

KIVONAT

Amfifil polimerek és ezeket tartalmazó polipeptid konjugátumok

Proteinek és/vagy peptidek, például luminális koleciszto-kinin felszabadító faktor (LCRF), amelyek amfifil oligomerekkel és polimerekkel vannak konjugálva. Az ilyen konjugátumok módosíthatják a proteinek és/vagy peptidek farmakokinetikai profilját, ily módon javítva azok klinikai felhasználhatóságát. Az ilyen konjugátumok stabilizálhatják és eljuttathatják a protei- neket és/vagy peptideket, például az LCRF-et, a belekben lévő receptorokhoz anélkül, hogy abszorbeálódnának a véráramba.

(Jellemző ábra: 2. ábra)

Amfifil polimerek és ezeket tartalmazó polipeptid konjugátumok

A találmány tárgyát általában amfifil oligomerek és polimerek peptidekké történő konjugálására szolgáló új eljárás képezi abból a célból, hogy módosítsa farmakokinetikai profiljukat és ily módon javítsa klinikai hasznosíthatóságukat. A találmány szerinti konjugátumok képesek stabilizálni és a belekben lévő receptorokhoz juttatni a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktort (LCRF) anélkül, hogy az a véráramba felszívódna.

Az endogén LCRF a bél felhámú sejtek luminális felszínén lévő receptorokra hat és azokkal kolecisztoxinint (CCK) szabadíttat fel a véráramba, ez olyan polipeptid hormon, amely a jóllakottság érzését váltja ki és csökkenti a táplálék felvételt. Az exogén LCRF, amely stabilizált állapotban már eljutott a bélbe, a normális fiziológiás aktivitást utánozza. Az étkezési szokásokat szabályozó peptidek kémiai módosításával kezelhető az elhízás, amely komoly és növekvő közegészségügyi probléma az ipari országokban, különösen az Egyesült Államokban.

Az elhízás közel járványos méreteken jelentkezik az ipari országokban, és elterjedtsége egyre növekszik. Az elhízás kórfejlődése összetett jelenség, beletartozik az életstílus, az étrend, a viselkedés és a genetikai tényezők kölcsönhatása. A találmány tárgyát képezi, hogy olyan hatóanyagot biztosítsunk, amely a jóllakottság érzetét váltja ki és ily módon fogyaszt vált ki.

Az elhízás kutatásának középpontjában szerepe volt az étkezést szabályozó idegi- és gyomorpeptideknek. Meggyőző bizonyíték van arra, hogy a CCK gátolja az evést. A CCK expresszió szabá-



lyozását nagyrészt az LCRF végzi, amely a patkányok duodenumjában mutatkozik meg lényegesen. Az embernél lehetségesnek tartjuk, hogy a tápanyagok általi stimulálásra van szükség a vélelmezett CCK-felszabadító faktor kiválasztásának stimulálásra. Fehérjetartalmú étkezés után az ételben lévő fehérjék telítik a rendelkezésre álló tripszint, nagyobb mennyiségű LCRF-et hagynak hidrolizálatlanul, amely azután a CCK sejtekhez kötődik. Ez váltja ki ezekben a CCK felszabadítását, amely telítettségi érzéshez vezet.

Egy másik szempont szerint, a találmány szerinti konjugátumok alkalmazhatók az LCRF receptoroknak LCRF-fel történő célbavételére — amely annak természetes agonistája — abból a célból, hogy megindítsa a CCK felszabadítást.

A találmány tárgya, hogy módszereket nyújtson az LCRF-nek cél-receptorához történő eljuttatására. Ez a cél úgy érhető el, hogy alkil-csoportokkal módosított PEG-oligomereket vagy polimereket konjugálunk proteinekhez és peptidekhez, azok farmakológiai tulajdonságainak javítása céljából. A találmány amfifil oligomer és polimer konjugálást alkalmaz a hatóanyag molekulák hidrofób és hidrofil tulajdonságainak variálására. Ez csökkenti az immunogenecitást, megakadályozza az enzimátikus lebomlást, és lehetővé teszi az orális beadást és a hatóanyagnak a különböző szövetek közötti eloszlását.

További tárgya a találmánynak, hogy olyan konjugált LCRF-et nyújtson, amely CCK felszabadulást képes kiváltani a CCK-felszabadító sejtekből, és így telítettségi érzethez és a táplálék felvétel csökkenéséhez vezet. Szabadalmazott amfifil polimer



konjugációs eljárásunk alkalmazását javasoljuk az LCRF eljuttatásához, amely a proteolízistől megvédi és hosszabb időszakra a bél lumenjébe szorítja az LCRF-et, telítettségi érzetet hozva létre. Hatékony és biztonságos gyógyszerkészítményként javasoljuk az ilyen konjugált LCRF-et az elhízás krónikus kezelésére.

A találmány szintetikus eljárásokat is nyújt az amfifil polimernek az LCRF N-végponti maradékaihoz történő kapcsolására, ez olyan 35 aminosavat tartalmazó fragmentum, amely a teljes hosszúságú LCRF összes biológiai aktivitását mutatja.

Az amfifil konjugátum egy polietilén-glikol (PEG) részt és egy alkil-láncot tartalmaz. Az alkil-lánc a bél felhámján lévő membránokba tud beépülni, szoros közelségbe hozva a konjugátumot a CCK-felszabadító sejt felületén elhelyezkedő LCRF receptorokkal. A peptid stabilitása megnő, hogy fenntartsa a bioaktivitást. Ezen túlmenően, ahol nagyobb stabilitásra és a bél felhámján történő kisebb mértékű áthatolásra van szükség, olyan peptideket tudunk nyújtani, amelyek konjugátumokkal rendelkeznek az N-végpontnál, a K 19-nél és a C-végpontnál.

Az LCRF konjugátum molekulák működőképessége egy sejt-alapú vizsgálatban validálható, patkány vékonybélből nyert, frissen készített CCK-felszabadító sejtek alkalmazásával. Radioimmúnassay (RIA) alkalmazható a CCK felszabadulás kimutatására.

Az LCRF a duodenumban válik ki és fiziológiásan a proteolízis, különösen a tripszin szabályozza. Amennyiben megvédjük az LCRF-et a proteolitikus lebontástól, az visszanyeri aktivitását, és a CCK sejteken lévő LCRF receptorokhoz kapcsolódik, és azokat aktiválja.

Egy amfifil polimer kovalens kötéssel kapcsolódhat a K19 ϵ -amino-csoportjához (a bejelentésben egybetűs aminosav-kódokat használunk), az LCRF-ben (1-41) lévő egyetlen tripszin felnyitási hely mellett, így sztérikus gátlással védve az LCRF-et a tripszin proteolízistól. Előnyös, hogy az LCRF-en végzett módosítások ne tegyék tönkre a receptor kötésben kulcsfontosságú szerepet játszó maradékokat. Mivel ismert, hogy a K19 a receptor kötés szempontjából döntő fontosságú területen belül van, előnyös olyan kötéssel kapcsolódni a K19 konjugátumhoz, amely a duodenumban meglévő körülmények között lassan hidrolizál. Amint a K19 konjugátum felszabadul, a peptid ekkor teljes aktivitását visszanyeri. A lassú hidrolízis is megnyújthatja az eljuttatott LCRF hatását, hogy minimalizálja az adagolást.

Az Egyesült Államok lakosságának körülbelül 55 %-a túlsúlyos vagy elhízott, amelynek komoly közegészségügyi következményei vannak. Az elhízás három legkomolyabb következménye a szívbetegség, a magas vérnyomás és a cukorbetegség. A legtöbb túlsúlyos embernél a diétázás és a tornászás nagymértékben sikertelen hosszú távú stratégiának bizonyult; így szükség van olyan gyógyszerkészítményekre, amelyek csökkentik az étvágyat. Az étvágy csökkentésének egyik megközelítése az, hogy kiváltjuk a CCK felszabadulását, ez olyan peptid hormon, amely telítettségi érzetet okoz és csökkenti a táplálék felvételt.

A CCK annak a hormonális rendszernek egyik alkotórésze, amely szigorúan szabályozza az éhség és telítettség érzetét, az emésztést és a tápanyagok eloszlását. A CCK-nak számos hatása van: kiváltja a telítettség érzetet és csökkenti a táplálék felvé-

telt; stimulálja az epehólyag összehúzódását; növeli a pankreász enzim kiválasztását; és késlelteti a gyomor kiürülését. Amikor élelem, különösen zsír és protein kerül a vékonybélbe, a CCK bejut a vérbe, ahol a perifériás idegekben, a pankreászban, epehólyagban és a gyomorban lévő receptorokhoz kapcsolódik.

A CCK vékonybélben történő felszabadulása negatív visszacsolási szabályozás alatt van. Az LCRF alapvetően képződött, tripszin-érzékeny intesztinális CCK-felszabadító peptid, amely ezért a negatív visszacsolási jelenségért részben felelős. Az 1. ábra [átvéve Miyasaka, K. és Funakoshi, A., *Pancreas* 16, 279 (1998)-ból] foglalja össze a CCK LCRF általi felszabadításának szabályozását. Az alaphelyzeti vagy éhezési állapotban az összes LCRF-et a tripszin gyorsan felnyitja. A protein vagy tripszin inhibitorok megemésztésekor némi LCRF érintetlen marad és a CCK-felszabadító sejthez kapcsolódik, CCK felszabadulást és telítettségi érzést okozva. Amikor az LCRF-et tripszin inhibitorokkal együtt juttatjuk be patkányok duodenumába, ez a táplálék felvétel csökkenését váltja ki.

Az LCRF hatásos CCK felszabadító faktor. Az LCRF azon három peptid egyike, amelyek azért felelősek, hogy a CCK sejtek CCK-t juttassanak el a véráramba. Ezen peptidek közül az LCRF a leghatékonyabb. A vékonybélbe kiválasztódó másik két peptidről azt találtuk, hogy stimulálják a CCK felszabadulást: az egyik a diazepam kötő inhibitor, a másik a monitor peptid. Az utóbbi pozitív visszacsatolási szabályozással ellenőrzi a CCK felszabadulást. Ennek a két peptidnek a CCK felszabadulást stimuláló hatékonysága azonban kisebb, mint az LCRF-é (század-ezred része, il-

letve hatodrésze).

A receptor/LCRF kölcsönhatás természetét nem határozták meg, mivel a receptort nem azonosították. Határozott bizonyíték van azonban arra, hogy a receptor a sejt felületén helyezkedik el. Dr. Rodger Liddle (Duke University) munkatársunk bizonyította, hogy az LCRF a vékonybél endokrin sejtjeiből egy kalcium beáramlás révén stimulálja a CCK felszabadulását. A sejten belüli kalcium mennyiségének növekedése jellegzetes jelző mechanizmus a receptorra, és erősen azt a benyomást kelti, hogy a receptor a sejt felületén helyezkedik el.

Tripszin inhibitorok fogyasztása vagy az epe-pankreász nedv elvezetése stimulálja a pankreász exokrin kiválasztását és a CCK felszabadulását patkányokban és embernél. Olyan CCK-stimuláló peptidet, amely érzékeny a tripszines emésztésre, először a patkány vékonybél mosadékából különítették el tisztítással. Ez a peptid, amelynek neve luminális kolecisztookinin felszabadító faktor (LCRF), stimulálja a CCK felszabadulását az izolált patkány, egér és humán vékonybél sejtekből és egy olyan sejtvonalból, amely egy intesztinális endokrin tumorból (STC-1 sejtek) származik. Az LCRF N-végponti töredék 35-ös maradéka rendelkezik a természetes peptid összes biológiai aktivitásával, amelynek hossza 60-65 maradék-egység között van (8136 D). Szintetikus peptidek alkalmazásával úgy találták, hogy a 11-25-ös maradékok felelősek az LCRF CCK felszabadító tulajdonságaiért, amely az 1-41-es töredék aktivitásának körülbelül 60 %-át nyújtja. Az LCRF génjét azonban nem azonosították, és 1999. decembertől nincsenek homológok a nyilvánosan rendelkezésre álló pro-

tein vagy DNS szekvencia adatbázisokban.

A találmány olyan LCRF konjugátumot nyújt, amely megtartja a CCK sejteken lévő LCRF receptorhoz történő kapcsolódás képességét; védett a proteolitikus felnyitással szemben; és molekulatömegénél fogva a bél lumenjére korlátozódik. Az LCRF receptor kötés azt idézi elő, hogy a CCK sejtek CCK-t juttatnak el a véráramba, amely telítettségi érzést okoz és csökkenti a táplálék felvételt. Ennek megfelelően, a találmány olyan LCRF konjugátumot nyújt, amely az elhízás ellen hatásos, orálisan eljuttatott kezelést kínál.

A peptidek hatóanyagként történő alkalmazásának gyakorlati korlátai vannak. A proteolízis, mind a belekben, mind a véráramban, a fő gátja annak, hogy a peptideket gyógyszerhatóanyagokként alkalmazzuk. Valóban, sok endogén peptid — ideértve az LCRF-et — átmeneti természete jellemző ezek szabályozó funkciójára. Egy másik nehézség, amivel szembetalálkoztunk a nem-endogén peptideknél, az immunogenecitás volt. Ezen problémák eredményeként a gyógyszeripar olyan megközelítést alkalmazott, hogy a gyógyszerkémia alkalmazásával kicsi, nem-peptid molekulákat állított elő. És bár a gyógyszerkémia sikeres volt, az eljárások nagyon sok időt emésztettek fel. Továbbá, a kémiai hatóanyagok nem várt toxicitással vagy teratogenicitással rendelkeztek.

Bár a „PEG-ilezett” proteinek felhasználása megalapozott, manapság ezek az injekciós alkalmazásra korlátozódnak. A találmány a polipeptidek, például inzulin, leu-enkefalin és kalcitonin, orálisan rendelkezésre álló konjugátumait nyújtja. Különösen, a találmány alkil-láncokhoz kapcsolt PEG egységeket tartalmazó

konjugátumokat nyújt. A PEG monomerek számának szabályozásával az alkil-lánc típusa és hossza, és a PEG-peptid kötés pontos termé- szete, a lipofilitás kívánt tulajdonságai hozzáigazíthatók a spe- cifikus alkalmazáshoz. Továbbá, a PEG-peptid kötés pontos termé- szete úgy változtatható, hogy az fiziológiás pH értéknél stabilis vagy a hidrolízissel szemben érzékeny legyen. A hidrolizálható kö- tés lehetővé teszi, hogy az érintetlen, konjugátatlan peptid idő- vel felszabaduljon, és mint prodrug fejtse ki hatását.

Sejt-alapú vizsgálatok alkalmazhatók, hogy validálni lehessen az amfifil oligomer-LCRF konjugátumoknak az állatokon végzett orális bejuttatásra vonatkozó kapacitását. Ezután állatvizsgála- tok alkalmazhatók a konjugátumok étvágy csökkentő képességének validálására. Például, a patkányok viselkedési vizsgálatoknak vethetők alá, hogy megbecsüljük az LCRF-konjugátum étvágy csök- kentő profilját. Amennyiben a konjugátum a szükséges étvágy csökkentő képességet mutatja patkányoknál, a hatóanyagot részle- tes farmakokinetikai és farmakodinámiás, valamint toxicitási vizsgálatoknak vetjük alá patkányokon.

Óriási erőfeszítéssel fejlesztenek gyógyszerkészítményeket az elhízás kezelésére. Egy, az elhízás ellen a közelmúltban engedé- lyezett hatóanyag az orlisztat lipáz inhibitor, amely megakadá- lyozza a zsírfelvételt, de nem befolyásolja az étvágyat. Az orlisztat (Xenical) csökkentheti a zsíroldható vitamin felvétel- ét és nagyon kellemetlen mellékhatásai lehetnek. A piacon lévő étvágy csökkentő szerek közé tartozik a sibutramin (Meridia), amely egy kevert neurotranszmitter ujjafelvétel inhibitor, és szimpatomimetikus szerek. Ezeknek a hatóanyagoknak az alkalmazá-

sát azonban korlátozzák a központi idegrendszeri (CNS) hatások. 1997-ben azt találták, hogy a fenfluramin és dexfenfluramin (Fen-Phen) étvágycsökkentő gyógyszer kombináció szívizom bántalmat okoz és kivonták a forgalomból. A neuropeptid Y antagonisták, a kappa opioid receptor antagonisták, a melanokortin-4 agonisták és a béta-3-adrenerg receptor antagonisták mind a preklinikai fejlesztés állapotában vannak az étvágy csökkentésére. A leptin és a neuropeptid Y, ez két endogén peptid, szerepet játszik az ételmiszer fogyasztás és az energiafogyasztás hosszú távú szabályozásában. Bár ezt a két peptidet intenzíven vizsgálják, a klinikai vizsgálatok során egyik sem bizonyult sikeresnek.

