

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.02.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.02.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/0102631**
(33) Země priority: **FR**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č. 8/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/FR2002/000691**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/068461**

(21) Číslo dokumentu:

2003-2612

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C 07 K 14/415

(71) Přihlašovatel:

SOCIÉTÉ DE CONSEILS DE RECHERCHES ET
D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (S.C.R.A.S.),
Paris, FR

(72) Původce:

Ferrandis Eric, Saint Rémy les Chevreuse, FR
Teng Beng Poon, Gif-sur-Yvette, FR
Sohier Christine, Saint Roch, FR
Thurieu Christophe, Paris, FR

(74) Zástupce:

Švorčík Otakar JUDr., Hálkova 2, Praha 2, 12000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Heterokarpin, protein, který váže lidský GHRH

(57) Anotace:

Řešení se týká proteinu, který váže lidský hormon uvolňující
růstový hormon (human Growth Hormone releasing hormone
- GHRH). Uvedený protein se získá z rostliny *Pilocarpus*
heterophyllus a může být použit pro přípravu léčiva, určeného
pro antagonizaci účinků GHRH a pro léčbu proliferativních
onemocnění (zejména rakoviny), akromegalie a diabetických
retinopatií a nefropatií.

CZ 2003 - 2612 A3

Heterokarpin, protein, který váže lidský GHRH

Oblast techniky

Předložený vynález se týká proteinu, který váže lidský GHRH (lidský hormon uvolňující růstový hormon - human Growth Hormone Releasing Hormone).

Dosavadní stav techniky

Růstový hormon (Growth Hormone - GH) je protein o 191 aminokyselinách, který stimuluje produkci řady růstových faktorů, jako je inzulínu podobný růstový faktor I (Insulin-Like Growth Factor I - IGF-1) a spouští růst velkého množství tkání (kostra, spojovací tkáně, svaly a vnitřní orgány). GH má také fyziologické účinky tím, že zvyšuje syntézu nukleových kyselin, proteinů a lipolýzu za snížení vylučování moči (Frohman L. A. & Kineman, R. D., Handbook of Physiology, Hormonal Control of Growth, editoři Kostyo, J. L. a Goodman, H. M. (Oxford Univ. Press, New York, 1999), str. 189-221).

Syntéza GH je regulována faktory s pozitivním nebo negativním účinkem, vylučovanými v hypothalamu. Hlavní faktor, který řídí produkci GH je hormon, uvolňující růstový hormon (Growth Hormone Releasing Hormone - GHRH), což je u člověka peptid o 44 aminokyselinách.

GH a GHRH jsou přítomny v mechanismu řady onemocnění. Mezi nimi je možno jmenovat zejména rakovinu (zejména rakovina prostaty nebo plic), akromegalii, diabetické retinopatie a nefropatie; u těchto patologií je indikována léčba využívající antagonisty GHRH. Z důvodu velkého počtu onemocnění, které potenciálně přicházejí v úvahu, farmaceutický průmysl pokračuje v hledání antagonistů GHRH.

Přihlašovatelům se podařilo izolovat nový protein rostlinného původu, který má vlastnost vázat lidský GHRH.

Předmět vynálezu

Předložený vynález se tedy především týká izolovaného proteinu, který je možno získat extrakcí z rostliny *Pilocarpus heterophyllus*, který je charakterizován svojí molekulovou hmotností přibližně 90,9 kDa a zahrnuje fragmenty peptidových sekvencí SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 a SEQ. ID. NO. 3, přičemž tento protein se může vyskytovat ve formě glykosylované nebo neglykosylované. Pro zjednodušení následujícího výkladu bude tento protein dále označován jako heterokarpin.

Uvedené sekvence SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 a SEQ. ID. NO. 3 jsou následující:

SEQ. ID. NO. 1 : KLIGARYFDK

SEQ. ID. NO. 2 : YGEDIIVGVIDSGV

SEQ. ID. NO. 3 : PESESY

Nomenklatura použitá pro uvedení těchto sekvencí (stejně tak jako ve zbytku předložené přihlášky vynálezu) pro definici peptidů je nomenklatura převzatá z IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, ve které v souladu s obvyklou reprezentací je N-terminální aminokyselina (aminová skupina) uvedena vlevo a C-terminální aminokyselina (skupina karboxylová) je uvedena vpravo. Výraz přirozená aminokyselina označuje jednu z přirozených L-aminokyselin, které se nacházejí v přirozených proteinech: Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, Asp, Asn, Glu, Gln, Cys, Met, Phe, Tyr, Pro, Trp a His.

Řekneme, že protein je izolovaný, jestliže je vyjmut z jeho původního prostředí. Přirozený protein je izolovaný zejména pokud je oddělen od biologického materiálu, ve kterém koexistuje v přírodním systému.

Předložený vynález se výhodně týká heterokarpinu v jeho neglykosylované formě.

Ve výhodném provedení předloženého vynálezu se heterokarpin získává z buněčného extraktu z rostliny *Pilocarpus heterophyllus* pěstované *in vitro*.

Předložený vynález se mezi jiným také týká monoklonální protilátky nebo jejího vazebného fragmentu antigenu, který specificky váže heterokarpin.

Heterokarpin má vlastnost vázat lidský GHRH. *In vitro* heterokarpin váže lidský GHRH a inhibuje tím syntézu cyklického AMP indukovanou vazbou lidského GHRH na jeho receptor. *In vivo*, u krysy, se komplex heterokarpin/lidský GHRH vytváří v krevním kompartmentu a inhibuje způsobem závislým na dávce syntézu GH indukovanou 10 µg lidského GHRH v molárním poměru. Heterokarpin má vlastnost vázat lidský GHRH.

Tyto vlastnosti způsobují, že sloučenina podle předloženého vynálezu má farmaceutické použití. Předložený vynález se tedy také týká heterokarpinu ve formě glykosylované nebo neglykosylované jako léčiva. Předložený vynález se také týká farmaceutických kompozic, obsahujících jako účinnou látku heterokarpin ve formě glykosylované nebo neglykosylované, přičemž uvedené kompozice také obsahují jeden nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů. Předložený vynález se také navíc týká použití heterokarpinu ve formě glykosylované nebo neglykosylované pro přípravu léčiv určených pro antagonizaci účinků GHRH, pro léčbu proliferativních onemocnění (a zejména rakoviny), pro léčbu akromegalie nebo pro léčbu diabetických retinopatií a nefropatií. V souvislosti s rakovinou je heterokarpin obzvláště vhodný pro přípravu léčiva, určeného pro léčbu karcinoidních a pankreatických nádorů, hypothalamo-hypofyzárních gangliocytomů, bronchiálních, intestinálních

a hepatických karcinomů, sympatoadrenergních nádorů, feochromocytomů, adenomů hypofýzy a karcinomů štítné žlázy.

