



(19) Országkód

HU



MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL

# SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

**217 872 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 96 02312  
(22) A bejelentés napja: 1995. 02. 23.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
6/25735 1994. 02. 23. JP  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/JP 95/00266  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 95/23165

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**A 61 K 38/19**

**A 61 P 7/00**

(40) A közzététel napja: 1997. 02. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2000. 04. 28.

(72) Feltalálók:

Kobayashi, Ken, Tokió (JP)  
Maruyama, Kumiko, Shizuoka (JP)  
Okabe, Masami, Shizuoka (JP)  
Suzawa, Toshiyuki, Kanagawa (JP)  
Yamasaki, Motoo, Tokió (JP)

(73) Szabadalmas:

Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Tokió (JP)

(74) Képvisező:

Somlai Mária, S. B. G. & K. Budapesti  
Nemzetközi Szabadalmi Iroda, Budapest

(54)

## Polipeptid alkalmazása vérlemezke- termelődést elősegítő gyógyszer előállítására

KIVONAT

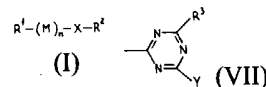
A találmány tárgya vegyi úton módosított, (XIII) általános képletű polipeptid alkalmazása vérlemezkek termelődését elősegítő gyógyszer előállítására, amelynél a humán granulociták differenciálódását elősegítő hatású polipeptid hatóanyag legalább egy aminocsoportja (I) általános képletű vegyülettel vegyi úton módosított, ahol az (I) általános képletben

R<sup>1</sup> 1–8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoport,  
M –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– vagy –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– képletű csoport,  
n valamely 1–1000 közötti pozitív egész szám,

X vegyértékkötés, oxigén- vagy kénatom vagy –NH- csoport,  
R<sup>2</sup> egy (VII) általános képletű csoport, ahol

R<sup>3</sup> halogénatom, hidroxilcsoport vagy egy –X<sup>a</sup>–(M<sup>a</sup>)<sub>n</sub>–R<sup>1a</sup> általános képletű csoport, mely képletben X<sup>a</sup>, M<sup>a</sup>, R<sup>1a</sup>, illetve na megegyezik X, M, R<sup>1</sup>, illetve n fenti jelentésével, és Y halogénatom vagy egy –Z–(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>–(O)<sub>m</sub>–W általános képletű csoport, mely képletben Z oxigén- vagy kénatom vagy –NH– csoport, W karboxilcsoport vagy ennek aktív származéka, p értéke 1–6 közötti egész szám, és m értéke 0 vagy 1, vagy

R<sup>2</sup> egy –(CO)<sub>ma</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>–W<sup>a</sup> általános képletű csoport, mely képletben W<sup>a</sup>, illetve ma jelentése megegyezik W és m fenti jelentésével, és t értéke 0 és 6 közötti egész szám.



(XIII) általános képlet

H R<sup>3</sup> Ala Leu Leu Lys R<sup>3</sup> Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly  
Asp Gly Ala Ala Leu Glu Gln Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys  
His Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Glu Leu Ala Gly Cys  
Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln  
Ala Leu Gln Gly Ile Ser Pro Gln Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu  
Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Thr Tyr Gln Met Cys  
Gln Leu Gly Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro  
Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala  
Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Gln Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
Leu Ala Gln Pro C<sup>H</sup>

(XIII)

ahol R<sup>3</sup> jelentése aminosavmaradék vagy peptidcsoport, mégpedig  
Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ser Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Arg Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Gly Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Cys Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ala Pro Thr Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Thr Pro Gln Lys Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Val Pro Ile Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Cys Pro Ile Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Tyr Pro Ile Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Arg Pro Thr Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Thr Pro Thr Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Asp Pro Gln Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ile Pro Thr Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Ser Pro Thr Arg Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ala Pro Ser Asp Ser Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Ala Pro Pro Asp Arg Gly Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ser Pro Cys Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Ser Pro Arg Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ser Pro Ser Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Thr Pro Leu Arg Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Thr Pro Leu Arg Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Ala Pro Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ala Pro Thr Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser  
Ser Ser Leu Pro Gln Ser Ser Ser Leu Pro Gln Ser vagy  
Pro Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser vagy  
egy fenti peptidcsoport, amely az N-terminális helyen Met-t  
tartalmaz; és  
R<sup>2</sup> jelentése Cys, Ser, Ala vagy Thr.

A találmány tárgya vegyi úton módosított, a humán granulociták differenciálódását elősegítő faktor jellegű XIII általános képletű polipeptid alkalmazása vérlemezkék termelődését elősegítő új gyógyszer előállítására. A polipeptidet egy, a humán granulociták differenciálódását elősegítő faktor (human granulocyte colony stimulating factor, a továbbiakban: hG-CSF) aktivitású polipeptidmolekula legalább egy amino- vagy merkaptocsoportjának kémiai módosításával állítjuk elő. A polipeptidet tartalmazó gyógyszerkészítmények – melyek csökkent trombocitaszámú betegek kezelésére alkalmasak – a polipeptidet hatásos mennyiségben, gyógyászatilag elfogadható dózisformában tartalmazzák valamely gyógyászatilag elfogadható vivőanyaggal együtt.

#### A technika állása

Az interleukin-6 [F. Takatsuki és munkatársai: Cancer Research, 50, 2885–2890 (1990)], a leukémiagátló faktor [D. Metcalf és munkatársai: Blood, 76, 50–56 (1990)], az őssejtfaktor [P. Hunt és munkatársai: Blood, 80, 904–911 (1992)], a makrofágok differenciálódását elősegítő faktor vagy M-CSF (11705/94 számú vizsgált japán szabadalmi bejelentés) és a trombopoietin [de Sauvage és munkatársai: Nature, 369, 533 (1994)] olyan anyagokként ismertek, amelyek elősegítik a vérlemezkék termelődését. A conagenin [Japanese Cancer Assoc. #2235 (1193)], az Y 25510 [The 113rd annual meeting of The Pharmaceutical Society of Japan, PB 13–22 (1193)], bizonyos 2-piranonszármazékok (213758/93 számú nem vizsgált japán szabadalmi bejelentés) és az FK 565 (WO 93/23066 számú PCT szabadalmi bejelentés) olyan kis molekulású anyagok, amelyek szintén elősegítik a trombocita termelődését.

Ismeretes, hogy a hG-CSF egyike azon polipeptideknek, melyek nélkülözhetetlenek a hemopoietikus folyamatokban (sejtnövekedés és -differenciálódás), melyek eredményeképpen különböző hemociták képződnek, valamint elősegítik a legtöbb granulocita, különösen a neutrofilek növekedését.

A hG-CSF hatású, vegyi úton módosított polipeptidek azon képviselői ismertek, melyeket valamely hG-CSF aktivitású polipeptid legalább egy aminocsoportjának polietilén-glikol-származékokkal történő kémiai módosítása útján állítanak elő [WO 90/06952 számú PCT bejelentés, valamint a 316400/89 és 32559/92 számú, nem vizsgált japán szabadalmi bejelentések, továbbá az US 5 194 592A, US 5 214 132A, EP 335 423A, AU 640 567B számú szabadalmi leírások és a Gen. Pharmac., 25, No 3. 533–537 (1994) közlemény]. Ezekről a vegyi úton módosított hG-CSF hatású polipeptidekről a fenti irodalmi közlemények leírják, hogy stabilabbak, mint a hG-CSF, továbbá kisebb a granulociták növekedését stimuláló aktivitásuk, azonban nem említik azt, hogy hatással vannak-e a vérlemezkék termelődésére.

#### A találmány ismertetése

Vizsgálataink során felismertük és adatokkal igazoltuk, hogy az I általános képletű vegyületekkel vegyi úton módosított XIII általános képletű polipeptidek vérlemezke-termelődést elősegítő hatással rendelkeznek.

A találmány a vegyi úton módosított polipeptid új alkalmazására vonatkozik, mely egy hG-CSF aktivitá-

sú, XIII általános képletű polipeptidmolekula legalább egy aminocsoportján valamely I általános képletű vegyülettel módosított és a vérlemezkék (trombociták) termelődését elősegítő hatású.

5 A találmány tárgya tehát valamely I általános képletű vegyülettel módosított XIII általános képletű polipeptid alkalmazása csökkent trombocitaszámú betegek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására. Az I általános képletű vegyület aktivált karboxilcsoportján keresztül kötődik a peptid aminocsoportjához.

10 Közelebbről megjelölve a találmány olyan vegyi úton módosított XIII általános képletű polipeptid alkalmazására vonatkozik, melyet egy hG-CSF aktivitású polipeptidmolekula legalább egy aminocsoportjának egy I általános képletű polialkilén-glikol-származékkal végzett kémiai módosításával állítanak elő. Polialkilén-glikol-származékok a polietilén-glikol-, a polipropilén-glikol-, valamint a polietilén-polipropilén-kopolimer-származékok.

15 Az I általános képletben

R<sup>1</sup> 1–8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoport,

M –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– vagy –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–,

n valamely 1–1000 közötti pozitív egész szám,

X vegyértékkötés, oxigén- vagy kénatom vagy NH-csoport, és

25 R<sup>2</sup> egy VII általános képletű csoportot jelent, ahol R<sup>3</sup> halogénatom, hidroxilcsoport vagy egy –X<sup>a</sup>–(M<sup>a</sup>)<sub>na</sub>–R<sup>1a</sup> általános képletű csoport, mely képletben X<sup>a</sup>, M<sup>a</sup>, R<sup>1a</sup>, illetve na megegyezik X, M, R<sup>1</sup>, illetve n fenti jelentésével, és Y halogénatom, egy –Z–(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>–(O)<sub>m</sub>–W általános képletű csoport, mely képletben Z oxigén- vagy kénatom vagy NH-csoport, W karboxilcsoport vagy ennek aktív származéka, p 1 és 6 között valamely egész szám, és m jelentése 0 vagy 1, vagy

30 R<sup>2</sup> egy –(CO)<sub>ma</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>–W<sup>a</sup> általános képletű csoport, mely képletben W<sup>a</sup>, illetve ma jelentése megegyezik W és m fenti jelentésével, és t értéke 0 és 6 között valamely egész szám.

40 Az EP 0272 703 B1 és a Biochem. Biophys. Res. Commun. 159: 103 (1989) közlemények ismertetik számos G-CSF aktivitású peptid – többek között a XIII általános képletű peptidok – előállítását, továbbá azt, hogy ezeket a vegyületeket granulociták stimulálására alkalmas gyógyszerkészítmények előállítására alkalmazták.

