



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 07 257 T2 2006.07.27**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 409 531 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 07 257.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR02/00691**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 706 900.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/068461**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.02.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **06.09.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.04.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **27.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 14/415 (2006.01)**

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 16/16 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0102631 27.02.2001 FR

(73) Patentinhaber:

**Société de Conseils de Recherches et
d'Applications Scientifiques (S.C.R.A.S.), Paris,
FR**

(74) Vertreter:

Abitz & Partner, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

**FERRANDIS, Eric, F-78470 Saint Remy les
Chevreuse, FR; TENG, Poon, Beng, F-91190
Gif-sur-Yvette, FR; SOHIER, Christine, F-37390
Saint Roch, FR; THURIEAU, Christophe, F-75116
Paris, FR**

(54) Bezeichnung: **HETEROCARPIN, EIN PROTEIN, DAS HUMANES GHRH BINDET**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Protein, das das menschliche GHRH (human Growth Hormone releasing hormone oder menschliches Wachstumshormon freisetzendes Hormon) bindet.

[0002] Das Wachstumshormon ("GH") ist ein Protein mit 191 Aminosäuren, das die Produktion von zahlreichen Wachstumsfaktoren, wie Insulin-Like Growth Factor I (IGF-1) stimuliert und das Wachstum einer großen Anzahl von Geweben (Skelett, Bindegewebe, Muskulatur und innere Organe) auslöst. GH besitzt auch physiologische Wirkungen, indem es die Synthese der Nucleinsäuren, der Proteine und die Lipolyse verstärkt und gleichzeitig die Urinsekretionen verringert (Frohman L. A. & Kineman, R. D., Handbook of Physiology, Hormonal Control of Growth, herausgegeben von Kostyo, J. L. & Goodman, H. M. (Oxford Univ. Press, New York, 1999), S. 189–221).

[0003] Die GH-Synthese wird durch Faktoren mit positiver oder negativer Wirkung reguliert, die vom Hypothalamus sekretiert werden. Der vorherrschende Faktor, der die GH-Produktion steuert, ist das "Growth Hormone Releasing Hormone" (GHRH), ein Peptid mit 44 Aminosäuren beim Menschen.

[0004] GH und GHRH sind an zahlreichen Krankheiten beteiligt. Unter diesen sind insbesondere Krebs (insbesondere Prostata- oder Lungenkrebs), Akromegalie, Retinopathien und diabetische Nephropathien zu nennen; bei diesen Krankheiten ist eine Behandlung mit GHRH-Antagonisten indiziert. Aufgrund der Anzahl von potenziell betroffenen Krankheiten sucht die Industrie weiterhin nach GHRH-Antagonisten.

[0005] WO 95/16707 beschreibt beispielsweise die Verwendung von Derivaten des menschlichen GHRH (growth hormone releasing hormone) als Antagonisten für die Behandlung von Krebs, Retinopathien, Akromegalie oder Nephropathien.

[0006] Die Anmelderin hat ein neues Protein pflanzlichen Ursprungs isoliert, das die Eigenschaft hat, das menschliche GHRH zu binden.

[0007] Gegenstand der Erfindung ist zunächst ein isoliertes Protein, das durch Extraktion der Pflanze *Pilocarpus heterophyllus* erhalten werden kann und dadurch gekennzeichnet ist, dass es eine Molmasse von etwa 90,9 kDa besitzt und die Fragmente von Peptidsequenzen SEQ.-ID.-NR. 1, SEQ.-ID.-NR. 2 und SEQ.-ID.-NR. 3 umfasst, wobei dieses Protein in einer glycosylierten oder nicht glycosylierten Form vorliegen kann. Zur Vereinfachung der folgenden Beschreibung wird dieses Protein im Nachstehenden mit "Heterocarpin" bezeichnet.

[0008] Diese Sequenzen SEQ.-ID.-NR. 1, SEQ.-ID.-NR. 2 und SEQ.-ID.-NR. 3 sind die folgenden:

SEQ.-ID.-NR.1:	KLIGARYFDK
SEQ.-ID.-NR.2:	YGEDIIVGVIDSGV
SEQ.-ID.-NR.3:	PESESY

[0009] Die zur Definierung der Peptide im Vorstehenden (sowie in der übrigen vorliegenden Anmeldung) verwendete Nomenklatur ist die von der "IUPAC-IUB-Kommission für biochemische Nomenklatur" spezifizierte Nomenklatur, bei der in Übereinstimmung mit der gebräuchlichen Darstellung die N-terminale Aminosäure (Aminogruppe) links und die C-terminale Aminosäure (Carboxylgruppe) rechts erscheint. Der Begriff "natürliche Aminosäure" gibt eine der in den natürlichen Proteinen angetroffenen L-Aminosäuren an: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp und His.

[0010] Ein Protein wird "isoliert" genannt, wenn es aus seiner ursprünglichen Umgebung herausgenommen wurde. Insbesondere ist ein natürliches Protein isoliert, wenn es vom biologischen Material, mit dem es im natürlichen System koexistiert, getrennt ist.

[0011] Die Erfindung betrifft vorzugsweise Heterocarpin in seiner nicht glycosylierten Form.

[0012] Gemäß einer bevorzugten Abwandlung der Erfindung wird Heterocarpin aus einem Extrakt von in vitro gezüchteten Zellen der Pflanze *Pilocarpus Heterophyllus* erhalten.

[0013] Gegenstand der Erfindung ist ferner auch ein monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-Bindungsfragment desselben, der bzw. das Heterocarpin spezifisch bindet.

[0014] Heterocarpin hat die Eigenschaft, das menschliche GHRH zu binden. In vitro bindet Heterocarpin das menschliche GHRH und inhibiert auf diese Weise die Synthese des cyclischen AMP, das bei der Bindung des menschlichen GHRH an seinem Rezeptor induziert wird. In vivo bei der Ratte bildet sich der Komplex Heterocarpin/menschliches GHRH im Blutkompartiment und inhibiert dosisabhängig die Synthese des GH, das durch 10 µg menschliches GHRH in einem Mol/Mol-Verhältnis induziert wird. Heterocarpin hat die Eigenschaft, das menschliche GHRH zu binden.

[0015] Aufgrund dieser Eigenschaften eignen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen für eine pharmazeutische Verwendung. Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch Heterocarpin in einer glycosylierten oder nicht glycosylierten Form als Medikament. Sie betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, die als Wirkstoff Heterocarpin in einer glycosylierten oder nicht glycosylierten Form enthalten, wobei diese Zusammensetzung auch einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffe umfasst. Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von Heterocarpin in einer glycosylierten oder nicht glycosylierten Form für die Herstellung von Medikamenten, die zur Antagonisierung der Wirkungen von GHRH, zur Behandlung von proliferativen Krankheiten (und insbesondere Krebs), zur Behandlung der Akromegalie oder zur Behandlung von Retinopathien und diabetischen Nephropathien bestimmt sind. Was Krebs betrifft, so ist Heterocarpin für die Herstellung eines Medikaments besonders geeignet, das für die Behandlung von Karzinoid- und Pankreastumoren, hypothalamohypophysären Gangliozytomen, Bronchial-, Darm- und Leberkarzinomen, sympathoadrenergen Karzinomen, Phäochromozytomen, hypophysären Adenomen und Thyroidkarzinomen bestimmt ist.

