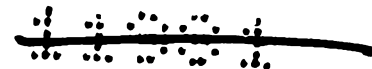


P0303854



Szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek

Kivonat

5

A találmány tárgyát meghatározott módon polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti

10 proteineket tartalmazó vérképződést serkentő gyógyászati készítmények, valamint a találmány szerinti proteinek előállításai és alkalmazási eljárásai.

2002. 12. 14.



Szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek

A találmány tárgyát meghatározott módon polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti proteinek tartalmazó vérképződést serkentő gyógyászati készítmények, valamint a találmány szerinti proteinek előállítási és alkalmazási eljárásai.

Az erythropoiesis a vörösvértestek termelési folyamata, amely a vörösvértestek "turnover"-ét és pusztulását szabályozza. Az erythropoietin (EPO) az erythropoiesist stimuláló hormonfehérje. A természetben előforduló humán EPO egy 165 aminosavas glikoprotein, amely elsősorban a vesékben termelődik, és a véráramba elválasztva serkenti a vörösvérsejtek csontvelőben lévő prekursor-sejtekből történő termelését. Bár a humán EPO-t kódoló gén alapján 166 aminosavas molekula jósolható meg, a protein érett alakjában a C-terminális arginin - poszt-transzlációs módosítás következtében - lehasítódik.

A glikozilált humán EPO három N-kötött szénhidrát-láncot tartalmaz, melyek a 24., 38. és 83. pozícióban lévő aminosavakhoz kötődnek, a 126. pozícióban lévő aminosavhoz pedig O-kötött szénhidrát-gyök kapcsolódik. A glikoziláció hatásai összetettek. A nem glikozilált EPO *in vitro* aktív, azonban vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a teljes *in vivo* aktivításhoz a glikoziláció nélkülözhetetlen. Bebizonyosodott továbbá, hogy a változó glikozilációs mintázat változó hatásokat eredményez. Például, a deszializált EPO *in vitro* aktivitása fokozott mértékű, *in vivo* azonban csökkent aktivitást mutat, ami a hepatociták által felismert, megkött és eliminált galaktózgyökök szabaddá válásának tudható be. Bebizonyosodott továbbá, hogy a teljesen szializált EPO elágazódási mintázata a biológiai aktivitásban különbségeket eredményez. A "négycsápos" elágazódású EPO aktivitása egyenértékű a "standard" EPO aktivitásával, míg a döntően "kétcsápos" elágazódású EPO aktivitása *in vitro* háromszoros, *in vivo* azonban mindössze 15 %-a a normál aktivitásnak. Ezen túlmenően, különféle kísérletek eredményeként kimutatták, hogy az EPO működése szempontjából csak az O-kötött cukrok jelentősek, az N-kötésűek nem.

Számos olyan gyógyászati termék létezik, amely rekombináns módszerekkel létrehozott, glikozilált EPO-t tartalmaz. A jelenleg rendelkezésre álló, EPO-tartalmú gyógyászati készítmények alkalmazhatósága - rövid vérplazmai felezési idejük és proteázos hasításra vonatkozó fogékonyságuk miatt - korlátozott, továbbá, az elágazódás és a szialosavtartalom (egyes N-kötött glikozilációs helyeken és a helyek között előforduló) nagyfokú heterogenitása miatt a

különböző glikozilált alakok komplex elegyeit tartalmazzák. Ezek a hátrányok jelentős mértékben korlátozták a szóban forgó gyógyászati készítmények maximális klinikai lehetőségeinek kihasználását.

Az ilyen EPO-proteinek keringési felezési idejének növelése és egyéb tulajdonságainak javítása érdekében a proteinekhez vízben oldható polimereket [pl. polietilénlikolt (PEG)] kapcsoltak, azonban ez - a polimerek szabályozott módon történő kapcsolásával kapcsolatos nehézségek miatt - felemás eredményekkel és felhasználó által meghatározott precizitással járt. A polimerek (pl. EPG és rokon polimerek) proteinen található reaktív csoportokhoz történő kapcsolására számos módszert alkalmaztak [ld. a 4 179 337 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Davis és mtsai.) és a 4 002 531 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Royer). A szóban forgó módszerek áttekintését illetően ld.: Abuchowski és mtsai.: in: "Enzymes as Drugs", szerk.: J.S. Holcerberg és J. Roberts), 367-383. old. (1981); és Zalipsky, S.: Bioconjugate Chemistry 6, 150 (1995). A polietilénlikol és egyéb polimerek proteinek módosítására történő alkalmazását illetően lásd még a következő forrásokat: Cheng és mtsai.: Bioconjugate Chem. 10, 520 (1999); Belcheva és mtsai.: Bioconjugate Chem. 10, 932 (1999); Bettinger és mtsai.: Bioconjugate Chem. 9, 842 (1998); Huang és mtsai.: Bioconjugate Chem. 9, 612 (1998); Xu és mtsai.: Langmuir 13, 2447 (1997); Schwarz és mtsai.: J. Amer. Chem. Soc. 121, 2662 (1999); Reuter és mtsai.: Bioconjugate Chem. 10, 271 (1999); Chan és mtsai.: J. Org. Chem. 62, 3500 (1997). Proteinekben a jellemző kapcsolódási helye közé tartoznak a primer aminocsoportok (pl. a lizinen vagy az N-terminálison található), a tiolcsoportok (pl. a cisztein oldalláncokban) és a karboxilcsoportok (pl. a glutaminsavban, aszparaginsavban vagy a C-terminálison). A leggyakoribb kapcsolódási helyek példáulként említhetők a glikoproteinek cukorgyökei, ciszteinjei vagy a célproteinek N-terminálisa és lizinjei.

Bár a polimerek EPO-hoz történő konjugálására számos különféle megközelítési módot ismertettek, a konjugálási folyamat során több problémával kerülhetünk szembe. Figyelmet kell fordítani a biológiai aktivitás konjugálási reakció okozta csökkenésének lehető legteljesebb mérséklésére. Például, a kapcsolódási helyek számának minimálisra csökkentése érdekében rendszerint megfelelően hajtogatott ("folded") vagy újrashajtogatott ("re-folded") proteinek alkalmazhatók. Mindazonáltal, ha az aktivált polimerből túl sok kapcsolódik a célproteinhez vagy célpolipeptidhez, a biológiai aktivitás jelentős mértékben csökkenhet vagy meg is szűnhet. Hasonlóan, ha a polimer proteinhez történő kapcsolására nem megfelelő kapcsolókomponenst alkalmazunk (vagy a célmolekulához elégtelen mennyiségű polimert kapcsolunk), a létrejött konjugátum terápiás hatékonysága csökken, és a keringési időben bekövetkező növekedés nem

elégseges a biológiai aktivitás csökkenésének kompenzálására. Nehézségek adódhatnak abból is, hogy a protein aktív helyét a módosításra alkalmazott polimer blokkolja - e probléma nehezen küszöbölhető ki, mivel a polimer és a protein rendszerint oldatban lejátszódó reakciók eredményeként kapcsolódik egymással. Felvetették a protein aktív helyeinek olyan anyagokkal történő blokkolásának lehetőségét, mint pl. a piridoxál-foszfát, azonban az eredmények nem egyértelműek [ld. a 4 179 337 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást (Davis és mtsai.)]. Ezek a problémák különösen súlyosak a kis molekulatömegű proteinek és peptidek esetében, amelyek gyakran tartalmaznak néhány olyan kapcsolódási helyet, melyek nincsenek összefüggésben a biológiai aktivitással.

10 Például, az egyik általánosan alkalmazott eljárás szerint a vízben oldható polimereket a célproteinben lévő primer aminokhoz kapcsolják (pl. az N-terminális aminocsoporthoz és a lizinek epszilon-aminocsoportjaihoz). A polimerek ciszteinek tiol-oldaláncaihoz történő kapcsolására tiol-reaktív polimer-konjugátumokat is alkalmaztak. Mindkét megoldás jelentős problémákat vet fel, mivel a proteinek többségében az ilyen reaktív csoportok a polipeptid-váz különböző - a protein aktivitásának, hajtogatódásának, újrashajtogatódásának és stabilitásának definiálásában fontos szerepet játszó - régiói mentén elszórva, több példányban vannak jelen. Ilyenformán, széles körű elterjedtségük ellenére a szóban forgó eljárások több-kevesebb hátrányos sajátsággal bírnak, a protein biológiai aktivitásának nem kívánatos csökkenését eredményezik, és rendszerint alkalmazásukkal olyan összetett elegyek jönnek létre, amelyek elválasztása és karakterizálása bonyolult [Delgada és mtsai.: *Pharmaceutical Sciences* 3, 59 (1997)].

20 A véletlenszerű kapcsolódás elkerülésére tett egyik kísérlet során olyan proteineket állítottak elő, amelyekben a természetes lizineket eltávolították, miközben a polimer kívánt kapcsolódási helyeire lizineket iktattak be (ld. a 4 904 584 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást). Ezzel a módszerrel, például, G-CSF-et és IL-2-t módosítottak. A véletlenszerű kapcsolódás kiküszöbölésének egy másik módszere olyan proteinek előállítását foglalja magában, amelyekben a természetes ciszteinek el vannak távolítva, miközben a polimer kívánt kapcsolódási helyeire ciszteinek vannak beépítve, vagy a ciszteinek az esetlegesen jelen lévő, természetes ciszteinek eltávolítása nélkül vannak beiktatva (EP 0 668 353). Például, ezzel az eljárással állítottak elő erythropoietint. Miközben az ilyen cisztein- vagy lizin-változatok elméletileg lehetővé teszik a polimer helyspecifikus kapcsolását, semmi nem garantálja, hogy valamenyny kiválasztott hely szabályozott módon módosítható.

A sok - azonos vagy hasonló reaktív funkciós csoportot tartalmazó oldalláncú - aminosavból álló proteinek helyspecifikus módosításának nehézségei miatt az utóbbi években a fi-

gyelem a proteinek N- és C-terminálisainak módosítására irányult. Az N- vagy C-terminális módosítása az e helyeket egyedi módon megváltoztató kémiai konjugálási technikákon alapul (ld. a WO 90/02136 és WO 90/02135 számú nemzetközi közzétételi iratokat). Például, ezt a technikát alkalmazták PEG-láncoknak a G-CSF és az IL-8-kemokin N-terminális aminosavához történő kapcsolására [ld. Gaertner és mtsai.: Bioconjug. Chem. 7(1), 38 (1996); és WO 96/41813 számú nemzetközi közzétételi irat]. Mindazonáltal, az N- vagy C-terminálisok módosítása általában csökkenti a protein aktivitását (ld. pl. az 5 985 265 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást, amelyben a PEG G-CSF N-terminálisához és lizin-oldalláncjaihoz történő kapcsolását tárják fel). A proteinek vízdékony polimerekkel történő módosításának hátrányai ellenére a proteinek PEGilálása és egyéb, vízben oldható polimerekkel történő konjugálása továbbra is az alkalmazott módszerek közé tartozik. Például, leírták a PEG erythropoietin (EPO) cukorláncjaihoz és belső aminosavaihoz, pl. lizinekhez történő kapcsolását (EP 0 605 963 és WO 00/32772) illetve N-terminálisához történő kapcsolását (ld. a 6 077 939 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást és a WO 00/32773 számú nemzetközi közzétételi iratot). Mindazonáltal, az ilyen PEGilált EPO-molekulák olyan komplex elegyeket alkotnak, amelyek nehezen választhatók el, illetve karakterizálhatók.

További nehézséget jelent a szóban forgó polimerek nagymértékű heterogenitása, ami megnehezíti a polimerrel módosított proteinek elegyeinek analitikai karakterizálását és tisztítását [Delgada és mtsai.: Pharmaceutical Sciences 3, 59 (1997)]. Például, a PEG- vagy PEG-alapú láncok - köztük az igen kis (pl. 3400 D) molekulatömegűek - előállítási módszerei olyan, gyengén szabályozott polimerizációs lépést foglalnak magukban, ami egy középérték körül szóródó, különböző hosszúságú láncokat tartalmazó készítményeket - vagyis $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ összegképletű polimerekből (ahol "n" nem egy meghatározott érték, hanem egy középérték körüli tartomány) álló készítményeket - eredményez. A derivatizált proteinek heterogenitása gyakran olyan tulajdonságokkal áll összefüggésben, amelyek nehezen azonosíthatók, még kevésbé elkülöníthetők.

Mindazonáltal, a megfelelő polimer azonosításának és alkalmazásának problémáját tovább súlyosbítja az a tény, hogy a jelenleg terápiás célra alkalmazott valamennyi EPO-protein rekombináns DNS-technikák eredménye. A rekombináns DNS-technológia alkalmazása komoly határokat szab az aktivitást növelő gyök és a rekombináns módszerekkel előállított EPO-protein között kialakítható kötések típusait és specifitását illetően. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy nagyon kevés olyan funkciós csoport létezik, amely alkalmas a kötés létrehozására; másodszor, a módosítani kívánt proteinben a reaktív funkciós csoportok általában több

példányban vannak jelen, ami eleve kizárja a módosítás specifikitását. Például, kimutatták, hogy a szuperoxid dizmutáz polietilén-glikollal történő, nem szelektív konjugálása esetében a módosított enzim jó néhány frakciója teljesen inaktívnak bizonyult [P. McGoff és mtsai.: Chem. Pharm. Bull. 36, 3079 (1988)]. Ezen túlmenően, ha a proteinhez más-más számú ilyen gyököt kapcsolunk, a terápiás hatású protein farmakokinetikája nem jósolható meg pontosan, ami nagyon megnehezíti a dozírozást. Ezenfelül, a kapcsolás szabályozásának hiánya a következőket okozhatja: (a) csökkent mértékű hatás; (b) a származékok összetett elegyeinek szétválasztására alkalmas tisztítási rendszerek kidolgozásának szükségessége; és (c) a módosításra alkalmazott gyök potenciálisan instabil kapcsolódása. Mindezek mellett, számos kötéstől (pl. trezil-kloridon alapuló kötések) ismert, hogy immunogén hatásúak.

A biológiai úton termeltetett proteinek vérkeringésben mérhető felezési idejének javítása, valamint proteolízisük és immunogenitásuk mérséklése céljából vízben oldható polimerek (pl. polietilén-glikol) kapcsolhatók hozzájuk, azonban ez - a kontrollált kapcsolás nehézségei miatt - vegyes eredményekkel és felhasználó által meghatározott precizitással jellemezhető. Ezen túlmenően, a polimerek pontos, felhasználó által meghatározott helyekre történő kapcsolásának mérsékelt sikere miatt nagyon keveset tudunk azon előnyös kapcsolási helyekről, amelyek a proteinekben általánosan alkalmazhatók, továbbá a PEG-protein konjugátumok tisztítása és analitikai karakterizálása - a kapcsolás sztochasztikus természete és a PEG és egyéb, ilyen célokra jelenleg alkalmazott, vízben oldható polimerek heterodiszperz természete miatt - meglehetősen bonyolult. Ilyenformán, a reprodukálható kapcsolódás gyenge szabályozhatóságának és a polimer heterogenitásának összetett problémája komolyan gátolja a polimerrel modifikált proteinek gyógyszerként történő alkalmazásának széles körű elfogadását (az 1970-es évek elejére tehető bevezetésük óta napjainkig csupán néhányat hagytak jóvá gyógyszer-szati felhasználásra).

A fentiek értelmében, nagy szükség van bioaktív erythropoiesis-stimuláló proteinek - rekombináns DNS-technikáktól és (a természetes és rekombináns módszerekkel termelt EPO módosítására alkalmazott) polimer-technikáktól eltérő - előállítási eljárásainak kifejlesztésére. Szükség van továbbá javított klinikai tulajdonságokkal bíró erythropoiesis-stimuláló proteinek-re. Találmányunk megoldást nyújt a fent említett és egyéb szükségletekre.

A találmány tárgyát szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek, valamint azok előállítási és alkalmazási eljárásai képezik. Közelebbről, a találmány tárgyát olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek képezik, amelyekhez egy vagy több, vízben oldható polimer van kapcsolva. Szintén a találmány tárgyhöz tartoznak a találmány szerinti szintetikus

erythropoiesis-stimuláló proteinek tartalmazó gyógyászati készítmények.

Ezen túlmenően, a találmány tárgyát eljárások képezik emlős találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinnel történő kezelésére. A találmány egyik megvalósítási módja értelmében eljárást tárunk fel emlős hematokrit-értékének növelésére. A találmány egy másik megvalósítási módja értelmében eljárást tárunk fel vörösvértestek termelődésének fokozására emlősben. A találmány egy következő megvalósítási módja szerint eljárást tárunk fel emlős hemoglobin-számának növelésére. Egy további megvalósítási mód szerint emlős vörösvértest-számának növelésére alkalmas eljárást tárunk fel. Az itt felsorolt, találmány szerinti eljárások során az emlősnek a kívánt hatás elérése céljából egy találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein hatásos mennyiségét adagoljuk.

A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek (ideértve azok előnyös, polimerrel modifikált alakjait és köztestermékeit) előállítási eljárásai szintén a találmány tárgyát képezik. A szóban forgó eljárások során egy szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmensek kémiai ligálását hajtjuk végre, miáltal szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tartalmazó polipeptid-láncot hozunk létre.

A következőkben az ábrák rövid leírását ismertetjük.

Az 1/A-1/E ábrákon a találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek előállítási eljárásainak folyamatát szemléltetjük.

A 2/A-2/C ábrákon a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek előállítási eljárásainak folyamatát szemléltetjük.

A 3/A-3/B ábrákon több peptidszegmensű ligálási eljárások folyamatát mutatjuk be, mely eljárások három vagy több nem átfedő peptidszegmens kémiai ligálásából állnak, vagyis legalább egy szegmens a végső, teljes hosszúságú ligálási terméknek megfelelő középső szegmens.

A 4/A-4/C ábrákon a natív kémiai ligálást és a létrejött oldallánc-tiol kémia módosítását szemléltetjük.

Az 5/A-5/B ábrákon a találmány szerinti U-B-Polimer-J* vízoldékony polimer elágazódási magjának (B) és egyedi kemoszelektív funkciós csoportjának (U) szilárd fázisú előállítási eljárását szemléltetjük.

A 6/A-6/D ábrákon a találmány szerinti előnyös, lényegében nem antigéntulajdonságú, vízoldékony Polimer-J* poliamid-komponensek (U-B maghoz történő későbbi kapcsolás céljára)



ból végzett) szilárd fázisú előállításának folyamatát szemléltetjük.

A 7. ábrán az U-B komponens Polimer-J* komponenshez történő kapcsolási eljárását mutatjuk be, amellyel a találmány szerinti U-B-Polimer-J* képletű előnyös szintetikus polimer-konstrukciókat hozzuk létre.

5 A 8. ábrán a vízdékony polimer - ligálásra és találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein előállítására alkalmazható - peptidszegmenshez történő precíziós kapcsolásának alternatív módját szemléltetjük.

A 9. ábrán a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek előállításának teljes folyamatát szemléltetjük.

10 A 10. ábrán a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek egyik előnyös típusának alapszerkezetét mutatjuk be. pPEG = "precíziós PEG".

A 11. ábrán az áthelyezett N- és C-terminálisú, cirkulárisan permutált SEP-analógok általános szerkezetét mutatjuk be.

15 A 12. ábrán egy előnyös vízben oldható polimer - és különböző lineáris és elágazó konstrukciói - szerkezetét mutatjuk be.

A 13. ábrán elágazó láncú pPEG-polimerek kialakítását szemléltetjük.

A 14. ábrán a SEP1-L30 elnevezésű szintetikus citokin (amely a humán EPO 2. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja) szintézisét szemléltetjük.

20 A 15. ábrán a SEP1-L30 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 2. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

A 16. ábrán a SEP1-L26 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 3. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

25 A 17. ábrán a SEP1-B50 elnevezésű szintetikus citokinhez (amely a humán EPO 4. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja) kapcsolt előnyös, elágazó láncú, vízben oldható polimer szintézisét szemléltetjük.

A 18. ábrán a SEP1-B50 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 4. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

30 A 20. ábrán a SEP3-L42 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 5. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

A 21. ábrán a SEP1-B51 elnevezésű szintetikus citokinhez (amely a humán EPO 7. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja) történő kapcsolásra előnyösen alkalmazható, elágazó láncú, vízben oldható polimer szintézisét szem-



léltetjük.

A 22. ábrán a SEP1-B51 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 7. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

5 A 23. ábrán a SEP1-B52 elnevezésű szintetikus citokinhez (amely a humán EPO 8. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja) történő kapcsolásra előnyösen alkalmazható, elágazó láncú, vízben oldható polimer szintézisét szemléltetjük.

A 24. ábrán a SEP1-B52 elnevezésű szintetikus citokint mutatjuk be, amely a humán EPO 8. példában leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógja.

10 A 25. ábrán a humán EPO 2-5., 7. és 8. példákban leírtak szerint előállított, precíziós polimerrel modifikált szintetikus analógjainak jellemző analitikai adatait mutatjuk be. Az ábrán a hajtogatódott, tisztított SEP1-B51 monomer-molekulatömegét izoelektromos fókuszáló gélen végzett izoelektromos fókuszálással (IEF) és nem redukáló SDS-PAGE-gélen végzett gélelektroforézissel határoztuk meg.

15 A 26. ábrán a SEP0, SEP1-L26, SEP1-L30, SEP1-B50, SEP1-B51 és SEP3-L42 elnevezésű SEP-vegyületek faktor-dependens sejtvonalban meghatározott *in vitro* aktivitását szemléltetjük.

A 27. ábrán a SEP3-L42 és SEP1-B50 idő (óra) függvényében mérhető vérplazmai koncentrációját (ng/ml) összehasonlító reprezentatív farmakokinetikai görbe látható.

20 A 28. ábrán a SEP1-B51 és a CHO-sejtekben termeltetett rekombináns, glikozilált humán erythropoietin (rhEPO) vörösvértestek (RBC) 72 órás ⁵⁹Fe-felvétele alapján hipoxiás patkány modellben mért *in vivo* aktivitása lineáris regressziós analízisének eredményét mutatjuk be.

25 A 29. ábrán a patkányokban megfigyelt clearance reprezentatív farmakokinetikai görbét mutatjuk be, összehasonlítva a SEP1-B51 és az rhEPO - a vizsgált vegyületek egyetlen, 5 µg/kg-os intravénás dózisének beadását követően az idő függvényében mért - vérplazmai koncentrációját (ng/ml).

A 30. ábrán cirkulárisan permutált, polimerrel modifikált SEP-konstrukciót mutatunk be.

30 A találmány értelmében szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteineket, valamint azok előállítási és alkalmazási eljárásait tárjuk fel.

I) A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tárunk fel, amelyhez egy vagy több vízben oldható polimer van kapcsolva. Az "erythropoiesis-stimuláló protein" kifejezésen olyan proteint értünk, amelynek *in vitro* biológiai aktivitása az erythropoietin-dependens sejtvonalak szaporodásának serkentése. A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek *in vivo* biológiai aktivitása a vörösvérsejtek termelődésének elősegítése. Egy protein erythropoiesis-stimuláló aktivitása különféle módszerekkel (pl. az erythropoiesis *in vivo* adagolás utáni megfigyelése, a protein EPO-dependens sejtvonalak proliferációját közvetítő képességének tesztelése, stb.) határozható meg.

A "vízben oldható polimer" vagy "vízoldékony polimer" kifejezésen olyan, lényegében nem antigéntulajdonságú polimer értünk, amely vízben oldható.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, egy protein akkor "szintetikus", ha aminosavai közül néhány (legelőnyösebben az összes) polimerizálását nem rekombináns technika alkalmazásával hajtottuk végre. A "nem rekombináns technika" kifejezésen olyan szerves kémiai és egyéb szintetikus polimerizációs technikákat értünk, amelyek jól elkülöníthetők az RNS proteinné történő - *in vivo* vagy *in vitro* - transzlációját magában foglaló technikáktól. A szintetikus proteinek lehetnek egészében szintetikus vagy félszintetikus proteinek egyaránt lehetnek. A teljes egészében szintetikus protein valamennyi ligálási komponense kémiai szintézissel, azaz riboszóma-mentes szintézissel van előállítva, míg a félszintetikus protein egy ligálási komponensének legalább egy részlete biológiai szintézissel - azaz sejtes vagy sejtmentes transzlációs rendszerben riboszómák által - van előállítva.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek riboszómáisan meghatározott erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot és - egy vagy több kémiai ligálási helyen keresztül kovalensen kapcsolt - egy vagy több nem átfedő peptidszegmenst. Az erythropoietin legelőnyösebben emlőseredetű, még előnyösebben humán erythropoietin vagy annak származéka. Például, számos erythropoietin aminosav-szekvenciája ismert, és a humán erythropoietinek számos aktív változatát létrehozták (ld. pl. az 5 856 298, 5 955 422, 8 888 772, 5 858 347, 5 614 184, 5 457 089 és 6 077 939 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat és a WO 00/32772 számú nemzetközi közzétételi iratot). Ilyenformán, egy találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein tartalmazhat fentebb említett aminosav-szekvenciákat tartalmazó polipeptid-láncot.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja szerint a riboszomálisan meghatározott erythropoietin egy vagy több glikozilációs helyet tartalmaz, és a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncához - a riboszomálisan meghatározott erythropoietin egy vagy több glikozilációs helyének megfelelő - egy vagy több helyen vízben oldható polimer van kapcsolva. Egy még előnyös megvalósítási mód szerint a vízdékony polimer a polipeptid-lánc kizárólag azon egy vagy több helyéhez van kapcsolva, amely(ek) egy vagy több ilyen glikozilációs helynek felel(nek) meg. A találmány e szempontja értelmében olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tárunk fel, amelyekben a riboszomálisan meghatározott erythropoietin rekombináns módszerekkel van előállítva. Ennek megfelelően, a riboszomálisan meghatározott erythropoietin természetes erythropoietin vagy nem természetes erythropoietin lehet, mely utóbbi egy vagy több nem természetes glikozilációs helyet is tartalmazhat.

A "glikozilációs hely" kifejezésen egy protein azon aminosav-szekvenciáját értjük, amely egy oligoszacharid (szénhidrát) láncnak a protein egy aminosavának oldalláncához történő enzimatis kapcsolódási helyét reprezentálja; ezek példái az N-kötött és O-kötött glikozilációs helyek. A találmány leírása alapján érthető lesz, hogy az egy vagy több ilyen glikozilációs hely eltávolítása céljából mutagenizált erythropoietinek megfelelnek a "glikozilációs hely" definíciójának, mivel a polimeres modifikációhoz visszamaradt hely pozíciója ugyanaz. A "természetes glikozilációs hely" kifejezésen természetben előforduló erythropoietin-glikoprotein glikozilációs helyét értjük. A "nem természetes glikozilációs hely" kifejezés az erythropoietinben valamilyen manipulációval létrehozott glikozilációs helyre vonatkozik [például, a rekombináns humán EPO ilyen módon van manipulálva (ld. pl. az 5 856 298 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírást)].

A találmány egy megvalósítási módja részben azon a felismerésen alapul, hogy ha egy humán erythropoietin polipeptid-láncát tartalmazó szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint egy vagy több glikozilációs helyen vízben oldható polimer (pl. a leírásban ismertetett polimer) hozzákapsolásával módosítunk, a vízben oldható polimer a természetben előforduló erythropoietin-glikoprotein megfelelő pozíciójában normális esetben megtalálható szénhidrát-láncnak tulajdonítható egy vagy több biológiai hatás kihasználása céljából alkalmazhatjuk. Ilyen biológiai hatás lehet a proteázos hasítással szembeni rezisztencia, az immunogenitás, receptor-specifitás, specifikus aktivitás, hatékonyság és farmakokinetikai sajátságok módosítása. Mindazonáltal, egy szénhidrát-lánc jelenlétének megszüntetésével (és a lánc találmány szerinti előnyös, vízben oldható polimerekkel történő helyettesítésével) jelentős előnyök érhetők el, ideértve az enzimatis lebontás és clearance elkerülését (pl. a cukor-láncokon lévő szialinsav-

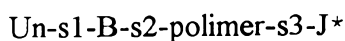
gyökök eltávolításával), valamint egyéb jelenségek (pl. instabilitás, korlátozott keringési felezési idő, eloszlás, rossz tárolhatósági tulajdonságok, stb.) megszüntetését. Lényeges azon felismerésünk is, hogy a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek megtartják az előnyös biológiai tulajdonságokat, anélkül, hogy biológiai aktivitásuk - a nem módosított szintetikus megfelelőjük aktivitásához viszonyítva - jelentős mértékben változna, ideértve a fokozott biológiai aktivitást is, még olyan esetekben is, ha a szintetikus protein monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb.

Ilyenformán, a találmány egy további előnyös megvalósítási módja értelmében szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tárunk fel, amely egy riboszomálisan meghatározott erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot tartalmaz, mely lánchoz egy vagy több vízben oldható polimer van kapcsolva, és monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb, és a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein biológiai aktivitása a megfelelő, de vízben oldható polimer nélküli polipeptid-láncot tartalmazó szintetikus proteinével azonos vagy még jobb. A biológiai aktivitás lehet *in vitro*, *in vivo* vagy mindkettő. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a biológiai aktivitás *in vivo*. Egy másik előnyös megvalósítási mód értelmében olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tárunk fel, amely egy riboszomálisan meghatározott erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot tartalmaz, mely lánchoz egy vagy több vízben oldható polimer van kapcsolva, és monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb, és a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein biológiai aktivitása a riboszomálisan meghatározott erythropoietin aktivitásával azonos vagy még jobb. Az előzőhöz hasonlóan, a biológiai aktivitás lehet *in vitro*, *in vivo* vagy mindkettő. Az egyik előnyös megvalósítási mód szerint a biológiai aktivitás *in vivo*. A szóban forgó, polimerrel modifikált szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek legelőnyösebben meghatározott számú vízzoldékony polimert tartalmaznak.

A "kémiai ligálási hely" kifejezésen egy első peptid vagy polipeptid N-terminális aminosavát és egy második peptid vagy polipeptid C-terminális aminosavát értjük, amelyek kémiai kapcsolás (ligálás) révén egymással nem reverzibilis kovalens kötés létrehozására képesek. Ahogy itt használjuk, a "kémiai ligálás" kifejezés olyan kemoszelektív reakcióra vonatkozik, amely két kémiai entitás (melyek mindegyike kölcsönösen reaktív funkciós csoportot tartalmaz, melyek egymással nem reverzibilis kovalens kötés kialakítására képesek) kovalens kötését foglalja magában. A kémiai ligálás (1) egy egyedi reaktivitású C-terminális csoportot tartalmazó első peptid vagy polipeptid (2) egy egyedi reaktivitású N-terminális csoportot tartalmazó második peptiddel vagy polipeptiddel történő kovalens ligálását foglalja magában, melynek so-

rán a C-terminális és N-terminális csoportok egymás között nem reverzibilis kovalens kötést alakítanak ki. Közelebbről, a kémiai ligálás a védőcsoport nélküli peptidszegmensek ligálására alkalmas kemoszelektív reakciók bármelyikével végrehajtható.

5 A vízben oldható polimert illetően, az előnyös vízdékony polimerek a következő általános képlettel írhatók le:



10 ahol "U" jelentése: a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncához kovalens kötéssel kapcsolt egyedi funkciós csoport, közelebbről, az U csoport a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein egy vagy több nem átfedő peptidszegmensének egy vagy több aminosavas "n" oldalláncának kölcsönösen reaktív egyedi funkciós csoportjához van kapcsol-
va, ahol "n" értéke 1 és 6 közötti egész szám. Az "n" oldallánc előnyösen 1 és 4 közötti egész
szám, legelőnyösebben 1 vagy 2. Ahogy itt használjuk, az "aminosav" kifejezésen a 20 geneti-
kailag kódolt aminosavat, a természetben megtalálható, ritka vagy nem általános aminosavakat
és a nem természetes aminosavakat (pl. szabálytalan aminosavak) értjük. Az előnyös megvaló-
sítási módok értelmében az "U" és az "n" oldallánc az egyedi, kölcsönösen reaktív csoportok
által alkotott kovalens kötések, melyek a következők lehetnek: oxim-, amid-, amin-, uretán-,
éter-, tioéter-, észter-, hidrazid-, oxazolidin-, tiazolidin-, tioéter-, éter- és észterkötés. Az "U"
és "n" kötés legelőnyösebben a következő: "U" kémiai ligálással létrehozott kötéssel (amid-,
oxim-, tioészter-, hidrazon-, tiazolidin- vagy oxazolidin-kötéssel) az "n" oldallánchoz kötődik.