45 Vizsgálataink során meglepő módon azt tapasztaltuk, hogy I általános képletű vegyületekkel vegyi úton módosított XIII általános képletű peptidok vérlemezkék termelődését stimuláló aktivitással rendelkeznek. Mivel az említett irodalmi közleményekben nem tesznek említést arról, hogy a szóban forgó polipeptidek stimulálnák a trombociták termelődését is, és mivel az eddigi ismeretek szerint a csontvelősejtekben termelődő, a granulocitákat stimuláló faktor a vérlemezkék termelődésére nincs hatással, így a fenti közlemények ismeretében valóban meglepő, előre nem látható új gyógyászati hatását ismertük fel a módosított XIII általános képletű peptidoknak.

50 Az I általános képletű módosítószer szubsztituens definícióiban az alkilcsoport (R<sup>1</sup> lehetséges jelentése)

1–8 szénatomos egyenes vagy elágazó láncú alkilcsoport lehet, mint amilyenek például a metil-, etil-, propil-, izopropil-, butil-, izobutil-, szek-butil-, terc-butil-, pentil-, izopentil-, hexil-, izohexil-, heptil-, oktil-, izooktil-, az alkanoilcsoport (R<sup>1</sup> lehetséges jelentése) 1–8 szénatomszámú egyenes vagy elágazó láncú csoport lehet, mint amilyenek a formil-, acetyl-, propionil-, butiril-, valericsoport; a halogénatom (R<sup>3</sup>, Y és Hal lehetséges jelentése) például klór-, bróm- vagy jódatom lehet; a karboxilcsoport aktív származéka (W lehetséges jelentése) például savhalogénid (például savklorid, savbromid), aktív észter (például p-nitro-fenil-észter, N-oxi-szukcinnimid) vagy vegyes anhidrid (például monoetil-észter-karbonát, mono-izobutil-karbonát) lehet. Az n szimbólum 1 és 1000 közötti, előnyösen 7 és 500 közötti pozitív egész szám. A kémiai módosításra alkalmazható szerek

molekulatömege 500 és 100 000 közötti, előnyösen 1000 és 40 000 közötti érték.

A jelen találmány szerinti hG–CSF aktivitású polipeptidként bármely XIII általános képletű hG–CSF hatású polipeptid használható, előnyösen azonban a SEQ ID NO:1 jelzésű aminosavszekvenciának megfelelő polipeptidet vagy e szekvencia egy részét tartalmazó polipeptidet, illetve az aminosavszekvencia valamely olyan változatát alkalmazzuk, melyben egyes aminosavak helyett más aminosavak szerepelnek [Nature, 319, 415 (1986), 267292/88 és 299/80 számú nem vizsgált japán szabadalmi bejelentések, valamint WO 87/01132 számú PCT szabadalmi bejelentés].

Maga a SEQ ID NO:1 jelzésű polipeptid 174 aminosav hosszúságú, egyfonalas, lineáris, protein típusú, és a szekvencia az alábbi képletnek felel meg:

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

Azon hG–CSF aktivitású származékokat, melyekben a SEQ ID NO:1 szekvencia bizonyos aminosavjait

más aminosavakra cserélték, az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

A kicserélt eredeti aminosav helyzete az N-terminális aminosavhoz képest a szekvenciában	A „csere”-aminosav a hG–CSF-származékban												
	a)	b)	c)	d)	e)	f)	g)	h)	i)	j)	k)	l)	
1. (Thr)	*	Val	Cys	Tyr	Arg	*	Asn	Ile	Ser	*	Ala	*	
3. (Leu)	Glu	Ile	Ile	Ile	Thr	Thr	Glu	Thr	Thr	*	Thr	*	
4. (Gly)	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Tyr	*	
5. (Pro)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	*	Arg	*
17. (Cys)	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser

\* változatlanul hagyott aminosav.

A hG–CSF aktivitású peptidmolekulában, melyben általában egynél több aminocsoport van jelen, elegendő ezek egyikét vegyi úton módosítani.

A hG–CSF aktivitású peptidok kémiai módosítása úgy történhet, hogy a módosító szert, mely polialkil-  
60 lénglikol-származék (például polietilénlikol-száрма-

zék, polipropilén-glikol-származék vagy polietilén-glikol és polipropilén-glikol kopolimerjének származéka) és sztirol-maleinsav-kopolimer-származék lehet, reagáltatjuk az aminocsoportot tartalmazó polipeptiddel (hG-CSF-származékok).

Az aminocsoportot, karboxil-, merkaptó- vagy guanidinocsoportot tartalmazó polipeptid reagáltatása poli-etilén-glikol- vagy polipropilén-glikol-származékkal ismert módon [például 316400/89 számú nem vizsgált japán szabadalmi bejelentés, Biotech. Lett., 14, 559–564 (1992), Biotechnology, 8, 343–346 (1990)] vagy az ismert módszerek valamely módozata szerint történhet.

A reakció polietilén-glikol-polipropilén-glikol-kopolimer-származékokkal ismert módon (például 59629/83 és 176586/85 számú nem vizsgált japán szabadalmi bejelentések) vagy az ismert módszerek valamely módozata szerint történhet.

A reakció sztirol-maleinsav-kopolimer-származékokkal ismert módon [például Bioindustry, 5, 499–505 (1988) és 85922/89, valamint 99573/89 számú, nem vizsgált, japán szabadalmi bejelentések] vagy az ismert módszerek valamely módozata szerint történhet.

HG-CSF aktivitású, vegyi úton módosított peptidet például úgy állíthatunk elő, hogy a hG-CSF legalább egy aminocsoportjához egy Ia általános képletű csoportot kapcsolunk. Az Ia általános képletben

R<sup>1</sup> – 8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoportot, n valamely 1–1000 közötti pozitív egész számot, X vegyértékkötést, oxigén- vagy kénatomot vagy NH-csoportot, és

R<sup>2a</sup> egy XI általános képletű csoportot jelent, ahol R<sup>3a</sup> halogénatom, hidroxilcsoport vagy egy –X<sup>a</sup>–(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>–R<sup>1a</sup> általános képletű csoport, mely képletben X<sup>a</sup>, R<sup>1a</sup> és n jelentése megegyezik X, R<sup>1</sup> és n fent megadott jelentésével, és

Y<sup>a</sup> egy –Z–(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>–(O)<sub>m</sub>–CO– általános képletű csoport, mely képletben Z oxigén- vagy kénatom, vagy NH-csoport, p 1 és 6 között valamely egész szám, és m jelentése 0 vagy 1, vagy

R<sup>2a</sup> egy –(CO)<sub>m</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>–CO– általános képletű csoport, mely képletben m jelentése megegyezik m fenti jelentésével, és t 0 és 6 között valamely egész szám.

Az Ia képletben az alkil- és alkanoilcsoport, a halogénatom és n részletezett definíciója megegyezik az I általános képletnél megadottakkal.

A vegyi úton módosított XIII általános képletű hG-CSF aktivitású polipeptidok közül újak azok a vegyületek, melyekben a peptid legalább egy aminocsoportjához egy Ib általános képletű csoport kapcsolódik.

Az Ib általános képletben R<sup>1</sup> 1–8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoportot,

M –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–, –OCH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– képletű csoportot, n valamely 1–1000 közötti pozitív egész számot, X vegyértékkötést, oxigén- vagy kénatomot vagy NH-csoportot,

5 Z oxigén- vagy kénatomot vagy NH-csoportot, p 1 és 6 közötti pozitív egész számot jelent, és R<sup>3b</sup> jelentése megegyezik R<sup>3a</sup> jelentésével.

A vegyi úton módosított hG-CSF, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származék 1–5 molekula poli-etilén-glikol-származékokat, polipropilén-glikol-származékokat, polietilén-glikol-polipropilén-glikol-kopolimer-származékokat vagy sztirol-maleinsav-kopolimer-származékokat köthet meg. Következésképpen a vegyi úton módosított hG-CSF és a vegyi úton módosított hG-CSF-származék vagy az 1–5 molekulás kombináció keverékeként vagy az egyes frakciók (fragmensek) elkülönítését követően alkalmazhatók. Az egyes frakciók elkülönítése kromatográfiás módszerekkel (ioncserélő kromatográfia, fordított fázisú kromatográfia, hidrofób kromatográfia, gél-szűrési kromatográfia) és ammónium-szulfátos frakcionálással történhet, mint általában a hosszú láncú polipeptidok és hasonló esetekben szokásos.

A kémiai módosítás mértékét mobilitás alapján nátrium-dodecil-szulfátos (SDS) poliakrilamid gélelektroforézis módszerrel határozzuk meg.

25 *Kísérleti módszerek a proteinek meghatározására*

1) A találmány kidolgozása során a proteinkoncentrációt Lowry és munkatársai módszerével [J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)] határoztuk meg.

30 2) Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist Laemmli módszerével [Nature, 227, 680 (1970)] végeztük, szétválás után az egyes fehérjefrakciókat Coumassie brilliant blue festéses technikával ismertük fel, és koncentrációjukat chromatoscanner (CS-930, Shimadzu Corporation) segítségével határoztuk meg.

35 Az alábbi kísérleti példákkal a vegyi úton módosított hG-CSF és vegyi úton módosított hG-CSF-származékok farmakológiai hatását szemléltetjük.

#### 40 1. kísérleti példa

Vegyi úton módosított hG-CSF és hG-CSF-származék hatása leukémiás sejtekre és NKS-60 sejtekre

A 4., 6., 8., 12., 15., 17. hivatkozási példa, valamint a 4. példa szerint előállított, vegyi úton módosított hG-CSF, illetve hG-CSF-származékok egérsontvelő-sejtekre kifejtett hatását Okabe és munkatársai módszerével [Blood, 75, 1788 (1990)] határoztuk meg. Ezenkívül e vegyületek hatását NSF-60 sejteken [K. Holmes és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 6687 (1985)] is vizsgáltuk Asano és munkatársai módszerével [Jpn. Pharmacol. Ther., 19, 2767 (1991)]. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat

HG-CSF*1 (vagy származékai)	A vegyi úton módosított vegyület	1 hG-CSF-molekulához kötődő módosító vegyület száma	A termelődést elősegítő hatás (%)*2	
			Csontvelősejteken	NFS-60 sejteken
3. hivatkozási példa	nincs módosítva	0	100	100
3. hivatkozási példa	4. hivatkozási példa	3	18	21

## 2. táblázat (folytatás)

HG-CSF*1 (vagy származékai)	A vegyi úton módosított vegyület	1 hG-CSF-molekulához kötődő módosító vegyület száma	A termelődést elősegítő hatás (%)*2	
			Csontvelősejteken	NFS-60 sejteken
3. hivatkozási példa	6. hivatkozási példa	1-4		15
SEQ ID NO: 1	8. hivatkozási példa	1-4		19
3. hivatkozási példa	9. hivatkozási példa	1-4		12
SEQ ID NO: 1	11. hivatkozási példa	1-3		17
3. hivatkozási példa	12. hivatkozási példa	1-3		33
3. hivatkozási példa	15. hivatkozási példa	1-4		11
3. hivatkozási példa	17. hivatkozási példa	3		24
3. hivatkozási példa	17. hivatkozási példa	2		40
3. hivatkozási példa	17. hivatkozási példa	1		61
3. hivatkozási példa	4. példa	3		17
3. hivatkozási példa	4. példa	2		24
3. hivatkozási példa	4. példa	1		53

\*1 A hG-CSF, illetve származékai a vonatkozó példa számával azonosítva.

