

KIVONAT

HGT-NK4 PEG-konjugátumai

A találmány tárgya konjugátum, amely áll a hepatocita növekedési faktor (HGF/SF) N-terminális fragmentumából, ahol ez tartalmazza az α -lánc hajtű doménjét és négy hurok (kringle) régióját, és mintegy 20 és 40 kDa közti összmolekulatömegű polietilénlikol csoportból. A nevezett konjugátum javult tulajdonságokkal bír hasznos gyógyszerként tumor kezeléshez.

jellemezve α -bra ϕ
Jettttt



A találmány a hepatocita növekedési faktor (NK4) 4 hurkot (kringle) tartalmazó N-terminális fragmentumának konjugátumaival foglalkozik polietilén-glikollal (PEG), ezeket tartalmazó gyógyszerkészítményekkel, eljárásokkal ezek előállítására, és alkalmazásuk eljárásaival.

A továbbiakban megvilágítjuk a találmány hátterét.

A hepatocita növekedési faktor (HGF/SF) egy polipeptid, amelyet Nakamura T. és munkatársai azonosítottak és tisztítottak [Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 1450-1459 (1984)]. Arra is rájöttek továbbá, hogy a hepatocita növekedési faktor azonos a szóródási (scatter) faktorról (SF) [Weidner K. M. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7001-7005 (1991)]. A HGF egy glikoprotein mintegy 100 kDa molekula-tömeggel, és ez érintett sokféle celluláris fenotípus kifejlődésében, ide értve a burjánzást, mitogenezist, elágazó csövecskék kialakulását, és tumorsejtek esetén a behatolást és áttételt. A helyzet összefoglalását adják meg Stuart K. A. és munkatársai [International Journal of Experimental Pathology 8], 17-30 (2000)]. Mind a patkány, mind a humán HGF-nél elvégezték a szekvencia elemzését és klónozását [Miyazawa K. és munkatársai: Biochem. Biophys. Res. Comm. 163, 967-973 (1989); Nakamura T. és munkatársai: Nature 342, 440-443 (1989); Seki T. és munkatársai: Biochem. and Biophys. Res. Comm. 172, 321-327 (1990); Tashiro K. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200-3204 (1990); Okajima A. és munkatársai: Eur. J. Biochem. 193, 375-381 (1990)]. Az öt N-terminális aminosavat nélkülöző HGF (dHGF) farmakokinetikai és

farmakológiai hatásait Uematsu Y. és munkatársai vizsgálták [J. Pharm. Sciences 88, 131-135 (1999)]. Arra jöttek rá, hogy a dHGF szérumban koncentrációja gyorsan csökken, és ezáltal az infúzió az előnyös beviteli út a bólusz injekcióval szemben.

Az 5,977,310 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom PEG-gel módosított HGF-et ír le. Az ilyen PEG-gel módosított HGF megnyújtott kiürüléssel bír in vivo, és azonos fiziológiai aktivitása van, mint a HGF-nek. Az 5,977,310 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom szerint azonban a HGF félélettartama 59,2 percről csak 76,7 percre, illetve 95,6 percre hosszabbodhat meg (például az 5,977,310 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom 5. példájában). Ebben a szabadalomban továbbá azt sugallják, hogy a PEG reagens moláris mennyisége a HGF molekulatömegének 5-100 szorosa közti tartományban van. Egy fehérje lizin amino-csoportjának vagy N-terminálisának módosítása esetében a PEG reagens előnyös móltartománya a HGF molekulatömegének 10-szerese és 25-szöröse között van. A rögzített PEG lánc molekulatömege mintegy 10 kDa. A PEG-et és polipeptideket, mint például HGF-et tartalmazó konjugátumok szintézisének eljárásait leírják például a WO 94/1332 számú PCT közzétételi iratban is. Ezek a konjugátumok egy előre meghatározott helyzetnél kapcsolódnak össze, mivel a véletlenszerű (random) konjugáció a szerzők szerint polimer részek bevezetéséhez vezet a molekula azon doménjeibe, amelyek közvetítik a terápiásan vagy diagnosztikailag kívánatos aktivitásokat. Következésképpen a molekulák hozzájuthatnak egy megnyújtott félélettartamhoz in vivo, és heterogén fehérjék esetében csökkentett immungenicitáshoz, de a kívánt biológiai aktivitások jelentős vagy teljes veszteségének kárára [Kitamura K. és munkatársai: Cancer Res. 51, 4310-4315 (1991); és Maiti P. K. és

munkatársai: *Int. J. Cancer Suppl.* 3, 17-22 (1988)]. A PEG-ezett IFN- α például képességeinek csak 7%-át mutatja a nem-PEG-ezett IFN- α -hoz viszonyítva [Bailon P.: *Bioconjugate Chem.* 12, 195-202 (2001)].

Arra is rájöttek továbbá, hogy egy HGF/SF fragmentum, amelyet NK4-nek neveznek, és a HGF/SF N-terminális hajtű doménjéből és a négy hurok (kringle) doménjéből áll, olyan farmakológiai tulajdonságokkal bír, amelyek teljes mértékben eltérnek a HGF/SF farmakológiai tulajdonságaitól, és antagonistá a HGF/SF befolyásolásával kapcsolatban a végbél ráksejtek mozgékonyására és behatolására, és ezen kívül angiogenezis inhibitor, amely visszaszorítja a tumor növekedést és áttételt [WO 93/23541 számú PCT közzétételi irat; Parr C. és munkatársai: *Int. J. Cancer* 85, 563-570 (2000); Kuba K. és munkatársai: *Cancer Res.* 60, 6737-6743 (2000); Date K. és munkatársai: *FEBS Letters* 420, 1-6 (1997); Date K. és munkatársai: *Oncogene* 17, 3045-3054 (1989); Tomioka D. és munkatársai: *Cancer Res.* 61, 7518-7524 (2001)].

Amint ez Kuba és munkatársai közleményéből [*Cancer Res.* 60, 6737-6743 (2000)] kiderül, állatkísérletekben az NK4 hatásának kimutatásához tüdő áttételre az NK4-et folyamatosan kell infúzióval beadni egy kéthetes időtartam során.

Ismeretes, hogy polimerek rögzítése bizonyos polipeptidekhez növelheti az ilyen polipeptidek szérumban félélettartamát. Olyanoknál jöttek rá erre például, mint a PEG-ezett interleukin-6 (EP 0 442 724 számú európai szabadalmi irat), PEG-ezett interleukin-2 (WO 90/07938 számú PCT közzétételi irat) vagy PEG-ezett eritropoietin (WO 01/02017 számú PCT közzétételi irat). A polietilén-glikol és más polimerek rögzítése azonban nem szükségszerűen vezet szérumban félélettartamuk meghosszabbodásához. Ismeretes például, hogy különböző polietilén-glikolok konjugálása

interleukin-8-hoz, G-CSF-hez vagy más interleukinokhoz olyan molekulák termeléséhez vezet, amelyeknek csökkent tulajdonságaik vannak [Mehvar R. J. : Pharm. Sci. 3 (1), 125-136 (2000)]. Így egy polipeptid PEG-ezésének kimenetele igen kevésbé jósolható meg. Gaertner H. F. és Offord R. E., leírják PEG helyspecifikus rögzülését a fehérjék amino-terminálisához [Bioconjugate Chem. 7, 38-44 (1996)]. Gaertner és munkatársai (a már említett WO 94/13222 számú PCT közzétételi iratban) megállapítják, hogy a PEG-ezés nagy problémát jelent, ha a rögzítési helyzeteket nem lehet pontosan szabályozni, mivel ezek fontos szerepet játszhatnak a fehérje stabilitásában és működésében.

Francis G. E. és munkatársai [Int. J. Hematol. 68, 1-18 (1998)] áttekintést nyújtanak citokinek és más terápiás jelentőségű fehérjék PEG-ezéséről. Francis és munkatársai megállapítják, hogy a PEG-ezési eljárások többségénél a biológiai aktivitás jelentős csökkenése következik be (tipikusan 20-95%). Francis és munkatársai szerint fehérjék PEG-ezése mindig próbálkozáson és hibán alapul, és egy ilyen PEG-ezés jórészt minden paraméterének meglepő és nagyon mély hatása lehet a termék működésére. Tsutsumi Y. és munkatársai [Thromb. Haemost. 77, 168-173 (1997)] leírják interleukin-6 PEG-ezését. Tsutsumi és munkatársai szerint az IL-6 lizin aminocsoportjainak mintegy 54%-a összekapcsolódik PEG-gel, 5 kDa molekulatömeggel PEG-csoportonként. Tsutsumi és munkatársai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8548-8553 (2000)] leírják egy immuntoxin kémiai módosítását PEG-gel. Mivel a véletlenszerű (random) PEG-ezéshez a fajlagos citotoxikus aktivitás jelentős vesztesége társul, Tsutsumi helyspecifikus PEG-ezést végez egy immuntoxin mutáns, amely egy vagy két további ciszteinnel bír, alkalmazásával, és ezt alkalmazza PEG kapcsoláshoz. Heinzerling L. és munkatársai [Dermatol. 201, 154-157

(2000)] leírják PEG kapcsolását 5 kDa molekulatömeggel interferon α -hoz. Tsutsumi Y. és munkatársai [J. Pharmacol. Exp. Ther. 278 1006-1011 (1996)] leírják a TNF- α PEG-es módosítását, amelyekből az alkalmazott PEG csoportok molekulatömege ismét 5 kDa. Mivel az alkalmazott PEG-ezett TNF- α molekulatömege legalább 84 kDa (a TNF- α 17 kDa-os molekulatömegére), itt legalább 13 darab 5 kDa-os PEG csoportnak kell lennie a TNF- α -hoz rögzítve.

A PEG-ezett fehérjékről és farmakológiai hatásaikról Reddy K. R. és munkatársai is adnak áttekintést [Ann. Pharmacotherapy 34, 915-923 (2000)]. Itt is megállapítják, hogy a terápiás hatású fehérjék PEG-ezését gondosan kell értékelni. Reddy és munkatársai szerint minden fehérje különböző optimalizált kémiai beavatkozást igényel, ezért a PEG-ezés befolyása nem jósolható meg.

A találmány tárgya javított, NK4 aktivitású polipeptidek megtalálása, és ezekből egy gyógyszerkészítmény kialakítása, amelyet hetenként csak kevés bólusz készítmény alkalmazásával is be lehet vezetni és/vagy nagyon kis dózisban, és amely képes tumor növekedés, angiogenezis és áttétel visszaszorítására.

A következőkben összefoglaljuk a találmányt.

A találmány NK4 konjugátumokat nyújt, amelyek NK4-et tartalmaznak kovalensen hozzákapcsolva egy mintegy 20-40 kDa-os polietilén-glikol (PEG) csoporthoz (mono-PEG-ezett NK4), előnyösen az NK4 lizin ϵ -aminocsoportja vagy az N-terminális aminocsoport révén. A legelőnyösebben az NK4 véletlenszerűen van PEG-ezve az NK4 lizin ϵ -aminocsoportjánál vagy az N-terminális aminocsoportnál. Meglepő módon arra jöttünk rá, hogy a találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4-nek

kiválóbb tulajdonságai vannak a terápiás alkalmazhatóság tekintetében az NK4-re vagy más PEG-ezett NK4-re vonatkoztatva.

A találmány továbbá eljárást nyújt a találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4 előállítására.

A találmány továbbá mono PEG-ezett NK4-et tartalmazó gyógyszerkészítményt nyújt.

A találmány továbbá eljárást nyújt mono PEG-ezett NK4-et tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására.

A találmány továbbá eljárást nyújt emberi rák (például mell-, tüdő-, prosztata-, hasnyálmirigy- vagy végbél rák) kezelésére, amely eljárást az jellemez, hogy mono-PEG-ezett NK4 gyógyászatilag hatékony mennyiségét bevezetjük hetenként 1-7 bólusz alkalmazásban a betegbe ilyen igény esetén.

Meglepő módon arra jöttünk rá, hogy a találmány szerinti véletlenszerűen PEG-ezett NK4-nek a kezelés során alkalmazandó teljes mennyisége jelentősen kisebb, összehasonlítva a nem-PEG-ezett NK4 alkalmazásával. Ennél fogva a gyógykezelésben alkalmazott PEG-ezett NK4 mennyisége mintegy 50%-a vagy kevesebb, előnyösen 20%-a vagy kevesebb, és legelőnyösebben mintegy 10%-a vagy kevesebb a nem-PEG-ezett NK4 igényelt mennyiségének.

A továbbiakban részletesen leírjuk a találmányt.

