A v UpET–PS3, (ii) K5A v pET32a, (iii) K4–5A v UpET–PS3, (iv) K4–5A v UpET–Ubi, (v) K4–5A v pET23a a (vi) K4–5A v pGEX–4T–2(se připravilo následovně: vektor upravený fosfatázou s tupými konci (1 μl z kroku A shora v textu) a fragment PCR (1 μl z kroku B shora v textu) se ligoval do celkového objemu 5,5 μl pomocí kitu Rapid Ligation kit, přičemž se postupovalo podle instrukcí výrobce (Boehringer–Mannheim Corp., Indianapolis, IN). Ligační směs (1 μl) se pak transformovala do 20 μl kompetentních buněk (XL1–Blue superkompetentní buňky nebo XL–2–Blue Ultra-kompetentní buňky (Stratagene®)) podle instrukcí výrobce. Rekombinantní buňky se selektovaly na plotnách s LB–Amp agarem (MicroDiagnostics, Lombard, IL).

D. Studie extrese:

Vektory pGEX se exprimovaly v bakteriích *E. coli* XL1–Blue nebo XL2–Blue. Všechny ostatní vektory se izolovaly a retransformovaly do bakterií *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) podle instrukcí výrobce. Jednotlivé kolonie se inokulovaly do 2,5 ml LB/Amp a míchaly se při 225 ot/min.; při teplotě 37 °C, přes noc. Kulturou kultivovanou přes noc (0,5 ml) se pak inokulovalo 50 ml LB/Amp ve kultivačních nádobách o objemu 250 ml a míchalo se při 225 ot./min při teplotě 37 °C až hodnota OD600 byla mezi 0,5 až 0,6. Pak se přidal izopropyl–1–thio–β–D–galakto-pyranozid (IPTG, 100 mM) tak, aby konečná koncentrace byla 1 mM. Kultura se míchala při 225 ot./min. při teplotě 30 °C po dobu 3 hodin a pak se buňky centrifugovaly na dno kultivační nádoby. Vzorky se připravily pro účely testu SDS–PAGE za použití známých metod. Předchozí experimenty ukazují, že buňky nesoucí K5A/pET32a, K4–5A/pET32a a K4–5A/pGEX produkují většinu rekombinantního proteinu. Kultury těchto klonů se pak analyzovaly SDS–PAGE za účelem zjistit, zda produkt exprese je rozpustný nebo nerozpustný. Jak je zobrazeno na obr. č. 7 konstrukce K5A/pET32a produkuje rekombinantní protein, který je skoro zcela rozpustný (porovnej dráhy S a P Trx–K5A), zatímco konstrukce K4–5A/pGEX produkuje protein, který je rozpustný pouze ze 75 %.

E. Konstrukce vektorů modifikovaného podle Abbotta:

i. Příprava kazet VB1, VB2, VB3 a VB4:

Kazety VB1, VB2, VB3 a VB4 se připravily jako syntetické DNA za použití metod, které jsou dobře známy v oboru. Sekvence synVB1, synVB2, synVB3 a synVB4 se uvádí dále v textu:

synVB1	5'-AGCGTCTCATGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGC GCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAGCGG GCTTTTTTTTGCTCTTCATAGTGACTGAGACGTCG-3'	SEQ ID NO:14
synVB2	5'-AGCGTCTCAGGTGGTGGTCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT CTGGTGCCGCGCGGCAGCTGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCT TTCTGCGCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAAT GAGCGGGCTTTTTTTTGCTCTTCACGAGACGTCG-3'	SEQ ID NO:15
synVB3	5'-AGCGTCTCAGGTGGTGGTCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT TGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCGCCTTGGCGCGC CAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAGCGGGCTTTTTTTTGC TCTTCACGAGACGTC-3'	SEQ ID NO:16
synVB4	5'-AGCGTCTCAGGTGGTGGTCATCACCATCACCATCACGGTGGTGGT GATGACGATGACAAGTGAAGAGCTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTC TGCGCCTTGGCGCGCCAACCTTAATTAACCGGGAGCCCGCCTAATGAG CGGGCTTTTTTTTGCTCTTCACGAGACGTCG-3'	SEQ ID NO:17

Každá syntetická sekvence se připravila jako dvouřetězcová a klonovala se do vektoru PCR–Script Cam™ (Stratagene®) podle instrukcí výrobce; klony se správnou sekvencí se pak izolovaly podle standardních postupů. 5 μg čištěné DNA se štěpilo 8 jednotkami restrikčního enzymu *BsmBI* při teplotě 55 °C při reakci o objemu 20 μl v pufru 1x NEB4 obsahujícím 100 μg/ml BSA. Reakce se krátce centrifugovala a přidalo se 20 μl deionizované vody, 0,4 μl směsi dNTP (Pharmacia®; 20 mM každého dNTP) a 0,25 μl klonované *pfu* DNA polymerázy (Strategene®; 2,5 jednotky na jeden mikrolitr) a reakce se inkubovala při teplotě 65 °C po dobu 20 minut, přičemž se zaplnily konce. DNA se pak podrobila elektroforéze na 3% agarózových gelech 3% MetaPhor™ (FMC, Rockland, Maine) v pufru 0,5 x Tris–acetát–EDTA (TAE). Pruh DNA kazety se pak vyřízl z gelu a DNA se eluovala zmrazením gelu a centrifugací pufru přes náplň Ultrafree™ Probind (MILLIPOORE Corp., Bedford, MA). Pak následuje srážení izopropanolem, přičemž se jako nosič použil Pellet Paint™ (Novagen). DNA (cfVB1, cfVB2, cfVB3 a cfVB4) se promyla 70% ethanolem, krátce se sušila a resuspendovala se v 25 μl pufru Tris–EDTA (TE).

ii) Konstrukce UpET:

Vektor pET21d (Novagen) se štěpil restrikčním enzymem *SapI*, dále se aplikovala T4 DNA polymeráza +dGTP, nukleáza fazole mungo, pak DNA polymeráza I Klenow fragment a vektor se znovu ligoval. Testovaly se jednotlivé kolonie za účelem selekce plazmidu, ve kterém se eliminovalo existující restrikční místo *SapI*. Uvedená DNA se pak štěpila restrikčními enzymy *NcoI* + *BamHI* a ligovala se do sekvencí 5'–CATGTGAAGAGC–3' (SEQ ID NO: 19) + 5'–GATCGCTCTTCA–3' (SEQ ID NO: 20) za účelem zavedení jediného restrikčního místa *SapI*. Čištěná a ověřená klonovaná DNA se štěpila restrikčními enzymy *SapI* + *HindIII*, upravily se tupé konce a aplikovala se fosfatáza, jak se popisuje shora v textu. DNA se ligovala do kazety cfVB1, transformovala se do bakterií *E. coli* a ty se nanesly na plotnu s LB–amp. Kolonie se přenesly sterilní špičkou pipety na plotny s LB–Amp agarem a do 20 μl AmpliTaq® PCR směsi (Perkin Elmer) v destičkách Costar Thermowell, které obsahují 1 μM každého vektorového primeru o sekvenci 5'–AGATCTCGATCCCGCGAA–3' (dopředný primer, sekvence SEQ ID NO: 21) a 5'–ATCCGGATATAGTTCCTC–3' (SEQ ID NO: 22). Reakce se zahřály na teplotu 94 °C po dobu 30 sekund; a pak se zpracovávaly na termálním cykleru GeneAmp 9600 při 30 jednotlivých cyklech: při teplotě 94 °C po dobu 5 min; 40 °C po dobu 1 Minuty; 72 °C po dobu 2 minut. 10 μl z každé reakce se nechalo běžet na agarózových gelech. Za účelem stanovení

orientace kazety se 0,25 µl testu PCR reakce o správné velikosti přidalo do čerstvé reakce, která obsahovala reverzní vektorový primer a primer kazety 5'–CGGGCTTTTTTTTGCTCTTA–3' (SEQ ID NO: 23). Reakce se amplifikovaly v dalších deseti stejných cyklech, jako je uvedeno shora v textu. Konečné vektory se sekvenovaly za použití standardního postupu a jeden klon se označil jako UpET.

iii. Konstrukce UpET–HTh:

UpET se štěpil restrikčním enzymem *SapI* a upravily se tupé konce, poté se aplikovala fosfatáza za účelem klonování. Fragment se ligoval do kazety cfVB2, ta se transformovala a jednotlivé kolonie se testovaly a provedla se sekvenční analýza za účelem stanovení shora popsané ligace cfVB1.

iv. Konstrukce UpET–H:

UpET se štěpil restrikčním enzymem *SapI* a upravily se tupé konce, poté se aplikovala fosfatáza za účelem klonování. Fragment se ligoval do kazety cfVB3, ta se transformovala a jednotlivé kolonie se testovaly a provedla se sekvenční analýza za účelem stanovení shora popsané ligace cfVB1.

v. Konstrukce UpET–Ubi:

Fragment PCR kódující ubiquitin *S. cerevisiae* se generoval za použití Ultma DNA polymerázy a pufru (Perkin Elmer), 40 µM každého dNTP, 1 µM každého z primerů o sekvenci 5'–CAGATTTTCGTCAAGACTT–3' (Ubi–5p, SEQ ID NO: 24) a 5'–ACCACCTCTTAGCC-TTAG–3' (Ubi–3p, SEQ ID NO: 25) a 1,75 µg kvasinkové DNA při teplotě 94 °C po dobu 2 minut, pak proběhlo 25 jednotlivých cyklů při teplotě 94 °C po dobu 1 minuty; 40 °C, po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 2 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut. Fragment PCR vznikl z 20 ng pET15b (Novagen) za použití primerů se sekvencí 5'–CATGGTATATCTCCTTCTT–3' (pET3p–ATG, SEQ ID NO: 26) a 5'–TGAGCAATAACTAGCATAAC–3' (T7RevTerm, SEQ ID NO: 27) při teplotě 94 °C po dobu 2 minut, pak proběhlo 10 cyklů při režimu 94 °C po dobu 45 vteřin; 42 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 15 minut; pak 72 °C po dobu 7 minutu. PCR fragmenty pro ubiquitin a odvozený od pET15b se čistily na gelu a ligovaly se za použití BRL T4 ligázy a ligačního pufru. Fragment PCR T7 promotor–ubiquitin (T7–ubiquitin) se vytvořil PCR reakcí, kde ligační směs sloužila jako templát a přidaly se Ultma DNA polymeráza a primery se sekvencemi 5'–AGATCTCGATCCCGCGA–3' (pET5p, SEQ ID NO: 28) a SEQ ID NO: 25 při teplotě 94 °C po dobu 2 minut a pak proběhlo 25 cyklů v režimu: teplota 94 °C po dobu 30 sekund; teplota 42 °C po dobu 1 minuty; teplota 72 °C po dobu 3 minut; pak teplota 72 °C po dobu 7 minut. PCR fragment T7–ubiquitinu se čistil na gelu.

PCR fragment přirozeného lidského Stromelysinu se připravil za použití Ultma DNA polymerázy (jak je uvedeno shora) s primerem se sekvencí 5'–TTAGGTCTCAGGGGAGT–3' (Strom–3p, SEQ ID NO: 29) a primerem upraveným kinázou o sekvenci 5'–TTCAGAACCT-TTCCTGGCA–3' (Strom–5p, SEQ ID NO: 30) a za použití přibližně 20 ng templátu (to je stromelysin klonovaný do pET3b (Novagen)) při teplotě 94 °C po dobu 2 minut, pak proběhlo 15 cyklů při režimu teplota 94 °C po dobu 1 minuty; teplota 44 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 2 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut. PCR reakce s fragmentem stromelysinu (10 µl) se ligovala s 100 pmol denaturovaných oligonukleotidů se sekvencemi 5'–AGCGGCGACGACGAC-GACAAG–3' (Ek–Cut–5p, SEQ ID NO: 31) a 5'–CTTGTCGTCGTCGTCGCCGCT–3' (Ek–Cut–3p, SEQ ID NO: 32, kóduje štěpicí místo enterokinázy) ve 40 µl BRL ligázy a ligačního pufru. PCR fragment nesoucí místo pro štěpení enterokinázou–přirozený stromelysin (Ek–stromelysin) se připravil reakcí PCR, kde se jako templát použil 1 µl ligační směsi, primery SEQ ID NO: 29 a primer upravený kinázou o sekvenci SEQ ID NO: 31, Ultma DNA polymeráza a pufr. PCR začala při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak proběhlo 10 cyklů v režimu: teplota

94 °C po dobu 1 minuty; teplota 44 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 2 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut. PCR fragment Ek–stromelysin se čistil na gelu.

