

23800071

77747

23742

63.914/SZE

KIVONAT

**NYELVI  
KÖZZÉTÉTEL**

A BDNF és az NT-3 konjugátumai vízoldható  
polimerrel képezett konjugátumai

Amgen Inc., THOUSAND OAKS, California, US

A bejelentés napja: 1995. 11. 13.

Elsőbbsége: 1994. 11. 14. (08/340,131) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/04658

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/15146

A találmány tárgyát olyan BDNF és NT-3 származékok képezik, amelyekben a polipeptidek reakcióképes (azaz "aktivált") vízoldható polimer egységgel reagálnak, és így kapcsolják a polimert a polipeptidhez.

  
12.09.02.

P9800671



63.914/SZE

**S.B.G. & K.**  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

## KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A BDNF és az NT-3 konjugátumai vízoldható  
polimerrel képezett konjugátumai

Amgen Inc., THOUSAND OAKS, California, US

Feltalálók: KINSTLER Olaf, F., THOUSAND OAKS, California, US

YAN Qiao, THOUSAND OAKS, California, US

A bejelentés napja: 1995. 11. 13.

Elsőbbsége: 1994. 11. 14. (08/340,131) US

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/04658

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/15146

A jelen találmány tárgyát a BDNF és az NT-3 származékok új csoportja képezi, amelyekben egy BDNF és NT-3 molekulát kapcsolunk egy vízoldható polimerhez, valamint a találmány tárgyát képezi az ilyen származékok alkalmazása.

A gyógyászati célokra alkalmazott fehérjék jelenleg megfelelő formában, a szükséges mennyiségben állnak rendelkezésre, főleg a rekombináns DNS technológia fejlődése következtében. Az ilyen fehérjék kémiai származékai hatékonyan blokkolhatnak egy proteolitikus enzimet, a fehérjelánccal való fizikai érintkezés következtében, és így megakadályozzák a lebomlást. További előny lehet például bizonyos körülmények között a terápiás fehérje stabilitásának és keringési időtartamának növekedése és csökkenő immunogenitása. Azt azonban meg kell jegyeznünk, hogy egy bizonyos fehérje módosításának következményei nem jósolhatók meg. A fehérjék módosításait és a fúziós fehérjét egy összefoglaló cikkben ismertetik [Francis: Focus on Growth Factors 3, 4-10, Mediscript, Mountview Court, Friern Barnet Lane, London, Nagy-Britannia (1992)].

A polietilén-glikol ("PEG" vagy "peg") egy olyan kémiai egység, amit a terápiás fehérjetermékek ("pegilezett fehérjék") készítésénél ("pegilezés") alkalmaznak. Az Adagen<sup>®</sup> például egy pegilezett adenzin-dezamináz, amit súlyos, kombinált immundeficiencia betegség kezelésére engedélyeztek; a pegilezett szuperoxid-diszmutázt klinikai vizsgálatokban próbálták ki fejsérülések kezelésére; a pegilezett  $\alpha$ -interferont Fázis I klinikai vizsgálatokban próbálták ki hepatítisz kezelésére; a pegilezett glükocerebrozidázról és a pegilezett hemoglobinnról leírták, hogy preklinikai vizsgálatok folynak velük. Néhány fehérje esetében a polietilén-glikol hozzákapcsolásáról kimutatták, hogy megvéd a proteolízissel



szemben [Sada és mtsai: J. Fermentation Bioengineering 71, 137-139 (1991)]. Ismertek módszerek bizonyos polietilén-glikol egységeknek a kapcsolására [Davis és mtsai: 4,179,337 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés; Royer: 4,002,531 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Összefoglaló cikk: Abuchowski és munkatársai.

Egyéb vízoldható fehérjéket is használnak fehérjék módosítására, azaz például az etilén-glikol/propilén-glikol kopolimerei, a karboximetilcellulóz, a dextrán, a polivinil-alkohol, a polivinil-pirrolidon, a poli-1,3-dioxolán, poli-1,3,6-trioxán, az etilén/maleinsav-anhidrid kopolimerek és a poliaminosavak (homopolimerek vagy random kopolimerek).

A polietilén-glikol esetében számos különböző módszert használnak a polietilén-glikol molekulának a fehérjéhez való kapcsolásához. A polietilén-glikol molekulák általában egy, a fehérjén található reakcióképes csoporton keresztül kapcsolódnak a fehérjéhez. Az aminocsoportok, azaz például amelyek a lizincsoportokon vagy az N-terminálison találhatóak, jól használhatók az ilyen kapcsoláshoz. Például az előzőekben említett Royer féle szabadalmi bejelentésben azt írják le, hogy redukív alkilezést alkalmaznak a polietilén-glikol molekulának egy enzimhez való kapcsolására. Az 1993. április 28-án publikált 0 539 167 európai szabadalmi bejelentésben azt írják le, hogy a szabad aminocsoportokkal rendelkező peptidket és szerves vegyületeket a polietilén-glikolnak egy imidát származékával, vagy ezzel rokon vízoldható vegyülettel módosítják. A 4,904,584 számú Amerikai Egyesült Államok-beli

szabadalmi bejelentésben (Shaw) a fehérjékben levő lizincsoportoknak a módosítását írják le, azzal a céllal, hogy a reakcióképes aminocsoportokon keresztül polietilén-glikol molekulákat kapcsoljanak a fehérjéhez.

Egy specifikus terápiás fehérje, amit kémiaailag módosítottak, a granulocita telepserkentő faktor, azaz a G-CSF [EP 0 401 384, EP 0 473 268 és EP 0 335 423 számú európai szabadalmi publikáció]. Egy másik példa a pegilezett interleukin-6 [Mikayama és mtsai: 5,264,209 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés]. Emellett az 1985. szeptember 11-én publikált 0 154 316 számú európai szabadalmi publikációban leírnak egy limfokint, a polietilén-glikolnak egy aldehidjével.

A fehérjemolekulák pegilezése általában kémiaailag módosított fehérjemolekulák keverékét eredményezi. Csak példaként említjük meg, hogy egy fehérjemolekula, amelyen öt lizincsoport és egy szabad aminocsoport található az N-terminálison, a fenti eljárás során úgy reagált, hogy a reakció eredménye egy heterogén elegy, amelyben a fehérjemolekulák közül néhány hat polietilén-glikol molekulát tartalmaz, néhány ötöt, néhány négyet, néhány hármat, néhány kettőt, néhány egyet és néhány nem tartalmaz egyet sem. A molekulák abban is eltérhetnek egymástól, hogy a polietilén-glikol egységek nem ugyanahhoz a csoporthoz kapcsolódnak. A fenti eljáráshoz feltétlenül szükséges egy kapcsoló egység a fehérje és a polietilén-glikol molekula között. A Delgado és munkatársai által ismertetett eljárás során trezil-kloridot használnak, és ennek az az ered-

ménye, hogy nincs kapcsoló csoport a polietilén-glikol és a fehérje-egységek között [Delgado és mtsai: "Coupling of PEG to Protein by Activation with Tresyl Chloride, Applications in Immunoaffinity Cell Partitioning", Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Plenum Press, New York, NY, 211-213 (1989)]. Ezt a módszert nehezen lehet alkalmazni terápiás termékek előállítására, mivel a trezil-klorid alkalmazása toxikus melléktermékek keletkezését eredményezheti.

Chamow és munkatársai leírják a CD4 immunadhezín monometoxi-polietilén-glikol aldehiddel ("MePEG" aldehyd) való módosítását, redukzív alkilezéssel [Chamow és mtsai: Bioconjugate Chem. 5, 133-140 (1994)]. A szerzők leírják, hogy a módosított CD4-IgG *in vitro* kötési képessége (a gp 120 fehérjéhez) csökken a MePEG-ilezés arányával összhangban.

Az agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) és a neutrofin-3 (NT-3) ismert polipeptidek, amelyek a neurotróp faktorok különálló, neutrofinok nevű osztályába tartoznak, ide tartozik az ideg növekedési faktor (NGF) is. Ezek a faktorok elősegítik a neuronok túlélését és a funkciók fennmaradását, és elsőszámú jelöltek a neurodegeneratív betegségek kezelésére [Barde és mtsai: Neuron 2, 1525-1534 (1989); Snider és mtsai: Cell 77, 627-638 (1994)]. Ezeknek a faktoroknak az azonosítására és rekombináns módszerekkel való előállítására szolgáló módszereket szabadalmi bejelentésekben ismertették [Gray és mtsai: 5,169,762 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, ami az NGF-re vonatkozik; Barde és mtsai:

5,180,820 és 5,229,500 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentés, ami a BDNF-re vonatkozik, és a WO 91/03569 számú publikált PCT bejelentés, ami az NT-3-ra vonatkozik].

Röviden összefoglalva, a jelen találmány tárgyát BDNF és NT-3 származékok képezik, amelyekben a BDNF vagy NT-3 polipeptid egység egy vízoldható polimerhez kapcsolódik.

Pontosabban, jelen találmány tárgyát olyan BDNF és NT-3 származékok képezik, amelyekben a polipeptidok a reakcióképes (azaz "aktivált") vízoldható polimer egységgel reagálnak, és így kapcsolják a polimert a polipeptidhez. Az ilyen kapcsolást végrehajthatjuk az alábbiakban ismertetett reakciókkal, azaz például acilezéssel vagy alkilezéssel. A polietilén-glikollal vagy egyéb vízoldható polimerrel végzett acilezés vagy alkilezés olyan körülmények között végezhető el, amely körülmények között a fő termék mono- vagy poli-származék. A poli-származék képzés általában magában foglalja a polietilén-glikolnak vagy egyéb vízoldható polimernek a polipeptid lizincsoportja  $\epsilon$ -aminocsoportjához való kapcsolását, és emellett magában foglalhatja a polimernek a polipeptid N-terminálisához való kapcsolását. A mono-származék képzés előnyösen magában foglalja a polimernek a BDNF vagy NT-3 polipeptid egység N-terminális csoportja  $\alpha$ -aminocsoportjához való kapcsolását, ezzel a vízoldható polimer egységnek a polipeptid N-terminálisához való szelektív kapcsolását biztosítja. Ez egy lényegében homogén polimer/BDNF vagy polimer/NT-3 konjugált molekula készítményeket biztosít, valamint (ha polietilén-gli-

kolt használunk) akkor pegilezett BDNF vagy NT-3 molekula készítményeket eredményez, amelyekben a polietilénglikol egység közvetlenül kapcsolódik a BDNF vagy NT-3 egységhez.

A jelen találmány szerinti BDNF vagy NT-3 származékok jól használhatók ugyanazokra a célokra, mint amilyen célokra a BDNF és NT-3 trofikus faktorokról ismert, hogy jól használhatók, azaz például a neuronok túlélésének és fennmaradásának elősegítésére *in vitro* és *in vivo*, valamint potenciális terápiás ágensekként betegek kezelésére, akik neurodegeneratív betegségekben azaz például Parkinson kórban, amiotróp laterális szklerózisban (ALS), Huntington kórban, retina degenerációban, perifériális neuropátiában és Alzheimer betegségben szenvednek, többek között. Amint azt az alább következő példák közül néhányban bemutatjuk, a jelen találmány szerint végzett származékképzés a molekulánál azt is eredményezheti, hogy fokozódik a molekulának az a képessége, hogy keresztülvándorol az agyszöveten, és így könnyebben lehet eljuttatni az agyban található terápiás célpontokba.