[0016] Gegenstand der Erfindung ist ferner ein monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-Bindungsfragment desselben, der bzw. das Heterocarpin spezifisch bindet, in Form eines Medikaments. Sie betrifft ferner eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen monoklonalen Antikörper oder ein Antigen-Bindungsfragment desselben umfasst, der bzw. das Heterocarpin spezifisch bindet, wobei diese Zusammensetzung auch einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthält. Außerdem betrifft sie die Verwendung eines monoklonalen Antikörpers oder eines Antigen-Bindungsfragments desselben, der bzw. das Heterocarpin spezifisch bindet, zur Herstellung von Medikamenten, die zur Antagonisierung der Wirkungen von GHRH, zur Behandlung von proliferativen Krankheiten (und insbesondere Krebs), zur Behandlung der Akromegalie oder zur Behandlung von Retinopathien und diabetischen Nephropathien bestimmt sind. Was Krebs betrifft, so ist dieser monoklonale Antikörper oder das Antigen-Bindungsfragment desselben für die Herstellung eines Medikaments besonders geeignet, das für die Behandlung von Karzinoid- und Pankreastumoren, hypothalamohypophysären Gangliozytomen, Bronchial-, Darm- und Leberkarzinomen, sympathoadrenergen Tumoren, Phäochromozytomen, hypophysären Adenomen und Thyroidkarzinomen bestimmt ist.

[0017] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von Heterocarpin als Hilfsstoff in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, der für die lang anhaltende Freisetzung von GHRH bestimmt ist. Sie betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die GHRH, Heterocarpin und einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe umfasst.

[0018] Gegenstand der Erfindung sind schließlich die Verfahren, die die Extraktion und Isolierung von Heterocarpin aus Zellen der Pflanze *Pilocarpus heterophyllus* gestatten, wobei diese Zellen vorzugsweise aus in-vitro-Kulturen stammen. Diese Verfahren umfassen im Wesentlichen einen Schritt der Extraktion der Zellen der Pflanze *Pilocarpus heterophyllus* mit Wasser mit einer Temperatur von 0 bis 50°C und vorzugsweise von 4 bis 25°C, wobei auf den Extraktionsschritt ein Filtrationsschritt zum Trennen des an Heterocarpin reichen Filtrats von den *Pilocarpus heterophyllus*-Zellen und ein oder mehrere Schritte der Trennung des Heterocarpins von den anderen aus der Pflanze *Pilocarpus heterophyllus* extrahierten Bestandteilen folgen.

[0019] Gemäß einer ersten Abwandlung umfassen diese Extraktions- und Isolierungsverfahren im Wesentlichen die folgenden aufeinander folgenden Schritte:

- a) eine Extraktion der Zellen der Pflanze *Pilocarpus heterophyllus* mit Wasser mit einer Temperatur von 0 bis 50°C und vorzugsweise von 4 bis 25°C, wobei auf diesen Extraktionsschritt ein Filtrationsschritt zum Trennen des an Heterocarpin reichen Filtrats von den *Pilocarpus heterophyllus*-Zellen folgt;
- b) eine Fällung der extrahierten Proteine beispielsweise durch Zusatz von Ammoniumsulfat, worauf ein Trennungsschritt des Niederschlags (durch Filtration oder vorzugsweise durch Zentrifugation) folgt;
- c) die Lösung des in Schritt b) gewonnenen Niederschlags in Wasser; und
- d) eine Gelfiltrationschromatographie zum Trennen des Heterocarpins von den anderen Bestandteilen der Lösung.

[0020] Gemäß einer anderen Abwandlung umfassen diese Extraktions- und Isolierungsverfahren im Wesent-

lichen die folgenden aufeinander folgenden Schritte:

- a) eine Extraktion der Zellen der Pflanze *Pilocarpus Heterophyllus* mit Wasser mit einer Temperatur von 0 bis 50°C und vorzugsweise von 4 bis 25°C, wobei auf diesen Extraktionsschritt ein Filtrationsschritt zum Trennen des an Heterocarpin reichen Filtrats von den *Pilocarpus Heterophyllus*-Zellen folgt;
- b) eine Entfettung der in a) erhaltenen Lösung, die durch Zusatz einer nicht oxidierenden Säure (beispielsweise Salzsäure, Schwefelsäure oder Phosphorsäure) auf einen pH von 2 bis 4 angesäuert wird, mit Hilfe einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (vorzugsweise unter Verwendung eines organischen Lösungsmittels, wie Dichlormethan, Heptan, Hexan oder Cyclohexan);
- c) eine Entfernung der Tannine durch In-Kontakt-Bringen der in c) erhaltenen entfetteten. Lösung mit Polyvinylpyrrolidin (oder Nylon 66), worauf eine Filtration über Harz mit großen Poren folgt (vorzugsweise ein solches Harz auf Polystyrolbasis wie das Harz Diaion® HP-20);
- d) Übergang auf ein alkalisches pH (vorzugsweise zwischen pH 9 und 11) des nach dem Schritt c) erhaltenen Filtrats durch Zusatz einer Base wie Ammoniumhydroxid, Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid);
- e) einen oder mehrere Filtrationsschritte über Anionentauscherharz, wobei das Eluierungsmittel bei diesem oder diesen Filtrationsschritten vorzugsweise eine Pufferlösung mit einem pH zwischen 9 und 11 ist, die gegebenenfalls Konzentrationsgradienten eines Salzes (wie beispielsweise Natriumchlorid oder Ammoniumsulfat) enthält, um das Heterocarpin von den anderen Bestandteilen der Lösung zu trennen; und
- f) einen Entsalzungsschritt, der darin besteht, dass die in Schritt e) erhaltene Lösung über ein Harz geleitet wird, das die Bestandteile einer Mischung in Abhängigkeit von ihrer Molmasse trennt (wie das Harz Sephadex® G25 oder Superdex® 200 HR), und diese Mischung auf diesem Harz mit Wasser eluiert wird.

[0021] Die eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können in fester Form vorliegen, wie z.B. in Form von Pulvern, Pillen, Granulat, Tabletten, Liposomen, Gelatine-kapseln oder Suppositorien. Die Pillen, Tabletten oder Gelatine-kapseln können mit einer Substanz bedeckt sein, die die Zusammensetzung gegenüber der Einwirkung der Magensäure oder der Enzyme im Magen des Patienten während eines so langen Zeitraums schützen kann, dass diese Zusammensetzung unverdaut in den Dünndarm des Patienten gelangen kann. Die Verbindung kann auch lokal, beispielsweise direkt an der Stelle eines Tumors verabreicht werden. Die Verbindung kann auch gemäß einem Verfahren der lang anhaltenden Freisetzung verabreicht werden (indem beispielsweise eine Verbindung mit lang anhaltender Freisetzung oder eine Infusionspumpe verwendet wird). Die geeigneten festen Trägerstoffe können beispielsweise Calciumphosphat, Magnesiumstearat, Magnesiumcarbonat, Talk, Zucker, Lactose, Dextrin, Stärke, Gelatine, Cellulose, Methylcellulose, Natriumcarboxymethylcellulose, Polyvinylpyrrolidin und Wachs sein.