A CCK út inkább az étkezési sémák módosításában, semmint a hosszú távú tömeg-megtartásban játszik szerepet. A CCK utat közvetlenül megcélzó, az elhízás elleni hatóanyagok felfedezésére és kifejlesztésére irányuló megközelítések közül három a következő: a CCK-A agonisták, a CCK proteolízis inhibitorai, és az LCRF receptor agonistái.

Számos benzodiazepin analóg és peptidomimetikum van a preklinikai fejlesztés szakaszában mint CCK-A agonista. Ezekről a hatóanyagokról kimutatták, hogy a patkányoknál csökkentik a táplálék felvételt, és az elhízás kezelését célzó preklinikai fejlesztés szakaszában vannak az Abbott Laboratories és a Glaxo Wellcome cégek megbízásából. Ennek a megközelítésnek további validálását jelenti a CCK-A antagonisták alkalmazása a pszichés eredetű étvágytalanság kezelésére.

A butabindid egy kolecisztokinin inaktiváló peptidáz inhibitor, amely most van preklinikai vizsgálat alatt az INSERM-nél



(Franciaország), és amely az elhízás kezelésére szolgál. A butabindid hatásának időtartama azonban túl rövid a klinikai hasznosíthatóság szempontjából és jelenleg egyéb analógok állnak vizsgálat alatt.

Olyan kicsi, szintetikus molekulák, amilyenek a LCRF receptor agonisták, alkalmazhatók a CCK felszabadítás stimulálására. A szerkezet-alapú hatóanyag tervezés azonban jelenleg nem életképes stratégia, mivel sem az LCRF-re, sem receptorára nem állnak rendelkezésre szerkezeti adatok.

2005-re az egészségügyi okokból diétázó emberek száma várhatóan eléri az 5,8 milliót. Az egészségügyi vagy kozmetikai célokat szolgáló fogyasztó hatású termékek és szolgáltatások teljes piaci értéke, ideértve a diétás élelmiszereket, az Egyesült Államokban 30 milliárd dollárt tesz ki. Annak ellenére, hogy kevés a biztonságos és hatékony termék, az amerikaiak 1998-ban 243 millió dollárt költöttek elhízás elleni hatóanyagokra. Nyilvánvaló, hogy óriási piaca van az elhízás biztonságos, hatékony és krónikus kezelésének.

A találmány olyan gyógyszerkészítményt nyújt, amely proteint vagy peptidet, például LCRF-et tartalmaz, egy vagy több a természetben elő nem forduló polimer molekulával kapcsolva, a fent nevezett polimer egy lipofil részből és egy hidrofil polimer részből áll, ily módon kiegyensúlyozott lipofil és hidrofil jellemzőket nyújt a gyógyszerkészítménynek úgy, hogy azok gyógyszerészetiileg elfogadható oldószerekben oldódjanak és a biológiai membránokkal képesek legyenek kölcsönhatásba lépni.

A találmány olyan gyógyszerkészítményt nyújt, amely proteint

vagy peptidet, például LCRF-et tartalmaz, egy vagy több a természetben elő nem forduló polimer molekulával kapcsolva, a fent nevezett polimer áll (i) egy lipofil részből, és (ii) egy hidrofíli részből, ily módon kiegyensúlyozott lipofil és hidrofíli jellemzőket nyújt a konjugátumnak úgy, hogy a konjugátum gyógyszerészetiileg elfogadható oldószerekben oldódjék legyen, és a biológiai membránokkal képes legyen kölcsönhatásba lépni.

A találmány olyan gyógyszerkészítményt nyújt, amely proteint vagy peptidet, például LCRF-et tartalmaz, egy vagy több a természetben elő nem forduló polimer molekulával kapcsolva, ez utóbbi egy lipofil részt és egy hidrofíli részt tartalmaz, és a gyógyszerkészítmény vizes oldószerekben oldható, és az LCRF hatásos az elhízás megelőzésében vagy kezelésében.

A találmány olyan gyógyszerkészítményt nyújt, amely proteint vagy peptidet, például LCRF-et tartalmaz, egy vagy több a természetben elő nem forduló polimer molekulával kovalens módon kapcsolva, ez utóbbi áll (i) egy lineáris polialkilén-glikol részből, és (ii) egy lipofil részből, amelyben a fiziológiásan hatásos peptid, a lineáris polialkilén-glikol rész és a lipofil rész egymáshoz alkalmazkodva úgy helyezkedik el, hogy az LCRF-nek az LCRF készítményben megnövekedett in vivo ellenálló képessége van az enzimatis leomlással szemben, az LCRF-hez egymagához viszonyítva.

A találmány triglicerid váz részt tartalmazó gyógyszerkészítményt nyújt, ez LCRF-ből áll, amely kovalens módon kapcsolódik a triglicerid váz részhez, egy, a triglicerid váz rész szénatomján kapcsolódó polialkilén-glikol távtartó csoporton keresztül; és



legalább egy zsírsav rész kovalens módon kapcsolódik vagy közvetlenül a triglicerid váz rész szénatomjához, vagy kovalens módon kapcsolódik egy polialkilén-glikol távtartó csoporton keresztül.

A találmány poliszorbát komplexet nyújt, amely egy poliszorbát csoportot, ideértve egy triglicerid vázat tartalmaz, amelynek egy zsírsav csoportja kovalens módon kapcsolódik α , α' és β szénatomjainak egyikéhez, és van egy polietilén-glikol csoportja, amely kovalens módon kapcsolódik α , α' és β szénatomjainak egyikéhez.

A találmány stabilis, vízben oldható, konjugált LCRF komplexet nyújt, amelyben az LCRF stabilizáló és konjugatív módon kapcsolódik egy polietilén-glikollal módosított glikolipid csoporthoz.

A találmány poliszorbát komplexet nyújt, amely tartalmaz egy triglicerid vázat magában foglaló poliszorbát részt, amely kovalensen kapcsolódik az α , α' és β szénatomok közül egymástól függetlenül választott szénatomokhoz; funkcionális csoportokat, ideértve egy zsírsav csoportot; és egy polietilén-glikol csoportot, amelynek van egy kovalens módon hozzákapcsolt, fiziológiásan aktív csoportja.

A találmány az elhízás kezelésére orális beadási formát is nyújt, amely egy gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyagot és egy stabilis, vízben oldható, konjugált LCRF komplexet tartalmaz, ez utóbbiban az LCRF egy fiziológiásan kompatibilis polietilén-glikollal módosított glikolipid részhez kapcsolódik.

A találmány eljárást is nyújt az elhízás kezelésére, az ilyen

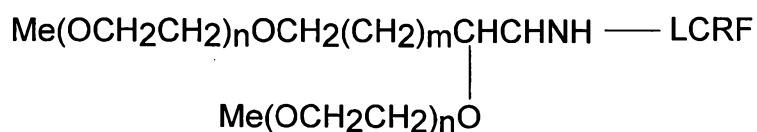


fogyatékoságban szenvedő embernél vagy nem-humán emlősnél úgy, hogy a betegnek hatásos mennyiséget adunk be egy konjugált LCRF gyógyszerkészítményből, amely stabilis, vízben oldható, konjugált LCRF komplexet tartalmaz, az LCRF pedig kovalens módon kapcsolódik egy fiziológiásan kompatibilis polietilén-glikollal módosított glikolipid részhez.

A találmány megelőző vagy beavatkozó kezelési eljárást nyújt a potenciális vagy kifejlődött elhízásra embernél vagy nem-humán emlős betegnél, a kezelés abból áll, hogy a betegnek hatásos mennyiséget adunk be egy konjugált LCRF gyógyszerkészítményből, amely stabilis, vízben oldható, konjugált LCRF komplexet tartalmaz, az LCRF pedig kovalens módon kapcsolódik egy fiziológiásan kompatibilis polietilén-glikollal módosított glikolipid részhez.

A találmány eljárást nyújt az LCRF aktivitásának meghosszabbítására egy in vivo vagy in vitro rendszerben, amely abból áll, hogy konjugatív módon kapcsoljuk az LCRF-et egy természetben elő nem forduló polimer egy vagy több molekulájával, amely utóbbi egy lipofil részből és egy hidrofil polimer részből áll, és egy konjugatív módon kapcsolt polimer-LCRF gyógyszerkészítményt eredményez, és a konjugatív módon kapcsolt polimer-LCRF gyógyszerkészítményt beviszi az in vivo vagy in vitro rendszerbe.

A találmány egy előnyös megvalósításban egy



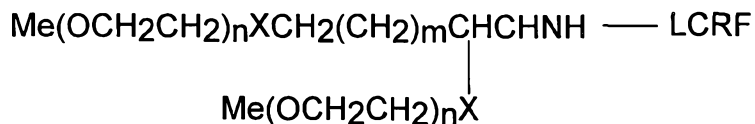
általános képletű vegyületet is nyújt, amelyben

n értéke 3 és 230 között, és



m értéke 0 és 20 között van.

A találmány egy előnyös megvalósításban egy



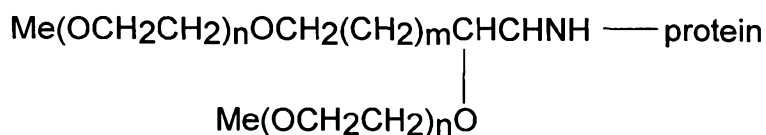
általános képletű vegyületet is nyújt, amelyben

n értéke 3 és 230, és

m értéke 0 és 20 között van; és

X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom.

A találmány egy előnyös megvalósításban egy



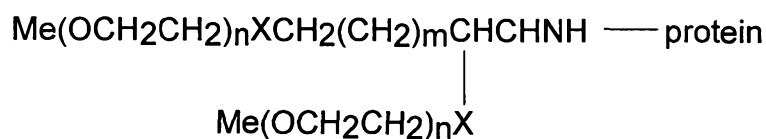
általános képletű vegyületet is nyújt, amelyben

n értéke 3 és 230, és

m értéke 0 és 20 között van; és

amelyben a protein előnyösen egy gyógyhatású protein.

A találmány egy előnyös megvalósításban egy



általános képletű vegyületet is nyújt, amelyben

n értéke 3 és 230, és

m értéke 0 és 20 között van; és

X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom; és amelyben a protein előnyösen egy gyógyhatású protein.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra foglalja össze a LCRF által szabályozott CCK felszabadítást.



A 2. ábra az LCRF konjugálási eljárások három alapsémáját mutatja.

A 3. ábra a találmány szerinti polimerek előállításának alapvető reakcióvázlatait mutatja.

Bár a következő leírás elsősorban és bemutató jelleggel az LCRF peptid komponensként történő alkalmazására irányul a találmány szerinti különböző gyógyszerkészítményekben és formulákban, érzékelni kell, hogy a találmány használhatósága így nem korlátozódik, hanem inkább bármilyen peptid féleségre kiterjed, amelyek a találmány szerint kovalens módon vagy társíthatóan konjugálhatók, ideértve, de nem korlátozva, az alábbi peptid féleségeket: kalcitonin, ACTH, glukagon, somatostatin, somatotropin, szomatomedin, paratiroid hormon, eritropoietin, hipotalamusz felszabadító faktorok, prolaktin, tiroid stimuláló hormon, endorfinok, antitestek, hemoglobin, oldható CD-4, alvadási faktorok, szöveti plazminogén aktivátor, enkefalinok, vazopresszin, nem-természetes opiátok, szuperoxid diszmutáz, interferon, aszparagináz, argináz, arginin dezamináz, adenzin dezamináz ribonukleáz, tripszin, kemotripszin és papain, lúgos foszfatáz, és egyéb alkalmas enzimek, hormonok, proteinek, polipeptidek, enzim-protein konjugátumok, antitest-hapten konjugátumok, virális epitopok, stb.

A találmány egyik célja, hogy alkalmas polimereket nyújtson a peptidekkel végzett konjugáláshoz úgy, hogy megkapjuk a fentebb felsorolt szükséges tulajdonságokat. Egy másik célja az, hogy hasznosítsa ezeket a módosított peptideket a peptid hosszantartó in vivo bejuttatásában. További célja, hogy alkalmazza az eljá-



rást és aktív formában orálisan juttassa el a peptideket.

További célja, hogy társítottan konjugált peptideket alkalmazzon az immunoassay diagnosztikában történő felhasználásra, és egyéb, nem terápiás (például in vitro) alkalmazásoknál. A találmány további célja, hogy stabilizáló hatású konjugált peptid készítményeket, ideértve a kovalens módon kapcsolt készítményeket, nyújtson, amelyek különféle módon alkalmasak az in vivo valamint a nem in vivo alkalmazásoknál, és hogy más módszer szerint nem-kovalens, társítottan konjugált peptid készítményeket nyújtson, amelyek különféle módon alkalmasak az in vivo valamint a nem in vivo alkalmazásoknál.

A találmány széles oltalmi körén belül egyetlen polimer molekula alkalmazható a peptid féleségek sokaságával végzett konjugálásra, és az is előnyös lehet a találmány széleskörű gyakorlatában, hogy sokféle polimert alkalmazzunk konjugáló szerként egy adott peptidhez; az ilyen megközelítések kombinációi is alkalmazhatók. Továbbá, a stabilizáló hatással konjugált peptid készítmények mind in vivo, mind in vitro alkalmazhatók. Továbbá, fel kell ismerni, hogy a konjugáló polimer(ek) alkalmazhat(nak) bármilyen egyéb csoportot, részt vagy egyéb konjugált vegyület-féleséget, amely alkalmas a végső felhasználásra. Például, néhány alkalmazásnál hasznos lehet, hogy kovalens módon kapcsoljunk a polimerhez olyan funkcionális csoportot, amely ezt UV-bomlással vagy oxidációval szemben ellenállóvá teszi, vagy egyéb tulajdonságokat vagy jellemzőket ad a polimernek. Egy további példa szerint néhány alkalmazásnál előnyös lehet úgy funkcionalizálni a polimert, hogy némileg reaktívvá vagy térhálósít-



hatóvá tegyük a jellegét, és erősítsük az átfogóan konjugált anyag különböző tulajdonságait vagy jellemzőit. Ennek megfelelően, a polimer bármilyen funkcionalitást, ismétlődő csoportokat, kötéseket vagy egyéb alkotó szerkezeteket tartalmazhat, amely nem gátolja a konjugált készítménynek a tervbe vett célt szolgáló hatékonyságát. A találmány további céljai és előnyei még nyilvánvalóbbá válnak az alábbi leírásból és a szabadalmi igénypontokból.

Azokat a szemléltető polimereket, amelyek hasznosan alkalmazhatók ezeknek a szükséges jellemzőknek a létrehozására, az alábbiakban egy példaként szolgáló reakcióvázlatban ismertetjük. A kovalens módon kapcsolt peptid alkalmazásoknál, a polimerek funkcionalizálhatók, és ezután hozzákapcsolhatók a peptid(ek) szabad aminosavja(i)hoz labilis kötések létrehozására, amelyek lehetővé teszik az aktivitás megőrzését a labilis kötések érintetlenül hagyásával. A kötés kémiai hidrolízissel és proteolízissel végzett eltávolítása ezután növeli a peptid aktivitását.