\*2 Relatív aktivitás; a módosítatlan vegyület (3. hivatkozási példa) hatását 100%-nak vettük.

## 2. kísérleti példa

Teljes testfelületen sugárkezelt egereknél a sugárzás hatására lecsökkent trombocitaszám normalizálása

A 3. és 4. táblázatok hím BALB/c egereken (5 db, 10 hetesek), az 5. táblázat 6 hetes BALB/c egerek négyes csoportján végzett vizsgálatok eredményeit mutatják. Minden egér <sup>137</sup>Cs sugárforrásból (Ri-433, Toshiba) a teljes testfelületre 3 Gy (abszorbeált dózisegység) sugarat kapott (a továbbiakban: Rx-kezelés), és ezt követően steril körülmények között tartották őket. A kontrollcsoport sugárkezelést nem kapott, és hasonló körülmények között voltak tartva. Vízet és táplálékot ad libitum fogyaszthattak.

A vegyi úton módosított hG-CSF-et, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származékokat fizioló-

giás sóoldatban oldjuk, és alkalmanként minden egyes egérnek 5 µg/0,2 ml-t adunk be az oldatból szubkután a következők szerint: a 3. táblázat szerinti vizsgálatoknál a vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus) oldatát az egerek egyik csoportja az Rx-kezelés utáni napon egyszeri adagban kapta, a másik csoport pedig egy adagot az Rx-kezelés utáni napon és egy adagot az Rx-kezelés utáni ötödik napon. A 4. és 5. táblázat szerinti vizsgálatoknál az egerek a vegyi úton módosított hG-CSF-et, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származékokat az Rx-kezelést követő napon egyszeri adagban kapták meg.

A vérmintákat az egérszemfenékből vettük, és a trombocitaszámot automatikus sejtszámlálóval (CC-180A, TOA Medical Electronics Co. Ltd.) határoztuk meg.

Az eredményeket a 3-5. táblázatok mutatják.

## 3. táblázat

A vegyi úton módosított hG-CSF-származék adagolási rendje*1	Átlagos trombocitaszám (%)*2					
	a besugárzás után eltelt napok száma					
	0	5	9	11	13	20
Kezeletlen	100	95,7	37,7	53,5	59,5	80,6
1. napon beadva	100	94,5	54,0	109,8	100,3	94,8
1. és 5. napon beadva	100	100,1	40,2	118,6	101,3	105,1

\*1 A 4. számú hivatkozási példa szerint előállított, vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus).

\*2 A sugárral nem kezelt kontrollcsoport trombocitaszámához (100) viszonyított %-os trombocitaszám. Kezeletlen (4. és 5. táblázatnál is)=módosított hG-CSF-fel nem kezelt egyedek.

4. táblázat

A vegyi úton módosított hG-CSF-származék	Átlagos trombocitaszám (%)*						
	a besugárzás után eltelt napok száma						
	0	6	8	9	10	11	12
Kezeletlen	100	88,9	36,2	42,1	51,2	67,6	74,2
8. hivatkozási példa	100	101	41,1	63,2	98,5	126	133
9. hivatkozási példa	100	103	41,0	66,3	98,9	142	159
11. hivatkozási példa	100	84,1	34,5	51,6	81,3	112	130
12. hivatkozási példa	100	93,1	42,4	66,1	92,7	145	140

\* A sugárzással nem kezelt kontrollcsoport trombocitaszámához (100) viszonyított %-os trombocitaszám.

5. táblázat

A vegyi úton módosított hG-CSF-származék	Átlagos trombocitaszám (%)*					
	a besugárzás után eltelt napok száma					
	0	6	8	10	11	12
Kezeletlen	100	58,9	26,6	35,1	38,3	45,1
19. hivatkozási példa	100	55,1	30,5	62,7	98,5	103,6
20. hivatkozási példa	100	52,4	29,1	61,3	84,6	105,1

\* A sugárral nem kezelt kontrollcsoport trombocitaszámához (100) viszonyított %-os trombocitaszám.

A teljes testfelületen 3 Gy sugárral kezelt egerek trombocitaszáma jelentősen csökkent, az Rx-kezelést követő 8–9. napon érte el a minimumot, majd fokozatosan emelkedni kezdett, de a kísérletek időtartama alatt nem érte el a sugárkezelést megelőző szintet. Ugyanakkor azoknál az egereknél, amelyek vegyi úton módosított hG-CSF, illetve vegyi úton módosított hG-CSF-származék-kezelést kaptak, a trombocitaszám-csökkenés mérséklődött, majd a besugárzást követő 8-9. napon jelentősen emelkedett, és a besugárzás utáni 11-12. napon újra elérte a sugárkezelést megelőző számot. Hasonló tendencia volt észlelhető azoknál az egereknél is, amelyeket a sugárkezelést követő 1. és 5. napon is kezeltünk a találmány szerinti szerekkel.

### 3. kísérleti példa

Daganatellenes szer hatására bekövetkező trombocitaszám-csökkenés ellensúlyozása

35 9 hetes hím BALB/c egerek ötös csoportjának intraperitoneálisan 5-fluor-uracil (5 FU, Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.) daganatellenes szert adtunk 100 mg/kg dózisban. A 4. hivatkozási példa szerinti vegyi úton módosított hG-CSF (tri típusú) fiziológiás sóoldattal készült oldatát az 5-FU-kezelést követő napon 5 µg/0,2 ml

40 dózisban szubkután adtunk be az egereknek. Ezután az egerek szemfenékvénájából vért vettünk, és a trombocitaszámot automatikus sejtszámlálóval meghatároztuk. Az eredményeket a 6. táblázat mutatja.

45

6. táblázat

A vegyi úton módosított hG-CSF-származék*1	Átlagos trombocitaszám (%)*2				
	az 5-FU-kezelés után eltelt napok száma				
	0	4	5	6	7
Kezeletlen	100	31,2	27,1	39,1	60,4
1. napon beadva	100	42,3	43,6	68,3	103,7

\*1 A 4. hivatkozási példa szerinti vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus).

Kezeletlen: módosított hG-CSF-fel nem kezelt egyedek.

\*2 A nem kezelt kontrollcsoport trombocitaszámához (100) viszonyított %-os trombocitaszám.

#### 4. kísérleti példa

Csökkent trombocitaszám normalizálódásának elősegítése csontvelő-transzplantációkor

8 hetes hím BALB/c egerek 4-es csoportja <sup>137</sup>Cs sugárforrásból 10 Gy Rx-kezelést kapott, majd az egereket steril körülmények között tartottuk. A besugárzást követő napon saját törzséből származó  $2 \times 10^6$  csontvelő-sejtet ültettünk át az egerekbe (tapadós nejlonszál nél-

kül). 2 óra elteltével az egerek a 4. hivatkozási példa szerinti vegyi úton módosított hG-CSF (tri típus) fiziológias sóoldatát kapták szubkután egyszeri dózisban (10 µg/0,2 ml, 20 µg/0,2 ml vagy 40 µg/0,2 ml). Ezután az egerek szemfenékvénájából vért vettünk, és a trombocitaszámot automatikus sejtszámlálóval meghatároztuk. Az eredményeket a 7. táblázat mutatja.

7. táblázat

Csontvelő-transzplantáció	Vegyi úton módosított hG-CSF-származék*1 (dózis, µg)	Átlagos trombocitaszám (%)*2					
		a besugárzás után eltelt napok száma					
		0	7	11	12	13	15
Kezeletlen	0	100	7,1	11,3	3,2	7,1	elhullott
Transzplantált	0	100	6,3	15,8	29,1	52,3	75,8
Transzplantált	40	100	6,6	21,4	42,0	81,5	118,7
Transzplantált	20	100	6,9	23,9	46,6	86,1	117,6
Transzplantált	10	100	7,9	17,6	43,8	79,8	108,7

\*1 A 4. hivatkozási példa szerinti vegyi úton módosított hG-CSF (tri típus).

\*2 A sugárzással nem kezelt kontrolcsoport trombocitaszámához (100) viszonyított %-os trombocitaszám.

Kezeletlen: módosított hG-CSF-fel nem kezelt egyedek.

Mindazon egerek, amelyek a teljes testfelületre 10 Gy sugarat kaptak, súlyos mértékű trombocitaszám-csökkenés után 2 héten belül elhullottak. A csontvelő-átültetésen átesett egerek életben maradtak, de a csökkent trombocitaszám több mint 2 hétig fennállt. Azok a csontvelő-átültetésen átesett egerek, amelyek vegyi úton módosított hG-CSF-et kaptak, a 11. naptól kezdve dózisfüggően javultak, és a besugárzást követő 15. napon trombocitaszámuk meghaladta a besugárzás előtti szintet.

#### 5. kísérleti példa

Akut toxicitási teszt

5–7 hetes hím BALB/c egerek négyes csoportja 25 µg-ot kapott egyszeri dózisban a 4. hivatkozási példa szerinti vegyi úton módosított hG-CSF (tri típus) anyagból. Egy másik tesztben 20 µg-os dózist adtunk be az 1., az 5. és a 9. napon. A tesztek során az egerek mind életben maradtak, és egészségi állapotuk nem változott.

A kísérleti példákából látható, hogy mind a vegyi úton módosított hG-CSF, mind a vegyi úton módosított hG-CSF-származékok egyértelműen elősegítik, hogy a besugárzás, rákkemoterápia vagy csontvelő-átültetés hatására lecsökkenő trombocitaszám normalizálódjék, bizonyítva ezzel, hogy e vegyületek elősegítik a vérlemezkék termelődését.

A vegyi úton módosított hG-CSF-en és a vegyi úton módosított hG-CSF-származékokon kívül más citokinineket vagy kis molekulású vegyületeket is alkalmazhatunk a vérlemezkék termelődését elősegítő anyagként. Más citokininek, például az interleukin-3, az interleukin-6, a leukémiagátló-faktor, az őssejtfaktor, a makrofágok differenciálódását elősegítő faktor, a trombopoetin és hasonló. Kis molekulású, a vér-

lemezkék termelődését elősegítő promoterek, például a conagenin, az Y25510, bizonyos 2-piranonszármazékok, az FK565 és hasonló.