Předložený vynález se také týká jakožto léčiva monoklonální protilátky nebo jejího vazebného fragmentu antigenu, která váže specificky heterokarpin. Předložený vynález se navíc týká farmaceutické kompozice, obsahující jako účinnou látku monoklonální protilátku nebo její vazebný fragment antigenu, které vážou specificky heterokarpin, přičemž uvedená kompozice obsahuje také jeden nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů. Předložený vynález se mimo to týká použití monoklonální protilátky nebo jejího vazebného fragmentu antigenu, které vážou specificky heterokarpin, pro přípravu léčiv určených k antagonizaci účinků GHRH, pro léčbu proliferativních onemocnění (a zejména rakoviny), pro léčbu akromegalie nebo pro léčbu diabetických retinopatií a nefropatií. V souvislosti s rakovinou uvedená monoklonální protilátka nebo její vazebný fragment antigenu je obzvláště vhodný pro přípravu léčiva, určeného pro léčbu karcinoidních a pankreatických nádorů, hypothalamohypofyzárních gangliocytomů, bronchiálních, intestinálních a hepatických karcinomů, sympatoadrenergních nádorů, feochromocytomů, adenomů hypofýzy a karcinomů štítné žlázy.

Předložený vynález se nakonec týká použití heterokarpinu jako excipientu ve farmaceutické kompozici určené pro prodloužené uvolňování GHRH. Předložený vynález se také týká farmaceutické kompozice, která obsahuje GHRH,

heterokarpin a jeden nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů.

Předložený vynález se nakonec týká způsobů extrakce a izolace heterokarpinu z buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus*, přičemž uvedené buňky výhodně pocházejí z kultur *in vitro*. Tyto způsoby zahrnují v zásadě krok extrakce buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus* vodou o teplotě 0 až 50 °C a s výhodou od 4 do 25 °C, přičemž po uvedeném kroku extrakce následuje krok filtrace pro separaci filtrátu bohatého na heterokarpin buněk *Pilocarpus heterophyllus* a jeden nebo více kroků separace heterokarpinu od ostatních složek, extrahovaných z rostliny *Pilocarpus heterophyllus*.

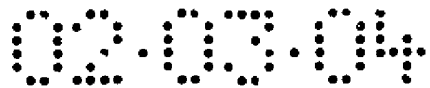
V první variantě tyto způsoby extrakce a izolace zahrnují v zásadě následující po sobě jdoucí kroky

- a) krok extrakce buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus* vodou o teplotě od 0 do 50 °C a s výhodou od 4 do 25 °C, přičemž uvedený krok extrakce je následován krokem filtrace pro separaci filtrátu bohatého na heterokarpin buněk *Pilocarpus heterophyllus*;
- b) krok precipitace extrahovaných proteinů, například přidáním síranu amonného, následovaný krokem separace precipitátu (filtrací nebo s výhodou centrifugací);
- c) rozpuštění precipitátu získaného v kroku b) ve vodě; a

d) krok chromatografie gelovou filtrací pro separaci heterokarpin od ostatních složek roztoku.

V jiné variantě tyto způsoby extrakce a izolace zahrnují v zásadě následující po sobě jdoucí kroky

- a) krok extrakce buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus* vodou o teplotě od 0 do 50 °C a s výhodou od 4 do 25 °C, přičemž krok extrakce je následován krokem filtrace pro separaci filtrátu bohatého na heterokarpin z buněk *Pilocarpus heterophyllus*;
- b) krok odstranění tuku z roztoku získaného v kroku a), okyseleného přidáním neoxidující kyseliny (například kyseliny chlorovodíkové, kyseliny sírové nebo kyseliny fosforečné) na pH s výhodou v rozmezí mezi 2 a 4, provedením extrakce kapalina-kapalina (s výhodou použitím organického rozpouštědla jako je dichlormethan, heptan, hexan nebo cyklohexan);
- c) krok odstranění taninu uvedením roztoku zbaveného tuku z kroku c) do kontaktu s polyvinylpyrrolidonem (nebo s nylonem 66) následovaný filtrací na pryskyřici s velkými póry (s výhodou pryskyřice na bázi polystyrenu jako je pryskyřice Diaion® HP-20);
- d) převedení filtrátu získaného z kroku c) na alkalické pH (s výhodou mezi pH 9 a 11) přidáním báze jako je hydroxid amoný, hydroxid sodný nebo hydroxid draselný;



- e) jeden nebo více kroků filtrace na aniontoměničové pryskyřici, přičemž vymývací rozpouštědlo pro tento nebo tyto kroky filtrace je s výhodou pufrovací roztok s pH mezi 9 a 11 a obsahující popřípadě gradienty koncentrace soli (jako je například chlorid sodný nebo síran amonný), pro separaci heterokarpinu od ostatních složek roztoku; a
- f) krok odsolení, spočívající v průchodu roztoku získaného v kroku e) přes pryskyřici oddělující složky směsi v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (jako je pryskyřice Sephadex® G25 nebo Superdex® 200 HR) a vymývání uvedené směsi na uvedené pryskyřici vodou.

Farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu podle předloženého vynálezu mohou být v pevné formě jako například prášky, pilulky, granule, tablety, liposomy, želé nebo čípky. Pilulky, tablety nebo želé mohou být potaženy látkou schopnou chránit kompozici před působením žaludeční kyseliny nebo enzymů v žaludku subjektu po dobu dostatečnou k tomu, aby tato kompozice prošla nenatrávená do tenkého střeva subjektu. Sloučenina může také být podáván lokálně, například přímo v místě nádoru. Sloučenina může také být podávána způsobem s prodlouženým uvolňováním (například používající kompozici s prodlouženým uvolňováním nebo perfúzní pumpu). Vhodný pevné nosiče mohou být například fosforečnan vápenatý, stearan hořečnatý, uhličitan hořečnatý, mastek, cukry, laktóza, dextrin, škrob, želatina, celulóza, methylcelulóza, sodná sůl karboxymethylcelulózy, polyvinylpyrrolidin a vosk.