A humán HGF egy diszulfid-kapcsolt heterodimer, amelyet el lehet hasítani egy 463 aminosavas α -alegységgé és egy 234 aminosavas β -alegységgé, az R494 és V495 aminosavak között hasítva. Az α -lánc N-terminálisát megelőzi egy 31 aminosavas α -lánc, amely egy metionin csoporttal indul. Ez a szegmens magában foglal egy 31 aminosavas szignál szekvenciát. Az α -lánc a 32. aminosavnál indul, és 4 hurok (kringle)

domént tartalmaz. Az úgynevezett „hajtű domén” a 70-96. aminosavakból áll. Az 1. hurok domén a 128-206. aminosavakat tartalmazza. A 2. hurok domén a 211-288. aminosavakat tartalmazza, a 3. hurok domén a 305-383. aminosavakat tartalmazza, és a 4. hurok domén a 391-469. aminosavakat tartalmazza az α -láncban, hozzávetőlegesen. Ezeknek a szekvenciáknak változatai is léteznek, ezek azonban lényegében nincsenek hatással az NK4 biológiai tulajdonságaira (különösen nincsenek hatással ezek HGF-re antagonistikus aktivitásaira és ennek antiangiogén aktivitásaira). Ilyen változatokat ír le például a WO 93/23541 számú PCT közzétételi irat. Az NK4 hosszúsága is változó lehet néhány aminosavon belül, olyan hosszúságban, amely nem hat ennek biológiai tulajdonságaira.

Az NK4 a HGF/SF α -lánc N-terminális 447 aminosavából tevődik össze, amely magában foglalja az előzőekben említett hajtű domént és a négy hurok (kringle) domént. Ez előállítható rekombináns úton, vagy a rekombináns humán HGF/SF előállításával és emésztésével elasztázzal [Date K.: FEBS Letters 420, 1-6 (1997)], vagy egy NK4-et kódoló nukleinsav rekombináns expressziójával megfelelő gazdasejtekben, ahogyan a továbbiakban leírjuk. Az NK4 glükoprotein molekulatömege mintegy 57 kDa (ebből 52 kDa a polipeptid rész egymagában), és olyan in vivo biológiai aktivitással rendelkezik, amely a tumor növekedés, angiogenezis és/vagy áttétel gátlását idézi elő.

A „mono-PEG-ezett NK4” kifejezés, ahogyan itt használjuk, ennél fogva azt jelenti, hogy az NK4 kovalensen rögzítve van egy 20-40 kDa molekulatömegű polietilén-glikol csoporthoz. A csoport előnyösen véletlenszerűen lehet rögzítve az NK4 molekula különböző helyeihez, előnyösen azonban a legreaktívabb helyekhez, amilyenek például a lizin oldalláncok és az N-terminális aminocsoport. A mono-PEG-ezett NK4

(amely ennél fogva mono-PEG-ezett NK4 molekulák keveréke, különböző helyeknél PEG-ezve, amely helyek az NK4 lizin ϵ -aminocsoportjai és az N-terminális aminocsoport) a készítmény legalább 90%-a, és legelőnyösebben a mono-PEG-ezett NK4 a készítmény 92%-a, vagy még nagyobb százaléka. A találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4 készítmények ennél fogva lényegében elég homogének ahhoz, hogy bemutassák a homogén készítmény előnyeit, például egy gyógyászati alkalmazásban.

A „lényegében homogén” kifejezés, ahogyan itt alkalmazzuk, azt jelenti, hogy a termelt, befogott vagy alkalmazott PEG-NK4 konjugátum molekulák csak azok, amelyek egy rögzített PEG csoporttal bírnak. A készítmény tartalmazhat el nem reagált fehérjét is (vagyis olyant, amelyből hiányzik a PEG csoport). Amint a peptid térképezéssel és N-terminális szekvencia-elemzéssel meghatározzuk, egy példa a továbbiakban olyan készítményt szolgáltat, amely legalább 90%-ban mono-PEG-NK4 konjugátum és legfeljebb 2%-ban el nem reagált fehérje.

A találmány szerint alkalmazott PEG polimer molekulák molekulatömege mintegy 20-40 kD között van, ezáltal azok a PEG polimerek az előnyösek, amelyek mintegy 20, 30 vagy 40 kDa molekulatömeggel bírnak (a „molekulatömeg” kifejezésén, ahogyan itt használjuk, a PEG átlagos molekulatömegét értjük; a „mintegy” kifejezés azt jelzi, hogy az említett PEG készítményekben néhány molekula tömege több vagy kevesebb, mint a megállapított molekulatömeg.

A „PEG” vagy „PEG csoport” kifejezés a bejelentésben egy olyan gyököt jelent, amely esszenciális részként poli(etilén-glikol)-t tartalmaz. Az ilyen PEG tartalmazhat további kémiai csoportokat is, amelyek szükségesek a kötési reakciókhoz; amelyek a molekula kémiai szintézisének eredményei; vagy amelyek távtartók a molekula részeinek optimális távolságához. Ezen

kívül egy ilyen PEG tartalmazhat egy vagy több PEG oldalláncot, amelyek egymáshoz vannak kapcsolva. Azokat a PEG-eket, amelyek egynél több PEG láncsal bírnak, többkarú vagy elágazó PEG-eknek nevezzük. Elágazó PEG-eket lehet készíteni például polietilén-oxid hozzáadásával különböző poliolokhoz, ezek közé értve például a glicerint, pentaeritriolt és szorbitot. Így például egy négykarú, elágazó PEG-et elő lehet állítani pentaeritriolból és etilén-oxidból. Elágazó PEG-et írnak le például az EP-A 0 473 084 számú európai szabadalmi iratban és az 5,932,462 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban. Különösen előnyösek a PEG-ek két PEG oldallánccal (PEG2) lizin primer aminocsoportjai révén kapcsolva [Monfardini C. és munkatársai: *Bioconjugate Chem.* 6, 62-69 (1995)]. PEG polimerekként a 20-30 kDa molekulatömegű lineáris PEG molekulák az előnyösek, és a több, mint 30 kDa, elsősorban több, mint 40 kDa molekulatömegű, elágazó PEG-ek is előnyösek PEG polimerekként. 40 kDa-os PEG-ként egy kétkarú PEG (PEG2) különösen előnyös.

A találmány szerint eljárást nyújtunk egy lényegében homogén mono-PEG-ezett NK4 előállítására. Az NK4 PEG-ezését a technika állása szerinti eljárásokkal lehet kivitelezni, például az NK4 reakciójával elektrofilesen aktivált PEG-ekkel (szállító: Shearwater Corp., Amerikai Egyesült Államok; www.shearwatercorp.com). Előnyös PEG reagesek például az N-hidroxiszukcinimidil-propionátok (PEG-SPA) vagy -butanoátok (PEG-SBA), vagy elágazó N-hidroxiszukcinimidek, mint például az mPEG2-NHS [Monfardini C. és munkatársai: *Bioconjugate Chem.* 6, 62-69 (1995)]. Az ilyen eljárások olyan NK4 polipeptidet eredményeznek, amely véletlenszerűen van PEG-ezve egy NK4 lizin ϵ -aminocsoportjánál vagy az N-terminális aminocsoportnál. Nem véletlenszerűen, N-terminálisan PEG-ezett NK4-et lehet előállítani a WO 94/01451 számú PCT közzétételi irat szerint.

Egy előnyös kiviteli módban az említett NK4 kovalensen van kapcsolva egy (IV) általános képletű poli(etilén-glikol) csoporthoz, ahol a poli(etilén-glikol) csoport -CO (vagyis karbonil)-csoportja amid kötést képez az NK4 egyik aminocsoportjával; R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport, x értéke 2 vagy 3; m értéke mintegy 450 és mintegy 950 között van; és x és m együtt úgy van kiválasztva, hogy a konjugátum molekulatömegéből kivonva az NK4 fehérje molekulatömegét mintegy 20 és mintegy 40 kDa közti molekulatömeg érték alakuljon ki. Az NK4 aminocsoportjaként az NK4 lizin ϵ -aminocsoportja a rendelkezésre álló (szabad) aminocsoport.

Pontosabban az előzőekben említett konjugátumokat az (I) általános képlet képviselheti, amelyben P jelentése az előzőekben leírt NK4 fehérje csoport (vagyis az aminocsoporttal vagy aminocsoportok nélkül, amelyek amid kapcsolást képeznek az (I) képletben bemutatott karbonil-csoporttal); R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport; x értéke 2 vagy 3; m értéke mintegy 450 és mintegy 950 között van, és x és m együtt úgy van megválasztva, hogy a konjugátum molekulatömegéből kivonva az NK4 fehérje molekulatömegét mintegy 20 és mintegy 40 kDa közti molekulatömeg érték alakuljon ki. Ahogyan itt alkalmazzuk, az „m” megadott értékei csak tájékoztató jelleggel bírnak. Az „m” értékek tartományát esetenként és pontosan határozzuk meg a PEG csoport molekulatömegével.

Egy további előnyös kiviteli módban az említett NK4 kovalensen van összekapcsolva egy (V) általános képletű poli(etilén-glikol) csoporttal, ahol a képletben y értéke 1 és 4 között van, előnyösen 4, n és p értéke együtt úgy van meghatározva, hogy a konjugátum molekulatömegéből kivonva az NK4 fehérje molekulatömegét mintegy 20 és 40 kDa közti molekulatömeg

adódjék, és n és p értékei nem különbözhetnek jobban, mint 25%, előnyösen jobban, mint 10%, és legelőnyösebben azonosak; és R jelentése kis szénatomos alkilcsoport.

Ahogy itt használjuk a "kis szénatomszámú alkil" kifejezés egyenes vagy elágazó láncú, 1-6 szénatomos alkil-csoportot jelent (1-6 szénatomos alkilcsoport). A kis szénatomszámú alkilcsoportokra példák lehetnek a metil-, etil- és izopropilcsoportok. A találmány szerint R bármely kis szénatomszámú alkilcsoport lehet. Előnyösek azok a konjugátumok, amelyekben R jelentése metilcsoport.

Az „ m ” jelölés az etilén-oxid (OCH_2CH_2) csoportok számát képviseli a poli(etilén-oxid) csoportban. Az etilén-oxid egy egyedi PEG alegysége mintegy 44 dalton molekulatömeggel bír. Így a konjugátum molekulatömege (kivéve az NK_4 molekulatömegét) függ az „ m ” értékétől. A találmány szerinti konjugátumokban m értéke mintegy 450 és mintegy 950 között van (amely megfelel mintegy 20 kDa és mintegy 40 kDa közti molekulatömegnek). Az m értékét úgy kell kiválasztani, hogy a létrejövő találmány szerinti konjugátumnak olyan fiziológiai aktivitása legyen, amely összehasonlítható a nem módosított NK_4 -ével, ahol ez az aktivitás a nem módosított NK_4 megfelelő aktivitásával azonos lehet, ennél több lehet, vagy ennek töredéke lehet. Egy megadott molekulatömeg szám mellett a „mintegy” azt jelenti, hogy ennek a számnak ésszerű tartományán belül van, ahogyan ez a hagyományos analitikai technikákkal meg van határozva. Az „ m ” értéke úgy van kiválasztva, hogy az NK_4 fehérjéhez kovalensen kötött poli(etilén-glikol) csoport molekulatömege mintegy 20 kDa és mintegy 40 kDa között legyen.

Az (I) általános képletű vegyület előállítható egy ismert, (II) általános képletű aktivált polimer anyagból, amely képletben R jelentése és m értéke

az előzőekben meghatározott, egy (II) általános képletű vegyületet kondenzálva az NK4 fehérjével. Azok a (II) általános képletű vegyületek, amelyekben x értéke 3, a poli(etilén-glikol) α -(kis szénatomszámú) alkoxi-vajsav szukcinimidil észterei (kis szénatomszámú alkoxi-PEG-SBA). Azok a (II) általános képletű vegyületek, amelyekben x értéke 2, a poli(etilén-glikol) α -(kis szénatomszámú) alkoxi-propionsav szukcinimidil észterei (kis szénatomszámú alkoxi-PEG-SPA). Bármely hagyományos eljárás hasznosítható egy aktivált észter reagáltatásához egy aminnal, hogy amid keletkezzék. Az előzőekben leírt reakcióban a példaként ismertetett szukcinimidil észter egy kilépő csoport, amely előidézi az amid kialakulását. A szukcinimidil észterek alkalmazása, mint például a (II) általános képletű vegyületeknél fehérjével alkotott konjugátumok előállítására, ismertetve van az 5,672,662 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalomban (Harris és munkatársai), amely 1997. szeptember 30-án lett megadva.