A jelen találmány tárgya továbbá, amint azt az alábbiakban szintén ismertetjük, eljárás az előzőekben említett variáns BDNF és NT-3 származékok előállítására, amelyekben a vízoldható polimereket, főleg a polietilénglikolt a polipeptid (BDNF vagy NT-3) N-terminálisán levő  $\alpha$ -aminocsoportához kapcsoljuk, és így a származék molekulák homogén populációját kapjuk, azaz ezeknek a polipeptideknek a polimerrel képezett konjugátumait.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a mellékletben szereplő ábrákat.

Az 1. ábrán a BDNF (vagy NT-3) acilezés egy példáját mutatjuk be, a monometoxi-polietilén-glikol aldehid N-hidroxiszukcinimidil (NHS) aktív észtereinek alkalmazásával, ami polipegilezett terméket eredményez. Az ábrán  $k$  jelentése a BDNF vagy NT-3 molekulával reagáló MPEG molekulák számát mutatja,  $n$  jelentése a reakcióban használt MPEG polimerizációjának mértékét mutatja (itt ha  $n=2000$ , akkor ez azt jelenti, hogy az MPEG molekulásúlya 100 kDa és ha  $n=40$ , akkor az MPEG molekulásúlya 2 kDa),  $m$  jelentése az összes primer aminocsoport száma per BDNF vagy NT-3 molekula.

A 2. ábrán a BDNF (vagy NT-3) aspecifikus reduktív alkilezésének egy példája látható, monometoxi-polietilén-glikol aktív aldehidek felhasználásával, ami egy polipegilezett terméket eredményez. Ezen az ábrán  $k$ ,  $m$  és  $n$  jelentése ugyanaz mint amit az előzőkben meghatároztunk.

A 3. ábrán a BDNF vagy az NT-3 helyspecifikus reduktív alkilezésének egy példáját mutatja be a polipeptid N-terminális csoportján levő  $\alpha$ -aminocsoporton, monometoxi-polietilén-glikol aktív aldehidek felhasználásával, és így lényegében monopegilezett terméket kapunk (az N-terminálison).

A 4. ábrán a kolin acetiltranszferáz (Chat) axotomizált arc motoneuronok immunhisztokémiája látható egy *in vivo* állatmodellben a periferiális idegfunkciók elvesztését illetően [Yan és mtsai: J. Neurosci. 14(9): 5285-5291 (1994)]. Felnőtt hím patkányok jobboldali arcidegét átvágjuk, majd az állatokat

hét napig minden nap szubkután kezeljük, az alábbiak szerint: PBS (A), nem-pegilezett BDNF 5 mg/testsúlykilogramm, mg/kg (B), N-terminálison pegilezett BDNF 0,3 mg/kg (C), vagy véletlenszerűen pegilezett BDNF 0,3 mg/kg (D). A PBS-sel kezelt patkányokban az axotómia a lézionált arc nukleusz ChAT immunreaktivitásában nagy esést eredményezett (A panel arc nukleusz a jobboldalon). Ezzel szemben, mind a nem-pegilezett BDNF-fel mind a pegilezett BDNF-fel (B, C és D panelek) való kezelés enyhítette a lézió által indukált ChAT immunreaktivitás csökkenést. A szimbólumok a következők: FN, arc nukleusz; py, pirimidális traktus; Sp5, a trigeminális spinális traktusának nukleusza. A D panelen látható vonal 1 mm-t jelent.

Az 5. ábrán egy dózis-hatás görbét láthatunk, a vizsgálati állatok nem-pegilezett BDNF-fel és pegilezett BDNF-fel való kezelését követően, ugyanabban az axotomizált arc motoneuron modellben, mint amit a 4. ábrán mutatunk be. Az állatok naponta szubkután injekció (s.c) formájában kaptak csak hordozóanyagot ○, nem-pegilezett BDNF-et □, N-terminálison pegilezett BDNF-et ● vagy véletlenszerűen pegilezett BDNF-et γ, a jelzett dózisokban, hét nap alatt. Az értékeket átlag ± SEM (n=4) formában fejezzük ki. Az adatokat ANOVA-val elemezzük, majd Dunett féle t teszttel. \*, p<0,05; \*\*, p, 0,01, BDNF konstrukció vs. hordozó.

A 6. ábra egy oszlopdiagramm, ami a nem-pegilezett BDNF ("NAT-BDNF") vagy a pegilezett BDNF ("PEG-BDNF") behatolását mutatja élő patkányok agyába, egyetlen, a jobb striatum

középpontjába adott injekció után. Húsz órával később az állatokat perfundálással fixáljuk 4%-os paraformaldehiddel. Az agyakat eltávolítjuk, szeleteket készítünk belőlük, majd BDNF-re specifikus ellenanyaggal festjük, a Yan és munkatársai által ismertetett eljárást alkalmazva [Yan és mtsai: Soc. Neurosci. Abs. 20, 1306 (1994)]. A BDNF-nek az agyszövetbe való behatolása teljes térfogatát mennyiségileg úgy határozzuk meg, hogy az összes immunreaktív szövet-szekciót integráljuk. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM (n=4) formában fejezzük ki. Az adatokat Student féle t teszttel elemezzük \*,  $p < 0,0001$ .

A 7. ábra egy oszlopdiaagramm, ami a nem-pegilezett BDNF és a pegilezett BDNF behatolását mutatja élő patkányok agyába, hét napig végzett folyamatos helyi beadás után. A BDNF-nek az agyszövetbe való behatolása teljes térfogatát mennyiségileg a 6. ábránál ismertetett módon határozzuk meg. Az értékeket átlag  $\pm$  SEM (n=4) formában fejezzük ki. Az adatokat Student féle t teszttel elemezzük \*,  $p < 0,0001$ .

A 8. ábrán a nem-pegilezett BDNF (A és B panel), valamint a pegilezett BDNF (C és D panel) retrográd transzportját láthatjuk, belsőleg lokalizált dopaminerg neuronokhoz, élő patkányok agyának striátumába való infúzió után, a 7. példában ismertetett eljárást alkalmazva. A B és D panelek az A és C panelek négyzetes szekciója megnagyobbításai. Az A panelben levő szimbólumoknak a következő a jelentésük: SNC, substantia nigra compacta; SNR substantia nigra reticulata; és VTA, ventrális tegmenális terület. A D-ben levő vonal jelentése 500  $\mu\text{m}$  az A és C panelben, és 200  $\mu\text{m}$  a B és D panelben.

A jelen találmányban való felhasználás céljára a természetes (azaz a természetben előforduló) szekvenciájú BDNF-et és NT-3-at választottuk ki, valamint ezeknek a fragmenseit, prekursorait, valamint az egy vagy több aminosav cserét, delécióit vagy addícióit tartalmazó polipeptideket, amelyek a természetes szekvenciából származnak, és amelyek a természetes szekvenciához hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, azaz például kimérák, analógok és hasonlók. Ennek következtében, hacsak külön nem jelezzük, akkor a "BDNF" és "NT-3" szakkifejezés jelentése az előzőkben ismertetett bármelyik formájú polipeptid.

Ismertek módszerek a BDNF és az NT-3 izolálására, különösen rekombináns módszerekkel, ami a gyakorlatban tipikusan a legjobban használható módszer nagy mennyiségek előállítására. A jól használható eljárásokat a tudományos és szabadalmi irodalomban ismertetik, beleértve az előzőkben említett 5,180,820 és 5,229,500 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést, valamint a WO 91/03569 számú publikált PCT bejelentést, amely publikációkat a továbbiakban referenciaként kezelünk. A jelen találmány alkalmazása során különösen jól használhatók a BDNF és az NT-3 természetes szekvenciái, rekombináns módszerekkel expresszáva prokarióta és eukarióta sejtekben, beleértve a humán nukleotid szekvenciákról expresszáldó szekvenciákat ("r-HuBDNF" és "r-HuNT-3"), beleértve azokat, amelyek bakteriális sejtekben expresszáldódnak, és az N-terminálisukon metionin csoportot tartalmaznak (azaz "r-metBDNF" és "r-metNT-3"). Az ilyen polipeptidekre példa lehet

az 1. számú szekvencia ("r-huBDNF"), a 2. számú szekvencia ("r-metHuBDNF"), a 3. számú szekvencia ("r-HuNT-3") és a 4. szekvencia ("r-metHuNT-3").

A BDNF és az NT-3 pegilezését bármelyik, a szakterületen ismert pegilezési reakcióval elvégezhetjük [Focus on Growth Factors 3(2), 4-10 (1992); EP 0 154 316; EP 0 401 384; valamint a többi, pegilezésre vonatkozó publikáció]. A pegilezést előnyösen acilezési vagy alkilezési reakcióval hajtjuk végre, egy reaktív polietilén-glikol molekulával (vagy egy analóg vízoldható polimerrel). Ezeket, a polietilén-glikol származékok előállítására vonatkozó előnyös módszereket az alábbiakban részletesen ismertetjük.

### Acilezés

Az acilezéssel végzett pegilezés abból áll, hogy a polietilén-glikol (PEG) egy aktív észter származékát egy BDNF vagy NT-3 polipeptiddel reagáltatjuk. Lényegében bármelyik reaktív PEG molekula használható ezeknek a polipeptideknek a pegilezésére. Egy előnyben részesített aktivált polietilén-glikol észter az N-hidroxiszukcinimiddel ("NHS") észterezett polietilén-glikol. A továbbiakban az "acilezés" szakkifejezésről azt gondoljuk, hogy minden korlátozás nélkül az alábbi típusú kötésekre vonatkozik a BDNF és az NT-3, valamint egy vízoldható polimer, azaz például polietilén-glikol között: amid, karbamát, uretán és hasonlóak [Bioconjugate Chem. 5, 133-140 (1994)]. A reakciókörülményeket a szakterületen ismert, vagy az azok után kidolgozott módszerek közül választhatjuk

ki, de el kell kerülni azokat a körülményeket, amelyek során olyan hőmérsékletet, oldószert vagy pH-t kell alkalmazni, ami inaktiválja a módosítandó BDNF vagy NT-3 molekulát. Az általánosan használható reakciókörülményeket az alábbiakban ismertetjük. Monometoxi-polietylénglikolnak egy N-hidroxiszukcinimiddel való reakcióját adjuk meg példaként a 6. ábrán.

A pegilezés vagy acilezés általában egy polipegilezett BDNF vagy NT-3 terméket eredményez, amelyben a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjait egy acil-kapcsoló molekulán keresztül pegilezzük. Az összekötő kötés előnyösen egy amid. Szintén előnyösen a keletkező termék lényegében (azaz  $\geq 95\%$ -ban) mono-, di- vagy tri-pegilezett. Azonban normális körülmények között néhány molekula nagyobb mértékben pegileződik (maximum a BDNF vagy NT-3 molekulában levő lizin  $\epsilon$ -aminocsoportok számnak, plusz a molekula N-terminálisa egy  $\alpha$ -aminocsoportjának megfelelő számban), aminek a mennyisége függ a használt specifikus reakciókörülményektől. Ha szükséges, akkor tisztítottab pegilezett molekulákat állíthatunk elő a keverékből, amely nem-reagált molekulákat is tartalmaz, standard tisztítási technikák, azaz például dialízis, kisózás, ultraszűrés, ioncserélő kromatográfia, gélszűrési kromatográfia és elektroforézis alkalmazásával.