A vegyi úton módosított hG-CSF, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származékok önmagukban vagy valamely dozírozott formában alkalmazhatók. A találmány szerinti gyógyszerkészítményeket úgy állítjuk elő, hogy a hatóanyagot (a vegyi úton módosított hG-CSF-et, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származékot) valamely gyógyászati elfogadható vivőanyaggal egyenletesen összekeverjük. Előnyösen injekcióban beadható gyógyszerkészítményt állítunk elő.

Injektálható készítmények előállításánál úgy járunk el, hogy a vegyi úton módosított hG-CSF-et vagy hG-CSF-származékot, valamint vivőanyagként desztillált vizet, sóoldatot, glükózoldatot vagy sóoldat és glükózoldat keverékét alkalmazzuk. A preparátumok önmagukban ismert módszerekkel oldat, szuszpenzió vagy diszperzió formájában alkalmas segédanyagok használatával állíthatók elő. Ezenkívül liofilizált preparátumot is készíthetünk. Liofilizátumok előállításakor rendszerint 1–5 órán át –50 °C alatti hőmérsékleten tartjuk az anyagot, majd 24–48 órán át 50–150 mTorr nyomáson –20 °C és 0 °C közötti hőmérsékleten, ezt követően pedig 16–24 órán át 50–100 mTorr nyomáson 10 °C és 30 °C közötti hőmérsékleten szárítjuk.

A találmány szerinti vérlemezke-termelődést elősegítő készítmények előállításánál különböző ismert vivőanyagokat, segédanyagokat, hígítót, stabilizátort, illetve adszorpcióinhibítort alkalmazunk.

Az alkalmazott dózis és adagolási rend a készítményformától, a beteg életkorától, testsúlyától, a betegség milyenségétől és súlyosságától függően változhat.

Felnőttek esetén a vegyi úton módosított hG-CSF, illetve a vegyi úton módosított hG-CSF-származék 15 µg és 1,5 mg közötti, előnyösen 25 és 500 µg közötti dózisban, heti 1–7 alkalommal alkalmazható intravénás vagy szubkután injekció, esetenként kúp vagy orrcsepp formájában.

A találmányt közelebbről az alábbi példákkal szemléltetjük.

*A találmány előnyös foganatosítási módja*

*1. példa (injekció)*

Egy 2,0 ml-es injekció összetétele a következő:

Vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus)	0,2 mg
Poliszorbát-80	0,04 mg
Humán szérumalbumin	2,0 mg
D-mannit	30 mg
Nátrium-klorid	16 mg
Kálium-klorid	0,4 mg
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,4 mg
Dinátrium-hidrogén-foszfát. 12H <sub>2</sub> O	5,8 mg

A 4. hivatkozási példa szerint előállított, vegyi úton módosított hG-CSF-származékból 10 mg-ot 80 ml PBS-oldatban oldunk. Az oldathoz 2 mg poliszorbát-80-at (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), majd 100 mg humán szérumalbumint (Sigma Ltd.) és 1,5 g D-mannitot adunk, és az elegy térfogatát 100 ml-re egészítjük ki PBS-oldattal. Az elegyet 0,22 µm pórusátmérőjű eldobható membránon aszeptikus körülmények között leszűrjük, és 2 ml-enként aszeptikus körülmények között ampullázzuk (0,2 mg hatóanyag/ampulla).

*2. példa (injekció)*

Egy 2,0 ml-es injekció összetétele a következő:

Vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus)	1,0 mg
Poliszorbát-80	0,04 mg
D-mannit	30 mg
Nátrium-klorid	16 mg
Kálium-klorid	0,4 mg
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,4 mg
Dinátrium-hidrogén-foszfát. 12H <sub>2</sub> O	5,8 mg

A 4. hivatkozási példa szerint előállított, vegyi úton módosított hG-CSF-származékból 50 mg-ot 80 ml PBS-oldatban oldunk. Az oldathoz 2 mg poliszorbát-80-at (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) és 1,5 g D-mannitot adunk, majd az elegy térfogatát PBS-sel 100 ml-re egészítjük ki. Az elegyet 0,22 µm pórusátmérőjű eldobható membránon aszeptikus körülmények között leszűrjük, és 2 ml-enként aszeptikus körülmények között ampullázzuk (1,0 mg hatóanyag/ampulla).

*3. példa (injekció)*

Egy 2,0 ml-es injekció összetétele a következő:

Vegyi úton módosított hG-CSF-származék (tri típus)	0,2 mg
Poliszorbát-80	0,04 mg
Humán szérumalbumin	2,0 mg
D-mannit	30 mg
Nátrium-klorid	12,8 mg

Kálium-klorid	0,32 mg
Kálium-dihidrogén-foszfát	0,32 mg
Dinátrium-hidrogén-foszfát. 12H <sub>2</sub> O	4,64 mg
Foszforsav	q. s.

- 5 A 4. hivatkozási példa szerint előállított, vegyi úton módosított hG-CSF-származékból 10 mg-ot 80 ml PBS-oldatban oldunk. Az oldathoz 2 mg poliszorbát-80-at (Wako Pure Chemical Industries Ltd.), 100 mg humán szérumalbumint (Sigma Ltd.), 1,5 g D-mannitot és pH 5 eléréshez szükséges mennyiségben foszforsavat adunk, majd az oldat térfogatát injekciós minőségű desztillált vízzel 100 ml-re egészítjük ki. Az elegyet 0,22 µm pórusátmérőjű eldobható membránon aszeptikus körülmények között leszűrjük, és 2 ml-enként aszeptikus körülmények között ampullázzuk (0,2 mg hatóanyag/ampulla).

*4. példa*

- 20 A 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékból 31,5 mg-ot 35 ml 50 mM-os foszfát-pufferben (pH 7,3) oldunk. Az oldat pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 8,7-re állítjuk be, majd az oldathoz 5,0 g 18. hivatkozási példa szerinti 2,4-bisz(O-metilpolietilén-glikol)-6-[3-(4-nitro-fenoxi-karbonil-oxi)-propil-amino]-s-triazint adunk. A reakcióelegyet 7 napon át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 0,7 M-os végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk hozzá. Az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált oszlopra (2,5 cm × 6,1 cm = 30 ml) töltjük 30 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot ezután 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 90 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 30 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-tartalmú (0,7 M → 0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) eluáljuk (össztérfogat: 180 ml, áramlási sebesség: 30 ml/óra). A kívánt anyagot a 0,47 M és 0,16 M közötti ammónium-szulfátot tartalmazó eluátumok tartalmazzák.

- 40 A kívánt eluátumokhoz 0,7 M ammónium-szulfát végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, majd az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált oszlopra (2,5 cm × 12 cm = 60 ml) töltjük 60 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot ezután 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 180 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 60 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-tartalmú (0,7 M → 0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) eluáljuk (össztérfogat: 600 ml, áramlási sebesség: 60 ml/óra). A kívánt anyagot a 0,38 M és 0,11 M közötti mennyiségű ammónium-szulfátot tartalmazó eluátumok tartalmazzák. Ebből 200 ml-t ultraszűrés után [cutoff Mr vagy névleges móltömeglimit 10 000: YM10 (Amicon Co. Ltd.)] 6,5 ml-re sűrítünk be. A kapott koncentrátumot Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (2,5 cm × 45 cm = 220 ml) töltjük

44 ml/óra áramlási sebességgel, majd ugyanilyen sebességgel PBS-t folytatunk át az oszlopon.

A vegyi úton módosított tri típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 3 molekula polietilén-glikol-karbonsav-származék kapcsolódik) a 92–100 ml közötti, a vegyi úton módosított di típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 2 molekula polietilén-glikol-karbonsav-származék kapcsolódik) a 100 és 104 ml közötti és a vegyi úton módosított mono típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 1 molekula polietilén-glikol-karbonsav-származék kapcsolódik) a 116 és 120 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza 1,0 mg (3,0%), 1,4 mg (4,4%) és 1,1 mg (3,6%) mennyiségben.

Az egy molekula hG-CSF-származékhoz kötődő polietilén-glikol-származék számát mind a mono, di és tri típus esetében SDS-poliakrilamid gélelektroforézis vizsgálatl is megerősítettük.

Az alábbi hivatkozási példákban a hG-CSF-hez kötődő polietilén-glikol-származék-molekulák számát, valamint a vegyi úton módosított hG-CSF-származék tisztaságát ugyancsak SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel igazoltuk.

#### 1. hivatkozási példa

6-klór-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-sz-triazin 20 g 4000 átlagos molekulatömegű metil-polietilén-glikolt (Nippon Oil and Fats Co. Ltd.) 10 g vízmentes nátrium-karbonátot tartalmazó 100 ml vízmentes toluolban oldunk. Az oldatot 30 percig 110 °C-on tartjuk, 500 mg cianur-kloridot adunk hozzá, majd 24 órán át 110 °C-on tartjuk a reakcióelegyet. A maradékot eltávolítjuk, ezután 300 ml petrol-éterrel a terméket kicsapjuk, petrol-éterrel többször mossuk. Kitermelés: 10 g (50%) cím szerinti vegyület.

#### 2. hivatkozási példa

6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észter 500 mg, az 1. hivatkozási példa szerint előállított vegyületet 9 ml vízmentes tetrahidrofuránban oldunk, és az oldatot hozzáadjuk 10 mg  $\gamma$ -amino-vajsav és 28  $\mu$ l trietil-amin 1 ml N,N-dimetil-formamiddal készült oldathoz. A reakcióelegyet 16 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, majd csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékhoz 30 ml metilén-kloridot és 15 ml 10 mM foszfát-puffert (pH 10) adunk. A fázisokat elválasztjuk, a felső fázis pH-értékét 2 n sósavoldattal 1-re állítjuk be, majd 30 ml metilén-kloriddal összerázzuk. Az alsó fázist elválasztjuk, vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk.

150 mg karbonsavat (30%) kapunk, melyet 3 mg N-hidroxi-szukcinimiddal együtt 1 ml vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz jégűtés közben 6 mg N,N-diciklohexil-karbodiimidet (DCC) adunk, és a reakcióelegyet 12 órán át szobahőmérsékleten keverjük. A diciklohexil-karbamidot (DCU) kiszűrjük, a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. Kitermelés: 100 mg (67%) cím szerinti vegyület.