[0022] Die eine erfindungsgemäße Verbindung enthaltenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können auch in flüssiger Form vorliegen, beispielsweise in Form von Lösungen, Emulsionen, Suspensionen oder einer Formulierung mit lang anhaltender Freisetzung. Die geeigneten flüssigen Trägerstoffe können beispielsweise Wasser, organische Lösungsmittel, wie Glycerin oder Glycole, wie Polyethylglycol, sowie ihre Mischungen in unterschiedlichen Verhältnissen in Wasser sein.

[0023] Die Verabreichung eines erfindungsgemäßen Medikaments kann auf topischem, oralem, parenteralem weg, durch intramuskuläre Injektion usw. stattfinden.

[0024] Die Dosis einer erfindungsgemäßen Verbindung, die für die Behandlung der oben angeführten Krankheiten oder Störungen vorzusehen ist, variiert je nach der Verabreichungsart, dem Alter und Körpergewicht des zu behandelnden Patienten sowie dessen Zustand und wird von dem behandelnden Arzt oder Veterinär endgültig entschieden. Eine solche durch den behandelnden Arzt oder Veterinär bestimmte Menge wird im vorliegenden Text "therapeutisch wirksame Menge" genannt.

[0025] Erfindungsgemäß kann man Heterocarpin mit Hilfe des im Nachstehenden beschriebenen Verfahrens herstellen.

Herstellung von Heterocarpin

[0026] Gemäß einer bevorzugten Variante der Erfindung wurden in vitro-Kulturen von Kallus oder von Zell-suspensionen aus verschiedenen Organen der Pflanze durchgeführt. Diese auf halbfestem oder flüssigem Me-dium kultivierten Gewebe haben die Fähigkeit zur Biosynthese von Verbindungen mit biologischen Eigenschaften.

[0027] Unter "Kallus" ist in der vorliegenden Anmeldung ein makroskopischer Haufen von undifferenzierten Pflanzenzellen in Kultur auf einem halbfesten Nährmedium zu verstehen. Unter "undifferenzierten Zellen" ver-

steht man in der vorliegenden Anmeldung Zellen, die die Fähigkeit haben, sich unter gewissen Bedingungen in Form eines Kallus oder einer Zellsuspension ohne Auftreten einer Morphogenese zu vervielfältigen. Unter "Zellsuspension" versteht man schließlich undifferenzierte Zellen, die in Kultur in einem flüssigen Nährmedium makroskopische Haufen bilden können.

[0028] Die Wahl des Nährmediums, der Hormone, der Kulturbedingungen sowie die Extraktion und die Analyse des Extrakts aus diesen in vitro-Kulturen sind integrierender Bestandteil der Erfindung.

[0029] Die Zellen von *Pilocarpus Heterophyllus*-Samen können beispielsweise gemäß dem nachstehenden Verfahren in Suspension gezüchtet werden.

[0030] Die Organe werden vor der Zucht nach den herkömmlichen Methoden gereinigt. Organe von in vitro-Keimlingen haben ferner als Ausgangsmaterial für die Kallogenese gedient, ohne eine vorhergehende Desinfizierung zu erfordern. Das bevorzugte Basismedium ist eines der für die in vitro-Kultur gewöhnlich verwendeten Medien: und zwar handelt es sich um Gamborg-Medium (beschrieben in Gamborg u. Mitarb., Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells, Exp. Cell Res. (1968), 50(1), 151–158). Die Kohlenstoffquelle ist Saccharose, Glucose kann aber auch in einer Konzentration von 1 bis 120 g/l, vorzugsweise von etwa 30 g/l, verwendet werden. Man kann auch den Gehalt an Makroelementen um einen Faktor 2 reduzieren. Das Medium wird mit Auxin oder mit einem Auxin und einem Zytokinin versetzt, wobei die Kombination der beiden Hormone, im Allgemeinen 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und Kinetin, bevorzugt wird, wobei jedoch α -Naphthalenessigsäure (ANA), β -Indollessigsäure (AIA), β -Indolbuttersäure (AIB) oder Picloram auch mit Kinetin oder mit Benzylaminopurin (BAP) kombiniert werden können. Die Konzentration kann bei Auxin von 0,1 bis 10 mg/l variieren (oder kann beispielsweise mit 1 mg/l gewählt werden) und bei Zytokinin von 0,01 bis 2 mg/l (oder kann beispielsweise mit 0,06 mg/l gewählt werden). Die Vitamine sind diejenigen, die mit den einzelnen Basismedien kombiniert sind. Die Kulturen werden bei Licht oder in der Dunkelheit durchgeführt. Die Temperatur kann von 10°C bis 33°C variieren, beträgt vorzugsweise jedoch etwa 23°C. Der pH-Wert des Mediums liegt zwischen 4 und 6,5 und wird vor der Sterilisierung vorzugsweise auf 5,8 eingestellt. Das Medium kann im Übrigen mit Agar versetzt sein oder nicht.

[0031] Die Primärkalli erschienen nach einigen Tagen Kultur und können nach etwa einem Monat von dem Ursprungsimplantat getrennt, entnommen und umgesetzt werden und dann auf halbfestem Gelosemedium (in Gläsern oder Petrischalen) mit Passagen von 4 bis 8 Wochen, vorzugsweise 6 Wochen, kultiviert werden. Auf diese Weise kann man einen Kallus über Jahre durch aufeinanderfolgende Umsetzungen auf neue Medien konservieren. Man kann den Kallus auch in ein gerührtes flüssiges Kulturmedium (Erlenmeyer-Kolben oder Bioreaktor) umsetzen, und zwar mit Umsetzungen von 2 bis 6 Wochen und vorzugsweise 3 Wochen.

[0032] Die erhaltenen Stämme zeichnen sich durch den genetischen Ursprung, die Kulturbedingungen, das Aussehen und das Fehlen von Morphogenese aus.

[0033] Die lyophilisierten *Pilocarpus Heterophyllus*-Zellen werden mit Wasser mit einer Temperatur von 0 bis 50°C und vorzugsweise von 4 bis 25°C extrahiert. Der auf diese Weise erhaltene Extrakt wird lyophilisiert, bevor er wieder in einer geeigneten Konzentration (beispielsweise etwa 30% Trockenmasse) gelöst wird. Die Proteine, die durch Zusatz einer konzentrierten Ammoniumsulfatlösung (beispielsweise mit einer Konzentration, die 70 bis 90% der Sättigungskonzentration darstellt) ausgefällt wurden, werden in einem Minimum an Wasser gelöst und die unlöslichen Stoffe werden durch Zentrifugieren gewonnen. Die Proteine werden dann durch Säulenchromatographie abgetrennt (wobei das Eluierungsmittel vorzugsweise Wasser ist) und das Heterocarpin (das durch seine Molmasse von etwa 90,9 kDa identifizierbar ist) kann nun gewonnen werden.