A humán NK4 tartalmazza 30 lizin gyök 30 szabad ϵ -aminocsoportját. Amikor a PEG-ező reagens egyesítve van egy (II) általános képletű SBA vegyülettel, észlelhető, hogy mintegy 5-10 mg/ml fehérje koncentrációnál, mintegy 7,0-8,0 közti pH-nál, mintegy 1:3 fehérje: PEG aránynál és 20-25°C közti reakcióhőmérsékletnél mono-di- és nyomnyi mennyiségű tri-PEG-ezett fajták keveréke alakul ki. Amikor a fehérje: PEG arány mintegy 1:1 és 1:2 között van (például előnyösen 1:2 a 30 kDa-os PEG-SBA-nál, és mintegy 1:5 40 kDa-os PEG2-NHS-nél), elsősorban a mono-PEG-ezett fajta keletkezik. A reakciófeltételek manipulálásával (például a reagensek aránya, pH, hőmérséklet, fehérjekoncentráció, reakcióidő és hasonló), a különböző mono-PEG-ezett fajták relatív mennyiségei optimalizálhatók. Tipikus feltételek, a korlátozás szándéka nélkül, mintegy 8 és 12 mg/ml közti NK4, 0,3 mól/l kálium-foszfát, pH 8,

25°C, 1 óra reakcióidő. Ilyen körülmények között 30 kDa-os PEG-SBA-t alkalmazva (fehérje: PEG 1:2), a kitermelés mintegy 38% mono-PEG-ezett NK4.

Mono-PEG-ezett NK4 előállítható a WO 94/01451 számú PCT közzétételi iratban ismertett eljárással is. A WO 94/01451 számú PCT közzétételi irat eljárást ismertet rekombináns polipeptid előállítására módosított terminális aminosav α -szén reaktív csoporttal. Az eljárás lépései magukban foglalják a rekombináns polipeptid kialakítását és ennek védelmét egy vagy több biológiailag hozzáadott védőcsoporttal az N-terminális α -aminál és a C-terminális α -karboxilnál. A polipeptid azután reagáltatható kémiai védőszerekkel a reaktív oldallánc csoportok szelektív védelmére, ezáltal megakadályozva, hogy az oldallánc csoportok módosuljanak. A polipeptidet ezután elhasítjuk egy, a biológiai védőcsoportra fajlagos hasító enzimmal, így alakítva ki egy nem-védett, terminális aminosav α -szén reaktív csoportot. A nem-védett, terminális aminosav α -szén reaktív csoportot azután módosítjuk egy kémiai módosító szerrel. A védett oldalláncú, terminálisan módosított, egymásolatos polipeptidet azután védőcsoport-mentesítjük az oldallánc csoportoknál, így alakítunk ki egy terminálisan módosított, rekombináns, egymásolatos polipeptidet. A lépések száma és sorrendje az eljárásban változtatható, hogy szelektív módosítást érjünk el a polipeptid N- és/vagy C-terminális aminosavainál.

További előnyös találmány szerinti konjugátumok NK4 fehérjét tartalmaznak kovalensen hozzákapcsolva egy kis szénatomszámú alkoxi-poli(etilén-glikol) csoporthoz egy $-C(O)-X-S-Y-$ általános képletű távtartó (linker) csoporton át, ahol a távtartó C(O) csoportja amid kötést képez az NK4 egy aminocsoportjával (amint az előzőekben említettük, a lizin gyök ϵ -

amino csoportja rendelkezésre áll), X jelentése $-(CH_2)_k$ - vagy $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k$ - csoport, k értéke 1 és 10 között van, és Y jelentése (VI a), (VI b), (VI c) vagy (VI d) képletű csoport; a poli(etilén-glikol) rész átlagos molekulatömege mintegy 20 kDa és mintegy 40 kDa között van, és a konjugátum molekulatömege mintegy 72 kDa és mintegy 92 kDa között van 52 kDa NK4 polipeptid molekulatömegnél, vagy mintegy 77 kDa és mintegy 97 kDa között van 57 kDa NK4 glikoproteinnél.

Ezt az NK4 fajtát a (III) általános képletű polipeptid képviselheti, amely képletben R jelentése bármilyen kis szénatomszámú alkilcsoport lehet, amely lineáris vagy elágazó láncú, 1-6 szénatomos alkilcsoport, mint például metil-, etil-, izopropilcsoport vagy hasonló csoport lehet. Előnyös alkilcsoport a metilcsoport. X jelentése $-(CH_2)_k$ - vagy $CH_2(O-CH_2-CH_2)_k$ - csoport lehet, ahol k értéke 1 és 10 között van. A k értéke előnyösen mintegy 1 és mintegy 4 között van, k értéke előnyösebben 1 vagy 2. X jelentése legelőnyösebben $-(CH_2)$ - csoport.

A (III) általános képletben Y jelentése (VII a), (VII b), (VII c) vagy (VII d) képletű csoport, előnyösen (VII b) vagy (VII d) képletű csoport, még előnyösebben (VII d) csoport.

A (III) általános képletben m értékét úgy választjuk ki, hogy a létrejövő (III) általános képletű konjugátum fiziológiai aktivitása összehasonlítható legyen a nem módosított NK4-ével, amely aktivitás a nem módosított NK4 megfelelő aktivitásával azonos, annál több vagy annak egy töredéke, m értéke az etilén-oxid láncok számát képviseli a PEG egységben. Egy $-(OCH_2CH_2)-$ egyedi PEG alegység molekulatömege mintegy 44 dalton. Így a konjugátum molekulatömege (kizárva az NK4 molekulatömegét) függ az m értékétől. A molekulatömegnél a „mintegy” kifejezés bizonyos számok mellett azt jelenti, hogy ez ennek a számnak

ésszerű tartományán belül van, ahogyan ezt hagyományos analitikai technikákkal meghatározzuk. m értéke ennél fogva egy egész szám mintegy 450 és mintegy 950 között (amely mintegy 20 és mintegy 40 kDa közti molekulatömegnek felel meg).

Előnyös (III) általános képletű NK4 fehérjéket képviselnek a (III a) és (III b) képletű vegyületek.

A legelőnyösebb NK4 fehérje termékeket a (III b) általános képlet képviseli.

Ezeket az NK4 fehérjéket a következőképpen állíthatjuk elő:

(a) kovalensen reagáltatjuk NK4 fehérje egy szabad aminocsoportját, előnyösen lizin aminosav ϵ -aminocsoportját, vagy a $P-NH_2$ képletű N-terminális aminocsoportot egy $Z-CO-X-S-Q$ általános képletű bifunkcionális reagenssel, így alakítva ki a (VIII) általános képletű köztes terméket egy amid kötéssel, amely képletben P jelentése egy NK4 fehérje a nélkül az aminocsoport nélkül, amely amid kötést képez; Z jelentése egy reaktív csoport, például karboxil-NHS észter; X jelentése $-(CH_2)_k-$ vagy $-CH_2(O-CH_2-CH_2)_k-$ csoport, ahol k értéke mintegy 1 és mintegy 10 között van; és Q jelentése védőcsoport, például alkanoil-csoport, mint acetilcsoport;

(b) az (a) lépésből való köztes terméket egy amid kapcsolással kovalensen reagáltatjuk egy $W-[OCH_2CH_2]_m-OR$ általános képletű aktivált poli(etilén-glikol) származékkal, egy (IX) általános képletű NK4 fehérje terméket alakítva ki, ahol a képletben W jelentése Y szulfhidril-reaktív formája, m értéke egész szám mintegy 450 és mintegy 950 között; R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport; és Y jelentése az előzőekben meghatározott.

Az egyik kiviteli módban a bifunkcionális reagens előnyösen N-szukcinimidil-S-acetil-tiopropionát vagy N-szukcinimidil-S-acetil-tioacetát; Z jelentése előnyösen N-hidroxi-szukcinimid, és a $W-(OCH_2CH_2)_m-OR$ aktivált poli(etilén-glikol) származék előnyösen jó-d-acetil-metoxi-PEG, metoxi-PEG-vinil-szulfon vagy metoxi-PEG-maleimid.

Részletesebben a (III) általános képletű NK4 fehérjéket egy merkaptocsoport kovalens kapcsolásával állíthatjuk elő NK4-hez („aktiválás”), és a létrejött aktivált NK4 összekötésével egy poli(etilén-glikol) származékkal. A találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4 előállításának első lépése tartalmazza egy merkaptocsoport kovalens kapcsolását az NK4 NH_2 -csoportjai révén. Az NK4-nek ezt az aktiválását bifunkcionális reagensekkel hajtjuk végre, amelyek hordoznak egy védett merkaptocsoportot és egy további reaktív csoportot, például aktív észtereket (mint egy szukcinimidil-észtert), anhidrideket, szulfonsavak észtereit, vagy karbonsavak illetve szulfonsavak halogenidjeit. A merkaptocsoport olyan csoporttal van védve, amely a szakterületen ismert, például acetilcsoporttal. A bifunkcionális reagensek képesek reagálni az aminocsoportokkal amid-összeköttetést alakítva ki.

Az amino-csoportok aktiválásának egy előnyös kiviteli módját egy szukcinimidil résszel bíró bifunkcionális reagensekkel történő reakcióval hajtjuk végre. A bifunkcionális reagensek hordozhatnak különböző térköztartó fajtákat, például $-(CH_2)_k$ -részeket [mint például a (X) képletű acetil-tioalkil-karboxil-NHS észtereknél], vagy $-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_k$ -részeket, [mint például a (XIII) képletű 2-(acetil-tio)-(etoxi) $_k$ -ecetsav NHS-észtereknél], ahol k értéke 1 és mintegy 10 között van, előnyösen 1 és mintegy 4 között, még előnyösebben 1 vagy kettő, és legelőnyösebben 1. Ezekre a reagensekre példa lehet a (XI) képletű N-szukcinimidil-S acetil-tiopropionát

(SATP) és a (XII) képletű N-szukcinimidil-S-acetil-tioacetát (SATA), amely képletekben k értéke az előzőekben meghatározott.

A bifunkcionális reagensek előállítása a szakterületen ismert. A 2-(acetil-tio)-(etoxi)_k-ecetsav NHS észterek prekursorait a DE-3924705 számú német szövetségi köztársaságbeli szabadalmi irat ismereteti, míg az acetil-tio-vegyület származékképzését March J. írja le [Advanced Organic Chemistry, 375-376 (1977)]. A SATA kereskedelmi forgalomban kapható (Molecular Probes, Eugene, Oregon, és Pierce, Rockford, Illinois, Amerikai Egyesült Államok).

Csak egy merkaptocsoport hozzáadása egy NK4 molekulához úgy alakítható ki, hogy megfelelően beállítjuk a reakcióparamétereket, vagyis a fehérje (NK4) koncentrációt és a fehérje/bifunkcionális reagens arányt.

A reakciót például pH 6,5-8,0 között vizes pufferoldatban hajtjuk végre 10 vagy 100 mmól/l kálium-foszfátban, 300 mmól/l nátrium-kloriddal (pH 7,3) vagy anélkül. A bifunkcionális reagenst dimetil-szulfoxidban adhatjuk be. Miután a reakció teljessé vált, előnyösen 30 perc múlva, a reakciót leállítjuk lizin hozzáadásával. A fölösleges bifunkcionális reagenst elkülöníthetjük a szakterületen ismert eljárásokkal, például dialízissel vagy oszlop szűréssel. Az NK4-hez adott merkaptocsoportok átlagos számát fotometriás eljárásokkal határozhatjuk meg, amilyen például Grasetti D. R. és Murray J. F. eljárása [J. Appl. Biochem. Biotechnol. 119, 41-49 (1967)].

Az előbb ismertetett reakciót egy aktivált poli(etilén-glikol) (PEG) származék kovalens kapcsolása követi. Megfelelő PEG származékok az aktivált PEG molekulák mintegy 20 és mintegy 40 kDa közti átlagos molekulatömeggel.

Aktivált PEG származékok ismertek a szakterületen, és le vannak írva például Morpurgo M. és munkatársai közleményében [J. Bioconj. Chem 7,

363 (1996)] PEG-vinil-szulfonokra. Lineáris láncú és elágazó láncú PEG fajták alkalmasak az (I) általános képletű vegyületek előállítására. Reaktív PEG-reagensekre példa lehet egy (XIV) általános képletű jód-acetil-metoxi-PEG és egy (XV) általános képletű metoxi-PEG-vinil-szulfon. Ezeknek a jód-aktivált vegyületeknek az alkalmazása a szakterületen ismert, ahogyan ezt például Hermanson G. T. leírta [a Bioconjugate Techniques című szakkönyvben, 147-148. oldal, kiadó: Academic Press, San Diego (1996)].