A találmányban alkalmazott polimerek alkalmasan olyan alkotórészeket építhetnek be molekuláikba, mint az étkezési zsírsavak (lipofil vég), polietilén-glikolok (víz oldható vég), elfogadható cukor csoportok (receptorral kölcsönhatásba lépő vég), és a peptid kapcsolódáshoz szolgáló távtartó csoportok. A választható polimerek közül a poliszorbátok különösen előnyösek és az alábbi tárgyalásban ezeket választjuk a találmány különféle megvalósításainak szemléltetésére. A találmány oltalmi köre természetesen nem korlátozódik a poliszorbátokra, és különböző egyéb polimerek, amelyek magukba építik a fentebb leírt csoportokat, hasznosan alkalmazhatók a találmány ~~származék~~ körü gyakorlatában. Néha szükséges lehet az egyik ilyen



szükséges lehet az egyik ilyen csoportnak az eltávolítása és mások megtartása a polimer szerkezetében anélkül, hogy céljainktól eltérnénk. Amikor szükséges, hogy így tegyünk, a cukor és/vagy a köztartó csoportok azok az előnyös csoportok, amelyeket el kell távolítanunk anélkül, hogy elveszítenénk a találmány kitűzött céljait és előnyeit.

Előnyös, ha olyan polimerekkel dolgozunk, amelyek molekula tömege 100 és 10000 dalton közé esik.

A találmány gyakorlatában a 2-4 szénatomos alkil-polialkilén-glikolok polialkilén-glikol maradékai, előnyösen a polietilén-glikol(PEG), előnyösen épülnek be a fontos polimer rendszerekbe.

Ezeknek a PEG maradékoknak a jelenléte hidrofíli tulajdonságokat ad a polimernek és a megfelelő polimer-peptid konjugátumoknak. Ismereteink szerint bizonyos glikolipidek stabilizálják a proteineket és peptideket. Ennek a stabilizálásnak a mechanizmusa valószínűleg magába foglalja a glikolipid zsírsav csoportoknak a peptid vagy protein hidrofób részével végbemenő egyesülését; ez meggátolja a protein vagy peptid aggregációját. Az is ismert, hogy az aggregálódott peptidek a természetes peptidekhez viszonyítva rosszul szívódnak fel a vékonybélben. A találmány ezért olyan polimer-peptid termékek létrehozását tervezi, amelyekben a peptid, például az LCRF, a polimernek vagy a hidrofíli vagy a hidrofób maradékával van konjugálva. A polimer zsírsav csoportja arra szolgál, hogy kapcsolatot létesítsen a peptid hidrofób részével és így meggátolja az oldatban végbemenő aggregációt. Az eredményül kapott polimer-peptid konjugátumok így az alábbi tulajdonságokkal rendelkeznek: stabilizáltak (a kémiai és enzimatisz hidrolízissal szemben); vízben oldhatók, a PEG mara-

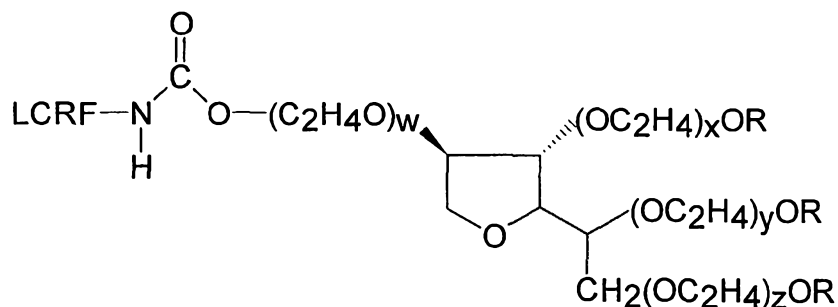
dék révén; és a zsírsav-hidrofób csoport kölcsönhatásai következtében nem hajlamosak az aggregációra.

A találmány gyakorlatában a polialkilén-glikol származék képzésének számos előnyös tulajdonsága van a polimer-peptid konjugátumok előállításában, mivel a polialkilén-glikol-származékok alábbi tulajdonságaival egyesülnek: javul a vízoldhatóság, amíg ugyanakkor antigén vagy immunogén reakció nem jelentkezik; nagyfokú a biológiai kompatibilitása; a polialkilén-glikol-származékoknak nincsen in vivo biológiai lebomlása; és könnyen kiválaszthatók az élő szervezetek által.

A találmány gyakorlatában alkalmazott polimerek így liofil és hidrofil csoportokat tartalmaznak, amelyek a kapott polimer-peptid konjugátumot nagyon hatásossá (bioaktívvá) teszik mind orálisan, mind parenterálisan, valamint a fiziológiás beadás egyéb módjainál, és nagyon hatásosak a nem-fiziológiás alkalmazásoknál is.

Az alábbiakban a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok szemléltető példáiként ismertetjük a kovalens módon kapcsolt konjugátumok képleteit, amelyekre a könnyedség kedvéért, mint 1., 2. és 3. konjugátumra utalunk, és az m, n, w, x és y specifikus értékeit az alábbi tárgyalásban írjuk le.

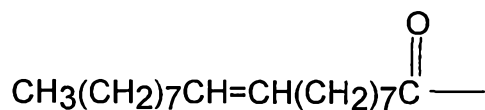
1. konjugátum:



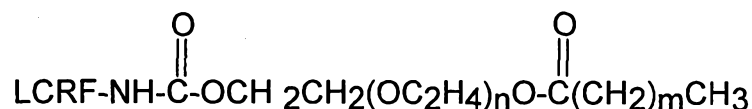
amelyben

$w+x+y+z$ értéke 20; és

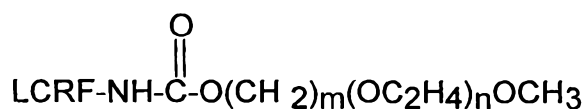
R jelentése olajsav:



2. konjugátum:



3. konjugátum:



Az 1. konjugátum jellemzi a kereskedelemben beszerezhető poliszorbát-monooleátot a polimer rendszer központjában, ami sok gyógyszerészeti alkalmazásban felhasznált cukor-származék. Az oleinsav lánc lipofil és felszívódást növelő tulajdonságokat nyújt, amíg a polietilén-glikol (PEG) maradékok hidrophil (hidrogén-kötést elfogadó) környezetet nyújtanak. Az inzulin egy, a polimer PEG részével szomszédos karbamát kötéssel keresztül kapcsolódik.

A 2. konjugátumban nincsen cukor-maradék, de az LCRF ismét a polimerhez kapcsolódik egy, a polimer PEG hidrophil szakaszával szomszédos karbamát kötéssel keresztül. A polimer lipofil zsírsav szakasza így bizonyos távolságra van az LCRF-hez való kapcsolódás pontjától.

A 2. konjugátumra fentebb leírt átrendeződés megfordul a 3. konjugátum esetében. A cukor-maradék még egyszer kizáródik, de ebben a szerkezetben a lipofil zsírsav maradék az LCRF-hez való

kapcsolódás pontjához van a legközelebb, és a hidrofil PEG szakasz távol van a kapcsolódási ponttól, amely ismét a karbamát kötésen keresztül megy végbe.

A találmány szerinti általános gyakorlatban a polimereknek a peptidhez történő kapcsolására különféle eljárások állnak rendelkezésre és a továbbiakban ezeket részletesen megtárgyaljuk. Amikor proteinekkel és polipeptidekkel dolgozunk tudomásul kell venni, hogy a peptidben bizonyos maradék csoportok fontosak ezek általános biológiai integritásában. Fontos, hogy alkalmas kapcsoló szert válasszunk, amely szükségtelenül nem lép kölcsönhatásba ezekkel a maradékokkal. Néhány esetben nehéz lehet a kapcsolódást elkerülni és ezért ezeknek a fontos maradékoknak az aktivitását elfedni, de némi aktivitás elcserélhető a megnövekedett stabilitásra, miközben fenntartjuk a megszerzett előnyös tulajdonságokat. Az in vivo alkalmazásokban például, a beadás gyakorisága csökkenthető, ami kisebb költségeket és a beteg nagyobb alkalmazkodóképességét eredményezi.

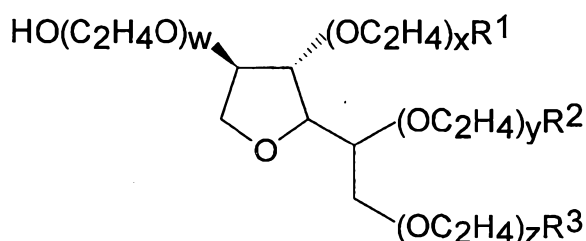
A protein-peptid konjugálásban a találmánnyal összhangban alkalmazott polimereket úgy tervezték, hogy jó fizikai tulajdonságokkal rendelkezzenek, amelyek lehetővé teszik a szükséges célok elérését. Az abszorpciót növelő szerek, bár lehetővé teszik a peptideknek a sejt membránon történő áthatolását, nem javítják a peptidek stabilitási jellemzőit, és az in vivo alkalmazások ezért felhasználhatják a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumokat az ilyen áthatolást növelő szereket nem tartalmazó készítményekben. A találmány egyik szempontja ezért arra vonatkozik, hogy zsírsav-származékokat építsünk be a polimerekbe az

áthathatóságot növelő szereket utánpótlására.

A találmány szerinti kovalens módon kapcsolt polimer-peptid konjugátumokban a peptid egy labilis kémiai kötéssel kovalens módon kapcsolódhat a vízoldható polimerhez. A peptid és a polimer közötti ilyen kovalens kötés kémiai vagy enzimatis reakcióval felnyitható. A polimer-peptid termék elfogadható mértékű aktivitást tart meg; a peptid komponens teljes mértékű aktivitása akkor realizálható, amikor a polimert teljesen lehasítjuk a peptidről. Ezzel egyidejűleg polietilén-glikol adagok vannak jelen a konjugáló polimerben, hogy nagy mértékű vízoldhatóságot és a vérkeringésben való hosszabb fennmaradást nyújtsanak a polimer-peptidnek. A glikolipidek a polimerrel hasznosan egyesülnek oly módon, hogy zsírsav csoportjaik a peptid hidrofób területét foglalják el és így az aggregációt meggátolják. A peptidek aggregációja azt eredményezi, hogy a vékonybélben gyengén szívódnak fel. Az aggregálatlan peptidek könnyebben szívódnak fel a vékonybélből. A glikolipideknek a konjugáló polimerbe történő beépülése így arra szolgál, hogy javítsa a stabilitást és megakadályozza a peptidek konjugáció utáni aggregációját. A fentebb leírt módosítások jobb oldhatósági, stabilitási és membrán affinitási tulajdonságokat nyújtanak a peptidnek. Ezen javított jellemzők eredményeként a találmány tervbe veszi mind az aktív polimer-peptid féleségek parenterális és orális módon végzett beadását, mind — a hidrolitikus felnyitás után — a peptid in vivo alkalmazásainak biológiai hozzáférhetőségét.

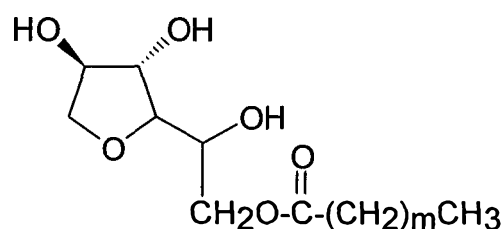
Az alább leírt megvalósításban alkalmazott polimerek osztályozhatók mint polietilén-glikollal módosított glikolipidek és ^{74, 919/BAZ} polietilén-glikollal módosított zsírsavak. Az előnyös

Az alábbiakban számos eljárást részletesen ismertetünk, amelyekkel a zsírsav-szorbitánok módosíthatók, hogy megkapjuk a szükséges polimert, és szemléltetjük a szerkezeteket is. A poliszorbátok a szorbitolok és anhidridjeik észterei, amelyeket szorbitol és szorbitol-anhidrid mólonként közelítőleg 20 mól etilén-oxiddal kopolimerizálunk. Alább egy jellegzetes polimer szerkezetét ismertetjük.



74.919/RAZ

ke egymástól függetlenül választható a laurin-, olein-, palmitin- és sztearinsav gyökök közül, vagy R^1 és R^2 mindegyikének jelentése hidroxil-csoport, amíg R^3 jelentése laurin-, palmitin-, olein- vagy sztearinsav gyök. Ezek a polimerek a kereskedelemben kaphatók és ezeket gyógyszerkészítményekben alkalmazzák. Ahol nagyobb molekulatömegű polimerre van szükség, az glikolipidekből, például szorbitán-monolaurátból, szorbitán-monooleátból, szorbitán-monopalmitátból vagy szorbitán-monosztearátból és egy alkalmas polietilén-glikolból állítható elő. Az alábbiakban ismertetjük azoknak a glikolipideknek a szerkezeti képletét, amelyek kiindulási anyagként alkalmazhatók.

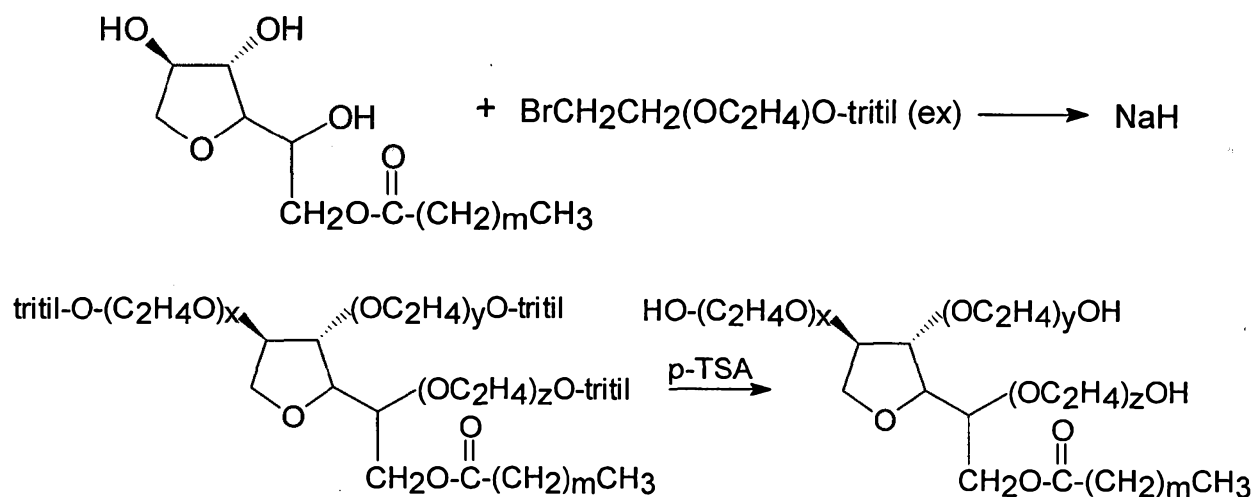


amelyben

m értéke 10 és 16 között van.

A három helyzetben polietilén-glikollal szubsztituált glikolipid polimerek szintézisében, egy, a záró helyzetekben két szabad hidroxicsoporttal rendelkező polietilén-glikolt piridinben oldott tritil-csoporttal védünk az egyik záró helyzetben, egy mól tritil-kloridot alkalmazva. A polietilén-glikol megmaradó szabad hidroxil-csoportját vagy toziláttá vagy bromiddá alakítjuk át. A szükséges glikolipidet egy alkalmas inert oldószerben oldjuk és nátrium-hidriddel reagáltatjuk. A védett polietilén-glikol tozilátját vagy bromidját egy inert oldószerben oldjuk és főlösléiben vett glikolipid oldatot adunk hozzá. A terméket

p-toluol-szulfonsav vízmentes inert oldószerrel készült oldatával szobahőmérsékleten reagáltatjuk, és oszlopkromatográfiával tisztítjuk. Az átalakulás szerkezeteit az alábbiakban ismertetjük.

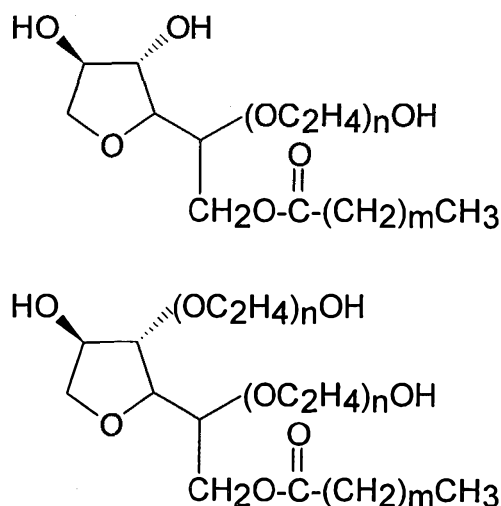


amelyben

m értéke 10 és 16 között van;

x, y, és z értékének összege 8 és 240 között van.