Fragmenty T7–ubiquitin a Ek–stromelysin se ligovaly dohromady BRL ligázou v ligačním pufru. PCR fragment T7–ubiquitinu–Ek–stromelysinu se pak připravil reakcí PCR, kde se jako templát použila ligační směs a Ultma DNA polymeráza a primery se sekvencemi SEQ ID NO: 28 a SEQ ID NO: 29. PCR reakce začala při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak proběhlo 25 cyklů v režimu: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin; teplota 42 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 6 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut.

PCR fragment vznikl PCR reakcí, kde se použil jako templát plazmid stromelysin–pET3b, dále se použily primery se sekvencemi SEQ ID NO: 26 a SEQ ID NO: 30, KlenTaq (AB Peptides, St. Louis, MO) a *pfu* DNA polymerázy. PCR reakce začala při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak proběhlo 15 cyklů v režimu: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin; teplota 42 °C po dobu 2 minut; 68 °C po dobu 20 minut. Tento PCR fragment se smísil s PCR fragmentem T7–ubiquitin–Ek–stromelysin a směs se transformovala do kompetentních buněk BRL DH5α s maximální účinností. Správné klony se identifikovaly izolací plazmidové DNA. Transfekce do BL21(DE3) a studovaná exprese se popisuje shora v textu.

PCR fragment z konstrukce ubiquitin–Ek se vytvořil ze správného expresivního plazmidu T7–ubiquitin–Ek–stromelysin použitím PCR reakce s primery se sekvencemi SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 32 a s *pfu* DNA polymerázou. PCR reakce začala při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak proběhlo 20 cyklů v režimu: teplota 94 °C po dobu 30 vteřin; teplota 40 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 3 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut. Fragment se čistil pomocí kolony Pharmacia S–400 HR Spin a ligoval se do kazety VBC1 za použití kitu Rapid DNA Ligation. PCR fragment vznikl reakcí PCR, kde se jako templát použila ligační směs a primery se sekvencemi SEQ ID NO: 24 a 5′–TGAAGAGCAAAAAAAAGCCCG–3′ (SEQ ID NO: 33) a *pfu* DNA polymeráza. PCR reakce začala při teplotě 94 °C po dobu 2 minut; pak proběhlo 20 cyklů v režimu; teplota 94 °C po dobu 30 vteřin; teplota 40 °C po dobu 1 minuty; 72 °C po dobu 2 minut; pak 72 °C po dobu 7 minut. PCR fragment se upravil kinázou a ligoval se do vektoru Upet–H, který se za účelem klonování upravil na fragment s tupými konci a aplikovala se fosfatáza. Ligační směs se transformovala do kompetentních buněk a kolonie se testovaly pomocí PCR, jak se popisuje shora v textu. Za účelem stanovení správných klonů UpET–Ubi se plazmidová DNA sekvenovala.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Sloučenina vzorce

A–B–C–X–Y,

nebo její farmaceuticky přijatelná sůl nebo ester, kde

symbol A není přítomen nebo představuje skupinu chránící dusík;

symbol Y není přítomen nebo představuje skupinu chránící karboxylovou kyselinu;

symboly B–C–X jsou vybrány ze skupiny sestávající ze sekvencí definovaných následujícími polohami aminokyselin z SEQ ID NO:1

(a) sekvence z pozice aminokyseliny 355 do pozice 543;

(b) sekvence z pozice aminokyseliny 355 do pozice 546;

(c) sekvence z pozice aminokyseliny 443 do pozice 543;

(d) sekvence z pozice aminokyseliny 449 do pozice 543;

(e) sekvence z pozice aminokyseliny 454 do pozice 543;

(f) sekvence z pozice aminokyseliny 443 do pozice 546;

(g) sekvence z pozice aminokyseliny 449 do pozice 546;

(h) sekvence z pozice aminokyseliny 454 do pozice 546;

(i) sekvence z pozice aminokyseliny 525 do pozice 535;

(j) sekvence z pozice aminokyseliny 529 do pozice 535;

(k) sekvence z pozice aminokyseliny 530 do pozice 535;

(l) sekvence z pozice aminokyseliny 529 do pozice 534;

(m) sekvence z pozice aminokyseliny 531 do pozice 534;

(n) sekvence z pozice aminokyseliny 450 do pozice 543.

2. Sloučenina podle nároku 1, kde symbol A znamená skupinu N–Ac a symbol Y znamená skupinu $-NH_2$.

3. Sloučenina podle nároku 1, kde hodnota ED_{50} pro inhibici migrace endoteliálních buněk je přibližně 100 až 500 pM.

4. Sloučenina podle nároku 1, kde hodnota ED_{50} pro inhibici proliferace endoteliálních buněk je přibližně 100 až 500 pM.

5. Použití sloučeniny podle nároku 1 nebo 2 pro výrobu léčiva pro ošetření onemocnění pacienta, při potřebě antiangiogenní terapie.

6. Použití podle nároku 5, kde uvedené onemocnění je vybráno ze skupiny zahrnující zhoubné bujení, artritidu, makulární degeneraci a diabetickou retinopatii.

7. Použití podle nároku 6, kde uvedené onemocnění je rakovina.

8. Použití podle nároku 7, kde uvedená rakovina je vybrána ze skupiny zahrnující primární a metastatické pevné nádory, karcinomy, sarkomy, lymfomy, lupénku a hemagiomy.

9. Kompozice, **vyznačující se tím**, že obsahuje sloučeninu podle nároku 1 a farmaceuticky přijatelný excipient.

10. Kompozice obsahující izolovanou jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou polynukleotidovou sekvenci, **vyznačující se tím**, že kóduje sloučeninu podle nároku 1.

11. Kompozice podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že uvedená polynukleotidová sekvence je sekvence DNA.

12. Kompozice podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že uvedená sekvence DNA kóduje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující:

(a) sekvenci SEQ ID NO: 1 z pozice aminokyseliny 443 do pozice 543;

(b) sekvenci SEQ ID NO: 1 z pozice aminokyseliny 449 do pozice 543;

(c) sekvenci SEQ ID NO: 1 z pozice aminokyseliny 454 do pozice 543;

(d) sekvenci SEQ ID NO: 1 z pozice aminokyseliny 355 do pozice 543.

13. Kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že uvedená polynukleotidová sekvence kóduje aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 34.

14. Buňka vhodná k implantaci do lidského nebo nehumánního zvířecího subjektu, přičemž buňka obsahuje vektor, zahrnující sekvenci DNA kódující sloučeninu podle nároku 1.

15. Způsob přípravy sloučeniny podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky:

(a) vystavení savčího plazminogenu účinkům elastázy v poměru přibližně 1:100 až přibližně 1:300 za vzniku směsi uvedeného plazminogenu a uvedené elastázy;

(b) inkubace uvedené směsi; a

(c) izolace uvedené sloučeniny z uvedené směsi.

16. Izolovaný jednořetězcový nebo dvouřetězcový polynukleotid, který kóduje sloučeninu podle nároku 1 pro použití jako inhibitoru angiogeneze.

17. Polynukleotid podle nároku 16, kterým je molekula DNA.

18. Polynukleotid podle nároku 16, kterým je molekula RNA.

19. Vektor obsahující polynukleotid, který kóduje sloučeninu podle nároku 1 pro použití jako inhibitoru angiogeneze.

20. Vektor podle nároku 19, který je expresivním vektorem.

21. Vektor podle nároku 20, kde expresivní vektor je konstruován zabudováním polynukleotidu, který kóduje sloučeninu podle nároku 1, do vektorů vybraných ze skupiny sestávající z pHil–D8, pET32a, pGEX–4T–2, UpET–Ubi a pCYB3.

22. Vektor podle nároku 20 dále obsahující hostitelskou buňku transformovanou uvedeným vektorem.

23. Vektor podle nároku 22, kde uvedená hostitelská buňka je eukaryontní buňka.

24. Vektor podle nároku 23, kde uvedená eukaryontní buňka je *Pichia pastoris*.

25. Vektor podle nároku 22, kde uvedená hostitelská buňka je prokaryontní buňka, kterou je *E. coli*.

26. Způsob přípravy rozpustné sloučeniny podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje:

(a) izolaci polynukleotidu, který kóduje uvedenou sloučeninu;

(b) klonování uvedeného polynukleotidu do expresivního vektoru;

(c) transformaci uvedeného vektoru do vhodné hostitelské buňky; a

(d) kultivaci uvedené hostitelské buňky za podmínek vhodných pro expresi uvedené sloučeniny.

27. Sloučenina vybraná ze skupiny sestávající z

(a) A–Pro–Arg–Lys–Leu–Tyr–Asp–3–I–Tyr–Y;

(b) A–Pro–Arg–Lys–Leu–3–I–Tyr–Asp–Tyr–Y;

(c) A–Pro–Glu–Lys–Arg–Tyr–Asp–Tyr–Y; a

(d) A–Gln–Asp–Trp–Ala–Ala–Gln–Glu–Pro–His–Arg–His–Ser–Ile–Phe–Thr–Pro–Glu–Thr–Pro–Glu–Thr–Asn–Pro–Arg–Ala–Gly–Leu–Glu–Lys–Asn–Tyr–Y,

kde symbol A není přítomen nebo představuje skupinu chránící dusík;

symbol Y není přítomen nebo představuje skupinu chránící karboxylovou kyselinu.

10 výkresů

Obr. č. 1 (a) (SEQ ID NO:1)

```
GLU PRO LEU ASP ASP TYR VAL ASN THR GLN GLY ALA SER LEU PHE
1               5                  10                  15

SER VAL THR LYS LYS GLN LEU GLY ALA GLY SER ILE GLU GLU CYS
            20                  25                  30

ALA ALA LYS CYS GLU GLU ASP GLU GLU PHE THR CYS ARG ALA PHE
        35                  40                  45

GLN TYR HIS SER LYS GLU GLN GLN CYS VAL ILE MET ALA GLU ASN
    50                  55                  60

ARG LYS SER SER ILE ILE ILE ARG MET ARG ASP VAL VAL LEU PHE
65                  70                  75

GLU LYS LYS VAL TYR LEU SER GLU CYS LYS THR GLY ASN GLY LYS
            80                  85                  90

ASN TYR ARG GLY THR MET SER LYS THR LYS ASN GLY ILE THR CYS
        95                  100                 105

GLN LYS TRP SER SER THR SER PRO HIS ARG PRO ARG PHE SER PRO
    110                 115                 120

ALA THR HIS PRO SER GLU GLY LEU GLU GLU ASN TYR CYS ARG ASN
125                 130                 135

PRO ASP ASN ASP PRO GLN GLY PRO TRP CYS TYR THR THR ASP PRO
            140                 145                 150

GLU LYS ARG TYR ASP TYR CYS ASP ILE LEU GLU CYS GLU GLU GLU
        155                 160                 165

CYS MET HIS CYS SER GLY GLU ASN TYR ASP GLY LYS ILE SER LYS
    170                 175                 180

THR MET SER GLY LEU GLU CYS GLN ALA TRP ASP SER GLN SER PRO
185                 190                 195

HIS ALA HIS GLY TYR ILE PRO SER LYS PHE PRO ASN LYS ASN LEU
            200                 205                 210

LYS LYS ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP ARG GLU LEU ARG PRO TRP
        215                 220                 225

CYS PHE THR THR ASP PRO ASN LYS ARG TRP GLU LEU CYS ASP ILE
    230                 235                 240

PRO ARG CYS THR THR PRO PRO PRO SER SER GLY PRO THR TYR GLN
245                 250                 255

CYS LEU LYS GLY THR GLY GLU ASN TYR ARG GLY ASN VAL ALA VAL
            260                 265                 270
```

Obr. č. 1 (b)