A PEG fajták legelőnyösebben maleimiddel vannak aktiválva, alkoxi-PEG-maleimidet, elsősorban metoxi-PEG maleimidet alkalmazva (molekulatömeg: 20000 és 40000 között; Shearwater Polymers, Inc). Az alkoxi-PEG-maleimidek szerkezetét a (XVI) vagy (XVII) általános képlet mutatja be, ahol R jelentése és m értéke az előzőekben meghatározott; különösen előnyösek a (XVII) általános képletű vegyületek.

A kapcsolási reakció alkoxi-PEG-maleimiddel a merkaptó védőcsoport in situ hasítása után megy végbe vizes pufferoldatban, például olyan pufferoldatban, amely 10 mmól/l kálium-foszfátot, 300 mmól/l nátrium-kloridot és 2 mmól/l EDTA-t tartalmaz (pH 6,2). A védőcsoport hasítását például hidroxil-ammal lehet végrehajtani dimetil-szulfoxidban 25°C hőmérsékleten, pH 6,2-nél, mintegy 90 perc alatt. A PEG módosításhoz az aktivált NK4/alkoxi-PEG-maleimid molarány mintegy 1:1 és mintegy 1:6 között lehet. A reakció cisztein hozzáadásával állítható be, és a megmaradó merkaptocsoportok (-SH) reakciójával N-metil-maleimiddel vagy más diszulfid kötés kialakítására képes, megfelelő vegyülettel. Bármely megmaradó aktív merkaptocsoport reakciója miatt egy védőcsoporttal, például N-metil-maleimiddel vagy más alkalmas védőcsoporttal, az NK4 fehérjék a találmány szerinti konjugátumokban tartalmazhatnak ilyen védőcsoportokat. Az itt leírt munkamenet általában molekulák keverékét

alakítja ki, amelyek változó számú merkaptocsoporttal bírnak, ahol ezek a merkaptocsoportok különböző számú védőcsoporttal vannak védve a PEG-maleimidhez nem konjugált aktivált merkaptocsoportok számától függően a fehérjén.

Míg az N-metil-maleimid azonos típusú kovalens kötést alakít ki, amikor a megmaradó merkaptocsoportok blokkolására alkalmazzuk PEG-ezett fehérjéken, a diszulfid vegyületek egy intermolekuláris szulfid/diszulfid cserereakcióban a blokkoló reagens diszulfid-hidas kapcsolásához vezetnek. Az ilyen típusú blokkolási reakcióhoz az előnyös blokkoló reagens az oxidált glutation (GSSG), cisztein és cisztamin. Míg a cisztein nem vezet be további nettó töltést a PEG-ezett fehérjébe, a GSSG blokkoló reagens vagy cisztamin további negatív vagy pozitív töltést eredményez.

A (III) általános képletű vegyületek további tisztítása, ide értve a mono-PEG-ezett NK4 fajták elkülönítését a di-, tri- és multi-PEG-ezett NK4 fajtáktól, olyan eljárásokkal hajtható végre, amelyek a szakterületen ismertek, például oszlopkromatográfiával. A mono-PEG konjugátum százaléka a szélesebb frakciók összegyűjtésével szabályozható az eluciós csúcs közül, hogy csökkenjen a mono-PEG százaléka, vagy a keskenyebb frakciók összegyűjtésével, hogy növekedjék a mono-PEG százaléka a kompozícióban. Mintegy 90% mono-PEG jó egyensúlyt jelent a kitermelésben és aktivitásban. Azok a kompozíciók kívánatosak, amelyekben például a konjugátumoknál legalább 92%-a vagy legalább 96%-a mono-PEG fajta. A találmány egyik kiviteli formájában a mono-PEG konjugátumok százaléka 90% és 96% között van.

Gyógyszerkészítmények

A találmány szerinti vegyületek a gyógyszerkészítmények előállításához alkalmas eljárások szerint szerelhetők ki, amely eljárások

ismeretesekek azok számára, akik a szakterületen járatosak. Az ilyen készítmények előállításához a találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4-et egyesítünk egy keverékben valamely gyógyszerészetileg elfogadható hordozóban. Ilyen elfogadható hordozókat írnak le például a Remington's Pharmaceutical Sciences című szakkönyv 18. kiadásában (kiadó: Mack Publishing Company, szerkesztő: Oslo és munkatársai), elsősorban az 1435-1712. oldalon. A tipikus készítmények hatékony mennyiségű találmány szerinti vegyületet tartalmaznak, például mintegy 0,1-100 mg/ml-t, megfelelő mennyiségű hordozóval együtt. A készítményeket parenterálisan lehet beadni.

A találmány továbbá gyógyszerkészítményeket nyújt, amelyek tartalmazzák az itt leírt konjugátumokat, amelyekben a mono-PEG konjugátumok százaléka előnyösen legalább 90%, előnyösebben legalább 92%.

A találmány szerinti gyógyszer kiszerezések előállíthatók bármely, a szakterületen ismert eljárással. Szokásosan a mono-PEG-ezett NK4 oldatait olyan pufferral szemben dializáljuk, amelyet alkalmazni szándékozunk a gyógyszerkészítményben, és a kívánt végső fehérjekoncentrációt koncentrállással vagy hígítással beállítjuk.

Ilyen gyógyszerkészítmények alkalmazhatók injekcióval való beadáshoz, és ezek a mono-PEG-ezett NK4 hatékony mennyiségét tartalmazzák gyógyszerészetileg elfogadható hígítókkal, tartósító szerekkel, szolubilizáló szerekkel, emulgeáló szerekkel, adjuvánsokkal és/vagy hordozókkal együtt. Az ilyen készítmények magukban foglalnak különböző puffer tartalmú (például arginin, acetát, foszfát), pH-jú és ionerősségű hígítókat, adalékanyagokat, mint detergenset és szolubilizáló szereket (például Tween 80/poliszorbát, Pluronic F68, nátrium-klorid, nátrium-

szulfát), antioxidánsokat (például aszkorbinsav, L-metionin), tartósítószerket (Timersol, benzil-alkohol) és töltőanyagokat (például szacharóz, mannit), továbbá olyan anyagok építhetők be a szemcsés készítményekbe vagy liposzómákba polimer vegyületekként, mint politejsav, poliglikolsav és hasonló. Az ilyen készítmények befolyásolhatják a találmány szerinti mono-PEG-ezett NK4 fizikai állapotát, stabilitását és kibocsátásának és kiürülésének sebességét.

Adagolás és gyógyszerkoncentráció

Egy standard rákkezelési menetrendben általában a betegeket mono-PEG-ezett NK4 1 és 30 mg közti tartományban levő dózisaival kezeljük testtömeg kg-ra számítva naponta egy adott időtartamon át, amely 1 naptól mintegy 30 napig terjed vagy még tovább. A gyógyszert egyetlen napi dózisként alkalmazzuk egy gyógyszer kiszerelés szubkután vagy intravénás bólusz injekciójaként, amely kiszerelés 0,1-100 mg mono-PEG-ezett NK4-et tartalmaz milliliterenként. Ez a kezelés kombinálható bármely standard (például kemoterápiás) kezeléssel, a mono-PEG-ezett NK4-et a standard kezelés előtt, közben vagy után alkalmazva. Ez javított kimenetelt eredményez összehasonlítva a standard kezeléssel egymagában.

Bármely esetben a beadott találmány szeinti PEG-ezett NK4 összes mennyisége jelentősen kisebb, mint az NK4 mennyisége egymagában ugyanilyen kezeléshez.

A következőkben kiviteli példákat, referenciákat és szekvencialistákat adunk, hogy segítsük megérteni a találmányt, amelynek valódi oltalmi köre a mellékelt igénypontokból ismerhető meg. Magától értetődik, hogy módosításokat lehet végezni az ismertetett munkamenetekben anélkül, hogy kilépnénk a találmány szelleméből és oltalmi köréből.

A szekvenciák leírása

SEQ ID NO:1 az NK4 DNS- és polipeptid szekvenciáját mutatja be

SEQ ID NO:2 az NK4 polipeptid szekvenciáját mutatja be

Az ábrák leírása

1. ábra HGF-fel indukált HUVEC burjánzás gátlása NK4-gyel, 20 kDa-os mono-PEG-NK4-gyel és 30 kDa-os mono-PEG-NK4-gyel.
2. ábra HFG-vel indukált HUVEC burjánzás gátlása NK4-gyel és 40 kDa-os mono-PEG-NK4-gyel.
3. ábra bFGF-fel indukált HUVEC burjánzás gátlása NK4-gyel, 30 kDa-os mono-PEG-NK4-gyel és 40 kDa-os mono-PEG-NK4-gyel.
4. ábra NK4, 30 kDa-os mono-PEG-NK4, 40 kDa-os mono-PEG-NK4 idő-koncentráció görbéje plazmában intravénás (i.v.) (4A. ábra) vagy szubkután (s.c.) (4B. ábra) injekció után.

1. példa

NK4 rekombináns előállítás

NK4-et állíthatunk elő terápiás alkalmazáshoz rekombináns eszközökkel bakteriális vagy eukarióta expressziós rendszereket alkalmazva. Megfelelő eukarióta expressziós rendszerek például a manipulált HeLa, BHK vagy elsősorban CHO sejtek. Az NK4 termeléshez a manipulált sejteket megfelelő tápközegekben tenyésztjük. Tipikusan 1-5 literes sejtenyészeket alkalmazunk inokulumként egy 10 literes fermentorhoz. 3-5 nap múlva a 10 literes fermentorban levő tenyészetet használjuk inokulumként a 100 literes fermentorhoz. További 3-5-napos fermentálás után ezt a tenyészetet alkalmazzuk inokulumként az 1000 literes termelő fermentorhoz. 3-4 nap múlva a sejteket szűréssel vagy centrifugálással eltávolítjuk és eldobjuk. Az NK4-et tartalmazó felülúszót szűrjük,

összegyűjtjük és feldolgozzuk tisztítás céljából. A tisztítási folyamatokat a következő példában írjuk le.

2. példa

Tisztítás

A heparin-Sepharose Sepharose gyöngyöket tartalmaz, amelyek felületére heparin van kovalensen hozzákötve. Mivel az NK4 nagy affinitást mutat a heparinhoz, ez visszamarad ezen az oszlopon, és nagy sókoncentrációval eluálható, míg a fehérje szennyezések és más tisztátalanságok nem kötődnek, vagy kis sókoncentrációknál eluálódnak. Az NK4 tartalmú frakciókat, amelyek mintegy 0,7 és mintegy 1,1 mól/l nátrium-kloridnál eluálódnak 50 mmól/l HEPES-sel (pH 7,5), összegyűjtjük és hidroxipapatit oszlopra visszük fel. Az NK4 mintegy 0,4 és 0,7 mól/l kálium-foszfátnál (pH 7,5) eluálódik. A kapott frakciók lényegében mentesek a szennyező fehérjéktől, és tovább tisztíthatók S-Sepharose kromatográfiával.

3. példa

Mono-PEG-ezett NK4 előállítás

Az előzőekben említett munkamenettel tisztított NK4-et alkalmazzuk a PEG-ezési reakciókban. Példaként három előzőleg említett megfelelő eljárást ismertetünk részletesen.

a) NK4 PEG-ezése mPEG-SBA-val

NK4 alikvotjait regálatjuk metoxi-PEG-SBA-val (5 kDa összehasonlításához, 20 kDa illetve 30 kDa; Shearwater Polymer, Inc., Huntsville, Alabama, Amerikai Egyesült Államok). A reakciót 1:1 és 1:5 közti fehérje-reagens aránynál hajtjuk végre, mintegy 2 órán át szobahőmérsékleten (az 1:2 arány az előnyös, amikor 20 és 30 kDa-os PEG-et alkalmazunk). A reakciót 10 mmól/l trisz puffer vagy arginin. HCl (pH 8) hozzáadásával

állítjuk le, és a mintákat SDS-PAGE-val vagy Superose 6 oszlopon (Pharmacia) méretkizárásos kromatográfiával elemezzük, pufferoldatként 500 mmól/l kálium-foszfátot (pH 6,8) alkalmazva a kiegyensúlyozáshoz és eluáláshoz. A reakciót változó fehérje-reagens arányokkal, pH-kal, hőmérséklettel és időtartammal optimalizáljuk, hogy zömmel mono-PEG-ezett NK4-et kapjunk.