#### 3. hivatkozási példa

HG-CSF-származékként az 1. táblázat k jelű vegyületét – mely a SEQ ID NO: 1 aminosavszekvenciájától abban tér el, hogy az 1. aminosav (treonin) helyett alanint, a 3. aminosav (leucin) helyett treonint, a 4. aminosav (glicin) helyett tirozint, az 5. aminosav (prolin) helyett arginint és a 17. aminosav (cisztein) helyett szerint tartalmaz – a következőképpen állíthatjuk elő: pCfBD28 plazmidaal rendelkező E. coli W3110 str A (Escherichia coli ECfBD28 FERM BP-1479) törzset, mely a szóban forgó hG-CSF-származékot kódoló DNS-t tartalmaz, LG táptalajon (10 g Bacto-trytone, 5 g élesztőkivonat, 5 g nátrium-klorid és 1 g glükóz 1 liter vízben; pH 7-re állítva nátrium-hidroxiddal) 37 °C-on 18 órán át tenyésztünk. Ezután a tenyészet 5 ml-ét 100 ml MCG táptalajra (0,6% dinátrium-hidrogén-foszfát, 0,3% kálium-hidrogén-foszfát, 0,5% nátrium-klorid, 0,5% kazein-hidrolizátum, 1 mM magnézium-szulfát, 4  $\mu$ g/ml B<sub>1</sub>-vitamin, pH 7,2) oltottuk át, mely táptalaj 50  $\mu$ g/ml ampicillint is tartalmazott. A tenyészetet 4–8 órán át 30 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 10  $\mu$ g/ml 3  $\beta$ -indol-akrilsavat (a továbbiakban: IAA), egy triptofánszármazékot adunk hozzá, és az inkubálást további 2–12 órán át folytatjuk. A tenyészetet 10 percen át 8000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, a kapott sejteket 30 mM-os nátrium-kloriddal és 30 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) mossuk, majd ugyanezen puffer 30 ml-ében szuszpendálva 0 °C-on 10 percig ultrahanggal kezeljük (Branson Sonic Power Company, Cell disruptor 200). A kapott sejtörmelékét 30 percig 9000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, és a kapott sejtszomókból a hG-CSF-származékot F. A. O. Marston és munkatársai módszerével [Biotechnology, 2, 800 (1984)] extraháljuk, és tisztítjuk.

#### 4. hivatkozási példa

A 3. hivatkozási példa szerinti hG-CSF-származékból 300 mg-ot 100 ml 50 mM-os foszforpufferrel (pH 7,2) elegyítünk, hozzáadunk 800 mg aktív észter, melyet a 2. hivatkozási példa szerint állítottunk elő. A reakcióelegyet 24 órán át 4 °C-on tartjuk, majd 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffert (pH 8,0) adunk hozzá (100 ml). Az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,35 M ammónium-szulfátot tartalmazó, 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 8,0) ekvilibrált oszlopra (2,2 cm  $\times$  26 cm) töltjük 100 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot ezután 0,35 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 8,0) 100 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 100 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-tartalmú (0,35 M  $\rightarrow$  0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 8,0) eluáljuk (össztérfogat: 400 ml, áramlási sebesség: 100 ml/óra). A kívánat anyagot a 0 mM és 250 mM közötti ammónium-szulfát-koncentrációjú eluátumok tartalmazzák. Az eluátumfrakcióból 250 ml-t ultraszűrőt követően [cutoff Mr vagy névleges móltömeglimit 10 000: YM10 (Amicon Co. Ltd.)] 10 ml-re sűrítünk be. A koncentrátumot Sephacryl S-200 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.) oszlopra visszük (5,6 cm  $\times$  40 cm) 160 ml/óra áramlási se-

bességgel, majd ugyanilyen sebességgel PBS-t folytatunk át az oszlopon.

A vegyi úton módosított tri típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 3 molekula polietilén-glikol-karbonsav-származék kapcsolódik) a körülbelül 360 és 400 ml közötti, a vegyi úton módosított di típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 2 molekula polietilén-glikol-karbonsav-származék kapcsolódik) a körülbelül 420 és 450 ml közötti és a vegyi úton módosított mono típusú hG-CSF-származékot (1 molekula hG-CSF-hez 1 molekula polietilén-glikol-karbonsav kötődik) a körülbelül 500 és 530 ml közötti eluátumfrakciók tartalmazzák 2,1 mg (7%), 1,5 mg (5%) és 1,5 mg (5%) mennyiségben. A mono, di és tri típusú termékek mind 90% fölötti tisztaságúak.

#### 5. hivatkozási példa

Karboxi-metil-monometil-polietilén-glikol-N-hidroxi-szukcinimid-észter

4 g (0,8 mmol) megfelelően vízmentesített, 5000 átlagos molekulatömegű karboxi-metil-monometil-polietilén-glikolt (Nippon Oil and Fats Co. Ltd.) és 184 mg N-hidroxi-szukcinimidet 40 ml vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz jég-hűtés közben, argonatmoszférában 300 mg diciklohexil-karbodiimidet adunk, és a reakcióelegyet 30 percig keverjük. Ezt követően a keverést szobahőmérsékleten másfél órán át folytatjuk, majd a diciklohexil-karbamidot kiszűrjük. A szűrletet csökkentett nyomáson 16 ml-re sűrítjük be, majd 240 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük. A kivált csapadékot dietil-éterrel mossuk, az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. Kitermelés: 2,8 g (0,56 mmol, 70%) cím szerinti vegyület.

#### 6. hivatkozási példa

A 3. hivatkozási példa szerinti hG-CSF-származékból 202,5 mg-ot 225 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk, a pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 8,1-re állítjuk be. Ehhez az oldathoz 1,1 g, az 5. hivatkozási példa szerint előállított karboxi-metil-monometil-polietilén-glikol-N-hidroxi-szukcinimid-észtert adunk, és a reakcióelegyet 6 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk. A reakcióelegyhez ezután 26,7 mg trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt tartalmazó 0,5 ml vizes oldatot adunk. Az elegyet 4 °C-on 8000 fordulat/perc sebességgel 40 percig centrifugáljuk. A felülúszó 370 ml-éhez 0,68 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, és az oldatot butil-Toyopearl 650 M töltetű (Tosoh Corporation) oszlopra (5 cm × 6,6 cm = 130 ml) visszük 130 ml/óra áramlási sebességgel.

Az oszlopot 0,68 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 390 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 10 ml/óra), majd 390 ml 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) az előbbi áramlási sebességgel eluáljuk. A kívánt anyagot a 35 és 80 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza. Ezt a 45 ml-es frakciót ultraszűrést követően (cutoff Mr vagy névleges móltömeglimit 10 000: YM10) 30 ml-re sűrítjük be. A koncentrátumot Sephacryl S-200 töltetű

(Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvilibrált oszlopra visszük (5 cm × 51 cm = 1000 ml) 200 ml/óra áramlási sebességgel, majd az oszlopon ugyanilyen sebességgel PBS-t folytatunk át. Ezután a vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tetra típusok keverékeként (1 molekula hG-CSF-hez 1–4 molekula polietilén-glikol-származék kapcsolódik) a körülbelül 200–380 ml-es eluátumfrakcióból kinyerjük. Össztömeg: 158 mg, kitermelés: 78%.

#### 7. hivatkozási példa

Karboxi-metil-monometil-polietilén-glikol-(N-hidroxi-szukcinimid)-észter

12 g (1,2 mmol) megfelelően vízmentesített

10 000 átlagos molekulatömegű karboxi-metil-monometil-polietilén-glikolt (Nippon Oil and Fats Co. Ltd.) és 276 mg N-hidroxi-szukcinimidet 120 ml vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz argonatmoszférában, jég-hűtés közben 495 mg diciklohexil-karbodiimidet adunk, és 30 percig keverjük. Ezután a keverést másfél órán át szobahőmérsékleten folytatjuk, a kivált diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson 48 ml-re sűrítjük be. A koncentrátumot 720 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük, a kivált csapadékot vízmentes dietil-éterrel mossuk, és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. Kitermelés: 10,0 g (1,0 mmol, 83%) cím szerinti vegyület.

#### 8. hivatkozási példa

40,8 mg, a SEQ ID NO:1 aminosavszekvenciájának megfelelő hG-CSF-et 30 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk, az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 8,3-ra állítjuk be, és az elegyet jég-hűtés közben hozzáadjuk a 7. hivatkozási példa szerint előállított 326 mg karboxi-metil-monometil-polietilén-glikol-(N-hidroxi-szukcinimid)-észterhez. A reakcióelegyet 6 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 3,9 mg trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt adunk hozzá 0,1 ml vizes oldatban. Ezután a reakcióelegyhez 0,7 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, majd az elegyet butil-Toyopearl 650 M töltetű (Tosoh Corporation) oszlopra (2,5 cm × 8,1 cm = 40 ml) visszük 40 ml/óra áramlási sebességgel.

Az oszlopot 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (120 ml, pH 7,5) 40 ml/óra áramlási sebességgel mossuk, majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-koncentrációjú (0,7 M → 0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel eluáljuk (pH 7,5, összterfogat: 240 ml, áramlási sebesség: 40 ml/óra). A kivált vegyületet a 0,33 M és 0,05 M közötti ammónium-szulfát-koncentrációjú eluátumok tartalmazzák. Az eluátum 90 ml-ét ultraszűrés után [cutoff Mr vagy névleges móltömeglimit 10 000: YM10 (Amicon Co. Ltd.)] 6 ml-re besűrítjük. A koncentrátumot Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.) PBS-sel ekvilibrált oszlopra (2,5 cm × 45 cm = 220 ml) visszük 44 ml/óra áramlási sebességgel. A vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tetra típusok keverékeként (1 molekula hG-CSF-hez 1–4 molekula

polietilén-glikol kapcsolódik) a körülbelül 60–102 ml-es eluátumfrakcióból nyerjük ki (össztömeg: 9,5 mg, kitermelés: 23%).

#### 9. hivatkozási példa

304,2 mg, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 338 ml 50 M-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk. Az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 8,1-re állítjuk be, és az elegyhez jég-hűtés közben hozzáadjuk a 7. hivatkozási példa szerint előállított karboxi-metil-monometil-polietilén-glikol-(N-hidroxi-szukcinimid)-észtert. A reakcióelegyet 6 órán át 4 °C-on tartjuk, majd 58,1 mg trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt tartalmazó 0,5 ml vizes oldatot adunk hozzá. A reakcióelegyet ezután 4 °C hőmérsékleten 8000 fordulat/perc sebességgel 40 percig centrifugáljuk, a felülúszóhoz 0,68 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, és az elegyet butil-Toyopearl 650 M töltetű (Tosoh Corporation), 0,68 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 8,0) ekvibrált oszlopra (55 cm × 7,1 cm = 140 ml) töltjük 140 ml/óra áramlási sebességgel.