A reagensek moláris ekvivalensének beállításával és olyan polietilén-glikolt alkalmazva, amelynek az molekulatömege az alkalmas tartományban van, a szükséges molekulatömegű mono- vagy diszubsztituált glikolipideket nyerjük, a fenti eljárás alkalmazásával.

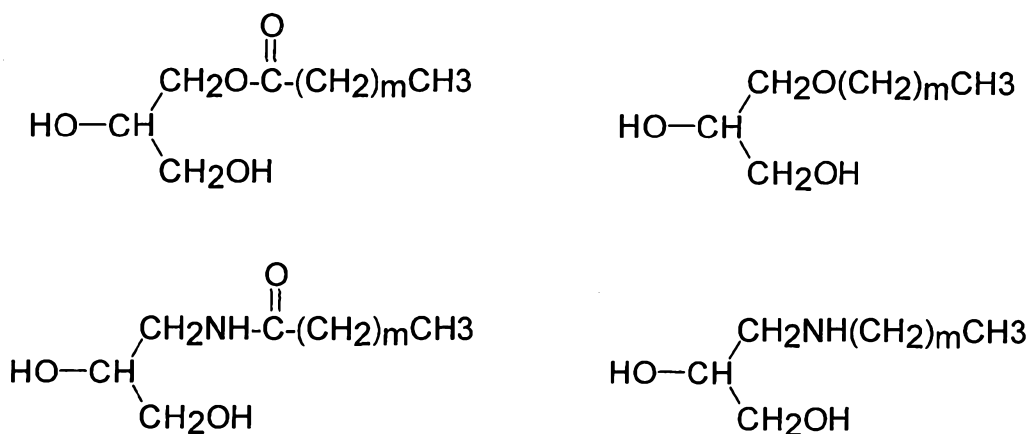


amelyben n és m értéke egymástól függetlenül változhat, és az bármilyen alkalmas érték lehet, amely megfelel a specifikus, stabilizálandó peptidnek, például 1 és 16 között.

A fentebb megadott glikolipid cukor csoportja glicerinnel vagy amino-glicerinnel szubsztituálható, amelynek a szerkezeti képlete az alábbi



Ebben a módosulatban a primer alkoholt először egy zsírsav csoporttal, például, laurin-, olein-, palmitin- vagy sztearin-savval, éterifikáljuk vagy észterifikáljuk; az amino-csoportból zsírsavakkal származékot képezünk és amidokat vagy szekunder amino-csoportokat hozunk létre, amint az az alábbiakban látható.



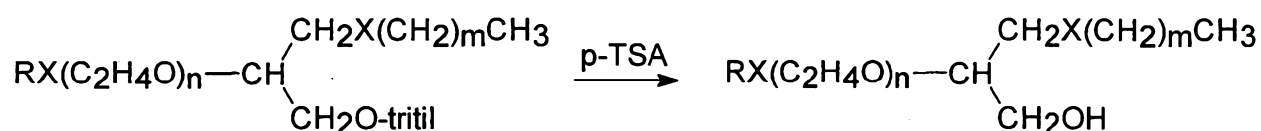
amelyben

m -nek bármilyen alkalmas értéke lehet, például 10 és 16 között.

A visszamaradó primer alkohol-csoportot egy tritil-csoporttal védjük, amíg a szekunder alkohol-csoportot polietilén-glikollal a szükséges polimerre alakítjuk át. Rendszerint a polietilén-glikolon van egy kilépő csoport az egyik záró csoportnál és egy



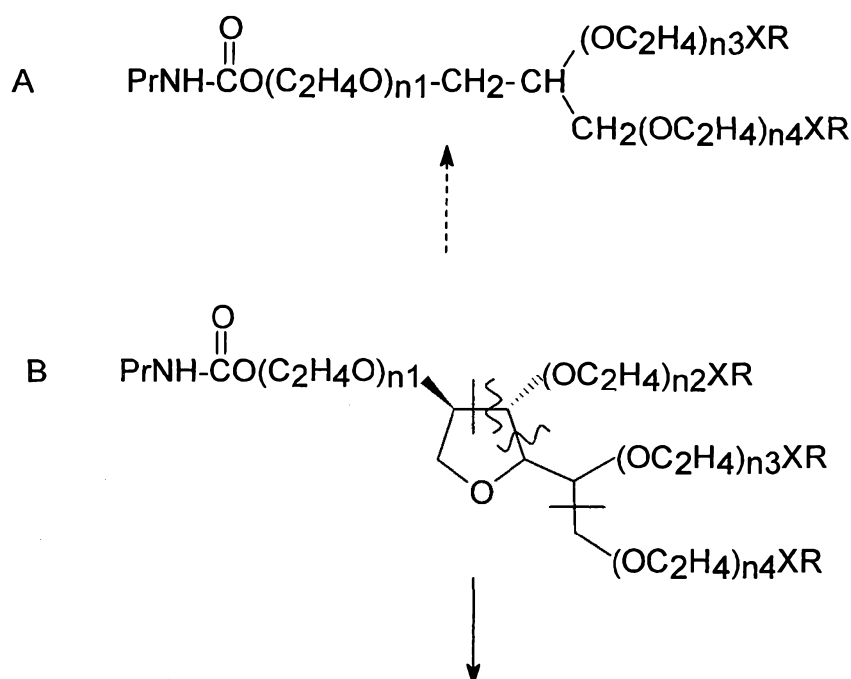
metoxi-csoport a másik záró csoportnál. A polietilén-glikolt egy inert oldószerben oldjuk és hozzáadjuk egy glikolipidet és nátrium-hidridet tartalmazó oldathoz. A termékről p-toluolszulfonsavban szobahőmérsékleten eltávolítjuk a védőcsoportot és így az alábbi ábra szerinti polimert nyerjük.

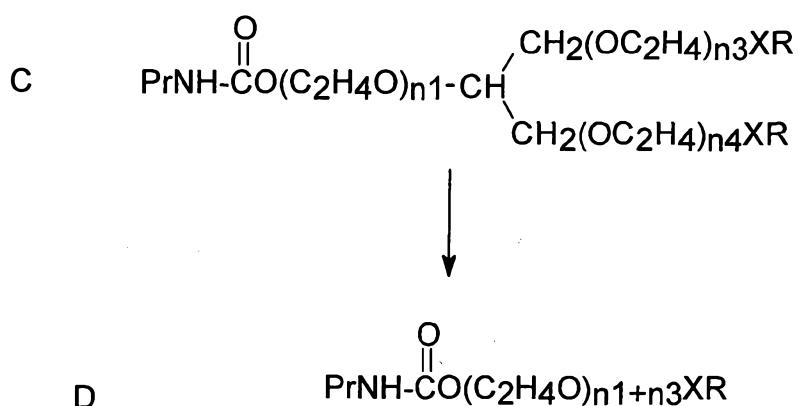


amelyben p-TsA jelentése p-toluolszulfonsav.

Néha szükséges, hogy zsírsav-származékokat építsünk be a polietilén-glikol lánc különböző részeibe és így bizonyos fizikai kémiai tulajdonságokat alakítsunk ki, amelyek a két/három zsírsav molekulával, például poliszorbát-trioleáttal, szubsztituált poliszorbátokéhoz hasonlóak.

A polimerekre jellemző szerkezeteket az alábbi reakcióvázlatban mutatjuk be, mint a poliszorbát nyílt láncát.





A képletekben

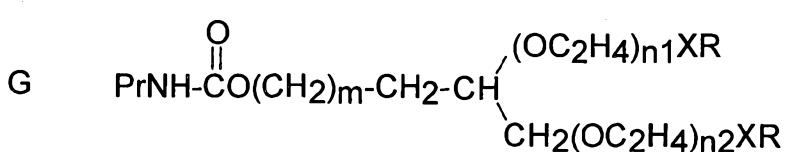
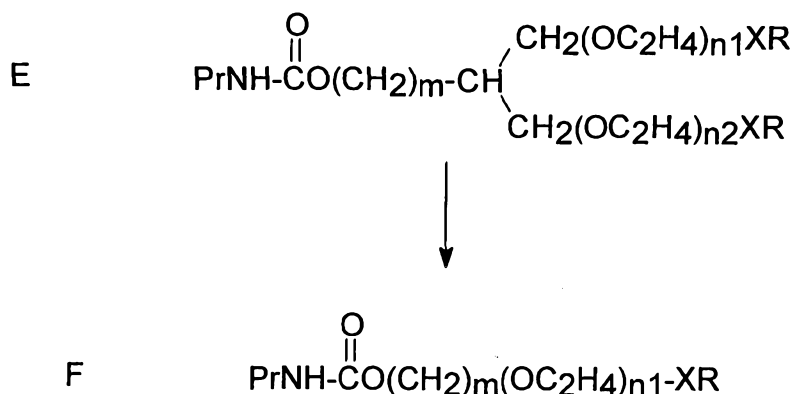
Pr jelentése peptidek, proteinek, protein hatóanyagok;

R jelentése 5-8 szénatomos alkilcsoport;

n értéke 5 és 120 között van;

X jelentése oxigén-, kénatom, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$;

$\text{PrNH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ = $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$, $-\text{HN}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ csoport.



A képletekben

Pr jelentése peptidek, proteinek, peptid hatóanyagok;

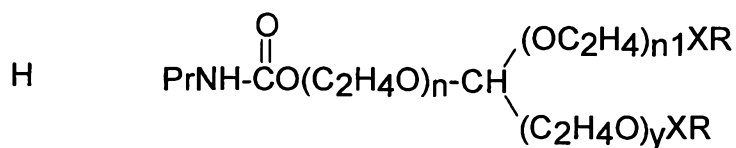
R jelentése 5-18 szénatomos alkilcsoport;

n értéke 5 és 120 között van;

m értéke 2 és 15 között van;

X jelentése oxigén-, kénatom, $-C(=O)-O-$, $-C(=O)-NH-$;

$PrNH-C(=O)-O-$ = $-NH-C(=O)-$, $-C(=O)-O-$, $-HN-C(=O)-O-$ csoport.



A képletben

Pr jelentése peptidek, proteinek, protein hatóanyagok;

R jelentése 5-18 szénatomos alkilcsoport;

m értéke 5 és 18 között van;

n értéke 2 és 15 között van;

y értéke 5 és 120 között van;

és ahol m, n és y értéke egymástól függetlenül változhat a fenti szakaszokon belül, egymáshoz viszonyítva.

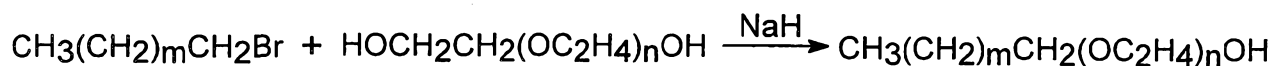
Az A polimer előállításában szükséges, hogy megvédjük a glicerin, például solketál, első és második szénatomján lévő hidroxici csoportot. A megmaradó hidroxici csoportot egy inert oldószerben nátrium-sóvá alakítjuk és a halogénezett vagy tozilezett polietilén-glikollal reagáltatjuk, amelyben a polietilén-glikol egyik végét észter formában védtük meg. A glicerin védőcsoportját eltávolítjuk és a kapott két hidroxici csoportot a megfelelő nátrium-sókká alakítjuk át. Ezeket a sókat egy inert oldószerben olyan polietilén-glikollal reagáltatjuk, amelyet zsírsavakkal részlegesen származékká alakítottunk. A reakció megindul, miután a szabad hidroxici csoport toziláttá vagy bromiddá alakult át.



A G polimert ugyanígy szintetizáljuk annak kivételével, hogy a védőcsoporttal ellátott glicerint először olyan zsírsavak észtereivel reagáltatjuk, amelyeket a sav záró szénatomján halogéneztünk.

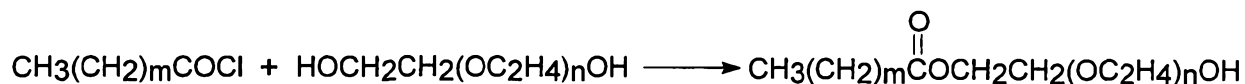
A C polimer szintézisében előnyös 1,3-dihalogén-2-propanolból kiindulni. A dihalogén vegyületet inert oldószerben oldjuk és olyan polietilén-glikol két móljának a nátriumsójával reagáltatjuk, amelyből előzőleg egy zsírsav csoport egy móljával származékot képeztünk. A terméket kromatográfiával vagy dialízissel tisztítjuk. A kapott száraz terméket inert oldószerben nátrium-hidriddel reagáltatjuk. Az így keletkezett nátrium-sót egy részlegesen védett polietilén-glikol halogén-származékával reagáltatjuk.

Néha szükséges lehet, hogy elhagyjuk a polimer cukor csoportját. A kapott polimer még így is tartalmaz egy polietilén-glikol töredéket. A zsírsav csoport membrán affinitási tulajdonságait meg lehet tartani, ha egy zsírsavat megfelelően szubsztituálunk egy lipofil, hosszúláncú alkánnal; így megőrizzük a biológiai kompatibilitást. Ennek a megvalósításnak egyik esetében a két végcsoporton lévő hidroxici-csoporttal rendelkező polietilén-glikolt inert oldószerben nátrium-hidriddel reagáltatjuk. Egy zsírsavszerű csoport primer bromid-származékának egy ekvivalens mennyiségét hozzáadjuk a polietilén-glikol és egy oldószer elegyéhez. A kívánt terméket egy inert oldószerrel extraháljuk és szükség esetén oszlop-kromatográfiával tisztítjuk.

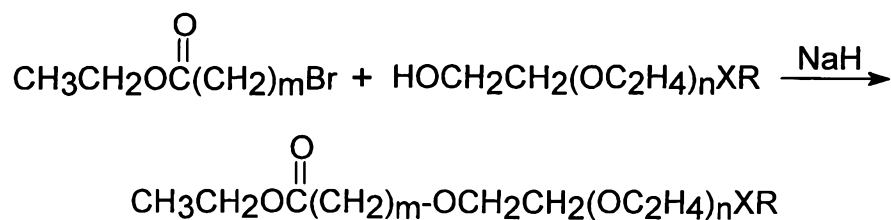




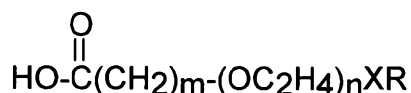
Ahol szükséges egy észterkötést létrehozni a zsírsav és a polietilén-glikol között, a sav savkloridját a fölöslegben vett kívánt polietilén-glikollal reagáltatjuk egy alkalmas inert oldószerben. A polimert egy inert oldószerrel extraháljuk és szükség esetén kromatográfiával tovább tisztítjuk.



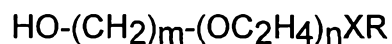
A peptidek néhány módosulatánál szükséges, hogy a zsírsav csoportot közvetlenül a peptidre konjugáljuk. Ebben az esetben a polimert a zsírsav csoporton lévő derivatizálható funkcióval szintetizáljuk. A megfelelő molekulatömegű mono-metoxi-polietilén-glikol egy inert oldószerrel készült oldatát nátrium-hidriddel reagáltatjuk, ezt követően hozzáadjuk a sav záró szénatomján egy kilépő csoportot hordozó zsírsav etil-észterét tartalmazó oldatot. A terméket oldószeres extrakció után szükség esetén oszlop-kromatográfiával tisztítjuk.



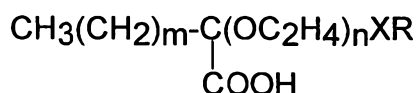
Az észteren lévő védőcsoportot híg savval vagy lúggal végzett reagáltatással távolítjuk el.



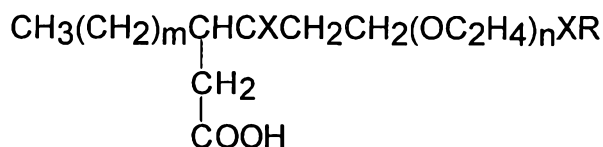
Ahol szükséges, hogy egy karbamát-kötést hozzunk létre a polipeptiddel, a karboxi- vagy észter-csoportot hidroxicsoporthá alakítjuk át a szakterületen járatosak előtt ismert kémiai redukciós eljárással.