Farmaceutické kompozice obsahující sloučeninu podle předloženého vynálezu mohou také být v kapalně formě, jako například roztoky, emulze, suspenze nebo přípravky s prodlouženým uvolňováním. Vhodné kapalné nosiče mohou být například voda, organická rozpouštědla jako je glycerol nebo glykoly jako je polyethylenglykol, stejně tak jako jejich směsi v různém poměru s vodou.

Podávání léčiva podle předloženého vynálezu se může provádět cestou topickou, orální, parenterální, intramuskulární injekcí a podobně.

Dávka sloučeniny podle předloženého vynálezu pro léčbu onemocnění nebo poruch uvedených výše se mění podle způsobu podávání, věku, tělesné hmotnosti a stavu léčeného subjektu pro léčbu a bude nakonec určena ošetřujícím lékařem nebo veterinářem. Taková dávka, určená ošetřujícím lékařem nebo veterinářem, bude dále nazývána "terapeuticky účinné množství".

Podle předloženého vynálezu je možno připravit heterokarpin způsobem popsáním dále.

Příprava heterokarpinu

Ve výhodném provedení předloženého vynálezu se připraví jako kultury *in vitro* kaly (callus) nebo buněčné suspenze pocházející z různých částí rostliny. Tyto tkáně kultivované v polotuhém nebo kapalném prostředí jsou

schopny provádět biologickou syntézu sloučenin, které mají biologické vlastnosti.

Výrazem „kalus“ se v předložené přihlášce vynálezu rozumí makroskopický soubor nediferenciovaných buněk rostlin v kultuře v polotuhém živném prostředí. Pod výrazem „nediferenciované buňky“ jsou v předložené přihlášce vynálezu označovány buňky, které mají schopnost se za jistých podmínek množit ve formě kalusu nebo buněčné suspenze bez morfogeneze. Nakonec výrazem „buněčná suspenze“ se rozumí nediferenciované buňky, které mohou vytvořit mikroskopický soubor v kultuře v kapalném živném prostředí.

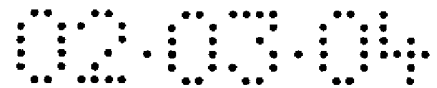
Volba živného prostředí, hormony a podmínky kultury tvoří nedílnou součást předloženého vynálezu stejně tak jako extrakce a analýza extraktu z kultur *in vitro*.

Buňky semen *Pilocarpus heterophyllus* mohou být kultivovány v suspenzi například způsobem uvedeným dále.

Orgány se dekontaminují obvyklými způsoby před uvedením do kultury. Orgány rostlin *in vitro* také slouží jako výchozí materiál pro kalogenezi aniž by byla nutná předchozí desinfekce. Výhodná základní živná prostředí jsou prostředí běžně používaná pro kultury *in vitro*: je to Gamborgovo médium (popsané v Gamborg a kol., Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells, Exp. Cell Res. (1968), 50 (1), 151-158). Zdroj uhlíku je sacharóza, ale může také být použita glukóza v koncentraci od 1 do 120

g/l, výhodně přibližně od 30 g/l. Je také možno snížit obsah makroelementů v poměru 2. Do prostředí se přidá auxin nebo auxin a cytokinin a s výhodou spojení dvou hormonů, obecně kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová a kinetin, ale kyselina α -naftalenoctová (ANA), kyselina β -indolooctová (AIA), kyselina β -indolbutanová (AIB) nebo pikloram mohou také být kombinovány s kinetinem nebo benzylaminopurinem (BAP). Koncentrace se může měnit v rozmezí od 0,1 do 10 mg/l pro auxin (je možno zvolit například 1 mg/l) a od 0,01 do 2 mg/l pro cytokinin (je možno zvolit například 0,06 mg/l). Vitaminy jsou ty, které se používají v různých základních prostředích. Kultury se pěstují za světla nebo v temnotě. Teplota se může měnit od 10 °C do 33 °C, ale výhodně je 23 °C. pH prostředí je v rozmezí od 4 do 6,5 a výhodně se nastaví na 5,8 před sterilizací. Do prostředí kromě toho může být přidán agar nebo může být bez přídavku agaru.

Primární kalusy se objeví po několika dnech kultivace a mohou být odděleny od počátečního implantu, odebrány a přesazeny po přibližně 1 měsíci a potom kultivovány v polotuhém gelovitém prostředí (ve zkumavce nebo Petriho misce) po dobu 4 až 8 týdnů, výhodně 6 týdnů a takto je možno kalus uchovávat po řadu roků postupným přesazováním do nového média. Je také možno přenést kalus do míchaného kapalného kultivačního prostředí (Erlenmeyerova baňka nebo bioreaktor) s přesazováním po 2 až 6 týdnech a výhodně po 3 týdnech.



Získané kmeny se odlišují genetickým původem, kultivačními podmínkami, druhem a přítomností nebo absencí morfogeneze.

Lyofilizované buňky *Pilocarpus heterophyllus* se extrahují vodou o teplotě od 0 do 50 °C a výhodně od 4 do 10 °C. Takto získaný extrakt se lyofilizuje před opětovným rozpuštěním s odpovídající koncentrací (například přibližně 30 % sušiny). Proteiny precipitují přidáním koncentrovaného roztoku síranu amonného (například s koncentrací, která představuje 70 až 90 % nasycené koncentrace), který se rozpustí v minimálním množství vody a nerozpustné látky se získají centrifugací. Proteiny se potom oddělí kolonovou chromatografií (vymývací rozpouštědlo je výhodně voda) a heterokarpin (identifikovatelný molekulovou hmotností přibližně 90,9 kDa) může potom být získán jako frakce.

Příprava protilátky, která váže specificky heterokarpin

Předložený vynález se týká vazebných činidel, jako jsou protilátky, které vážou specificky heterokarpin. Takové činidlo se označuje jako činidlo, které „váže specificky“ protein, jestliže reaguje na detekovatelné úrovni (například v testu ELISA) s uvedeným proteinem a nereaguje na detekovatelné úrovni s jinými proteiny. Vazbou se označuje nekovalentní spojení mezi dvěma oddělenými molekulami, které vytvoří jejich komplex. Schopnost vazby může být ohodnocena například určením vazebné konstanty pro vytvoření komplexu. Vazebná konstanta je hodnota získaná tím, že se hodnota koncentrace komplexu vydělí součinem hodnot koncentrací nekomplexovaných složek. Řekneme, že dva

produkty jsou vázané, pokud jejich vazebná konstanta dosahuje 10³ l/mol. Vazebná konstanta může být určena způsoby dobře známými odborníkovi v oboru.