Ilyen körülmények például:

NK4 koncentráció:	8-12 mg/ml
Puffer rendszer/pH:	0,3 mól/l kálium-foszfát, (pH 8)
Hőmérséklet:	25°C
Reakcióidő:	1 óra
Mólarányok (fehérje:reagens)	1:2
Kitermelés:	
Mono-PEG-ezett NK4:	38%
Di-PEG-ezett NK4:	17%
Nem PEG-ezett NK4:	45%

b) NK4 PEG-ezése mPEG-SPA-val

NK4 alikvotjait (fehérje koncentráció 8-12 mg/ml között 0,3 mól/l kálium-foszfátban, pH 8) reagáltatjuk metoxi-PEG-SPA-val (5 kDa összehasonlításához, illetve 20 kDa; Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, Alabama, Amerikai Egyesült Államok). A reakciót 1:2 fehérje—reagens aránynál hajtjuk végre mintegy 2 óra alatt szobahőmérsékleten. A reakciót 10 mmól/l trisz puffer vagy arginin HCl hozzáadásával állítjuk be, és a mintákat elemezzük SDS-PAGE-val, fordított fázisú HPLC-vel vagy Superose 6 oszlopon (Pharmacia) méretkizárásos kromatográfiával, pufferoldatként 500 mmól/l kálium-foszfátot (pH 6,8) alkalmazva a kiegyensúlyozáshoz eluáláshoz. A reakciót változó fehérje—reagens arányokkal, pH-val,

hőmérséklettel és időtartammal optimalizáljuk, hogy zömmel mono-PEG-ezett NK4-et kapjunk, a di- és tri-PEG-ezett NK4-gyel szemben.

c.) NK4 PEG-ezése mPEG2-NHS-sel

A PEG-ezést a 3 c. példában leírtak szerint hajtjuk végre azzal a kivétellel, hogy PEG-SPA helyett mPEG2-NHS-et (40 kDa-os PEG, elágazó egy lizin kapcsoló tag révén) alkalmazunk 1:5 molaránynál (fehérje — PEG reagens).

4. példa

Mono-PEG-ezett NK4 izolálása.

Mono-PEG-ezett NK4-et különíthetünk el nem PEG-ezett, di- és tri-PEG-ezett NK4-ből egy preparatív méretkizárásos kromatográfiát futtatva [például Superose 6 vagy Superdex 200 (Pharmacia)], pufferoldatként 500 mmól/l kálium-foszfátot alkalmazva (pH 6,8) kiegyensúlyozásához és eluáláshoz, vagy ioncserélő kromatográfiával. A tisztított fehérje zömmel a mono-PEG-ezett fajtákat tartalmazza. Frakciókat gyűjtünk és elemezzük SDS-PAGE-val és fordított fázisú kromatográfiával.

5. példa

Mono-PEG-ezett NK4 molekuláris jellemzése

a) Méretkizárásos kromatográfia

A mono-PEG-ezett fajták korábban eluálódnak a méretkizárásos kromatográfiában (például Superose 6 vagy Superdex 200; pufferoldatként 500 mmól/l kálium-foszfátot (pH 6,8) alkalmazva a kiegyensúlyozáshoz és eluáláshoz), összehasonlítva a nem módosított formával. Ez a molekula megnövekedett hidrodinamikai sugarának tulajdonítható.

b) SDS-PAGE

Az SDS-PAGE-ban a fehérjéket molekulatömegük szerint különítjük el. A PEG-ezés általi megnövekedett molekulatömeg következtében a mono-

PEG-ezett NK4 rövidebb vándorlási távolságot mutat összehasonlítva a nem módosított NK4-gyel. A vándorlási távolság fordított korrelációban van a PEG rész lánchosszúságával és az NK4 molekulánként rögzített PEG csoportjainak számával.

c) Peptid térképezés

Mono-PEG-ezett NK4 emésztése szekvencia-fajlagos endoproteinázokkal (például LysC vagy tripszin) jellegzetes peptid térképet eredményez. A létrejövő peptideket elkülöníthetjük fordított fázisú kromatográfiával és elemezhetjük tömegspektrometriával és/vagy N-terminális szekvencia-elemzéssel. Ez lehetővé teszi a PEG-módosított csoportok meghatározását az NK4 molekulán belül.

d.) Fordított fázisú kromatográfia

Mono-PEG-ezett NK4 jellemezhető fordított fázisú kromatográfiával is. Az NK4 PEG-ezése változást eredményez a retenciás időben a nem módosított NK4-gyel összehasonlítva.

6. példa

Mono-PEG-ezett, nem PEG-ezett és multi-PEG-ezett NK4 összehasonlítása

Ebben a példában nem PEG-ezett NK4-et 5 kDa PEG-gel, 20 kDa PEG-gel, 30 kDa PEG-gel mono-PEG-ezett NK4-et, és multi-PEG-ezett NK4-et (több mint egy PEG láncsal PEG-ezett NK4) alkalmazunk.

a.) Eloszlási vizsgálat

MDCK sejteket összefolyásig tenyésztünk szövettenyésztő lemezekben. Sejteket kezelünk HGF-fel (10 ng/ml) vagy HGF és NK4 kombinációival. Ezekben a kísérletekben a HGF-indukált sejteloszlást gátolja NK4 10-1000-szeres moláris fölöslegének hozzáadása, a PEG-ezett NK4 funkcionális aktivitását mutatva. Arra jöttünk rá, hogy a mono-PEG-ezett 5 kDa-PEG-NK4, 20 kDa-PEG-NK4, 30 kDa-PEG-NK4 és 40 kDa-PEG-NK4 in vitro

aktivitása hasonló a nem PEG-ezett NK4 aktivitásához. Arra is rájöttünk, hogy a több, mint egy PEG lánc (20-40 kDa) hozzáadása szignifikáns veszteséget jelent az in vitro aktivitásban (1. Táblázat).

1. TÁBLÁZAT

Az MDCK eloszlási vizsgálat pontértékei

NK4 (kontroll)			40kDa-PEG-NK4			30kDa-PEG-NK4			
NK4 ($\mu\text{g/ml}$)	NK4	NK4	Mono- PEG	Di- PEG	Tri- PEG	Mono- PEG	Di- és tri- PEG	Tri- és tetra- PEG	Penta- PEG
5,00	++	++	++	+	+/-	++	++	+	-
1,67	++	++	++	+	-	++	+	+/-	-
0,56	++	++	++	+/-	-	++	+	-	-
0,19	+	+	+	-	-	+	+/-	-	-
0,06	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-

20 kDa- PEG-NK4			5 kDa-PEG-NK4							
NK4 ($\mu\text{g/ml}$)	Mono- PEG	Di- PEG	Tri- PEG	Mono- PEG	Di- PEG	Tri- PEG	Tetra- PEG	Penta- PEG	Hexa- PEG	Hepta- PEG
5,00	++	++	+	++	++	++	++	+	-	-
1,67	++	+	+	++	++	++	++	+	-	-
0,56	++	+	+/-	++	++	++	+	+/-	-	-
0,19	+	+/-	-	+	+	+	+/-	-	-	-
0,06	+/-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Az NK4 különböző PEG-ezett formáinak relatív képességét mérjük MDCK sejtek HGF (10 ng/ml) által indukált szétszóródásának gátlásában.

++ jelenti a teljes gátlást, + jelenti a gátlást, +/- jelenti a gyenge gátlást és - jelenti azt, hogy nincs gátlás.

b) HUVEC burjánzási vizsgálat

A HGF mitogén aktivitásának NK4 általi gátlását a HUVEC burjánzásának mérésével határozzuk meg tenyészetben, ahogyan Nakamura T. és munkatársai leírják [Nature 342, 440-443 (1989)]. Ezekben a kísérletekben a HGF-indukált sejtburjánzást NK4 10-1000-szeres moláris fölöslegének hozzáadásával gátoljuk, kimutatva a mono-PEG-ezett NK4 funkcionális aktivitását.

Egy másik megoldás szerint a HUVEC burjánzási vizsgálatot a bFGF (bázisos fibroblasztos növekedési faktor) mitogén aktiválásának NK4 általi gátlásával hajtjuk végre. A gátlást HUVEC burjánzás mérésével határozzuk meg tenyészetben, ahogyan ezt Kuba és munkatársai leírják [Cancer Res. 60, 6737-6743 (2000)]. Ezekben a kísérletekben az FGF-indukált sejtburjánzást NK4 10-1000-szeres moláris fölöslege gátolja, kimutatva a mono-PEG-ezett NK4 funkcionális aktivitását (3. ábra).

c) Behatolási vizsgálat

Ebben a vizsgálatban elemezzük a tumorsejtek behatolási képességét. A vizsgálatot lényegében úgy hajtjuk végre, ahogyan ezt Albini és munkatársai leírják (1987) HT115 sejteket alkalmazva. Ismét HGF-indukált (10 ng/ml) sejtbehatolást gátolhatunk PEG-ezett NK4 10-1000-szeres moláris fölöslegével, kimutatva a mono-PEG-ezett NK4 funkcionális aktivitását.

7. példa

Aktivitás in vivo

Modell:	Panc Tu1 humán hasnyálmirigy rák ortotóp SCID egér modell [Alves F. és munkatársa: Pancreas <u>23</u> , 227-235 (2001)].
Kezelés:	8 nap múlva, egy alkalmazással naponta mono-PEG-ezett NK4-gyel 24 napos időtartamon át.
Dózisok	16 mg/kg/nap 4 mg/kg/nap 1 mg/kg/nap placebo
Eredmények:	A kezelés mono-PEG-ezett NK4-gyel a primer tumor növekedés és áttétel egy dóziszfüggő visszaszorítását mutatja, miközben hatás nem látható a placebóval kezelt csoportokban.

8. példa

Gyógyszerkészítmények

Megfelelő gyógyszerkészítmények például a következők.

1-30 mg/ml mono-PEG-ezett NK4

150 mmól/l nátrium-klorid

10 mmól/l nátrium-foszfát, pH 7,2

1-30 mg/ml mono-PEG-ezett NK4

150 mmól/l nátrium-klorid

0,01 % Tween 80, vagy Tween 20, vagy Pluronic F68

10 mmól/l nátrium-foszfát, pH 7,2

1-30 mg/ml mono-PEG-ezett NK4

50 mmól/l nátrium-klorid

3 % mannit

10 mmól/l nátrium-foszfát, pH 7,2

1-30 mg/ml mono-PEG-ezett NK4

50 mmól/l nátrium-klorid

3% mannit

0,01% Tween 80, vagy Tween 20 vagy Pluronic 68

10 mmól/l nátrium-foszfát, pH 7,2

A készítményeket úgy állítjuk elő, hogy a mono-PEG-ezett NK4-et dializáljuk az előzőekben említett pufferoldattal (mannittal vagy anélkül) szemben. A fehérje koncentrációt koncentrálással vagy pufferoldattal történő hígítással állítjuk be. Detergenst és nátrium-kloridot adunk egy 10 %-os törzsoldatból.

9. példa

NK4, 30 kDa-os mono-PEG-NK4 és 40 kDa-os mono-PEG-NK4 farmakokinetikai elemzése.

Felnőtt egerek (csoportonként 4) kapják az anyagok egyedi intravénás vagy szubkután injekcióját (4 mg/kg 0,25 ml injekció térfogatban). Számos időpontban vémintákat veszünk és ELISA-val elemezzük NK4, 30 kDa-mono-PEG NK4 vagy 40 kDa-mono-PEG-NK4 tartalomra. Az idő-koncentráció görbéket kiszámítjuk és a 4. ábrában bemutatjuk. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a 30 kDa-mono-PEG-NK4 és 40 kDa-mono-PEG NK4 jelentősen javult stabilitással bír in vivo, amely jelentősen megnövekedett plazma félérettartamokat jelent a nem módosított NK4-hez viszonyítva.

A továbbiakban közös listában foglaljuk össze a leírásban már említett irodalmi hivatkozásokat.