A polipeptid konjugálásban alkalmazott funkcionális csoportok rendszerint a polimer végén helyezkednek el, de néhány esetben előnyös, hogy a funkcionális csoport a polimeren belül legyen. Ebben a helyzetben a származékot képző csoportok távtartó csoportokként szolgálnak. Ezen megvalósítás egyik esetében a zsírsav-csoport brómozható a karboxil-csoporthoz viszonyított alfa-helyzetű szénatomon és a sav-csoportot észterifikáljuk. Az ilyen típusú vegyülethez szolgáló kísérleti eljárás hasonló a fentebb említettethez, amely az alábbi terméket eredményezi.



Amikor nagyobb méretű távtartó csoportra van szükség egy polietilén-glikol-monoéter amino-csoporttá alakítható át és olyan borostyánkősav-anhidriddel reagáltatható, amelyből egy zsírsav-csoporttal származékot képeztünk. A primer amint hordozó, szükséges polietilén-glikolt nátrium-foszfát pufferben oldjuk 8,8 pH-n és szubsztituált borostyánkősav-anhidrid zsírsav-csoporttal reagáltatjuk, amint azt az alábbi vázlat mutatja. A terméket oldószeres extrakcióval különítjük el és szükség esetén oszlopkromatográfiával tisztítjuk.



Tudni kell azt, hogy a fenti reakcióvázlatok csupán a szemléltetés céljaira szolgálnak, és ezeket a reakciók és szerkezetek szempontjából nem szabad korlátozó értelemben tekinteni, amelyek hasznosan alkalmazhatók a peptidek módosítására a talál-

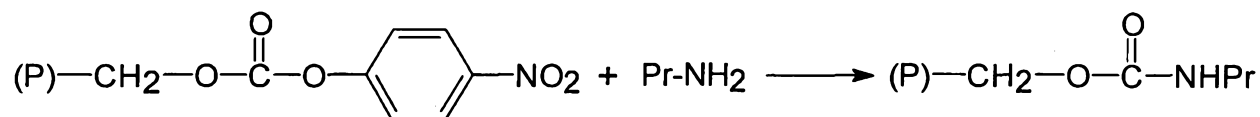
mány széles körű gyakorlatában, például hogy javítsuk az oldhatóságot, stabilitást és a parenterális és orális beadáshoz szolgáló sejt-membrán iránti affinitást.

A találmány biológiailag kompatibilis polimerek konjugátumait nyújtja mint biológiailag aktív makromolekulákat, diagnosztikai reagenseket, stb., amelyek például peptidekből, proteinekből, enzimekből, növekedési hormonokból, növekedési faktorokból és hasonlókból állnak. Az ilyen makromolekuláris vegyületek felépülhetnek amid-kötéssel kapcsolt alfa-amino-savakból, amelyek peptid-oligomereket és -polimereket képeznek. Ezen vegyületek funkcióinak függvényében, a peptid komponensek lehetnek proteinek, enzimek, növekedési hormonok, stb. A rövidség kedvéért ezekre a vegyületekre összességében mint peptidekre utalunk, és Pr-rel jelöljük ezeket. A biológiailag aktív peptidek valamennyi esetben szabad amino- vagy karboxil-csoportokat tartalmaznak. A polimer és a peptidek közötti kötés általában a szabad amino- és karboxi-csoportok között jön létre.

Az itt bemutatás céljaira választott peptidek különösen érdekesek az orvostudomány, mezőgazdaság, tudomány és a háztartások területén, valamint ipari alkalmazásoknál. Ezek lehetnek az átültetési terápiában alkalmazott enzimek, az állatok növekedését elősegítő hormonok, vagy sejtnövelő szerek a sejtenyésztésben; vagy különböző alkalmazásoknál felhasznált aktív, proteinszerű anyagok, például biotechnológiai és biológiai szerek, és orvosi diagnosztikumok. Az említendő enzimek között van a szuperoxid diszmutáz, interferon, aszparagináz, glutamáz, argináz, arginin dezamináz, adenzin dezamináz ribonukleáz,

tripszin, kromo- tripszin és papin. A peptid hormonok között említhető az inzulin, kalcitonin, ACTH, glukagon, szomatozin, szomatropin, szomatomedin, paratiroid hormon, eritropoietin, hipotalamusz felszabadító faktorok, prolaktin, tiroid stimuláló hormonok, endorfinek, enkefalinok és vazopresszin.

A polimernek a peptiddel végbemenő reakciója könnyen végrehajtható, amellyel kovalens módon kapcsolt konjugált termékeket kapunk. Az alábbi tárgyalás rövidebbé céljából, a polimerre mint P-re fogunk hivatkozni. Ahol a polimer hidroxil-csoportot tartalmaz, azt először egy aktív karbonát-származékká alakítjuk át, amilyen a p-nitro-fenil-karbonát. Az aktivált származékot azután rövid időszak alatt, enyhe körülmények között a peptiddel reagáltatjuk, így megőrzött biológiai aktivitással rendelkező karbamát-származékokat nyerünk.



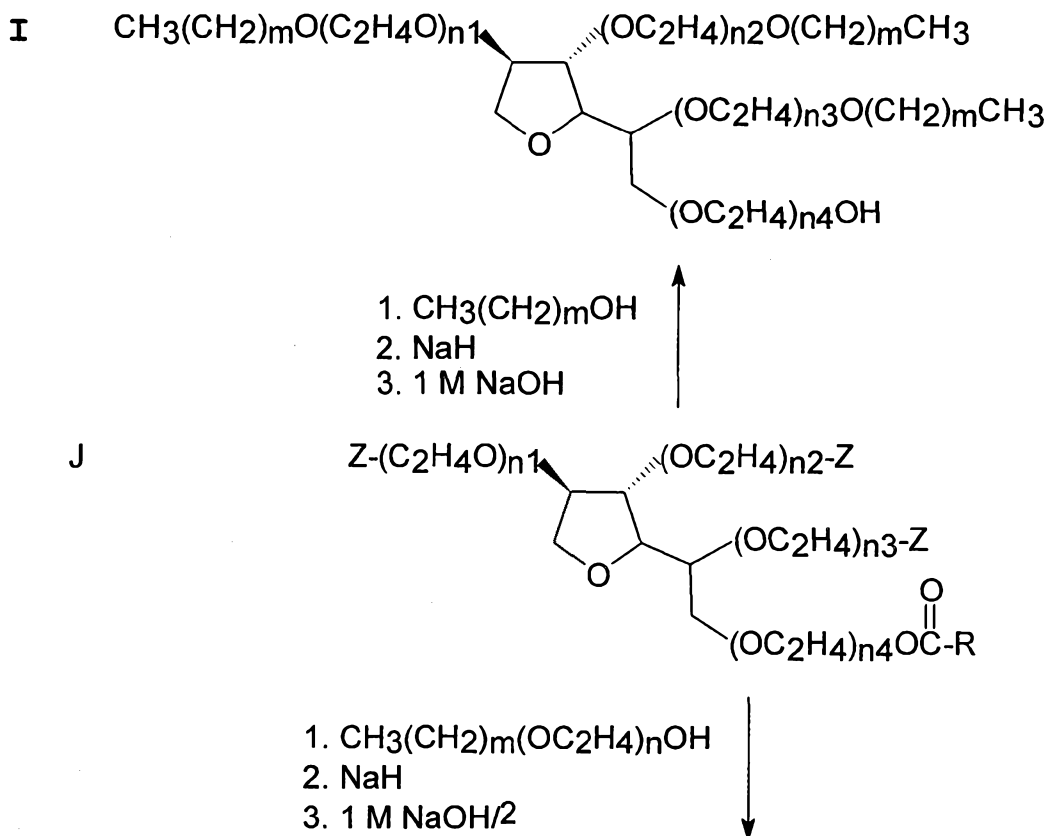
A fenti reakció és reagens csak szemléltetésként szolgál és nem kizárólagos jellegű; uretán képződést vagy egyéb kötéseket eredményező, más aktiváló reagensek is alkalmazhatók. A hidroxil-csoport amino-csoporttá alakítható át a szakterületen járatosak előtt ismert reagensekkel. Karboxi-csoportjainak ezt követően peptidekkel végzett kapcsolása amid-csoport képződését eredményezi.

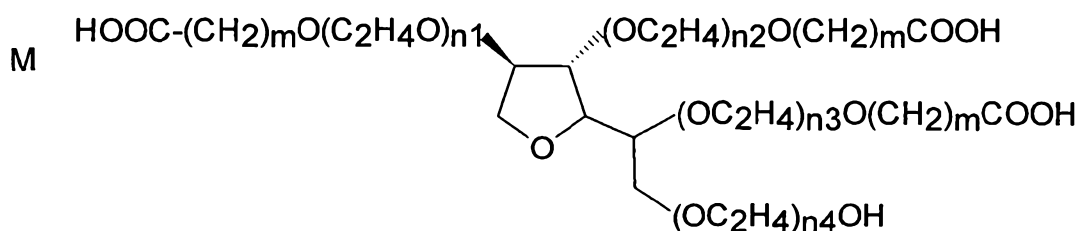
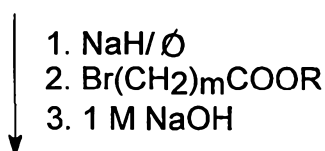
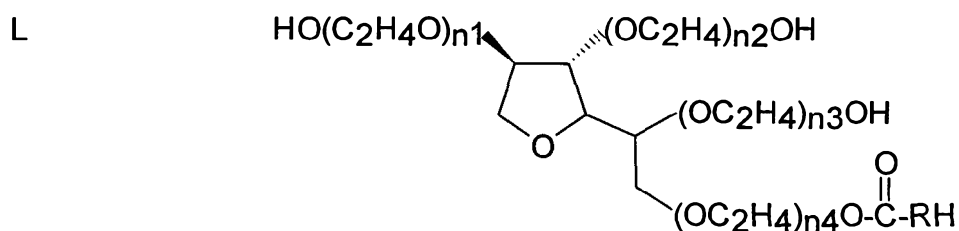
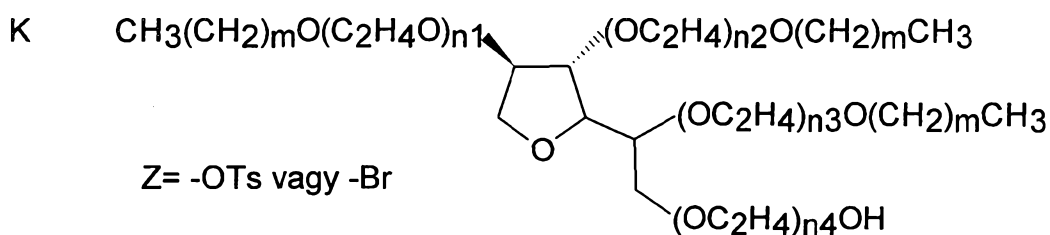
Ahol a polimer egy karboxi-csoportot tartalmaz, az vegyes anhidriddé alakítható át és a peptid amino-csoportjával reagáltatva amid-kötést tartalmazó konjugátumot képez. Egy másik eljárás-

ban a karboxi-csoport vízoldható karbodiimiddal elegyíthető és a peptiddel reagáltatva amid-kötéseket hordozó konjugátumokat nyerünk.

A peptid konjugátumok aktivitása és stabilitása sokféle módon változtatható, például a polimer/peptid molekulaarány változtatásával és másféle molekula méretű polimer alkalmazásával. A konjugátumok oldhatósága változtatható a polimer készítménybe beépített polietilén-glikol csoport arányának és méretének változtatásával. A zsírsav és polietilén-glikol csoportok gondos kombinálásával a hidrofil és hidrofób tulajdonságok kiegyensúlyozhatók.

Az alábbiakban ismertetünk néhány szemléltető módosító reakciósémát a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumaira.





Az I, J és K jelű vegyületeket magába foglaló fenti reakcióvázlatban, a bemutatott reakció utak a konjugált polimer hidrofíll/lipofíll jellege kiegyensúlyozásának módosítására szolgálnak. A konjugáló polimerben lévő észter-csoportok érzékenyek az észterázok általi hidrolízissel szemben; ezért az észtercsoportokat tartalmazó konjugáló polimerek módosíthatók, hogy az észter-csoportokat olyan észter-csoportokká alakítsuk át, amelyek jellegükben jobban ellenállnak a hidrolízisnek. Az L és M vegyületeket magába foglaló reakcióvázlat szemlélteti a hidroxicssoportoknak karboxilát-csoportokká történő átalakulását. Ebből a szempontból a karboxi-csoportok karboxilát-aniont nyújtanak, amelynek jobb a stabilizáló funkciója (ionos koordinált komplexek-

ket képezve), mint a hidroxí-csoportnak, amely nem képez ilyen komplexeket. A találmány szerinti polimer féleségeket tartalmazó, koordinált ion-komplexek képzésére szolgáló más, alkalmas anion forrással rendelkező funkciós csoport lehet a szulfát- és foszfát-csoport.

A különböző eljárások általában előnyösen alkalmazhatók a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok stabilitási jellemzőinek javítására, ideértve a polimer hidrolízisnek jobban ellenálló csoportokkal végzett funkcionálisítását; például az észter-csoportoknak éter-csoportokká történő előbb szemléltetett átalakulását; a konjugáló polimer lipofil/hidrofil egyensúlyának a módosítását, amely megfelelő a polimer által stabilizált peptidhez; és a polimer molekulatömegének a polimer által stabilizált peptid molekulatömege alkalmas szintjéhez történő hozzáigazítását.

Az értékes polialkilén-glikollal módosított polimerek — amelyek a találmány szerinti terápiás alkalmazásokhoz szolgálnak — páratlan tulajdonsága az általános biológiai kompatibilitás. A polimereknek különböző vízzoldhatósági tulajdonságaik vannak és nem toxikusak. Ezek nem antigének, nem immunogének és nem lépnek kölcsönhatásba az enzimek biológiai aktivitásával. Ezek sokáig keringenek a véráramban és könnyen kiüríthetők élő szervezetek által.

Azt találtuk, hogy a találmány szerinti termékek hasznosak a peptidek biológiai aktivitásának fenntartásában, és terápiás beadásra előállíthatók például vízben vagy elfogadható folyékony közegben végzett oldással. A beadás történhet vagy parente-



rálisan vagy orálisan. Finom kolloid szuszpenziók készíthetők a parenterális beadásra, hogy hosszan tartó hatást érvünk el, vagy beadhatók orális úton is.

A száraz, liofilizált állapotban a találmány szerinti peptid-polimer konjugátumoknak jó a tárolási stabilitása; a találmány szerinti konjugátumok oldat formájú gyógyszerkészítményeire is jellemző a jó tárolási stabilitás.

A találmány szerinti terápiás hatású polimer-peptid konjugátumok alkalmazhatók bármilyen állapot vagy betegség körülmény megelőzésére vagy kezelésére, amellyel szemben a peptid alkotórész hatásos.

Ezen túlmenően a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok alkalmazhatók alkotórészek, állapotok vagy betegség helyzetek diagnózisára biológiai rendszerekben vagy mintákban, valamint diagnózis céljaira nem-fiziológiás rendszerekben.

Továbbá, a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok alkalmazhatók állapot(ok) vagy betegség helyzet(ek) megelőzésében vagy kezelésében növényi rendszereknél. Például a konjugátum peptid komponense inszekticid, herbicid, fungicid, és/vagy peszticid hatással rendelkezhet, így megfelel különböző növényi rendszerekben való alkalmazásra.

Továbbá, a találmány szerinti konjugátumok peptid komponense antitest vagy antigén tulajdonságú lehet, diagnosztikai, immunológiai, és/vagy vizsgálati célokra.

A terápiás alkalmazásban a találmány kezelési eljárást tervez állatok számára, amelyek ilyen állapot(ok)ban vagy betegség helyzet(ek)ben vannak, vagy látens módon ilyenekre fogékonyak,



és igénylik az ilyen kezelést; a kezelés abból áll, hogy a találmány szerinti polimer-peptid konjugátum hatásos mennyiségét adjuk be az állatnak, amely terápiásan hatásos a fentebb említett állapotra vagy betegség helyzetére.