20 "B" jelentése: három vagy több, azonos vagy különböző kart tartalmazó elágazódási mag, amely bizonyos esetekben hiányozhat; legelőnyösebben azonban "B" jelen van, és három vagy több kart, még előnyösebben négy vagy több kart tartalmaz. A "B" mag egyik karja (adott esetben az "s1" távtartó- vagy kapcsolókomponensen keresztül) az "U" komponenshez van kapcsolva, míg a "B" mag egy másik karja (adott esetben az "s2" távtartó- vagy kapcsoló-
25 komponensen keresztül) a "polimer" komponenshez kapcsolódik. Az egyik előnyös, polimerrel modifikált szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinben a "B" molekularész elágazási karjainak legalább egyike oxim-, amid-, amin-, uretán-, tioéter-, észter-, hidrazid-, oxazolidin- vagy tiazolidin-kötésből származó gyököt tartalmaz. A találmány szerinti polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein egy előnyös "B" elágazódási csoportja amin,
30 karboxilát vagy vegyes amino-karboxilát elágazódási magot tartalmaz. Az előnyös amin elágazódási mag lizint, az előnyös karboxilát elágazódási mag glutaminsavat vagy aszparaginsavat, és az előnyös vegyes amino-karboxilát elágazódási mag gamma-glutaminsavat vagy származé-
kait tartalmazza.

A "polimer" komponens lényegében nem antigénhatású, vízben oldható polimer, amely azonos vagy különböző, ha a "B" komponens jelen van. A "vízben oldható polimer" kifejezésen lényegében nem antigénhatású, vízben oldódó polimert értünk, amelynek atomi molekulatömege nagyobb, mint kb. 1000 D. A "polimer" komponens effektív hidrodinamikai molekulatömege 10 kD-nál nagyobb, még előnyösebben kb. 20 kD és 500 kD közötti, legelőnyösebben kb. 40 kD és 300 kD közötti. Az "effektív hidrodinamikai molekulatömeg" kifejezésen egy polimer-lánc - vízalapú méretszelekciós kromatográfiával (SEC) meghatározott - effektív, vízzel szolvatált méretét értjük. Ha a vízben oldható polimer ismétlődő polialkilén-oxid egységekből (pl. ismétlődő etilén-oxid egységekből) álló polimerláncokat tartalmaz, előnyös, ha az egyes láncok atomi molekulatömege kb. 200 D és kb. 80 kD közötti, előnyösebben kb. 1,5 kD és kb. 42 kD közötti, legelőnyösebben 2 kD és kb. 20 kD közötti. Hacsak másképpen nem jelezzük, a molekulatömeget atomi molekulatömeget értjük.

A "polimer" komponens molekulatömege igen tág határok között változhat, és különféle polimer-alegységeket tartalmazhat, melyek lehetnek biológiai polimerek, szintetikus polimerek, illetve ezek kombinációi. Az ilyen vízben oldható polimerek jellemző példái közé tartoznak a következők: dextrán és dextránszármazékok, köztük a dextrán-szulfát, P-aminokeresztékötött dextrin és karboximetildextrin; cellulóz és cellulóz-származékok, pl. metilcellulóz és karboximetilcellulóz; keményítő és dextrinek, valamint a keményítő származékai és híd-roilaktátjai; polialkilénglikol és származékai, köztül a polietilénglikol, metoxi-polietilénglikol, polietilénglikol-homopolimerek, polipropilénglikol-homopolimerek, az etilénglikol propilénglikollal alkotott kopolimerei (mely homopolimerek és kopolimerek lehetnek szubsztituens nélküliek vagy egyik végükön alkilcsoporttal szubsztituáltak), heparin vagy heparin-fragmensek; polivinilalkohol és polivinil-etiléterek; polivinilpirrolidon; aszpartamid; és polioxietilezett poliolo, dextránnal és dextrán-származékokkal, dextrinnel és dextrin-származékokkal. A találmány céljaira a felsorolt, vízben oldható polimerek különböző származékai is alkalmasak lehetnek.

A vízben oldható polimerek szakember számára jól ismertek, különösen a polialkilén-oxid-alapú polimerek, mint pl. a polietilénglikol (PEG). Ld. pl. "Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications", szerk.: J.M. Harris, Plenum Press, New York, N.Y. (1992); "Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications", szerk.: J.M. Harris és S. Zalipsky, ACS (1997), valamint a következő nemzetközi közzétételi iratokat, illetve egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat: WO 90/13540, WO 92/00748, WO 92/16555, WO

94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28937, WO 95/11924,
WO 96/00080, WO 96/23794, WO 98/07713, WO 98/41562, WO 98/48837, WO
99/30727, WO 99/32134, WO 99/33483, WO 99/53951, WO 01/26692, WO 95/13312,
WO 96/21469, WO 97/03106, WO 99/45964, and US Patents Nos. 4,179,337;
5 5,075,046; 5,089,261; 5,100,992; 5,134,192; 5,166,309; 5,171,264; 5,213,891;
5,219,564; 5,275,838; 5,281,698; 5,298,643; 5,312,808; 5,321,095; 5,324,844;
5,349,001; 5,352,756; 5,405,877; 5,455,027; 5,446,090; 5,470,829; 5,478,805;
5,567,422; 5,605,976; 5,612,460; 5,614,549; 5,618,528; 5,672,662; 5,637,749;
5,643,575; 5,650,388; 5,681,567; 5,686,110; 5,730,990; 5,739,208; 5,756,593;
10 5,808,096; 5,824, 778; 5,824,784; 5,840,900; 5,874,500; 5,880,131; 5,900,461;
5,902,588; 5,919,442; 5,919,455; 5,932,462; 5,965,119; 5,965,566; 5,985,263;
5,990,237; 6,011,042; 6,013,283; 6,077, 939; 6,113,906; 6,127,355; 6,177,087;
6,180,095; 6,194,580; 6,214,966).

A találmány szempontjából még előnyösebb polimerkomponens polialkilénoxidot, po-
15 liamid-alkilénoxidot vagy ezek származékát tartalmazza. A találmány szerinti megoldás szem-
pontjából előnyös polialkilénoxid és poliamid-alkilénoxid $-(CH_2-CH_2-O)-$ képletű ismétlődő
etilén-oxid egységet tartalmaz. Még előnyösebben, a polimerkomponens az $-[C(O)-X-C(O)-$
 $NH-Y-NH]_n$ vagy $-[NH-Y-NH-C(O)-X-C(O)]_n$ általános képletű (ahol X és Y jelentése: két-
értékű gyökök, melyek egyformák vagy különbözők, elágazóak vagy lineárisak; és "n" értéke:
20 2 és 100 közötti egész szám, előnyösebben 2 és 50 közötti egész szám), kb. 1 kD-nál nagyobb
molekulatömegű poliamid, amelyben mind az X, mind az Y biokompatibilis, lényegében nem
antigénhatású ismétlődő egységet tartalmaz, amely lineáris vagy elágazó egyaránt lehet. A ta-
lálmány szerinti megoldás szempontjából legelőnyösebb vízben oldható ismétlődő egység
25 $-(CH_2-CH_2-O)-$ vagy $-(CH_2-CH_2-O)-$ képletű etilén-oxidot tartalmaz. A vízben oldható ismét-
lődő egységek száma tág határok között változhat, azonban az ilyen egységek száma előnyö-
sen 2-500, 2-400, 2-300, 2-200, 2-100, legelőnyösebben pedig 2-50. Egy még előnyösebb
megvalósítási mód szerint X és Y jelentése: $-((CH_2)_{n1}-(CH_2-CH_2-O)_{n2}-(CH_2)_{n1})-$ vagy
 $-((CH_2)_{n1}-(O-CH_2-CH_2)_{n2}-(CH_2)_{n1})-$, ahol "n1" értéke 1-6, 1-5, vagy 1-4, legelőnyösebben 1, 2
vagy 3; és "n2" értéke: 2-50, 2-25, 2-15, 2-10, 2-8, legelőnyösebben 2-5. Egy különösen elő-
30 nyös megvalósítási mód szerint X jelentése: $-(CH_2-CH_2)-$, és Y jelentése: $-(CH_2-(CH_2-CH_2-$
 $O)_3-CH_2-CH_2-CH_2)-$ vagy $-(CH_2-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2)-$.

A "polimer" komponens - illetve (ha jelen vannak) az egy vagy több távtartó- vagy
kapcsolókomponens - biológiailag stabil vagy biológiailag lebontható polimerláncokat vagy

-egységeket tartalmazhat. Például, az ismétlődő kötések tartalmazó polimer stabilitása fiziológiai feltételek mellett - a kötés bomlékonyságától függően - változó. Az ilyen kötések tartalmazó polimerek fiziológiai feltételek melletti relatív hidrolízises rátájuk szerint kategorizálhatók (a kis molekulatömegű analógiák ismert hidrolízises rátája alapján: pl. a kevésbé stabilaktól a nagy stabilitásúak felé: polikarbonátok $(-O-C(O)-O-)$ > poliészterek $(-C(O)-O-)$ > poliuretánok $(-NH-C(O)-O-)$ > poliortoészterek $(-O-C((OR)(R'))-O-)$ > poliamidok $(-C(O)-NH-)$). Hasonlóan, a vízben oldható polimert célmolekulához kapcsoló kötőrendszerek szintén biológiailag stabilak vagy biológiailag lebonthatók lehetnek, a kevésbé stabilaktól a nagy stabilitásúak felé: karbonát $(-O-C(O)-O-)$ > észter $(-C(O)-O-)$ > uretán $(-NH-C(O)-O-)$ > ortoészter $(-O-C((OR)(R'))-O-)$ > amid $(-C(O)-NH-)$. Ezeket a kötések csupán példaként említjük, s ez nem jelenti azt, hogy a találmány szerinti, vízben oldható polimerek polimer-láncaiban vagy kötési rendszereiben csupán ezek a kötések lennének alkalmazhatók.

A fenti, "Un-s1-B-s2-polimer-s3-J*" általános képletben a J* komponens egy toldalékcsoport ("*pendant group*"), amely fiziológiai körülmények között negatív, pozitív vagy semleges nettó töltésű. Az ilyen csoportok példáulként említhetők a következők: alkilcsoport, arilcsoport, heteroalkilcsoport, heteroarilcsoport, aril-alkilcsoport, acilcsoport, alkoxics csoport, alkenilcsoport, alkinilcsoport, amidocsoport, aminocsoport, karbonilcsoport és hasonló (ideértve azok szubsztituált változatait, illetve sóit is). Semleges töltésű csoportként előnyösen az alkilcsoportok és alkoxics csoportok alkalmazhatók, melyek 1-18 szénatomosak és lineáris vagy elágazó láncúak lehetnek. Töltéssel bíró csoport alkalmazásakor a J* komponens ionizálható funkciós csoportot reprezentál. A funkciós csoportok példái közé tartoznak, többek között, a karbonsavak, észterek, amidok, nitrolok, tiolok és hidroxilok. Az ilyen J*-csoportok aminosavak, nukleinsavak, zsírsavak, szénhidrátok vagy származékaik komponensei lehetnek, és olyan molekulák, mint a kitin, kitozán, heparin, heparin-szulfát, chondroitin, chondroitin-szulfát, dermatán és dermatán-szulfát, ciklodextrin, dextrán, hialuronsav, foszfolipid, szíálsav és hasonló. A J*-komponens előnyösen ionizálható csoportot tartalmaz, amely karboxilcsoport, aminocsoport, tiolcsoport, hidroxilcsoport, foszforilcsoport, guanidiniumcsoport, imidazolcsoport vagy ezek sója lehet. A J*-komponens legelőnyösebben ionizálható karboxilátgyök, amely fiziológiai feltételek mellett nettó negatív töltésű. Például, a találmány szerinti előnyös, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek izoelektromos pontja 3 és 7 közötti, így a pI finomhangolására a negatív töltésű J*-csoportok használhatók fel.

Az "s1", "s2" és "s3" komponensek távtartó- vagy kapcsolókomponensek, amelyek egyformák vagy különbözőek, és egymástól függetlenül jelen lehetnek vagy hiányozhatnak. A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös távtartó- vagy kapcsolókomponensek lineáris vagy elágazó molekularészek, amelyek egy vagy több - vízdékony polimerekben alkalmazott - ismétlődő egységet tartalmaznak, például, diamino- és/vagy disav-egységeket, természetes vagy nem természetes aminosavakat vagy származékaikat, illetve alifás gyököket, pl. alkil-, aril-, heteroalkil-, heteroaril-, alkoxi- és hasonló gyököket, melyek legfeljebb 18 szénatomosak. A távtartó- vagy kapcsolókomponens, még előnyösebben, polimerlánc is lehet.

Más módon, a fenti "Un-s1-B-s2-polimer-s3-J*" általános képlet "Un-B-Polimer-J*" általános képletként is leírható, amelyben az s1, s2 és s3 csoportok jelen lehetnek vagy hiányozhatnak.

A polimer-komponens, még előnyösebben, olyan polimer-komponens, ahol a az "U-s1-B-s2-polimer-s3-J*" vízdékony polimer teljes egészében szakaszos szintézissel van előállítva. Ez pontos molekulatömegű és meghatározott szerkezetű polimerek előállítását teszi lehetővé. Ezzel szemben, a hagyományos polimerszintézis (amely egy polimerizációs folyamat) olyan elegy jön létre, amely különböző hosszúságú láncokat tartalmaz, melyek molakulatömeg- és méreteloszlása olyan, hogy a különböző láncok elválasztása bonyolult (ha nem lehetetlen). A molekuláris tisztaság szabályozásának képessége azzal az előnnyel jár, hogy olyan monodiszperz szintetikus protein állítható elő, amelyhez vízben oldható polimer van kapcsolva. Ez jelentős előnyt nyújt abból a szempontból, hogy kiküszöbölhetők a heterogén vegyületekből adódó változékony tulajdonságok, és csak azok a vegyületek állíthatók elő és izolálhatók viszonylag egyszerűen, amelyek a legelőnyösebb sajátságokkal bírnak.

A találmány egy másik előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek egy vagy több szabálytalan aminosavat is tartalmaznak. Ahogy itt használjuk, a "szabálytalan aminosav" kifejezés olyan aminosavra vonatkozik, amely nem genetikailag kódolt oldalláncot, nem genetikailag kódolt molekulagerincet, nem genetikailag kódolt, szubsztituált N α - vagy α C(O)-gyököt (vagy ezek kombinációját) tartalmaz, vagyis a 20 genetikailag kódolt, riboszomálisan beépített aminosavtól eltérő aminosavakra. A szabálytalan aminosavak jellemző példái közé tartoznak a genetikailag kódolt funkciócsoporttól eltérő egyedi funkciócsoportot hordozó oldalláncokat tartalmazó aminosavak, valamint a pszeudo-aminosavak és a különböző aminosav-származékok. A találmány szerinti megoldás a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tervezésében és/vagy előállításában széles körű variabilitást és rugalmasságot biztosít. A találmány szerinti megoldás értelmében

alkalmazható, nem riboszomálisan beépített aminosavak közé tartoznak, többek között, a következők: D-aminosavak, β -aminosavak, pseudo-glutamát, γ -aminobutirát, ornitin, homocisztein, N-szubsztituált aminosavak [ld. Simon és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9367 (1992); WO 91/19735 számú nemzetközi közzétételi irat (Bartlett és mtsai.), és 5 646 285 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás (Baindur)], α -amino-metilén-oxi-ecetsavak (aminosav-Gly dipeptid izoszter), α -amino-oxisavak és egyéb, nem genetikailag kódolt oldallánc funkciós csoportokat tartalmazó aminosav-származékok, stb. Szintén alkalmazhatók a tioamidot, vinil-amidot ("*vinyllogous amide*"), hidrazint, metilénoxicsoportot, tiometilénecsoportot, foszfoamidokat, oxiamidot, hidroxietilén-csoportot, redukált amid és szubsztituált redukált amid izosztereket és β -szulfonamid(oka)t tartalmazó peptidanalógok. A "pseudo-aminosav" kifejezés olyan aminosavra vonatkozik, amelynek molekulagerince és oldallánc-csoportjai azonosak a genetikailag kódolt aminosavéval, de az oldalláncok atomi összetétele különbözik attól.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tárunk fel, amelyekben a polipeptid-lánc egy szabálytalan aminosavához vízben oldható polimer van kapcsolva. A vízben oldható polimer polipeptid-lánchoz történő kapcsolására azok a szabálytalan aminosavak előnyösek, amelyek a genetikailag kódolt funkciós csoportok jelenlétében is kemoselektív ligálási reakció alkalmazását teszik lehetővé, anélkül, hogy a polimer reagálna azokkal.

Ahogy fentebb említettük, a teljes egészükben szakaszos módon előállított, vízben oldható polimerek monodiszperz formában állíthatók elő (például, a találmány szerinti előnyös poliamid-etilén-oxidok). Ilyenformán, a találmány egy további előnyös megvalósítási módja értelmében a vízben oldható polimer monodiszperz (vagyis olyan, molekulárisan homogén készítmény, amely egyféle és strukturálisan meghatározott molekulafajtát tartalmaz). Ezenfelül, mivel a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek szintén előállíthatók teljes egészükben kémiai szintézissel, esetükben is lehetőség van a monodiszperz állapotban történő előállításra. Az ilyen vegyületek előnye a nagyfokú tisztaság és a tisztítás és analitikai karakterizálás problémamentessége (ami a heterodiszperz polimerek esetében nem jellemző). Ezek a vegyületek a reprodukálható adagolás és hasonlóak szempontjából is előnyösek (például, egyetlen molekula-típus, szemben a glikoproteinek és a rekombináns módszerekkel előállított, PEGilált proteinekre jellemző heterogén elegyekkel).

Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb lehet. A találmány céljaira a molekula-tömeg meghatározását denaturáló SDS-poliakrilamid gélelektroforézis alkalmazásával hajtjuk végre. A "monomer-molekulatömeg" kifejezésen egy monomer szintetikus protein molekula-tömegét értjük, megkülönböztetve azon szintetikus proteinek molekulatömegétől, amelyek egy protein vagy polipeptid több példányából állnak. A "monomer-polipeptid molekulatömeg" kifejezésen egy polipeptid-monomer molekulatömegét értjük, megkülönböztetve azon szintetikus proteinekétől, amelyek kapcsolt polimereket és/vagy egy protein vagy polipeptid több példányát tartalmaznak. Még előnyösebben, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein 40 kD-nál nagyobb, még előnyösen 50 kD-nál nagyobb molekulatömegű, legelőnyösebben 60-70 kD-os. Például, az egyik találmány szerinti, előnyös, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein (SEP-1-B51) monomer-molekulatömege kb. 73 kD. Mindazonáltal, az ennél sokkal nagyobb molekulatömegű konstrukciók szintén a találmány igényelt oltalmi körébe tartoznak.

A találmány egy következő megvalósítási módja értelmében olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tárunk fel, amely a protein ligálási helyén pszeudo-aminosavat és -adott esetben - a proteinhez kapcsolva vízben oldható polimert tartalmaz. E vegyületek - a ligálási helyen védőcsoport nélküli oldallánc funkciós csoportot tartalmazó - ligálási termék kialakításával állíthatók elő, oly módon, hogy egy (kemoszelektív, reaktív funkciós csoportot hordozó N-terminális aminosavat tartalmazó) első peptidet vagy polipeptid-szakaszt egy második - kémiai ligálással kompatibilis, C-terminális funkciós csoportot (pl. α -karboxi-tioésztert) tartalmazó - peptidhez vagy polipeptid-szakaszhoz ligálunk, és a ligálási helyen lévő, nem védett oldallánc funkciós csoportot pszeudo-aminosavvá alakítjuk (pl. a cisztein tiol-oldalláncának karboximetilálásával, ami pszeudo-glutamát aminosavat eredményez). A természetes kémiai ligálási helyeken lévő ciszteinek átalakításával létrehozott pszeudo-aminosavakat "pszeudonatív kémiai ligálásnak" nevezzük (részletes leírását ld. később).

A találmány szerinti megoldás értelmében feltárunk egy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint, amely - a ligálási helyén lévő aminosav oldalláncához kapcsolva - vízben oldható polimert tartalmaz. Ezek a vegyületek a ligálási helyen védőcsoport nélküli oldallánc funkciós csoportot tartalmazó ligálási termék kialakításával szintetizálhatók, oly módon, hogy egy (kemoszelektív, reaktív funkciós csoportot hordozó N-terminális aminosavat tartalmazó) első peptidet vagy polipeptid-szakaszt egy második - kémiai ligálással kompatibilis, C-terminális funkciós csoportot (pl. α -karboxi-tioésztert) tartalmazó - peptidhez vagy polipeptid-sza-

kaszhoz ligálunk, és a ligálási helyen lévő, védőcsoport nélküli oldallánc funkciós csoporthoz vízben oldható polimert kapcsolunk.

A találmány szerinti, pszeudo-aminosavas kémiai ligálási eljárás és a kémiai ligálási helyen végzett polimeres modifikációs eljárás a korábbi technikákhoz képes számos előnyt nyújt, így például, lehetővé teszi a erythropoiesis-stimuláló proteinek különböző - egyébként megfelelő ligálási helyek nélküli - típusainak nagy mennyiségben történő szintézisét; növeli azon helyek (és kapcsolási kémiaiak) számát, amelyeknél rutinszerű és költségtakarékos módon helyspecifikus polimer-modifikáció hajtható végre; és lehetővé teszi jelentős molekulatömegű, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek szintézisét. A szóban forgó eljárások különösen alkalmasak nagy átmenőtjeljesítményű analogizálásra (a kívánt biológiai tulajdonságok finomhangolásához), ideértve a vízben oldható polimerek kapcsolására alkalmas hely vagy helyek pásztázását.

Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek biológiai tulajdonságai a polimer kapcsolási helyeinek és kémiaiájának pontos megválasztásával módosíthatók - kombinálva a vízben oldható polimer molekulatömegének, polimer-összetételének, szerkezetének (pl. lineáris vagy elágazó vagy ezek kombinációja), és toldalékcsoportjának (pl. töltött vagy töltés nélküli vagy ezek kombinációja) pontos meghatározásával. Közelebbről, egy proteinhez kapcsolt, vízben oldható polimer - amellet, hogy a felezési időt meghosszabbítva növeli a protein molekulatömegét és elágazódásainak számát -, lehetővé teszi, hogy a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein (izoelektromos pont pontos töltésű legyen, ami az meghatározása alapján mérhető, amely hozzávetőleg megegyezik a megfelelő, biológiailag termelt protein (amely a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein aminosav-szekvenciájának alapjául szolgál) töltésével, amelynek előnye a megfelelő, riboszomálisan meghatározott protein természetes töltésének utánzása. Ilyenformán, a találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tárunk fel, amelyekre a fenti sajátságok kombináltan jellemzők, ideértve az e célra alkalmazott, vízben oldható polimereket, különösen a strukturálisan definiált polimer-adduktumokat, amelyek alkalmasak előre meghatározott pozíciókban történő kapcsolásra.

Közelebbről, a találmány szerinti előnyös, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek (SEP-k) előnyösen a humán vizeleteredetű EPO polimerrel modifikált, szintetikus analógjai. A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek - egy vagy több aminosavukhoz tioéter-, oxim-, amid- vagy egyéb kötésen keresztül kapcsolva - egy vagy több vízben oldható polimert tartalmaznak. Egy különösen elő-

nyös megvalósítási mód szerint az említett kötések egy vagy több olyan pozícióban találhatók, amelyek a humán vizeleteredetű EPO-ban természetes állapotban glikoziláltak (vagyis a 24., 38., 83. és 126. pozíciók). A találmány szerinti SEP-molekulák, legelőnyösebben, két vagy több ilyen pozícióban tartalmaznak polimert. Egy másik, alternatív megvalósítási mód értelmében a polimerek más aminosavakhoz lehetnek kapcsolva. A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek polimerrel modifikált pozíciói közé tartoznak azok az aminosav-pozíciók, amelyek a protein rendezetlen hurokjában, régiójában vagy doménjében - vagy potenciális proteázos hasítási helyen vagy annak közelében - helyezkednek el. Például, a polimerek az EPO 9., 69. és/vagy 125. pozíciói közül egy vagy több helyre kapcsolhatók. Ezenfelül, ha a természetes glikozilációs helyek közül egyet vagy többet polimer hozzákapcsolásával nem módosítunk, az adott régióban egy vagy több aminosavat - kívánt esetben -, például, lizinnel helyettesítünk (ha pozitív töltés kialakítása a cél) vagy aszparaginsavval vagy glutaminsavval helyettesítünk (ha negatív töltés kialakítása a cél). A találmány szerinti SEP-molekulák össz molekulatömege kb. 25 kD-tól kb. 150 kD-ig, még előnyösebben kb. 30 kD-tól kb. 80 kD-ig terjed. A molekulatömeg az adott analóg módosítására alkalmazott, vízben oldódó polimerek számának növelésével vagy csökkentésével, illetve szerkezetük módosításával szabályozható.

Például, az oximkötésű polimerrel módosított SEP-analógok oly módon állíthatók elő, hogy a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinhez - annak amino-oxi, keton vagy aldehid funkciós csoportot tartalmazó, nem természetes aminosaván - amino-oxi, keton vagy aldehid funkciós csoportot tartalmazó, vízben oldható polimert kapcsolunk. Például, a SEP-0 és SEP-1 89. és 117. pozíciójában pseudo-glutaminsavat tartalmaz, amely a glutaminsav $-CH\alpha-CH_2-CH_2-COOH$ képletű oldalláncától eltérő, $-CH\alpha-CH_2-S-COOH$ képletű oldalláncot hordozó, nem természetes aminosav. A tioéter-kötéseket tartalmazó SEP-analógok előnyösen tiol funkciós csoportot hordozó cisztein (vagy oldalláncában tiolcsoportot tartalmazó, nem természetes aminosav) alkalmazásával hozhatók létre. A 10. ábrán a találmány szerinti előnyös, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek egy típusának alapszerkezetét mutatjuk be.

A találmány egy alternatív megvalósítási módja értelmében, a találmány szerinti SEP-molekulák "cirkulárisan permutált" EPO-analógokat tartalmaznak, amelyekben az EPO természetes N- és C-terminálisa át van helyezve. Még előnyösebben, az áthelyezés eredményeként az N- és C-terminális kis strukturális kényszerítettségű pozíciókba kerül (pl. rendezetlen hurkokba, stb.). Az áthelyezés, például, a - természetes EPO aminosav-számozásának megfelelően - 125. és 126. pozíció körül elhelyezkedő, rendezetlen hurokba történhet. A szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek, legelőnyösebben, diszulfidmentesek, és kémiai úton úgy

vannak módosítva, hogy előre meghatározott aminosavakhoz kapcsolva polimer-komponenseket tartalmazzanak.

Más módon, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek N- és C-terminálisa természetes glikozilációs helyre - vagy egyéb, glikozilációra alkalmas helyekre (pl. a 126. és 125. pozíció) - van áthelyezve. A SEP-molekulák N- és C-terminálisa a molekula töltésének semlegesítése vagy megváltoztatása céljából beiktatott módosításokat (pl. karboxi-amidálás, stb.) is tartalmazhat. A cirkulárisan permutált molekulák egy előnyös példájában az új N- és C-terminális a 126., illetve 125. pozícióba van áthelyezve. A 7., 29., 33. és 161. pozíciókban elhelyezkedő, természetes, diszulfidképző ciszteinek előnyösen a nem természetes L- α -N-vajsavval (Aba) vannak helyettesítve, amely nem képes diszulfidkötés kialakítására. Az R166, E37 és V82 aminosavak - a termelés javítása céljából - előnyösen alaninnal vannak helyettesítve. A natív EPO számozása szerinti 1. és 166. pozíciók közé előnyösen további ciszteint inszertálhatunk, melyen pozícióját 0-val jelöljük. Az így kapott molekula - N-terminálistól C-terminális irányban - a 126., 0., 38. és 83. pozícióban négy ciszteint tartalmaz, melyek (1) ligálási helyként, illetve (2) tioéter-képző pPEG-kapcsolási helyként alkalmazhatók. Adott esetben az A125 aminosavat is ciszteinnel helyettesíthetjük, létrehozva ezáltal egy újabb pPEG-kapcsolási helyet.

A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek össz molekulatömege kb. 25 kD-tól kb. 150 kD-ig, még előnyösebben kb. 30 kD-tól kb. 80 kD-ig terjed. A molekulatömeg az adott analóg módosítására alkalmazott polimer (pl. pPEG) számának növelésével vagy csökkentésével, illetve szerkezetének megváltoztatásával szabályozható. A nagyobb konstrukciók esetében a pPEG-közvetítette hidrodinamikai molekulatömeg 100 kD-nál nagyobb. Az opcionális pPEG-kapcsolási helyek (N→C-terminális irányban) a 125., 9. és 24. pozícióban helyezkednek el. Egyéb SEP-analóg-típusok a rendezetlen hurokrégióban tartalmaznak alternatív N- és C-terminálist és/vagy N- és/vagy C-terminálisukról aminosavak vannak lehasítva. A találmány szerinti előnyös, cirkulárisan permutált molekulák alapszerkezetét a 11. ábrán mutatjuk be. A találmány szerinti előnyös, vízben oldható polimer - és különböző lineáris és elágazó konstrukciók - szerkezetét a 12. ábrán szemléltetjük.

A kísérleti példákban ismertetett specifikus SEP-konstrukciók mellett, a humán EPO natív szekvenciájának következők szerint végzett cirkuláris permutációjával terveztünk egy szekvenciát. A természetes N-terminális aminosavat (Ala1) és C-terminális aminosavat (Arg166) egy újabb cisztein beiktatásával összekapcsoltuk, miáltal 167 aminosavas polipeptidet hoztunk létre. E polipeptid új N- és C-terminálisának kialakítása érdekében a láncot a natív

szekvencia 125. és 126. aminosava között hasítottuk; az összes natív ciszteint L- α -amino-n-vajsavval helyettesítettük; és a következő szubsztitúciókat hajtottuk végre: Glu37Ala, Asn38Cys, Val82Ala, Asn83Cys, Ser126Cys és Arg166Ala (valamennyi aminosav-számozást a humán EPO natív szekvenciája alapján adtuk meg). Ezek a módosított elemek együttesen a SEP-5 aminosav-szekvenciáját eredményezik. A SEP-5-L28-proteint a (humán EPO-szekvencia számozása alapján) 126., 0., 24., 38. és 83. pozícióban - maleimiddel módosított lineáris (TTD-Succ)₆ karboxilátpolimer-konstrukció - Michael-addíciós reakcióval végzett kapcsolásával módosítottuk. E módosításokat úgy terveztük meg, hogy javítsák a SEP-5-L28-protein szintézisét és kezelhetőségét. A megtervezett szekvenciát négy peptidszegmensből állítottuk elő, melyek mindegyike N-terminális ciszteint tartalmazott. A kémiai ligálási helyek a következők voltak: Cys0, Cys38 és Cys83. Peptideket szintetizáltunk: a C-terminális peptid α -karboxilát volt, a többi három α -tioészter, így az N-terminális ciszteinek oldalláncát Acm-csoporttal védtük. a 24. pozícióban lévő cisztein oldalláncát nem védtük. A peptidszegmenseket - a két C-terminális szakasszal kezdve - natív kémiai ligálással lépésenként egymáshoz csatlakoztattuk, majd a ligálás után a ligálási helyen lévő cisztein szabad oldalláncát maleimiddel módosított lineáris (TTD-Succ)₆ karboxilátpolimer-konstrukcióval reagáltattuk (Michael-addíciós reakció alkalmazásával), és a cisztein-oldalláncot védő Acm-csoportot eltávolítottuk. A következő peptidszegmens ligálását és a polimer hozzákapcsolását hasonló módon hajtottuk végre. Az Acm-csoport eltávolítása után a következő (negyedik) peptidszegmenst ligáltuk, és az utolsó Acm-csoport eltávolítását és a polimeres modifikációt az előzőkhöz hasonló módon elvégezve a cirkulárisan permutált, polimerrel modifikált SEP-konstrukciót kaptuk (ld. 30. ábra).