THR VAL SER GLY HIS THR CYS GLN HIS TRP SER ALA GLN THR PRO
275 280 285

HIS THR HIS ASN ARG THR PRO GLU ASN PHE PRO CYS LYS ASN LEU
290 295 300

ASP GLU ASN TYR CYS ARG ASN PRO ASP GLY LYS ARG ALA PRO TRP
305 310 315

CYS HIS THR THR ASN SER GLN VAL ARG TRP GLU TYR CYS LYS ILE
320 325 330

PRO SER CYS ASP SER SER PRO VAL SER THR GLU GLN LEU ALA PRO
335 340 345

THR ALA PRO PRO GLU LEU THR PRO VAL VAL GLN ASP CYS TYR HIS
350 355 360

GLY ASP GLY GLN SER TYR ARG GLY THR SER SER THR THR THR THR
365 370 375

GLY LYS LYS CYS GLN SER TRP SER SER MET THR PRO HIS ARG HIS
380 385 390

GLN LYS THR PRO GLU ASN TYR PRO ASN ALA GLY LEU THR MET ASN
395 400 405

TYR CYS ARG ASN PRO ASP ALA ASP LYS GLY PRO TRP CYS PHE THR
410 415 420

THR ASP PRO SER VAL ARG TRP GLU TYR CYS ASN LEU LYS LYS CYS
425 430 435

SER GLY THR GLU ALA SER VAL VAL ALA PRO PRO PRO VAL VAL LEU
440 445 450

LEU PRO ASP VAL GLU THR PRO SER GLU GLU ASP CYS MET PHE GLY
455 460 465

ASN GLY LYS GLY TYR ARG GLY LYS ARG ALA THR THR VAL THR GLY
470 475 480

THR PRO CYS GLN ASP TRP ALA ALA GLN GLU PRO HIS ARG HIS SER
485 490 495

ILE PHE THR PRO GLU THR ASN PRO ARG ALA GLY LEU GLU LYS ASN
500 505 510

TYR CYS ARG ASN PRO ASP GLY ASP VAL GLY GLY PRO TRP CYS TYR
515 520 525

THR THR ASN PRO ARG LYS LEU TYR ASP TYR CYS ASP VAL PRO GLN
530 535 540

Obr. č. 1 (c)

CYS ALA ALA PRO SER PHE ASP CYS GLY LYS PRO GLN VAL GLU PRO
545 550 555

LYS LYS CYS PRO GLY ARG VAL VAL GLY GLY CYS VAL ALA HIS PRO
560 565 570

HIS SER TRP PRO TRP GLN VAL SER LEU ARG THR ARG PHE GLY MET
575 580 585

HIS PHE CYS GLY GLY THR LEU ILE SER PRO GLU TRP VAL LEU THR
590 595 600

ALA ALA HIS CYS LEU GLU LYS SER PRO ARG PRO SER SER TYR LYS
605 610 615

VAL ILE LEU GLY ALA HIS GLN GLU VAL ASN LEU GLU PRO HIS VAL
620 625 630

GLN GLU ILE GLU VAL SER ARG LEU PHE LEU GLU PRO THR ARG LYS
635 640 645

ASP ILE ALA LEU LEU LYS LEU SER SER PRO ALA VAL ILE THR ASP
650 655 660

LYS VAL ILE PRO ALA CYS LEU PRO SER PRO ASN TYR VAL VAL ALA
665 670 675

ASP ARG THR GLU CYS PHE ILE THR GLY TRP GLY GLU THR GLN GLY
680 685 690

THR PHE GLY ALA GLY LEU LEU LYS GLU ALA GLN LEU PRO VAL ILE
695 700 705

GLU ASN LYS VAL CYS ASN ARG TYR GLU PHE LEU ASN GLY ARG VAL
710 715 720

GLN SER THR GLU LEU CYS ALA GLY HIS LEU ALA GLY GLY THR ASP
725 730 735

SER CYS GLN GLY ASP SER GLY GLY PRO LEU VAL CYS PHE GLU LYS
740 745 750

ASP LYS TYR ILE LEU GLN GLY VAL THR SER TRP GLY LEU GLY CYS
755 760 765

ALA ARG PRO ASN LYS PRO GLY VAL TYR VAL ARG VAL SER ARG PHE
770 775 780

VAL THR TRP ILE GLU GLY VAL MET ARG ASN ASN
785 790

Obr. č. 2 (a)

		1				5				10
lidský	(SEQ ID NO:34)	VAL	ALA	PRO	PRO	PRO	VAL	VAL	LEU	LEU	PRO
myší	(SEQ ID NO:35)	---	GLU	LEU	---	THR	---	SER	GLN	GLU	---
opičí	(SEQ ID NO:36)	ALA	---	---	---	---	---	ALA	GLN	---	---
bovinní	(SEQ ID NO:37)	PRO	---	ALA	---	ooo	ooo	ooo	GLN	ALA	---
prasečí	(SEQ ID NO:38)	THR	ASN	PHE	---	ALA	ILE	ALA	GLN	VAL	---

					15					20				
lidský	ASP	VAL	GLU	THR	PRO	SER	GLU	GLU	ASP	CYS	MET	PHE	GLY	ASN
myší	SER	GLY	PRO	SER	ASP	---	---	THR	---	---	---	TYR	---	---
opičí	---	ALA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
bovinní	GLY	---	---	ASN	---	PRO	---	ALA	---	---	---	ILE	---	THR
prasečí	SER	---	---	ASP	LEU	---	---	ooo	---	---	---	---	---	---

	25					30				35				
lidský	GLY	LYS	GLY	TYR	ARG	GLY	LYS	ARG	ALA	THR	THR	VAL	THR	GLY
myší	---	---	ASP	---	---	---	---	THR	---	VAL	---	ALA	ALA	---
opičí	---	---	---	---	---	---	---	LYS	---	---	---	---	---	---
bovinní	---	---	SER	---	---	---	---	LYS	---	---	---	---	ALA	---
prasečí	---	---	ARG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	ALA	---

		40					45					50		
lidský	THR	PRO	CYS	GLN	ASP	TRP	ALA	ALA	GLN	GLU	PRO	HIS	ARG	HIS
myší	---	---	---	---	GLY	---	---	---	---	---	---	---	---	---
opičí	---	---	---	---	GLU	---	---	---	---	---	---	---	SER	---
bovinní	VAL	---	---	---	GLU	---	---	---	---	---	---	---	HIS	---
prasečí	VAL	---	---	---	GLU	---	---	---	---	---	---	---	---	---

			55					60					65	
lidský	SER	ILE	PHE	THR	PRO	GLU	THR	ASN	PRO	ARG	ALA	GLY	LEU	GLU
myší	---	---	---	---	---	GLN	---	---	---	---	---	---	---	---
opičí	ARG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
bovinní	---	---	---	---	---	---	---	---	---	GLN	SER	---	---	---
prasečí	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