- Albini A. és munkatársai: *Cancer Res.* 47, 3239-3245 (1987)
- Alves F. és munkatársai: *Pancreas* 23, 227-235 (2001)
- Bailon P.: *Bioconjugate Chem.* 12, 195-202 (2001)
- Date K. és munkatársai: *FEBS Letters* 420, 1-6 (1997)
- Date K. és munkatársai: *Oncogene* 17, 3045-3054 (1989)
- EP 0 442 724 számú európai szabadalmi irat
- EP-A 0 473 084 számú európai szabadalmi irat
- Francis G. E. és munkatársai: *Int. J. Hematol.* 68, 1-18 (1998)
- Gaertner H. F., and Offord, R. E., *Bioconjugate Chem.* 7, 38-44 (1996)
- Grasetti D.R. és Murray, J. F., *J. Appl. Biochem. Biotechnol.* 119, 41-49 (1967)
- Heinzerling L., és munkatársai: *Dermatol.* 201, 154-157 (2000)
- Hermanson G. T. és munkatársai: *Bioconjugate Techniques*; kiadó: Academic Press, San Diego, Amerikai Egyesült Államok 147-148. oldal (1996)
- Kuba, K. és munkatársai: *Cancer Res.* 60, 6737-6743 (2000)
- Maiti P.K. és munkatársai: *Int. J. Cancer Suppl.* 3, 17-22 (1988)
- March J.: *Advanced Organic Chemistry* 375-376 (1977)
- Mehvar R.: *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (1), 125-136 (2000)
- Miyazawa K. és munkatársai: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 163, 967-973 (1989)
- Monfardini C. és munkatársai: *Bioconjugate Chem.* 6, 62-69 (1995)
- Morpurgo M. és munkatársai: *Bioconj. Chem* 7, 363-368 (1996)
- Nakamura T. és munkatársai: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 22, 1450-1459 (1984)
- Nakamura T. és munkatársai: *Nature* 342, 440-443 (1989)
- Okajima A. és munkatársai: *Eur. J. Biochem.* 193, 375-381 (1990)

Parr és munkatársai: Int. J. Cancer 85, 563-570 (2000)

Reddy K. R.: Ann. Pharmacotherapy 34, 915-923 (2000)

Remington's Pharmaceutical Sciences, 18. kiadás (1990), kiadó: Mack Publishing Company, szerkesztők: Oslo és munkatársai (például 1435-1712. oldal)

Seki T. és munkatársai: Biochem. and Biophys. Res. Comm. 172, 321-327 (1990)

Stuart K. A. és munkatársai: International Journal of Experimental Pathology 81, 17-30 (2000)

Tashiro K. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3200-3204 (1990)

Tomioka D. és munkatársai: Cancer Res. 61, 7518-7524 (2001)

Tsutsumi Y. és munkatársai: Thromb. Haemost. 77, 168-173 (1997)

Tsutsumi és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8548-8553 (2000)

Tsutsumi Y. és munkatársai: J. Pharmacol. Exp. Ther. 278, 1006-1011 (1996)

Uematsu Y. és munkatársai: J. Pharm. Sciences 88, 131-135 (1999)

5,672,662 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom

5,932,462 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom

5,977,310 lajstromszámú amerikai egyesült államokbeli szabadalom

Weidner K. M. és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7001-7005 (1991)

WO 01/02017 számú PCT közzétételi irat

WO 90/07938 számú PCT közzétételi irat

WO 93/23541 számú PCT közzétételi irat

WO 94/01451 számú PCT közzétételi irat

WO 94/13322 számú PCT közzétételi irat

SZEKVENCIALISTA

<110> F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

<120> HGF-NK4 PEG-KONJUGÁTUMAI

<130> Case 20859

<140>

<141>

<150> 01104640.6

<151> 2001-02-23

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
 <211> 1344
 <212> DNS
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1344)

<400> 1
 caa agg aaa aga aga aat aca att cat gaa ttc aaa aaa tca gca aag 48
 Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys
 1 5 10 15
 act acc cta atc aaa ata gat cca gca ctg aag ata aaa acc aaa aaa 96
 Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys
 20 25 30
 gtg aat act gca gac caa tgt gct aat aga tgt act agg aat aaa gga 144
 Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly
 35 40 45
 ctt cca ttc act tgc aag gct ttt gtt ttt gat aaa gca aga aaa caa 192
 Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln
 50 55 60
 tgc ctc tgg ttc ccc ttc aat agc atg tca agt gga gtg aaa aaa gaa 240
 Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu
 65 70 75 80

ttt ggc cat gaa ttt gac ctc tat gaa aac aaa gac tac att aga aac	288
Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn	
85 90 95	
tgc atc att ggt aaa gga cgc agc tac aag gga aca gta tct atc act	336
Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr	
100 105 110	
aag agt ggc atc aaa tgt cag ccc tgg agt tcc atg ata cca cac gaa	384
Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu	
115 120 125	
-cac agc ttt ttg cct tcg agc tat cgg ggt aaa gac cta cag gaa aac	432
His Ser Phe Leu Pro Ser Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn	
130 135 140	
tac tgt cga aat cct cga ggg gaa gaa ggg gga ccc tgg tgt ttc aca	480
Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr	
145 150 155 160	
agc aat cca gag gta cgc tac gaa gtc tgt gac att cct cag tgt tca	528
Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser	
165 170 175	
gaa gtt gaa tgc atg acc tgc aat ggg gag agt tat cga ggt ctc atg	576
Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met	
180 185 190	
gat cat aca gaa tca ggc aag att tgt cag cgc tgg gat cat cag aca	624
Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr	
195 200 205	

cca	cac	cgg	cac	aaa	ttc	ttg	cct	gaa	aga	tat	ccc	gac	aag	ggc	ttt	672
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe	
210						215					220					
gat	gat	aat	tat	tgc	cgc	aat	ccc	gat	ggc	cag	ccg	agg	cca	tgg	tgc	720
Asp	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	
225					230				235						240	
tat	act	ctt	gac	cct	cac	acc	cgc	tgg	gag	tac	tgt	gca	att	aaa	aca	768
Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr	
				245					250					255		
tgc	gct	gac	aat	act	atg	aat	gac	act	gat	gtt	cct	ttg	gaa	aca	act	816
Cys	Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr	
			260					265					270			
gaa	tgc	atc	caa	ggt	caa	gga	gaa	ggc	tac	agg	ggc	act	gtc	aat	acc	864
Glu	Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr	
		275					280					285				
att	tgg	aat	gga	att	cca	tgt	cag	cgt	tgg	gat	tct	cag	tat	cct	cac	912
Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His	
	290					295					300					
gag	cat	gac	atg	act	cct	gaa	aat	ttc	aag	tgc	aag	gac	cta	cga	gaa	960
Glu	His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu	
305					310					315					320	
aat	tac	tgc	cga	aat	cca	gat	ggg	tct	gaa	tca	ccc	tgg	tgt	ttt	acc	1008
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	
				325					330					335		

act gat cca aac atc cga gtt ggc tac tgc tcc caa att cca aac tgt 1056
 Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys
 340 345 350

gat atg tca cat gga caa gat tgt tat cgt ggg aat ggc aaa aat tat 1104
 Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr
 355 360 365

atg ggc aac tta tcc caa aca aga tct gga cta aca tgt tca atg tgg 1152
 Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp
 370 375 380

gac aag aac atg gaa gac tta cat cgt cat atc ttc tgg gaa cca gat 1200
 Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp
 385 390 395 400

gca agt aag ctg aat gag aat tac tgc cga aat cca gat gat gat gct 1248
 Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala
 405 410 415

cat gga ccc tgg tgc tac acg gga aat cca ctc att cct tgg gat tat 1296
 His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr
 420 425 430

tgc cct att tct cgt tgt gaa ggt gat acc aca cct aca ata gtc taa 1344
 Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val
 435 440 445

<210> 2
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Gln	Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys
1				5					10					15	
Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys
		20						25					30		
Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly
	35						40					45			
Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln
	50					55					60				
Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu
	65				70					75					80
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn
				85					90					95	
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr
			100					105					110		
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu
		115					120					125			
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn
	130					135					140				
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
145					150					155					160
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser
				165					170				175		
Glu	Val	Glu	Cys	Met	Thr	Cys	Asn	Gly	Glu	Ser	Tyr	Arg	Gly	Leu	Met
			180					185					190		

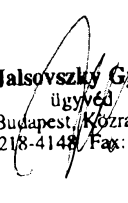
Asp	His	Thr	Glu	Ser	Gly	Lys	Ile	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	His	Gln	Thr
		195					200					205			
Pro	His	Arg	His	Lys	Phe	Leu	Pro	Glu	Arg	Tyr	Pro	Asp	Lys	Gly	Phe
	210					215					220				
Asp	Asp	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Gln	Pro	Arg	Pro	Trp	Cys
225					230					235					240
Tyr	Thr	Leu	Asp	Pro	His	Thr	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Ala	Ile	Lys	Thr
			245						250					255	
Cys	Ala	Asp	Asn	Thr	Met	Asn	Asp	Thr	Asp	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Thr
		260						265					270		
Glu	Cys	Ile	Gln	Gly	Gln	Gly	Glu	Gly	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Asn	Thr
	275						280					285			
Ile	Trp	Asn	Gly	Ile	Pro	Cys	Gln	Arg	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Pro	His
	290					295					300				
Glu	His	Asp	Met	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Lys	Cys	Lys	Asp	Leu	Arg	Glu
305					310					315					320
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu	Ser	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
				325					330					335	
Thr	Asp	Pro	Asn	Ile	Arg	Val	Gly	Tyr	Cys	Ser	Gln	Ile	Pro	Asn	Cys
		340						345					350		
Asp	Met	Ser	His	Gly	Gln	Asp	Cys	Tyr	Arg	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr
	355						360					365			
Met	Gly	Asn	Leu	Ser	Gln	Thr	Arg	Ser	Gly	Leu	Thr	Cys	Ser	Met	Trp
	370					375					380				
Asp	Lys	Asn	Met	Glu	Asp	Leu	His	Arg	His	Ile	Phe	Trp	Glu	Pro	Asp
385					390					395					400
Ala	Ser	Lys	Leu	Asn	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asp	Asp	Ala
				405					410					415	
His	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Gly	Asn	Pro	Leu	Ile	Pro	Trp	Asp	Tyr
		420						425					430		
Cys	Pro	Ile	Ser	Arg	Cys	Glu	Gly	Asp	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Val	
	435						440						445		

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

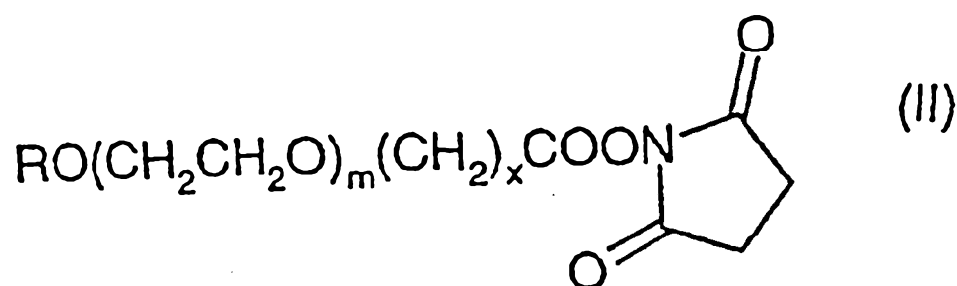
1. Konjugátum, amely áll a hepatocita növekedési faktor (HGF/SF) N-terminális fragmentumából, ahol ez tartalmazza az α -lánc hajtú doménjét és négy hurok (kringle) régióját, és egy mintegy 20 és 40 kDa közti összmolekulatömegű polietilénlikol csoportból.
2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben az említett polietilénlikol csoport a (IV) általános képletű csoporttal bír, és az említett - CO - csoport amid kötést képez a hepatocita növekedési faktor említett N-terminális fragmentuma aminocsoportjainak egyikével, ahol
 - x értéke 2 vagy 3;
 - m értéke mintegy 450 és mintegy 950 között van;
 - R jelentése 1-6 szénatomos alkilcsoport.
3. Az 1. igénypont szerinti konjugátum azzal jellemezve, hogy az említett polietilénlikol csoport az (V) általános képlettel bír, és az említett - CO - csoport amid kötést képez a hepatocita növekedési faktor említett N-terminális fragmentuma aminocsoportjainak egyikével, ahol
 - y értéke 1 és 10 között van
 - n és p értéke együtt mintegy 450 és 950 között van; és
 - R jelentése 1-6 szénatomos alkilcsoport.
4. Az 1-3. igénypontok szerinti konjugátum, amelyben a polietilénlikol csoport molekulatömege mintegy 30 és 40 kDa között van.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum, ahol az említett polietilénlikol csoport(ok) (a) monometoxi-polietilénlikol csoport(ok).