Az oszlopot 0,68 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 8,0) 420 ml-ével 140 ml/óra áramlási sebességgel mossuk, majd 420 ml 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 8,0) 140 ml/óra áramlási sebességgel eluáljuk. A célvegyületet a 82 és 184 ml közötti eluátumfrakció (102 ml) tartalmazza. Ezt Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (10 cm × 50 cm = 3900 ml) visszük 780 ml/óra áramlási sebességgel, majd azonos sebességgel PBS-t bocsátunk át az oszlopon. A vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tetra típusok keverékeként (1 molekula hG-CSF-hez 1–4 molekula polietilén-glikol kapcsolódik) a körülbelül 1600 és 2070 ml közötti eluátumfrakcióból nyerjük ki (össztömeg: 216 mg, 71%).

#### 10. hivatkozási példa

6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észter

412 mg (4,0 mmol)  $\gamma$ -amino-vajsavat 300 ml 0,1 M-os borátpufferben (pH 10) oldunk, az oldathoz jég-hűtés közben 20 g (2 mmol) 6-klór-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazint (Seikagaku Corp.) adunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten, majd 6 órán át szobahőmérsékleten keverjük, a pH-értékét 1 n sósavval 1-re állítjuk be, végül kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékot vízmentes acetonban oldjuk, csökkentett nyomáson besűrítjük, és a kapott karbonsavat szobahőmérsékleten kristályosítjuk (15,8 g, 1,6 mmol).

10 g (1,0 mmol), a fentiek szerint előállított karbonsavat és 230 mg N-hidroxi-szukcinimidet vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz argonatmoszférában, jég-hűtés közben 413 mg diciklohexil-karbodiimidet adunk. A reakcióelegyet 30 percig jég-hűtés közben,

majd másfél órán át szobahőmérsékleten keverjük, a diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson 40 ml-re sűrítjük be. A sűrítményt 600 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük, a kivált csapadékot dietil-éterrel mossuk, és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. 7,7 g (0,77 mmol, 77%) cím szerinti vegyületet kapunk.

#### 11. hivatkozási példa

40,8 mg, a SEQ ID NO:1 aminosavszekvenciájának megfelelő hG-CSF-et 30 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk, az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 7,2-re állítjuk be, majd az elegyhez jég-hűtés közben 326 mg, a 10. hivatkozási példa szerint előállított 6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észtert adunk. A reakcióelegyet 48 órán át 4 °C-on keverjük, ezután 3,9 mg trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt tartalmazó 0,1 ml vizes oldatot adunk hozzá. A reakcióelegyhez 0,7 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, majd az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corp.) töltetű oszlopon (2,5 cm × 8,1 cm = 40 ml) bocsátjuk át 40 ml/óra áramlási sebességgel.

Az oszlopot 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 120 ml-ével 40 ml/óra áramlási sebességgel mossuk, majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-koncentrációjú (0,7 M → 0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel eluáljuk (pH 7,5, osztérfogat: 240 ml, áramlási sebesség: 40 ml/óra). A kívánt vegyületet a 0,35 M és 0,07 M közötti ammónium-szulfát-koncentrációjú eluátumfrakció tartalmazza. Az eluátum 90 ml-ét ultraszűrés után [cutoff Mr vagy névleges móltömeglimit 10 000: YM10 (Amico Co. Ltd.)] 6 ml-re sűrítjük be. A koncentrátumot Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (2,5 cm × 47 cm = 230 ml) visszük 46 ml/óra áramlási sebességgel, majd az oszlopon PBS-t bocsátunk át ugyanilyen sebességgel. A vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tri típusok keverékeként (1 mol hG-CSF-hez 1–3 mol polietilén-glikol kapcsolódik) a körülbelül 110–145 ml-es eluátumfrakcióból nyerjük ki (össztömeg: 7,8 mg, kitermelés: 19%).

#### 12. hivatkozási példa

540 mg, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 600 ml 50 mM-os foszfátpufferrel elegyítünk (pH 7,3), az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 7,2-re állítjuk be, és az elegyhez jég-hűtés közben 8,7 g, a 10. hivatkozási példa szerint előállított 6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észtert adunk. A reakcióelegyet 48 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 105 mg trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt adunk hozzá 0,5 ml vizes oldatban. A reakcióelegyet 4 °C-on 40 percig 8000 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, a felülúszó 600 ml-éhez 0,68 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, és az oldatot butil-Toyopearl 650 M töltetű (Tosoh

Corporation), 0,68 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált oszlopon (5 cm×18 cm=350 ml) 350 ml/óra sebességgel átbocsátjuk.

Az oszlopot 0,68 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 700 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 350 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-koncentrációjú (0,68 M→0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) eluáljuk (össztérfogat: 2800 ml, áramlási sebesség: 350 ml/óra). A kívánt vegyületet a 0,39 M és 0,20 M közötti ammónium-szulfát-tartalmú eluátumfrakció tartalmazza. Ennek 800 ml-ét ultraszűrés után [cutoff Mr 10 000: YM10 (Amicon Co. Ltd.)] 100 ml-re besűrítjük. A sűrítmenyt Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (10 cm×50 cm=3900 ml) visszük 780 ml/óra áramlási sebességgel, majd az oszlopon PBS-t bocsátunk át ugyanilyen sebességgel. A vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tri típusok keverékéként (1 molekula hG-CSF-hez 1–3 molekula polietilénlikol kapcsolódik) a körülbelül 1750–2250 ml-es eluátumfrakcióból nyerjük ki (össztömeg: 303 mg, 56%).

### 13. hivatkozási példa

6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilénlikol)-s-triazin

100 g (8,33 mmol) megfelelően vízmentesített, 12 000 átlagos molekulatömegű monometil-polietilénlikolt (Nippon Oil and Fats Co.), 9,3 g cink-oxidot (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) és 83,5 g 4A típusú molekulaszitát (Wako Pure Chemical Industries Ltd.) vízmentes benzolban, argonatmoszférában egy éjszakán át szobahőmérsékleten tartunk. A molekulaszitát ezután eltávolítjuk, az oldathoz újabb 42 g molekulaszitát adunk, és azonos körülmények között egy éjszakán át állni hagyjuk. A molekulaszitát eltávolítjuk, és az oldatból argonatmoszférában, 80 °C hőmérsékleten 50 ml előpárlatot ledesztillálunk. A maradék oldatot 100 g 4A típusú molekulaszitá hozzáadása után Soxhlet-extraktorba visszük, és argonatmoszférában egy éjszakán át 80 °C hőmérsékleten visszafolyató hűtő alatt forraljuk. A reakcióelegyet lehűtjük, 36 mg (4,0 mmol) cianurkloridot adunk hozzá, és 5 napon át visszafolyató hűtő alatt forraljuk. (Az alkalmazott cianurkloridot előzőleg vízmentes dietil-éterből átkristályosítottuk.) A reakcióelegyet ezután szobahőmérsékletre hűtjük, 300 ml vízmentes benzolt adunk hozzá, és 10 percig 3600 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, majd az oldhatatlan anyagokat eltávolítjuk. A felülúszót csökkentett nyomáson 300 ml-re besűrítjük, és a sűrítmenyt 3000 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük. A kivált csapadékot dietil-éterrel mossuk, és a csapadékot oldószermentesítjük.

24 g (12,0 mmol)  $\gamma$ -amino-vajsavat 1000 ml 0,1 M-os borátpufferben (pH 10) oldunk, és a fentiek szerint kapott száraz csapadékból 100 g-ot jég-hűtés közben hozzáadunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten, majd 6 órán át szobahőmérsékleten keverjük, majd a pH-értékét 1 n sósavoldattal 1-re állítjuk

be, és az elegyet kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist vízmentes nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékhoz vízmentes acetont adunk, az oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk, szobahőmérsékleten kristályosítjuk. 90 g nyersterméket kapunk, melynek 70–80%-a a célvegyület. A nyersterméket 6000 ml desztillált vízben oldjuk, és az oldatot HPA-75 anioncserélő gyantával (Mitsubishi Chemical Corp.) töltött és desztillált vízzel ekvibrált oszlopra visszük (ezt megelőzően az oszlopon 12 000 ml 2 n nátrium-hidrid-oldatot folyattunk át). A cím szerinti vegyületet főkomponensként tartalmazó frakciót desztillált vízzel eluáljuk, a pH-értékét 1 n sósavval 1-re állítjuk be, majd kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist vízmentes nátrium-szulfáttal szárítjuk, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. 43,6 g tisztított cím szerinti vegyületet kapunk (43%).

### 14. hivatkozási példa

6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilénlikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észter

25 g, a 13. hivatkozási példa szerint előállított és megfelelően vízmentesített 6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilénlikol)-s-triazint és 240 mg N-hidroxi-szukcinimidet 400 ml vízmentes metilénkloridban oldunk. Az oldathoz argonatmoszférában, jég-hűtés közben 431 mg diciklohexil-karbodiimidet adunk. A reakcióelegyet 30 percig jég-hűtés közben, majd másfél órán át szobahőmérsékleten keverjük, a diciklohexil-karbamidot kiszűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson 160 ml-re besűrítjük. A sűrítmenyt 2400 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük, a kivált csapadékot vízmentes dietil-éterrel mossuk, és az oldószert csökkentett nyomáson eltávolítjuk. 21,4 g (0,89 mmol, 89%) cím szerinti vegyületet kapunk.

### 15. hivatkozási példa

504 mg, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 560 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk, az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 7,3-ra állítjuk be, és az elegyhez jég-hűtés közben 22,4 g, a 14. hivatkozási példa szerint előállított 6-(3-karboxi-propil-amino)-2,4-bisz(O-metil-polietilénlikol)-s-triazin-(N-hidroxi-szukcinimid)-észtert adunk. A reakcióelegyet 48 órán át 4 °C hőmérsékleten keverjük, majd 113 mg trisz(hidroxi-metil)-aminometánt adunk hozzá 0,5 ml vizes oldatban. A reakcióelegyhez ezután 0,7 M végkoncentráció eléréséig ammónium-foszfátot adunk, majd az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferoldattal (pH 7,5) ekvibrált oszlopon (5 cm×25 cm=500 ml) bocsátjuk át 500 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 1500 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 500 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-koncentrációjú (0,7 M→0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5)

eluáljuk (össztérfogat: 3000 ml, áramlási sebesség: 500 ml/óra). A kívánt vegyületet a 0,55 és 0,08 M közötti ammónium-szulfát-koncentrációjú eluátumfrakció tartalmazza. Ehhez 0,7 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk, és az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált oszlopon (5 cm × 15 cm = 300 ml) bocsátjuk át 450 ml/óra áramlási sebességgel. Ezután az oszlopot 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH = 7,5) 1500 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 450 ml/óra), majd 900 ml 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 450 ml/óra áramlási sebességgel eluáljuk. A kívánt anyagot a 67 és 132 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza. Az eluátumfrakció 100 ml-ét Sephadex G-25 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopon (5 cm × 50 cm = 1000 ml) bocsátjuk át 300 ml/óra áramlási sebességgel. Ezután az oszlopon PBS-t bocsátunk át azonos áramlási sebességgel. A vegyi úton módosított hG-CSF polipeptidet mono-tetra típusok keverékékként (1 molekula hG-CSF-hez 1-4 molekula polietilén-glikol kapcsolódik) a 350-500 ml-es eluátumfrakcióból nyerjük ki (össztömeg: 282 mg, 56%).