				70					75					80
lidský	LYS	ASN	TYR	CYS	ARG	ASN	PRO	ASP	GLY	ASP	VAL	GLY	GLY	PRO
myší	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	ASN	---	---
opičí	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
bovinní	ARG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	ASN	---	---
prasečí	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	ASP	ASN	---	---

					85					90				
lidský	TRP	CYS	TYR	THR	THR	ASN	PRO	ARG	LYS	LEU	TYR	ASP	TYR	CYS
myší	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
opičí	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	PHE	---	---	---
bovinní	---	---	---	---	MET	---	---	---	---	---	PHE	---	---	---
prasečí	---	---	---	---	---	---	---	GLN	---	---	PHE	---	---	---

	95					100		101
lidský	ASP	VAL	PRO	GLN	CYS	ALA	ooo	ALA
myší	---	ILE	---	LEU	---	---	SER	---
opičí	---	---	---	---	---	---	ooo	---
bovinní	---	---	---	---	---	GLU	ooo	ooo
prasečí	---	---	---	---	---	VAL	ooo	THR

Obr. č. 3 (a) (SEQ ID NO:12)

```
   1  CATCCTGGGA TTGGGACCCA CTTTCTGGGC ACTGCTGGCC AGTCCCAAAA
  51  TGGAACATAA GGAAGTGGTT CTTCTACTTC TTTTATTTCT GAAATCAGGT
 101  CAAGGAGAGC CTCTGGATGA CTATGTGAAT ACCCAGGGGG CTTCACTGTT
 151  CAGTGTCACT AAGAAGCAGC TGGGAGCAGG AAGTATAGAA GAATGTGCAG
 201  CAAAATGTGA GGAGGACGAA GAATTCACCT GCAGGGCATT CCAATATCAC
 251  AGTAAAGAGC AACAATGTGT GATAATGGCT GAAAACAGGA AGTCCTCCAT
 301  AATCATTAGG ATGAGAGATG TAGTTTTATT TGAAAAGAAA GTGTATCTCT
 351  CAGAGTGCAA GACTGGGAAT GGAAAGAACT ACAGAGGGAC GATGTCCAAA
 401  ACAAAAAATG GCATCACCTG TCAAAAATGG AGTTCCACTT CTCCCCACAG
 451  ACCTAGATTC TCACCTGCTA CACACCCCTC AGAGGGACTG GAGGAGAACT
 501  ACTGCAGGAA TCCAGACAAC GATCCGCAGG GGCCCTGGTG CTATACTACT
 551  GATCCAGAAA AGAGATATGA CTACTGCGAC ATTCTTGAGT GTGAAGAGGA
 601  ATGTATGCAT TGCAGTGGAG AAAACTATGA CGGCAAAATT TCCAAGACCA
 651  TGTCTGGACT GGAATGCCAG GCCTGGGACT CTCAGAGCCC ACACGCTCAT
 701  GGATACATTC CTTCCAAATT TCCAAACAAG AACCTGAAGA AGAATTACTG
 751  TCGTAACCCC GATAGGGAGC TGCGGCCTTG GTGTTTCACC ACCGACCCCA
 801  ACAAGGCGTG GGAACTTTGT GACATCCCCC GCTGCACAAC ACCTCCACCA
 851  TCTTCTGGTC CCACCTACCA GTGTCTGAAG GGAACAGGTG AAAACTATCG
 901  CGGGAATGTG GCTGTTACCG TGTCCGGGCA CACCTGTCAG CACTGGAGTG
 951  CACAGACCCC TCACACACAT AACAGGACAC CAGAAAACTT CCCCTGCAAA
1001  AATTTGGATG AAAACTACTG CCGCAATCCT GACGGAAAAA GGGCCCCATG
1051  GTGCCATACA ACCAACAGCC AAGTGCGGTG GGAGTACTGT AAGATACCGT
1101  CCTGTGACTC CTCCCCAGTA TCCACGGAAC AATTGGCTCC CACAGCACCA
1151  CCTGAGCTAA CCCCTGTGGT CCAGGACTGC TACCATGGTG ATGGACAGAG
1201  CTACCGAGGC ACATCCTCCA CCACCACCAC AGGAAAGAAG TGTCAGTCTT
1251  GGTCATCTAT GACACCACAC CGGCACCAGA AGACCCCAGA AAACTACCCA
```

Obr. č. 3 (b)