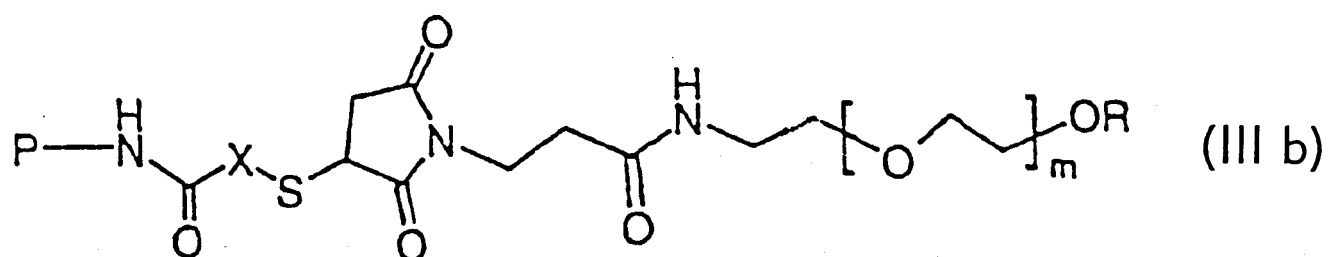
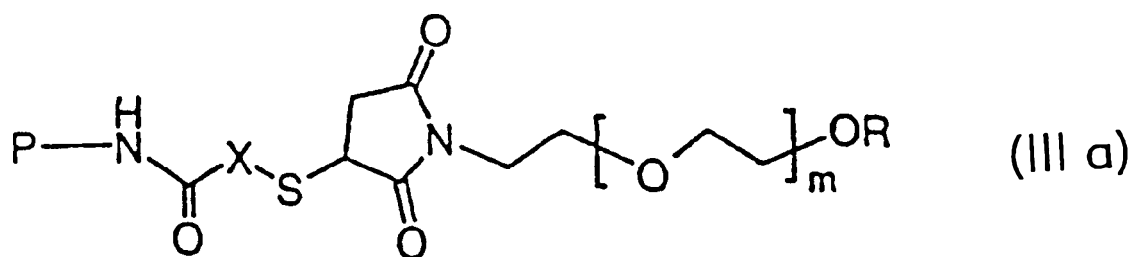
6. Gyógyszerkészítmény, amely valamely 1-5. igénypont szerinti konjugátumot tartalmaz, továbbá egy gyógyszerészetileg elfogadható hordozót.
7. Eljárás a 6. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény előállítására azzal jellemezve, hogy egy 1-5. igénypontok bármelyike szerinti konjugátumot összekeverünk valamely gyógyszerészetileg elfogadható hordozóval.
8. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti konjugátum alkalmazása rák kezelésére alkalmas gyógyszer előállítására.
9. Eljárás rákbetegségek kezelésére azzal jellemezve, hogy a betegnek ilyen kezelés szükségessége esetén beadunk egy 6. igénypont szerinti gyógyszerkészítményt.

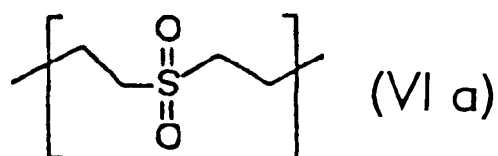
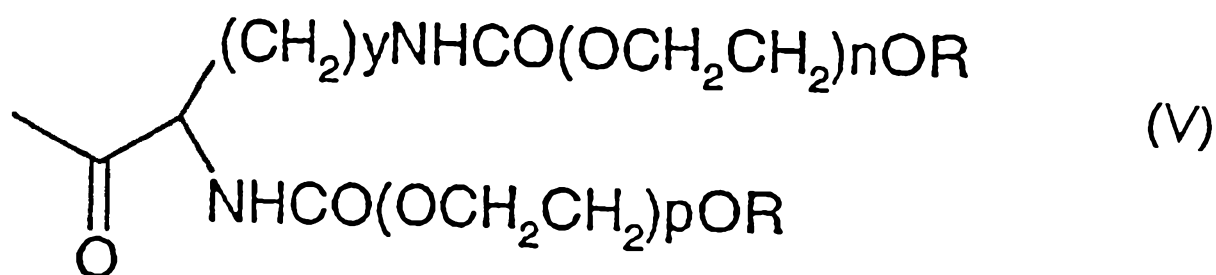
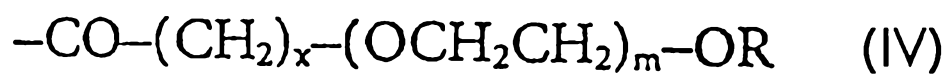
A meghatalmazott:

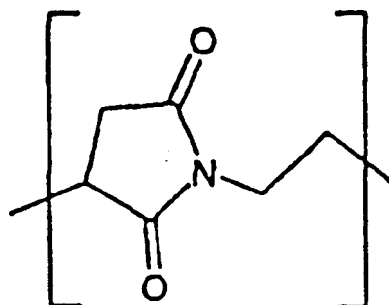

Dr. Jalsovszky Györgyné
ügyvéd
1093 Budapest, Közvartár u. 24.
Tel.: 218-4148 / Fax: 218-4506

42 oldal
12 a b r e
4 old nehezebb
58 oldal
Belet

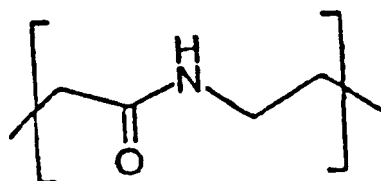




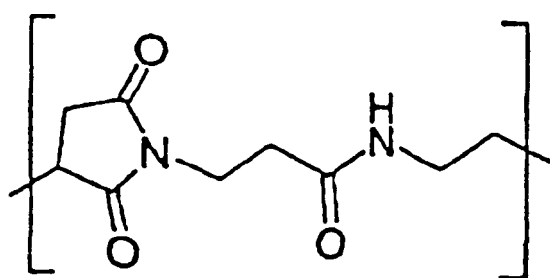




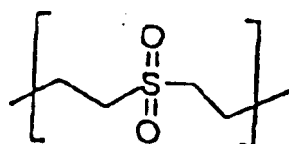
(VI b)



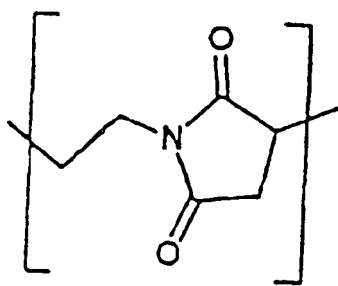
(VI c)



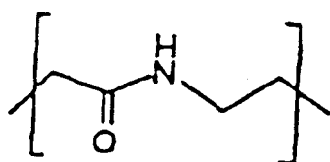
(VI d)



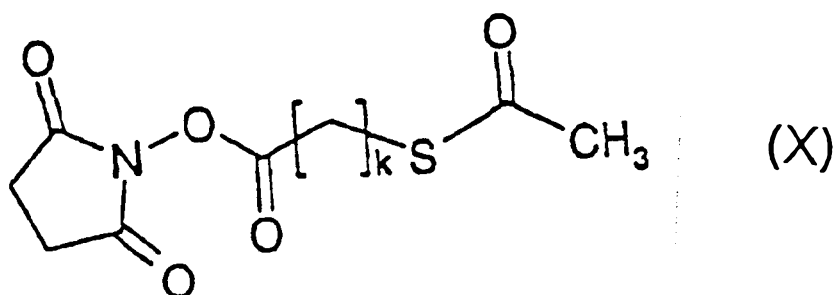
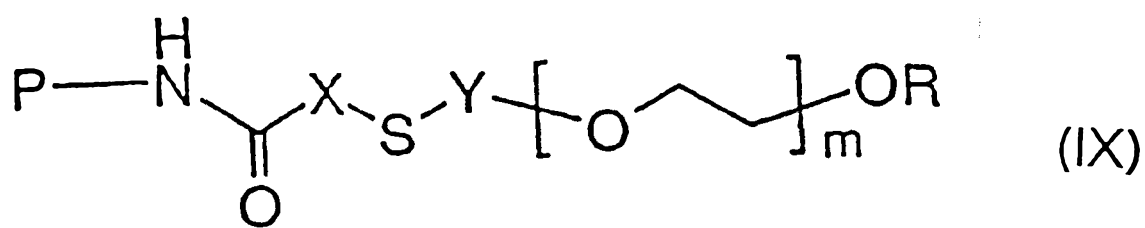
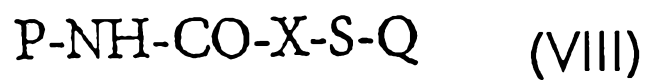
(VII a)

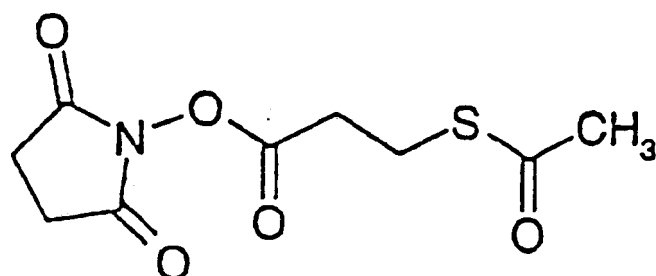


(VII b)



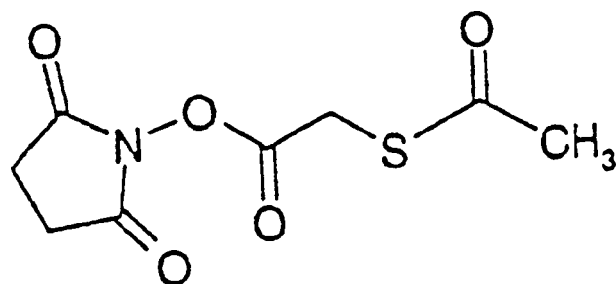
(VII c)





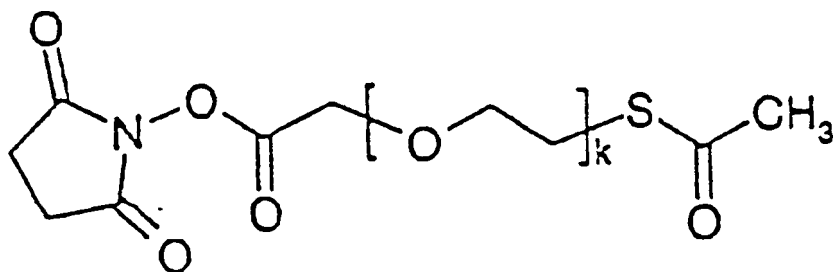
(XI)

SATP

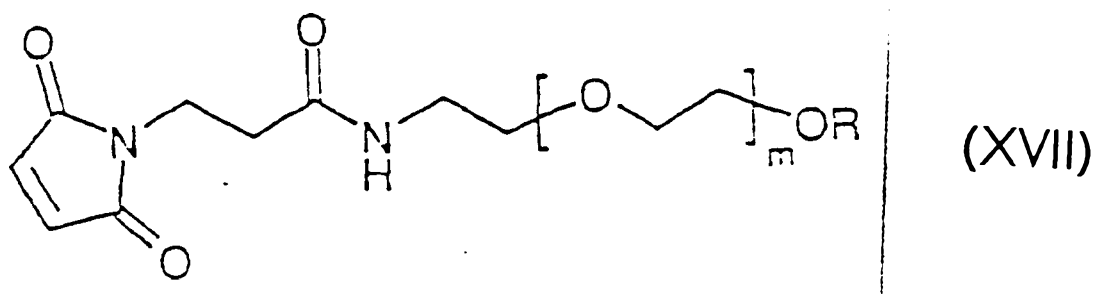
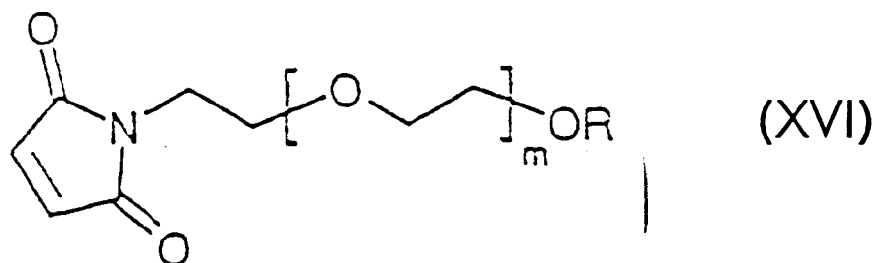
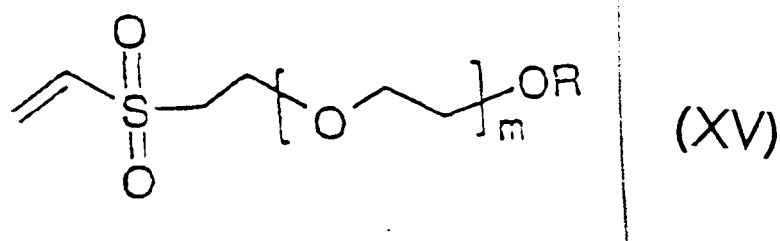
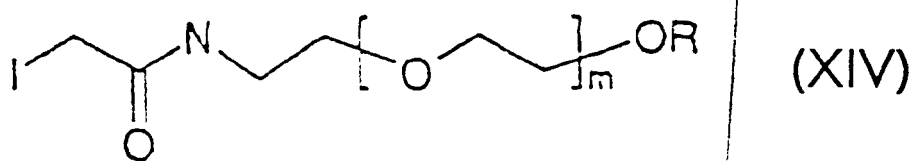