Libovolné činidlo, které je schopno vyhovět výše uvedeným kritériím, může být považováno za vazebné činidlo.

Podle předloženého vynálezu je vazebné činidlo výhodně protilátka nebo její fragment. Protilátky mohou být připraveny libovolnou technikou, která je k dispozici odborníkovi v oboru (viz Harlow a Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Obecně mohou protilátky být produkty technik buněčných kultur, které zahrnují tvorbu monoklonálních protilátek nebo transfekci genů protilátky do hostitelských buněk bakterií nebo savců pro produkci rekombinantních protilátek.

Mezi jinými technikami je výhodné použití způsobů popsaných dále. Imunogen obsahující heterokarpin se injektuje skupině savců (například myši, krysy, králíci, ovce nebo kozy). V tomto kroku heterokarpin může sloužit jako imunogen bez modifikace. Alternativně vynikající imunitní odezva může být indukována pokud heterokarpin je spojen s transportním proteinem jako je albumin hovězího séra nebo liščí hemokyanin. Imunogen se injektuje hostitelskému zvířeti, výhodně podle předem určeného schématu a zvířatům je periodicky odebírána krev. Polyklonální protilátky specifické na heterokarpin mohou takto být získány purifikací z takového antiséra například afinitní



chromatografií, používající heterokarpin vázaný na odpovídající pevný nosič.

Farmaceutické kompozice určené k uvolňování GHRH :

Tyto kompozice mohou být zejména připraveny z heterokarpinu a GHRH jedním ze způsobů popsaných v přehledu De Wolf a Brett, *Pharmacological Reviews* (2000), 52, 207-236 a v referencích tam citovaných.

Pokud nejsou definovány jiným způsobem, všechny technické a vědecké výrazy, které zde budou používány, mají stejný význam jako je význam běžně chápaný obvyklým specialistou v oboru, do kterého předložený vynález spadá. Stejně tak všechny publikace, přihlášky vynálezů, všechny vynálezy a všechny další reference, které budou uvedeny, jsou uváděny jako reference.

Následující příklady jsou uvedeny jako ilustrace výše uvedených způsobů a neměly by být v žádném případě považovány za omezení rozsahu předmětu předloženého vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Získávání a charakterizace heterokarpinu

Příklad 1:

Kultura buněk *in vitro* :

Semeno rostliny *Pilocarpus heterophyllus* se nechá klíčit a sazenice, vzniklá tímto klíčením se odebere. Uvedená rostlina se kultivuje v Gamborgově médiu (Gamborg a kol., Nutrient requirements of suspension cultures of Soybean root cells, Exp. Cell Res. (1968), 50 (1), 151-158) s přidavkem 30 g/l sacharózy, 1 mg/l kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové a 0,06 mg/l kinetinu. Kultivace se provádí ve zkumavkách za teploty 23 °C a ve tmě. Přesazování se provádí každých 6 týdnů za obvyklých podmínek. Kmeny granulovitého vzhledu mají béžovou pigmentaci.

Kinetika růstu kmenů, založená na vzrůstu hmotnosti surové hmoty a sušení biomasy se provádí po 8 týdnů. Kalusy ze dvou zkumavek se spojí a představují sklizeň každé dva týdny, přičemž první sklizeň se provádí v čas 0. Kalusy a geloza se potom sklídí a lyofilizují. Je možno pozorovat, že růst je exponenciální až do 6 týdnů od začátku kultivace před dosažením stacionární fáze růstu.

Extrakce buněčných kultur:

25 g lyofilizovaných buněk *Pilocarpus heterophyllus* se extrahuje dvakrát ponořením do 375 ml vody o teplotě 4 °C, ponecháním za teploty 4 °C přes noc, potom v 250 ml vody o teplotě 4 °C po dobu 4 hodin a nakonec promýváním 125 ml vody o teplotě 4 °C. Každý takto získaný roztok se filtruje za vakua přes skleněný filtr s celitem pro separaci buněčných zbytků z vodného roztoku. Takto získané vodné roztoky se kombinují a potom se lyofilizují pro získání 9,4 g sušiny. Suchý lyofilizovaný extrakt se potom rozpustí v 31 ml vody o teplotě 20 °C pro získání roztoku obsahujícího 30 % suchého extraktu. V malých dávkách se za stálého magnetického míchání přidá 17,4 g síranu amonného pro precipitaci proteinové frakce. Proteinový precipitát se potom oddělí z roztoku síranu amonného centrifugací při 3000 otáčkách za minutu po dobu 20 minut. Roztok síranu amonného se dekantuje a precipitované proteiny se rozpustí v 22 ml vody, znovu centrifugují a filtrují pro odstranění nerozpustných částic.

Získaný filtrát se potom podrobí chromatografii gelovou filtrací. Injektuje se do kolony (Buchi č. 19678, L = 230 mm; vnitřní průměr = 26 mm) s náplní Superdex™ 200 (Amersham Pharmacia Biotech, reference č. 17-1043-01; částice o středním průměru 13 µm) připravené podle doporučení výrobce používající ultračistou vodu (Water's Milli-Q) jako vymývací rozpouštědlo s průtokem 5 ml za minutu. Frakce o objemu 40 ml se odebírají a účinný protein se nachází v třetí a čtvrté frakci. Tyto frakce se

lyofilizují pro získání přibližně 14,2 mg účinného produktu.

Čistota získaného produktu byla dokázána nalezením jediného pruhu při gelové elektroforéze s gelem obsahujícím dodecylsulfát sodný (SDS-PAGE). Produkt odpovídající tomuto pruhu je v následujícím textu označován jako heterokarpin.

Příklad 2

Buňky kultivované *in vitro* stejným způsobem, jako byl způsob popsáný v příkladu 1, se extrahují způsobem popsáným dále.