II) A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein előállítás

Bár a polimerrel modifikált, erythropoiesis-stimuláló proteineket korábban már leírták, a találmány szerinti megoldás jelentősen eltér a korábbi megoldásoktól. Például, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek - részben vagy egészben - kémiai úton vannak szintetizálva. Ezenfelül, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek - egy vagy több, felhasználó által kiválasztott és meghatározott helyen - vízben oldható polimerekkel vannak módosítva.

Ezen túlmenően, a találmány szerinti erythropoiesis-stimuláló proteinek szintézises előállítási módja révén biztosítható, hogy a szóban forgó módosítások egy adott készítményben lévő összes molekula felhasználó által kiválasztott és meghatározott helyének mindegyikén megtalálhatók legyenek. A szintézis egységessége és szabályozottsága a találmány szerinti

megoldást élesen megkülönbözteti a korábban leírt eljárásokkal végzett véletlenszerű módosításoktól. A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein megtervezését, amelyben bármely nem kulcsfontosságú aminosav derivatizálható oly módon, hogy polimer-adduktumot tartalmazzon. Ezen túlmenően, az ilyen felhasználó által kiválasztott és meghatározott helyek mindegyikén a felhasználó meghatározhatja a pontos kötést (amid-, tioészter-, tioéter-, oxim-, és hasonló kötések), amelyen keresztül az adduktumok a polipeptid vagy protein molekulagerincéhez kapcsolhatók. Az egy adott helyen kívánt polimer-adduktumok szintén variálhatók és kontrollálhatók, miáltal a végeredményként kapott készítményben minden egyes protein vagy polipeptid pontosan azonos derivatizált helyen pontosan ugyanazt a derivatizált adduktumot tartalmazza. Ilyenformán, a találmány szerinti megoldás polimerrel modifikált erythropoiesis-stimuláló polipeptidek és proteinek homogén készítményeinek előállítását teszi lehetővé.

A találmány szerinti megoldás - azon túlmenően, hogy lehetőséget biztosít a vízben oldható polimer kapcsolódási helyei pozíciójának és számának variálására - lehetővé teszi a megkötött polimer természetének megváltoztatását is. Az adott, felhasználó által kiválasztott és meghatározott helyre beépíthető polimer-adduktumok tetszőlegesen meghatározott hosszúságúak lehetnek. Hasonlóan, a találmány szerinti eljárások lehetőséget biztosítanak arra, hogy a különböző helyeken különböző hosszúságú polimereket alkalmazzunk. Ilyenformán, a találmány egyik megvalósítási módja értelmében a polimerrel modifikált szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek a vízben oldható polimer-adduktummal egyszeresen vagy többszörösen modifikáltak lehetnek. Ha egy bizonyos polipeptidbe vagy proteinbe egynél több polimer-adduktumot építünk be, az alkalmazott polimerek "mono-specifikáltak", "poli-specifikáltak", "egységesen specifikáltak" vagy "eltérően specifikáltak" lehetnek. Ahogy itt használjuk, a "mono-specifikált" kifejezés olyan polipeptidre vagy proteinre vonatkozik, amely egyféle polimerrel van módosítva. Ezzel szemben, a "poli-specifikált" kifejezésen olyan polipeptidet vagy proteint értünk, amely többféle polimerrel van módosítva. Az ilyen poli-specifikált polipeptidek vagy proteinek "egységesen specifikáltak", ha a polipeptid vagy protein minden egyes módosított helyén ugyanazon, egyféle polimer van jelen, míg a poli-specifikált polipeptidek vagy proteinek akkor "eltérően specifikáltak", ha a polipeptid vagy protein módosított helyei különböző polimerekkel vannak módosítva.

Ezen túlmenően, lehetőség van arra is, hogy a felhasználó által kiválasztott és meghatározott helyek mindegyikén változtassuk a polimer-adduktumok linearitásának és elágazódásának mértékét. Ennek megfelelően, a polimer-adduktumok lineárisak, elágazók vagy egysé-

gesen elágazók lehetnek. Az "egységesen elágazó" kifejezésen azt értjük, hogy egy adott helyen a polimer valamennyi elágazása azonos szerkezetű és hosszúságú. A találmány szerinti eljárásokkal - várakozásaink szerint - az egyes elágazások hosszúsága, illetve az adott elágazási ponton a polimer szerkezete egyaránt változtatható.

- 5 Összefoglalva: a találmány szerinti megoldás lehetőséget nyújt a polipeptid vagy protein molekulavázában a felhasználó által kiválasztott és meghatározott, polimerrel módosított helyek (1) elhelyezkedésének és (2) gyakoriságának definiálására; valamint az ilyen helyeken az elágazódások (3) hosszúságának, (4) fajtájának és (5) mértékének szabályozására. Ezen túlmenően, a több polimerrel módosított polipeptidek és proteinek esetében a találmány szerinti
- 10 megoldás lehetőséget nyújt az egyes helyeken a fenti öt változó egymástól független meghatározására. Sőt, az elágazó polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló polipeptid
- 15 dek és proteinek esetén, a találmány szerinti megoldás lehetővé teszi, hogy a fenti öt változó minden egyes elágazódási pontra külön-külön legyen meghatározható. Ez a precíziós, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek (amelyek a 20 genetikailag kódolt aminosav-oldallánc bármelyikének több példányát tartalmazzák, melyeket nem gátolják a nem kívánatos polimer-kapcsolások) homogén készítményeinek szintézisét teszi lehetővé.

- Ilyenformán, a találmány szerinti megoldás jelentős rugalmasságot biztosít a polimerrel modifikált szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tervezésében, szintézisében és alkalmazásában. Például, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek aminosav-szekvenciája - az alapjául szolgáló, genetikailag kódolt protein aminosav-szekvenciájához viszonyítva - egy vagy több aminosavat érintő deléciót, inszerciót vagy szubsztitúciót hordozhat. Az aminosav-szekvencia egy vagy több szabálytalan aminosavval (pl. pszeudo-aminosavval) és/vagy egyéb, nem természetes oldalláncot (például, amely úgy van módosítva, hogy vízben oldható polimer-adduktum hozzákapcsolására alkalmas egyedi kemoszelektív funkció
- 20 csoportot tartalmazzon) hordozó aminosavval lehet szubsztituálva. Ennek megfelelően, a vízben oldható polimer szabálytalan aminosavon vagy genetikailag kódolt aminosavon keresztül kapcsolható a proteinhez. A vízben oldható polimer lineáris vagy elágazó lehet, és kémiai gyököt (pl. karboxil-, alifás, amid- vagy amingyököt) hordozó terminális csoportot tartalmazhat. Ezen túlmenően, a vízben oldható polimer monodiszperz lehet, vagyis úgy állítható elő, hogy
- 25 pontosan definiált szerkezetű és összetételű, egyféle molekulatípus legyen. Ilyenformán, a vízben oldható polimer úgy tervezhető meg, hogy a vele módosított célprotein felezési idejének, immunogenitásának, hatékonyságának, tárolhatóságának, adagolásának, szállíthatóságának és hasonló tulajdonságainak pontos beállítását szolgáló eszközöket hordozzon.
- 30

A találmány szerinti, proteinnel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek találmány szerinti előállítási eljárása a következő lépésekből áll: tervezés, peptidszintézis, peptidligálás, a teljes hosszúságú ligálási termék megfelelő összehajtogatása ("folding"), létrehozva ezáltal a proteint, és a protein biológiai aktivitásának értékelése. Azt találtuk, hogy a polimerrel végzett módosítás a peptidszintetizálási vagy peptidligálási lépésben, vagy a már összehajtogatott terméken hajtható végre. Mindazonáltal, a polimer előnyösen a peptidekhez vagy a ligálási termékhez (a "folding" előtt) kapcsolhatjuk. Az így előállított, kívánt biológiai aktivitást mutató proteinek kisselektálhatók, s ezek a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteineket reprezentálják.

Az egyik előnyös eljárás szerint egy szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint tartalmazó polipeptid-láncot a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmensek kémiai módszerrel végzett ligálásával állítjuk elő. Közelebbről, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinmolekulák a kérdéses szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinmolekula polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmensek egymáshoz ligálásával állíthatók elő, mely peptidszegmensek közül egy vagy több - felhasználó által meghatározott és előre kiválasztott helyen hozzákapcsolt - vízben oldható polimert tartalmaz. A polimerrel modifikált peptidlánc megfelelő összehajtogatását követően a találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinhez jutunk.

A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein előállításának egy másik előnyös eljárása szerint egy találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmenseket kémiai módszerrel egymáshoz ligálunk, és egy vagy több vízben oldható polimert egy vagy több kémiai ligálási helyen aminosav-oldallánchoz kapcsolunk, majd a polimerrel módosított polipeptid-láncot összehajtogatásával a találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint kapjuk.

A szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek, kevésbé előnyös módon, a következők szerint is előállíthatók: (1) egy szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmenseket kémiai módszerrel egymáshoz ligálunk, miáltal a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek megfelelő, teljes hosszúságú polipeptid-láncot kapjuk, amelyben legalább egy peptidszegmens egy első kemo-szelektív funkciós csoportot hordozó szabálytalan aminosavat tartalmaz; (2) a polipeptidláncot megfelelő módon összehajtogatjuk ("folding"); és (3) olyan vízben oldható polimert kapcsol-

lunk hozzá, amely - az első kemoszelektív csoporttal kölcsönösen reaktív - egyedi kemoszelektív csoportot tartalmaz.

A találmány különféle megvalósítási módjait reprezentáló különféle eljárásokat, melyeket a példákban is ismertetünk, az ábrákon a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinekre általánosan szemléltetjük. Például, az 1/A-1/E ábrákon olyan ligálási sémákat mutatunk be, amelyek - a ligálást megelőzően, a ligálást követően vagy ezek kombinációjával - egy vízben oldható polimer (U-B-Polimer-J*, meghatározását ld. fentebb) részlegesen vagy teljesen védőcsoport nélküli peptidszegmensekhez (az ábrákon hullámos vonal) történő kapcsolását foglalják magukban. Az 1/A-1/D ábrákon Yaa jelentése: az első peptidszegmens C-terminális aminosava, amely egyedi kemoszelektív gyököt (pl. α -karboxil-tioésztert) tartalmaz, és alkalmas egy második - egyedi és kölcsönösen reaktív N-terminális "Xaa" aminosavat (pl. N-terminális ciszteint) hordozó - peptidszegmenshez történő ligálásra, mely "Xaa" aminosav az "Yaa" aminosavval kemoszelektív kémiai ligálásra képes. Az Yaa és Xaa közötti kemoszelektív reakció a két aminosav között kovalens kötés (pl. amidkötés) kialakulását eredményezi. Ilyenformán, az Yaa és Xaa kemoszelektív ligálási párt képez. Az ábrákon "U_n-" jelentése egy második egyedi kemoszelektív molekularész, amely egy aminosav oldalláncának felhasználó által pontosan meghatározott helyéhez van kapcsolva, és kemoszelektív és kölcsönösen reaktív az U-B-Polimer-J* általános képletű, vízben oldható polimer "U-" csoportjával. Például, ha U_n jelentése: ketoncsoporttal módosított oldallánc, úgy az U-Polimer-J* általános képletű, vízben oldható polimer "U-" csoportja a ketonnal kemoszelektíven reagáló csoport, pl. amino-oxicsoport, amely oximkötés kialakítására képes. Az "U_n-" "n" indexe azon aminosavak és oldalláncaik számát jelzi, amelyekhez az "U" kemoszelektív csoport kapcsolását terveztük. Például, ha két specifikus és felhasználó által meghatározott helyet kívánunk polimerrel módosítani, n = 2, ami a következőképpen is leírható: U₂ vagy U_{n=2}. Valamennyi esetben "n" értéke: pozitív egész szám, amely tervezéssel pontosan kontrollálható. Ilyenformán, "U_n" és "U" egy második kemoszelektív ligálási párt reprezentál, amely az Xaa és Yaa kemoszelektív csoportjaival kompatibilis, illetve azokkal nem reaktív. Az 1/A és 1/B ábrán két különböző lehetséges reakció folyamatábráját mutatjuk be. Az első reakcióban egy "U_n" funkciós csoportot hordozó polipeptidláncot egy második polipeptidhez ligálunk, majd a ligálási terméket U-B-Polimer-J* molekulával reagáltatva polimerrel modifikált polipeptidet kapunk. A második reakcióban az "U_n" funkciós csoportot hordozó polipeptidláncot az U-B-Polimer-J* molekulával reagáltatjuk, s az így kapott, polimerrel módosított polipeptidet egy második polipeptidhez ligáljuk, ami egy na-

gyobb méretű, polimerrel modifikált polipeptidet eredményez. Az 1/A és 1/B ábra annyiban különbözik egymástól, hogy míg az 1/A ábrán bemutatott reakció során az Xaa aminosavat hordozó polipeptidet módosítjuk a polimerrel, az 1/B ábrán látható reakcióban a polimert az Yaa aminosavat tartalmazó polipeptidhez kapcsoljuk. Az 1/C ábrán a találmány szerinti megoldás azon sajátosságát szemléltetjük, hogy több polipeptid-lánc módosítására is alkalmas, akár a nagyobb polipeptiddé történő ligálásuk előtt, akár azt követően. Az 1/D ábrán "PG" és "PG'" jelentése: védőcsoport, mely "PG'" védőcsoport ortogonális védőcsoport, vagyis PG és PG' eltérő feltételek mellett hasítható le, így ezek olyan esetekben alkalmasak, ha az U_n -csoportokhoz azonos kapcsolási kémiával különböző vízdékony polimereket kapcsolunk, vagy ha az U_n -csoportok olyan oldallánc funkciós csoportokat reprezentálnak, amelyeket nem kívánunk polimerrel módosítani (pl. a reaktív $-NH_2$ vagy $-SH$ csoportokat hordozó oldallán-

5

10

15

cok, ahol a vízben oldható polimer U-csoportja úgy van megtervezve, hogy kizárólag primer aminocsoporttal vagy oldallánc tiolokkal reagáljon). Az 1/D ábrán azt szemléltetjük, hogy a találmány szerinti eljárásokkal ligálandó polipeptidek kívánt oldalláncainak védelére védőcsoportok alkalmazhatók.

Az 1/E ábrán az 1/A-1/D ábrákon bemutatott ligálási és polimerrel végzett modifikálási lépésekben alkalmazott peptidszegmensekben potenciálisan jelenlévő vagy hiányzó, különféle csoportokat mutatjuk be.

A 2/A-2/C ábrákon a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek előállítási eljárásainak további sémáit mutatjuk be. Közelebbről; a 2/A és 2/B ábrán a vízben oldható U-B-Polimer-J* polimer N-terminális Xaa csoporthoz - ligálási helyen (pl. cisztein tiol-oldalláncánál) - történő kapcsolását magában foglaló ligálási sémát mutatunk be. A 2/C ábrán a 2/A és 2/B ábrákon bemutatott ligálási és polimerrel végzett modifikálási lépésekben alkalmazott peptidszegmensekben potenciálisan jelenlévő vagy hiányzó, különféle csoportokat mutatjuk be.

20

25

A 3/A és 3/B ábrán a három vagy több, nem átfedő peptidszegmens kémiai ligálását (ahol legalább egy peptidszegmens a végső, teljes hosszúságú ligálási terméknek megfelelő középső szakasz) magában foglaló eljárások végrehajtási sémáinak folyamatábráit mutatjuk be. Az e módon előállított peptidek egy másik ligálási reakcióban (pl. az 1/A-1/E, 2/A-2/C és 4/A-4/C ábrákon bemutatott reakcióban) felhasználható peptidszegmensek előállítására alkalmazhatók. A több szakaszos ligálások során, általában, a középső szakasz(ok) védett Xaa-csoportot vagy védett Yaa-csoportot tartalmaznak, hogy elkerüljük a peptid gyűrűvé záródását vagy konkatamer-képződését (az alkalmazott ligálási kémiától függően). A több lépéses vagy

30

sorozatos ligálások esetében egy középső szakasz Xaa-csoportját védőcsoporttal látjuk el [pl. Cys(Acm)], míg a Yaa-csoportot védőcsoport nélkül hagyjuk (pl. Yaa-COSR, hogy -COSR jelentése: alfa-karboxil-tioészter). Ilyen esetben az Yaa-csoport szabadon reagálhat egy második - szintén védőcsoport nélküli Xaa-csoportot tartalmazó - peptiddel, mely második peptid nem tartalmaz szabad Yaa-csoportot. A ligálást követően a védőcsoportot - az Xaa-csoport következő ligálási reakcióhoz történő regenerálása céljából - eltávolítjuk. Ezt a folyamatot, kívánt esetben, hosszabb polipeptidlánc létrehozása céljából folytathatjuk. Az Yaa-csoport védel-
se különösen hasznos a - négy vagy több szakaszból álló végső ligálási termékek előállítását eredményező - konvergens kémiai ligálás céljaira. Például, egy négy peptidszegmens ligálásából
10 (azaz három ligálási reakcióból) álló folyamat eredményeként létrehozott célprotein esetében, a protein egyik végének megfelelő két szakaszt és a protein másik végének megfelelő két szakaszt párhuzamosan ligáljuk egymáshoz (szemben a lépésenkénti ligálással), és a két véget egy utolsó ligálási reakcióval kapcsoljuk össze. Az ilyen konvergens kémiai ligálási sémákban szintén alkalmazhatók ortogonális ligálási kémiai. Még egyszer: a peptidszegmensekben po-
15 tenciálisan jelen lévő vagy hiányzó csoportok különféleségét az 1/E, 2/C és 4/C ábrán szemléltetjük.

A 4/A-4/C ábrákon azt mutatjuk be, hogy a találmány szerinti megoldás értelmében milyen módon hajtható végre a natív kémiai ligálás és a kapott tiol-oldallánc kémiai módosítása. Közelebbről, a 4/A-4/B ábrákon a natív kémiai ligálást és a ligálási hely(ek)en a kapott
20 cisztein tiol-oldalláncának tioalkilezéssel - és tioéter-kötést tartalmazó, kémiailag módosított oldallánc (az ábrán "Ψ") létrehozásával - végzett, pszeudo-aminosavat (az ábrán "ΨXaa") eredményező kémia módosítását szemléltetjük. Egy másik, ábrával nem szemléltetett megvalósítási mód értelmében a tiol-oldallánc deszulfurizációs reakcióval alaninná alakítható [ld. Liang és mtsai.: J. Amer. Chem. Soc. 123(4), 526 (2001)]. Mindkét reakció lényeges jellemzője,
25 hogy az átalakítani vagy módosítani nem kívánt többi tiol-oldalláncot megfelelő védőcsoporttal (PG) vagy - több peptidszegmensű ligálás céljára - ortogonális védőcsoporttal (PG') védhető, ahol a C-terminális Yaa-csoportot tartalmazó peptidszegmens védett N-terminális Xaa-csoportot hordoz, azaz PG-Xaa-peptid, amely, például, a 4/B ábrán bemutatott módon állítható elő. A 4/C ábrán - a 4/A és 4/B ábrán, illetve az 1/A-1/E, 2/A-2/C és 3/A-3/B ábrákon
30 bemutatott ligálási és polimeres modifikálási reakciókban alkalmazott - peptidszegmensekben potenciálisan jelen lévő vagy hiányzó csoportok különféleségét mutatjuk be.

A tervezéssel összhangban megkonstruáljuk a polipeptid-gerinc szintetizálására alkalmazandó peptideket vagy polipeptid-szegmenseket. Ez magában foglalja a megfelelő ligálási

helyek kiválasztását, amit a polipeptid-gerinc összeállítására kiválasztott ligálási reakció, az adott célproteinre kiválasztott polimerkapcsolási reakció és a polimer kapcsolási helyei alapján hajtunk végre. Natív kémiai ligálás alkalmazása esetén a cisztein ligálási helyeket a célpolipeptid-gerinc aminosav-szekvenciájának megfelelő, természetes ciszteinek azonosítása céljából végzett letapogatásával határozzuk meg. A találmány leírásában ismertetett, bővített natív kémiai ligálás alkalmazása esetén a ligálási helyek a célpolipeptid-gerinc aminosav-szekvenciájának megfelelő, természetben előforduló - hatékony ligálást lehetővé tevő - ligálási hely junkciók (pl. Xaa-Gly helyek) azonosítása céljából végzett pásztázásával szelektálhatók. Mivel a bővített natív kémiai ligálás nem korlátozódik a ciszteineknél végzett ligálásra, számos aminosav funkcionálhat ligálási hely junkcióként. Bizonyos esetekben a natív kémiai ligálást és a bővített natív kémiai ligálást kombinálva alkalmazzuk.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a teljes hosszúságú polipeptid-lánc részének vagy egészének létrehozására a natív kémiai ligálást alkalmazzuk. Kémiai ligálási helyként a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein alapjául szolgáló, természetben előforduló proteinben jelen lévő ciszteinek alkalmazhatók, azonban, ha egy előnyös ligálási junkció nem tartalmaz alkalmas ciszteint, az adott pozícióban lévő, ciszteintől eltérő aminosav ciszteinnel helyettesíthető, hogy az adott helyen lehetővé tegyünk a natív kémiai ligálást. Kívánt esetben a behelyettesített cisztein az adott pozícióban lévő eredeti aminosavnak megfelelő pszeudo-aminosavvá alakítható át. Más módon, ha a polimer tervezett kapcsolási helyére ciszteint építünk be, a tiol-oldallánc tiol-reaktív vízdoldékony polimer-konstrukció kapcsolására használható fel, feltéve, hogy a célpolipeptidben lévő összes többi - változatlan állapotban megtartani kívánt - cisztein védőcsoporttal van ellátva.

A találmány egy további előnyös megvalósítási módja értelmében a teljes hosszúságú polipeptid-lánc egy részének vagy egészének előállítására a bővített natív kémiai ligálást alkalmazzuk. Erre a célra N-terminális, N α -szubsztituált, két vagy három szénatomos alkil- vagy aril-tiol aminosavak alkalmazhatók. Az ilyen aminosavak (ha a ligálásra használt peptid vagy polipeptid N-terminálisán vannak jelen) előnyösen alkalmazhatók a polipeptid másik - C-terminálisán α -karboxi-tioésztert tartalmazó - polipeptidhez (bővített natív kémiai ligálási eljárásokkal) történő ligálására.

A peptidek szintézisére rendszerint - automata peptidszintetizáló berendezésen vagy manuálisan végzett - standard, szakaszos, szilárd fázisú Boc- és/vagy Fmoc-peptidszintézist alkalmazunk ["Synthetic Peptides, A User's Guide", szerkesztő: G.A. Grant, W.H. Freeman &

Company, New York, N.Y. (1992); "Principles of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztő: M. Bodanszky, Springer-Verlag (1993); "The Practice of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztők: M. Bodanszky és A. Bodanszky, Springer-Verlag (1994); "Protecting Groups", szerkesztő: P.J. Kocienski: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Németország (1994); "Fmoc Solid
5 Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach", szerkesztők: W.C. Chan és P.D. White, Oxford University Press (2000)]. A tioészter-közvetítette ligálásra (pl. natív kémiai ligálásra) alkalmazott peptidok standard eljárások alkalmazásával is előállíthatók [ld. pl. Dawson és mtsai.: Science 266, 776 (1994); Canne és mtsai.: Tetrahedron Lett. 36, 1217 (1995); WO 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); Ingenito és mtsai.: JACS 121(49), 11369 (1999); Hackeng és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10068 (1999); Amiato és mtsai., ld. fentebb].
10

A peptidszintézis során a ligálásra és a vízben oldható polimer helyspecifikus kapcsolására kémiai ortogonális stratégiákat alkalmazunk (ld. az 1-4. ábrákat és a példákat), miáltal kiküszöbölhetők a nem kívánt kapcsolódást eredményező mellékreakciók. Például, a ligálási tí-
15 pustól és a polimer kapcsolásának módjától függően, különféle ortogonális szintetizálási technikák alkalmazhatók, melyek során a peptidhez kapcsolni kívánt, vízben oldható polimer természetét és - még inkább - a polipeptidhez történő kapcsolásra alkalmazni kívánt funkciós csoportot kell figyelembe venni (ahogy azt a későbbiekben a találmány szerinti előnyös gliko-
utánzó polimerek esetében ismertetjük).

20 A vízben oldható polimert úgy állítjuk elő, hogy tartalmazzon egy egyedi funkciós csoportot (U), amely szelektíven képes reagálni a ligálásra alkalmazott célpeptid, a teljes hosszúságú peptid vagy akár az összehajtogatott polipeptid egyedi funkciós csoportjával. Mivel kémiai szintézist alkalmazunk, a peptidet úgy állítjuk elő, hogy pontos, felhasználó által meghatározott helyen kölcsönösen reaktív kemoszelektív csoportot tartalmazzon. A találmány
25 e megvalósítási módjában a peptidszintézis (védőcsoport-stratégiák) és a kémiai ligálás (részleges védettség vagy védőcsoport nélküli stratégiák) alapelveit alkalmazzuk. A védőcsoport-stratégia értelmében az összes potenciálisan reaktív funkcióscsoportot - a vízzeloldékony polimer kapcsoláshoz alkalmazni kívánt funkciós csoportja és a célmolekula kölcsönösen reaktív funkciós csoportja kivételével - megfelelő védőcsoporttal blokkoljuk. Erre a célra számos védőcso-
30 port alkalmas és ismert [ld. pl. "Protecting Groups in Organic Synthesis", 3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene és P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999); NovaBiochem 2000-es katalógus; "Synthetic Peptides, A User's Guide", szerkesztő: G.A. Grant, W.H. Freeman & Company, New York, N.Y. (1992); "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid

Phase Organic Chemistry", szerkesztők: W.D. Bennet, J. W. Christensen, L.K. Hamaker, M.L. Peterson, M.R. Rhodes és H.H. Saneii, Advanced Chemtech (1998); "Principles of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztő: M. Bodanszky, Springer-Verlag (1993); "The Practice of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztők: M. Bodanszky és A. Bodanszky, Springer-Verlag (1994); "Protecting Groups", szerkesztő: P.J. Kocienski: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Németország (1994)].

Ilyenformán, a vízben oldható polimer úgy állítható elő, hogy sokféle funkciós csoportot (pl. a fentebb leírtakat) tartalmazzon. A részleges védettségű és védőcsoport nélküli stratégia alkalmazásakor a polimer funkciós csoportja és a célpeptiden vagy -polipeptiden lévő, kölcsönösen reaktív funkciós csoport kemoselektív reakciópárt alkot, ami azt jelenti, hogy a reakciórendszerben jelen lehetnek más funkciós csoportok is, azonban azok az említett, egymással kölcsönösen reaktív funkciós csoportokkal nem lépnek reakcióba. Ezek közé tartoznak az aminbefogási stratégiákra fogékony csoportok (pl. hemiamin-képzéssel, iminképzéssel vagy Michael-féle addícióval végzett ligálás), a tiolbefogási stratégiákra fogékony csoportok (pl. ligálás tioészter-cserével, cisztein vagy tioltartalmú oldallánc aminosav-származék bevonásával) és ortogonális ligálási kapcsolási stratégiákra fogékony csoportok [pl. ligálás tiazolidin-képzéssel, tioésztercserével, tioészter-képzéssel, diszulfidcserével és amidképzéssel; ld. Coltart: Tetrahedron 56, 3449 (2000)].

A találmány e megvalósítási módja szempontjából előnyös kemoselektív U-csoport olyan egyedi funkciós csoportot tartalmazhat, amely vizes közeggel kompatibilis ligálási reakcióban, pl. natív kémiai ligálási reakcióban [Dawson és mtsai.: Science 266, 776 (1994); WO 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.)]; bővített általános kémiai ligálásban [WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.)]; oximképző kémiai ligálásban [Rose és mtsai.: J. Amer. Chem. Soc. 116, 30 (1994)]; tioészterképző ligálásban [Schnölzer és mtsai.: Science 256, 221 (1992); tioéterképző ligálásban [Englebrechtsen és mtsai.: Tet. Letts. 36(48), 8871 (1995); hidrazonképző ligálásban [Gaertner és mtsai.: Bioconj. Chem. 5(4), 333 (1994)]; tiazolidin-képző ligálásban és oxazolidin-képző ligálásban [Zhang és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. 95(16), 9184 (1998); WO 95/00846 számú nemzetközi közzétételi irat (Tam és mtsai.)] vagy egyéb eljárásokban alkalmazhatók [ld. pl. Yan, L.Z. és Dawson, P.E.: "Synthesis of Peptides and Proteins without Cysteine Residues by Native Chemical Ligation Combined with Desulfurization", J. AM. Chem. Soc. 123, 526 (2001), melyet a kitanítás részének tekintünk; Gieselmann és mtsai.: Org. Lett. 3(9), 1331 (2001); Saxon és mtsai.: "Traceless" Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds.

Org. Lett. 2, 2141 (2000)].

A vízben oldható polimer és egy célpeptid vagy célpoli-peptid között a fent említett különféle kapcsolási reakciókkal kialakított kötés karbonát-, észter-, uretán-, ortoészter-, amid-, amin-, oxim-, imid-, karbamid-, tiokarbamid-, tioéter-, tiouretán-, tioészter-, éter-,
5 tiazolidin-, hidrazon-, oxazolidinkötés és hasonló lehet. Legelőnyösebb az oxim- és amidkötés.

A peptidligálási lépés során (ld. pl. az 1-4. ábrákat) szilárd vagy oldat fázisú ligálási stratégiákat alkalmazhatunk. A 8. ábrán a vízben oldható polimer peptidszegmenshez történő precíziós kapcsolásának egy alternatív módját mutatjuk be, amely alkalmas a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek ligálására és előállítására.

Ezen eljárás első lépése egy szilárd fázisú peptidszintézis (SPPS, pl. Fmoc- vagy Boc-SPPS), melynek során a polimer kapcsolására kiválasztott aminosav-oldalláncot ortogonális védőcsoporttal védjük (például, Fmoc-SPPS-technika alkalmazása esetén a polimer kapcsolására kiválasztott hely védelére ortogonális védőcsoportként Boc-csoportot, Boc-SPPS-technika alkalmazása esetén pedig Fmoc-csoportot alkalmazhatunk). A peptidszintézist követően az ortogonális védőcsoportot szelektíven eltávolítjuk, miközben a peptid többi része védett marad - ez a következő lépésben végrehajtandó szilárd fázisú polimerszintézishez egyetlen szabad kapcsolási helyet biztosít. Az ortogonális védőcsoport eltávolítása után a polimerláncot prekuzorként kapcsoljuk a peptidhez. A polimerláncot, még előnyösebben, egymást követő polimer-szintetizálási lépésekkel, a 6/A-6/D ábrákon szemléltetett eljárással állítjuk elő. Bár csak
10 egyetlen polimerkapcsolási helyet tüntetünk fel, több is alkalmazható. A 9. ábrán egy általános reakcióvázlatot mutatunk be.