(XII)

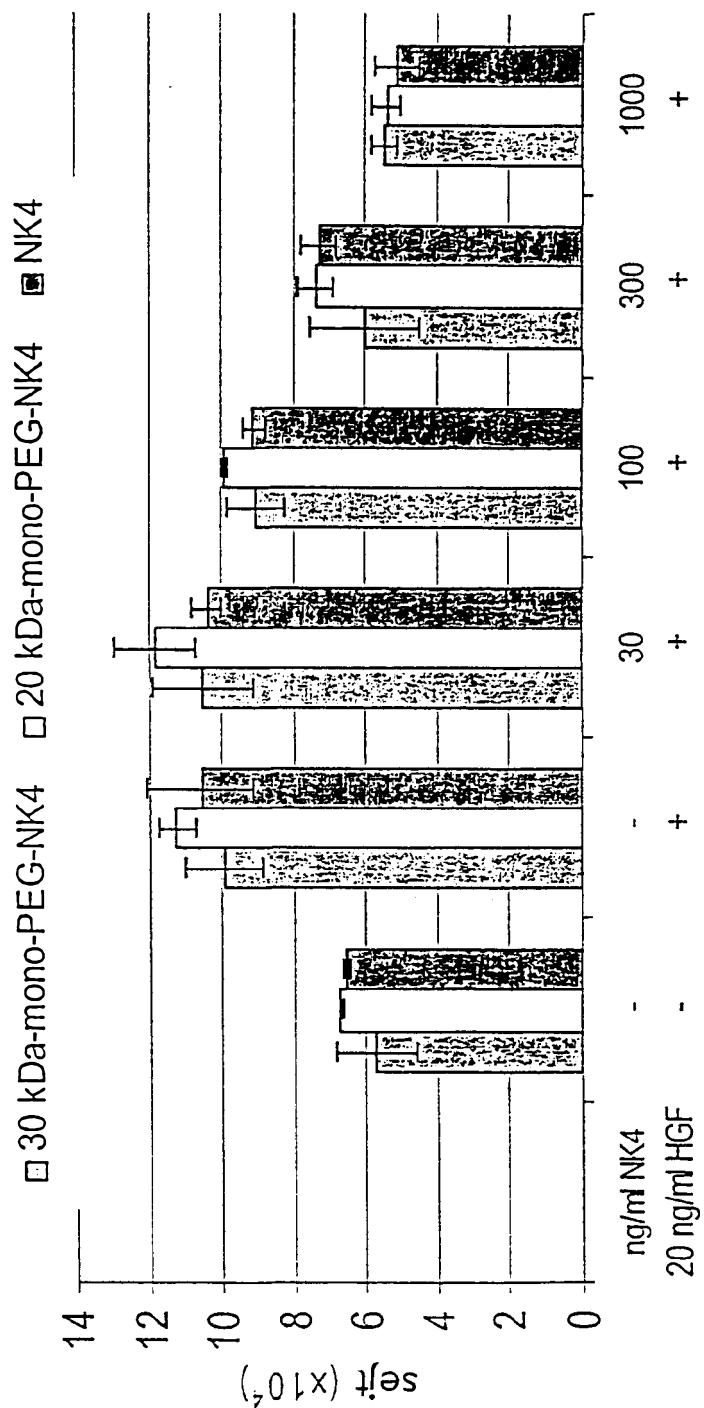
SATA



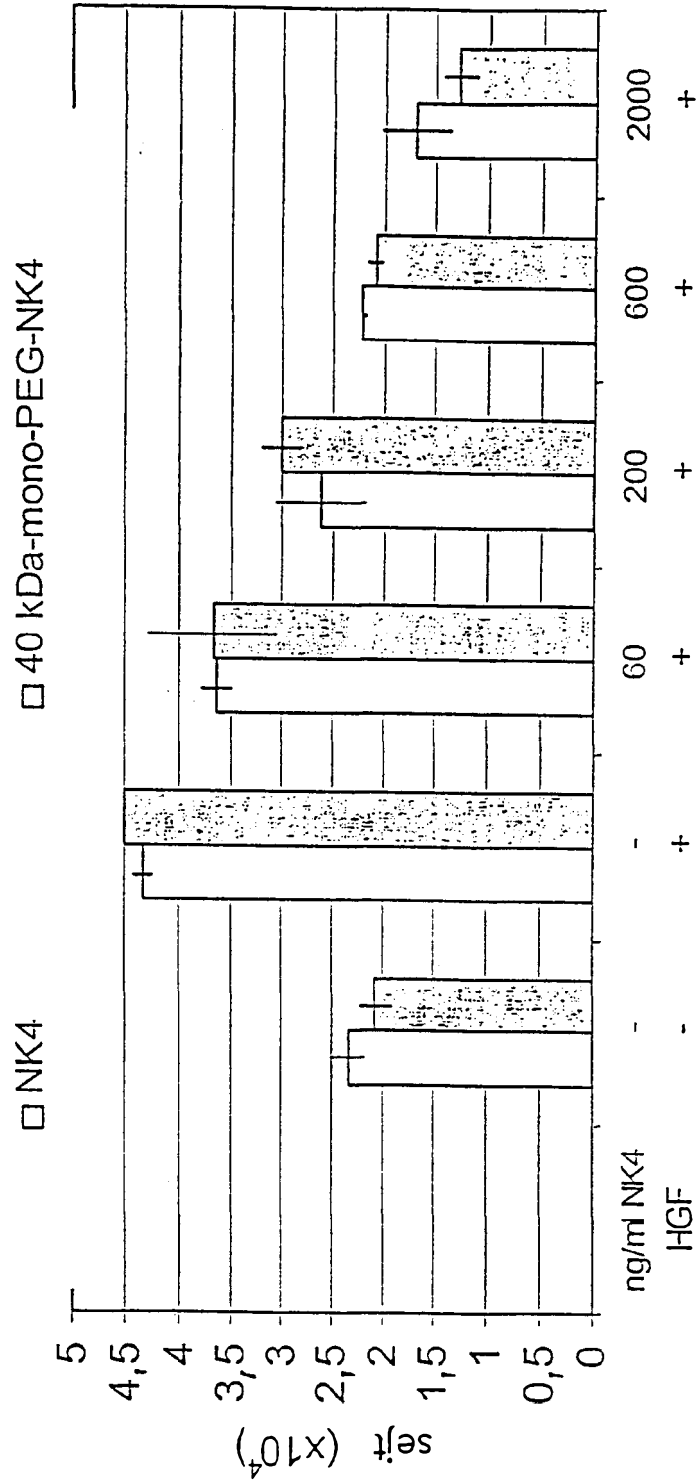
(XIII)



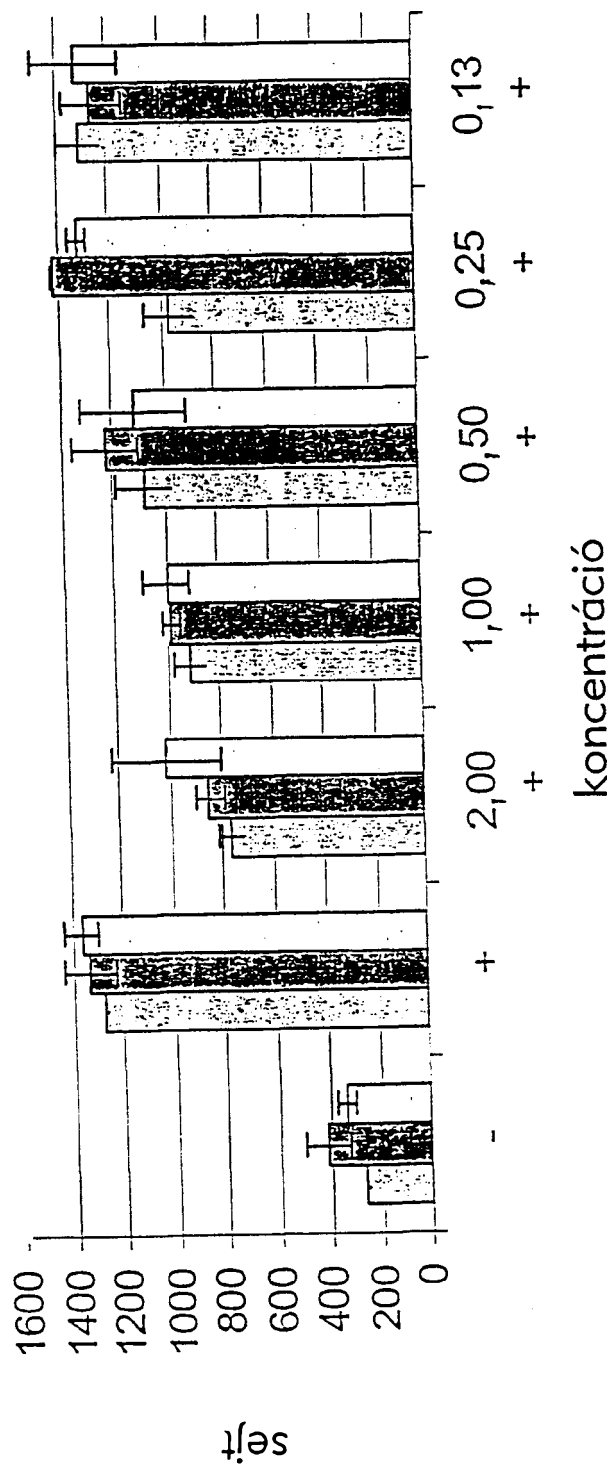
1. ÁBRA



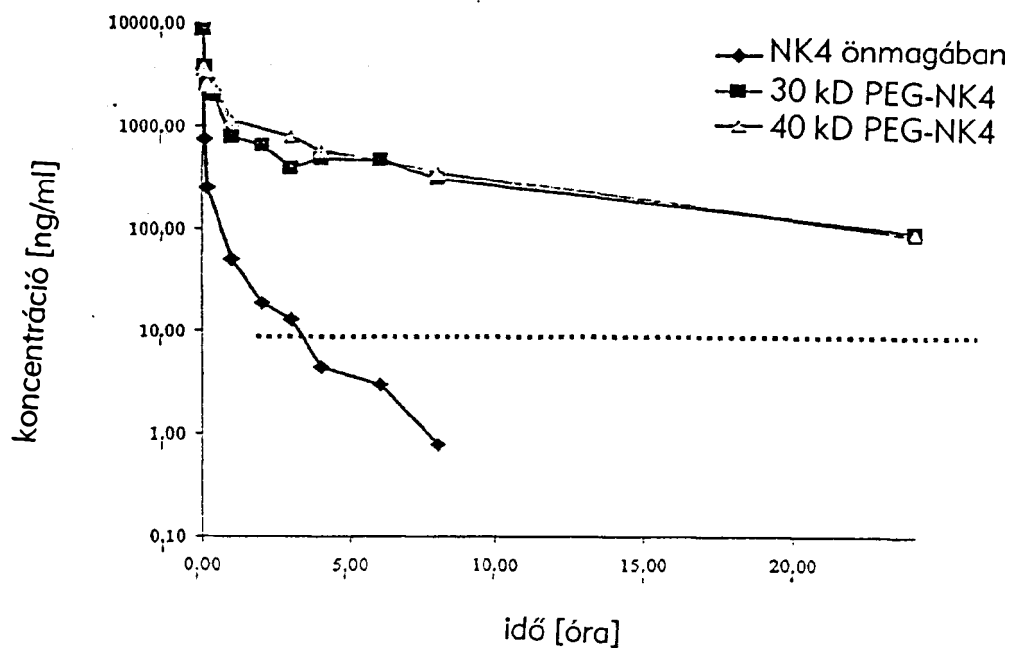
2. ÁBRA



3. ÁBRA



4A. ÁBRA



4B. ÁBRA