100 g lyofilizovaných buněk *Pilocarpus Heterophyllus* se extrahuje ve 2 litrech demineralizované vody o teplotě 20 °C, směs se míchá jednu noc. Buňky a extrakt se filtrují podtlakovou filtrací na fritě (porozita 3, průměr 20 cm) zakryté vrstvou celítu (předem promývaný kyselinou; tloušťka 1 a 2 cm). Získané buňky se před eliminací promývají 400 ml demineralizované vody. Vodný filtrát se potom okyselí na pH 3,0 přidáním přibližně 10 ml 18% kyseliny chlorovodíkové. Okyselený roztok se potom zbaví tuků extrakcí kapalina-kapalina použitím 400 ml dichlormethanu. Dichloromethanová fáze se dekantuje a potom odstraní. Roztok zbavený tuků se podrobí rotačnímu odpaření pro odstranění residuálního dichlormethanu. Do roztoku zbaveného tuků se potom přidá 30 g polyvinylpyrrolidonu (pH přibližně 3,0) a směs se míchá po přibližně 30 minut pro odstranění taninů. Směs se podtlakově filtruje na fritě

(porozita 3, průměr 10 cm) zakryté složenou vrstvou 25 g celitu (předem promývaný kyselinou) a 25 g polyvinylpyrrolidonu. Filtrát se potom nechá procházet přes vrstvu 400 ml Diaion® HP-20 (Mitsubishi Chemical Company) preaktivované podle instrukcí výrobce. Vzniklý filtrát se potom alkalizuje (pH 10) přidáním přibližně 60 ml 20% roztoku hydroxidu amonného. Po 30 minutách v klidu dojde k slabé precipitaci. Do alkalického roztoku se přidá 1 g celitu (předem promývaný kyselinou) a roztok se potom podtlakově filtruje přes membránový filtr (0,22 µm). Přibližně 2 litry filtrátu se potom nechají procházet kolonou HiPrep®Q XL 16/10, namontovanou na purifikátoru Akta© a předem ekvilibrované na pH 10,2 pufrem piperazin/HCl 0,1M, průtok 0,5 ml za minutu (kolona HiPrep® a purifikátor Akta® jsou výrobky společnosti Amersham Biosciences). Kolona se potom postupně promývá 6 objemy kolony výchozího pufru o pH 10,2, 5 objemy kolony stejného pufru s NaCl o koncentraci 0,2M; a 10 objemy kolony stejného pufru s NaCl o koncentraci 1M. Hlavní podíl heterokarpinu se získá v prvních třech objemech pufru s NaCl o koncentraci 1M. Aktivní frakce se zbaví solí průchodem přes kolonu Sephadex® G25 (objem lože 260 ml) s použitím demineralizované vody jako vymývacího rozpouštědla. Aktivní frakce, které se nacházejí v prvním objemu kolony, odpovídajícímu mrtvému objemu, se potom lyofilizují pro získání 170 mg heterokarpinu. Takto získaný heterokarpin vykazuje prakticky jediný pás při gelové elektroforéze SDS PAGE.

Charakterizace heterokarpinu

Analýza a mikrosekvenace :

Vzorky se vloží do polyakrylamidového gelu 10 %. Po migraci se gel váže a obarví modří Coomassie.

Dráhy v gelu, které jsou uvedeny na Obr. 3 a odpovídají drahám 1, 2, 3, 4 a 5, jsou ukazatel molekulové hmotnosti (Amersham), 0,5, 1 a 2 μg obsahu konečné frakce heterokarpinu a ukazatel molekulové hmotnosti (Amersham). Určení molekulové hmotnosti pomocí standardní křivky ukazatele molekulové hmotnosti, používající klasické informatické nástroje dobře známé odborníkům v oboru (například software Bio-Profil Bio1D, Viber Lourmat) umožní ukázat, že heterokarpin má molekulovou hmotnost 90,9 kiloDaltonů ($\pm 1,6$ kiloDaltonů).

Pro mikrosekvenační analýzu proteinu byl pás polyakrylamidu obsahující protein rozříznut a natráven v 300 μl pufru pro natrávení, obsahujícím 50 mM Tris (pH 8,6) a 0,03 % dodecylsulfátu sodného za teploty 35 °C po dobu 18 hodin v přítomnosti 0,4 μg endolysinu-C (Sigma). Získané peptidy se oddělí pomocí HPLC s lineární kolonou DEAE-C18 o průměru 1 mm. Gradientní separace používá směs acetonitrilu (od 2 do 70 %) a 0,1 % kyseliny trifluoroctové (TFA). Sekvenace se potom provádí pomocí sekvenátoru Procise (Applied Biosystem). Tímto způsobem byly sekvenovány tři píky, což umožnilo charakterizovat heterokarpin jednoznačným

způsobem. Odpovídající sekvence jsou identifikovány v předložené přihlášce vynálezu jako SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 a SEQ. ID. NO. 3.

Analýza glykoproteinů byla prováděna detekcí struktur cukrů glykoproteinů separovaných gelovou elektroforézou SDS-PAGE. Tento detekční systém je modifikace způsobu „kyselina perjodová-Schiff“ a vede na nalezení pásů s barvou magenta, prokazujících přítomnost glykoproteinů (Sigma). Získané výsledky jsou znázorněny na Obr. 4.

Farmakologické vlastnosti heterokarpinu

Stabilní transfekce lidského receptoru GHRH (hGHRH-R):

Lidské embryonální ledvinové buňky, HEK-293, (buněčná linie, kterou vyvinul Dr. Stuart Sealfon, Mount Sinai Medical School, New York, New York) exprimující stabilním způsobem lidský receptor GHRH byla získána od Dr. Kelly Mayo (Northwestern University, Chicago, IL).

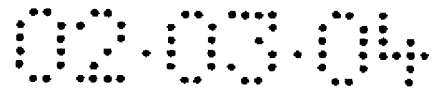
Buněčná kultura a příprava membrán:

Buňky HEK-293 transfektované stabilním způsobem lidským receptorem GHRH a popsané výše se kultivují DMEM (Eaglovo médium, modifikace Dulbecco, silný obsah glukózy; dodáno společností Life technologies) doplněném o 0,4 mg/ml G418 (Life technologies) v přítomnosti 10 % fetálního telecího séra a 4 mM L-glutaminu (Life technologies). Buňky se homogenizují v pufru A obsahujícím 50 mM HEPES (pH 7,4), 5

mM chloridu hořečnatého ($MgCl_2$), 2 mM kyseliny ethylenglykol-bis(2-amino-ethyl)-N,N,N',N'-tetraoctové (EGTA) a 50 μ g/ml bacitracinu a potom se podrobí sonikaci ve témže pufru A. Takto homogenizované buňky se centrifugují za teploty 4 °C při 39000 g po 10 minut, suspendují v pufru A a znovu centrifugují za teploty 4 °C při 40000 g po 10 minut. Celkové membránové proteiny se kvantifikují způsobem podle Bradforda. Tímto způsobem získané membrány se potom uchovávají za teploty -80 °C pro pozdější použití.