A találmány szerinti polimer-peptid konjugátumokkal kezelt betegek lehetnek mind emberek, mind állatok (például madarak, kutyák, macskák, tehenek, lovak), előnyösen emlős betegek, és a legelőnyösebben emberek.

A leküzdendő specifikus állapottól vagy betegség helyzettől függően, az állatoknak a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok bármilyen alkalmas, terápiásan hatásos és biztonságos adagban beadhatók, ami a szakterületen járatosak által könnyen és szükségtelen kísérletezgetés nélkül meghatározható.

Az (1) általános képletű vegyületek alkalmas dózisa a terápiás hatás elérése céljából általában 1 mikrogramm (μg) és 100 milligramm (mg) per kg beteg testtömeg per nap, előnyösen 10 μg és 50 mg per kg testtömeg per nap, és a legelőnyösebben 10 μg és 50 mg per kg testtömeg per nap között vannak. A szükséges dózist előnyösen kettő, három, négy, öt, hat vagy több adózisban adjuk be, alkalmas időszakonként a nap folyamán. Ezek az adózisok egységdózisok formájában adhatók be, amelyek például 10 μg és 1000 mg, előnyösen 50 μg és 500 mg, és a legelőnyösebben 50 μg és 250 mg közötti mennyiségben tartalmazzák a hatóanyagot egységdózisonként. Más módszer szerint, ha a beteg állapota úgy kívánja, a dózisok folyamatos infúzióval is beadhatók.

A beadás módja és a dózis formája természetesen befolyásolja a hatóanyagok terápiás mennyiségeit, amelyek szükségesek és ha-

tásosak az adott kezelés alkalmazásánál.

Például az orálisan beadott dózisok mennyisége jellemzően legalább a kétszerese, például 2-10-szerese, a parenterális beadásnál alkalmazott mennyiségeknek, ugyanabból a hatóanyagból.

A találmány szerinti polimer-peptid konjugátumok beadhatók önmagukban, valamint gyógyszerészetileg elfogadható észterek, sóik és egyéb, fiziológiásan funkcionális származékaik alakjában.

A találmány olyan gyógyszerkészítményeket is nyújt, mind állatgyógyászati, mind humán alkalmazásra, amelyek hatóanyagként egy vagy több, a találmány szerinti polimer-peptid konjugátumot tartalmaznak.

Ezért az ilyen gyógyszerészeti- és gyógyszerkészítményekben a hatóanyagot előnyösen egy vagy több gyógyszerészetileg elfogadható vivőanyaggal és adott esetben bármilyen egyéb gyógyhatású alkotórésszel együtt alkalmazzuk. A vivőanyag(ok)nak elfogadható(k)nak kell lenniük abba az értelemben, hogy kompatibilisnek kell lenniük a készítmény egyéb alkotórészeivel és nem szabad indokolatlanul veszélyt jelenteniük a gyógyszereszedők számára. A hatóanyagot olyan mennyiségben kínáljuk, hogy az hatékonyan érje el a szükséges és fentebb említett farmakológiai hatást, és olyan mennyiségben, amely alkalmas módon teszi ki a szükséges napi dózist.

A gyógyszerkészítmények közé tartoznak azok, amelyek alkalmassak a parenterális, valamint nem-parenterális beadásra, és a specifikus beadási módok közé tartozik az orális, rektális, bukkális, helyi, nazális, szemészeti, szubkután, intramuszkulá-

ris, intravénás, transzdermális, intratekális, intraartikuláris, intraartériás, intraarachnoid, brochiális, limfatikus, vaginális és intrauterin beadás. Előnyösek az orális és parenterális beadásra alkalmas gyógyszerkészítmények.

Amikor egy folyékony oldatból álló gyógyszerkészítményben alkalmazzuk a hatóanyagot, ez a gyógyszerkészítmény előnyösen orálisan vagy parenterálisan adható be. Amikor a hatóanyagot folyékony szuszpenzióban vagy porként alkalmazzuk egy biológiailag kompatibilis vivőanyagot tartalmazó gyógyszerkészítményben, a gyógyszerkészítmény előnyösen orálisan, rektálisan vagy bronchiálisan adható be.

Amikor a hatóanyagot közvetlenül alkalmazzuk porított szilárd anyag formájában, előnyösen a hatóanyag orálisan adható be. Más módszer szerint beadható bronchiálisan a port egy vivőgázban elporlasztva, így a por egy gázzal alkotott diszperzióját képezzük, amelyet a beteg egy alkalmas porlasztóból álló készülékből belélegez.

A találmány szerinti hatóanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmények előnyösen egységdózis formában készíthetők és ezek a gyógyszerész szakmában ismert bármilyen eljárással előállíthatók. Ezek az eljárások általában magukba foglalják azt a lépést, amikor a hatóanyag(ka)t egy vivőanyaggal társítják, amely egy vagy több kiegészítő alkotórészt képez. Jellemző módon a gyógyszerkészítményeket úgy állítják elő, hogy egyenletesen és alaposan összedolgozzák a hatóanyag(ka)t egy folyékony vivőanyaggal, egy finoman elosztatott szilárd vivőanyaggal, vagy mindkettővel, és ezután, szükség esetén, kialakítják a terméket a kívánt



gyógyszerkészítmény adagolási formáira.

A találmány szerinti, az orális beadásra alkalmas gyógyszerkészítmények különálló egységekként készíthetők el, ilyenek a kapszulák, tasakok, tabletták vagy hosszúkás tabletták, mindegyik a hatóanyag előre meghatározott mennyiségét tartalmazza porként vagy granulaként; vagy lehet vizes folyadékkal vagy nem-vizes folyadékkal készített szuszpenzió, például szirup, elixír, emulzió vagy kanalas orvosság.

A tabletták készülhet présseléssel vagy öntéssel, adott esetben egy vagy több kiegészítő alkotórésszel. A préselt tabletták előállíthatók egy alkalmas gépen végzett présseléssel, amelynél a hatóanyag szabadon folyó formában van jelen porként vagy granulaként, amelyet adott esetben egy kötőanyaggal, szétesést elősegítő anyaggal, siklató szerrel, inert hígítószerrel, felületaktív szerrel, vagy felszabadító szerrel keverünk. A porított hatóanyagnak egy alkalmas vivőanyaggal készült keverékét tartalmazó öntött tabletták egy alkalmas gépen végzett öntéssel állíthatók elő.

A szirup úgy készíthető, hogy a hatóanyagot egy cukor, például szacharóz, tömény vizes oldatához adjuk hozzá, amelyhez bármilyen egyéb kiegészítő alkotórészt is hozzáadtunk. Az ilyen kiegészítő alkotórész(ek) lehet(nek) ízesítőszer, alkalmas tartósítószer, a cukor kristályosodását késleltető szer és olyan anyagok, amelyek bármelyik egyéb alkotórész — ilyen a polihidroxialkohol, például glicerín vagy szorbitol — oldhatóságát növelik.

A parenterális beadásra alkalmas gyógyszerkészítmények alkal-



mas módon a hatóanyag steril vizes készítményét tartalmazzák, amely előnyösen a kezelt beteg vérével izotóniás (például izotóniás sóoldat). Az ilyen gyógyszerkészítmények szuszpendáló szereket és sűrítő szereket vagy egyéb mikroszemcsés rendszereket tartalmazhatnak, amelyeket arra terveztek, hogy a hatóanyagot a vér alkotórészeibe, vagy egy vagy több szervbe célba juttassák. A gyógyszerkészítmények készülhetnek egység dózisos vagy több dózisos formában.

A nazális aeroszol gyógyszerkészítmények a hatóanyagok tisztított vizes oldatait tartalmazzák tartósító szerekkel és izotóniás szerekkel társítva. Az ilyen gyógyszerkészítményeket előnyösen egy bizonyos pH értékre állítják be és izotóniás állapotuk kompatibilis az orr nyálkahártya membránjával.

A rektális beadásra szolgáló gyógyszerkészítmények kúp formájában készülhetnek, egy alkalmas vivőanyaggal, például kakaóvajjal, hidrogénezett zsírokkal vagy hidrogénezett zsír-karbonsavval társítva.

A szemészeti gyógyszerkészítményeket a nazális aeroszolhoz hasonló módszerrel állítjuk elő, annak kivételével, hogy a pH értéket és az izotóniás faktorokat előnyösen a szemhez alkalmazkodva állítjuk be.

A helyileg alkalmazott gyógyszerkészítmények a hatóanyagot egy vagy több olyan közegben oldva vagy szuszpendálva tartalmazzák, mint az ásványolaj, petróleum, polihidroxialkoholok vagy egyéb, a helyi alkalmazásra szolgáló készítményekben használt bázisok.

A fentebb említett alkotórészekon kívül, a találmány szerinti



gyógyszerkészítmények további egy vagy több kiegészítő alkotórészt tartalmazhatnak az alábbiak közül választva: hígítószer, pufferek, ízesítő szerek, szétesést elősegítő szerek, felületaktív anyagok, sűrítők, siklató szerek, tartósítók (ideértve az antioxidánsokat) és hasonlókat.

A találmány szerinti nem terápiás alkalmazásokban a polimer-peptid konjugátum egy kovalens módon kapcsolt vagy másféle, nem-kovalens kötésű kapcsolatot használhat fel a peptid és a polimer komponensek között. Továbbá, a társítva kapcsolt peptid és polimer komponensek alkalmazhatók a terápiás hatású peptid készítmények beadásánál, alkalmas beadási eljárásokkal, amelyeket fentebb szemléltető módon írtunk le, a találmány kovalens módon kapcsolt polimer-peptid konjugátumainak szemléltető ismertetésével kapcsolatban.

Az ilyen nem terápiás, társítva kapcsolt peptid-polimer gyógyszerkészítményekben, a peptid és polimer komponensek kezdetben együtt formulázhatók, hogy nagyobb stabilitást és bomlással szembeni ellenállást nyerjünk; más módszer szerint ezek a komponensek például különálló részei lehetnek egy több alkotórészből álló készítménynek, amelyet a felhasználáskor keverünk össze, és amely a polimer és peptid közötti társító kötés hiányában a kapott keverékben fogékony lesz a gyors romlásra vagy egyéb lebomlásra. Tekintet nélkül a társítva kapcsolt peptid és polimer gyógyszerkészítmény formájára, a találmány tervez egy összefüggő társítást, amely a peptid néhány tulajdonságát vagy állapotát javítja, vagy másképpen növeli ennek használhatóságát ahhoz a peptid komponenshez viszonyítva, amelynek nincsen ilyen



társító polimere.

Ennek megfelelően, a találmány alkalmas polimereket kíván nyújtani az oldatban lévő peptidek in vitro stabilizálásához, a nem-terápiás alkalmazás előnyös szemléltető alkalmazásaként. A polimerek alkalmazhatók például a peptid hő-stabilitásának és az enzimatis bomlással szembeni ellenálló képességének növelésére. A peptid hő-stabilitási tulajdonságának növelése a találmány szerinti konjugálás révén lehetőséget nyújt az eltarthatóság, a szobahőmérsékleti stabilitás, valamint a diagnosztikai és kutatási reagensek és kitek, például immunoassay kitek, tartósságának javítására. Különleges példa révén a lúgos foszfatáz kovalens vagy társító módon egy alkalmas polimerhez kapcsolható a találmánnyal összhangban, hogy stabilitást adjon az ilyen foszfatáznak, amikor ezt reagensként alkalmazzák a biológiai folyamatokban lévő antitest vagy antigén kolorimetriás kimutatásához.

Az alábbi példák a találmány szemléltetését szolgálják, és ezeket nem kell korlátozó jellegűeknek tekinteni.

Példák

Az LCRF-amfifil polimer konjugátum előállítható és tesztelhető a CCK-felszabadító aktivitásra. Ekkor az LCRF konjugátumnak értékelhető a proteolízissel szembeni ellenálló képessége. A fiziológiás és viselkedési hatások in vivo állatkísérletekben erősíthetők meg.

Egy LCRF amfifil polimer konjugátum előállítása

Különböző méretű és kémiai összetételű amfifil oligomerek vagy polimerek alkalmazásával a peptid konjugátum abszorpciós és megoszlási tulajdonságai megváltoztathatók. Előnyös, hogy az



LCRF peptidhez kapcsolt polimerek ne lépjenek kölcsönhatásba a receptor kötéssel. Az LCRF és receptora közötti kölcsönhatás pontos természete nem ismert, de történt két megfigyelés a kölcsönhatással kapcsolatban: a 11-25 maradékok döntőek a kölcsönhatás szempontjából, és a 19 és 20 maradékok közötti felnyitás tönkreteszi a kötés aktivitását. Ezért egy hidrolizálható kötést fogunk alkalmazni a K19-nél, hogy a peptidet a tripszin proteolízistól megvédjük.

A találmány szerinti konjugátumoknak két komponensük van (PEG és alkil-lánc), amely két hasznos tulajdonságot nyújt az LCRF-nek. Először, nagy, elágazó oligomert alkalmazva a N-végpontnál, megakadályozzuk a szernek a bélből a véráramba történő felvételét. Ebből a célból 5-10 kD-os oligomert adunk a N-végpontra, mivel a 4 kD-osnál nagyobb molekulatömegű molekulák nem jutnak át a bél falon a véráramba, hanem visszamaradnak a lumenben. Másodszor, a hidrofób alkil-lánc a bél felhámjának sejt membránjaiba be tud épülni, a peptidet szoros közelségbe hozva cél-receptorával a felhám sejt felszínén. Előnyös, hogy a PEG/alkil konjugátumot a N-végponthoz kapcsoljuk, távol a receptor kötésbe foglalt maradékoktól.

Az LCRF első 35 maradéka (az LCRF aminosav-szekvenciája: STFWAYQPDGDNTPDYQKYEHTSSPSQLLAPGDYPCVIEV) szilárd fázisú eljárásokkal előállítható és a kereskedelemben beszerezhető. Az LCRF konjugáció eljárásai három alapvető sémát követnek, amelyeket a 2. ábrán foglalunk össze.

Az LCRF két reaktív amino-csoportot tartalmaz, amelyek alkalmazhatók a konjugátumnak az amino-végponthoz és egy lizin oldal-

lánchoz való kapcsolására. Az 1. konjugátum (1. konjugátum) egy 4-10 kD átlagos molekulatömegű elágazó oligomert alkalmazhat, amely egy nem hidrolizálható kötéssel kapcsolódik az LCRF N-végpontjához. Ennek a konjugátumnak három kulcsfontosságú jellemzője van. Először, a N-végponton lévő oligomerek disztálisan helyezkednek el az LCRF ismert receptor-kötési helyéhez képest, és így valószínűtlen, hogy károsítják annak biológiai hatását. Másodszor, az N-végponton lévő elágazó oligomer sztérikusan gátolja az amino-peptidázokat, amelyek máskülönben lebontanák a peptidet. Harmadszor, az elágazó oligomerek mind szélsőséges vízoldhatóságot, mind erősen megnagyobbodott méretet nyújtanak az LCRF konjugátumnak, amely megakadályozza, hogy a peptid keresztül hatoljon a vékonybél felhámjának falán.

A 2. konjugátum az 1. konjugátumnál leírt N-végponti konjugátumot, és egy második, a K19 epszilon-amino-csoportjához kapcsolt konjugátumot alkalmazhat. Ez a lineáris oligomer egy hidrolizálható kötéssel kapcsolódhat úgy, hogy — bizonyos idő múlva — az oligomer hidrolizál és lehetővé teszi, hogy az LCRF receptorához kapcsolódjék. A K19 a vélelmezett receptor-kötési szekvencia közelítő centrumában van. A 2. konjugátum kulcsfontosságú jellemzői, az 1. konjugátumnál leírtakon kívül azok, hogy egy hidrolizálható oligomert addíciónál a K19-nél, amely védelmet nyújt a tripszin hidrolízissel szemben. Másodszor, az oligomer hidrolizálható kötése lehetővé teszi az alkalmas receptor kötését. Harmadszor, az oligomer lassú hidrolízise a K19-nél (várhatóan $T_{1/2} = 30-60$ perc) meghosszabbított hatástartamot nyújthat az LCRF-nek. A 3. sémán a C-végponton, N-végponton és a

K19-nél van egy-egy konjugátum. A C-végponton lévő maradék (tirozin) lizinné alakul, így egy harmadik helyet nyújt a konjugáláshoz. Nem várható, hogy az a mutáció megváltoztatja a receptor kötést, mivel a kötési terület a 35 maradék közül legalább 10-nél megglelhető. Az amfifilitás egyensúlyát egy elágazó oligomer helyett három lineáris polimer alkalmazásával valósítjuk meg. Egy hidrolizálható oligomernek a C-végpontra történő hozzáadása ellenállást biztosít a karboxipeptidázok általi bomlással szemben. Az összes oligomernek hidrolízissel végzett eltávolítása regenerálja az aktív LCRF teljes biológiai aktivitását. Az oligomerek hidrolízise (várhatóan $T_{1/2} = 30-60$ perc) meghosszabbíthatja az LCRF hatását.