### Alkilezés

Az alkilezés útján végzett pegilezés magában foglalja a polietylénglikol aldehid származékának reagáltatását egy polipeptiddel, azaz például BDNF-fel vagy NT-3-mal, egy redukáló

agens jelenlétében. Az alkilezéssel végzett pegilezés is polipegilezett BDNF-et vagy NT-3-at eredményez. Polipegilezett terméket eredményező alkilezési reakciót mutatunk be a 7. ábrán. Emellett manipulálhatjuk a reakciókörülményeket, az alábbiakban ismertetett módon, ami azt eredményezi, hogy lényegében a BDNF vagy az NT-3 polipeptidnek csak az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoportja pegileződik (azaz monopegilezett molekulák keletkeznek). A 8. ábrán adunk meg egy alkilezési reakciót, amelyben a BDNF-nek vagy az NT-3-nak monopegilezett származéka keletkezik. Mind a monopegilezés, mind a polipegilezés esetében a polietilén-glikol csoportok a polipeptidhez előnyösen egy  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$  csoporton keresztül kapcsolódik. A  $-\text{CH}_2-$  csoport miatt az ilyen típusú kötést a továbbiakban "alkil" kötésnek nevezzük.

A redukzív alkilezéssel végzett, monopegilezett terméket eredményező származékképzés a származékképzés számára a BDNF-ben vagy az NT-3-ban hozzáférhető primer aminocsoportok (lizin az N-terminálissal szemben) eltérő reakcióképességét használja ki. A reakciót olyan pH-n hajtjuk végre, ami lehetővé teszi, hogy kihasználjuk a polipeptidben levő lizincsoportok és az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoportja  $pK_a$  különbséget. Az ilyen szelektív származékképzéssel egy reakcióképes csoportot tartalmazó vízoldható polimernek, azaz például egy aldehidnek a polipeptidhez való kapcsolódása ellenőrizhető. A polimerrel való konjugáció főleg a polipeptid N-terminálisán játszódik le, és nem játszódik le egyéb reakcióképes csoportoknak, azaz például a lizin oldallánc aminocsoportjainak módosítása. Lényeges

szempont, hogy a jelen találmány szerinti eljárással lényegében homogén monopolimer/BDNF vagy monopolimer/NT-3 konjugátum készítményeket lehet előállítani, amihez lényegében (azaz  $\geq 95\%$ -ban) egyetlen polimer molekula kapcsolódik, csak egyetlen pozícióban. Még pontosabban, ha polietilénglikolt használunk, akkor a jelen találmány szerinti eljárással pegilezett BDNF vagy NT-3 állítható elő, amiről hiányzanak a valószínűleg antigén tulajdonságú kapcsoló csoportok, és a polietilénglikol molekula közvetlenül a BDNF vagy NT-3 polipeptidhez kapcsolódik.

Tehát egy előnyös megvalósítási mód szerint a jelen találmány tárgyát pegilezett BDNF és NT-3 képezi, amelyben a polietilénglikol csoport(ok) egy acil- vagy alkil-csoporton keresztül kapcsolód(i)(na)k. Amint azt az előzőekben tárgyaltuk, az ilyen termékek lehetnek monopegilezettek vagy polipegilezettek (azaz 2-6, előnyösen 2-5 PEG csoportot tartalmazhatnak). A polietilénglikol csoportok a polipeptidhez általában a polipeptid lánc  $\alpha$  és/vagy  $\epsilon$  csoportján keresztül kapcsolódnak, de az is elképzelhető, hogy a polietilénglikol csoportok a polipeptid szerkezetében levő bármelyik olyan aminocsoporthoz csatlakoznak, amely elég reakcióképes ahhoz, hogy egy PEG csoporthoz kapcsolódjon megfelelő reakciókörülmények között.

A mind az acilezési, mind az alkilezési megközelítésben alkalmazott polimer molekulákat vízoldható polimerek és azok keverékei közül választhatjuk. A kiválasztott polimernek vízoldhatónak kell lennie, hogy a polipeptid, amihez

hozzákapcsoljuk, ne csapódjon ki vizes környezetben, azaz például fiziológias környezetben. A kiválasztott polimert úgy kell módosítani, hogy előnyösen egyetlen reakcióképes csoporttal rendelkezzen, azaz például egy aktív észterrel az acilezéshez, vagy egy aldehiddel az alkilezéshez, hogy a polimerizáció mértéke szabályozható legyen, amit a jelen találmány biztosít. Egy előnyben részesített vegyület a polietilén-glikol propionaldehid, ami vízben oldódik, illetve ennek a  $C_1$ - $C_{10}$  alkoxi vagy ariloxi származéka (lásd az 5,252,714 számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi bejelentést). A polimer lehet elágazó vagy egyenes szénláncú. Előnyösen, a végtermék készítmény terápiás alkalmazása céljára a polimernek gyógyászatilag elfogadhatónak kell lennie. A vízoldható polimert az alábbi csoportból választhatjuk: polietilén-glikol (azaz például monometoxi-polietilén-glikol), dextrán, poli-(N-vinil-pirrolidon), propilén-glikol homopolimerek, polipropilén-oxid/etilén-oxid kopolimerek, polioxietilezett poliolo (azaz például glicerin) és polivinil-alkoholok. Az acilezési reakciókhoz a kiválasztott polimernek egyetlen reakcióképes észtercsoporttal kell rendelkeznie. A jelen találmány szerinti redukív alkilezéshez a kiválasztott polimernek reakcióképes aldehiddel kell rendelkeznie. A vízoldható polimert általában nem a természetben előforduló glikozil csoportokból választjuk ki, mivel ezeket általában kényelmesebben elő lehet állítani emlős rekombináns expressziós rendszerekben. A polimer molekulásúlya bármekkora lehet, és lehet elágazó vagy egyenes szénláncú.

Egy, a jelen találmány során különösen előnyben részesített vízdoldható polimer a polietilén-glikol. A továbbiakban polietilén-glikol szakkifejezés alatt a polietilén-glikol bármely olyan formáját értjük, amit egyéb fehérjék módosítására használhatunk, azaz ilyen lehet például mono-(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) alkiloxi- vagy ariloxi polietilén-glikol.

A származékképzést bármely olyan megfelelő körülmény között végezhetjük, amit biológiailag aktív anyagnak aktivált vízdoldható polimerrel való reagáltatására használnak. A pegilezett BDNF vagy NT-3 előállítására szolgáló eljárások általában a következő lépéseket tartalmazzák: (a) egy BDNF vagy NT-3 polipeptidet polietilén-glikollal reagáltatunk (azaz például a polietilén-glikol reaktív észter vagy aldehid származékával), olyan körülmények között, amelyek között a BDNF vagy az NT-3 egy vagy több polietilén-glikol csoporthoz kötődik, és (b) kinyerjük a reakcióterméket. Az acilezési reakciókban alkalmazott optimális reakciókörülményeket esetenként kell meghatározni, az ismert paraméterek és a várt eredmények alapján. Ha például minél nagyobb a polietilén-glikol:fehérje arány, akkor annál nagyobb a polipegilezett termék aránya.

A jelen találmány szerinti eljárásban a monopolimer/polipeptid konjugátum molekula homogén populációjának előállítására szolgáló redukzív alkilezés általában a következő lépéseket tartalmazza: (a) egy BDNF vagy NT-3 polipeptidet reagáltatunk egy reakcióképes polietilén-glikol molekulával, redukzív alkilezési körülmények között, olyan pH értéknél, ami

lehetővé teszi a polipeptid N-terminálisán levő  $\alpha$ -aminocsoport szelektív módosítását, és (b) kinyerjük a reakcióterméket.

A monopolimer/BDNF vagy monopolimer-NT-3 konjugátum molekulák lényegében homológ populációjának előállításához olyan redukzív alkilezési körülményeket alkalmazunk, amelyek lehetővé teszik a vízoldható polimer szelektív kapcsolódását a polipeptid N-terminálisához. Az ilyen reakciókörülmények általában a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportja és az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoportja közötti  $pK_a$  érték különbségen alapulnak (a  $pK_a$  érték az a pH érték, amelyen az aminocsoportok 50%-a protonálva van, 50% pedig nincs protonálva). A pH érték érinti a polimer-polipeptid alkalmazandó arányát is. Általában, ha a pH alacsonyabb, akkor a polimert nagyobb fölöslegben kell használni a polipeptidhez viszonyítva (azaz minél kevésbé reakcióképes az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoport, annál több polimerre van szükség az optimális körülmények eléréséhez). Ha a pH érték magasabb, akkor a polimer:polipeptid aránynak nem kell olyan magasnak lennie (azaz több reakcióképes csoport áll rendelkezésre, és így kevesebb polimer molekulára van szükség). A jelen találmány céljaira a pH érték általában 3 és 9 között van, előnyösen 3-6 között van.

Egy másik lényeges megfontolás a polimer molekulásúlya. Általában minél magasabb a polimer molekulásúlya, annál kevesebb polimer molekula kapcsolódhat a polipeptidhez. Hasonlóképpen a polimer elágazását kell figyelembe venni, ha ezeket a paramétereket optimalizáljuk. Általában minél magasabb a molekulásúly (vagy minél több az elágazás), annál

magasabb a polimer:polipeptid arány. Az alábbiakban megfontolt pegilezési reakciókhoz általában a polimer előnyben részesített molekulásúlya körülbelül 2 kDa és 100 kDa között változik (a "körülbelül" jelentése  $\pm 1$  kDa-t jelent). Egy inkább előnyben részesített átlagos molekulásúlya körülbelül 5 kDa és körülbelül 50 kDa között változik, de inkább körülbelül 12 kDa és körülbelül 25 kDa között változik. A vízoldható polimernek a BDNF-hez vagy az NT-3-hoz viszonyított aránya általában 1:1 és 1:100 között változik, előnyösen (a polipegilezéshez) 1:1 és 20:1 között, a monopegilezéshez 1:1 és 5:1 között változik.

Az előzőkben ismertetett körülmények között a jelen táblomány szerinti redukív alkilezés a polimernek az N-terminálisán egy  $\alpha$ -aminocsoportot tartalmazó BDNF vagy NT-3 fehérjéhez való szelektív kapcsolódását jelenti, és lényegében homológ monopolimer/polipeptid fehérje konjugátum készítését eredményezi. A "monopolimer/polipeptid konjugátum" szakkifejezés a továbbiakban azt jelenti, hogy egyetlen polimer molekula kapcsolódik egy BDNF vagy NT-3 molekulához. A monopolimer/polipeptid konjugátumban egyetlen polimer molekula van az N-terminálison, de nincs a lizin oldalláncain. A készítmény előnyösen több mint 80%-ban monopolimer/polipeptid konjugátumot tartalmaz, előnyösebben több mint 90%-ban monopolimer/polipeptid konjugátumot tartalmaz, és a többi kimutatható molekula nem reagált molekula (azaz olyan polipeptid, ami nem tartalmaz polipeptidet). Az alábbiakban ismertetett példákban olyan készítményt eredményeznek, amely legalább körülbelül 90%-ban monopolimer/polipeptid konjugátum, és kö-

rülbelül 10%-ban nem reagált polipeptid. A monopolimer/polipeptid konjugátum biológiailag aktív.