Herstellung von spezifisch Heterocarpin bindenden Antikörpern

[0034] Die vorliegende Erfindung liefert Bindungsmittel, wie Antikörper, die Heterocarpin spezifisch binden. Ein solches Mittel wird "spezifisch bindend" gegenüber einem Protein genannt, wenn es auf einem (beispielsweise durch einen ELISA-Test) erfassbaren Niveau mit diesem Protein reagiert und mit anderen Proteinen nicht erfassbar reagiert. Die "Bindung" bezieht sich auf eine nicht kovalente Assoziation zwischen 2 getrennten Molekülen, so dass sich ein Komplex bildet. Die Bindungsfähigkeit kann beispielsweise durch Bestimmung der Bindungskonstante für die Bildung des Komplexes gemessen werden. Die Bindungskonstante ist der Wert, den man erhält, wenn der Wert der Konzentration des Komplexes durch das Produkt der Werte der Konzentrationen der nicht komplexierten Bestandteilen geteilt wird. 2 Produkte werden "gebunden" genannt, wenn die Bindungskonstante 103 l/mol erreicht. Die Bindungskonstante kann mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden bestimmt werden.

[0035] Jeder beliebige Stoff, der in der Lage ist, diese Kriterien zu erfüllen, kann als ein Bindungsmittel betrachtet werden.

[0036] In der vorliegenden Erfindung ist ein Bindungsmittel vorzugsweise ein Antikörper oder ein Fragment desselben. Antikörper können mit Hilfe von jeder beliebigen, dem Fachmann zur Verfügung stehenden Technik hergestellt werden (vgl. Harlow und Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Im Allgemeinen können Antikörper mit Hilfe von Zellkulturtechniken hergestellt werden, die die Erzeugung von monoklonalen Antikörpern einschließen, oder über Transfektionen von Antikörpergenen in Gastzellen von Bakterien oder Säugetieren, um rekombinante Antikörper herzustellen.

[0037] Unter anderen Techniken wird die Verwendung der im Nachstehenden beschriebenen Techniken bevorzugt. Ein Heterocarpin enthaltendes Immunogen wird einer Gruppe von Säugetieren injiziert (beispielsweise Mäuse, Ratten, Hasen, Schafe oder Ziegen). In diesem Schritt kann das Heterocarpin ohne Modifikation als Immunogen dienen. Alternativ hierzu kann eine stärkere Immunantwort induziert werden, wenn das Heterocarpin einem Transportprotein wie Rinderserumalbumin oder Hämocyanin der Napfschnecke beigegeben wird. Das Immunogen wird dem Gasttier vorzugsweise gemäß einem vorbestimmten Schema injiziert und den Tieren wird periodisch Blut abgenommen. Spezifische polyklonale Antikörper des Heterocarpins können auf diese Weise aus solchen Antiseren beispielsweise durch Affinitätschromatographie gereinigt werden, indem ein mit einem geeigneten festen Träger gekoppeltes Heterocarpin verwendet wird.

Zur Freisetzung von GHRH bestimmte pharmazeutische Zusammensetzungen:

[0038] Diese Zusammensetzungen können insbesondere aus Heterocarpin und GHRH gemäß Methoden hergestellt werden, die in der Zeitschrift von De Wolf und Brett, *Pharmacological Reviews* (2000), 52, 207–236, und den darin genannten Quellen beschrieben werden.

[0039] Sofern sie nicht anders definiert werden, haben alle technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hier verwendet werden, dieselbe Bedeutung, wie sie gewöhnlich von einem normalen Fachmann des Bereichs, zu dem die Erfindung gehört, verstanden wird. Ebenso gelten alle Veröffentlichungen, Patentanmeldungen, alle Patente und alle anderen hier erwähnten Schriften in dem vorliegenden Text als durch Bezug aufgenommen.

[0040] Die folgenden Beispiele dienen zur Veranschaulichung der vorstehenden Verfahren und dürfen auf keinen Fall als eine Begrenzung der Reichweite der Erfindung betrachtet werden.

HERSTELLUNG VON HETEROCARPIN

Beispiel 1:

Kultur von Zellen in vitro:

[0041] Ein *Pilocarpus heterophyllus*-Samen wird zum Keimen gebracht, und der aus dieser Keimung hervorgehende Stengel wird entnommen. Dieser Stengel wird in ein Gamborg-Medium (Gamborg u. Mitarb., *Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells*, *Exp. Cell Res.* (1968), 50(1), (151–158)) gegeben, das mit 30 g/l Saccharose, 1 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure und 0,06 mg/l Kinetin versetzt ist. Die Kultur wird in Gläsern bei einer Temperatur von 23°C und in der Dunkelheit durchgeführt. Alle 6 Wochen werden Umsetzungen unter gebräuchlichen Bedingungen genommen. Die körnig aussehenden Stämme haben eine beige Pigmentierung.

[0042] Über 8 Wochen wurde eine Wachstumskinetik der Stämme erstellt, die auf der Zunahme der Frisch- und Trockenmasse der Biomasse beruht. Die Kalli von 2 Gläsern werden vereinigt und bilden eine halbwochentliche Ernte, wobei die erste Ernte zum Zeitpunkt 0 stattfindet. Kalli und Gelose werden dann geerntet und lyophilisiert. Man stellt fest, dass das Wachstum bis zu 6 Wochen Kultur exponentiell ist, bevor eine stationäre Wachstumsphase eintritt.

Extraktion der Zellkulturen:

[0043] 25 g lyophilisierte *Pilocarpus heterophyllus*-Zellen werden 2 mal durch Eintauchen in 375 ml Wasser mit 4°C extrahiert und über Nacht bei 4°C belassen, und dann in 250 ml Wasser mit 4°C während 4 Stunden, und werden schließlich mit 125 ml Wasser mit 4°C gewaschen. Jede auf diese Weise erhaltene wässrige Lö-

sung wird unter Vakuum über ein Glasfilter filtriert, über welchem Celitte angeordnet ist, um die Zellenreste von der wässrigen Lösung zu trennen. Die auf diese Weise kombinierten wässrigen Lösungen werden dann lyophilisiert, um 9,4 g Trockenmasse zu bilden. Der lyophilisierte Trockenextrakt wird dann in 31 ml Wasser mit 20°C gelöst, so dass man eine Lösung erhält, die 30% Trockenextrakt enthält. 17,4 g Ammoniumsulfat werden in kleinen Portionen unter konstantem magnetischem Rühren zugesetzt, um die Proteinfraction auszufällen. Der Proteinniederschlag wird dann durch Zentrifugation mit 3000 rpm während 20 min von der Ammoniumsulfatlösung getrennt. Die Ammoniumsulfatlösung wird dekantiert und die ausgefällten Proteine werden in 22 ml Wasser wieder gelöst, wieder zentrifugiert und filtriert, um die unlöslichen Teilchen zu entfernen.