#### 16. hivatkozási példa

4-(nitro-fenil)-oxi-karbonil-(O-metil-polietilén-glikol)

5,5 g (0,55 mmol) megfelelően vízmentesített, 10 000 átlagos molekulatömegű metil-polietilén-glikolt (Nippon Oil and Fats Co. Ltd.) 27,5 ml vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz 0,153 ml trietil-amint és 222 mg 4-nitro-fenil-(klór-formiát)-ot adunk. A reakcióelegyet argonatmoszférában 4 órán át szobahőmérsékleten keverjük, s közben a pH-értékét trietil-amin hozzáadásával 7,5 és 8,5 között tartjuk. A reakcióelegyet csökkentett nyomáson 20 ml-re bepároljuk, és a sűrítmenyt 300 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük. A kivált csapadékot etil-acetátból átkristályosítjuk. 4,8 g (0,48 mmol, 87%) cím szerinti vegyületet kapunk.

#### 17. hivatkozási példa

40,5 ml, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 45 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,3) elegyítünk, az elegy pH-értékét 5%-os nátrium-hidroxiddal 8,7-re állítjuk be, és jég-hűtés közben 4,3 g, a 16. hivatkozási példa szerint előállított 4-(nitro-fenil)-oxi-karbonil-(O-metil-polietilén-glikol)-t adunk hozzá. A reakcióelegyet 3 napon át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, 0,7 M végkoncentráció eléréséig ammónium-szulfátot adunk hozzá, majd az elegyet butil-Toyopearl 650 M (Tosoh Corporation) töltetű, 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) ekvibrált oszlopon (2,5 cm × 12 cm = 60 ml) bocsátjuk át 60 ml/óra áramlási sebességgel. Az oszlopot ezután 0,7 M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os trisz-HCl-puffer (pH 7,5) 180 ml-ével mossuk (áramlási sebesség: 60 ml/óra), majd lineáris gradiens szerint csökkenő ammónium-szulfát-koncentrációjú (0,7 M → 0 M) 10 mM-os trisz-HCl-pufferrel (pH 7,5) eluáljuk (össztérfogat: 360 ml, áramlási sebesség: 60 ml/óra). Az elu-

ció teljessé tételére ezután az oszlopon még 180 ml 10 mM-os trisz-HCl-puffert (pH 7,5) bocsátunk át.

A kívánt vegyületet a 0,4 M és 0 M ammónium-szulfát-tartalmú eluátumfrakció tartalmazza, s ennek 210 ml-ét ultraszűrést követően [cutoff Mr 10 000: YM10 (Amicon Co. Ltd.)] 30 ml-re besűrítjük. A sűrítmenyt Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopon (5 cm × 51 cm = 1000 ml) bocsátjuk át 200 ml/óra sebességgel, majd az oszlopon PBS-t engedünk át ugyanilyen sebességgel.

A vegyi úton módosított tri típusú hG-CSF-származékot (1 mol hG-CSF-hez 3 mol polietilén-glikol-karbonsav kapcsolódik) a körülbelül 285 és 305 ml közötti eluátumfrakció, a di típusú hG-CSF-származékot (1 mol hG-CSF-hez 2 mol polietilén-glikol-karbonsav kapcsolódik) a körülbelül 325 és 345 ml közötti eluátumfrakció, a mono típusú hG-CSF-származékot pedig (1 mol hG-CSF-hez 1 mol polietilén-glikol kapcsolódik) a körülbelül 365 és 385 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza 6,2 mg (10,9%), 6,8 mg (11,9%), illetve 5,0 mg (8,8%) mennyiségben.

#### 18. hivatkozási példa

6-[3-(4-nitro-fenil-karbonil-oxi)-propil-amino]-2,4-bisz(O-metoxi-polietilén-glikol)-s-triazin

120 mg (1,6 mmol) 3-amino-propanolt 200 ml 0,1 M-os borátpufferrel (pH 10) elegyítünk, és az elegyhez jég-hűtés közben 8 g (0,8 mmol) 6-klór-2,4-bisz(O-metil-polietilén-glikol)-s-triazint (Seikagaku Corporation) adunk. A reakcióelegyet egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten keverjük, a pH-értéket 2 n sósavval 1-re állítjuk be, majd kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist 2 n sósavval kétszer mossuk, vízmentes nátrium-szulfáttal vízmentesítjük, szűrjük, és a szűrletet csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékhoz vízmentes acetont adunk, amikor is először egy csapadék válik ki, mely később feloldódik. Az acetonos oldatot csökkentett nyomáson bepároljuk. A maradékból szobahőmérsékleten 5,5 g (69%) polietilén-glikol-származék kristályosodik ki.

Az így kapott és megfelelően vízmentesített polietilén-glikol-származékból 5,3 g-ot (0,53 mmol) 26,5 ml vízmentes metilén-kloridban oldunk. Az oldathoz először 0,147 ml trietil-amint, majd 214 ml (1,06 mmol) 4-nitro-fenil-(klór-formiát)-ot adunk, és a reakcióelegyet 4 órán át 4 °C hőmérsékleten keverjük. Ezután a reakcióelegyet csökkentett nyomáson 20 ml-re besűrítjük, és a sűrítmenyt 300 ml vízmentes dietil-éterhez csepegtetjük. A kivált csapadékot vízmentes dietil-éterrel mossuk, majd csökkentett nyomáson oldószermentesítjük, és vízmentes etil-acetátból átkristályosítjuk. Kitermelés: 4,6 g (0,46 mmol, 87%) cím szerinti vegyület.

#### 19. hivatkozási példa

29,25 mg, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 6,5 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,5) elegyítünk, és az elegyhez 287 mg aktivált polietilén-glikol M-SCM 20 000-et (Shearwater Polymer Inc.) adunk. A reakcióelegyet 6 órán át 4 °C

hőmérsékleten tartjuk, majd 35 µl 50 mg/ml koncentrációjú trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt adunk hozzá. A reakcióelegyet ezután Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (2,5 cm×45 cm=220 ml) visszük 44 ml/óra áramlási sebességgel, majd az oszlopon ugyanilyen sebességgel PBS-t bocsátunk át.

A vegyi úton módosított di típusú hG-CSF polipeptidet (melyben 1 mol hG-CSF-hez 2 mol polietilén-glikolkarbonsav kötődik) a 96 ml és 104 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza 3,8 ml (13,0%) mennyiségben.

#### 20. hivatkozási példa

28,8 mg, a 3. hivatkozási példa szerint előállított hG-CSF-származékot 6,7 ml 50 mM-os foszfátpufferrel (pH 7,5) elegyítünk, és az elegyhez 98 mg aktivált polietilén-glikol M-SSPA-20 000-et (Shearwater Polymer Inc.) adunk. A reakcióelegyet 24 órán át 4 °C hőmérsékleten tartjuk, majd 30 µl 40 mg/ml-es trisz(hidroxi-metil)-amino-metánt adunk hozzá. A reakcióelegyet Sephacryl S-300 töltetű (Pharmacia Co. Ltd.), PBS-sel ekvibrált oszlopra (2,5 cm×45 cm=220 ml) visszük 44 ml/óra áramlási sebességgel, majd az oszlopon ugyanilyen sebességgel PBS-t bocsátunk át.

A vegyi úton módosított tri típusú hG-CSF polipeptidet (amelyben 1 mol hG-CSF-hez 3 mol polietilén-glikolkarbonsav kötődik) a körülbelül 78 ml és 98 ml közötti eluátumfrakció tartalmazza 2,0 mg (6,6%) mennyiségben.

Az N-terminális aminocsoporton vagy a Lys-maradék aminocsoportján kémiai módon módosított, a fenti hivatkozási példákban előállított vegyületek a következők:

#### 4. hivatkozási példa

N-{3-[(4',6'-bisz(ω-metil-polietilén-glikol)-1',3',5'-triazin)-2'-il-amino]-propil-karbonil}-hG-CSF-származék

#### 6. hivatkozási példa

N-(ω-metil-polietilén-glikol-metil-karbonil)-hG-CSF-származék

#### 8. hivatkozási példa

N-(ω-metil-polietilén-glikol-metil-karbonil)-hG-CSF

#### 9. hivatkozási példa

N-(ω-metil-polietilén-glikol-metil-karbonil)-hG-CSF-származék

#### 11. hivatkozási példa

N-{3-[(4',6'-bisz(ω-metil-polietilén-glikol)-1',3',5'-triazin)-2'-il-amino]-propil-karbonil}-hG-CSF

#### 12. hivatkozási példa

N-{3-[(4',6'-bisz(ω-metil-polietilén-glikol)-1',3',5'-triazin)-2'-il-amino]-propil-karbonil}-hG-CSF-származék

#### 15. hivatkozási példa

N-{3-[(4',6'-bisz(ω-metil-polietilén-glikol)-1',3',5'-triazin)-2'-il-amino]-propil-karbonil}-hG-CSF-származék

#### 17. hivatkozási példa

N-(ω-metil-polietilén-glikol-karbonil)-hG-CSF-származék

#### 19. hivatkozási példa

N-{3-[(4',6'-bisz(ω-metil-polietilén-glikol)-1',3',5'-triazin)-2'-il-amino]-propil-oxi-karbonil}-hG-CSF-származék

#### 20. hivatkozási példa

N-{2-[2'-(ω-metil-polietilén-glikol)-etil-tio]-etil-karbonil}-hG-CSF-származék

#### Ipari alkalmazhatóság

A találmány értelmében vegyi úton módosított polipeptidek állíthatók elő oly módon, hogy egy hG-CSF hatású polipeptidnek legalább egy aminocsoportját kémiai módon módosítjuk; előállíthatók továbbá vérlemezkék termelődését nagymértékben elősegítő szerek, melyek a kérdéses, vegyi úton módosított polipeptidet tartalmazták.