1301 AATGCTGGCC TGACAATGAA CTACTGCAGG AATCCAGATG CCGATAAAGG

1351 CCCCTGGTGT TTTACCACAG ACCCCAGCGT CAGGTGGGAG TACTGCAACC

1401 TGAAAAAAATG CTCAGGAACA GAAGCGAGTG TTGTAGCACC TCCGCCTGTT

1451 GTCCTGCTTC CAGATGTAGA GACTCCTTCC GAAGAAGACT GTATGTTTGG

1501 GAATGGGAAA GGATACCGAG GCAAGAGGGC GACCACTGTT ACTGGGACGC

1551 CATGCCAGGA CTGGGCTGCC CAGGAGCCCC ATAGACACAG CATTTTCACT

1601 CCAGAGACAA ATCCACGGGC GGGTCTGGAA AAAAATTACT GCCGTAACCC

1651 TGATGGTGAT GTAGGTGGTC CCTGGTGCTA CACGACAAAT CCAAGAAAAC

1701 TTTACGACTA CTGTGATGTC CCTCAGTGTG CGGCCCCTTC ATTTGATTGT

1751 GGGAAGCCTC AAGTGGAGCC GAAGAAATGT CCTGGAAGGG TTGTAGGGGG

1801 GTGTGTGGCC CACCCACATT CCTGGCCCTG GCAAGTCAGT CTTAGAACAA

1851 GGTTTGGAAT GCACTTCTGT GGAGGCACCT TGATATCCCC AGAGTGGGTG

1901 TTGACTGCTG CCCACTGCTT GGAGAAGTCC CCAAGGCCTT CATCCTACAA

1951 GGTCATCCTG GGTGCACACC AAGAAGTGAA TCTCGAACCG CATGTTCAGG

2001 AAATAGAAGT GTCTAGGCTG TTCTTGGAGC CCACACGAAA AGATATTGCC

2051 TTGCTAAAGC TAAGCAGTCC TGCCGTCATC ACTGACAAAG TAATCCCAGC

2101 TTGTCTGCCA TCCCCAAATT ATGTGGTCGC TGACCGGACC GAATGTTTCG

2151 TCACTGGCTG GGGAGAAACC CAAGGTACTT TTGGAGCTGG CCTTCTCAAG

2201 GAAGCCCAGC TCCCTGTGAT TGAGAATAAA GTGTGCAATC GCTATGAGTT

2251 TCTGAATGGA AGAGTCCAAT CCACCGAACT CTGTGCTGGG CATTTGGCCG

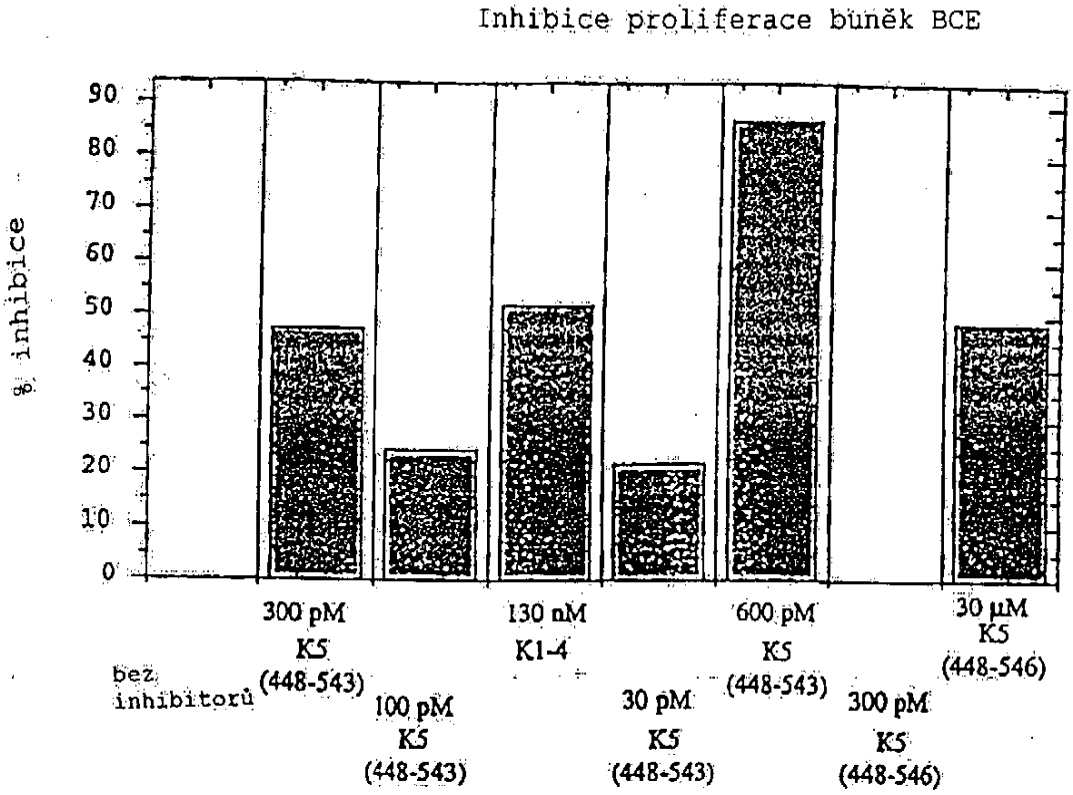
2301 GAGGCACTGA CAGTTGCCAG GGTGACAGTG GAGGTCCTCT GGTTTGCTTC

2351 GAGAAGGACA AATACATTTT ACAAGGAGTC ACTTCTTGGG GTCTTGGCTG

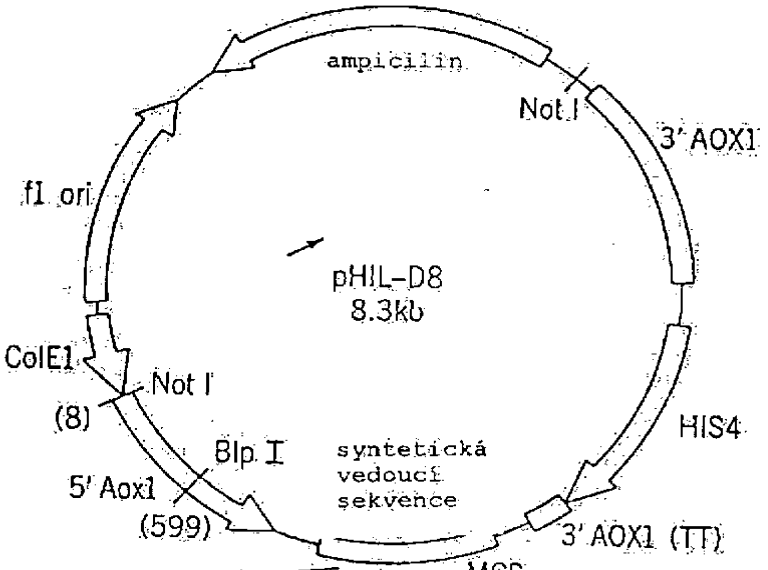
2401 TGCACGCCCC AATAAGCCTG GTGTCTATGT TCGTGTTTCA AGGTTTGTTA

2451 CTTGGATTGA GGGAGTGATG AGAAATAATT AATTGGACGG GAGACAG

Obr. č. 4


Inhibice proliferace buněk BCE
% inhibice
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
bez inhibitorů
300 pM K5 (448-543)
100 pM K5 (448-543)
130 nM K1-4
30 pM K5 (448-543)
600 pM K5 (448-543)
300 pM K5 (448-546)
30 µM K5 (448-546)

Obr. č. 5



5'Aox1– – –aac taa tta ttc gaa acg ATG TTC TCT CCA ATT TTG TCC TTG GAA ATT ATT TTA GCT TTG
M F S P I L S L E I I L A L