Ahogy fentebb említettük, a kémiai ligálás egy első kémiai komponens és egy második kémiai komponens közötti szelektív kovalens kötés kialakítását foglalja magában. A ligálási reakció kemoszelektivitásának biztosítása érdekében az első és második komponensen egyedi -
25 egymással kölcsönösen reaktív - funkciós csoportok alkalmazhatók. Például, a peptidek és polipeptidek kémiai ligálása egyedi, kompatibilis, egymással kölcsönösen reaktív C-terminális és N-terminális aminosavakat tartalmazó peptid- vagy polipeptid-szakaszok kemoszelektív reakciójával hajtható végre. Erre a célra számos különféle eljárást alkalmaztak, melyek jellemző példái a következők: natív kémiai ligálás [Dawson és mtsai.: Science 266, 776 (1994); WO
30 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.)]; oximképző kémiai ligálás [Rose és mtsai.: J. Amer. Chem. Soc. 116, 30 (1994)]; tioészterképző ligálás [Schnölzer és mtsai.: Science 256, 221 (1992)]; tioéterképző ligálás [Englebrechtsen és mtsai.: Tet. Letts. 36(48), 8871 (1995)]; hidrazonképző

ligálás [Gaertner és mtsai.: *Bioconj. Chem.* **5**(4), 333 (1994)]; tiazolidinképző ligálás és oxazolidinképző ligálás [Zhang és mtsai.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**(16), 9184 (1998); WO 95/00846 számú nemzetközi közzétételi irat (Tam és mtsai.); 5 589 256 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás]; szelenociszteín-közvetítette natív kémiai ligálás, [Gieselman és mtsai.: *Org. Lett.* **3**(9), 1331 (2001)]; és Staudinger-féle amidképző kémiai ligálás [Saxon és mtsai.: *Org. Lett.* **2**, 2141 (2000)]. Ilyenformán, belátható, hogy az erre a célra alkalmas, védőcsoport nélküli peptidszegmensek ligálására bármely kemoszelektív reakció alkalmazható.

Egy adott ligálási reakció feltételeit úgy választhatjuk meg, hogy fenntartsuk a ligálásra alkalmazni kívánt peptid- vagy polipeptid-szakaszok kívánt kölcsönhatását. Például, a ligálás optimalizálása céljából a következő feltételek változtathatók: a reakcióelegy pH-ja és hőmérséklete, a ligálási jelölő vízdékonysága, az első szakasz második szakaszhoz viszonyított aránya, valamint a reakcióelegy összetétele. Az egymáshoz ligálni kívánt szakaszok szolubilizálását biztosító reagensek alkalmazása vagy elhagyása szintén alkalmas a kívánt ligálási reakció specifikálásának és sebességének szabályozására, azaz, a reaktív csoportok hozzáférhetőségének és prezentálásának - peptid- vagy polipeptid-szakaszok oldékonyságának módosítása révén történő - szabályozására. A reakciófeltételek a kívánt kemoszelektív reakciótermék egy vagy több belső és/vagy külső kontrollhoz viszonyított kimutatásával egyszerűen meghatározhatók.

Amennyiben a ligálási reakció N-terminális ciszteint tartalmazó polipeptid ligálását foglalja magában, előnyösen a natív kémiai ligálást alkalmazzuk [ld. Dawson és mtsai.: *Science* **266**, 776 (1994); WO 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.)]. Ez a technika a natív amidkötés ligálási helyen történő kialakításának hatékony módszere. A natív kémiai ligálás egy - C-terminális α -karboxi-tioésztergyököt tartalmazó - első peptid vagy polipeptid és egy - N-terminális ciszteint tartalmazó - második peptid vagy polipeptid közötti szelektív reakción alapul. A tiolcserés reakció egy kiindulási, tioészter-kötött köztesterméket eredményez, amely spontán átrendeződve a ligálási helyen natív amidkötést hoz létre, miközben regenerálja a cisztein tiololdalláncát. A természetes protein aminosav-szekvenciája sok esetben megfelelően elhelyezett ciszteineket tartalmaz ahhoz, hogy N-terminális ciszteint tartalmazó polipeptid-fragmenseket szintetizálhassunk és alkalmazzunk a natív kémiai ligálási reakcióban. Más esetekben a peptidszintézist úgy kell végrehajtani, hogy a polipeptidbe ciszteineket építsünk be. Ilyenformán, a natív kémiai ligálás - standard formájában - egy célpolipeptid aminosav-szekvenciájában lévő cisztein tioészter-közvetítette kemoszelektív reakcióját foglalja magában. A ligálási helyen peptidkötés képződik, és a ciszteint oldallánca natív formájában regenerálódik.

Más módon, a találmány szerinti proteinek ún. "pszeudo-natív kémiai ligálással" vagy "bővített natív kémiai ligálással" szintetizálhatók. A pszeudo-natív kémiai ligálás során a proteinszintetizésre felhasznált peptidek előre kiválasztott pozícióiban nem természetes pszeudo-aminosavakat alkalmazunk (ld. pl. 4. ábra). Az ilyen pszeudo-aminosavak szerkezete egyrészt a cisztein szerkezetét, másrészt a szintetizálni kívánt protein előre kiválasztott pozícióiban természetes állapotban megtalálható aminosavak szerkezetét utánozza. Ennek megfelelően, a pszeudo-natív kémiai ligálás a natív ligálással létrehozott ligálási helyeknél képződött cisztein-oldalláncok tioalkilezésére irányul. A cisztein ligálási helyek tioalkilezésének előnyös aspektusát reprezentálja az eset, amikor legalább egy peptid olyan natív ciszteint tartalmaz, amelynek tiol-oldallánca megfelelő védőcsoporttal van védve.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében egy cisztein tiolgyökét egy kívánt oldallánccá alakítjuk (pl. egy riboszomálisan meghatározott aminosav, ilyen aminosav analógjának vagy egy nem riboszomálisan meghatározott aminosav oldallánccává). Ahogy itt használjuk, a "riboszomálisan meghatározott aminosav" kifejezésen olyan aminosavat értünk, amelyet a protein transzlációs folyamatában a riboszómák felismernek, és amely riboszomálisan létrehozott proteinbe építhető. A cisztein tiol-oldallancának kémiai módosítására vonatkozóan jelentős mennyiségű irodalmi adat áll rendelkezésre [ld. pl. "Current Protocols in Protein Science", szerkesztő: John E. Coligan és mtsai., John Wiley and Sons, New York (2000)]. E.T. Kaiser a cisztein-oldalláncok természetben előforduló aminosav-oldallánc kémiai tulajdonságainak utánzása céljából végzett átalakítását írta le [ld. pl. Kaiser és mtsai.: Science 226(4674), 505 (1984)]. Ezen túlmenően, a cisztein oldallancának peptid vagy protein jelölésére történő alkalmazását is leírták. A cisztein oldallánc-módosításainak áttekintését ld. "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", szerkesztő: S.S. Wong, CRC Press (1991); "Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures", szerkesztők: Glazer, A.N. és mtsai., Elsevier (1975); "Chemical Reagents for Protein Modification", R.L. Lundblad, CRC Press (1991)]. Tam és mtsai. [Biopolymers 46, 319 (1998)] a homocisztein (-CH₂-CH₂-SH) nem ciszteines natív kémiai ligálásra történő alkalmazását írták le, melyet a homocisztein oldallancának natív metionin-oldallánccá (-CH₂-CH₂-S-CH₃) történő átalakítása céljából metil-p-nitrobenzolszulfonát (metilezőszer) alkalmazásával végzett tioalkilezés követ. A találmány szerinti eljárás homociszteinek pszeudo-aminosavakká történő átalakítására is alkalmazható, azonban a találmány szerinti megoldás értelmében - hasonlóan a ciszteinek itt leírt átalakításához -, a legalább egy (átalakítani nem kívánt) natív ciszteint tartalmazó peptidek diszulfid-párosításában szerepet játszó natív ciszteinek lebontásának

elkerülése érdekében védőcsoportok alkalmazására van szükség. Az e célra alkalmas védőcsoportokat a későbbiekben ismertetjük.

Miközben a pseudo-natív kémiai ligálási eljárás nem teszi lehetővé bizonyos, riboszomálisan meghatározott aminosavak oldalláncainak (pl. a glicin, alanin, valin és prolin oldalláncának) utánzását [bár az alanin oldallánca deszulfurizációs reakcióval kialakítható; ld. Liang és Dawson: J. Am. Chem. Soc. 123, 526 (2001), mely forrást teljes egészében a kitanítás részének tekintjük], a szóban forgó eljárás számos riboszomálisan meghatározott vagy nem kódolt aminosav oldalláncának kialakítására alkalmas. A találmány szerinti pseudo-natív kémiai ligálási eljárással előállított aminosavak tioéter-kötést tartalmaznak, és β -szénatomon nem elágazóak (vagyis a β -pozícióban metilcsoportot tartalmaznak: aminosav-CH₂-S-). Ennek megfelelően, a β -elágazódásos aminosavak (izoleucin és treonin) pseudo-aminosav változatai toldalék ("pendant") oldallánc-szerkezettel állíthatók elő (β -geometria és a velejáró kényszerek nélkül).

Lényeges, hogy a találmány szerinti eljárások a riboszomálisan meghatározott aminosavak oldalláncaival azonos (vagy azoknál nagyobb vagy kisebb) hosszúságú aminosav-oldalláncok kialakítására egyaránt alkalmasak. Az oldallánc-hosszúság módosítása a protein háromdimenziós konformációjának stabilizálására (vagy destabilizálására), illetve a protein konformációt módosító képességének javítására alkalmazható, miáltal a protein - a természetben előforduló proteinhez viszonyítva - eltérő szubsztrátokat, inhibitorokat, receptorokat, ligandumokat, stb. képes fogadni. Például, a Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-COOH reakció Cys-CH₂-S-CH₂-COOH molekulát eredményez. Az ilyen "pseudo-glutaminsav" egy plusz oldallánc-atomot (nevezetesen -S- csoportot); míg aszparaginsav helyett alkalmazva két plusz oldallánc-atomot (nevezetesen -CH₂-S- csoportot) tartalmaz. Más oldalláncok azonos számú láncalkotó atomot tartalmaznak, de a tioéter-kötés (-S-) jelenléte miatt különböznek. Például, a Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-CH₂-NH-PG reakció - a PG védőcsoport eltávolítása után - Cys-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH₂ molekulát eredményez. Ez a struktúra az oldalláncban nem tartalmaz plusz atomokat, de az egyik -CH₂- csoport -S- csoporttal van helyettesítve. Egy másik példa a metionin; a Cys-CH₂-SH + I-CH₂-CH₃ reakció Cys-CH₂-S-CH₂-CH₃ molekulát eredményez (szemben a metionin natív szerkezetével: Met-CH₂-CH₂-S-CH₃), vagyis a tioéter áthelyezésre került. Az arginin esetében ugyancsak: Cys-CH₂-SH + Br-CH₂-NH-CH((-NH₂)(=NH₂⁺)) → Cys-CH₂-S-CH₂-NH-CH((-NH₂)(=NH₂⁺)). A nem kívánatos mellékreakciók elkerülése céljából (különösen pseudo-lizin előállítása esetén) a reaktív aminocsoportok védőcsoportokkal láthatók el. A

tioalkilezési reakció elvégzése után a védőcsoport eltávolítható.

Általánosságban elmondható, hogy olyan esetekben, ha egy természetben előforduló protein lehető legjobb utánzása a cél, legelőnyösebben olyan pszeudoaminosav-molekulát alkalmazhatunk, amelynek oldallánc-hosszúsága azonos a protein megfelelő pozíciójában lévő, riboszomálisan meghatározott aminosav oldalláncának hosszúságával. Kevésbé előnyös az olyan pszeudoaminosav-molekula alkalmazása, amelynek oldallánca egy atommal hosszabb, mint a riboszomálisan meghatározott aminosavé; még kevésbé előnyös az olyan pszeudoaminosav-molekula alkalmazása, amelynek oldallánc-hosszúsága két atommal rövidebb, mint a riboszomálisan meghatározott aminosavé. Ezen túlmenően, előnyös olyan cisztein ligálási hely kiválasztása, amelynek környezetében a genetikai változások valószínűleg nem zavarják a molekula működését, vagy amely helyen a rokon proteinekben lévő aminosavak konzerváltak. Az ilyen helyek alanin-páztázással, homológia-modellezéssel és más módszerekkel azonosíthatók.

A pszeudo-natív kémiai ligálás során, hasonlóan a natív kémiai ligáláshoz, egy C-terminális tioésztert tartalmazó peptidhez N-terminális ciszteint tartalmazó peptidet ligálunk, majd a cisztein tiol-oldalláncát R_{aa} -X általános képletű vegyülettel (ahol X jelentése: jó távozócsoport; és R_{aa} jelentése: olyan csoport, amelynek szerkezete egy riboszomálisan meghatározott vagy szintetikus aminosav oldalláncának N terminális részletét utánozza) reagáltatjuk.

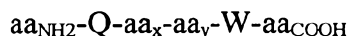
Lényeges, hogy a pszeudo-natív kémiai ligálási reakciók a cisztein oldalláncának természetes L-konfigurációjával vagy a D-konfigurációval működnek. A D-konfiguráció alkalmazása a ligálási helyen proteázos hasítással szembeni rezisztenciát biztosít, így olyan esetekben lehet kívánatos, ahol proteolízissel szembeni fokozott ellenállóképességre van szükség. Mindazonáltal, a D-cisztein alkalmazása esetén a molekulagerinc szerkezete az adott helyen megváltozik. Erre a változtatásra - a proteázzal szembeni rezisztencia mellett - a biológiai aktivitás módosítása céljából lehet szükség, azonban a biológiai aktivitásra gyakorolt hatás minimalizálása érdekében előnyös a D-ciszteint nagy flexibilitású helyen (pl. rendezetlen régióban) lokalizálni, például, olyan rendezetlen hurokban, amely az összehajtogatott molekula felületén fog elhelyezkedni, vagy a molekula rendezetlen terminálisán. A pszeudo-natív kémiai ligálási reakciók, kívánt esetben, a szintetizált molekula felületén nagyméretű, töltéssel bíró oldalláncok (pl. a lizin, aszparaginsav vagy glutaminsav oldalláncai) elhelyezésére alkalmazhatók.

A "jó távozócsoport" (X) példáiként említhetők a halogénatomok, különösen a jód- és brómatom, míg az R_{aa} csoportok példái közé a következők tartoznak: PO_4 , $COOH$, COO , $CONH_2$, guanidiniumcsoport, amincsoport, alkilcsoport, szubsztituált alkilcsoport, arilcsoport,

szubsztituált arilcsoport, imidazolcsoport, alkilezett imidazolcsoport, indolcsoport vagy alkilezett indolcsoport.

A konkrét esetekben alkalmazható R_{aa} csoport kiválasztása attól függ, hogy az adott pozícióban milyen aminosav-oldallánc jelenléte kívánatos. Például, egy

5



általános képletű polipeptid (amelyben Q és W adott esetben további aminosavak potenciális jelenlétét vagy hiányát jelzi; aa_x és aa_y jelentése: belső, szomszédos aminosavak, amelyek "x", illetve "y" oldalláncokat tartalmaznak; és aa_{NH_2} , illetve aa_{COOH} jelentése: a polipeptid vagy protein N-terminális, illetve C-terminális aminosava) a következők szerint szintetizálható: előállítunk két peptidfragmenst:

10



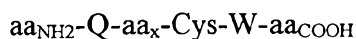
ahol "Cys" az aa_y ciszteinnel végzett helyettesítést reprezentálja; és R jelentése: tetszőleges, tioészterrel kompatibilis csoport, például, többek között, arilcsoport, benzilcsoport és alkilcsoport; konkrét példaként említhetők a 3-karboxi-4-nitrofenil-tioészterek, benzilészterek és merkaptopropionsav-leucinészterek [ld. pl. Dawson és mtsai.: Science 266, 776 (1994); Canne és mtsai.: Tetrahedron Lett. 36, 1217 (1995); WO 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); Ingenito és mtsai.: JACS 121(49), 11369 (1999); Hackeng és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10068 (1999)]; ditiotreitolt vagy alkil- vagy aril-tioészterek, melyek szintén jól ismert, intein-közvetítette biológiai technikák alkalmazásával állíthatók elő [ld. pl. Chong és mtsai.: Gene 192, 277 (1997); Chong és mtsai.: Nucl. Acids Res. 26, 5109 (1998); Evans és mtsai.: Protein Science 7, 2256 (1998); és Cotton és mtsai.: Chemistry & Biology 6(9), 247 (1999)], majd a kapott fragmenseket egymáshoz ligáljuk, miáltal az

15

20

25

30



aminosav-szekvenciát tartalmazó polipeptidet vagy proteint kapjuk. A ligált fragmenst ezután R_y-X_1 általános képletű vegyülettel reagáltatjuk (amelyben R_y jelentése: az y-oldallánc szerkezetét utánzó mellékcsoport). A reakciót a cisztein tiolcsoportjának "pseudo-y" oldallánccá történő átalakításához megfelelő feltételek mellett hajtjuk végre. Például, ha $R_{aa} = CH_2-COOH$ vagy $(CH_2)_2-COOH$, a reakció az aszparaginsav, illetve glutaminsav szerkezetét és funkcióját utánzó aminosav (pszeudo-Asp, illetve pszeudo-Glu) kialakulását eredményezi. A fent leírtak alapján belátható, hogy kettőnél több peptidfragmens alkalmazásával összetettebb szintézis hajtható végre.

E megközelítési mód lényeges sajátága, hogy a reakcióban résztvevő fragmensekben módosítani nem kívánt ciszteinek oldalláncukon védőcsoporttal vannak ellátva [pl. Cys(Acm)], ami - a ligálási hely(ek)en lévő cisztein(ek) kivételével - megakadályozza a ciszteinek kémiai módosítását, illetve, hogy a reakcióban résztvevő fragmensekben lévő összes többi cisztein - a

5 ligálás utáni kémiai modifikációs reakcióval - azonos "pszeudo-aminosavak" egyidejű létrehozására legyen szánva.

Az alábbiakban a pszeudo-aminosavakat tartalmazó peptidek találmány szerinti eljárásokkal végzett szintetizálására alkalmazható R_{aa} oldalcsoportokat foglaljuk össze. A következő reakcióegyenletekben "φ" jelentése: benzilcsoport; "IM" jelentése: imidazolcsoport; "IN" jelentése: indolcsoport; "PG" jelentése: védőcsoport; és "X" jelentése: halogénatom (I, Br, Cl, F; melyek közül többnyire a jód és a bróm előnyös, míg a "φ" kapcsolás esetén a fluor előnyös).

10

Bázikus aminosavak

Lizin (nincs extra atom): $-CH_2-SH + X-CH_2-CH_2-NH-PG \rightarrow$ (védőcsoport eltávolítása után)
 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH_2$;

15 Arginin (nincs extra atom): $-CH_2-SH + X-CH_2-C((NH_2)(=NH_2^+)) \rightarrow -CH_2-S-CH_2-NH-C((NH_2)(=NH_2^+))$;

Hisztidin (két extra atom): $-CH_2-SH + X-CH_2-IM \rightarrow -CH_2-S-CH_2-IM$.

Savas aminosavak

Aszparaginsav (két extra atom): $-CH_2-SH + X-CH_2-COOH \rightarrow -CH_2-S-CH_2-COOH$;

20 Glutaminsav (egy extra atom): $-CH_2-SH + X-CH_2-COOH \rightarrow -CH_2-S-CH_2-COOH$;

Töltés nélküli, poláros aminosavak

Tirozin (extra atom nélkül vagy egy extra atom):

$-CH_2-SH + F-\phi-pOH \rightarrow CH_2-S-\phi-pOH$ (extra atom nélkül, azonos geometria)

$-CH_2-SH + Br/I-CH_2-\phi-pOH \rightarrow CH_2-S-CH_2-\phi-pOH$ (egy extra atom);

25 Glutamin (egy extra atom):

$-CH_2-SH + X-CH_2-C(O)(NH_2) \rightarrow CH_2-S-CH_2-C(O)(NH_2)$;

Aszparagin (két extra atom):

$-CH_2-SH + X-CH_2-C(O)(NH_2) \rightarrow CH_2-S-CH_2-C(O)(NH_2)$;

Szerin (két vagy három extra atom):

30 $-CH_2-SH + X-CH_2OH \rightarrow CH_2-S-CH_2OH$ (2 extra atom);

$-CH_2-SH + X-CH_2-CH_2OH \rightarrow CH_2-S-CH_2-CH_2OH$ (3 extra atom);

Treonin (két vagy három extra atom, β-elágazás hiányzik):

$-\text{CH}_2-\text{S} + \text{X}-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{O}-\text{PG}))$, majd PG-csoport eltávolítása $\rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{OH}))$ (két extra atom);

$-\text{CH}_2-\text{S} + \text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{O}-\text{PG}))$, majd PG-csoport eltávolítása $\rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{OH}))$ (három extra atom).

5 Nem poláros aminosavak

Leu (egy vagy két extra atom):

$-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{X}-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{CH}_3)) \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{CH}_3))$ (egy extra atom);

$-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{CH}_3)) \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}((\text{CH}_3)(\text{CH}_3))$ (két extra atom);

Izoleucin (két vagy három extra atom, β -elágazás hiányzik):

10 $-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{X}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (két extra atom);

$-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{X}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ (három extra atom);

Fenilalanin (egy vagy két extra atom):

$-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{F}-\varphi \rightarrow \text{CH}_2-\text{S}-\varphi$ (egy extra atom);

15 $-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{Br/I}-\text{CH}_2-\varphi \rightarrow \text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\varphi$ (két extra atom);

Metionin (extra atomok nélkül):

$-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{I}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

Trp (egy extra atom): $-\text{CH}_2-\text{SH} + \text{F}-\text{IN} \rightarrow -\text{CH}_2-\text{S}-\text{IN}$.

Mindazonáltal, olyan esetekben, ha egy protein aminosav-szekvenciáját nem célszerű

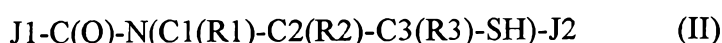
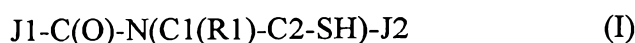
20 vagy nem kívánatos cisztein vagy homocisztein - ligálásra alkalmazott polipeptid adott N-terminálisára történő - beiktatásával módosítani (vagy a ligálási helyen pszeudo-aminosavat alkalmazni), a natív kémiai ligálási eljárás olyan polipeptidek alkalmazásával bővíthető, amelyek N-terminálisra úgy van módosítva, hogy N-szubsztituált - előnyösen $\text{N}\alpha$ -szubsztituált - két-három szénatomos amino-alkil- vagy aril-tiolcsoportot tartalmazzon, és ezáltal a natív kémiai

25 ligálás alapelvei a ciszteint nem tartalmazó polipeptidekre is alkalmazhatóvá válik (ld. a 60/231,339 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentést, melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk).

A "bővített natív kémiai ligálási eljárás" során egy karboxil-tioésztert (még előnyösebben α -karboxil-tioésztert) tartalmazó első komponens savval szemben ellenálló, N-szubsztituált (előnyösen $\text{N}\alpha$ -szubsztituált) 2-3 szénatomos amino-alkil- vagy aril-tiolcsoportot tartalmazó második komponenssel ligálunk. Az első komponens karboxi-tioésztercsoportja és

30 a második komponens két vagy három szénatomos, N-szubsztituált alkil- vagy aril-tiolcsoport-

ja közötti kemoszelektív reakció tioészter-kötésű köztesterméken keresztül zajlik le, és egy első ligálási terméket eredményez. Közelebből; a COSR tioészter-komponens és az amino-alkil-tiol komponens között lejátszódó tiolcsere egy tioészter-kötésű köztesterméket eredményez, amelyből - spontán átrendeződést követően -, öt vagy hat tagú (attól függően, hogy az amino-alkil-tiol komponens az (I) vagy a (II) általános képlettel írható-e le) gyűrűs köztesterméken keresztül amidkötésű első ligálási termék képződik:



ahol J1 jelentése: egy vagy több - adott esetben védett - aminosav-oldalláncot tartalmazó peptid vagy polipeptid, vagy egy ilyen peptid vagy polipeptid részlete, egy polimer, színezék, megfelelő funkciós csoporttal ellátott felület, kapcsolókomponens vagy detektálható marker vagy bármilyen egyéb - a kémiai peptidszintézissel vagy a bővített natív kémiai ligálással kompatibilis - kémiai entitás; R1, R2 és R3 jelentése, egymástól függetlenül: hidrogénatom vagy C1-szénatomhoz konjugált elektrondonor csoport (azzal a kikötéssel, hogy R1, R2 és R3 legalább egyike C1-szénatomhoz konjugált elektrondonor csoport); és J2 jelentése: egy vagy több - adott esetben védőcsoporttal ellátott - aminosav-oldalláncot tartalmazó peptid vagy polipeptid (vagy egy ilyen peptid vagy polipeptid részlete), polimer, színezék, megfelelő funkciós csoporttal ellátott felület, kapcsolókomponens vagy detektálható marker vagy bármilyen egyéb - a kémiai peptidszintézissel vagy a bővített natív kémiai ligálással kompatibilis - kémiai entitás.

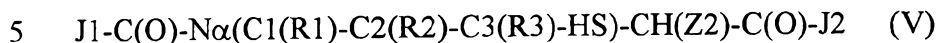
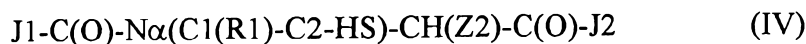
A ligálási helyen jelen lévő két vagy három szénatomos, N-szubsztituált alkil- vagy aril-tiol $[HS-C2-C1(R1)-]$ vagy $[HS-C3(R3)-C2(R2)-C1(R1)-]$ alkalmas arra, hogy peptidkompatibilis feltételek mellett - a termék károsítása nélkül - el lehessen távolítani, miáltal a (III) általános képletű ligálási termékhez jutunk, amely a ligálási helyen natív amidkötést tartalmaz:



(mely képletben J1, J2, R1, R2 és R3 jelentése megegyezik a fentebb megadottakkal).

Az R1, R2 és R3 csoportot úgy választjuk meg, hogy peptidkompatibilis hasítási feltételek mellett elősegítse az N-C1 kötés hasítását. Például, a C1-szénatomnál a rezonancia-stabilizált kation létrehozására (ami elősegíti a hasítást) elektrondonor csoportok alkalmazhatók, különösen, ha a C1-szénatomhoz van konjugálva. A kémiai ligálási reakcióelegy előnyösen - excipiensként - tiol-katalizátort tartalmaz, és a reakciót vizes vagy vegyes szerves/vizes reakciófeltételek mellett, semleges pH-n hajtjuk végre. Az első és második komponens kémiai ligálását öt vagy hat tagú gyűrűn keresztül valósítjuk meg, mely gyűrű spontán átrendeződés-

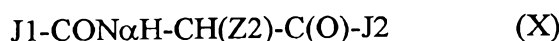
vel az N-szubsztituált, amidkötésű ligálási termékhez jutunk. Ha az első és második komponens peptid vagy polipeptid, az N-szubsztituált, amidkötésű ligálási termék a (IV) vagy (V) általános képlettel írható le:



mely képletekben J1, J2, R1, R2, R3 és Z2 jelentése megegyezik a fentebb megadottakkal.

Az N-szubsztituált, amidkötésű ligálási termék konjugált elektrondonor-csoportjai (R1, R2 és R3) elősegítik az N-C1 kötés hasítását és a két vagy három szénatomos láncú alkil- vagy aril-tiol eltávolítását az N-szubsztituált, amidkötésű ligálási termékről. A nitrogénatom

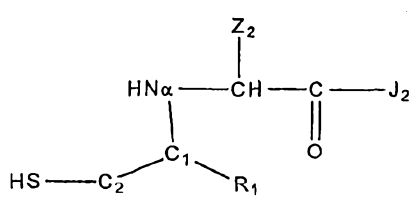
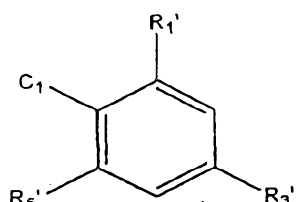
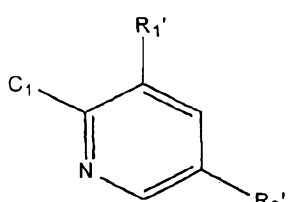
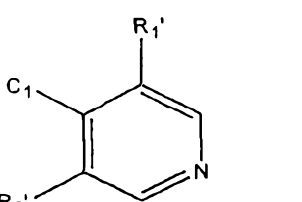
10 alkil- vagy aril-tiol-láncának peptidkompatibilis hasítási feltételek melletti eltávolítása olyan ligálási terméket eredményez, amely a ligálási helyen natív amidkötést tartalmaz. Ha az első és második komponens peptid vagy polipeptid, a ligálási termék a (X) általános képlettel írható le:



Az R1-szubsztituensek jellemző példáit az 1. táblázatban mutatjuk be.

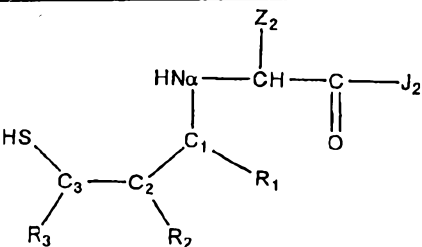
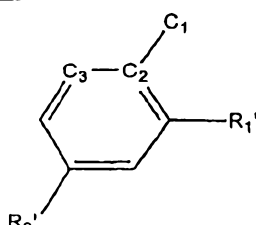
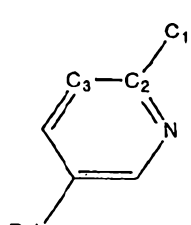
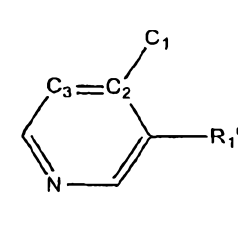
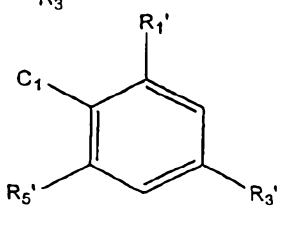
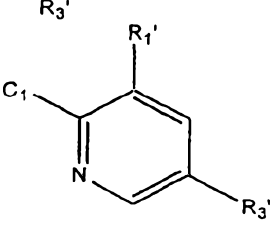
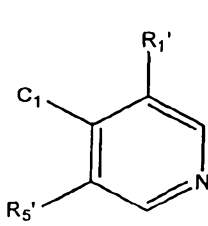
1. táblázat

15

(I) általános képlet		
		
Az (I) általános képletű vegyület R1-szubsztituensei (vonatkoztatási szénatomként a C1 feltüntetésével)		
		

Az R2-szubsztituensek jellemző példáit az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat

(II) általános képlet		
		
R1-, R2- és R3-szubsztituens (vonatkoztatási szénatomként a C1 feltüntetésével)		
		
		

- Hasonlóan a két láncalkotó szénatomot tartalmazó, N-szubsztituált vegyületekhez, az
- 5 Nα-C1 kötés ligálás utáni hatékony hasítása érdekében a C1-szénatomhoz való elektronos konjugáció fenntartásához a benzil- és pikolilcsoport R1', R3' és R5' elektrondonor szubsztituenseinek orto- és para-helyzetekben történő elhelyezésére van szükség. Mindazonáltal, ha R2 és R3 a C2- és C3-szénatommal benzilcsoportot alkot, úgy R1' és R3' legalább egyike erős elektrondonor csoport, amikor is R1' és R3' jelentése: metoxics csoport (OCH₃), tiolcsoport (-SH), hidroxilcsoport (-OH) vagy tio-metilcsoport (-SCH₃). Azon három szénatomos, N-szubsztituált tiolok esetében, amelyekben R2 és R3 jelentése: hidrogénatom, R1 jelentése olyan benzil- vagy pikolilcsoport, amelyben R1', R3' és R5' jelentése erős vagy mérsékelt elektrondonor csoport vagy ezek kombinációja. Hasonlóan az N-szubsztituált, két szénatomos alkil- vagy ariltiolokhoz, az erős elektrondonor csoportok fokozzák a három szénatomos alkil- vagy
- 15 ariltiol ligálás utáni hasításra vonatkozó érzékenységet. Mindezek alapján megfelelő elektrondonor csoportot vagy ilyen csoportok kombinációját választhatjuk ki.