A jelen találmány szerinti redukív alkilezés során a redukáló ágensnek vizes oldatban stabilnak kell lennie és előnyösen képesnek kell lennie arra, hogy csak a redukív alkilezés kezdeti lépésében keletkező Schiff bázist redukálja. Az előnyben részesített redukáló ágenseket az alábbi csoportból választhatjuk: nátrium-cianobórhidrid, dimetilamin-borán, trimetilamin-borán és a piridin-borán. Egy különösen előnyben részesített redukáló ágens a nátrium-cianobórhidrid.

Egyéb reakcióparamétereket, azaz például az oldószert, a reakcióidőt, a hőmérsékletet, stb., valamint a termékek tisztítási módszereit esetenként lehet meghatározni, azoknak a publikált információknak az alapján, amikben fehérjék vízoldható polimerekkel való származékképzését írják le (lásd az idézett publikációkat). Részleteket az alábbi példákban ismertetünk.

Polimer/polipeptid konjugátumok keverékét előállíthatjuk acilezéssel vagy alkilezéssel, és az alábbiakban ismertetett előny az, hogy megválaszthatjuk, hogy milyen legyen a keverékben levő monopolimer/polipeptid konjugátum aránya. Tehát ha szükséges, akkor előállíthatunk egy különböző polipeptidekből álló keveréket, amely peptidok különböző számú kapcsolt polimer molekulát tartalmaznak (azaz di-, tri-, tetra-, stb.), majd kombináljuk a jelen találmány szerinti módszerrel előállított monopolimer/polipeptid konjugátummal, és így egy olyan keveréket kapunk, amelyben a

monopolimer/polipeptid konjugátum meghatározott arányban található.

Amint azt az előzőkben említettük, a jelen találmány szerinti polimer/polipeptid konjugátumok ugyanazokra a célokra használhatók, amikre a BDNF-et és az NT-3-at használják. Ezekről a polipeptidekről korábban kimutatták, hogy hatékonyak, például mint trofikus faktorok, amelyek elősegítik a neuronok túlélését és fenntartását *in vitro* körülmények között, és ezzel lehetővé teszik a neuronok kutatásban való alkalmazását. Az ilyen sejteket általában nagyon nehezen lehet életben tartani. Ezek az azonos biológiai aktivitások alátámasztják az ilyen faktoroknak *in vivo* körülmények között való alkalmazását állatok neurológiai vizsgálatára, és terápiás ágensekként való alkalmazának lehetőségét adják olyan neurodegeneratív betegségek kezelésére, amik neuron funkciók elvesztéséhez kapcsolódnak.

Terápiás célokra a jelen találmány szerinti polimer/polipeptid konjugátumok bármilyen steril biokompatibilis gyógyászati hordozóval kiszerezhetők és beadhatók, beleértve, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a sóoldatot, puffert, sóoldatot, dextrózt és vizet. Egy adott rendellenesség vagy körülmény kezelésében hatásos BDNF/polimer vagy NT-3/polimer konjugátum mennyisége függ a rendellenesség vagy körülmény természetétől, és standard klinikai technikákkal határozható meg. Ahol lehetséges, ott célszerű először *in vitro* meghatározni a gyógyászati készítmények dózis-hatás összefüggését, a szakirodalomban ismertetett BDNF és NT-3 bio-

lógiai vizsgáló rendszerekben, majd használható állatmodellekben, mielőtt emberekben vizsgálnánk. A beadási módszerek közé tartoznak az intradermális, intramuszkuláris, intraperitoneális, intravénás, szubkután, intranazális, pulmonáris és az orális. Emellett kívánatos lehet, hogy a gyógyászati készítményeket bármely alkalmas úton juttassuk be a központi idegrendszerbe, beleértve az intraventrikuláris vagy intratekális injekciót. Emellett szükséges lehet, hogy a gyógyászati készítményeket lokálisan adjuk be, a kezelést igénylő területre. Ezt elérhetjük például lokális infúzióval sebészeti beavatkozás során, injekciózással, katéter segítségével, vagy például egy beültetett porózus, nem-porózus, gélszerű, szálal vagy membránszerű eszközzel.

Az alábbiakban a jelen találmány szerinti BDNF és NT-3 származékok készítését, valamint fizikai és biológiai tulajdonságait ismertetjük. Ezeket a példákat azért adjuk meg, hogy teljesen illusztráljuk a jelen találmányt és nem az a szándékunk, hogy korlátozzuk a találmányt. Ezekben a példákban a rekombináns módon *Escherichia coli*-ban előállított humán BDNF-et és NT-3-at használjuk, hacsak külön nem említjük az eltérést.

### 1. Példa

#### MonoMPEG(6 kDa)-BDNF konjugátum készítése az N-terminális $\alpha$ -aminocsoport(ok) kapcsolódási helyével

2,5 mg/ml r-metHuBDNF hűtött, 100 mmol/l nátriumfoszfátban (pH=4,0) kevertetett oldatához, ami 20 mmol/l NaCNBH<sub>3</sub>-at

tartalmaz, kétszeres mólfölöslegben hozzáadunk aktivált metoxi-polietilén-glikol (MPEG) aldehidet, aminek átlagos molekulásúlya 6000 dalton (azaz 6 kDa).

A reakció során a fehérje módosítását méretkizárásos kromatográfiával követjük, Superose 6HR 10/30 oszlopon (Pharmacia), 0,4 ml/perc áramlási sebességgel eluálva 100 mmol/l nátriumfoszfát oldattal (pH=6,9), ami 0,5 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Tíz óra elteltével a méretkizárásos kromatográfiával végzett elemzés azt mutatja, hogy mindegyik polipeptid (amely oldatban dimerként létezik) lényegében az N-terminálison pegilezett származék két lehetséges formájává alakul: a BDNF dimer egyik, vagy mindkét végéhez konjugált MPEG.

A reakcióelegyet azután összesen ötszörösre hígítjuk steril vízzel, majd egy HiLoad 16/10 Sepharose HP ioncserélő oszlopra visszük (Pharmacia), amit 20 mmol/l koncentrációjú nátriumfoszfát pufferrel (pH=7,5) hoztunk egyensúlyba. A reakcióelegyet 1 ml/perc sebességgel visszük az oszlopra, majd a nem-reagált MPEG-aldehidet három oszloptérfogatnyi, az előzővel azonos összetételű pufferrel eluáljuk. Lineáris, ötszáz-perces gradienst (0%-100% 20 mmol/l nátriumfoszfát, pH=7,5, amely 0,75 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz) használunk az N-terminálisán pegilezett BDNF dimer két formájának eluálására. Az MPEG-BDNF származékokat tartalmazó frakciókat egyesítjük, töményítjük, majd sterilre szűrjük.



## 2. Példa

### MonoMPEG(20kDa)-BDNF konjugátum készítése az N-terminális $\alpha$ -aminocsoport(ok) kapcsolódási helyével

Az 1. példában ismertetett eljárást ismételjük meg, azzal az eltéréssel, hogy 20000-es molekulásúlyú (20 kDa) metoxi-polietilén-glikol aldehidet használunk, és a pH-értéke 5,0.

## 3. Példa

### POLiMPEG(6kDa)-BDNF konjugátumok készítése MPEG aldehidekkel végzett redukzív alkilezéssel

10 mg/ml r-metHuBDNF 100 ml BICIN-ben (pH=8) kevertetett, 4 °C-ra hűtött oldatához, amely 20 mmol/l NaCNBH<sub>3</sub>-at tartalmaz, négyszeres mólfölöslegű metoxi-polietilén-glikol (MPEG) aktivált aldehidet adunk, aminek átlagos molekulásúlya 6 kDa.

A reakció során a fehérjemódosítás mértékét méretkizárásos kromatográfiával követjük, Superose 6HR 10/30 oszlopon (Pharmacia), 0,4 ml/perc áramlási sebességgel eluálva 100 mmol/l nátriumfoszfát oldattal (pH=6,9), ami 0,5 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Tíz óra elteltével a méretkizárásos kromatográfiával végzett elemzés azt mutatja, hogy mindegyik polipeptid MPEG-gel van módosítva.

A reakcióelegyet azután steril desztillált vízzel ötszörösre hígítjuk, a pH-t 7-re állítjuk (foszforsavval), majd az elegyet egy HiLoad 16/10 Sepharose HP ioncserélő oszlopra (Pharmacia) visszük, amit 20 mmol/l koncentrációjú nátriumfoszfát pufferrel (pH=7,5) hoztunk egyensúlyba. A reakcióelegyet 1 ml/perc sebességgel visszük az oszlopra, majd a



nem-reagált MPEG-aldehydet három oszloptérfogatnyi, az előzővel azonos összetételű pufferrel eluáljuk. Lineáris, ötszáz-perces gradienst (0%-100% 20 mmol/l nátriumfoszfát, pH=7,5, amely 0,75 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz) használunk az MPEG-BDNF konjugátumok eluálására. Az MPEG-BDNF származékokat tartalmazó frakciókat egyesítjük, töményítjük, majd sterilre szűrjük.

#### 4. Példa

##### PoliMPEG(6kDa)-BDNF konjugátum készítése MPEG aldehidekkel végzett redukzív acilezéssel

A 3. példában ismertetett eljárást követjük, azzal az eltéréssel, hogy az MPEG aldehidet hatszoros mólfölöslegben alkalmazzuk.

#### 5. Példa

##### PoliMPEG(6kDa)-BDNF konjugátum készítése aktivált MPEG származékokkal végzett acilezéssel

6 mg/ml r-metHuBDNF 100 ml BICIN-ben (pH=8) kevertetett, 4 °C-ra hűtött oldatához, amely 20 mmol/l NaCNBH<sub>3</sub>-at tartalmaz, négyszeres mólfölöslegben levő karboximetil MPEG szukcinimidil észterét adjuk, aminek átlagos molekulásúlya 6 kDa. A polimert óvatos kevertetéssel oldjuk fel, és a reakciót ugyanazon a hőmérsékletet folytatjuk.

A reakció során a fehérje módosítás mértékét méretkizárásos kromatográfiával követjük, Superose 6HR 10/30 oszlopon (Pharmacia), 0,4 ml/perc áramlási sebességgel eluálva

100 mmol/l nátriumfoszfát oldattal (pH=6,9), ami 0,5 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Három óra elteltével a méretkizárásos kromatográfia azt mutatja, hogy mindegyik BDNF dimer MPEG-gel van módosítva.

A reakcióelegyet azután steril desztillált vízzel négyszeresre hígítjuk, a pH-t 7-re állítjuk (foszforsavval), majd az elegyet egy HiLoad 16/10 Sepharose HP ioncserélő oszlopra (Pharmacia) visszük, amit 20 mmol/l koncentrációjú nátriumfoszfát pufferrel (pH=7,5) hoztunk egyensúlyba. A reakcióelegyet 1 ml/perc sebességgel visszük az oszlopra, majd a nem-reagált MPEG-aldehidet három oszloptérfogatnyi, az előzővel azonos összetételű pufferrel eluáljuk. Lineáris, ötszáz-perces gradienst (0%-100% 20 mmol/l nátriumfoszfát, pH=7,5, amely 0,75 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz) használunk az MPEG-BDNF konjugátumok eluálására. Az MPEG-BDNF származékokat tartalmazó frakciókat egyesítjük, töményítjük, majd sterilre szűrjük.