[0044] Das erhaltene Filtrat wird dann einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen. Es wird in eine Säule (Buchi Nr. 19678, L = 230 mm; Innendurchmesser = 26 mm) injiziert, die mit Superdex™ 200 (Amersham Pharmacia Biotech, Artikelnr. 17-1043-01; Teilchen mit einem mittleren Durchmesser von 13 µm) gefüllt ist und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers unter Verwendung von ultrareinem Wasser (Water's Milli-Q) als Eluierungsmittel mit einem Durchsatz von 5 ml pro Minute präpariert ist. Auf diese Weise werden Fraktionen von 40 ml gesammelt und das aktive Protein wird in der dritten und vierten Fraktion vorgefunden. Diese Fraktionen werden lyophilisiert, um etwa 14,2 mg aktives Produkt zu erhalten.

[0045] Die Reinheit des erhaltenen Produkts wird durch Auftreten einer einzigen Bande auf Natriumdodecylsulfat enthaltendem Elektrophoresegel (SDS PAGE) nachgewiesen. Das dieser Bande entsprechende Produkt wird im Folgenden mit Heterocarpin bezeichnet.

Beispiel 2:

[0046] Zellen, die nach demselben Verfahren, wie es in Beispiel 1 beschrieben wurde, in vitro gezüchtet wurden, werden nach der im Nachstehenden beschriebenen Methode extrahiert.

[0047] 100 g lyophilisierte *Pilocarpus heterophyllus*-Zellen werden mit Hilfe von 2 Liter entmineralisiertem Wasser mit 20°C extrahiert, wobei die Mischung während einer Nacht gerührt wird. Die Zellen und der Extrakt werden durch Absaugung auf Sintermaterial (Porosität 3, Durchmesser 20 cm), das mit einem Celittebett (zuvor mit Säure gewaschen; 1 bis 2 cm Dicke) bedeckt ist, filtriert. Die gewonnenen Zellen werden mit 400 ml entmineralisiertem Wasser gewaschen, bevor sie entfernt werden. Das wässrige Filtrat wird dann durch Zusatz von etwa 10 ml 18%-iger Salzsäure auf pH 3,0 angesäuert. Die angesäuerte Lösung wird durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hilfe von 400 ml Dichlormethan entfettet. Die Dichlormethanphase wird dekantiert und dann entfernt. Die entfettete Lösung wird einer Rotationsverdampfung unterzogen, um das restliche Dichlormethan zu entfernen. Etwa 30 g Polyvinylpyrrolidon werden dann der entfetteten Lösung zugesetzt (pH etwa 3,0) und die Mischung wird während etwa 30 Minuten gerührt, um die Tannine zu entfernen. Die Mischung wird einer Bettfiltration durch Absaugung über Sintermaterial (Porosität 3, Durchmesser 10 cm) unterzogen, das mit einem gemischten Bett bedeckt ist, das aus 25 g Celitte (zuvor mit Säure gewaschen) und 25 g Polyvinylpyrrolidon besteht. Das Filtrat wird dann über ein Bett von 400 ml Diaion® HP-20 (Mitsubishi Chemical Company) geleitet, das gemäß den Angaben des Herstellers voraktiviert wurde. Das gebildete Filtrat wird dann durch Zusatz von etwa 60 ml einer 20%-igen Ammoniumhydroxidlösung alkalisch gemacht (pH 10). Nach 30 Minuten Ruhen bildet sich ein leichter Niederschlag. 1 g Celitte (zuvor mit Säure gewaschen) wird der alkalischen Lösung zugesetzt, die dann durch Absaugung über ein Membranfilter (0,22 µm) filtriert wird. Etwa 2 Liter Filtrat werden dann über eine Säule HiPrep® Q XL 16/10 geleitet, die auf einem Reiniger Akta® montiert ist und mit einem Puffer Piperazin/HCl 0,1 M mit einem Durchsatz von 0,5 ml pro Minute voräquilibriert ist (die Säule HiPrep® und der Reiniger Akta® sind beide Produkte der Firma Amersham Biosciences). Die Säule wird dann nacheinander mit 6 Säulenvolumen des Ausgangspuffers mit pH 10,2, mit 5 Säulenvolumen desselben Puffers, der NaCl in einer Konzentration von 0,2 M enthält und mit 10 Säulenvolumen desselben Puffers, der NaCl in einer Konzentration von 1 M enthält, gewaschen. Der größte Teil des Heterocarpins wird in den drei ersten Säulenvolumen von Puffer mit der NaCl-Konzentration 1 M gewonnen. Die aktiven Fraktionen werden durch einen Durchgang durch eine Sephadex® G25-Säule (Volumen des Betts: 260 ml) entsalzt, indem entmineralisiertes Wasser als Eluierungsmittel verwendet wird. Die aktiven Fraktionen, die in dem ersten Säulenvolumen, das dem Todvolumen entspricht, vorgefunden werden, werden dann lyophilisiert, um 170 mg Heterocarpin zu erhalten. Das auf diese Weise erhaltene Heterocarpin ist praktisch auf Gel SDS PAGE einbandig.

CHARAKTERISIERUNG DES HETEROCARPINS

Analyse und Mikrosequenzierung:

[0048] Die Proben werden auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel geladen. Nach Wandern werden die Gele fixiert

und mit Coomassie-Blau gefärbt.

[0049] Die Bahnen des in [Fig. 3](#) dargestellten Gels, die den Bahnen 1, 2, 3, 4 und 5 entsprechen, sind der Molgewicht-Marker (Amersham), 0,5, 1 und 2 μm des Inhalts der gemäß Beispiel 1 erhaltenen endgültigen Heterocarpinfraktion und der Molmasse-Marker (Amersham). Die Bestimmung der Molmasse mit Hilfe einer Standardkurve des Molmasse-Markers unter Verwendung der gebräuchlichen und dem Fachmann bekannten Informatikwerkzeuge (beispielsweise der Software Bio-Profil Bio1D von Viber Lourmat) gestattet nachzuweisen, dass das Heterocarpin eine Molmasse von 90,9 Kilodalton ($\pm 1,6$ Kilodalton) besitzt.

[0050] Für die Analyse durch Protein-Mikrosequenzierung wird die das Protein enthaltende Polyacrylamid-Bande zerschnitten und in 300 μm Verdauungspuffer, der 50 mM Tris (pH 8,6), 0,03% Natriumdodecylsulfat mit 35°C enthält, während 18 Stunden in Gegenwart von 0,4 μg Endolysin-C (Sigma) verdaut. Die erhaltenen Peptide werden durch HPLC auf einer DEAE-C18-Online-Säule von 1 mm Durchmesser getrennt. Der Trennungsgradient beruht auf einer Mischung von Acetonitril (2 bis 70%) und 0,1%-iger Trifluoressigsäure (TFA). Die Sequenzierung wird dann auf einem Sequenzer Procise (Applied Biosystem) ausgeführt. Auf diese Weise wurden drei Peaks sequenziert, die eine eindeutige Charakterisierung des Heterocarpins gestatten. Die entsprechenden Sequenzen sind in der vorliegenden Anmeldung mit SEQ.-ID.-NR. 1, SEQ.-ID.-NR. 2 und SEQ.-ID.-NR. 3 identifiziert.