A találmány szerinti, három láncalkotó szénatomot tartalmazó N-szubsztituált vegyületek - a két szénatomos, N-szubsztituált vegyületekhez hasonlóan - az R1-csoport R1' és R5' pozícióiban szubsztituensként tiolcsoportot tartalmazhatnak. Az elektrondonor tiolcsoport ebben az esetben is a C1-szénatomhoz van konjugálva, és az e pozíciókba történő beépítése a vegyületek számára a hat tagú gyűrű képződésével járó ligálási esemény két útvonalát teszi lehetővé, növeli továbbá az α -karboxi-tioészterrel történő reakcióhoz hozzáférhető tiolok helyi koncentrációját, és a strukturális kényszer vonatkozásában további, ligálást elősegítő konformációkat biztosít.

A találmány szerinti N-terminális, N-szubsztituált, két vagy három szénatomos alkil- vagy aril-tiol-aminosavak szintézise, például, az alábbi 1. és 2. reakcióvázlatban bemutatott módon, szakember számára jól ismert, standard szerves kémiai technikák alkalmazásával hajtható végre [ld. pl. "Advanced Organic Chemistry, Reactions, mechanisms and Structure", 4. kiadás, szerkesztő: J. March, John Wiley and Sons, New York, NY (1992); "Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations", szerkesztő: R. Larock, VCH Publishers, New York, NY (1989)]. A szóban forgó aminosavak oldat fázisban, polimerrel segített szintézissel vagy ezek kombinálásával állíthatók elő. Az előnyös módszer szerint $N\alpha$ -védett, N-alkilezett, S-védett amino-alkil- vagy -ariltiol aminosav-prekursorokat alkalmazunk. A szintézis során alkalmazott reagensok kereskedelmi forgalomban beszerezhetők. Tudni kell továbbá, hogy a kiindulási komponensek és a különféle köztestermékek (pl. a különálló aminosav-származékok) későbbi felhasználásig tárolhatók, reagenskészletekbe foglalhatók, stb.

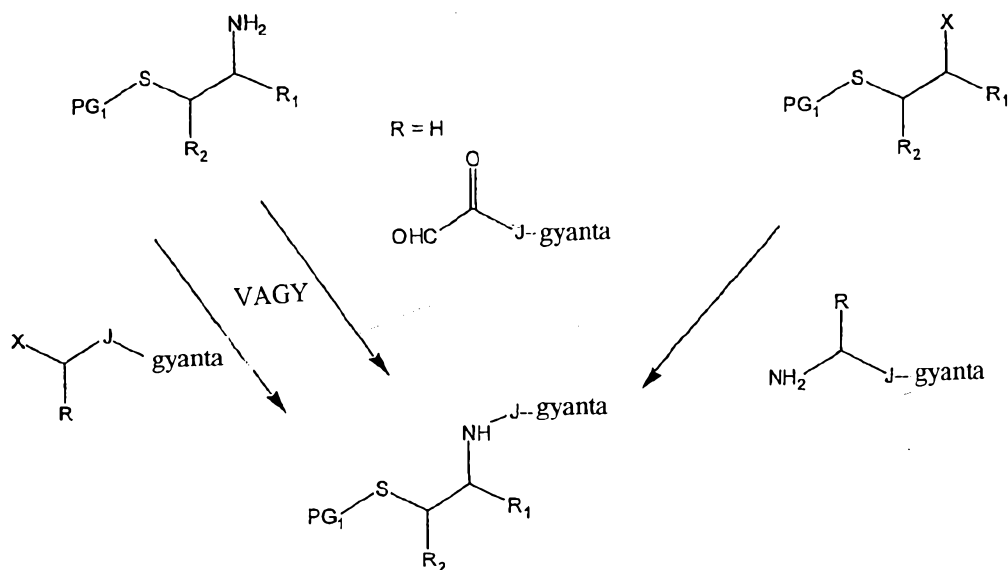
A találmány szerinti N-terminális, $N\alpha$ -szubsztituált, két vagy három szénatomos alkil- vagy aril-tiol-aminosavak előállítását védőcsoportok alkalmazásával végezzük. A különböző szintetizálási stratégiákban alkalmazott, előnyös védőcsoportok (PG) általában kompatibilisek a szilárd fázisú peptidszintézissel (SPPS). Bizonyos esetekben olyan ortogonális védőcsoportok alkalmazására is szükség van, amelyek eltérő feltételek mellett távolíthatók el a molekuláról. Számos, ilyen célra alkalmas védőcsoport ismeretes [ld. pl. "Protecting Groups in Organic Synthesis", 3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene and P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999); NovaBiochem 2000-es katalógus; "Synthetic Peptides, A User's Guide", szerkesztő: G.A. Grant, W.H. Freeman & Company, New York, N.Y (1992); "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry", szerkesztők: W.D. Bennet, J. W. Christensen, L.K. Hamaker, M.L. Peterson, M.R. Rhodes és H.H. Saneii, Advanced Chemtech (1998); "Principles of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztő: M. Bodanszky,

Springer-Verlag (1993); "The Practice of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztők: M. Bodanszky és A. Bodanszky, Springer-Verlag (1994); "Protecting Groups", szerkesztő: P.J. Kocienski: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Németország (1994)]. Az ilyen védőcsoportok példái közé tartoznak a következők: benzil-oxi-karbonilcsoport (Z), Boc, Bpoc, Trt, Nps, FmocCl-Z, Br-Z, NSC, MSC, Dde és hasonlók. A kénatomok védelmére alkalmazható védőcsoportok példáuliként említhetők, többek között, a következők: benzilcsoport, 4-metilbenzilcsoport, 4-metoxi-benzilcsoport, trifenil-metilcsoport, ACM, TACAM, xantilcsoport, diszulfidszármazékok, pikolilcsoport és fenil-acilcsoport.

Közelebbről, az $N\alpha$ -szubsztituált, két vagy három szénatomos alkil- vagy ariltiolokat az 1. reakcióvázlatban ($N\alpha$ -szubsztituált prekursor szilárd fázisú szintézise) és a 2. vázlatban ($N\alpha$ -szubsztituált prekursor oldat fázisú szintézise) bemutatottak szerint állíthatjuk elő. Ahogy az 1. reakcióvázlatban látható, az $N\alpha$ -szubsztituált, két vagy három szénatomos alkil- vagy ariltiolokat - a polimerrel segített szerves szintézis standard eljárásainak alkalmazásával - közvetlenül a szilárd hordozón állítjuk össze, míg a 2. reakcióvázlatban bemutatott stratégia szerint az $N\alpha$ -védett, N-alkilezett, S-védett amino-alkil- vagy -ariltiol aminosav-prekursorokat standard kapcsolási reakciók alkalmazásával kapcsoljuk a gyantához. Racém vagy diasztereo-mer termékek előállítása esetén szükség lehet ezek elegyeinek - a bővített natív kémiai ligálásban történő felhasználásuk előtt - standard eljárásokkal elválasztani.

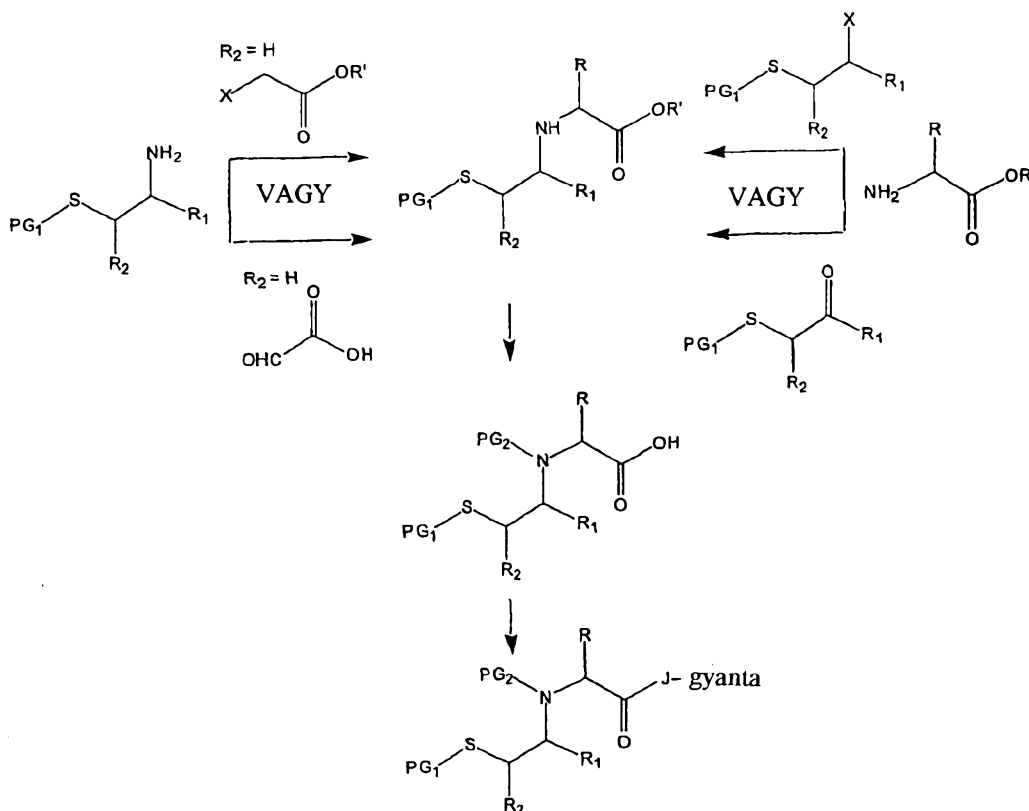
1. reakcióvázlat

ECL-derivatizált molekulák szilárd fázisú szintézise



X= halogénatom

2. reakcióvázlat



Az α -karboxi-tioészterek szakember számára jól ismert, standard technikák alkalmazásával végzett kémiai vagy biológiai eljárásokkal (ld. a példákban) állíthatók elő. Az α -karboxi-tioészter peptidek oldatban vagy tioészter-képző gyantákból szintetizálhatók, mely technikák szakember számára jól ismertek [ld. pl. Dawson és mtsai.: Science 266, 776 (1994); Canne és mtsai.: Tetrahedron Lett. 36, 1217 (1995); WO 96/34878 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); WO 98/28434 számú nemzetközi közzétételi irat (Kent és mtsai.); Ingenito és mtsai.: JACS 121(49), 11369 (1999); Hackeng és mtsai.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 10068 (1999); Amiato és mtsai., ld. fentebb]. Például, a kémiai úton szintetizált tioészter-peptidek a megfelelő peptid- α -tiosavakból állíthatók elő, amelyek viszont tioészter-gyantán vagy oldatban szintetizálhatók (előnyösebb a gyantán végzett szintézis). A peptid- α -tiosavak a megfelelő 3-karboxi-4-nitro-fenil-tioészterekké, a megfelelő benzilészterre vagy bármilyen más alkil-tioészterre alakíthatók. E tioészterek mindegyike megfelelő távozócsoportot biztosít a ligálási reakciókhoz - a 3-karboxi-4-nitro-fenil-tioészterek valamivel nagyobb reakciósebességet eredményeznek, mint a megfelelő benzil-tioészterek, amelyek viszonyt na-

gyobb reaktivitásúak lehetnek, mint az alkil-tioészterek. További példaként említhető a trifenil-metil-asszociált merkaptó-propionsav leucin-tioészter-képző gyanta C-terminális tioészterek előállítására történő alkalmazása (Hackeng és mtsai., ld. fentebb)- A C-terminális tioészter-szintézis 3-karboxi-propán-szulfonamid "biztonsági zár" kapcsolókomponens alkalmazásával, diazometánnal vagy jód-acetonitrillel végzett aktiválással, majd megfelelő tiollal végzett kisso-
 5 rítással hajtható végre (Ingenito és mtsai., ld. fentebb; Bertozzi és mtsai.).

A C-terminális α -karboxi-tioészter-peptidek biológiai eljárásokkal, pl. intein-közvetítette biológiai technikákkal is előállíthatók [ld. pl. Chong és mtsai.: *Gene* **192**, 277 (1997); Chong és mtsai.: *Nucl. Acids Res.* **26**, 5109 (1998); Evans és mtsai.: *Protein Science* **7**, 2256 (1998); és Cotton és mtsai.: *Chemistry & Biology* **6**(9), 247 (1999)]. Például, C-terminális ditiotreitol (DTT) észter peptid vagy polipeptid-szakasz előállítása céljából, "intein" protein-splicing elem indukálható önhasító aktivitásának kihasználására intein expressziós rendszerek (jelölők, pl. affinitási toldalékokkal vagy anélkül) alkalmazhatók. Tiolok (pl. DTT, β -merkaptóetanol vagy cisztein) jelenlétében az intein specifikus önhasítódáson megy át, ami
 10 C-terminális tioésztert hordozó peptidszegmens létrejöttét eredményezi [ld. pl. Chong és mtsai.: *Gene* **192**, 277 (1997); Chong és mtsai.: *Nucl. Acids Res.* **26**, 5109 (1998); Evans és mtsai.: *Protein Science* **7**, 2256 (1998); és Cotton és mtsai.: *Chemistry & Biology* **6**(9), 247 (1999)]. Mindazonáltal, rekombináns módon előállított peptidszegmens alkalmazása esetén a végtermék kémiaiilag szintetizált részlete rendszerint abban a pozícióban tartalmazza a poli-
 15 mert, ahová kapcsolása történt.

A találmány szerinti N-szubsztituált, két vagy három láncalkotó szénatomos alkil- vagy aril-tiol-komponensek első karboxi-tioészter komponenssel végzett ligálása olyan ligálási terméket eredményez, amely a ligálási helyen N-szubsztituált amidkötést tartalmaz. A reakció ligálási feltételeit úgy választjuk meg, hogy fenntartsuk a tioészter szelektív reaktivitását a két
 25 vagy három láncalkotó szénatomos, N-szubsztituált alkil- vagy aril-tiol-gyökkel. A találmány egyik előnyös megvalósítási módja értelmében a ligálási reakciót 6-8-as (előnyösen 6,5-7,5-es) pH-jú pufferoldatban végezzük. A pufferoldat vizes, szerves vagy a kettő kombinációja lehet. A ligálási reakcióelegy egy vagy több katalizátort és/vagy egy vagy több redukálószer, lipidet, detergenst, egyéb denaturálószeret vagy szolubilizálószereket és hasonlókat is tartalmazhat.
 30 Katalizátorként előnyösen a tiol- és foszfintartalmú vegyületek - pl. tiofenol, benzilmerkaptán, TCEP és alkilfoszfinok - alkalmazhatók. A denaturálószeret és/vagy szolubilizálószereket példáulként említhető a guanidinium, a karbamid vízben vagy szerves oldószerekben (pl. TFE,

HFIP, DMF, NMP, vízzel kevert acetonitril), illetve a guanidinium és karbamid vízben. A reakcióhőmérséklet változtatásával szabályozható a ligálási reakció sebessége. Az alkalmas hőmérséklet általában 5-55 °C, előnyösen 15-40 °C. Például, a ligálási reakció 2 % tiofenolt tartalmazó 6M guanidinium-oldatban, 6,8 és 7,8 közötti pH-n jól működik.

- 5 A két láncalkotó szénatomos, N-szubsztituált alkil- vagy ariltiolok esetében a ligálási esemény a COSR tioészter-komponens és az amino-alkil-tiol komponens közötti tiolcsere eredményeként következik be. A kicserélődéssel tioészter-kötésű köztestermék jön létre, amelyből - öt tagú gyűrűs köztesterméken keresztül végbemenő spontán átrendeződéssel - J1-HN-CH(Z1)-C(O)-N α (C1(R1)-C2-SH)-CH(Z2)-J2 általános képletű első ligálási termék képződik, amely a ligálási helyen egy eltávolítható, N-szubsztituált, két láncalkotó szénatomot tartalmazó alkil- vagy ariltiol [HS-C2-C1(R1)-] tartalmaz (a szubsztituensek jelentése megegyezik a fentebb megadottakkal). A ligálási helyen lévő, N-szubsztituált, két láncalkotó szénatomot tartalmazó alkil- vagy ariltiol [HS-C2-C1(R1)-] peptidkompatibilis feltételek mellett eltávolítható, miáltal J1-HN-CH(Z1)-CO-NH-CH(Z2)-CO-J2 általános képletű ligálási végterméket kapjuk, amely a ligálási helyen natív amidkötést tartalmaz.
- 10
- 15

- A három láncalkotó szénatomot tartalmazó, N-szubsztituált alkil- vagy ariltiolok esetében a COSR tioészter-komponens és az amino-alkil-tiol komponens közötti tiolcsere eredményeként tioészter-kötésű ligálási köztestermék jön létre, amelyből - hat tagú gyűrűs köztesterméken keresztül végbemenő spontán átrendeződéssel - J1-HN-CH(Z1)-C(O)-N α (C1(R1)-C2(R2)-C3(R3)-SH)-CH(Z2)-J2 általános képletű első ligálási termék képződik, amely a ligálási helyen egy eltávolítható, N-szubsztituált, három láncalkotó szénatomot tartalmazó alkil- vagy ariltiol [HS-C3(R3)-C2(R2)-C1(R1)-] tartalmaz (a szubsztituensek jelentése megegyezik a fentebb megadottakkal). A ligálási helyen lévő, három láncalkotó szénatomot tartalmazó, N-szubsztituált alkil- vagy ariltiol [HS-C3(R3)-C2(R2)-C1(R1)-] peptidkompatibilis feltételek mellett eltávolítható, miáltal J1-HN-CH(Z1)-CO-NH-CH(Z2)-CO-J2 általános képletű ligálási végterméket kapjuk, amely a ligálási helyen natív amidkötést tartalmaz.
- 20
- 25

- Az N-szubsztituált alkil- vagy aril-tiolcsoportok eltávolítását előnyösen az N-C1 kötés hasítását elősegítő savas feltételek mellett hajtjuk végre, miáltal a ligálási helyen szubsztituens nélküli stabilizált amidkötést kapunk. A "peptidkompatibilis hasítási feltételek kifejezésen a peptidekkel kompatibilis - és az alkil- vagy aril-tiolgyök ligálási termékről történő lehasítására alkalmas - fizikai-kémiai feltételeket értünk. A peptidkompatibilis hasítási feltételeket általában az alkalmazott α -szubsztituált vegyülettől függően választjuk meg, és szokványos rutin mód-
- 30

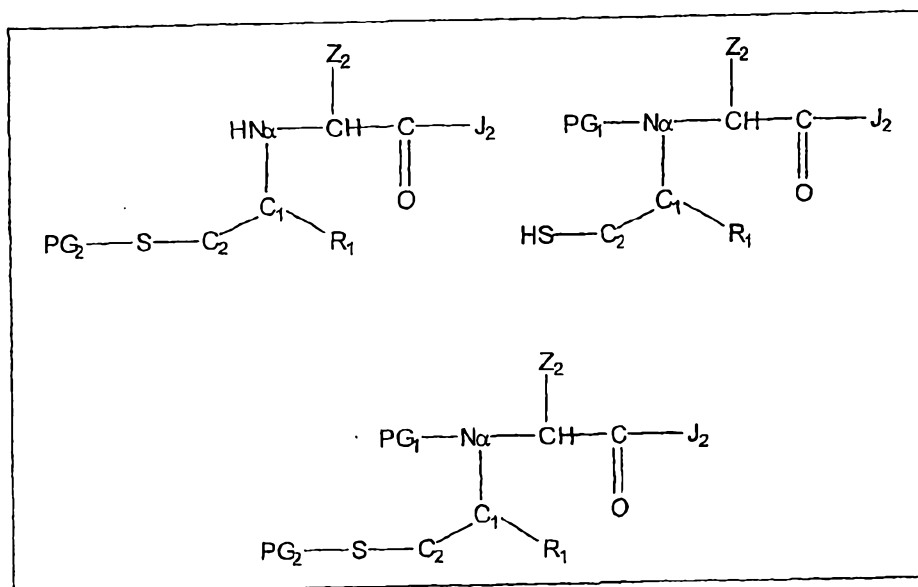
- szerekkel könnyen meghatározható [ld. pl. "Protecting Groups in Organic Synthesis", 3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene és P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999); NovaBiochem 2000-es katalógus; "Synthetic Peptides, A User's Guide", szerkesztő: G.A. Grant, W.H. Freeman & Company, New York, N.Y (1992); "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry", szerkesztők: W.D. Bennet, J. W. Christensen, L.K. Hamaker, M.L. Peterson, M.R. Rhodes és H.H. Saneii, Advanced Chemtech (1998); "Principles of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztő: M. Bodanszky, Springer-Verlag (1993); "The Practice of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztők: M. Bodanszky és A. Bodanszky, Springer-Verlag (1994); "Protecting Groups", szerkesztő: P.J. Kocienski: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Németország (1994)].

Például, ha az R1-, R2- vagy R3-szubsztituens metoxicsoportot, hidroxilcsoportot, tiolcsoportot, tio-metilcsoportot, metilcsoportot vagy hasonló csoportot tartalmazó, a lehasítás általánosabb módszereit a peptidszintézis-kémiákra jellemző savas hasítási feltételek mellett hajtjuk végre. Ez az N-C1 kötés erősen savas vagy vizes/savas feltételek melletti hasítását jelenti - redukálószeres és/vagy mentesítő („*scavenger*”) rendszerek [például, savak (pl. vizes hidrogén-fluorid (HF), trifluorecetsav (TFA) vagy trimetil-szulfonil-fluorecetsav (TMSFA) és hasonló] jelenlétében vagy hiányában. Az aril- vagy alkil-tiolgyök adott konstrukcióról történő eltávolítása vonatkozásában, az N α -C1-kötés hasításának optimalizálása érdekében specifikusabb savas hasítási rendszerek választhatók. Az ilyen reakciófeltételek szakember számára jól ismertek, és a peptidek integritásának megőrzése szempontjából kompatibilisek. Különösen olyan esetben, ha a peptid- vagy polipeptid aminosav-szekvenciájában triptofánok vannak jelen, a triptofán-oldallánc felszabadított aril- vagy aril-tiolgyökkel bekövetkező reakciójának megakadályozása érdekében tiol-mentesítőt alkalmazhatunk. A tiol-mentesítők jellemző példái közé tartozik az etándiol, cisztein, β -merkaptotanol és a tiokrezol.

A speciális hasítási feltételek további példái között említhetők a fotolízises és a redukatív hasítási feltételek (ha a szubsztituens pikolilcsoport). Például, ha R1 vagy R2 és R3 jelentése pikolilcsoport, a hasításra - standard eljárásokkal végzett - fotolízist (pl. ultraibolya sugárzás alkalmazásával), cink/ecetsavas vagy elektrolitikus redukciót alkalmazhatunk. Ha a két láncalkotó szénatomot tartalmazó, N-szubsztituált tiol R1-szubsztituense R1-nél tiometánt tartalmaz, higanyos vagy hidrogén-fluoridos hasítást alkalmazhatunk. A hasítási rendszer szilárd hordozóról történő egyidejű hasításra és/vagy védőcsoport-eltávolító reagensként is alkalmazható, ha az első vagy második ligálási komponens más védőcsoportokat tartalmaz.

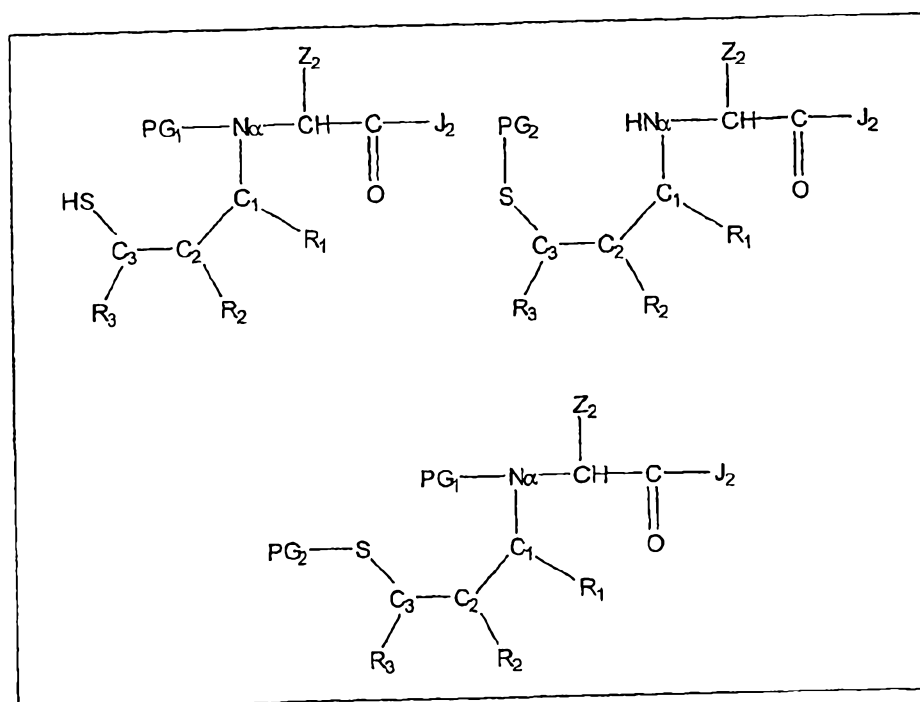
A találmány egyik megvalósítási módja szerint a két vagy három láncalkotó szénatomot tartalmazó, $N\alpha$ -szubsztituált alkil- vagy ariltiolokat a peptidszintetizálási lépésben (különösen az automatizált peptidszintézis és az ortogonális vagy konvergens ligálási stratégiák esetében) megfelelő N-terminális szubsztituenst tartalmazó polipeptidek előállítására alkalmazzuk, melyek a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek eredményező bővített kémiai ligálás szubsztrátjaiként használhatók fel. Az ilyen vegyületek a következő általános képletekkel leírható teljesen védett, részlegesen védett vagy egyáltalán nem védett, savstabil, két vagy három láncalkotó szénatomos $N\alpha$ -szubsztituált amino-alkil- vagy -ariltiol tartalmaznak: (PG1)S-C2-C1(R1)- $N\alpha$ (PG2)-CH(Z2)-C(O)-J2 vagy (PG1)S-C3(R3)-C2(R2)-C1(R1)- $N\alpha$ (PG2)-CH(Z2)-C(O)-J2, melyeket a 3. és 4. táblázatban mutatunk be. Közelebbről, R1, R2 és R3 közül egy vagy több a C1-szénatomhoz kapcsolt elektrondonor csoport, amely az $N\alpha$ -szubsztituált amino-alkil- vagy -ariltiol $N\alpha$ -szubsztituált amid-alkil- vagy -ariltiollá történő átalakítását követően a C1-szénatomon rezonancia-stabilizált kation létrehozására képes, amely peptidkompatibilis hasítási feltételek mellett elősegíti az $N\alpha$ -C1 kötés hasítását. A fenti képletekben PG1 és PG2 jelentése: azonos vagy különböző védőcsoportok, melyek külön-külön vagy kombinálva vannak jelen vagy hiányoznak; Z2 jelentése: a kémiai peptidszintézissel vagy a bővített natív kémiai ligálással kompatibilis, tetszőleges csoport; és J2 jelentése: a kémiai peptidszintézissel vagy a bővített natív kémiai ligálással kompatibilis, tetszőleges csoport. A PG1 (vagy X1) az amin védésére, míg PG2 (X2) a tiol védésére alkalmas csoport. Számos ilyen védőcsoport ismeretes, melyek erre a célra alkalmasak [ld. pl. "Protecting Groups in Organic Synthesis", 3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene és P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999); NovaBiochem 2000-es katalógus; "Synthetic Peptides, A User's Guide", szerkesztő: G.A. Grant, W.H. Freeman & Company, New York, N.Y (1992); "Advanced Chemtech Handbook of Combinatorial & Solid Phase Organic Chemistry", szerkesztők: W.D. Bennet, J. W. Christensen, L.K. Hamaker, M.L. Peterson, M.R. Rhodes és H.H. Saneii, Advanced Chemtech (1998); "Principles of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztő: M. Bodanszky, Springer-Verlag (1993); "The Practice of Peptide Synthesis", 2. kiadás, szerkesztők: M. Bodanszky és A. Bodanszky, Springer-Verlag (1994); "Protecting Groups", szerkesztő: P.J. Kocienski: Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Németország (1994)].

3. táblázat



Az előnyös PG1- vagy X1-védőcsoportok jellemző példái közé tartoznak, többek között, a következők: Boc (t-butyl-karbamátcsoport), Troc (2,2,2-triklór-etilkarbamát), Fmoc (9-fluorenil-metilkarbamát), Br-Z vagy Cl-Z (Br- vagy Cl-benzilkarbamát), Dde (4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén), MsZ (4-metil-szulfonil-benzilkarbamát), Msc (2-metil-szulfo-etilkarbamát), Nsc (4-nitro-fenil-etil-szulfonil-etil-oxi-karbonilcsoport). Az előnyös PG1- és X1-védőcsoportokat a "Protecting Groups in Organic Synthesis" című kiadványból [3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene és P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999)] választjuk ki; legelőnyösebb az Fmoc- és Nsc-csoport. A PG2- vagy X2-védőcsoportok előnyös példái közé tartoznak, többek között, a következők: Acn (acetamido-metilcsoport), MeoBzl vagy Mob (p-metoxi-benzilcsoport), Meb (p-metil-benzilcsoport), Trt (trifenil-metilcsoport), Xan (xantenilcsoport), tButhio (s-t-butilcsoport), Mmt (p-metoxi-trifenil-metilcsoport), 2- vagy 4-pikolil (2- vagy 4-piridilcsoport), Fm (9-fluorenil-metilcsoport), tbut (t-butilcsoport), Tacam (trimetil-acetamido-metilcsoport). Az előnyös PG2- és X2-védőcsoportokat a "Protecting Groups in Organic Synthesis" című kiadványból [3. kiadás, szerkesztők: T.W. Greene és P.G.M. Wuts, John Wiley and Sons, Inc. (1999)] választjuk ki; legelőnyösebb az Acn-, Mob-, MeB- és Pikolilcsoport.

4. táblázat



A találmány szerinti, két vagy három láncalkotó szénatomot tartalmazó, $N\alpha$ -szubsztituált alkil- vagy ariltiolok védett alakjai a fenti 1. és 2. reakcióvázlatban bemutatott módon állíthatók elő.

A találmány szerinti vegyületek számos eljárással előállíthatók, így például, halogénközvetítette amino-alkilezéssel, reduktív aminálással, valamint - szilárd fázisú aminosav-szintetizálási módszerekkel kompatibilis - $N\alpha$ -védett, N-alkilezett, S-védett amino-alkil- vagy -ariltiol aminosav-prekursorok előállítása révén állítjuk elő. Kívánt esetben, az elfogadható királis tisztaságú vegyületek előállítása céljából, a képződött racemátok vagy diasztereomerek resolválását standard módszerekkel végezhetjük.

III) A találmány szerinti előnyös, vízben oldható polimerek szintézise és előállítása

Ahogy itt használjuk, a "molekuláris heterogenitás" kifejezésen egy proteinkészítményben lévő egyes proteinekhez kapcsolódó polimermolekulák számának változékonyságát értjük. A "molekuláris diverzitás" kifejezés (a) a protein polimerrel módosított helyének (helyeinek) változékonyságára; (b) az ugyanazon protein különböző helyeire [vagy egy proteinkészítmény különböző proteinjeinek ugyanazon helyére (helyeire)] kapcsolt polimer-adduktumok hosszúságának változékonyságára; vagy (c) egy protein különböző helyeire [vagy egy proteinkészítmény különböző proteinjeinek ugyanazon helyére (helyeire)] kapcsolt polimer-adduktumok elágazódásának mennyisége és/vagy természete változékonyságára vonatkozik. Ahogy a

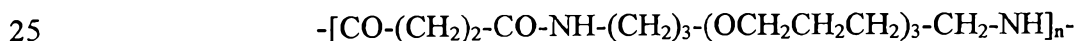
leírásban használjuk, a "molekulárisan homogén" kifejezés olyan proteinkészítményre vonatkozik, amelyben valamennyi proteinmolekula azonos aminosav-szekvenciát tartalmaz, amelyek ugyanazon pozíciókban ugyanazon polimerrel vannak módosítva. Két vagy több "molekulárisan homogén" proteinkészítmény elegyét "molekulárisan definiált" készítménynek nevezzük.