Az alábbiakban megadjuk a hivatkozási példák szerinti eljárással előállított végtermékek molekulatömegének értékét. Elegy esetén a molekulatömeget intervallumként adjuk meg. A 4., 6., 8., 9., 11., 12., 15., 17., 19. és 20. példa végtermékének analízisét elektroforézissel határozzuk meg.

Táblázat

	Vegyület	Molekulatömeg	Diszperzió
35	1. hivatkozási példa	8,420	1,04
	2. hivatkozási példa	8,680	1,05
40	5. hivatkozási példa	5,620	1,04
	7. hivatkozási példa	10,570	1,03
45	10. hivatkozási példa	12,170	1,04
	13. hivatkozási példa	24,610	1,05
	14. hivatkozási példa	25,010	1,06
50	16. hivatkozási példa	11,050	1,04
	18. hivatkozási példa	12,560	1,04

	Vegyület	Molekulatömeg (számított)
60	3. hivatkozási példa	18 905 Da

Vegyület	Típus	Molekula- tömeg	Jellemző
4. hivatkozási példa	tri típus	100 kDa	12% gél
4. hivatkozási példa	di típus	80 kDa	
4. hivatkozási példa	mono típus	50 kDa	
6. hivatkozási példa	tetra mono típus	30–80 kDa	14% gél
8. hivatkozási példa	tetra mono típus	30–80 kDa	5–20% átalakulás géllé
9. hivatkozási példa	tetra mono típus	40–110 kDa	10% gél
11. hivatkozási példa	tri mono típus	50–100 kDa	12% gél
12. hivatkozási példa	tri mono típus	50–100 kDa	12% gél
15. hivatkozási példa	tetra mono típus	70–210 kDa	5–20% átalakulás géllé
17. hivatkozási példa	tri típus	80 kDa	5–20% átalakulás géllé
17. hivatkozási példa	di típus	60 kDa	
17. hivatkozási példa	mono típus	40 kDa	
19. hivatkozási példa	di típus	80 kDa	5–20% átalakulás géllé
20. hivatkozási példa	tri típus	120 kDa	5–20% átalakulás géllé

A példák végtermékeinek molekulatömegét a Polymer Laboratories erre vonatkozó

- CliniPeg,
  - Index (Polymer Standard) és az
  - Application Note 40 (Polyethylene oxide calibrations)
- közleményekben leírtak szerint végeztük.

### SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Vegyi úton módosított, (XIII) általános képletű polipeptid alkalmazása vérlemezkék termelődését elősegítő gyógyszer előállítására, melynél a humán granulociták differenciálódását elősegítő hatású, (XIII) általános képletű polipeptid hatóanyag aminocsoportjai közül legalább egy valamely (I) általános képletű vegyülettel vegyi úton módosított, ahol az (I) általános képletben
- R<sup>1</sup> 1–8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoport,
- M –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– vagy –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– képletű csoport,
- n valamely 1–1000 közötti pozitív egész szám,
- X vegyértékkötés, oxigén- vagy kénatom vagy –NH– csoport,
- R<sup>2</sup> egy (VII) általános képletű csoport, ahol
- R<sup>3</sup> halogénatom, hidroxilcsoport vagy egy –X<sup>a</sup>–(M<sup>a</sup>)<sub>na</sub>–R<sup>1a</sup> általános képletű csoport, mely képletben X<sup>a</sup>, M<sup>a</sup>, R<sup>1a</sup>, illetve na megegyezik X, M, R<sup>1</sup>, illetve n fenti jelentésével, és Y halogénatom vagy egy –Z–(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>–(O)<sub>m</sub>–W általános képletű csoport, mely képletben Z oxigén- vagy kénatom vagy –NH– csoport, W karboxilcsoport vagy ennek aktív származéka, p értéke 1–6 közötti egész szám, és m értéke 0 vagy 1, vagy

R<sup>2</sup> egy –(CO)<sub>ma</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>–W<sup>a</sup> általános képletű csoport, mely képletben W<sup>a</sup>, illetve ma jelentése megegyezik W és m fenti jelentésével, és t értéke 0 és 6 közötti egész szám.

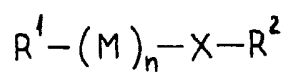
2. Vegyi úton módosított, (XIII) általános képletű polipeptid 1. igénypont szerinti alkalmazása vérlemezkék termelődését elősegítő gyógyszer előállítására, melynél a humán granulociták differenciálódását elősegítő hatású, (XIII) általános képletű polipeptid hatóanyag legalább egy aminocsoportjához egy (Ia) általános képletű csoport kapcsolódik, ahol az (Ia) általános képletben R<sup>1</sup> 1–8 szénatomos alkil- vagy alkanoilcsoport, n értéke 1–1000 közötti pozitív egész szám, X vegyértékkötés, oxigén- vagy kénatom vagy –NH– csoport, és

R<sup>2a</sup> egy (XI) általános képletű csoportot jelent, ahol R<sup>3a</sup> halogénatom, hidroxilcsoport vagy egy –X<sup>a</sup>–(M<sup>a</sup>)<sub>na</sub>–R<sup>1a</sup> általános képletű csoport, mely képletben X<sup>a</sup>, R<sup>1a</sup> és na jelentése megegyezik X, R<sup>1</sup> és n fent megadott jelentésével, és M<sup>a</sup> egy –OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>– vagy –OCH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>– képletű csoport, és

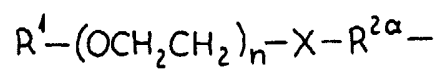
Y<sup>a</sup> egy –Z–(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>–(O)<sub>m</sub>–CO– általános képletű csoport, mely képletben Z oxigén- vagy kénatom vagy –NH– csoport, p 1 és 6 között valamely egész szám, és m jelentése 0 vagy 1, vagy

R<sup>2a</sup> egy –(CO)<sub>ma</sub>–(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>–CO– általános képletű csoport, mely képletben ma jelentése megegyezik m fenti jelentésével, és t 0 és 6 közötti egész szám.

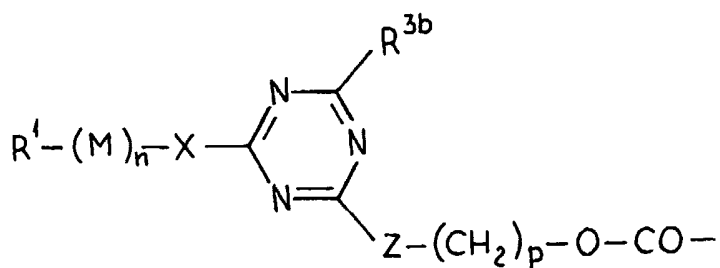
3. Vegyi úton módosított, (XIII) általános képletű polipeptid 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazása vérlemezkék termelődését elősegítő, csökkent trombocitaszámú betegek kezelésére alkalmas gyógyszerkészítmény előállítására, mely a módosított polipeptidet gyógyászati elfogadható dózisformában valamely gyógyászati elfogadható vivőanyaggal együtt tartalmazza.



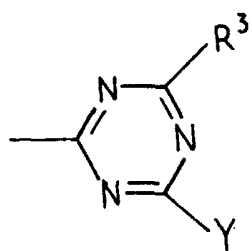
(I)



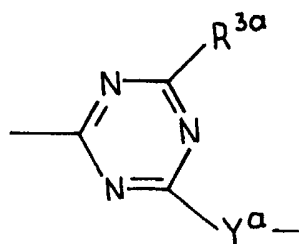
(Ia)



(Ib)

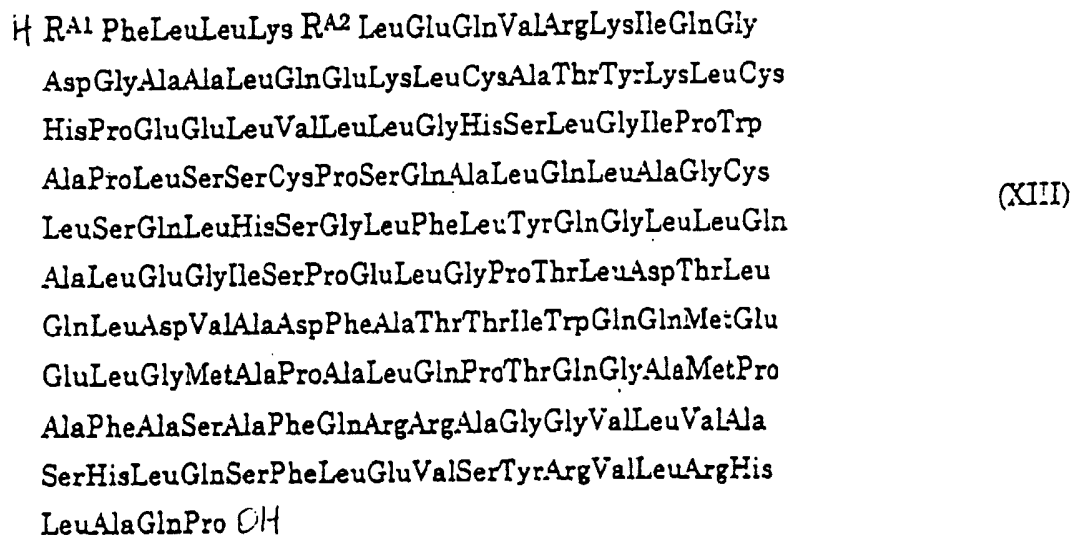


(VII)



(XI)

(XIII) általános képlet



ahol R<sup>A1</sup> jelentése aminosavmaradék vagy peptidilcsoport, mégpedig  
ThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer, SerProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer,  
ArgProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer, GlyProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer,  
CysProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer, AlaProThrArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
ThrProGluLysSerAlaSerSerLeuProGlnSer, ValProIleArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
CysProIleArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer, TyrProIleArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
ArgProThrArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer, ThrProThrArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
AsnProGluArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer, IleProThrArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
SerProThrArgSerAlaSerSerLeuProGlnSer, AlaProSerAsnSerAlaSerSerLeuProGlnSer,  
AlaProProAsnArgGlySerSerLeuProGlnSer, SerProCysGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer,  
SerProArgGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer, SerProSerGlyProAlaSerSerLeuProGlnSer,  
ThrProLeuArgProAlaSerSerLeuProGlnSer, ThrProLeuArgProAlaSerSerLeuProGlnSer,  
AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSer, AlaProThrTyrArgAlaSerSerLeuProGlnSer,  
Ser, SerLeuProGlnSer, SerSerLeuProGlnSer vagy  
ProAlaSerSerLeuProGlnSer, vagy  
egy *fenti* peptidilcsoport, amely az N-terminális helyen Met-t  
tartalmaz; és  
R<sup>A2</sup> jelentése Cys, Ser, Ala vagy Thr.