A 3. ábrán mutatjuk be az LCRF konjugátum szintézisének reakcióvázlatát. Az oligomer karboxil-alkanoloikat brómmal aktiváljuk és észterifikáljuk. Az oligomer PEG-t ezután az aktivált alkán oligomerekhez kapcsoljuk. A PEG/alkán-karbonsavnak a peptid szabad amionsavjához való kapcsolását N-hidroxí-szukcinamiddal vízes oldatban olyan pH értéknél végezzük, ahol az amino-csoport nukleofil. Az előzetesen szintetizált és tisztított oligomereket aktiváljuk és az LCRF-hez kapcsoljuk változó reakciókörülmények mellett, amelyek lehetővé teszik az oligomereknek bizonyos helyekhez (N-terminális, C-terminális vagy K19) való kapcsolását. A konjugációs reakciók és a termék tisztítása szekvenciáját is alkalmazni lehet bizonyos specifikus konjugációs sémák megvalósítására. A N-végponton lévő amino-csoportnak a lizin oldalláncon kialakuló szelektivitása a reakcióelegy pH-jának megválasztásával valósítható meg. A N-végponthoz történő kapcsolást ($pK_a \sim 8$)

9-es pH-nál végezzük, ahol az epszilon-amino-csoport ($pK_a \sim 10,6$) még protonozott.

Az alkán (hidrofób) és a PEG (hidrofil) komponensek viszonylagos hosszának változtatásával a konjugátum amfifilitása és oldat szerkezete optimalizálható.

A reakcióelegyet egy preparatív HPLC oszlopon (C-18) tisztítjuk, izopropanol/víz (0,1 % trifluor-ecetsav) elegyből készült oldószer gradiens rendszerrel. Az oldószert csökkentett nyomáson és 20 °C alatti hőmérsékleten ledesztilláljuk és így kapjuk a száraz terméket. A termék tisztaságát fordított fázisú HPLC-vel és tömegspektrometriával elemezzük.

A sejt alapú vizsgálatok gyors eszközt nyújtanak az LCRF konjugátumok biológiai aktivitásának megerősítéséhez (ilyen például a konjugátumok azon képessége, amely kiváltja a CCK felszabadulását a CCK-felszabadító sejtekből).

A sejt alapú vizsgálatok alkalmazhatók arra, hogy összehasonlítsuk a konjugátumainkkal és a vivőanyaggal végzett kezelés hatását. A természetes LCRF körülbelül 300 %-os növekedést vált ki a CCK kiválasztásban. Az a célunk, hogy konjugátumainkkal legalább 200 %-os növekedést váltsunk ki a CCK kiválasztásban. Várhatóan kísérletenként hat vizsgálat statisztikailag jelentős eredményeket fog nyújtani.

A természetes CCK sejtek a következőképpen állíthatók elő: vékonybél nyálkahártya sejteket készítünk 200-225 g hím és nőstény Sprague-Dawley patkányokból. Az állatok leölése után a vékonybélnek a test középpontjához közelebb eső 10 cm-es részét, amely 2 cm-re kezdődik a pilorusztól távolabbi részen, gyorsan

eltávolítjuk, és azonnal sóoldatba helyezzük és mossuk. A vékonybelet rövid darabokra vágjuk, kifordítjuk, és foszfáttal pufferolt sóoldatba (PBS) helyezzük. A nyálkahártyás felületet PBS-sel kétszer öblítjük és tripszin-mentes disszociációs közegbe helyezzük 37 °C-on, és 2 percen át lassan kevertetjük. Az oldatot (oldószert?) eltávolítjuk és friss disszociációs közeggel cseréljük fel, és további 10 percen át inkubáljuk lassú kevertetés mellett. A visszamaradó szuszpenziót szűrjük (450 µm) és a szűrletet centrifugáljuk (1000 ford/perc, 3 perc). A szemcsét újra szuszpendáljuk Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldatban HEPES-sel (10 mM; pH 7,4) (HHBSS) és a fentiek szerint centrifugáljuk. A szemcsét újra szuszpendáljuk 5 ml HEPES-ben és alikvot részekre osztjuk a vizsgálat céljaira.

A konjugátumok aktivitása az alábbiak szerint mérhető: CCK sejteket inkubálunk a vizsgálati vegyületekkel (vagy vivőanyaggal) 5 és 40 perc közötti időszakokon át. Az inkubálást a sejteket jégre helyezésével megállítjuk, a sejteket centrifugáljuk, és a felülúszót eltávolítjuk. A hidrolizálható kötéseket tartalmazó konjugátumoknál az inkubálást, 5, 10, 15, 20, 30 és 40 perc múlva megállítjuk. A hidrolizálható kötéseket nem tartalmazó konjugátumoknál csak egyetlen időpontra (15 perc) van szükség. A felülúszót alkalmazzuk a fent leírt CCK RIA méréseire. 50 µl felülúszót megvizsgálunk HPLC-vel és a MALDI-TOF tömegspektrométerrel, hogy megmérjük a visszamaradó LCRF konjugátumok mennyiségét.

A radioimmunassay (RAI) alkalmazható a CCK kiválasztás mérése. A kiválasztást 24 vájatos mikrotiter lemezre helyezett

CCK-felszabadító sejtekből mérjük. A sejteket 37 °C-on inkubáljuk és HEPES-t tartalmazó HHBSS-sel mossuk (10 mM, pH 7,4). 0,5 ml puffert adunk, a vizsgálati szerekkel együtt vagy azok nélkül, a sejtekhez 5-40 perc alatt. 350 µl-t eltávolítunk, centrifugáljuk, és jégre helyezzük vagy fagyasztjuk. A mintából 350 µl-t használunk fel az RIA-hoz. Az RIA-t HEPES-t (10 mM, pH 7,5), 0,1 % gamma-globulint és 0,01 % nátrium-nitridet tartalmazó PBS-ben végezzük. A mintából 50 µl-t hozzáadunk 200 µl RIA pufferhez és 100 µl 1:80000 hígítású nyúl CCK antitesthez (OAL-656). Ezután 100 µl ^{125}J -CCK-8-at (3000-4000 cpm) adunk a kémcsövekbe 4 °C-on 12 órára. A mintákat kecske anti-nyúl IgC szefaróz CL4B szemcsékkel reagáltatjuk egy órán át, lassú kevertetés mellett. A szefaróz szemcséket ezután rövid centrifugálással szemcsésítjük és a szemcsét leszívátjuk. A szemcsét újra szuszpendáljuk 0,5 ml HEPES-sel pufferolt sóoldatban, és a szemcséket ismét szemcsésítjük. A szemcséket ezután eltávolítjuk, mossuk és egy gamma-számlálóban 5 percen át számláljuk. A konjugátatlan LCRF körülbelül 300 %-os növekedést idéz elő a CCK kiválasztásban a természetes CCK és STC-1 sejtekből, és ezt a sejt vizsgálat pozitív kontroljaként fogjuk alkalmazni.

Hidrolizálható konjugátumokat tartalmazó vizsgálati vegyületek esetén, a CCK felszabadulás (RIA) korrelálható a konjugátum hidrolízisével (HPLC-MS).

A konjugátum pontos természete optimalizálható, hogy a szükséges tulajdonságokat biztosítsuk. A N- és C-végponti konjugálás megközelítését tesztelni fogjuk, hogy lássuk: vajjon a N- vagy C-végponti konjugálás, vagy mindkettő biztosítja-e a legjobb vé-



delmet és biológiai aktivitást.

Amikor LCRF-et juttatunk be patkányok duodenumjába, a pankreász protein output kétfázisú dózis-reakció görbéje figyelhető meg, az LCRF nagyobb dózisa csökkent mértékű pankreász protein outputhoz vezetnek. Az alkalmas konjugátum koncentrációk könnyen meghatározhatók a szakterületen jártasok által — figyelembe véve a közleményt — és ez 1-től 1000 mM-ig terjedhet.

Úgy véljük, hogy a CCK kiválasztást negatív visszacsatolási gátlás szabályozza. Az LCRF lényeges módon a patkányok duodenumában képződik, és embernél pedig reakcióként a táplálékokra. Amikor táplálék nincsen jelen, az LCRF-et a duodenumban a proteázok lebontják. Mivel a tripszin inhibitorok duodenumba történő bejuttatása elegendő ahhoz, hogy növekedést váltson ki patkányoknál a CCK felszabadulásban, azt javasoljuk, hogy a tripszin általi felnyitással szembeni védelem elegendő lesz az LCRF konjugátumnak a proteolitikus emésztéstől való megvédésére. Konjugálási eljárásunkat sikeresen alkalmaztuk a kalcitonin és inzulin proteolízistől való megvédésére.

A konjugált LCRF-nek a vékonybélben fennálló körülmények közötti stabilitása meghatározható, ha megvizsgáljuk a peptideknek a proteolitikus enzimekkel — tripszin, pankreász elasztáz és kimotriposzin — szembeni 40 perces stabilitását, ez jellegzetes tartózkodási idő a bélben. A konjugált LCRF oldatokat 37 °C-on inkubáljuk [0,1 % Tween 20 (tömeg/térf), 10 mM nátriumhidrogén--foszfát, pH 7,4] és proteázokat adunk hozzájuk. Szükség esetén Tween-t (0,1 %) adunk hozzá a peptidek oldhatóvá tételére. A proteolízist úgy szakítjuk meg, hogy a pH-t 2-3-ra ál-

lítjük. A kapott mintákat HPLC-vel különítjük el, 5 μ l-t, és C-18 oszlopot alkalmazva; és 25 percen át eluáljuk 0,5 ml/perc sebességgel, a lineáris gradiens 90 % víz/0,1 % trifluor-ecetsav és 10 % izopropil-alkohol volt, amit 60 % izopropil-alkoholra növeltünk.

A konjugált LCRF stabilitása a gyomorban meghatározható, ha megvizsgáljuk a peptideknek a pepszinnel szembeni stabilitását. A konjugált LCRF pepszines lebomlását egy szimulált gyomornedvben (33 mM nátrium-klorid, pH 1,2) határozzuk meg. A peptid oldatokat 37 °C-on inkubáljuk és pepszint adunk hozzájuk. A proteolízist úgy szakítjuk félbe, hogy a pH-t 7,0-7,5-re növeljük.

A HPLC alkalmazható a proteolízis nyomon követésére. Az abszorpciós csúcsok (280 nm) alatti területet integráljuk, hogy kövessük a proteolízis időbeni sebességét. A felnyitatlan LCRF konjugátumokból származó, a csúcs alatti integrált területben bekövetkező csökkenés alkalmazható a hidrolízis sebességének nyomon követésére. A HPLC-vel végzett elválasztást úgy végezzük, amint azt fentebb leírtuk a konjugált LCRF tisztítására az 1. specifikus célban.

Kimotripszines felnyitási helyek vannak az Y17 és Y20 maradékoknál. Amennyiben a kimotripszin gyorsan nyitja fel a peptidet, védőhatású PEG csoportot viszünk a tirozin hidroxici-csoportjára olyan kötéssel, amely lassan hidrolizál 7,4-es pH-nál. Elasztáz felnyitási helyek vannak az 5, 10, 29, 30 és 31 maradékoknál. Ezek a maradékok a szakaszon kívül vannak (11-25), és igen fontosak a receptor kötés szempontjából. Amennyiben szükséges, egy gyomorban oldódó bevonattal védelem nyújtható a gyomornedvvel



szemben, amely kialakult eljárás a gyógyszeriparban.

A találmány előnyös szempontjából a konjugátumok az alapszintű kiválasztáshoz viszonyítva legalább 200 %-os növekedést biztosítanak a CCK kiválasztásban, amikor konjugált LCRF-fel végzünk kezelést, amint az RIA-val mérhető. A természetes LCRF körülbelül 300 %-os növekedést vált ki a CCK-nak a természetes CCK sejtekből történő kiválasztásában, és ez a vizsgálatok pozitív kontroljaként alkalmazható.

Továbbá előnyös, hogy a konjugátumokkal 70 %-osnál kisebb proteolízist tapasztaljunk az LCRF konjugátumnál, miután azokat 40 percen át tettük ki a szerin proteázok hatásának (pH 7,4). A is előnyös, hogy a konjugátumokkal 10 %-osnál kisebb proteolízist tapasztaljunk a gyomorban oldódó bevonattal ellátott LCRF konjugátumnál, miután azt 40 percen át tettük ki a szimulált gyomornedv hatásának.

A szakterületen járatosak, a közlemény segítségével állatmodellekben és humán betegeknél megerősíthetik a táplálkozásra és elhízásra vonatkozó fiziológiás és viselkedési következményeket. A patkány vékonybelét alkalmazzuk szövetforrásként a nyálkahártya CCK sejtjeinek a tisztításához. A patkányokat kizárólag arra a célra öljük le, hogy vékonybél szövetet nyerjünk. A leölést követően, a vékonybelet sebészileg eltávolítjuk, és mossuk és a vékonybél sejteket kollagenáz és EDTA diszpergálással állítjuk elő. 2,5-3 hónapos, 250-300 g-os, hím és nőstény Sprague-Dawley patkányok szolgálnak a CCK sejtek forrásaként. Közelítőleg 48 patkányra lesz szükség a javasolt vizsgálat elvégzéséhez, amellyel jelentőségteljes eredményeket kapunk. Figyelemre méltó mun-

kát végeztünk a CCK kiválasztás szabályozásával kapcsolatban patkányokon. Mindegyik patkánynak elegendő CCK sejtet kell nyújtania egy kísérlethez. A patkányokat a vékonybél szövet összegyűjtése céljából öljük le. Az eutanázia módja előnyösen a szén-dioxidos narkózis, amelynél a patkányokat szén-dioxidot tartalmazó, légmentesen zárt ketrecekben helyezzük el. Ez az eljárás megfelel az Amerikai Állatorvos Szövetség Eutanázia Bizottsága ajánlásainak.

Szabadalmi igénypontok

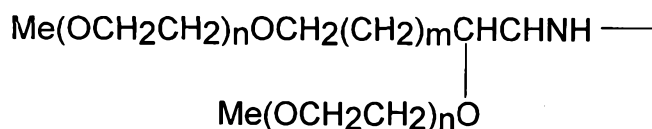
1. Vegyület, amely az alábbiakat tartalmazza:

egy luminális kolecisztokinin felszabadító faktor polipeptid; és egy elágazó, a luminális kolecisztokinin felszabadító faktor polipeptid oligomer csoport N-végpontjához kapcsolt oligomer csoport, a fentebb említett elágazó oligomer csoport molekulatömege nagyobb, mint 4000 Dalton.

2. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport hidrofil csoport.

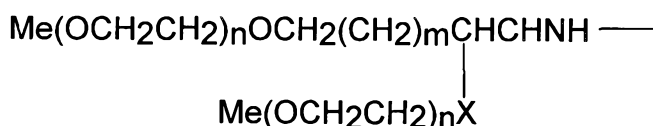
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport lipofil csoport.

4. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport képlete az alábbi:



amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van.

5. Az 1. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport képlete az alábbi:



amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van, és X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom.

6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport teljes átlagos molekulatömege 4000 és 10000 Dalton között van.

7. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport teljes átlagos molekulatömege 5000 és 10000 Dalton között van.

8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport nem hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a N-végponthoz.

9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid egy lizin maradékot tartalmaz.

10. A 9. igénypont szerinti vegyület, amely a lizin maradékhoz kapcsolt oligomert tartalmaz.

11. A 10. igénypont szerinti vegyület, amelyben az oligomer hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a lizin maradékhoz.