[0051] Die Analyse der Glycoproteine wird durch Erfassung von Zuckerstrukturen der durch SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Glycoproteine vorgenommen. Dieses Erfassungssystem ist eine Modifizierung der Methoden "Periodic acid-Schiff" und führt zum Auftreten von Magenta-Banden, die die Glycoproteine angeben (Sigma). Man erhält für das gemäß Beispiel 1 erhaltene Heterocarpin das in [Fig. 4](#) wiedergegebene Ergebnis.

PHARMAKOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN VON HETEROCARPIN

Stabile Transfektionen des menschlichen GHRH-Rezeptors (hGHRH-R):

[0052] Die menschlichen Nierenembryonalzellen, HEK-293 (eine von Dr. Stuart Sealfon, Mount Sinai, Medical School, New York, New York, entwickelte Zellenlinie), die den menschlichen GHRH-Rezeptor stabil exprimieren, wurden bei Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Chicago, IL) bezogen.

Zellenkultur und Membranherstellung:

[0053] Die oben beschriebenen Zellen HEK-293, die mit dem menschlichen GHRH-Rezeptor stabil transfektiert wurden, werden in DMEM (Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium, hoher Glucosegehalt; geliefert von Life technologies), das mit 0,4 mg/ml G418 (Life technologies) in Gegenwart von 10% Kalbsfötusserum und 4 mM L-Glutamin (Life technologies) ergänzt wurde, kultiviert. Die Zellen werden in dem Puffer A homogenisiert, der 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2), 2 mM Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bacitracin enthält, und werden dann im selben Puffer A einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die auf diese Weise homogenisierten Zellen werden während 10 Minuten bei 4°C mit 39 000 g zentrifugiert, in den Puffer A gehängt und noch einmal bei 4°C mit 40 000 g während 10 Minuten zentrifugiert. Die Gesamtmembranproteine werden mit Hilfe der Bradford-Technik quantifiziert. Der Membranrückstand wird auf diese Weise für eine spätere Verwendung bei -80°C gelagert.

Test der kompetitiven Bindung an hGHRH-R:

[0054] Die Membranen der mit dem menschlichen GHRH-Rezeptor stabil transfizierten Zellen HEK-293 werden in dem Reaktionspuffer, der 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM MgCl_2 , 2 mM EGTA, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Bacitracin und 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) enthält, auf die Konzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Die Membranen werden während 2 Stunden bei 23°C mit 0,05 nM [^{125}I]GHRH (1-44 Amid) (Amersham) in einem endgültigen Volumen von 200 μl in Gegenwart von steigenden Heterocarpin-Konzentrationen inkubiert. Die Reaktion wird durch eine schnelle Filtration über zu 0,1% mit Polyethylenimin vorgeladenen Filtern mit 96 Vertiefungen GF/C gestoppt. Die Filter werden dann dreimal bei 4°C mit 50 mM Tris enthaltendem Waschpuffer (pH 7,4) unter Verwendung einer Filtrierstation Packard mit 96 Vertiefungen gewaschen. Die auf diese Weise getrockneten Filter werden mit 50 μl Szintillationscocktail (Microscient O, Packard) übergossen und werden einer Zählung auf Topcount (Packard) unterzogen. Die nicht spezifische Aktivität wird in Gegenwart von 100 nM hGHRH bestimmt. Für hGHRH (0,001 nM-100 nM) wird eine Dosis-Wirkungskurve erzeugt und die erhaltenen Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) aufgenommen.

Kompetitive Bildung von cyclischem AMP:

[0055] Die mit dem menschlichen GHRH-Rezeptor stabil transfizierten Zellen HEK-293 werden in Kulturschalen mit 48 Vertiefungen verteilt und während 3 Tagen kultiviert. Das Kulturmedium wird dann abgezogen und durch das Medium B ersetzt, das 250 µl DMEM (Dulbecco-modifiziertes Eagle-Medium, hoher Glucosegehalt; geliefert von Life technologies) in Gegenwart von 0,5% BSA, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) enthält, und dann wird 5 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Nach Ende dieser Vorinkubationszeit wird das Heterocarpin während zusätzlicher 20 Minuten getestet. Die beobachteten Konzentrationen sind in [Fig. 2](#) eingetragen. Die Inkubation wird durch Zusatz von 100 ml HCl 0,1 M gestoppt und die Teilmengen werden hinsichtlich ihres Gehalts an cyclischem AMP unter Verwendung des Kits FlashPlate (New England Nuclear) analysiert.

GH-Dosierung bei Ratten:

[0056] Die GH-Pegel bei Ratten (männlich, Sprague Dawley) werden in Blutentnahmen mit einem von Spi-Bio (Spi-Bio, Frankreich) entwickelten enzymimmunologischen Test gemessen. Die Ratten werden durch intravenöse Injektion von Heterocarpin in steigenden Dosen (Träger allein, 1, 3 und 10 nmol) und dann 10 Minuten danach durch intravenöse Injektion von 10 µg (3 nmol) hGHRH behandelt. 10 Minuten nach der Injektion von hGHRH werden die Pegel des Wachstumshormons in den Blutentnahmen auf die oben beschriebene Weise gemessen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in [Fig. 5](#) dargestellt.

Kurze Beschreibung der Figuren:

[0057] [Fig. 1](#) ist eine Kurve, die die Inhibition der Bindung des menschlichen GHRH an dem menschlichen GHRH-Rezeptor in Abhängigkeit von steigenden Heterocarpinkonzentrationen darstellt.

[0058] [Fig. 2](#) ist eine Kurve, die die Inhibition der Produktion von cyclischem AMP in mit dem menschlichen GHRH-Rezeptor stabil transfizierten Zellen in Gegenwart von 10 nM menschlichem GHRH in Abhängigkeit von steigenden Heterocarpinkonzentrationen zeigt.

[0059] [Fig. 3](#) ist die Wiedergabe einer SDS-PAGE-Proteingelplatte, die das Vorliegen von Heterocarpin mit einem Molgewicht von 90,9 kDa zeigt.