#### 6. Példa

##### PolimPEG(6kDa)-BDNF konjugátum készítése aktivált MPEG származékokkal végzett acilezéssel

Az 5. példában alkalmazott eljárást alkalmazzuk, azzal az eltéréssel, hogy a reagensekből egy-egy mólarányt használunk.

#### 7. Példa

Az 5. példában szereplő eljárást ismételjük meg, azzal az eltéréssel, hogy 20 kDa átlagos molekulásúlyú MPEG-

szukcinimidil-propionátot használunk, és az MPEG a BDNF dimerre vonatkoztatva hatszoros mólfölöslegben van jelen.

### 8. Példa

#### MonoMPEG(20 kDa)-NT-3 konjugátum előállítás az N-terminális $\alpha$ -aminocsoport kapcsolódási helyével

4,77 mg/ml r-metHuNT-3 20 mmol/l nátrium-acetátban (pH=4) kevertetett, 4 °C-ra hűtött oldatához, amely 150 mmol/l nátrium-kloridot és 20 mmol/l NaCNBH<sub>3</sub>-at tartalmaz, háromszoros mólfölöslegben levő aktivált MPEG-et adunk, aminek átlagos molekulásúlya 6 kDa.

A reakció során a fehérjemódosítás mértékét méretkizárásos kromatográfiával követjük, Superose 6HR 10/30 oszlopon (Pharmacia), 0,4 ml/perc áramlási sebességgel eluálva 10 mmol/l nátriumfoszfát oldattal (pH=7,1), ami 150 mmol/l nátrium-kloridot tartalmaz. Tíz óra elteltével a méretkizárásos kromatográfia azt mutatja, hogy minden fehérje (oldatban dimerként) az N-terminálison pegilezett származék két lehetséges formájává alakult, azaz az NT-3 dimer egyik, vagy mindkét N-terminálisához konjugált MPEG.

A reakcióelegyet azután 20 mmol/l nátriumfoszfáttal (pH=7,1) négyszeresre hígítjuk, majd az elegyet egy HiLoad 16/10 Sepharose HP ioncserélő oszlopra (Pharmacia) visszük, amit 20 mmol/l koncentrációjú nátriumfoszfát pufferrel (pH=7,1) hoztunk egyensúlyba. A reakcióelegyet 1 ml/perc sebességgel visszük az oszlopra, majd a nem-reagált MPEG-aldehidet három oszloptérfogatnyi, az előzővel azonos összeté-

telű pufferrel eluáljuk. Lineáris gradienst (0%-100% 20 mmol/l nátriumfoszfát, pH=7,1, amely 0,4 mol/l nátrium-kloridot tartalmaz) használunk az N-terminálison pegilezett NT-3 dimer két formájának eluálására. Az MPEG-NT-3 származékokat tartalmazó frakciókat egyesítjük, töményítjük, majd sterilre szűrjük.

További MPEG-BDNF vagy MPEG-NT-3 konjugátumok úgy állíthatók elő, hogy a BDNF-et vagy NT-3-at különböző átlagos molekulásúlyú MPEG aldehidekel módosítjuk, amiknek a molekulásúly 5 kDa és 20 kDa között változik, az előzőkben ismertettekhez hasonló módszerekkel. A kapott pegilezett BDNF vagy NT-3 konjugátumok homogenitását nátrium-dodecilszulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) határozzuk meg, 10-20%-os vagy 4-20%-os előre kiöntött gradiens géleket alkalmazva (Integrated Separation System). Az egyes MPEG-BDNF vagy MPEG-NT-3 molekulák effektív méretének (hidrodinamikai sugár) a meghatározására egy Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia) géliszűrő oszlopot használunk. A fehérjéket 280 nm-en mért UV elnyelés alapján mutatjuk ki. A Bio-Rad géliszűrő standardok szolgálnak globuláris fehérje molekulásúly markerként. A konjugátumok molekulásúlyát ülepedési egyensúlyi analitikai ultracentrifugálással, valamint mátrix-asszisztáló lézer deszorpciós tömegspektrometriás elemzéssel. Az egyes N-terminális MPEG-BDNF vagy MPEG-NT-3 konjugátumok szerkezetét standard módszerekkel, vagy N-terminális fehérjeszekvenálással és peptid-térképezéssel igazoljuk.

Az 1-7. példákban előállított MPEG-BDNF konjugátumok *in vitro* biológiai aktivitását a PC12/pcDneo-trk#18 sejtek 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetilfenil)-2-(4-

szulfofenil)2H-tetrazólium belső só felvételére gyakorolt hatása alapján határozzuk meg. Ezeket az eredményeket valamint a konjugátumok készítése során alkalmazott fő reakcióparamétereket az 1. táblázatban adjuk meg.

1. Táblázat

Az MPEG-BDNF konjugátum jellemzők és a készítési reakciók fő paramétereinek összefoglalása

Konjugátum	Reaktív MPEG	Reakciókő- rűlmények	A konjugátum jellemzői					
Típus	Ms., kDa	pH	MPEG <sup>a</sup>	Ms., kDa	MPEG <sup>a</sup>	BDNF	BDNF	in vitro akti- vítás
r-methHUBDNF	N/A	N/A	N/A	27	N/A	N/A	100%	
(1) mono-MPEG- BDNF	Aldehid	6	4	4	111,8	2	101	
(2) mono-MPEG- BDNF	Aldehid	20	5	4	483,8	2	73	
(3) poli-MPEG- BDNF	Aldehid	6	8	8	110,1	2,4	82	
(4) poli-MPEG- BDNF	Aldehid	6	8	12	257,2	4,6	25	
(5) poli-MPEG- BDNF	NHS észter	6	8	8	298,0	4,6	2	



1. Táblázat folytatása

Az MPEG-BDNF konjugátum jellemzők és a készítési reakciók fő paramétereinek összefoglalása

Konjugátum	Reaktív MPEG	Reakciókö- rülmények	A konjugátum jellemzői				
Típus	Ms., kDa	pH	MPEG <sup>a</sup> BDNF	Ms., kDa	MPEG <sup>a</sup> BDNF	in vitro akti- vítás	
poli-MPEG-	NHS	6	8	2	113,2	2,3	28
(6) BDNF	észter						
(7) poli-MPEG-	NHS	20	8	6	934,3	2,8	8
BDNF	észter						

a - mol/mol BDNF dimer

b - látszólagos molekulásúly gélzúréssel meghatározva

n/a - nincs adat



## 9. Példa

### A monomPEG(20kDa)-BDNF konjugátum felnőtt patkányokban a motoneuronokra gyakorolt *in vivo* biológiai aktivitásának értékelése

A BDNF-ről korábban kimutatták, hogy megmenti a fejlődő motoneuronokat a természetben előforduló valamint az axotómia által okozott sejtpusztulástól [Yan és mtsai: Nature 360, 753-755 (1992); Oppenheim és mtsai: Nature 360, 755-757 (1992); Sendtner és mtsai: Nature 360, 757-759 (1992)]. Azt is igazoltuk, hogy az axotomizált felnőtt motoneuronok reagálnak az exogén BDNF-re, pontosabban, a különböző módon beadott BDNF enyhíti kolin-acetiltranszferáz (ChAT) immunreaktivitásának az axotómia által indukált csökkenését felnőtt patkányok arcideg motoneuronjaiban [Yan és mtsai: J. Neurosci. 14(9), 5281-5291 (1994)]. A ChAT aktivitás csökkenése a motoneuron funkció elvesztésének jelzése, mivel a ChAT egy, a motoneuronok által termelt létfontosságú neurotranszmitter. Tehát ezek a vizsgálatok azt mutatják, hogy a BDNF jól használható terápiás ágens a felnőtt motoneuron betegségekből. Az itt ismertetett vizsgálatokban az N-terminálison pegilezett és véletlenszerűen pegilezett BDNF molekulák (lásd az 1. és 3. példát) biológiai aktivitását értékeljük ki lézionált felnőtt motoneuronokban.

## Módszerek

### A. Sebészeti beavatkozás és kezelés állatokon

Felnőtt nőstény Sprague-Dawley patkányokat (összesen 52 patkány, mindegyik csoportban n=4) anesztetizálunk egy

kóktállal (43 mg/ml ketamin-hidroklorid, 8,6 mg/ml xilazin és 1,43 mg/ml acepromazin), 0,7 ml/testsúlykilogramm dózisban. A jobb arcideget átvágjuk a halántékcsonti karcsecselyük közelében. Az állatokat naponta egyszer szubkután kezeljük hét napig, a sebészeti beavatkozás napján kezdve (0. nap). A használt dózisok: 0,1, 0,3, 1,0 és 5,0 mg per testsúlykilogramm a nem-pegilezett BDNF-ből, az N-terminális monomPEG(20kDa)-BDNF konjugátumból vagy a véletlenszerűen pegilezett polimPEG-BDNF konjugátumból, mindegyik PBS-ben. Egy patkánycsoportot csak PBS-sel kezeltünk, ez a kontroll. Az állatok testsúlyát naponta mérjük.

#### B. ChAt immunokémia

A patkányokat túladagolt altatóval elpusztítjuk, majd transzkardiálisan PBS-sel perfundáltatjuk, utána 4% paraformaldehiddel 0,1 mol/l nátriumfoszfát pufferrel (pH=7,2). Az agytörzset eltávolítjuk, 30%-os, PBS-ben készített cukoroldattal krioprotekciót végzünk, egy csúszó mikrotom tokmányba fogjuk, majd 80 µm-es sorozat koronális bevágást teszünk az arcideg nukleusz régióban. A szekciókat azután immunokémiához készítjük elő, ChAT elleni egér monoklonális ellenanyaggal (aszcitész, 1:500, Chemicon, Temecula, CA), majd 2 µg/ml szekunder biotinilezett ló anti-egér ellenanyagot adunk hozzá, az ABC módszer alkalmazásával (Vector Laboratories, Burlingame, CA) [Yan és Johnson: J. Neurosci 8(9), 3481-3498 (1988)].

### C. Az immunokémiai szekciók mennyiségi meghatározása

Egy Quantimet 520 képelemzőt (Leica, Inc., Deerfield, IL), amit egy Nikon Optiphot-FXA mikroszkóphoz kapcsoltunk, használunk a ChAT festődés relatív intenzitásának mennyiségi meghatározására. Egy 510 nm-es keskenysávú szűrőt (Oriel Corp., Stratford, CT) használunk egy Nikon-Plan Apokróm 2X objektívvel, hogy erősen kontrasztos képeket kapjunk az arcideg régióról a hisztológiai szekciókban. A ChAT immunreaktivitás relatív intenzitását úgy határozzuk meg, hogy meghatározzuk az egyes kijelölt nukleuszok átlagos szürkescálás intenzitását, és kivonjuk belőle a szomszédos ChAT negatív szürkeállomány háttér-festődését. Mindegyik állat esetében az arcideget tartalmazó három vagy négy szekciót használunk a mennyiségi meghatározáshoz. Mivel a BDNF nem érinti a ChAT immunfestődést a nem-léziós arcideg nukleuszban, az adatokat az ugyanazokban a szekciókban levő nem-léziós és léziós arcideg nukleuszok relatív optikai sűrűsége arányában fejezzük ki. Az adatokat statisztikailag elemezzük ANOVA-val, majd Dunnett  $t$  tesztet végzünk.