12. A 10. vagy 11. igénypont szerinti vegyület, amelyben az lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer lineáris oligomer.

13. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer egy liofil csoportot hordoz.

14. A 10-12. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer egy hidrofil csoportot hordoz.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az elhízás kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

16. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az étvágy csökkentésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.



17. Vegyület, amely az alábbiakat tartalmazza:

lizin maradékot tartalmazó luminális kolecisztochinin felszabadító faktor polipeptid;

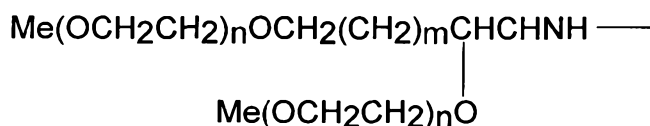
a luminális kolecisztochinin felszabadító faktor polipeptid N-végpontjához kapcsolódó elágazó oligomer csoport, a fentebb említett elágazó oligomer csoport molekulatömege nagyobb, mint 4000 Dalton; és

a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer.

18. A 17. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport egy hidrofil csoportot hordoz.

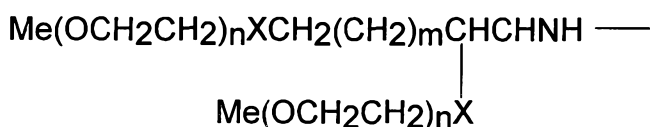
19. A 17. vagy 18. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport egy lipofil csoportot hordoz.

20. A 17. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport képlete az alábbi:



amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van.

21. A 17. igénypont szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport képlete az alábbi:



amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van, és X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom.

22. A 17-21. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport teljes átlagos molekulatömege 4000 és 10000 Dalton között van.



23. A 17-21. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport teljes átlagos molekulatömege 5000 és 10000 Dalton között van.

24. A 17-23. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az elágazó oligomer csoport nem hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a N-végponthoz.

25. A 17-24. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben az oligomer hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a lizin maradékhoz.

26. A 17-25. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer lineáris oligomer.

27. A 17-26. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer egy lipofil csoportot hordoz.

28. A 17-27. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a lizin maradékhoz kapcsolódó oligomer egy hidrofil csoportot hordoz.

29. A 17-28. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az elhízás kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

30. A 17-28. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az étvágy csökkentésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

31. Vegyület, amely az alábbiakat tartalmazza:

luminális kolecisztochinin felszabadító faktor polipeptid, amely egy első lizin maradékot és egy második lizin maradékot

tartalmaz, a fentebb megadott második lizin maradék a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid C-terminálisánál van;

egy első oligomer, amely a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid N-végpontjához kapcsolódik;

egy második oligomer, amely a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid első lizin maradékához kapcsolódik; és

egy harmadik oligomer, amely a második lizin maradékhoz kapcsolódik, az utóbbi a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid C-végpontjánál van.

32. A 31. igénypont szerinti vegyület, amelyben az első oligomer lineáris oligomer.

33. A 31. vagy 32. igénypont szerinti vegyület, amelyben az első oligomer hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid N-végpontjához.

34. A 31-33. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a második oligomer lineáris oligomer.

35. A 31-34. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a második oligomer hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid első lizin maradékához.

36. A 31-35. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a harmadik oligomer lineáris oligomer.

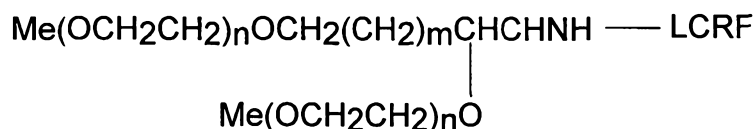
37. A 31-36. igénypontok bármelyike szerinti vegyület, amelyben a harmadik oligomer hidrolizálható kötéssel kapcsolódik a luminális kolecisztoxinin felszabadító faktor polipeptid máso-

dik lizin maradékához.

38. A 31-37. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az elhízás kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

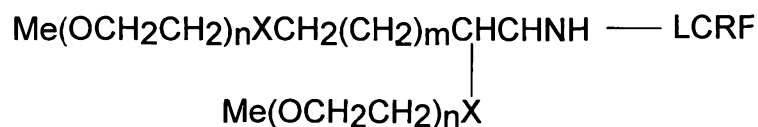
39. A 31-37. igénypontok bármelyike szerinti vegyület alkalmazása az étvágy csökkentésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

40. Vegyület, amelynek képlete az alábbi:



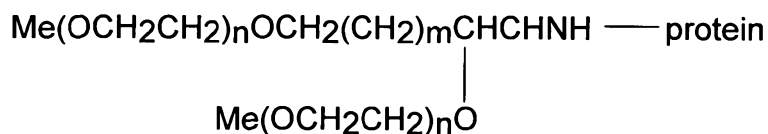
amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van.

41. Vegyület, amelynek képlete az alábbi:



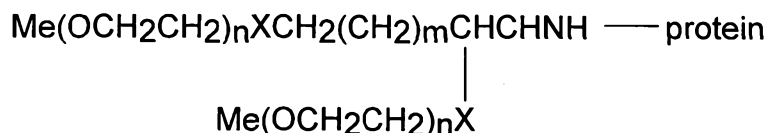
amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van, és X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom.

42. Vegyület, amelynek képlete az alábbi:



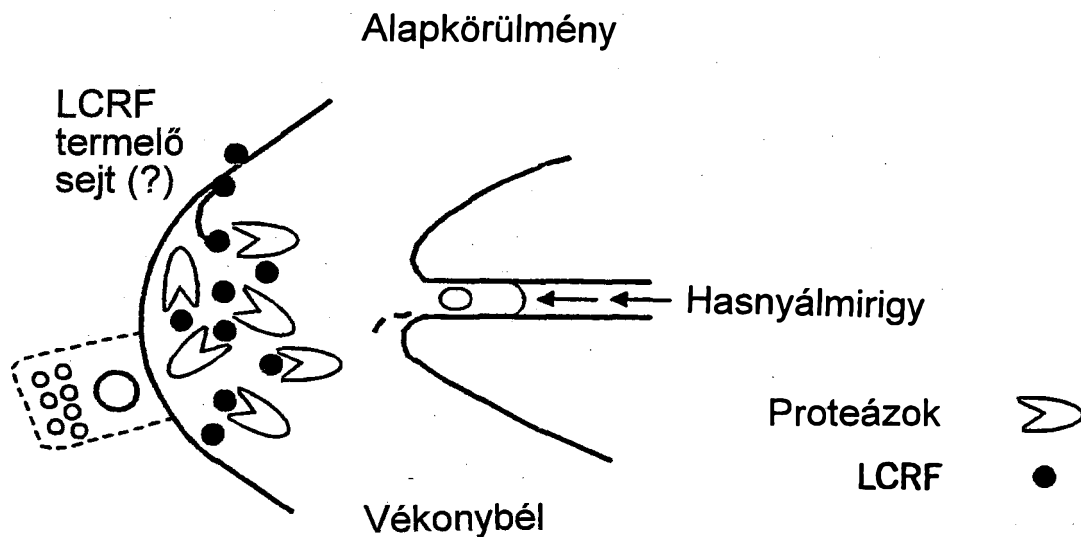
amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van.

43. Vegyület, amelynek képlete az alábbi:

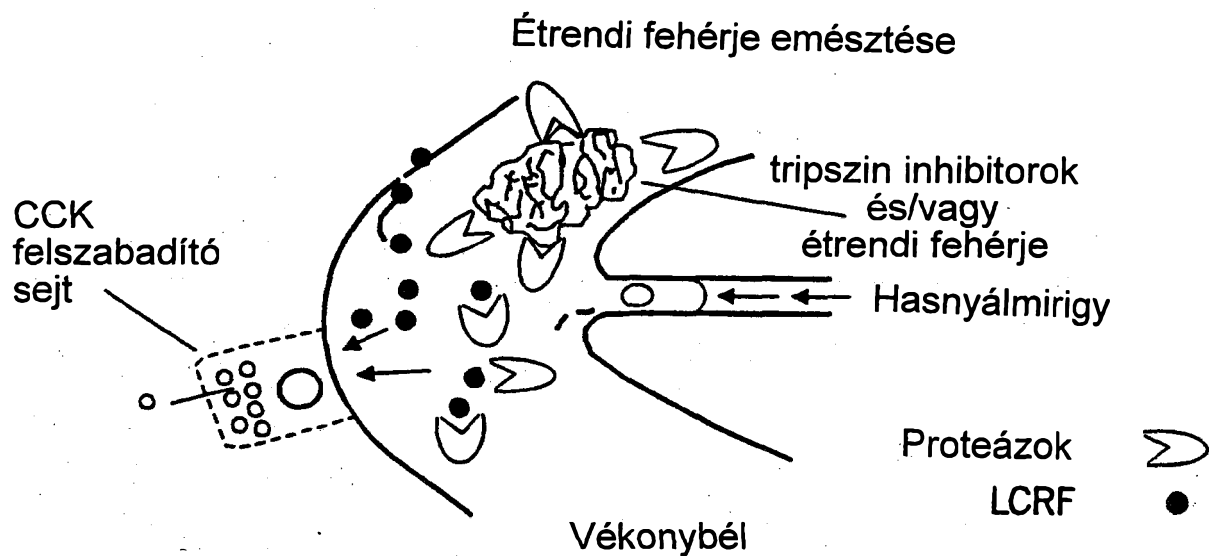


amelyben n értéke 3 és 230 és m értéke 0 és 20 között van, és X jelentése nitrogén-, oxigén- vagy kénatom.

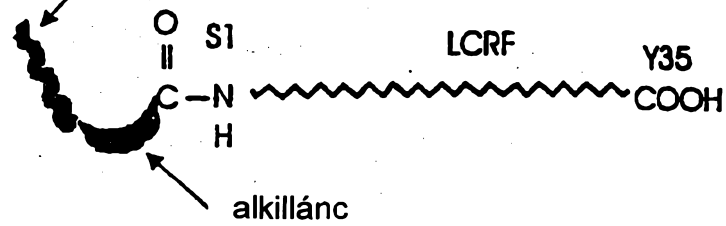
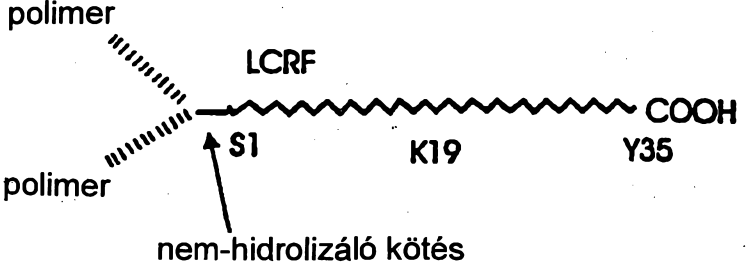
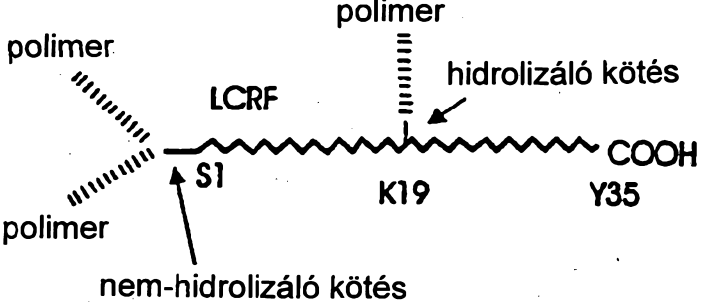
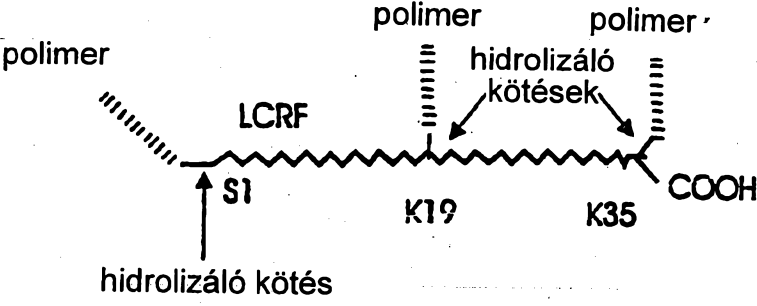
1A. ábra



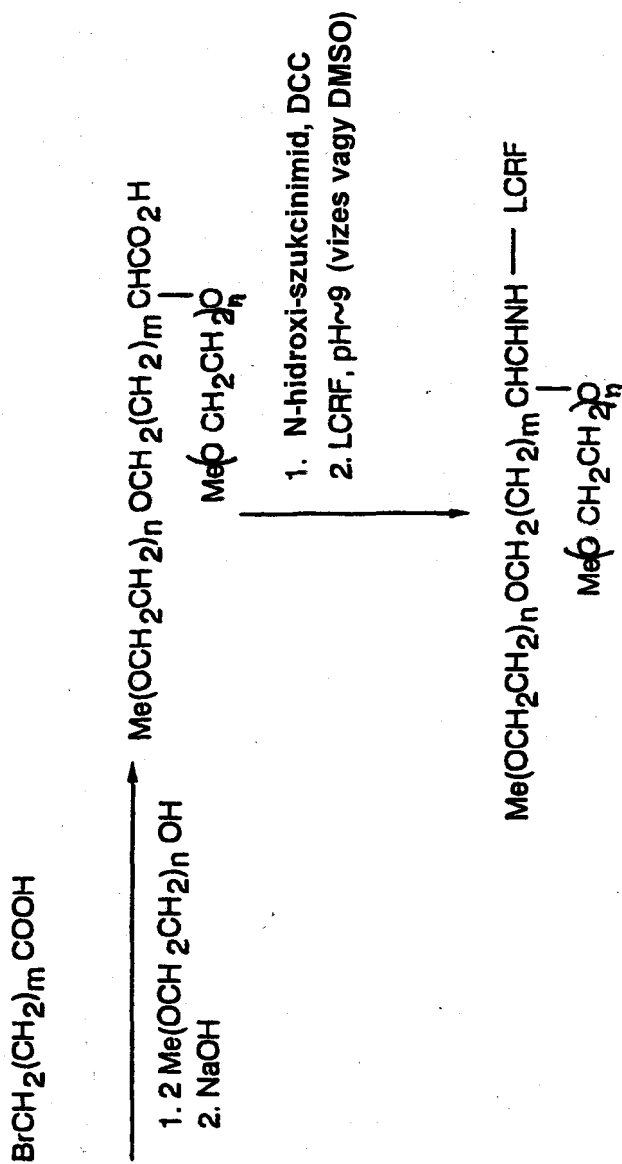
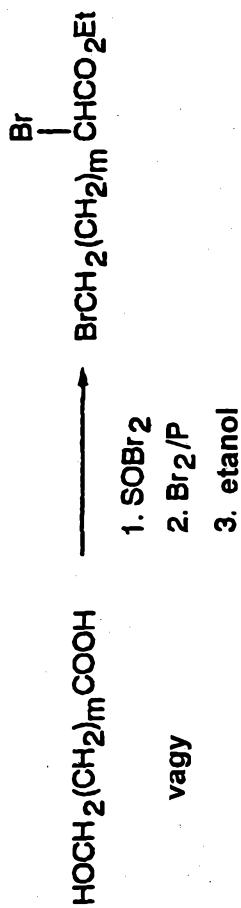
1B. ábra



2. ábra

Oligomer szerkezet hidrofób rész: alkillánc (2-22 szénatom) hidrofil rész: PEG (2-5 kD)	PEG oligomer vagy polimer  alkillánc
1. tervezet elágazó polimer az N-terminálison nem-hidrolizáló kötés, C-terminális és K19 konjugátatlan	 nem-hidrolizáló kötés
2. tervezet elágazó polimer az N-terminálison, nem-hidrolizáló kötés, K19 epsilon N-konjugált egy lineáris polimerhez hidrolizálható kötéssel, C-terminális konjugátatlan	 nem-hidrolizáló kötés
3. tervezet lineáris polimer az N-terminálison, hidrolizáló kötés, K19 és K35 epsilon-N hidrolizálható kötésekkel lineáris polimerekhez konjugálva Y35 → K35 mutáció	 hidrolizáló kötés

3. ábra



n értéke 3-tól 230-ig és m értéke 0-tól 20-ig terjed