- 5 A találmány e szempontjának megfelelően, a polimer heterogenitásának, diverzitásának és alkalmatlanságának fentebb vázolt problémáira a biokompatibilis polimerek új osztályának előállítása nyújt megoldást, ami a polipeptidek előnyeit (pontos hosszúság, egyszerű szintézis) a "pPEG" (precíziós PEG) előnyeivel (flexibilitás, amfifilitás, immunogenitás hiánya, proteázos hasítással szembeni érzéketlenség) kombinálja [09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose, K. és mtsai.)]. A szóban forgó biokompatibilis polimerek a következő általános képlettel írhatók le:

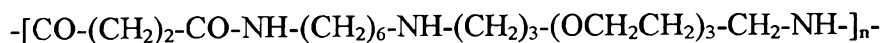


- ahol "n" értéke: előnyösen 1 és 100, még előnyösebben 2 és 100 közötti egész szám; X és Y jelentése: pontos szerkezetű, egymáshoz amidkötéssel kapcsolódó, biokompatibilis ismétlődő elemek. X és y előnyösen kétértékű szerves gyökök, amelyek nem tartalmaznak reaktív funkciós csoportok, vagy X és Y hiányzik (mely lehetőségek az "n" számú ismétlődő egységekben egymástól függetlenül változók lehetnek). Előnyös esetben, ha "n" értéke X és Y legalább egyikének jelentése: szubsztituált, szubsztituátlan, elágazó láncú vagy lineáris láncú alifás vagy aromás csoport. Még előnyösebben, X és Y egyikének jelentése: fenilcsoport, 1-10 szénatomos alkilgyökök, 1-10 szénatomos alkilcsoport, heteroatomot tartalmazó fenilcsoport, heteroatomot tartalmazó 1-10 szénatomos alkilgyökök, heteroatomot tartalmazó 1-10 szénatomos alkilcsoport vagy ezek kombinációja.

A találmány szerinti megoldás szempontjából különösen előnyös pPEG-molekulák a következő általános képletekkel írhatók le:



(ahol "n" értéke előnyösen 1 és 100 közötti egész szám, még előnyösebben 2 és 100 közötti egész szám); vagy



- 30 (ahol "n" értéke előnyösen 1 és 50 közötti egész szám, még előnyösebben 2 és 50 közötti egész szám).

Az ilyen pPEG-molekulák számos módszerrel szintetizálhatók, azonban előállításukra előnyösen az egységek szilárd fázisú, lépésenkénti összekapcsolását magában foglaló láncösszeállítási eljárást, és nem polimerizációs eljárásokat alkalmazunk. Az ilyen összeállítási

folyamat lehetővé teszi, hogy egy készítmény komponensei - hosszúságuk, X és Y-szubsztituenseik, az esetlegesen jelen lévő elágazódási pontjaik, és az esetlegesen jelen lévő elágazások pozíciója, hosszúsága, X- és Y-szubsztituensei vonatkozásában - definiáltak és homogén szerkezetűek legyenek.

5 Az ilyen molekulák a következők szerint szintetizálhatók:

(a) a "Z-Q-hordozó" általános képletű vegyület (amelyben Z jelentése: H_2N - vagy HO -; Q jelentése: kapcsolócsoporthoz vagy célmolekula; és "hordozó" jelentése: szilárd fázis, mátrix vagy felület) aminocsoportját vagy hidroxilcsoportját egy $HOOC-X-COOH$ általános képletű disav származékának moláris feleslegével acilezzük;

10 (b) az (a) lépésben kapott termék szabad karboxilcsoportját aktiváljuk;

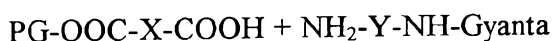
(c) a (b) lépésben kapott terméket NH_2-Y-NH_2 általános képletű diamin moláris feleslegével aminolízisnek vetjük alá; és

(d) adott esetben az (a)-(c) lépéseket a $HOOC-X-COOH$ és NH_2-Y-NH_2 általános képletű vegyületek (amelyekben X és Y jelentése, egymástól függetlenül: kétértékű szerves gyök vagy X vagy Y hiányozhat, és az opcionális ismétlődő egységekben egymástól függetlenül változók lehetnek, továbbá az előző acilezési és/vagy aminolízises lépésekben alkalmazott X- és Y-szubsztituensekkel azonosak vagy azoktól eltérőek.

A találmány előnyös megvalósítási módjai értelmében a fenti ismétlődő egység 6-mereit, 12-mereit, 18-mereit és 32-mereit alkalmazzuk. Kívánt esetben az ismétlődő egység, például, a lizin aminocsoportjával együtt alkalmazható, ami elágazó pPGE-struktúrákat eredményez. A pPEG különböző kémiai módszerekkel (pl. tioéter-, oxim- és amidkötés-képzéssel) kapcsolható a találmány szerinti szintetikus proteinekhez.

A találmány egyik megvalósítási módja szerint az egységek szilárd fázison végzett lépésenkénti egymáshoz kapcsolását a következők szerint hajtjuk végre:

25 1. lépés: Védett vagy nem védett disavat gyantához kötött aminocsoporttal kapcsolunk, miáltal a kapcsolási helyen amidkötést hozunk létre (a PG-védőcsoport az alkalmazott disavtól függően jelen van vagy hiányzik):



2. lépés: az esetlegesen jelen lévő védőcsoport (PG) eltávolítása a gyantáról:

30 $HOOC-X-CO-NH-Y-NH-Gyanta$

3. lépés: védett vagy nem védett diamin gyantához kötött karbonsavhoz történő kapcsolása, miáltal a kapcsolási helyen amidkötést kapunk (a PG-védőcsoport az alkalmazott diamintól függően jelen van vagy hiányzik):

PG-NH-Y-HN + HOOC-X-CO-NH-Y-NH-Gyanta

4. lépés: az esetlegesen jelen lévő védőcsoport (PG) eltávolítása a gyantáról:

-NH-Y-NH-OC-X-CO-NH-Y-NH-Gyanta

5. lépés: az 1-4. lépések ismétlése "n" alkalommal (ami "n" számú egység összekapcsolását eredményezi), majd lehasítás a gyantáról: $-\text{[CO-X-CO-NH-Y-NH]}-\text{[CO-X-CO-NH-Y-NH]}-\text{[CO-X-CO-NH-Y-NH]}-\text{[CO-X-CO-NH-Y-NH]}-$.

Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló molekulákhoz történő kapcsolásra vízben oldható polimerként a lineáris vagy elágazó pPGE-konstrukciók alkalmazhatók előnyösen. Az alkalmazott pPEG-konstrukciók fiziológiai feltételek mellett töltéssel bíró vagy semleges oldalcsoportokat tartalmaznak, és úgy állíthatók elő, hogy kapcsolási kémiájuk, hosszúságuk, elágazódásuk és oldékonyságuk - az alkalmazott szerkezettől függően - változó legyen. Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti előnyös pPEG-ek $-\text{CO-X-CO-NH-Y-NH}-$ ismétlődő egységet tartalmazó, vízben oldható poliamidot tartalmaznak, ahol X és Y egyike vagy mindkettő vízben oldható ismétlődő egység, legelőnyösebben "PEG"-alapú ismétlődő egység. Bár az oligokarbamidok elsősorban egyszerű, kétlépcsés szilárd fázisú eljárással állíthatók elő - ahogy azt egy amino-gyanta ($\text{NH}_2\text{-Gyanta}$) és egy szimmetrikus diamin ($\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$) esetében az alábbiakban bemutatjuk:

aktiválás karbonil-diimidazollal $\rightarrow \text{im-CO-NH-Gyanta}$

aminolízis diaminnal ($\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$) $\rightarrow \text{NH}_2\text{-Y-NH-CO-NH-gyanta}$

(mely két lépést többször ismételve $-\text{NH-Y-NH-CO}-$ képletű ismétlődő egységet tartalmazó oligokarbamidot kapunk - ez az eljárás kevésbé előnyös. Ennek oka, hogy a fenti két lépés hozama szobahőmérsékleten nem kvantitatív, még akkor sem, ha a reagenseket nagyon nagy feleslegét és hosszú reakcióidőt alkalmazunk. Ilyenformán, előnyösebben három lépésű szilárd fázisú eljárást alkalmazhatunk, amelyet az alábbiakban amino-gyanta ($\text{NH}_2\text{-gyanta}$) alkalmazásával, poliamid előállítására szemléltetünk. Az izomer termékek képződésének elkerülése céljából a HOOC-X-COOH és $\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$ általános képletű reagenseknek szimmetrikusnak kell lenniük.

Aktiválás disavval (HOOC-X-COOH) $\rightarrow \text{HO-CO-X-CO-NH-Gyanta}$

Aktiválás karbonil-diimidazollal $\rightarrow \text{im-CO-OCO-X-CO-NH-gyanta}$

Aminolízis diaminnal ($\text{NH}_2\text{-Y-NH}_2$) $\rightarrow \text{NH}_2\text{-Y-NH-CO-X-CO-NH-gyanta}$

Ezt a három lépést egymás után többször megismételve az $[-\text{NH-Y-NH-CO-X-CO}-]$ ismétlődő egységet tartalmazó poliamidot kapjuk. A polimer pontos számú monomeregységet

tartalmaz; X és Y az egyes lépésekben egymástól függetlenül változhat, és a végcsoportok tet-
szőlegesen választhatók ki. Például, az acilezési lépésben borostyánkősav-anhidridet ("Succ"),
az aminolízises lépésben 4,7,10-trioxa-1,13-tridecándiamint (más néven: EDA vagy TTD) al-
kalmazva olyan "PEG"-alapú poliamidokat kapunk, amelyek képletében X jelentése: $-\text{CH}_2-$
5 CH_2- , Y jelentése: $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-$; és az ismétlődő egység a követ-
kező: $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$. Annak ellenére, hogy az eljá-
rás során védőcsoport nélküli kétértékű reagenseket alkalmazunk, kereskedelmi forgalomban
beszerezhető, standard peptidszintetizáló gyanták felhasználása esetén a keresztkötődés nem
jelent problémát [09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose, K. és
10 mtsai.); és Rose és mtsai.: J. Am. Chem. Soc. 121, 7034 (1999)], kivéve az elágazó konstruk-
ciók előállításánál a Lys elágazási magok alábbiakban leírt esetét.

Például, az elágazó pPEG-konstrukciók a "kemotest" ("chemobody") konstrukciók
esetében leírtakhoz [ld. 09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose, K.
és mtsai.); és Rose és Vizzavona: J. Am. Chem. Soc. 121, 7034 (1999)] hasonló módon állít-
15 hatók elő. Ennek megfelelően, az elágazó pPEG-konstrukciók úgy állíthatók elő, hogy tartal-
mazzanak egy elágazási magot (pl. lizin elágazási magot), amely oxim-kapcsolókomponense-
ken keresztül egy előnyös, vízben oldható poliamidhoz kapcsolódik [pl. $-(\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-\text{NH}-$
 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH})_n-$]. Például, az oximkötések a poliamid másik végén lévő
lizin-oldalláncon található amino-oxi-acetilcsoport és egy lizin-magon [pl. az
20 $(\text{O}=\text{CHCO})_4\text{Lys}_2\text{Lys}-$ tetramer magon] lévő glioxililcsoportok között alakíthatók ki. Ilyenfor-
mán, az egyes lizin elágazódási pontok oxim-kapcsolókomponense a következő szerkezet sze-
rint alakítható ki: $\text{Lys}(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{ON}=\text{CHCO}-)$ amid-. Más módon, az oximkötés a poliamid és a
poliamid szabad toldalékcsoportja közé iktatható be - előnyösen egyszeresen védett diamín al-
kalmazásával, és a poliamid kapcsolása után a védőcsoport eltávolításával, miáltal egy négyér-
25 tékű elágazó konstrukciót kapunk: $[\text{O}=\text{CHCO}-(\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_3-\text{CH}_2-\text{NH}-$
 $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO})_n]_4-\text{Lys}_2\text{Lys}-$

Az oximkémia nem csupán a dimer és tetramer elágazó konstrukciók előállítására, ha-
nem oktamer elágazó konstrukciók összeállítására is alkalmas [Rose: J. Am. Chem. Soc. 116,
30 (1994); Rose és mtsai.: Bioconj. Chem. 7, 552 (1996)]. Ilyen célra természetesen - ilyen
30 pPEG-poliamidok alkalmazása esetén - egyéb kémiai módszerek alkalmazására is lehetőség
van (ld. pl. a 13. ábrát). Ezen túlmenően, a poliamid-képzés az Fmoc- vagy Boc-kémiát magá-
ban foglaló peptidszintetizálási sémában is alkalmazható, de tekintettel kell lenni arra, hogy az
aminolízises lépés eltávolítja az Fmoc-csoportot és eltávolítja az indol formil-védelmét (ha

Boc-kémiát kívánunk alkalmazni).

Ennek megfelelően, az ilyen pPEG-ek különböző elágazódási magok (pl. lizin elágazási mag, stb.) beiktatásával állíthatók elő, mely elágazási magvak választott kötésekkel (pl. amid-, tioéter-, oximkötés és hasonló) kapcsolódnak egy lineáris, vízben oldható poliamidhoz [pl. -(Succ-TTD)_n-, stb.], ahol az egyes lineáris, vízdékony poliamidok szabad végeinek mindegyikéhez - kívánt töltés kialakítása céljából - egy kívánt toldalékcsoport (pl. karboxilát, amino, amid, stb.) kapcsolható ("capping"). Ezen túlmenően, a találmány szerinti lineáris és elágazó pPEG-ek előállíthatók oly módon is, hogy - egy vagy több egyedi és kölcsönösen reaktív funkciós csoportot tartalmazó szintetikus proteinhez kapcsolható - egyedi funkciós csoportot tartalmazzanak, és a pPEG-ek toldalékcsoportjai előnyösen ne legyenek antigénsajátságúak (ld. pl. 13. ábra).

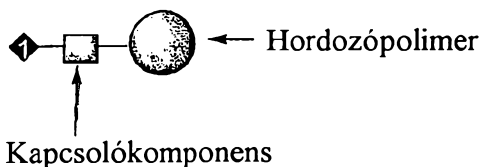
A találmány egy különösen előnyös megvalósítási módja értelmében a találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek molekulárisan homogén, vízben oldható, gliko-utánzó polimerekkel módosítjuk, mely polimerek a következő általános képlettel írhatók le:



ahol U jelentése: egyedi funkciós csoport; B jelentése elágazódási mag, amely jelen van vagy hiányzik, és három vagy több - azonos vagy különböző - elágazódási kart tartalmaz; "Polimer" jelentése: kb. 5 kD-nál nagyobb molekulatömegű poliamid, amely a következő általános képletek valamelyikével írható le: $-[C(O)-X-C(O)-NH-Y-NH]_n-$ vagy $-[NH-Y-NH-C(O)-X-C(O)]_n-$ (ahol X és Y jelentése: azonos vagy különböző, elágazó vagy lineáris kétértékű gyök, és "n" értéke: 2 és 50 közötti egész szám); és ha X és Y lényegében nem antigénhatású, lineáris vagy elágazó, vízdékony ismétlődő egységet tartalmaz, úgy J* jelentése: lényegében nem antigénhatású toldalékcsoport, amely fiziológiai körülmények között negatív, pozitív vagy semleges nettó töltésű; és s1, s2 és s3 jelentése: távtartó- vagy kapcsolókomponensek, melyek egyformák vagy különbözők, és egymástól függetlenül jelen lehetnek vagy hiányozhatnak. Az ilyen polimerek közé tartoznak a 60/236,377 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben feltárt polimerek (mely forrást teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintünk). A fenti U-s1-B-s2-Polimer-s3-J* általános képlet az U-B-Polimer-J* általános képlettel is leírható, amelyben az s1, s2 és s3 távtartó- vagy kapcsolókomponensek jelen vannak vagy hiányoznak.

A találmány szerinti gliko-utánzó polimerek előállítási eljárásait az 5-7. ábrákon szemléltetjük. Az 5/A és 5/B ábrán a találmány szerinti U-B-Polimer-J* általános képletű,

vízben oldható polimer elágazási magjának (B) és egyedi kemoselektív funkciós csoportjának (B) szilárd fázisú előállítási eljárását mutatjuk be. Az eljárás oldatban is végrehajtható, azonban a szilárd fázisú módszer előnyösebb. Az 5/A ábrán kiindulási vegyületként az ortogonálisan védett U-B-prekurzort tüntettük fel, amely reaktív csoportot tartalmaz (—◆) és az ilyen konstrukciók alapvető geometriai szerkezetét vonalakkal egymáshoz kapcsolt fekete pontokkal jelöltük: (● —●) Ezt a geometriai szerkezet nem jelenti az alkalmazható kémiai kötések vagy csoportok típusainak korlátozását, csupán a találmány szerinti U-B-molekularészek előállítására alkalmas építőstruktúrák geometriájának relatív pontjait és a kémiai feldolgozási pontokat szemlélteti. Az ortogonálisan védett U-B-prekurzort - megfelelő, hasítható kapcsolókomponenst és kölcsönösen reaktív csoportot (—◆) (amely aktiválást követően képes az U-B-prekurzorhoz kovalens kötést kialakítani) tartalmazó - hordozópolimerhez/gyantához kapcsoljuk.



Ebben a rendszerben a polimer-segítette szerves kémiai technikák alapelveit alkalmazzuk. A kapcsolás után az elágazási mag kidolgozása következik (az ábrán csak egy elágazási magot tüntettünk fel, azonban további elágazódási magok is jelen lehetnek), miáltal a kívánt "Polimer"-komponens (pl. lényegében nem antigénhatású, vízben oldható polimer) kapcsolására alkalmas elágazási magot kapjuk. Feltüntettük az U-csoportot is, amely a szintézis kezdetén, az ortogonálisan védett U-B-prekurzor részleteként prezentálható, illetve az elágazási mag (B) kidolgozása során (vagy azt követően) alakítható ki. Bár a "Polimer"-komponens kapcsolása még a gyantáról történő lehasítás előtt is elvégezhető, az előnyös eljárás szerint az U-B-komponenst először lehasítjuk a hordozópolimerről/gyantáról, miáltal egy U-B-magot kapunk, amelyhez tisztítást követően hozzákapcsoljuk a "Polimer"-komponenst.

Ahogy az ábrán látható, a B-mag függő elágazási pontjai úgy vannak kialakítva, hogy - azonos vagy különböző - funkciós csoportot ("Func") tartalmazzanak, és reverzibilis védőcsoportokkal (PG, PG' vagy PG' ') lehetnek ellátva vagy védőcsoport nélküliek lehetnek. A "Polimer"-komponens kapcsolását jelentő utolsó lépés mindegyik esetben a függő elágazási pontokon egy funkciós csoport ("Func") létrehozása, illetve az U-csoport kialakítása (ld. 7. ábra). Az 5/B ábrán egy alternatív eljárást mutatunk be, melynek során egy védett U-B-prekurzort egy kapcsolókomponenst tartalmazó hordozópolimerrel kombinálva alkalmazzuk.

Az 5/B ábrán egy előre összeállított B elágazási mag hordozópolimerhez történő kapcsolását, és az U-csoportot létrehozó gyanta U-B-komponens előállítására történő alkalmazását is bemutatjuk (mely U-B-komponens a "Polimer"-komponens későbbi kapcsolására alkalmas).

A 6/A-6/D ábrákon a találmány szerinti előnyös, lényegében nem antigénhatású, vízben oldható "Polimer-J*" poliamid-komponensek (melyek az U-B-maghoz történő későbbi kapcsolásra alkalmazhatók) előállításának szilárd fázisú eljárását szemléltetjük. Bár az ábrákon a szilárd fázisú eljárást mutatjuk be (amely a találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös eljárást reprezentálja), azonos végeredmény eléréséhez oldat fázisú eljárás is adaptálható. Ahogy a 6/A és 6/B ábrán bemutatjuk, a disav- és diamino-egységeket szilárd fázisú szerves kémiai alapelvek alkalmazásával kapcsoljuk egymáshoz. A védett amino-X'-sav és/vagy amino-Y'-sav egységeket - az $[\text{NH}-\text{Y}-\text{NHCO}-\text{X}-\text{CO}]$ - általános képletű poliamid-szerkezettel bíró - végső hasítási termében az X- és Y-csoport további diverzitása érdekében építhetjük be. A 6/A ábrán N-terminális $\rightarrow$ C-terminális irányban végzett szintézist, míg a 6/B ábrán a C-terminális $\rightarrow$ N-terminális irányban végzett szintézist szemléltetjük. A 6/C és 6/D ábrán bemutatott eljárás szerint a védett amino-X'-sav és/vagy amino-Y'-sav egységeket szilárd fázisú szerves kémiai alapelvek alkalmazásával kapcsoljuk egymáshoz. A 6/C ábrán az N-terminális $\rightarrow$ C-terminális irányban végzett szintézist, míg a 6/D ábrán a C-terminális $\rightarrow$ N-terminális irányban végzett szintézist szemléltetjük. Ahogy a 6/A-6/D ábrákon bemutatottak alapján látható, a végeredményként kapott poliamid-termék természete - a szintézis ciklusainak számától függően - pontosan kontrollálható. Ezen túlmenően, a J* toldalékcsoport gyakorlatilag bármely felhasználó által meghatározott specifikációhoz hozzáépíthető. A monodiszperz X, Y, X' és Y' ismétlődő egységek alkalmazása esetén pontosan szabályozható a poliamid-végtermék pontos molekuláris szerkezete.

Az U-B-komponens Polimer-J*-komponenshez történő - találmány szerinti U-B-Polimer-J* általános képletű, előnyös szintetikus polimer-konstrukciókat eredményező - kapcsolásának előnyös eljárását a 7. ábrán mutatjuk be. Ahogy az ábrán látható, az adott konstrukció tervezett végfelhasználásától függően - különböző védőcsoportok alkalmazhatók. Bemutatjuk továbbá a kívánt U-B-Polimer-J*-konstrukciók előállításának eltérő módszereit (köztük a szilárd fázisú és az oldat fázisú megközelítést).

Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös, vízben oldható ismétlődő egységek polialkilén-oxidot, poliamid-alkilén-oxidot vagy ezek származékait tartalmazzák. A legelőnyösebb vízdékony ismétlődő egység $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})-$ vagy

-(CH₂-CH₂-O)- képletű etilén-oxidot tartalmaznak. A vízdékony ismétlődő egységek száma
tág határok közt változhat, azonban az ilyen egységek száma előnyösen 2-től 500-ig, 2-től
400-ig, 2-től 300-ig, 2-től 200-ig, 2-től 100-ig, 2-től 50-ig, még előnyösebben 2-től 32-ig, leg-
előnyösebben 3-tól 8-ig terjedhet. Egy még előnyösebb megvalósítási mód szerint X és Y kö-
5 zül az egyik vagy mindkettő jelentése: -((CH₂)_{n1}-(CH₂-CH₂-O)_{n2}-(CH₂)_{n1})- vagy -((CH₂)_{n1}-(O-
CH₂-CH₂)_{n2}-(CH₂)_{n1})-, ahol "n1" értéke: 1-6, 1-5, 1-4, legelőnyösebben 1-3; és "n2" értéke: 2-
50, 2-25, 2-15, 2-10, 2-8, legelőnyösebben 2-5. Az egyik különösen előnyös megvalósítási
mód szerint X jelentése: -(CH₂-CH₂)-, és Y jelentése: -(CH₂-(CH₂-CH₂-O)₃-CH₂-CH₂-CH₂)-
vagy -(CH₂-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂)-. Még előnyösebben azok a monodiszperz készí-
10 mények, amelyekben minden egyes "n" értéke: diszkrét egész szám. Egy rendkívül előnyös
megvalósítási mód szerint X jelentése: -(CH₂-CH₂)-, és Y jelentése: -(CH₂-(CH₂-CH₂-O)₃-
CH₂-CH₂-CH₂)_n- vagy -(CH₂-CH₂-CH₂-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂)_n-, ahol "n" értéke 12-36.

Közelebbről, a "Polimer" előnyös megvalósítása esetén, ha a vízben oldható polimer
polialkilén-oxid ismétlődő egységeket (úgy mint etilén-oxid ismétlődő egységeket) tartalmazó
15 polimerláncot tartalmaz, akkor előnyös, ha az egyes láncok molekulatömege kb. 1,5 kD és kb.
42 kD közötti, még előnyösebben kb. 2 kD és 20 kD közötti érték.

Az előnyös U-csoport kémiai ligálásra alkalmas gyököt tartalmaz. A találmány szerinti
megoldás szempontjából előnyös polimerek elágazók, és a B-csoport három vagy több atomból
áll. A J*-komponens előnyösen olyan csoport, amely fiziológiai feltételek mellett ionizálható
20 (legelőnyösebben negatív töltésű). Az U- és J-komponens bármelyike (vagy mindkettő) tartal-
mazhat védőcsoportot, amely a konstrukció integritásának károsítása nélkül eltávolítható.

Az előnyös távtartó- vagy kapcsolókomponensek közé lineáris vagy elágazó moleku-
larészek tartoznak, amelyek egy vagy több - vízben oldható polimerben alkalmazható - ismét-
lődő egységet tartalmaznak, így pl. diamino- és/vagy disav-egységeket, természetes vagy nem
25 természetes aminosavakat vagy származékaikat, továbbá alifás gyököket (alkil-, aril-, heteroal-
kil-, heteroaril-, alkoxi- és hasonló gyököket, melyek előnyösen legfeljebb 18 szénatomosak)
vagy akár egy további polimerláncot.

Ahogy fentebb említettük, az U-komponens olyan funkciós csoport, amely egy cél-
molekulához (pl. peptidhez vagy polipeptidhez vagy egyéb felülethez) kapcsolható (vagy ahhoz
30 van kapcsolva). Ha az U-komponens egy célmolekulához történő konjugálásra alkalmas funk-
ciós csoport, úgy nukleofil vagy elektrofil csoportot tartalmaz, míg a célmolekula azzal köl-
csönösen reaktív elektrofil vagy nukleofil csoportot hordoz.

Számos ilyen kölcsönösen reaktív funkciós csoport ismert, melyek képesek a peptidekre és polipeptidekre általánosan jellemző oldallánc funkciós csoportokhoz (vagy derivatizált oldallánc funkciós csoportokhoz) történő kapcsolódásra [ld. Zalipsky és mtsai.: Bioconjugate Chemistry 6, 150 (1995); "Perspectives in Bioconjugate Chemistry", szerkesztő: C. F. Meares, ACS (1993); "Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking", szerkesztő: S.S. Wong, CRC Press, Inc. (1993)]. Az aminocsoporttal reagálóképes funkciós csoportok példái a következők: (a) karbonátok, pl. p-nitro-fenilcsoport vagy szukcinimidilcsoport; (b) karbonil-imidazol; (c) azlaktonok; (d) ciklikus imid-tionok; és (e) izocianátok vagy izotiocianátok. A karboxilcsoportokkal és reaktív karbonilcsoportokkal reagálóképes funkciós csoportok példái: (a) primer aminok; és (b) hidrazin és hidrazid funkciós csoportok, úgymint az acilhidrazidok, karbazátok, szemikarbamátok, tiokarbazátok, aminosavcsoport, stb. A merkaptó- vagy szulfhidrilcsoporttal reagálóképes funkciós csoportok közé tartoznak a fenil-glioxálok, maleimidek és a halogének. A hidroxilcsoportokkal, például, (karbon)savakkal vagy egyéb - elektrofil centrummal reagálóképes - nukleofil csoportokkal reagálni képes funkciós csoportok jellemző példáiként említhetők a következők: hidroxilcsoport, aminocsoport, karboxilcsoport, tiolcsoport, aktív metilénecsoport és hasonló.

Például, a fenti polimer előállítható oly módon, hogy az U-komponenst egy célmolekulához történő kapcsolásra alkalmas funkciós csoportként tartalmazza, ahol is a funkciós csoport akrilát, aldehid, keton, amino-oxi, amin, karbonsav, észter, tioészter, halogén, tiol, cianoacetát, dipalmitoil-foszfátidil-etanolamin, disztearoil-foszfátidil-etanolamin, epoxid, hidrazid, azid, izocianát, maleimid, metakrilát, nitrofenil-karbonát, ortopiridil-diszulfid, szilán, szulfhidril, vinilszulfonok, szukcinimidil-glutarát, szukcinimidil-szukcinát, borostyánkősav, trezilát és hasonló. Az U-komponens aktiválható alakban, pl. karbonsav formájában is előállítható, amely - nukleofil reagenssel, pl. aminnal reagálóképes - aktív észterre alakítható.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében a vízben oldható polimer U-komponense egy célmolekulán elhelyezkedő egyedi funkciós csoporttal szelektíven reagálóképes, egyedi funkciós csoport. A találmány e szempontja értelmében a peptidszintézis (védőcsoport-stratégiák) és a kémiai ligálás (részlegesen védett vagy védőcsoport nélküli stratégiák) alapelveit alkalmazzuk (ld. a fenti (II) szakaszt). Ennek megfelelően, az U-komponens igen különböző funkciós csoport lehet (pl. a fentebb felsoroltak). A találmány e megvalósítási módja szempontjából előnyös U-csoportok a következő kapcsolási eljárásokban alkalmazhatók: aminbefogási stratégiák (pl. hemiamin-képzéssel, iminképzéssel vagy Michael-féle addícióval végzett ligálás); tiolbefogási stratégiák (pl. merkaptidképzéssel vagy diszulfidcserével végzett

ligálás); natív kémiai ligálási stratégiák (pl. ligálás tioészter-cserével, cisztein vagy tioltartalmú oldallánc aminosav-származék bevonásával) és ortogonális ligálási kapcsolási stratégiák fogékony csoportok (pl. ligálás tiazolidinképzéssel, tioésztercserével, tioészterképzéssel, diszulfid-cserével és amidképzéssel); ld. pl. Coltart, D. M.: *Tetrahedron* **56**, 3449 (2000)]. A találmány e megvalósítási módja szempontjából különösen előnyös U-csoport olyan egyedi funkciós csoport, amely alkalmas a vizes közeggel kompatibilis kémiai ligálási eljárásban (ld. a fentebb leírt (II) szakaszt) történő felhasználásra. Ennek megfelelően, az U-csoport karbonátkötés, észterkötés, uretánkötés, ortoészterkötés, amidkötés, aminkötés, oximkötés, imidkötés, karbamidkötés, tiokarbamidkötés, tioéterkötés, tiouretánkötés, tioészterkötés, éterkötés, tiazolidinkötés, hidrazonkötés, oxazolidinkötés és hasonló, előnyösen oximkötés vagy amidkötés kialakítására képes funkciós csoport lehet.