### D. Eredmények

A felnőtt patkányokon végzett axotómia a ChAT immunreaktivitás gyors és reprodukálható csökkenését okozza a motoneuronokban [Lams és mtsai: Brain Res. 475, 401-405 (1988); Armstrong és mtsai: J.Comp.Neurol. 304, 596-607 (1991)]. A nem-pegilezett BDNF és a pegilezett BDNF felnőtt motoneuronokra gyakorolt hatásai kiértékelésére az előzőekben

ismertetett arcideg átvágás paradigmát alkalmaztuk ezeknek a polipeptideknek a ChAT motoneuronokban való expresszáció vizsgálataira.

Hét nappal a jobb arcideg átvágása után a ChAT immunreaktivitás nagyrészt eltűnt a léziós arcideg nukleusból a PBS kezelést kapott állatoknál (4. ábra, A panel, az arcideg nukleusz a jobboldalon van). A természetes BDNF-fel (5 mg/kg, 4. ábra, B panel), N-terminális monoMPEG-BDNF konjugátummal (0,3 mg/kg, 4. ábra, C panel) és véletlenszerűen pegilezett poliMPEG-BDNF konjugátummal (0,3 mg/kg, 4. ábra, D panel) végzett szubkután kezelés jelentősen enyhíti a ChAT immunreaktivitás lézió által indukált csökkenését. Ennek a jelenségnek a mennyiségi kiértékeléséhez a ChAT immunfestett szekciókban mind a léziós mind a nem-léziós arcideg nukleuszok optikai sűrűségét mérjük. A természetes, az N-terminális monoMPEG-BDNF konjugátum és a véletlenszerűen pegilezett poliMPEG-BDNF konjugátum is csökkenti a ChAT immunreaktivitás lézió által indukált csökkenését, dóziszfüggő módon (5. ábra). A természetes BDNF 5 mg/kg dózisban a hordozó kontrollal szemben a lézió által indukált ChAT immunreaktivitás csökkenést jelentősen enyhítette. Mind az N-terminálison pegilezett monoMPEG-BDNF konjugátum, mind a véletlenszerűen pegilezett poliMPEG-BDNF konjugátum jelentős javulást eredményezett a hordozó kontrollal szemben az összes vizsgált dózisban, valamint a természetes BDNF-fel szemben is a vizsgált alacsony dózisban ( $p < 0,01$ ). Becslés alapján a pegilezett BDNF-fel végzett kezelés a dózis-hatás görbét balra tolja, a természe-

tes BDNF-hez viszonyítva körülbelül húszszorosan (5. ábra), jelezve ezzel a pegilezett BDNF hatékonyságának fokozódását a léziós motoneuronokra.

#### 10. Példa

#### Az N-terminális monoMPEG-NT-3 konjugátum biológiai aktivitásának kiértékelése embrionális csirke DRG biológiai vizsgálatban

A nem-pegilezett NT-3 és az N-terminálison pegilezett monoMPEG(20kDa)-NT-3 konjugátum összehasonlító biológiai aktivitását embrionális csirke dorzális gyök ganglionon (DRG) végezzük [Lindsay és mtsai: Dev. Biol. 112, 319-328 (1985)]. Röviden, lukanként öt embrionális (E8) csirke dorzális gyök gangliont tenyésztünk explantumokként egy kollagén hordozóban 2 ml F14 közeggel, ami 5% normális lószérumot tartalmaz. A neurotróf faktorok (mind a pegilezett mind a nem-pegilezett forma) hatásait vizuálisan értékeljük egy fáziskontraszt mikroszkóp alatt, majd 0-5 közötti skálán értékeljük ki (0=nincs neurit kinövés, 5=maximális neurit kinövés).

Az alábbi 2. táblázatban látható eredmények azt mutatják, hogy a pegilezett NT-3 nem veszített az aktivitásából a nem-pegilezett NT-3-hez viszonyítva, ami egy meglepő eredmény, a többi, *in vitro* körülmények között vizsgált pegilezett fehérjéhez viszonyítva, amelyeknek a biológiai aktivitása jelentősen lecsökken.

## 2. Táblázat

E8 csirke DRG in vitro biológiai vizsgálat

Faktor	A minta	
	koncentrációja (ng/ml)	Neurit kinövés
NT-3	0,5	1, 2, 2, 3, 3
	5	4, 4, 5, -, -
	10	0,5, 1, 1, 1, 2
	50	0,5, 0,5 0,5 1, 1
Pegilezett NT-3	5	4, 4, 4, 2, 2
	50	3, 3, 2, 2, 1
	500	0, 0,5, 0,5 1, 2
	1000	3, 3, 2, 1, 0,5

11. Példa

Az N-terminális monoPEG(20kDa)-BDNF konjugátum in vivo biológiai aktivitásának további kiértékelése felnőtt patkányokban, az agyszöveten keresztül való diffúzióval

1. Egyszeri striatális injekció

Egy  $\mu$ l nem-pegilezett BDNF-et vagy N-terminális monomPEG(20 kDa)-BDNF konjugátumot (1 mg/ml foszfáttal pufferezt sóoldatban) injekciózunk 18-20 órára *in vivo* felnőtt nőstény patkányok (n=4) agyának jobb striátumának középpontjába. Húsz órával később az állatokat leöljük túladagolt anesztetizáló szerrel, majd transzkardiálisan perfundáljuk PBS-sel, utána 0,1 mol/l koncentrációjú nátri-

umfoszfát pufferben készített 4% paraformaldehiddel. Az agyakat eltávolítjuk, krioprotekcióként 30%-os, PBS-ben készített PBS-t alkalmazunk, majd csúszó mikrotom tokmányra fagyasztjuk és 60  $\mu\text{m}$ -es szeriális koronális metszeteket készítünk. A metszeteket azután immunokémiához előkészítjük, 1  $\mu\text{mol/ml}$  nyúl anti-BDNF ellenanyaggal, azután 2  $\mu\text{mol/l}$  biotinilezett szekunder kecske anti-BDNF ellenanyagot adunk hozzá, az előzőkben ismertetett ABD módszerrel. Nagyon erős festődés látható a striátum injekciózási területén, mind a nem-pegilezett, mind a pegilezett BDNF mintákkal. A pegilezett BDNF-ről látható, hogy egy nagyobb szövetterületre diffundál mint a nem-pegilezett BDNF, a különbség körülbelül 2,4-szeres, amint az a 6. ábrán látható. Volt egy pár neuron a substantia nigra-ban, amelyek pozitívan festődtek.

## 2. Striatális hétnapos infúzió

Felnőtt nőstény patkányok ( $n=4$ ) kaptak naponta 12  $\mu\text{g}$  nem-pegilezett BDNF vagy N-terminális monoMPEG(20kDa)-BDNF konjugátumból infúziót a striátumba, hét napig. Ebben a vizsgálatban mindkét BDNF formának jobb a behatolása mint az előzőkben említett egyszeri injekciós protokoll esetében. A pegilezett BDNF sokkal nagyobb területre vándorol mint a természetes BDNF, a különbség körülbelül 6,1-szeres, amint az a 7. ábrán látható. Sokkal több neuron festődik pozitívan a substantia nigra compacta-ban ("SNC") és a ventrális tegmentális területen ("VTH") a pegilezett BDNF-fel végzett infúzióval (8. ábra, C és D panel) mint a nem-pegilezett BDNF-

fel végzett infúzióval (8. ábra, A és B panel). Nagyobb nagyítás mellett a BDNF immunreaktivitás pontszerű, és a perikarionban, ami azt mutatja, hogy a BDNF retrográd módon transzportálódik a sejttesthez képest terminális idegből. A substantia nigra reticulata ("SNR") mediális ventrális részében látható pozitív festődés a neuropilben van, és nem kötődik semmilyen sejttesthez. Ez a festődés aspecifikus diffúzió vagy receptor által közvetített retrográd transzport következménye [Ferguson és mtsai: J. Comp. Neurol. 313, 680-692 (1991)].

Ezek az eredmények nagyon jelentősek. Tipikus esetben az állatok agyának parenchimális részébe való beadása után a BDNF-ről kiderült, hogy nagyon gyengén diffundál keresztül az agyszöveten. A jelen találmányban ismertetett adatok azt mutatják, hogy jelentős javulás érhető el az ilyen diffúziós képességben, ha pegilezett BDNF-et használunk, ami azt mutatja, hogy potenciálisan nagyobb a terápiás hatékonyságuk, legalább az ilyen beadási formáknál.

Az alábbiakban ismertetjük a bejelentésben említett szekvenciákat.

**A SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE**

## (1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) BENYÚJTÓ: Amgen Inc.

(ii) A TALÁLmány CÍME: BDNF és NT-3 származékok

(iii) A SZEKVENCIÁK SZÁMA: 4

(iv) LEVELEZÉSI CÍM:

(A) CÍMZETT: Amgen Inc.

(B) UTCA: 1840 Dehavilland Drive

(C) VÁROS: Thousand Oaks

(D) ÁLLAM: Kalifornia

(E) ORSZÁG: USA

(F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 91320-1789

(v) SZÁMÍTÓGÉPES FORMA:

(A) A HORDOZÓ TÍPUSA: FLOPPY LEMEZ

(B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC KOMPATIBILIS

(C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAM: PATENTIN RELEASE #1.0, VERSION

#1.25

(vi) A JELENLEGI BENYÚJTÁS ADATAI:

(A) A BENYÚJTÁS SORSZÁMA:

(B) A BENYÚJTÁS IDŐPONTJA:

(C) OSZTÁLYOZÁS:

(VIII) ÜGYVIVŐ/ÜGYNÖK INFORMÁCIÓ:

(A) NÉV: Mazza, Richard J.

(C) REFERENCIA/LAJSTROMSZÁM: A-298





4. számú szekvenciavázlat

(i) A szekvencia jellemzői:

(A) Hossz: 120 aminosav

(B) Típus: aminosav

(C) Száltípus: egyszálú

(D) Topológia: lineáris

(ii) A molekula típusa: fehérje

(xi) A szekvencia leírása: 4. számú szekvencia

Met	Tyr	Ala	Glu	His	Lys	Ser	His	Arg	Gly	Glu	Tyr	Ser	Val
1				5					10				
Cys	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Trp	Val	Thr	Asp	Lys	Ser	Ser	Ala
15					20					25			
Ile	Asp	Ile	Arg	Gly	His	Gln	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Glu	Ile
	30					35					40		
Lys	Thr	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Lys	Gln	Tyr	Phe	Tyr	Glu	Thr
		45					50					55	
Arg	Cys	Lys	Glu	Ala	Arg	Pro	Val	Lys	Asn	Gly	Cys	Arg	Gly
			60						65				70
Ile	Asp	Asp	Lys	His	Trp	Asn	Ser	Gln	Cys	Lys	Thr	Ser	Gln
				75						80			
Thr	Tyr	Val	Arg	Ala	Leu	Thr	Ser	Glu	Asn	Asn	Lys	Leu	Val
	85				90						95		
Gly	Trp	Arg	Trp	Ile	Arg	Ile	Asp	The	Ser	Cys	Val	Cys	Ala
	100					105						110	
Leu	Ser	Arg	Lys	Ile	Gly	Arg	Thr						
		115					120						



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy BDNF polipeptidet tartalmazó BDNF származék, ami legalább egy vízoldható polimerhez kapcsolódik.