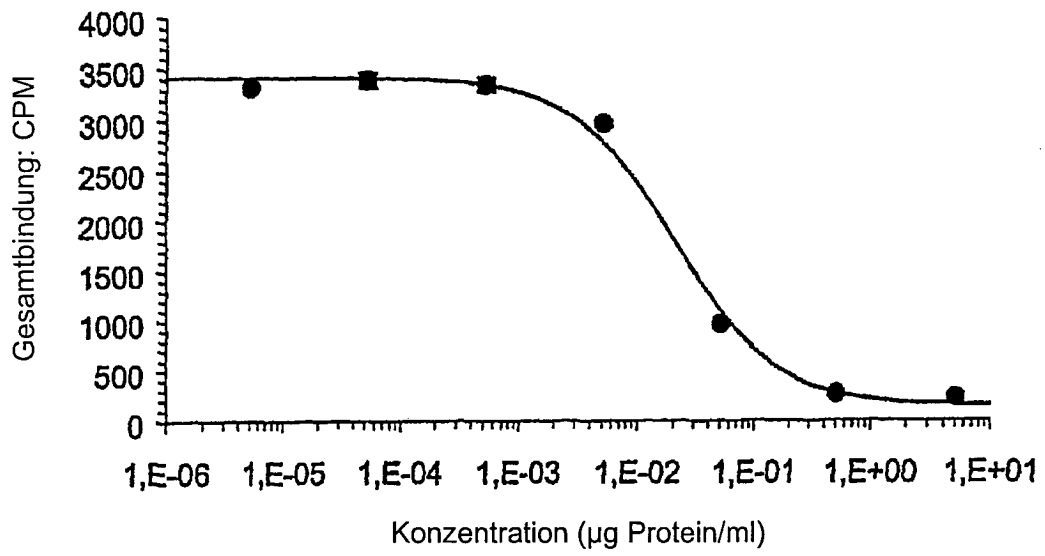
[0060] [Fig. 4](#) ist die Wiedergabe einer SDS-PAGE-Proteingelplatte, die zeigt, dass das Heterocarpin ein Glycoprotein ist (Feld B).

[0061] [Fig. 5](#) ist eine Histogramm-Darstellung, die die Inhibition der GH-Synthese bei der Ratte in Gegenwart von 10 µg menschlichem GHRH in Abhängigkeit von zunehmenden Heterocarpinkonzentrationen zeigt.

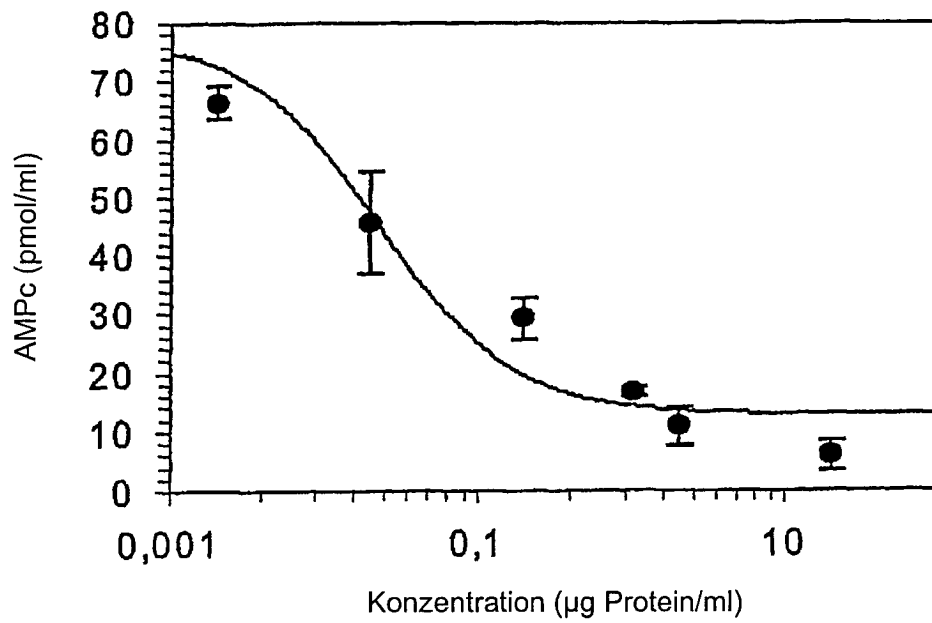
3. Medikament, das ein Protein nach Anspruch 1 oder 2 enthält.
4. Monoklonaler Antikörper, oder ein Antigen-Bindungsfragment desselben, der bzw. das das isolierte Protein des Anspruchs 1 spezifisch bindet.
5. Medikament, das einen monoklonalen Antikörper oder ein Antigen-Bindungsfragment desselben enthält, der bzw. das das isolierte Protein des Anspruchs 1 spezifisch bindet.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff ein Protein nach Anspruch 1 oder 2 sowie einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe enthält.
7. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung eines Medikaments, das dazu bestimmt ist, die Wirkungen des GHRH zu antagonisieren.
8. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 für die Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung einer proliferativen Krankheit, insbesondere von Krebs, bestimmt ist.
9. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 für die Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung der Akromegalie bestimmt ist.
10. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 oder 2 für die Herstellung eines Medikaments, das für die Behandlung von Retinopathien und diabetischen Nephropathien bestimmt ist.
11. Verfahren zur Extraktion und Isolierung des Proteins nach Anspruch 1 aus Zellen der Pflanze *Pilocarpus Heterophyllus*, umfassend einen Schritt der Extraktion der Zellen der Pflanze *Pilocarpus Heterophyllus* mit Wasser mit einer Temperatur von 0 bis 50°C, wobei auf den Extraktionsschritt ein Filtrationsschritt zum Trennen des an Heterocarpin reichen Filtrats von den *Philocarpus Heterophyllus*-Zellen und ein oder mehrere Schritte der Trennung des Heterocarpins von den anderen aus der Pflanze *Pilocarpus Heterophyllus* extrahierten Bestandteilen folgen.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