Test kompetitivní vazby k hGHRH-R :

Membrány buněk HEK-293 transfektované stabilním způsobem lidským receptorem GHRH se zředí na koncentraci 100 μ g/ml v reakčním pufru obsahujícím 50 mM HEPES (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA, 50 μ g/ml bacitracinu a 0,5 % hovězího sérového albuminu (BSA). Membrány se inkubují s 0,05 nM [^{125}I] GHRH (1-44 amid) (Amersham) s konečným objemem 200 μ l v přítomnosti vzrůstajících koncentrací heterokarpinu po dobu 2 hodin za teploty 23 °C. Reakce se zastaví rychlou filtrací na 96 jamkových filtrech GF/C předem navlhčených 0,1 % polyethyleniminu. Filtry se potom třikrát promývají za teploty 4 °C promývacím pufrům obsahujícím 50 mM Tris (pH 7,4), používajíce filtrační stanici Packard s 96 jamkami. Takto vysušené filtry se ponoří do 20 μ l scintilační tekutiny (Microscint O, Packard) a odečítají se počítačem Topcount (Packard). Nespecifická aktivita se určí v přítomnosti 100 nM hGHRH. Pro hGHRH se generuje křivka



dávka-odezva (0,001 nM-100 nM) a získané výsledky jsou znázorněny na Obr. 1.

Kompetitivní tvorba cyklického AMP:

Buňky HEK-293 transfektované stabilním způsobem lidským receptorem GHRH se rozdělí do kultivačních destiček s 48 jamkami a kultivují se po 3 dny. Kultivační médium se potom odebere a nahradí médiem B obsahujícím 250 μ l DMEM (Eaglovo médium, Dulbeccova modifikace, silný obsah glukózy; dodáno společností Life technologies) v přítomnosti 0,5 % BSA, 0,5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthinu (IBMX) a preinkubovány 5 minut za teploty 37 °C. Na konci preinkubace se heterokarpin testuje po dalších 20 minut. Pozorované koncentrace jsou uvedeny v Obr. 2. Inkubace se zastaví přidáním 100 μ l 0,1M HCl a alikvoty se analyzují na jejich obsah cyklického AMP, používajíce soupravu FlashPlate (New England Nuclear).

Dávkování GH krysám:

Hladina GH u krys (samci, Sprague Dawley) se měří ve vzorcích odebrané krve enzymaticko-imunologickým testem vyvinutým společností Spi-Bio (Spi-Bio, France). Krysy se ošetřují intravenózní injekcí heterokarpinu s rostoucími dávkami (samotné vehikulum, 1, 3 a 10 nmol) a potom po 10 minutách intravenózní injekcí 10 μ g (3 nmol) hGHRH. Deset minut po injekci hGHRH se změří hladiny růstového hormonu

v odebraných krevních vzorcích výše uvedeným způsobem. Získané výsledky jsou znázorněny na Obr. 5.

Stručný popis obrázků:

Obr. 1 je křivka představující inhibici vazby lidského GHRH na receptoru lidského GHRH v závislosti na rostoucích koncentracích heterokarpinu.

Obr. 2 je křivka představující inhibici produkce cyklického AMP v buňkách transfektovaných stabilním způsobem receptorem lidského GHRH v přítomnosti 10 nM lidského GHRH v závislosti na rostoucí koncentraci heterokarpinu.

Obr. 3 je zobrazení jedné gelové destičky SDS-PAGE, znázorňující přítomnost heterokarpin o molekulové hmotnosti 90,9 kDa.

Obr. 4 je zobrazení jedné gelové destičky SDS-PAGE, ukazující, že heterokarpin je glykoprotein (panel B).

Obr. 5 je zobrazení ve formě histogramů představujících inhibici syntézy GH u krys v přítomnosti 10 µg lidského GHRH v závislosti na rostoucí koncentraci heterokarpinu.

Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

PATENTOVÉ NÁROKY

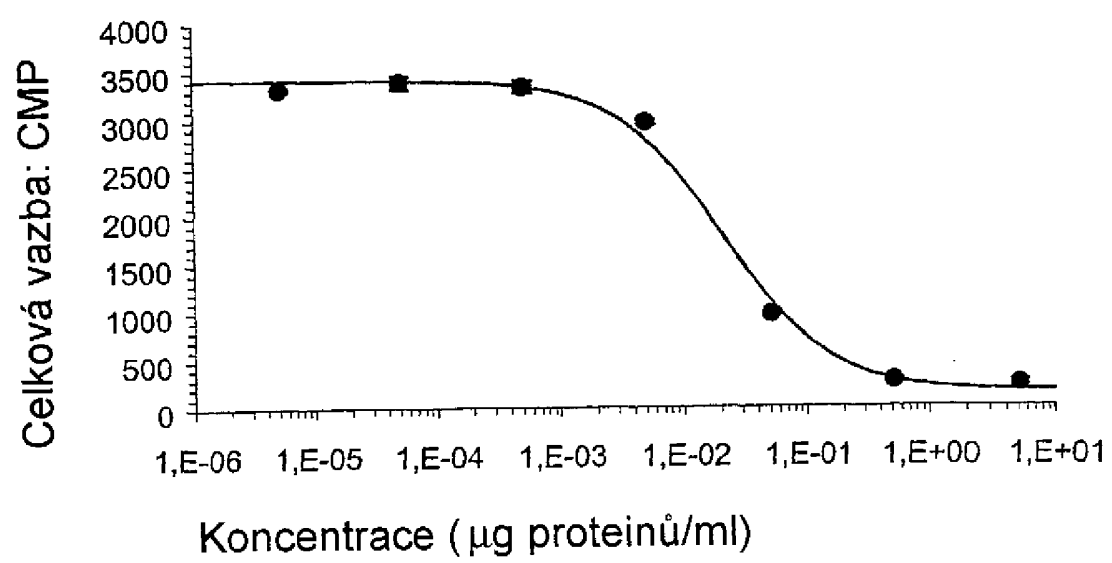
1. Izolovaný protein, který je možno získat extrakcí z rostliny *Pilocarpus heterophyllus*, **vyznačující se tím**, že má molekulovou hmotnost přibližně 90,9 kDa a zahrnuje fragmenty s peptidovou sekvencí SEQ. ID. NO. 1, SEQ. ID. NO. 2 a SEQ. ID. NO. 3, přičemž uvedený protein se může nacházet ve formě glykosylované nebo neglykosylované.
2. Protein podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se získá z buněčného extraktu z rostliny *Pilocarpus heterophyllus* kultivovaného *in vitro*.
3. Protein podle nároku 1 nebo 2 jako léčivo.
4. Monoklonální protilátka nebo její vazebný fragment antigenu, které vážou specificky izolovaný protein podle nároku 1.
5. Monoklonální protilátka nebo její vazebný fragment antigenu, které vážou specificky izolovaný protein podle nároku 1, jako léčivo.
6. Farmaceutická kompozice obsahující jako účinnou látku protein podle nároku 1 nebo 2 a jeden nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů.
7. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 pro přípravu léčiva, určeného pro antagonizaci účinků GHRH.

8. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 pro přípravu léčiva, určeného pro léčbu proliferativního onemocnění, zejména rakoviny.
9. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 pro přípravu léčiva, určeného pro léčbu akromegalie.
10. Použití proteinu podle nároku 1 nebo 2 pro přípravu léčiva, určeného pro léčbu diabetických retinopatií a nefropatií.
11. Způsob extrakce a izolace heterokarpinu z buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus*, **vyznačující se tím**, že zahrnuje krok extrakce buněk rostliny *Pilocarpus heterophyllus* vodou o teplotě od 0 do 50 °C, přičemž po uvedeném kroku extrakce následuje krok filtrace pro separaci filtrátu bohatého na heterokarpin z buněk *Pilocarpus heterophyllus* a jeden nebo více kroků separace heterokarpinu od ostatních složek extrahovaných z rostliny *Pilocarpus heterophyllus*.

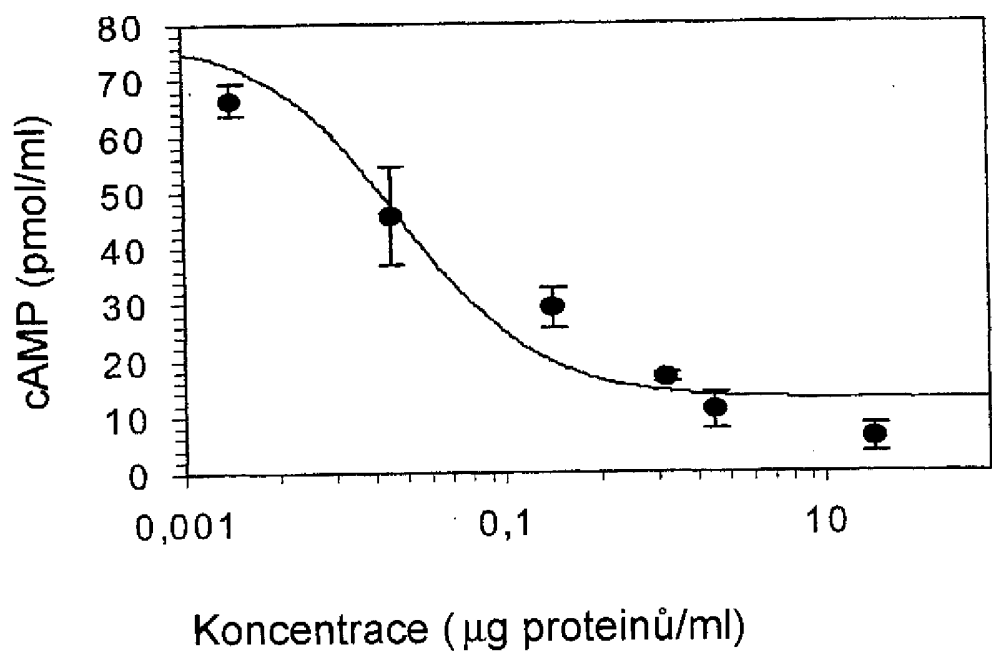
Zastupuje:

Dr. Otakar Švorčík

1/1

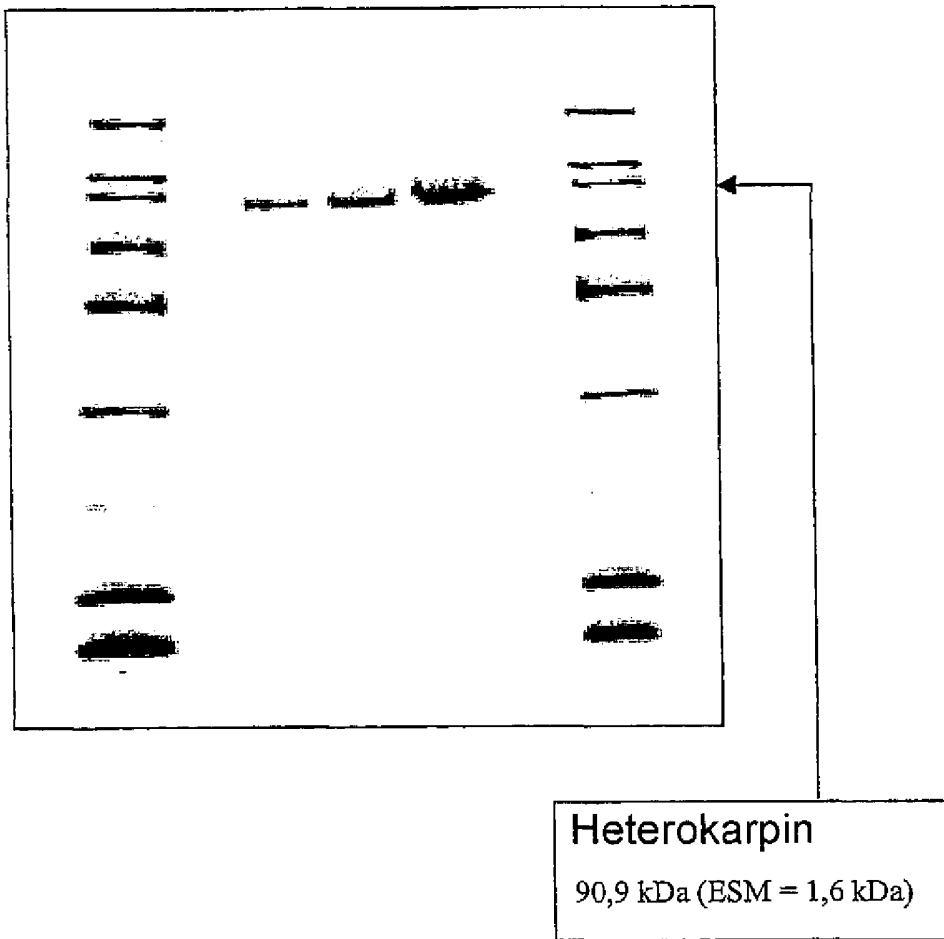


Obr. 1



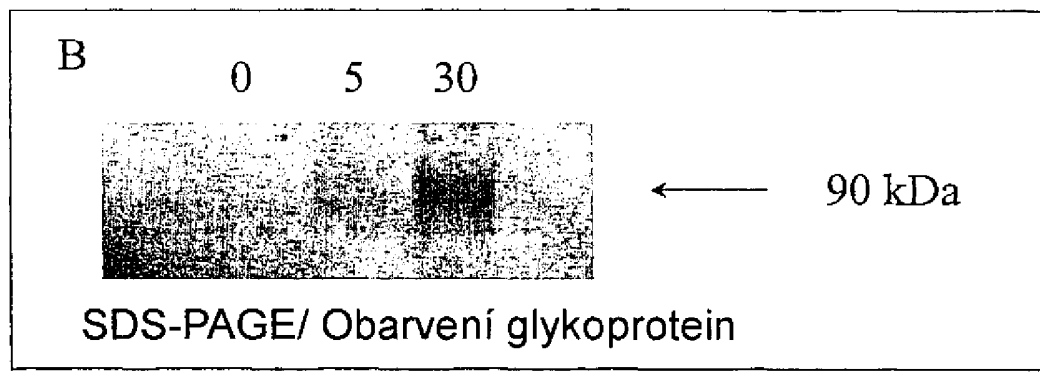
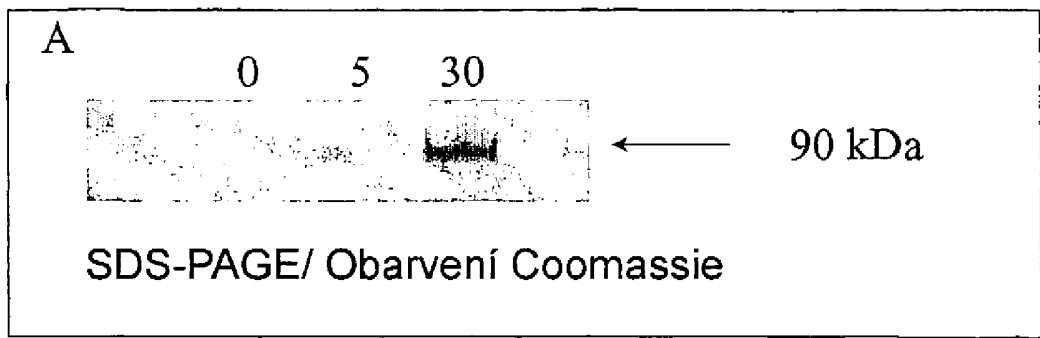
Obr. 2

2/4



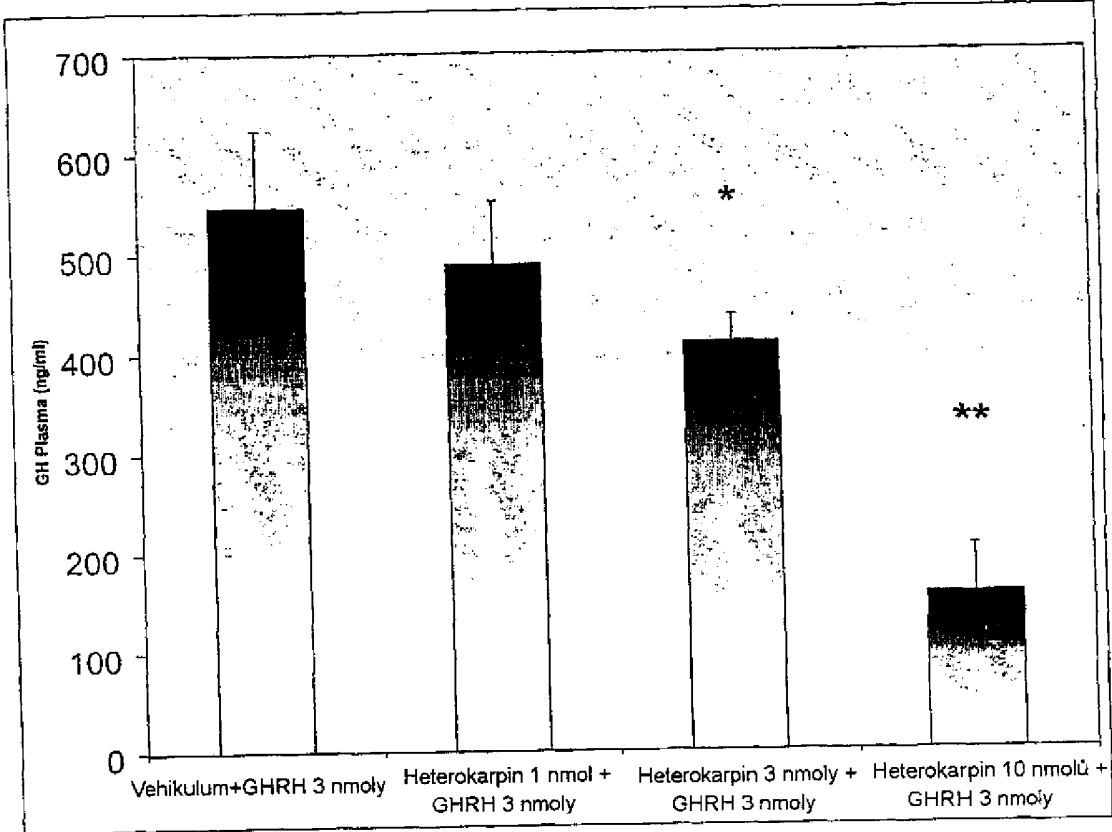
Obr. 3

3/4



Obr. 4

4/4



Obr. 5