2. Egy NT-3 polipeptidet tartalmazó NT-3 származék, ami legalább egy vízoldható polimerhez kapcsolódik.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti származék, amelyben a polipeptidet baktériumsejtben állítjuk elő rekombináns módszerrel.

4. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti származék, amelyben a vízoldható polimert az alábbi csoportból választjuk ki: dextrán, poli(N-vinil pirrolidon), polietilén-glikol, poli-propilén-glikol, polipropilén-oxid/etilén-oxid kopolimerek, polioxietilézett poli-olok és polivinil-alkoholok.

5. A 4. igénypont szerinti származék, amelyben a vízoldható polimer a polietilén-glikol.

6. Az 5. igénypont szerinti származék, amelyben a vízoldható polimer a monoetoxi-polietilén-glikol.

7. Az 5. igénypont szerinti származék, amelyben a poli-etilén-glikol a polipeptidhez egy acil- vagy alkil-kötésen keresztül kapcsolódik.

8. Az 5. igénypont szerinti származék, amelyben a poli-etilén-glikol molekulásúlya 2 és 100 kDa között változik.

9. A 8. igénypont szerinti származék, amelyben a poli-etilén-glikol molekulásúlya 5 kDa és körülbelül 50 kDa között változik.



10. Eljárás egy vízoldható polimernek a polipeptidhez való kapcsolására, amely polipeptid lehet BDNF vagy NT-3, azzal jellemezve, hogy a vízoldható polimer egyetlen reakcióképes aldehyd-csoporttal rendelkezik, és az eljárás az alábbi lépéseket tartalmazza:

(a) a polipeptidet egy vízoldható polimerrel reagáltatjuk redukív alkilezési körülmények között, eléggé alacsony pH-n ahhoz, hogy lehetővé tegyük, hogy az említett polipeptid N-terminálisán levő  $\alpha$ -aminocsoport reakcióképes legyen; és

(b) izoláljuk a polipeptidet, ami legalább egy vízoldható polimerhez kapcsolódik.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás egy vízoldható polimernek egy polipeptidhez való kapcsolására, azzal jellemezve, hogy a (c) lépést is tartalmazza, ami abban áll, hogy a legalább egy vízoldható polimerhez kapcsolódó polipeptidet elválasztjuk a nem-reagált molekuláktól.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polimer gyógyászatiilag elfogadható.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vízoldható polimert az alábbi csoportból választjuk ki: dextrán, poli(N-vinil pirrolidon), polietilén-glikol, poli-propilén-glikol, homopolimerek, polipropilén-oxid/etilén-oxid kopolimerek, polioxietilézett poliolkok és polivinil-alkoholok.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vízoldható polimer a polietilén-glikol.



15. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a pH érték 3 és körülbelül 9 között van.

16. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a redukív alkilezés magában foglalja a nátrium-cianobórhidrid mint redukáló ágens használatát.

17. Eljárás polietilén-glikolnak polipeptidhez való kapcsolására, amely polipeptid lehet BDNF vagy NT-3, azzal jellemezve, hogy a polietilén-glikol egyetlen reakcióképes aldehid-csoporttal rendelkezik, és az eljárás az alábbi lépéseket tartalmazza:

(a) a polipeptidet polietilén-glikollal reagáltatjuk redukív alkilezési körülmények között, eléggé alacsony pH-n ahhoz, hogy lehetővé tegyünk, hogy az említett polipeptid N-terminálisán levő  $\alpha$ -aminocsoport reakcióképes legyen; és

(b) izoláljuk a polietilén-glikolhoz kapcsolódó polipeptidet.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás polietilén-glikol molekulának egy polipeptidhez való kapcsolására, azzal jellemezve, hogy a (c) lépést is tartalmazza, ami abban áll, hogy a reakcióterméket elválasztjuk a nem-reagált molekuláktól.

19. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a polietilén-glikol molekula molekulásúlya körülbelül 2 kDa és körülbelül 100 kDa között van.

20. Egy vízoldható polimer és egy, a 17. igénypont szerint előállított polipeptid konjugátuma.

21. Egy lényegében homogén BDNF készítmény, amely az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoporton monopegilezve van.

22. Egy lényegében homogén NT-3 készítmény, amely az N-terminális  $\alpha$ -aminocsoporton monopegilezve van.

23. Eljárás a BDNF *in vivo* hatékonyságának javítására léziós motoneuronok kezelésében, azzal jellemezve, hogy egy pegilezett BDNF származékot használunk.

24. Eljárás a BDNF vagy az NT-3 agyszöveten keresztül való vándorlásának javítására, azzal jellemezve, hogy pegilezett BDNF vagy NT-3 származékot használunk.

A meghatalmazott

**ifj. Szentpéteri Ádám**  
 szabadalmi ügyvivő  
 az S.B.G. & K. Nemzetközi  
 Szabadalmiroda tagja  
 H-1062 Budapest, Andrássy út 113.  
 Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-823

*Hs oldel + 8 oldal*



Patent

ANYAGÉLEK  
KÉSZÍTÉSE

FIG. 1

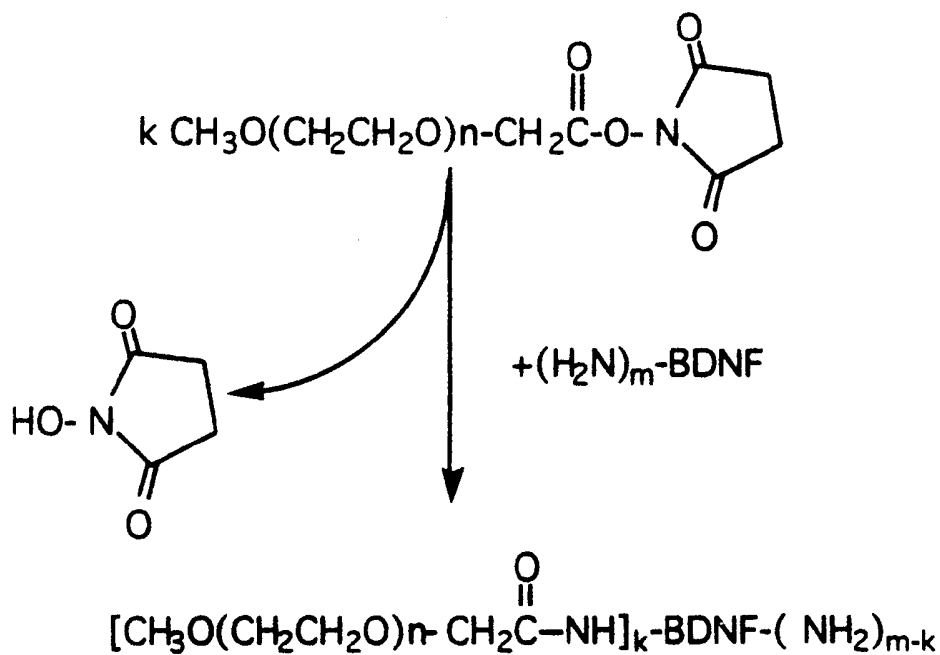


FIG. 2

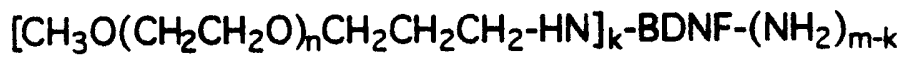
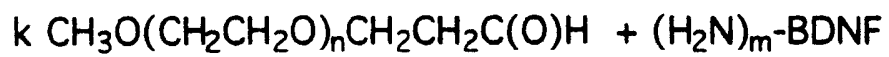