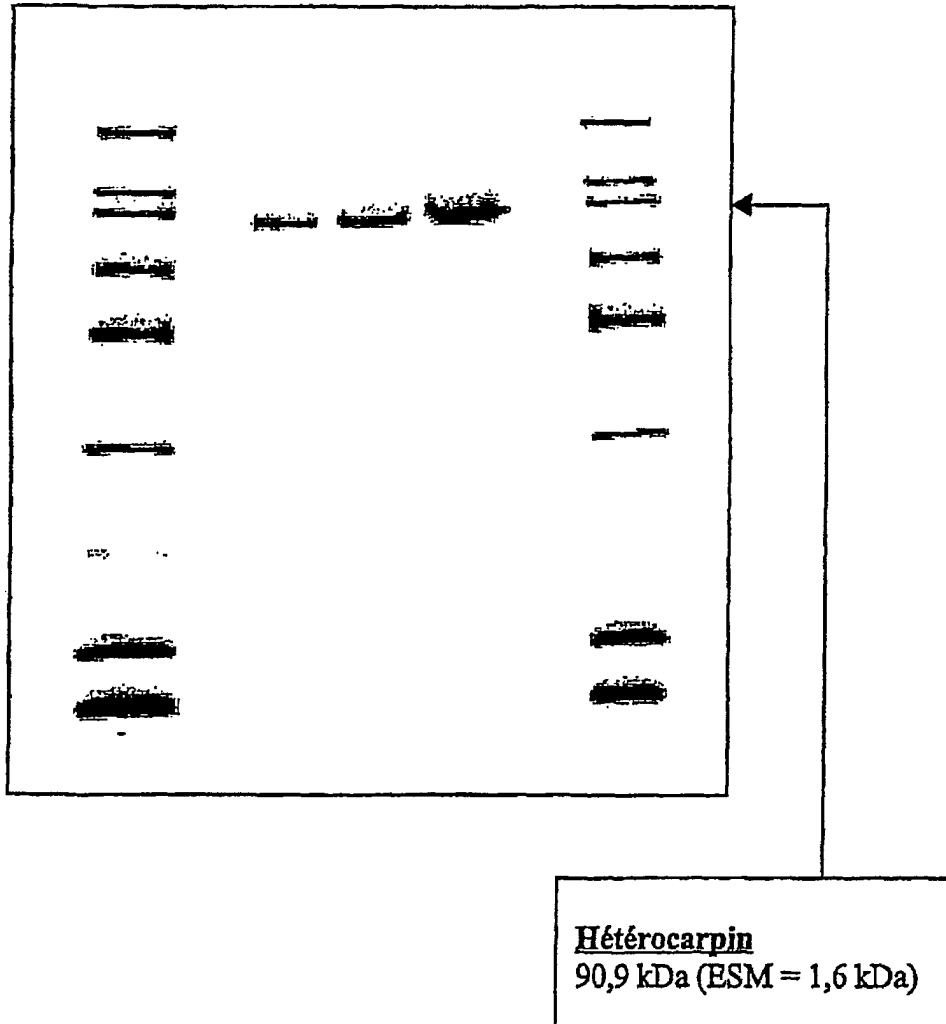
Anhängende Zeichnungen



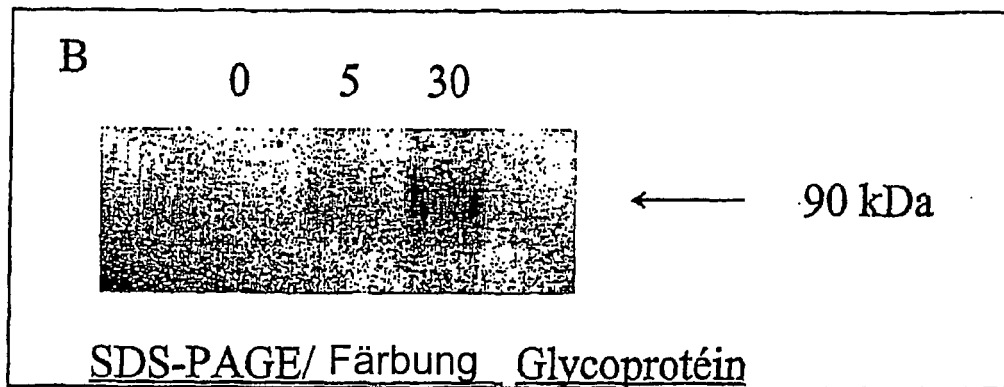
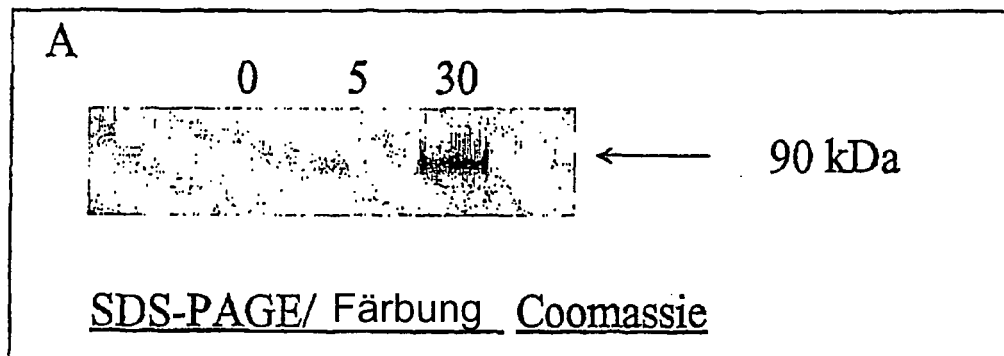
Figur 1



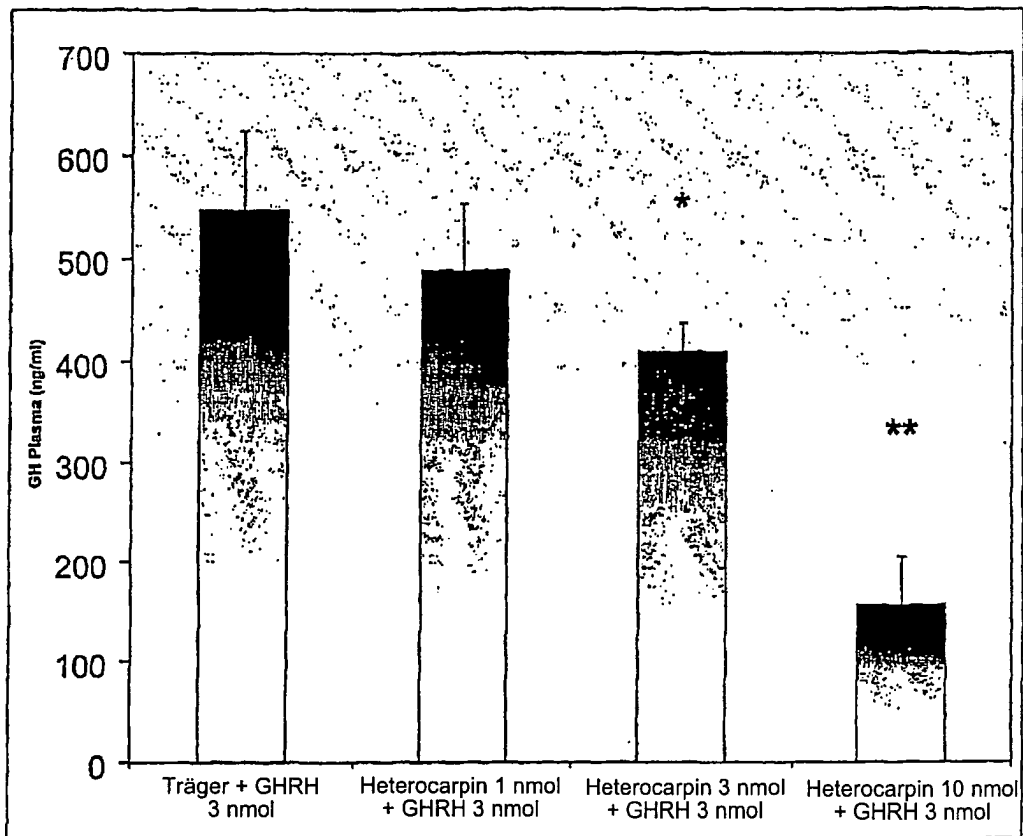
Figur 2



Figur 3



Figur4



Figur 5