PHO1 sekreční signál

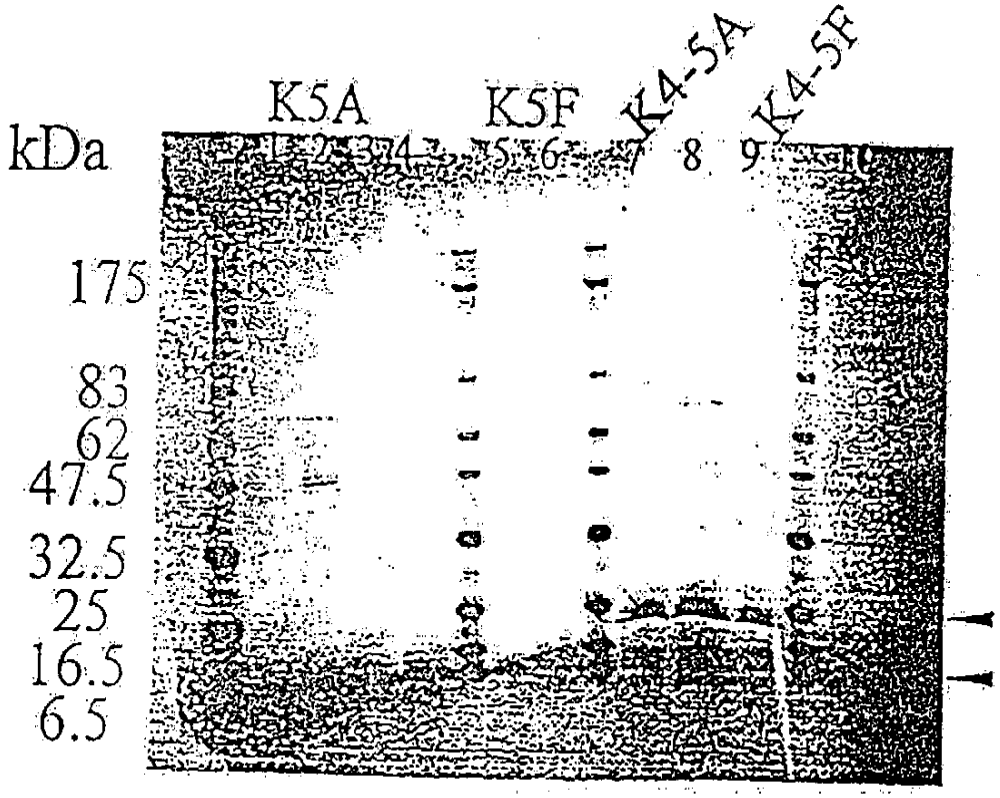
GCT ACT TTG CAA TCT GTC TTC GCT cag cca gtt atc tgc act acc gtt ggt tcc gct gcc
A T L Q S V F A Q P V I C T T V G S A A

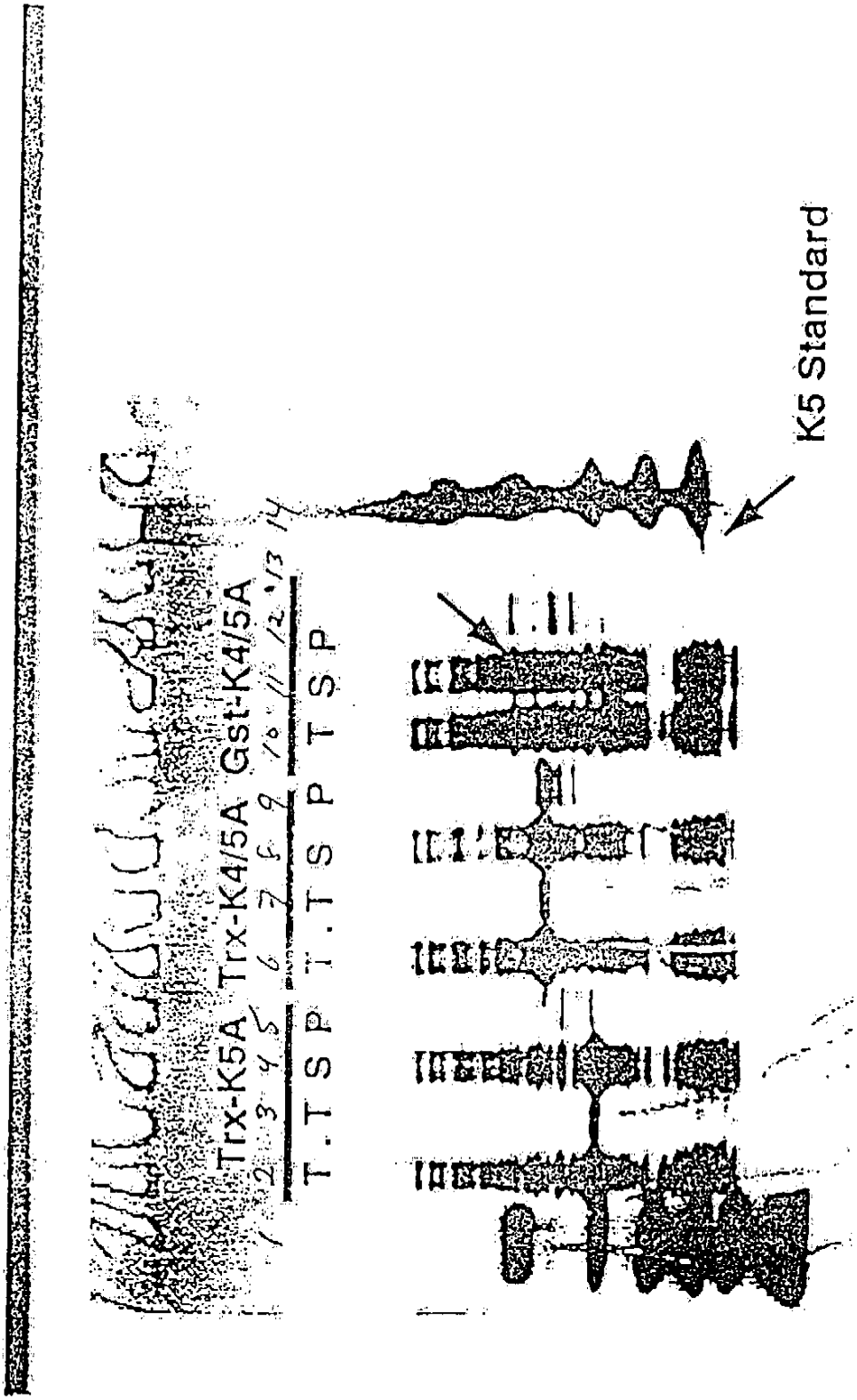
syntetický pro-peptid

BamH I *Rsr II* *Xho I* *Eco RI*
gag gga tcc cgg acc gct cga gga att cgc ctt aga – – – 3'T
E G S

CZ 298260 B6

Obr. č. 6





Obr. č. 7

Konec dokumentu