FIG. 3

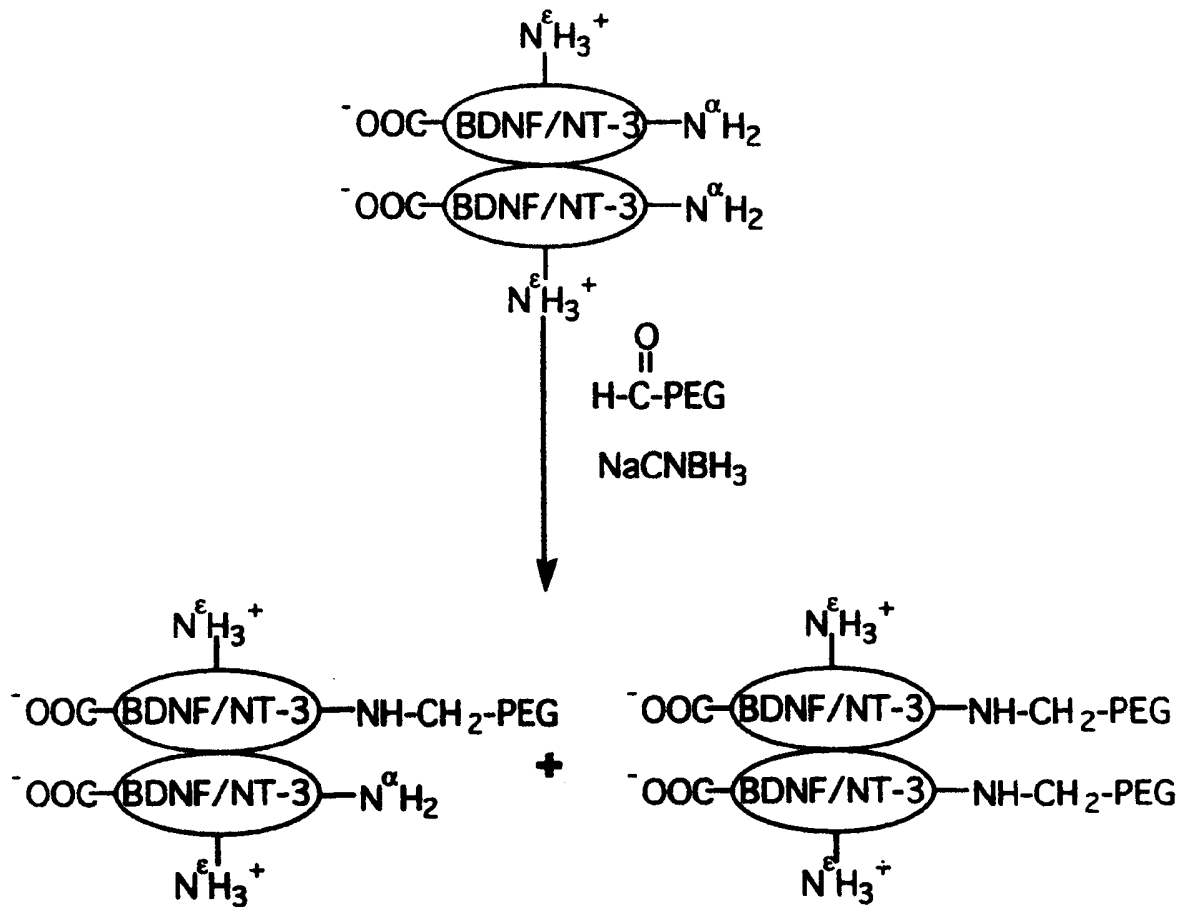


FIG.4B

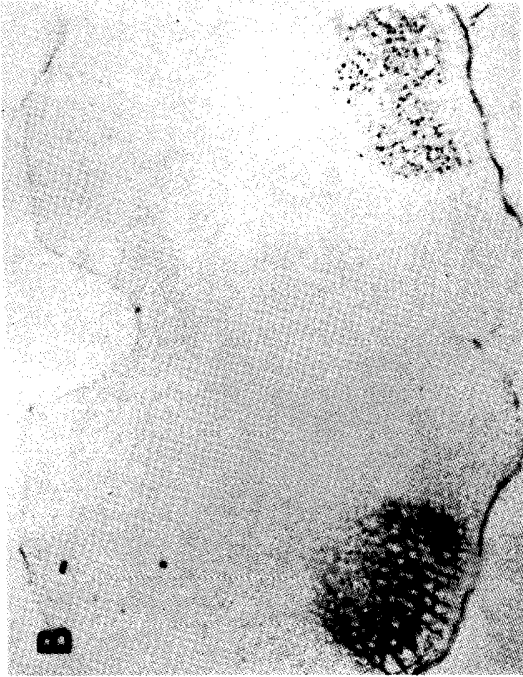


FIG.4D



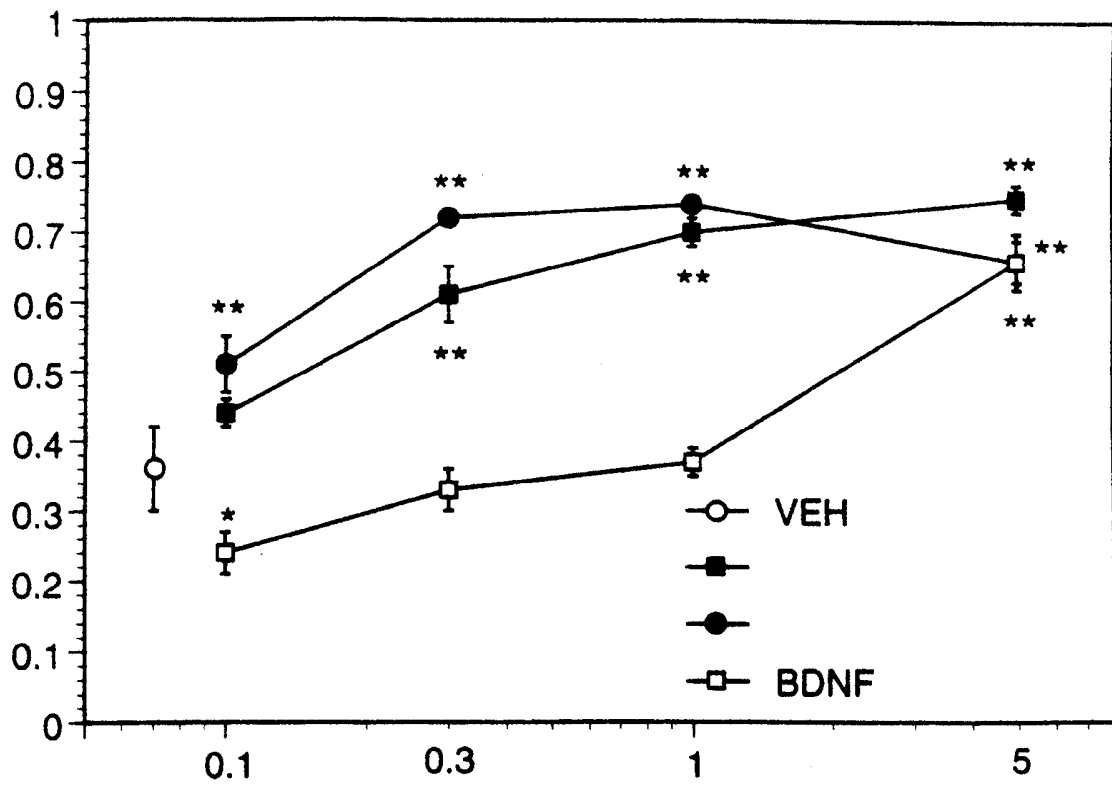
FIG.4A



FIG.4C



FIG.5



**FIG.6**

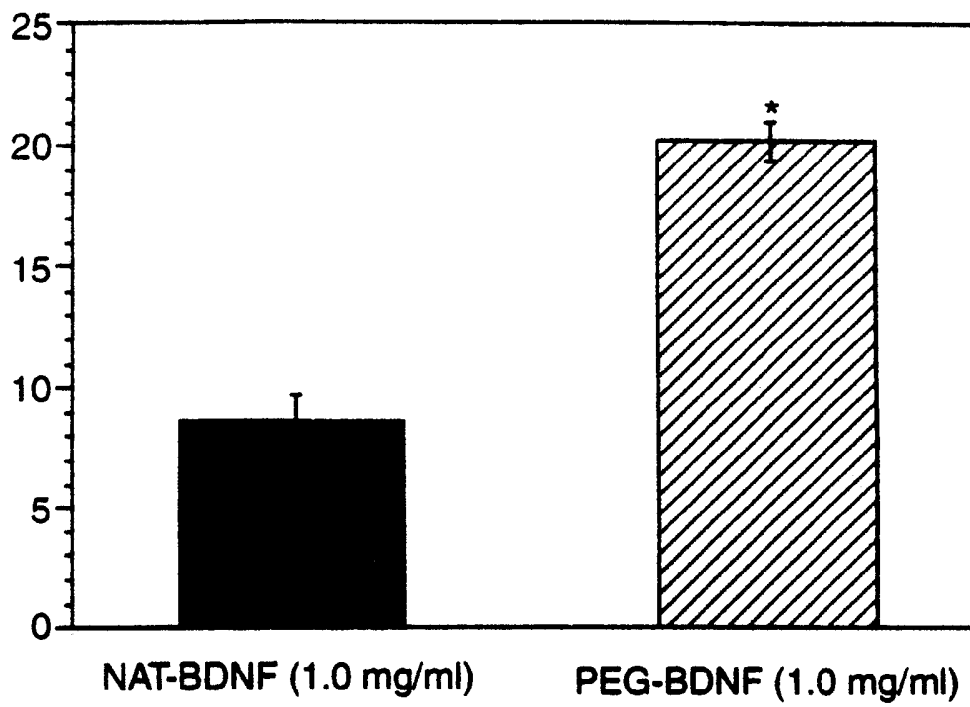


FIG.7

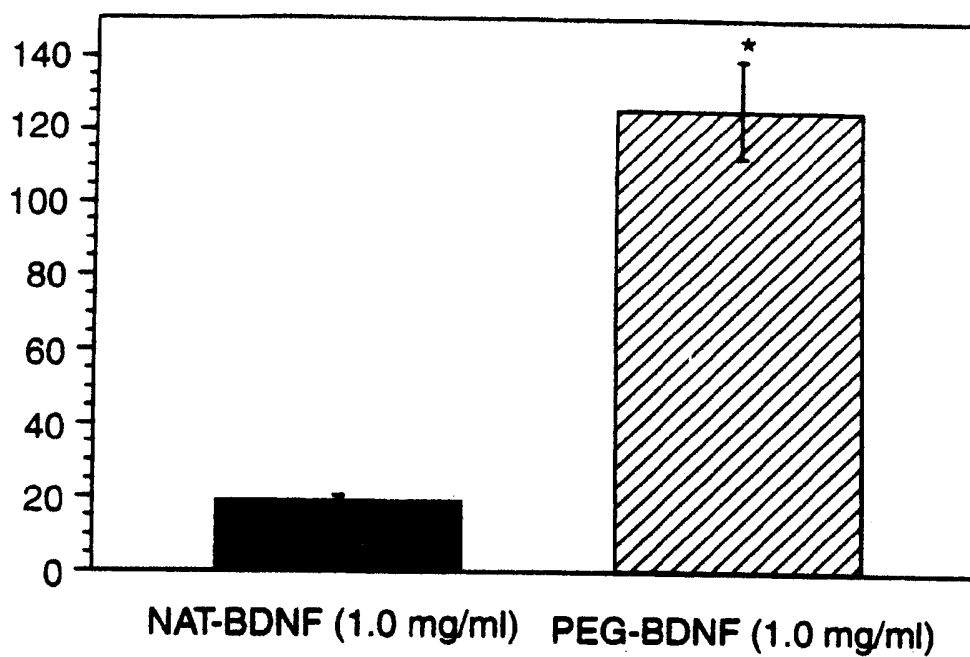


FIG.8B

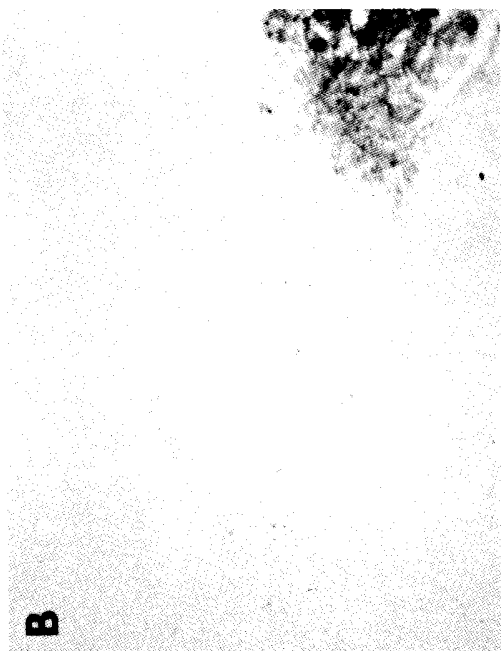


FIG.8A

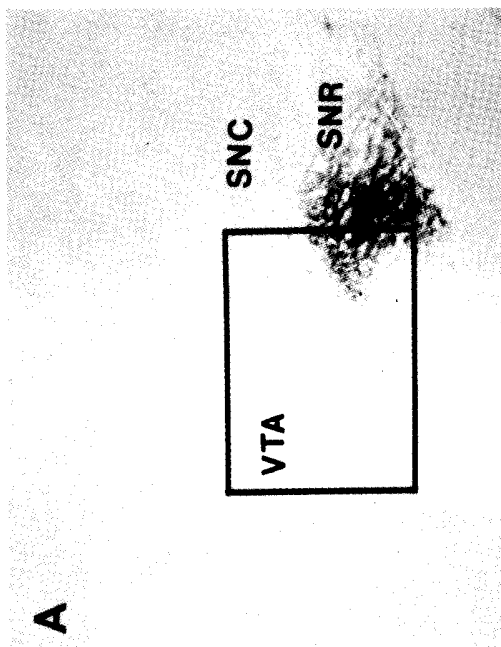


FIG.8D

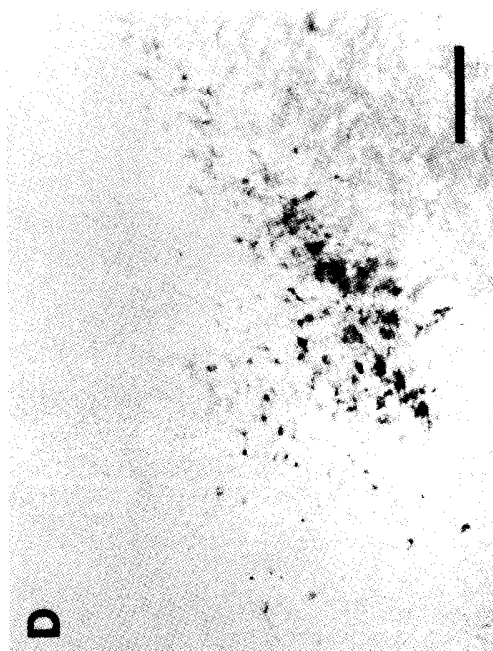


FIG.8C