Ahogy fentebb említettük, a találmány szerinti, U-s1-B-s2-Polimer-s3-J* általános képletű polimer-konstrukcióban B jelentése: elágazási mag, amely három vagy több karból áll, és amely a konstrukcióban jelen van vagy hiányzik. Ha a B-komponens jelen van, egyik karja az U-komponenshez - vagy az U-komponenshez kapcsolt távtartó- vagy kapcsolókomponenshez kötődik, míg a többi karja a "Polimer"-komponenshez vagy az ahhoz kapcsolt távtartó- vagy kapcsolókomponenshez csatlakozik. A B elágazási magvak jellemző példái közé tartozik, többek között, az aminocsoport, amidcsoport, karboxilcsoport és ezek kombinációi. Ezek között említhetők a lizin oligoamidjai és hasonló, vagy az alkéndiaminokból és akrilsavból előállított oligomerek ("poliamidoaminok"), mely utóbbiak az elágazási magban nettó pozitív töltést eredményeznek [ld. pl. Zeng és mtsai.: *J. Pept. Sci.* **2**, 66 (1996); Rose és mtsai.: *Bioconjugate Chem.* **7**(5), 552 (1996); NovoBiochem katalógus és peptidszintézis kézikönyv (Laufelfingen, 2001); Wells és mtsai.: *Biopolymers* **47**, 381 (1998); Mahajan és mtsai.: **40**, 4909 (1999); Judson és mtsai.: **39**, 1299 (1998); Swali és mtsai.: **62**, 4902 (1997); valamint az 5 932 462, 5 919 455, 5 643 575 és 5 681 567 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírások]. A szóban forgó konstrukciókban számos egyéb elágazási mag is alkalmazható, így például, szubsztituált diaminok, szubsztituált disavak, alkilsavak (pl. glicerin) és egyéb - három vagy több funkciós csoportot vagy aktiválható csoportot (így pl. többértékű alkilcsoportot, arilcsoportot, heteroarilcsoportot, alkoxics csoportot és hasonlókat) tartalmazó - csoportok, valamint az oligoszacharidok [lásd például: Nierengarten és mtsai.: *Tetrahedron Lett.* **40**, 5681 (1999); Matthews és mtsai.: *Prog. Polym. Sci.* 1-56 (1998); Suner és mtsai.: *Macromolecules* **33**, 253 (2000); Fischer és mtsai.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 884 (1999); Sunder és mtsai.: *Adv. mater.* **12**, 235 (2000); Mulders és mtsai.: *Tetrahedron Lett.* **38**, 631 (1997); Mulders és mtsai.:

Tetrahedron Lett. 38, 30 (1997); és Turnbull és mtsai.: Chembiochem. 1(1), 70 (2000)]. A "Polimer"-komponenshez kötött elágazási mag legelőnyösebben amidkötésekkel kapcsolódik.

A találmány szerinti megoldás szempontjából előnyös elágazási magvak aminocsoportból, karboxilcsoportból, illetve vegyes amino és karboxil funkciós csoportból származnak.

- 5 Az előnyös elágazási magvak jellemző példáiként említhetők a lizin amino-magvak, aszparaginsav vagy glutaminsav elágazási magvak és a gamma-glutaminsav elágazási magvak. Ezen túlmenően, a találmány szerinti megoldás szempontjából azok az elágazó polimer-konstrukciók előnyösek, amelyekben az elágazás egyetlen elágazási magból (pl. oligoamid vagy poliamidoamin magból) ered, azonban az elágazó konstrukciók egyéb fajtái is alkalmazhatók, így például
- 10 a férégszerű struktúrák, amelyekben az elágazás egy polimergerinc mentén elosztva elhelyezkedő elágazási magvak sorozatából indul ki [ld. Schlüter és mtsai.: Chem. Int. Ed. 39, 864 (2000)]. Az ilyen férégszerű struktúrák - a polimergerinc és az ismétlődő egységek kémiai összetételétől és/vagy nagyságától függően - vízdékonynak vagy folyadékkristályszerkeződés indukálására hajlamosnak tervezhetjük [Quali és mtsai.: Macromolecules 33, 6185 (2000)], ami
- 15 a célbajuttatás, stabilitás és hatásuk időtartama szempontjából lehet előnyös. A találmány szerinti egyéb elágazó polimer-konstrukciókhoz hasonlóan, a férégszerű konstrukciókat úgy állítjuk elő, hogy tartalmazzanak egy "U"-komponenst tartalmazó toldalék funkciós csoportot.

- A "Polimer"-komponens (vagy a távtartó- vagy kapcsolókomponensek közül egy vagy több) biostabil vagy biológiailag lebontható polimerláncot vagy közbeiktatott kapcsoló-
- 20 komponenseket vagy kötéseket tartalmazhat [ld. pl. az (I) szakaszban leírtakat]. Ahogy azt az (I) szakaszban szintén leírtuk, a J*-komponens egy olyan toldalékcsoport, amely fiziológiai körülmények között nettó - negatív, pozitív vagy semleges - töltéssel bír. Legelőnyösebb esetben J* jelentése: ionizálható karboxilátgyök, és fiziológiai feltételek mellett nettó negatív töltésű.
- Az s1-, s2- és s3 komponensek egyforma vagy különböző távtartó- vagy kapcsolókomponensek, amelyek - egymástól függetlenül - jelen lehetnek vagy hiányozhatnak [ld. az (I) szakaszban
- 25 leírtakat]. A távtartó- vagy kapcsolókomponens legelőnyösebben olyan polimerlánc, amely egy vagy több $[-CO-X-CO-NH-Y-NH]_n$ általános képletű ismétlődő egységet tartalmaz.

IV) Gyógyászati készítmények

- A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek különféle betegségek és állapotok gyógykezelésére szolgáló gyógyszer-hatóanyagként
- 30 alkalmazhatók. Ennek megfelelően, a találmány egy következő megvalósítási módja értelmében gyógyászati készítményeket tárunk fel, amelyek találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint vagy gyógyászati szempontból elfogadható sóját tartalmazzák. A találmány

szerinti gyógyászati készítmények egy vagy több segédanyagot is tartalmazhatnak, melyek elő-
nyös például pufferek, hordozóproteinek, aminosavak, detergensok, lipidek, vízben oldható
polimerek és tartósítószerke említhetők. A gyógyászati készítmények - a szintetikus
erythropoiesis-stimuláló proteinen kívül - egy vagy több további bioaktív hatóanyagot (pl. kis
5 molekulatömegű szerves molekulákat, egyéb proteingyógyszereket, stb.) is tartalmazhatnak.
Az ilyen gyógyászati készítmények a találmány szerinti előnyös eljárásokban - például, az em-
lősök vörösvérsejt-termelésének, hematokrit-értékének, hemoglobin- és retikulocita-számának
növelésére irányuló eljárásokban - alkalmazhatók. Ezek az eljárások egy találmány szerinti
szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein kívánt eredmény elérésére hatásos mennyiségének
10 emlősnek történő adagolását foglalják magukban.

A találmány szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló polipeptidek és/vagy protei-
nek, legelőnyösebben, hatóanyag-célbajuttató rendszer alkalmazásával adagoljuk a páciensnek.
Az ilyen rendszerek alkalmazásával a hatóanyag a páciens számára elfogadható - és a kívánt
bioaktivitás hatékonyságát fokozó - módon prezentálható a páciensnek. A találmány céljaira
15 előnyös hatóanyag-célbajuttató rendszerek példáulként említhetők a polipeptidek vagy proteinek
orálisan, nazálisan vagy inhalálás útján, intramuszkulárisan, szubkután, transzdermálisan,
intravénásan, intraorálisan vagy intraocularisan történő adagolására alkalmas rendszerek.

Az ilyen hatóanyag-célbajuttató rendszerek példái a hatóanyag helyspecifikus felsza-
badulását vagy a belek nyálkahártyájának védelmét biztosító készítmények. Az alkalmas ké-
szítmények közé tartoznak, például, a száraz por alakú készítmények, vírusrészecske tokba zá-
20 rásán alapuló készítmények, liposzóma-alapú készítmények, transzdermális tapaszok, továbbá
ide tartoznak az elektromosan segített módszerek (elektroporációs terápia) és a polimer/niazon
konjugáció.

A találmány egy előnyös megvalósítási módja értelmében az ilyen hatóanyag-
célbajuttató eszközök reagálnak a biológiai környezet változásaira, és a hatóanyagokat e válto-
25 zások alapján szabadítják fel (vagy nem szabadítják fel) a szervezetben. A drogok és egyéb ak-
tív hatóanyagok felszabadításának szabályozására számos különféle anyagot alkalmaztak, me-
lyek például a következők: poliuretánok, polisziloxánok, poli(metil-metakrilát), polivinilalkohol
(hidrofilításhoz és szilárdsághoz), polietilén, polivinilpirrolidon, poli(2-hidroxi-etil-metakrilát),
30 poli(n-vinilpirrolidon), poli(metilmetakrilát), polivinilalkohol, poliakrilsav, poliakrilamid,
poli(etilén-ko-vinilacetát), polietilén-glikol, polimetakrilsav, stb. A találmány egy másik előnyös
megvalósítási módja értelmében a hatóanyag-célbajuttatásra biológiailag lebontható polimere-
ket alkalmazunk. Az ilyen polimerek közé tartoznak a polilaktidok (PLA), poliglikolidok

(PGA), poli(laktid-ko-glikolidok) (PLGA), polianhidridek és poliortoészterek. A hatóanyag-célbajuttató rendszerek és alkalmazási eljárásaik leírását illetően ld. pl. a következő egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat: 6 072 041; 6 041 253; 6 018 678; 6 017 318; 6 002 961; 5 879 712; 5 849 331; 5 792 451; 5 783 121; 5 766 633; 5 759 566; 5 690 954; 5 681 811; 5 5 654 000; 5 641 511; 5 438 040; 4 810 499; és 4 659 558.

Ennek megfelelően, a találmány egy következő szempontja értelmében gyógyászati készítményeket és eljárásokat tárunk fel rászoruló emlősök kezelésére, mely eljárások a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek vagy gyógyászati szempontból elfogadható sóik hatásos mennyiségének emlősöknek történő adagolásán alapulnak. A "gyógyászati szempontból elfogadható só" kifejezésen olyan sót értünk, amely megtartja a találmány szerinti polipeptid biológiai tulajdonságait és hatékonyságát, ugyanakkor, biológiai vagy egyéb szempontból nem káros. Az ilyen sók savakból vagy bázisokból származhatnak. A savaddíciós sók szervesen savakból [pl. sósavból, hidrogén-bromidból, kénsavból (szulfát és hidrogén-szulfát sók), salétromsavból, foszforsavból és hasonlókból], illetve szerves savakból (például, ecetsavból, propionsavból, glikolsavból, piruvátsavból, oxálsavból, almasavból, malonsavból, borostyánkősavból, maleinsavból, fumársavból, borkősavból, citromsavból, benzoésavból, fahéjsavból, mandulasavból, metánszulfonsavból, etánszulfonsavból, szalicilsavból, p-toluolszulfonsavból, stb.) származtathatók. A bázisaddíciós sók származhatnak szervesen bázisokból (pl. nátrium-, kálium-, lítium-, ammónium-, kalcium-, magnéziumsók és hasonlóak), illetve szerves bázisokból [pl. primer, szekunder és terciér aminokból, szubsztituált aminokból (ideértve a természetben előforduló szubsztituált aminokat), ciklikus aminokból (ideértve az izopropilamint, trimetilamint, dietilamint, trietilamint, tripropilamint, etanolamint, 2-dimetil-aminoetanolt, trometamint, lizint, argint, hisztidint, koffeint, prokaint, hidrabramint, kolint, betaint, etiléndiamint, glükózamint, N-alkilglükaminokat, teobromint, purinokat, piperazint, piperidint, N-etilpiperidint és hasonlókat)].

Ahogy a leírásban használjuk, a "kezelés" kifejezésen egy betegség vagy állapot (pl. anaemia) emlősben, elsősorban emberben történő kezelésére vonatkozik és a következőket foglalja magában: (i) egy betegségre fogékony, de annak jelenlétével még nem diagnosztizált páciensben az betegség vagy állapot kialakulásának megelőzése; (ii) a betegség vagy állapot gátlása, vagyis kifejlődésének megakadályozása; (iii) a betegség vagy állapot enyhítése, vagyis regressziójának elősegítése vagy tüneteinek mérséklése.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, az "emlősök erythropoiesis-stimuláló proteinnel végzett kezeléssel megelőzhető vagy enyhíthető betegsége" kifejezésen olyan beteg álla-



potokat értünk, amelyekről általánosan elismert, hogy erythropoiesis-stimuláló proteinnel hatá-
sosan kezelhető, továbbá ide tartoznak az olyan beteg állapotok is, amelyekről bebizonyoso-
dott, hogy a találmány szerinti vegyületekkel végzett kezeléssel sikeresen megelőzhetők vagy
csillapíthatók. Az ilyen betegségek közé tartoznak, többek között, a következők: anaemia, bé-
5 ta-thalassaemia, vészes vérszegénység, sarlósejtes vérszegénység, krónikus bakteriális
endocarditis, osteomyelitis, fiatalkori rheumatoid arthritis, reumás láz, Crohn-kór, fekélyes
vastagbélgyulladás és hasonló.

Ahogy a találmány leírásában használjuk, a "terápiás szempontból hatásos mennyiség"
kifejezésen egy polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein azon
10 mennyiségét értjük, amely rászoruló emlősnek adagolva elégséges a betegség hatékony kezelé-
sére (meghatározását ld. fentebb), például, a vörösvértest-termelődés indukálásával, anaemia
elleni hatóanyagként, stb. A "terápiás szempontból hatásos" mennyiséget alkotó mennyiség az
adott proteinszármazéktól, a kezelni kívánt állapot vagy betegség természetétől és súlyossá-
gától, a kezelni kívánt emlőstől, testtömegétől, életkorától és hasonló tényezőktől függ. A te-
15 rápiás szempontból hatásos mennyiség szakember számára rutinszerűen meghatározható.
Ahogy itt használjuk, a "kellő mennyiség" kifejezésen egy adott funkció eléréséhez szükséges
mennyiséget értünk (pl. egy oldat kívánt térfogatra, pl. 100 ml-re történő kiegészítéséhez szük-
séges mennyiséget).

A találmány szerinti, polimerrel modifikált, szintetikus erythropoiesis-stimuláló pro-
20 teinek és gyógyászati szempontból elfogadható sóikat (azaz az aktív hatóanyagokat) terápiás
szempontból hatás dózisban, vagyis olyan mennyiségben adagoljuk, amely a kezelésre rászor-
uló emlősnek beadva elégséges az adott betegség hatékony kezelésére. A találmány szerinti
szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek adagolását a hasonló alkalmazási területű ható-
anyagok beadására elfogadott módszerek bármelyikével végrehajthatjuk. Ahogy itt használjuk,
25 a "találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein", a
"találmány szerinti polipeptidek gyógyászati szempontból elfogadható sói" és az "aktív össze-
tevő" kifejezéseket egymással felcserélhető módon (egymás szinonimáiként) alkalmazzuk.

A készítményben a polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protei-
nek mennyisége az általánosan alkalmazott tartományon belül változhat, így pl. a protein-
30 antagonistá vagy -agonista a készítmény kb. 0,01 tömeg%-tól kb. 99,99 tömeg%-ig terjedő
hányadát, a segédanyagok pedig kb. 0,01 tömeg%-tól kb. 99,99 tömeg%-ig terjedő hányadát
tehetik ki. A készítményekben a polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló
proteinek, még jellemzőbben, kb. 0,5 tömeg% és kb. 80 tömeg% mennyiségben lehetnek jelen.

Bár a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek emberek kezelésére alkalmas dózisszintje még meghatározásra vár, a vegyület beadható mennyisége, természetesen, a kezelni kívánt páciensről és a megelőzni vagy csillapítani kívánt betegségtől, a betegség természetétől vagy súlyosságától, az adagolás módjától és sémájától, illetve a kezelőorvos megítélésétől függ. A felhasználási ilyenfajta optimalizálása szakember hatáskörébe tartozik.

Az adagolást az elfogadott szisztémás vagy lokális módszerek bármelyikével végrehajthatjuk, így például, parenterálisan, orálisan (különösen csecsemőknek szánt készítmények esetében), transzdermálisan vagy topikusan, szilárd, félszilárd, folyékony vagy aeroszol dózisalakokban, melyek például a következők: tabletták, pirulák, kapszulák, porok, folyadékok, oldatok, emulziók, injektálható készítmények, szuszpenziók, végbélkúpok, aeroszolak és hasonlóak. A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek tartós vagy kontrollált hatóanyag-felszabadulást biztosító dózisalakok [pl. depóinjekciók, ozmózis-pumpák, pirulák, transzdermális (pl. elektrotranszport) tapaszok és hasonlóak] alkalmazásával is adagolhatók, ami (előnyösen pontos dózisok egyszeri beadásra alkalmas egységdózisalakban) biztosítja a polipeptid előre meghatározott sebességű, hosszú időtartamú célbajuttatását. A készítmények a gyógyszerészeti gyakorlatban általánosan alkalmazott hordozókat vagy segédanyagokat és találmány szerinti protein-antagonistát vagy -agonistát, valamint egyéb gyógyászati és gyógyszer-hatóanyagokat, hordozókat, adjuvánsokat és hasonlókat tartalmazhatnak. Hordozóként különféle olajok, így pl. kőolajeredetű olajok, állati, növényi vagy szintetikus eredetű olajok (pl. földimogyoróolaj, szójababolaj, ásványi olaj, szezámolaj és hasonlóak) alkalmazhatók. Folyékony hordozóként - különösen injektálható oldatok készítéséhez - előnyösen vizet, sóoldatot, vizes dextrózoldatot és glikolokat alkalmazhatunk. A hasznos gyógyszerészeti hordozók közé tartozik a keményítő, cellulóz, talkum, glükóz, laktóz, szacharóz, zselatin, maltóz, rizs, liszt, kalcium-karbonát, szilikagél, magnézium-sztearát, nátrium-sztearát, glicerín-monosztearát, nátrium-klorid, tejpor, glicerín, propilén-glikol, víz, etanol és hasonlóak. A gyógyászati szempontból elfogadható hordozók és készítményeik további leírását illetően ld. E. W. Martin: "Remington's Pharmaceutical Sciences".

A gyógyászati készítmények, kívánt esetben, minimális mennyiségű nem toxikus kiegészítőanyagokat (pl. detergenset vagy emulgeálószeret, puffereket és hasonlókat, például, nátrium-acetátot, szorbitán-monolaurátot, trietanolamint, stb.) is tartalmazhatnak.

Bár az aktív összetevőből többre is szükség lehet, a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek célbajuttatására orális adagolást alkal-



mazhatunk, amit - az elérni kívánt megelőzési szintnek vagy a betegség enyhítése kívánt mértékének megfelelően - szokványos napi adagolási séma szerint hajthatunk végre. Az orális adagolás céljaira alkalmas, gyógyászati szempontból elfogadható, nem toxikus készítmények a szokványosan alkalmazott segédanyagok (például, gyógyszerészeti tisztaságú mannitol, laktóz, keményítő, povidon, magnézium-sztearát, nátrium-szaccharin, talkum, cellulóz, croscarmellose-nátrium, glükóz, zselatin, szacharóz, magnézium-karbonát és hasonló) felhasználásával állíthatók elő. Az ilyen készítmények oldatok, szuszpenziók, diszpergálható tabletták, pirulák, kapszulák, porok, tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító készítmények és hasonló alakjában állíthatók elő. Az orális adagolásra szánt készítmények különösen a gyomor-bélrendszeri rendellenességek kezelésére alkalmasak. Általános szisztémás célokra az orálisan adagolt hatóanyagok biológiai hozzáférhetősége a keringésbe történő felvételt javító segédanyagok (pl. acetilált aminosavak) alkalmazásával szabályozható (ld. pl. az 5 935 601 és 5 629 020 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat).

A kapszula, pirula vagy tableta alakjában előállított készítmények - az aktív összetevő mellett - a következő komponenseket tartalmazhatják: diluendum, pl. laktóz, szacharóz, dikalcium-foszfát és hasonló; szétesést elősegítő anyag, pl. croscarmellose-nátrium, keményítő vagy származékai; lubrikáns, pl. magnézium-sztearát és hasonló; kötőanyag, pl. keményítő, polivinilpirrolidon, gumiarábikum, zselatin, cellulóz és származékai, stb.

A folyékony gyógyászati készítmények a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein - és, adott esetben, megfelelő adjuvánsok és tartósítószer - hordozóban (például, vízben, sóoldatban, vizes dextrózoldatban, glicerinben, glikolokban, etanolban és hasonlóban) történő oldásával, diszpergálásával, stb. állíthatók elő, oly módon, hogy az aktív hatóanyagot kb. 0,5-20 % koncentrációban tartalmazó oldatot vagy szuszpenziót kapjunk. Kívánt esetben a beadásra szánt gyógyászati készítmény, csekély mennyiségben, nem toxikus kiegészítő anyagokat [pl. detergenset, szuszpendálószeret, emulgeálószeret vagy szolubilizálószeret, puffereket és hasonlókat (pl. nátrium-acetátot, nátrium-citrátot, ciklodextrin-származékokat, polioxietilént, szorbitán-monolaurátot vagy sztearátot és hasonlókat)] is tartalmazhat. Az ilyen dózisalakok előállításának módszerei szakember számára jól ismertek; leírásukat illetően ld. pl.: "Remingtons' s Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, USA. A beadásra szánt készítmény az aktív összetevőt minden esetben olyan mennyiségben tartalmazza, amely hatásos a kezelni kívánt páciensben a betegség kialakulásának megelőzésére vagy a betegség tüneteinek enyhítésére. A csecsemőknek és kisgyermekeknek történő orális adagolásra előnyösen folya-

dékkészítményt (pl. szirupot vagy szuszpenziót) alkalmazhatunk.

A folyadékot tartalmazó szilárd dóziszalakok esetében a (pl. propilén-karbonátban, növényi olajokban vagy trigliceridekben készített) oldatot vagy szuszpenziót előnyösen zselatin-kapszulákba töltjük. Folyékony dóziszalakok esetében a (pl. polietilén-glikolban készített) oldatot - a beadni kívánt mennyiség könnyebb kimérése érdekében - megfelelő mennyiségű, gyógyászati szempontból elfogadható folyékony hordozóval (pl. vízzel) hígítjuk.

Más módon, az aktív összetevő növényi olajokban, glikolokban, trigliceridekben, propilén-glikol-észterekben (pl. propilén-karbonátban) vagy hasonlóknak végzett oldásával vagy diszpergálásával folyékony vagy félszilárd készítményeket állíthatunk elő, és ezeket az oldatokat vagy szuszpenziókat kemény vagy lágy zselatinhéjakba tölthetjük.

A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek fenti állapotok kezelésére történő alkalmazása esetén az aktív összetevőket előnyösen parenterálisan adagoljuk. A parenterális adagolást általában injektálással (szubkután, intramuszkulárisan vagy intravénásan) hajtjuk végre, és ide tartozik az intradermális vagy intraperitoneális injektálás, valamint az intrasternalis injektálás, illetve az infúziós technikák is. Az injektálható készítményeket szokványos alakokban állíthatjuk, így például, folyékony oldatként vagy szuszpenziókként, injektálás előtt feloldandó vagy szuszpendálendő szilárd készítményekként, továbbá emulziókként vagy biokompatibilis polimer-alapú mikrogömbökként [pl. liposzómák, polietilén-glikol-származékok, poli(D,C)laktid és hasonló]. Az e célra alkalmas segédanyagok példái a víz, sóoldat, dextróz, glicerin, etanol és hasonló. Az adagolásra szánt gyógyászati készítmények, kívánt esetben, csekély mennyiségben, nem toxikus kiegészítő anyagokat [pl. detergenset, emulgeálószeret, puffereket, szolubilizálószereket, protein-hordozókat és hasonlókat (pl. nátrium-acetátot, polioxietilént, szorbitán-monolaurátot, trietanolamin-oleátot, ciklodextrineket, szérumalbumint, st.)] is tartalmazhatnak.

A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein parenterális adagolása céljából a vegyületet megfelelő oldószerben (pl. vízben vagy sóoldatban) feloldjuk vagy liposzóma-készítménybe foglaljuk, majd megfelelő infúziós folyadékban diszpergáljuk. A találmány szerinti polipeptid jellemző napi dózisát egyetlen infúzióval vagy meghatározott időközönként adott - infúziósorozattal adagoljuk. Parenterális adagolásra különösen alkalmasak az aktív összetevőt vízben oldható alakban (pl. vízdékes só alakjában) tartalmazó vizes oldatok vagy az injektálható vizes szuszpenziók, amelyek viszkozitást növelő anyagokat (pl. karboxi-metilcellulózt, szorbitolt és/vagy dextránt és, kívánt esetben, stabilizálószereket) is tartalmaznak. Az aktív összetevő - adott esetben segédanyagokkal együtt -

lioofilizátum alakjában is előállítható; ilyen esetben közvetlenül a parenterális adagolás előtt megfelelő oldószerek hozzáadásával alakítjuk oldattá.

A parenterális adagolás egyik utóbbi években kifejlesztett módszere lassú vagy tartós hatóanyag-felszabadulást biztosító rendszer páciensbe történő beültetésén alapul; az ilyen megoldás állandó dózisszint fenntartását teszi lehetővé (ld. pl. a 3 710 795; 5 714 166 és 5 041 292 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat, melyeket teljes terjedelmükben a kitanítás részének tekintünk).

A parenterális adagolásra alkalmas készítményekben az aktív összetevő százalékos aránya a polipeptid természetétől és aktivitásától, valamint a páciens szükségleteitől függ. Mindazonáltal, általában az aktív összetevő 0,01-10 %-át tartalmazó oldatok alkalmazhatók, mely érték magasabb is lehet, ha szilárd készítményről van szó, amelyet felhasználást megelőzően hígítunk a fenti értékre. A készítmény az aktív összetevőt (oldatban) előnyösen 0,01-8 % koncentrációban tartalmazza.

A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek egy további adagolási eljárása szerint bolus injekciót és folyamatos infúziót alkalmazunk.

Az aeroszol alkalmazásával végzett adagolás a találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek közvetlenül légzőrendszerbe történő célbajuttatásának hasznos módja. Ezen eljárás előnyei a következők: 1) kiküszöböli az enzimatikus lebontás, a gyomor-béltraktusból történő gyenge felszívódás, illetve a hatóanyag-mennyiség máj "first-pass" hatásából eredő csökkenésének következményeit; 2) olyan aktív hatóanyagok célbajuttatását teszi lehetővé, amelyek egyébként - molekulaméretük, töltésük vagy az extrapulmonáris helyekre vonatkozó affinitásuk következtében - nem érnel el a légzőrendszeren belüli célhelyeiket; 3) a tüdőalveolusokon keresztül gyors felszívódást tesz lehetővé; és 4) megóvjá az egyéb szervrendszereket az aktív összetevő hatásától, ami olyan esetekben lényeges, ha az ilyen érintkezés nem kívánatos mellékhatásokkal járhat. Ezen okok miatt az aeroszol alkalmazásával végzett adagolás különösen előnyös az asztma, a tüdő lokális fertőzései és a tüdő és a légzőrendszer egyéb betegségei vagy rendellenességei kezelésére.

A belélegeztető-eszközök három típusa ismeretes: a porlasztásos belélegeztetők, a kimért dózisú belélegeztetők és a száraz poros belélegeztetők. A porlasztásos belélegeztető-eszközök nagy sebességű levegőáramot hoznak létre, amely a folyékony alakban prezentált proteinszármazékot porlasztva juttatja a páciens légzőrendszerébe. A kimért dózisú belélegeztető-készülékek sűrített gáztöltetet tartalmaznak, amely kiengedve a polipeptid meghatározott mennyiségét ragadja magával, ami a hatóanyag pontos mennyiségének megbízható adagolását

teszi lehetővé. A száraz poros belélegeztető-készülékekkel a polipeptidet szabadon folyó por alakjában, a páciens légvételekor keletkező légáram segítségével adagolhatjuk. Szabadon folyó por előállítása érdekében a proteinszármazékot segédanyaggal, pl. laktózzal elegyítjük. A készülék a proteinszármazék kimért mennyiségét egy kapszulában tárolja, és minden egyes működtetéskor abból áramlik ki. A fenti módszerek mindegyike alkalmas a találmány szerinti készítmények beadására.

A találmány szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek adagolására liposzómákra alapuló készítmények is alkalmazhatók (ld. pl. az 5 631 018; 5 723 147 és 5 766 627 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírásokat). A liposzómák előnyei a szöveti eloszlás és a farmakokinetikai paraméterek kedvező változásával hozhatók összefüggésbe, ami a hatóanyagok liposzómába történő beágyazásából adódik, és jól adaptálható a találmány szerinti polipeptidekre is. Az injektálásra vagy orális adagolásra szánt, szabályozott hatóanyag-felszabadulást biztosító liposzomális folyadékkészítmények szintén alkalmazhatók.

A végbélkúpok alkalmazásával történő szisztémás adagolásra alkalmas, szokványos kötőanyagok és hordozók közé tartoznak, például, a polietilénlikolok vagy trigliceridek [pl. PEG 1000 (96 %) és PEG 4000 (4 %)]. Az ilyen végbélkúpok az aktív összetevőt kb. 0,5 tömeg%-tól kb. 10 tömeg%-ig, előnyösen kb. 1 tömeg%-tól kb. 2 tömeg%-ig terjedő koncentrációban tartalmazó elegyekből állíthatók elő.

A találmány leírásában említett valamennyi publikációt és szabadalmi iratot teljes terjedelmében a kitanítás részének tekintjük. A találmány szerinti megoldást az alábbiakban kísérleti példákon keresztül szemléltetjük, melyeket a találmány előnyös megvalósítási módjainak bemutatása céljából írunk le, anélkül, hogy a találmány igényelt oltalmi körét e megvalósítási módokra korlátoznánk.

A példákban a következő rövidítéseket alkalmazzuk:

Acm = amino-oxi-acetilcsoport; Arg(Tos) = oldalláncán N^G-toluol-szulfonilcsoporttal védett L-arginin; ART = abszolút retikulocitaszám; Asp(cHex) = oldalláncán ciklohexil-észterrel védett L-aszparaginsav; Boc = t-butoxi-karbonilcsoport; CD = cirkuláris dikroizmus; CDI = karbonil-diimidazol; CHO = kínai hörcsög petefészkek; CL = "clearance" (mL/óra/kg); C_{max} = maximális koncentráció; Cys(4MeBzl) = oldalláncán (4-metil)-benzilcsoporttal védett L-cisztein; Cys/Acm = oldalláncán acetamidometilcsoporttal (-CH₂NH-COCH₃) védett L-cisztein; DCM = diklórmétán; DIAE = diizopropil-etilamin; DMF = dimetilformamid; DMSO = dimetilszulfoxid; DPC = dodexil-foszfokolin; Dpr = L-1,2-diaminopropionsav; ED₅₀ = 50 %-os

maximális hatás eléréséhez szükséges dózis; EDA = (4,7,10)-trioxa-tridekán-1,13-diamin; ELISA = enzimkötött immuneszt; EPO = erythropoietin; ES-MS = elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria; FBS = magzati borjúsérum; Glu(cHex) = oldalláncán ciklohexil-észterrel védett L-glutaminsav; GM-CSF = granulocita-makrofág kolonizációs stimuláló faktor; HATU = O-(7-aza-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-ammónium-hexafluorfoszfát; HCT = hematokrit; HGB = hemoglobin; His(Dnp) = oldalláncán N^{lm}-dinitro-fenilcsoporttal védett L-hisztidin; HOBT = N-hidroxibenzotriazol; HPLC = nagynyomású folyadékkromatográfia; IMDM = Iscove-féle módosított Dulbecco-tápközeg; IPA = izopropanol; Lev = levulinsav; Lys(CIZ) = oldalláncán 2-klór-benzil-oxi-karbonilcsoporttal védett L-lizin; MBHA = 4-metilbenzohidrilamin; MRT = átlagos tartózkodási idő; MTT 4-metil-(trifenil-metil)-csoport; MTT = tiazolilkek; NHS = N-hidroxiszukcinimid; -OCH₂-Pam-gyanta = -O-CH₂-Bz-CH₂CONHCH₂ (ko-polisztirol-divinilbenzol)-gyanta; Pbo = 4-(CH₃S(O))-benzilcsoport; PBS = foszfátpufferelt sóoldat; rhEPO = rekombináns humán EPO; RSA = patkány-szérumalbumin; SDS = nátriumdodecil-szulfát; SDS-PAGE = SDS-poliakrilamid-gélelektroforézis; SEP = szintetikus erythropoiesis protein; Ser(Bzl) = oldalcsoportján benzilcsoporttal védett L-szerin.

1. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-0-protein szintézise

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP) szintetizáltunk. A teljes hosszúságú, szintetizált protein ["SEP-0(1-166)"] aminosav-szekvenciája a következő:

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVN FYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW ψ P LQLHVDKAVS
GLRSLTTLR ALGAQK ψ AIS PPDAASAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR (1. azonosítószámú szekvencia)

amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (szulfhidrilcsoportján karboximetilált cisztein). A SEP-0-proteint oldat fázisban, négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

SEP-0:1 szakasz (GRFN-1711; amely az 1. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavaiból áll):

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-tioészter;

SEP-0:2 szakasz (GRFN-1712; amely az 1. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavaiból áll):

CSLNEKITVP DTKVN FYAWK RMEVGQQA VE VWQGLALLSE AVLRGQALLV

KSSQPW-tioészter (ahol Cys³³ Ac-m-csoporttal van védve);

SEP-0:3 szakasz (GRFN-1713; amely az 1. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavaiból áll):

CPLQLHVDKA VSGLRSLTTL LRALGAQK-tioészter (ahol Cys⁸⁹ Ac-m-csoporttal van védve);

SEP-0:4 szakasz (GRFN-1714; amely az 1. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavaiból áll):

CAISPPDAAS AAPLRTITAD TFRKLFRVYS NFLRGKCLKLY TGEACRTGDR-karboxilát [ahol a C-terminális cisztein (Cys¹⁶¹) pikolil (pico) csoporttal van védve].

10 A SEP-0:1, SEP-0:2 és SEP-0:3 peptideket tioészterképző gyantán, a Boc (t-butoxikarbonil) technikához alkalmas *in situ* semlegesítési eljárással és lépésenkénti szilárd fázisú peptidszintézissel (SPPS), oldallánc-védelem és tioészter-gyanta stratégia alkalmazásával [ld. Hackeng és mtsai.: PNAS 96, 10068 (1999); és Schnolzer és mtsai.: Int. J. Pept. Prot. Res. 40, 180 (1992)], ABI433A típusú automatizált peptidszintetizáló készülékkel vagy manuális
15 láncösszeállítással állítottuk elő vagy kereskedelmi forgalmazóktól rendeltük vagy vásároltuk. Például, a Boc-SPPS-védőcsoportok standard készletét alkalmaztuk, amely a következő védőcsoportokat foglalja magában: Arg(Tos), Asp(cHex), Cys(4MeBzl) és Cys(Acm), Glu(cHex), His(DNP), Lys(CIZ), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(formil), Tyr(BrZ). A metionint, aszparagint és glutamint oldallánc-védőcsoport nélkül alkalmaztuk. A SEP-0:4-es szakaszt az előzőkhöz ha-
20 sonló módon, -OCH₂-Pam-gyantán szintetizáltuk. A peptideket - védőcsoportjaik eltávolítása után - standard Boc-kémiai eljárással, HF/p-krezol alkalmazásával lehasítottuk a gyantáról, azonban a HF/p-krezolos kezeléssel el nem távolítható védőcsoportokat tartalmazó peptidek esetében a védőcsoportokat megtartottuk. A peptideket C4-es preparatív reverz fázisú, nagy-
25 nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) tisztítottuk. A tiszta peptidet tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és a későbbi ligáláshoz liofilizáltuk.

1. lépés: 1. ligálás

A SEP-0:4-es és SEP-0:3-as peptidszegmenst trifluoetanolban (TFE) 15 mM koncentrációban feloldottuk, majd az oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot és 1 % tiofenolt tartalmazó - telített foszfátpuffert (pH = 7,9) adtunk, miáltal a peptidszegmensek átlátszó oldatát kaptuk. Ligálást követően a ligálási elegyet 2 ml TFE, 6 ml 6M guanidinium-klorid, és 25 % β -merkaptóetanolt tartalmazó 100 mM foszfátpuffer elegyéhez adtuk és 20 percig inkubáltuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfínHCl (TCEP) jégecetben készített, 15 mg/ml koncentrációjú

oldatával savanyítottuk, majd C4-es preparatív, reverz fázisú HPLC-oszlopra (átmérő: 2,54 cm) töltöttük. A peptideket preparatív gradiens reverz fázisú HPLC-vel tisztítottuk. A kívánt SEP-0:Acm+SEP-0:3+SEP-0:4 ligálási terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és összeöntöttük.

5 2. lépés: Acm-csoport eltávolítása (1. fázis)

Az Acm-csoport eltávolítása céljából a SEP-0:Acm+SEP-0:3+SEP-0:4 összeöntött frakcióit tartalmazó vizes acetonitril-oldatot HPLC-tisztaságú vízzel egyszeresére hígítottuk, majd az oldathoz 2M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (a várt cisztein-koncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet egy óra hosszat kevertük. Az oldatot ezután β-merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk, félpreparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-0:3+SEP-0:4 terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

15 3. lépés: 2. ligálás

A SEP-0:3+SEP-0:4 és a SEP-0:2 peptidszegmensek azonos mennyiségeit együtt, 15 mM koncentrációban tiszta TFE-ben oldottuk, majd a kapott oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot és 1 % tiofenolt tartalmazó - 250 mM foszfátpuffert (pH = 7,5) adtunk, miáltal a peptidszegmensek átlátszó oldatát kaptuk. Egy napos ligálás után a ligálási elegyet 10 ml TFE, 10 ml β-merkaptóetanol, 10 ml piperidin és 20 ml 6M guanidinium-klorid (pH = 4) elegyéhez adtuk, és a maradék védőcsoportok eltávolítása érdekében 20 percig inkubáltuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl (TCEP) 20 %-os vizes ecetsavban készített, 15 mg/ml koncentrációjú oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív, reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt ligált terméket (SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

25 4. lépés: Karboximetilezés

A SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4 konstrukciót TFE-ben 15 mM koncentrációban feloldottuk, majd az oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó - 200 mM foszfátpuffer (pH=7,9) kétszeres térfogatát adtuk, miáltal a peptidszegmens átlátszó oldatát kaptuk. Az oldathoz ezután 25-szörös feleslegben brómecetsavat (minimális mennyiségű etanolban készített oldat) adtunk, és az oldatot két óra hosszat reagáltattuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl (TCEP) 20 %-os vizes jégecetben készített, 15 mg/ml koncentrációjú

oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt karboximetilezett SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával tisztítottuk és a frakciókat összeöntöttük.

5. lépés: Pikolilcsoport eltávolítása

2M sósavban 30 percig cinkport aktiváltunk. A SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et peptidet kb. 10 ng/ml koncentrációban tiszta TFE-ben oldottuk, majd az oldatot 6M guanidinium-klorid és - frissen hozzáadott 35 mg/ml L-metionint és 35 mg/ml dodecilszarkozint (azaz nátrium-N-dodekanoilszarkozint) tartalmazó - 100 mM acetátpuffer (pH=4) elegyével a TFE térfogatára vonatkoztatva négyszeres térfogatúra hígítottuk. Az oldatot hozzáadtuk az aktivált cinkporhoz, majd a reakció előrehaladását kb. egy órás időközönként ellenőriztük. A reakció befejeződése után a felülúszót eltávolítottuk, a maradék cinkport 6M guanidinium-klorid és - 35 mg/ml L-metionint és 35 mg/ml dodecilszarkozint tartalmazó - 100 mM acetátpuffer (pH=4) 20 % TFE-t tartalmazó elegyével kétszer öt percig mostuk, majd egyszer ugyanezen, de 20 % β -merkaptóetanolt tartalmazó oldattal mostuk. Az összeöntött terméket tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl (TCEP) 20 %-os vizes ecetsavban készített, 15 mg/ml koncentrációjú oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt módosított SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, és a frakciókat összeöntöttük.

6. lépés: Az Acm-védőcsoport eltávolítása (2. fázis)

A SEP-0:Acm+SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico frakciók összeöntött oldatát HPLC-tisztaságú vízzel háromszorosára hígítottuk, majd az oldathoz 2M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (a várt cisztein-koncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet egy óra hosszát kevertük. Az oldatot ezután β -merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk, félpreparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, majd a peptid tömegéhez viszonyítva kétszeres tömegű dodecyl-foszfokolint (DPC) tartalmazó vízzel kétszeres térfogatra hígítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

7. lépés: 3. ligálás

A SEP-0:2+SEP-0:3+SEP-0:4+Et-Pico és a SEP-0:1 peptidszegmensek azonos mennyiségeit együttesen, 15 mM koncentrációban tiszta TFE-ben oldottuk, majd az oldathoz 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó - 250 mM foszfátpuffert (pH=7,5) adtunk. Egy napos
5 ligálás után a ligálási elegyet 10 ml TFE, 10 ml β -merkaptoetanol, 10 ml piperidin és 20 ml 6M guanidinium-klorid (pH = 4) elegyéhez adtuk, és a maradék védőcsoportok eltávolítása érdekében 20 percig inkubáltuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfin'HCl (TCEP) 20 %-os vizes ecetsavban készített, 15 mg/ml koncentrációjú oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív, reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gradiens alkalmazásával tisztítottuk.
10 A kívánt ligált terméket [SEP-0(1-166); 1. azonosítószámú szekvencia] elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, majd a peptid tömegéhez viszonyítva kétszeres tömegű dodecilszarkozint tartalmazó vízzel kétszeres térfogatra hígítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

8. lépés: Folding

15 A teljes hosszúságú ligált SEP-0(1-166)-peptidet - 6M guanidinium-kloridot, 20 % TFE-t és (a proteinben lévő ciszteinekre vonatkoztatva) tízszeres moláris feleslegben ciszteint tartalmazó - 200 mM Tris-pufferben (pH = 8,7) oldottuk. A kapott elegyet egy éjszakán át 3M guanidinium-kloridot tartalmazó 200 mM Tris-pufferrel (pH = 8,7) szemben dializáltuk. Ezt követően az oldatot szobahőmérsékleten négy óra hosszat 4 °C-on 3 M guanidinium-kloridot
20 tartalmazó 200 mM Tris-pufferrel (pH=8,7) szemben, végül 4 °C-on négy óra hosszat 10 mM foszfátpufferrel (pH=7,0) szemben dializáltuk, miáltal az összehajtogatott végterméket kaptuk. Az összehajtogatódást (folding) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektrometriával igazoltuk.

9. lépés: Tisztítás

25 Az összehajtogatott polipeptidet Centricon típusú bepárlófiolákban ötszörösére töményítettük, majd 10 mM foszfátpufferrel (pH=7,0) kiegyensúlyozott "Resource S" kationcserélő oszlopra töltöttük. Az összehajtogatott proteint lineáris NaCl-gradienssel (500 mM-ig) 10 percig eluáltuk. Az összehajtogatott SEP-0(1-166)-polipeptidet tartalmazó frakciókat SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) azonosítottuk, majd -80 °C-on lefagyasztottuk
30 és tároltuk. Az összehajtogatott proteintermék analitikai reverz fázisú HPLC-kromatogramja és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektruma, valamint a CD-spektrum az összehajtogatott protein jelenlétét igazolta.

2. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-L30-protein szintézise

A második szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP-1-L30) úgy állítottuk elő, hogy a SEP-0 24. és 126. pozícióiban oximképző csoportokat tartalmazzon. Ezeket a csoportokat a SEP-1-L30 kialakítására alkalmaztuk, amelyben a proteingerinchez lineáris (EDA-Succ-)₁₈-karboxilát van kapcsolva [EDA = (4,7,10)-trioxa-tridekán-1,13-diamin, más néven TTD; Succ = -CO-CH₂CH₂CO-]. A teljes hosszúságú SEP-1(1-166) aminosav-szekvenciája a következő:

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVNIFYA

WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW^ψP LQLHVDKAVS

GLRSLTTLR ALGAQK^ψAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR

GKLKLYTGEA CRTGDR (2. azonosítószámú szekvencia)

amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (amely szulfhidrilcsoportján karboximetilált cisztein); és K^{ox} jelentése: nem természetes lizin, amely ϵ -aminocsoportján oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, amely oximkötéssel a megadott vízdékony polimerhez kapcsolódik. A SEP-1-L30-protein szerkezetét a 15. ábrán mutatjuk be.

A SEP-1-L30 kémiai szintézisének reakcióvázlatát a 14. ábrán mutatjuk be. Ahogy a 14/A és 14/B ábrán látható, a GRFN32 (GP32) vízdékony polimert oximképző kémiai ligálási reakcióval a SEP-1:1 és SEP-1:4 peptidekhez kapcsoltuk. Ahogy az ábrán látható, a SEP-1:1-peptid a 32. pozícióban C-terminális Yaa-csoportot (a későbbi kémiai ligálást lehetővé tevő hisztidin- α -karboxil-tioésztert), a 24. pozícióban pedig (amely a természetes humán EPO glikozilációs helye) nem természetes lizint tartalmaz, mely utóbbi oldallánca kémiaiilag úgy van módosítva, hogy amino-oxi-acilgyököt tartalmazó U_{n=1} csoportot tartalmazzon. Vonatkoztatásként feltüntettük a végső, teljes hosszúságú termék 1. pozíciójának megfelelő N-terminális alanint is. A SEP-1:4-peptid a 117. pozícióban védőcsoport nélküli N-terminális Xaa-csoportként ciszteint, a 126. pozícióban amino-oxi-acilgyökkel módosított lizint (a természetes humán EPO glikozilációs helye), a 161. pozícióban pedig ciszteint (diszulfidképző cisztein) tartalmaz, mely utóbbi pikolilcsoporttal védett tiol-oldalláncot tartalmaz. A 161. pozícióban lévő cisztein - a natív kémiai ligálási helyek létrehozása érdekében beépített ciszteinek későbbi átalakítása során bekövetkező - tioalkileződésének (ld. 14/D ábra) elkerülése érdekében tartalmaz védőcsoportot. Ezen túlmenően, a pikolil védőcsoportot azért is használtuk, mert az eltávolításához szükséges feltételek nem azonosak az acetamido-metilcsoporttal (Acm) védett

cisztein első natív kémiai ligálási reakcióban történő eltávolításához szükséges feltételekkel (ld. 14/C ábra). A GP32-polimer-konstrukciók 24. és 126. pozícióban történő helyspecifikus és kizárólagos kapcsolását oximképző kémiai ligálással hajtottuk végre, miáltal a precíziós, polimerrel módosított SEP-1:1+GP32 és SEP-1:4+GP32 peptideket kaptuk. A 14/C ábrán a SEP-1:4+GP32-peptidnek a középső SEP-1:3-peptidszegmenshez történő natív kémiai ligálását mutatjuk be, ami a SEP-1:3+SEP-1:4+GP32-peptid létrejöttét eredményezi (amelynek ligálási helye a 116. pozícióban lévő lizin és a 117. pozícióban lévő cisztein között található). Ahogy az ábrán látható, a SEP-1:3-peptid a 89. pozícióban N-terminális Xaa-csoportként Acm-csoporttal védett ciszteint, a 116. pozícióban pedig Yaa-csoportként lizin- α -karboxil-tioésztert tartalmaz. A natív kémiai ligálást követően az Acm-védőcsoportot eltávolítottuk, miáltal a következő ligálási reakcióban alkalmazható ligálási terméket kaptuk. A 14/D ábrán a SEP-1:3+SEP-1:4+GP32-peptid középső SEP-1:2-peptidszegmenshez történő natív kémiai ligálását szemléltetjük, ami a SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP32-peptid létrejöttét eredményezte, amelyben a ligálási hely a 88. triptofán és a 89. cisztein között található. Ahogy az ábrán látható, a SEP-1:2-peptid a 33. pozícióban N-terminális Xaa csoportként Acm-ciszteint, a 89. pozícióban C-terminális Yaa-csoportként pedig triptofán- α -karboxil-tioésztert tartalmaz. A natív kémiai ligálást követően a ligálási terméket - a ligálási helyeken (89. és 117. pozíció) lévő ciszteinek tiol-oldalláncainak karboximetilezése, s ezáltal a ciszteinek pszeudo-glutaminsavakká történő átalakítása érdekében - brómecetsavval reagáltattuk. A karboximetilezést követően az Acm- és pikolil-védőcsoportokat eltávolítva a következő ligálási reakcióban alkalmazható, polimerrel módosított ligálási terméket kaptuk. A 14/E ábrán a SEP-1:3+SEP-1:4+GP32-peptid SEP-1:1+GP32-peptidhez (amely a teljes hosszúságú termék N-terminálisának felel meg) történő natív kémiai ligálását, és a teljes hosszúságú SEP-1-L30-termék (SEP-1:1+GP32+SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP32) létrehozását mutatjuk be (az utolsó ligálási hely a 32. hisztidin és a 33. cisztein között található). Ahogy az ábrán látható, a teljes hosszúságú SEP-1-L30-termék két - kizárólag felhasználó által meghatározott helyekhez (vagyis a természetes humán EPO 24. és 126. pozíciójának megfelelő glikozilációs helyekhez) kapcsolt - vízben oldható polimert (G32) tartalmaz. A szintézis részleteit az alábbiakban ismertetjük.

A) A GRFN1776- és GRFN1711-peptid oximozása GRFNP32-vel

Az oximképzési reakciót az amino-oxi-acetilcsoportot tartalmazó vízőldékony polimerek keton karbonil csoportot tartalmazó peptidekhez történő kapcsolása céljából hajtottuk végre. Ennek érdekében a következő peptidszegmenseket szintetizáltuk:

SEP-1:4 szakasz (GRFN-1776; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavaiból áll):

CAISPPDAAK AAPLRTITAD TFRKLFRVYS NFLRGKCLKLY TGEACRTGDR-karboxilát
[amelyben a 126. pozícióban lévő lizin (Lys¹¹⁶) ε-aminocsoportján levulinsavval van módosítva,
5 a 117. pozícióban lévő cisztein (Cys¹¹⁷) pedig Acm-csoporttal van védve].

SEP-1:1 szakasz (GRFN-1711; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavaiból áll):

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin levulinsavval van módosítva).

10 A SEP-1:1-szakaszt (GRFN-1711) tioészterképző gyantán, míg a SEP-1:4-szakaszt (GRFN-1776) -OCH₂-Pam-gyantán, az 1. példában leírtak szerint szintetizáltuk. E két peptidszegmens 24., illetve 126. pozíciójában lévő lizineket először - ε-aminocsoportjukon - Fmoc-csoporttal védtük. A láncösszeállítás után a védett aminosocsoportokról standard Fmoc-eltávolítási eljárással távolítottuk el az Fmoc-csoportokat, és az egyes peptid-gyantákhoz
15 levulinsavat kapcsoltunk. A peptidekről ezután eltávolítottuk a védőcsoportokat, és egyidejűleg lehasítottuk a gyantáról (ld. 1. példa). A peptideket preparatív C4 reverz fázisú HPLC-vel tisztítottuk. A tiszta peptidet tartalmazó frakciókat elektroforlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, a frakciókat összeöntöttük és további ligáláshoz liofilizáltuk. A GRFNP32-polimert [-(EDA-Succ)₁₈-karboxilát] karboxilképző
20 "Sasrin"-gyantán, standard eljárások [ld. Rose és mtsai.: J. Am. Chem. Soc. 121, 7034 (1999); és 09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose és mtsai.)] alkalmazásával állítottuk össze. A polimer N-terminális aminosocsoportjához - aktivált Boc-amino-oxiacetsav ötszörös moláris feleslegének alkalmazásával - amino-oxi-acetil (AoA)-gyököt kapcsoltunk. A polimer-láncot klasszikus Fmoc-technikák alkalmazásával lehasítottuk a gyantáról,
25 majd preparatív C4 reverz fázisú HPLC-vel tisztítottuk. A tiszta polimert tartalmazó frakciókat elektroforlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, a frakciókat összeöntöttük és a további ligáláshoz liofilizáltuk.

A SEP-1:4-szakaszt és a GRFNP32-polimert együttesen, azonos molarányban 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó 50 % vizes acetonitrilben oldottuk. A kapott oldatot liofilizáltuk, majd a száraz port feloldottuk, és a polimerrel módosított peptidet preparatív C4 reverz fázisú gradiens HPLC-vel elválasztottuk a nem módosított peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:4+GP32-terméket elektroforlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük és liofilizáltuk.

A SEP-1:1-szakaszt és a GRFNP32-polimert együttesen, azonos mólarányban - 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó - 50 % vizes acetonitrilben oldottuk. A kapott oldatot liofilizáltuk, majd a száraz port feloldottuk, és a polimerrel módosított peptidet preparatív C4 reverz fázisú gradiens HPLC-vel elválasztottuk a nem módosított peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:1+GP32-terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük és liofilizáltuk.

B) A szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-L30-protein szintézise

A SEP-1-L30-proteint oldat fázisban, a következő négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

10 SEP-1:1+GP32 (GRFN-1711 + GRFNP32; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavainak felel meg):

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporthal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP32-polimerhez van kapcsolva);

15 SEP-1:2 (GRFN-1712; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavainak felel meg):

CSLNEKIT VPDTKVNFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL
LVKSSQPW-tioészter (amelyben a 33. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

20 SEP-1:3 (GRFN-1713, amely a 2. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavainak felel meg):

CP LQLHVDKAVS GLRSLTTLR ALGAQK-tioészter (amelyben a 89. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-1:4+GP32 (GRFN-1776 + GRFNP32; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavainak felel meg):

25 CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-
karboxilát [amelyben a 126. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporthal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP32-polimerhez van kapcsolva, és a C-terminális cisztein pikolil (pico) -védőcsoporthal tartalmaz].

30 A további peptidek szintézisét, a ligálási reakciókat, karboximetilezési reakciókat, védőcsoporthal-eltávolítási reakciókat, a polipeptidek hajtogatását (folding) és tisztítását az 1. példában leírtak szerint hajtottuk végre, miáltal a teljes hosszúságú, összehajtogatott SEP-1-L30-peptidet kaptuk. Az összehajtogatott proteintermék analitikai reverz fázisú HPLC-kromatog-

ramja és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektruma, valamint a CD-spektrum az összehajtogatott protein jelenlétét igazolta.

3. példa

5 Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-L26-protein szintézise

A harmadik szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP-1-L26) úgy állítottuk elő, hogy a SEP-0 24. és 126. pozícióiban oximképző csoportokat tartalmazzon. Ezeket a csoportokat a SEP-1-L26-protein kialakítására alkalmaztuk, amelyben a proteingerinchez a 24., illetve a 126. pozícióban lineáris (EDA-Succ-)₁₈-karboxilát és (EDA-Succ)₆-amid van kapcsol-

10 va. A teljes hosszúságú SEP-1(1-166) aminosav-szekvenciája a következő:

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVNFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW_ψP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLR ALGAQK_ψAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR (2. azonosítószámú szekvencia)

15 amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (amely szulfhidrilcsoportján karboximetilált cisztein); és K^{ox} jelentése: nem természetes lizin, amely ϵ -aminocsoportján oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, amely oximkötéssel a megadott vízőldékony polimerhez kapcsolódik.

A SEP-1-L26-konstrukciót - a SEP-1-L30-konstrukcióval ellentétben - úgy terveztük meg, hogy a 126. pozícióban kisebb méretű és töltés nélküli vízőldékony polimert tartalmazzon. A 24. pozícióhoz kapcsolt polimer azonos volt a SEP-1-L30-ban találhatóval. A teljes hosszúságú termék összeállítását a 2. példában leírtak szerint végeztük. A SEP-1-L26-konstrukció szerkezetét a 16. ábrán mutatjuk be.

20 A) A GRFN1776-peptid oximozása GRFNP6-tal és a GRFN1711-peptid oximozása GRFNP32-vel

25 Az oximképzési reakciót az amino-oxi-acetilcsoportot tartalmazó vízőldékony polimerek keton karbonil csoportot tartalmazó peptidekhez történő kapcsolása céljából végeztük. Ennek végrehajtása érdekében a következő peptidszegmenseket szintetizáltuk:

SEP-1:4 szakasz (GRFN-1776; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavaiból áll):

30 CAISPPDAAK AAPLRTITAD TFRKLFRVYS NFLRGKLKLY TGEACRTGDR-karboxilát [amelyben a 126. pozícióban lévő lizin (Lys¹¹⁶) ϵ -aminocsoportján levulinsavval van módosítva, a 117. pozícióban lévő cisztein (Cys¹¹⁷) pedig Acim-csoporttal van védve].

SEP-1:1 szakasz (GRFN-1711; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavai-
vaiból áll):

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEKITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő
lizin levulinsavval van módosítva).

5 A SEP-1:1-szakaszt (GRFN-1711) tioészterképző gyantán, míg a SEP-1:4-szakaszt
(GRFN-1776) -OCH₂-Pam-gyantán, az 1. példában leírtak szerint szintetizáltuk. E két peptid-
szegmens 24., illetve 126. pozíciójában lévő lizineket először - ε-aminocsoportjukon - Fmoc-
csoporttal védtük. A láncösszeállítás után a védett aminocsoportokról standard Fmoc-
eltávolítási eljárással távolítottuk el az Fmoc-csoportokat, és az egyes peptid-gyantákhoz -
10 standard kapcsolási eljárások alkalmazásával - levulinsavat kapcsoltunk. A peptidekről ezután
standard Boc-technikák alkalmazásával eltávolítottuk a védőcsoportokat, és egyidejűleg leha-
sítottuk a gyantáról (ld. 1. példa). A peptideket külön-külön preparatív C4 reverz fázisú
HPLC-vel tisztítottuk. Az egyes tiszta peptideket tartalmazó frakciókat külön-külön
elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, a
15 frakciókat összeöntöttük és további ligáláshoz liofilizáltuk.

A vízben oldható -(EDA-Succ)₁₈-karboxilát polimert (GRFNP32) karboxilképző
"Sasrin"-gyantán, standard eljárások [ld. Rose és mtsai.: J. Am. Chem. Soc. 121, 7034 (1999);
és 09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose és mtsai.)] alkalmazásá-
val állítottuk össze. A vízben oldható (EDA-Succ)₆-amid polimert (GRFNP6) amidképző
20 "Sieber"-gyantán, szintén standard eljárások [ld. Rose és mtsai.: J. Am. Chem. Soc. 121, 7034
(1999); és 09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose és mtsai.)] al-
kalmazásával állítottuk össze. A gyantához kapcsolt polimerek N-terminális aminocsoportjához
- aktivált Boc-amino-oxiecetsav ötszörös moláris feleslegének alkalmazásával - amino-oxi-
acetil (AoA)-gyököt kapcsoltunk. A két polimer-láncot klasszikus Fmoc-technikák alkalmazá-
25 sával külön-külön hasítottuk le a gyantákról, majd preparatív C4 reverz fázisú HPLC-vel tisz-
títottuk. A kétféle tiszta polimert (külön-külön) tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ioni-
zációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, a frakciókat összeöntöttük
és a további ligáláshoz liofilizáltuk.

A SEP-1:4-szakaszt és a GRFNP6-polimert együttesen, azonos molarányban 0,1 %
30 trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó 50 % vizes acetonitrilben feloldottuk. A kapott oldatot lio-
filizáltuk, majd a száraz port feloldottuk, és a polimerrel módosított peptidet preparatív C4
reverz fázisú gradiens HPLC-vel elválasztottuk a nem módosított peptidtől és az el nem reagált
polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:4+GP6-terméket elektroporlasztásos ionizációs tömeg-

spektrometriával azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük és liofilizáltuk.

A SEP-1:1-szakaszt és a GRFNP32-polimert együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó - 50 % vizes acetonitrilben oldottuk. A kapott oldatot liofilizáltuk, majd a száraz port feloldottuk, és a polimerrel módosított peptidet preparatív C4 reverz fázisú gradiens HPLC-vel elválasztottuk a nem módosított peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:1+GP32-terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük és liofilizáltuk.

B) A szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-L26-protein szintézise

A SEP-1-L26-proteint oldat fázisban, a következő négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

SEP-1:1+GP32 (GRFN-1711 + GRFNP32; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavainak felel meg):

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP32-polimerhez van kapcsolva);

SEP-1:2 (GRFN-1712; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavainak felel meg):

CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL

LVKSSQPW-tioészter (amelyben a 33. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-1:3 (GRFN-1713, amely a 2. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavainak felel meg):

CP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQK-tioészter (amelyben a 89. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-1:4+GP6 (GRFN-1776 + GRFNP6; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavainak felel meg):

CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-karboxilát [amelyben a 126. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP6-polimerhez van kapcsolva, és a C-terminális cisztein (Cys¹⁶¹) pikolil (pico) -védőcsoportot hordoz].

A további peptidek szintézisét, a ligálási reakciókat, karboximetilezési reakciókat, védőcsoport-eltávolítási reakciókat, a polipeptidek hajtogatását (folding) és tisztítását az 1. és 2. példában leírtak szerint hajtottuk végre, miáltal a teljes hosszúságú, összehajtogatott SEP-1-

L26-proteint kaptuk. Az összehajtogatott proteintermék analitikai reverz fázisú HPLC-kromatogramja és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektruma, valamint a CD-spektrum az összehajtogatott protein jelenlétét igazolta.

5

4. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B50-protein szintézise

Szintetizáltunk egy negyedik szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP-1-B50) is, amelynek aminosav-szekvenciája azonos a SEP-1-L30-proteinével:

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVNIFYA
 10 WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW ψ P LQLHVDKAVS
 GLRSLTTLR ALGAQK ψ AIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
 GKLKLYTGEA CRTGDR (2. azonosítószámú szekvencia)

amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (amely szulfhidrilcsoportján karboximetilált cisztein); és K^{ox} jelentése: nem természetes lizin, amely ϵ -aminocsoportján oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, amely oximkötéssel a megadott vízóldékony polimerhez kapcsolódik.

15

Ezt a proteint - a SEP-1-L30 lineáris (Succ-EDA)₁₈-polimere helyett - négy lineáris (Succ-EDA)₁₂-kart tartalmazó elágazó polimer-konstrukcióval derivatizáltuk. A derivatizálást oximkötésekkel valósítottuk meg.

A 17. ábrán a SEP-1-B50-proteinhez oximképző ligálással (ld. lentebb) kapcsolt, el-
 20 ágazó, vízóldékony GRFNP29 (GP29) polimer kémiai szintézisének reakcióvázlatát mutatjuk be. Ahogy a 17. ábrán látható, az U-B-komponens, azaz a GRFN17 (GP17) előállítására [amely U-csoportként amino-oxi-acilcsoportot, "B" elágazási magként pedig három lizint tartalmaz, melyek - a lineáris, vízóldékony poliamid-etilén-oxid konstrukcióhoz (GP29, amely bo-
 25 rostyánkősav-maradékból származó karboxilát-toldalékot tartalmaz) tioéter-kötésekkel törté-
 nő, későbbi kapcsolásra alkalmas - tiol-oldalláncokat hordoznak] ortogonálisan védett lizin U-B prekuzort alkalmaztunk. A teljes hosszúságú termék összeállítását a 2. példában leírtak szerint végeztük. A SEP-1-B50 szerkezetét a 18. ábrán mutatjuk be.

A) A több tiolcsoportot hordozó GRFNP17-templát szintézise

A GRFNP17-templátot amidképző (4-metil)-benzhidril-amin (MBHA)-gyantán, 0,4
 30 mmol-os léptékben, manuálisan szintetizáltuk. Az Fmoc-Lys(Boc)-OH kapcsolását standard kapcsolási eljárással hajtottuk végre [Schnölzer, M.: Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180 (1992)]. A reakcióhoz 2,1 mmol aminosavat, és 10 % DIEA-t tartalmazó 3,8 ml 0,5M HBTU-t (vagyis

ötszörös aminosav-felesleget) alkalmaztunk. Az Fmoc-védőcsoport eltávolítása után az Fmoc-Lys(Fmoc)-OH kapcsolását standard aminosav-kapcsolási eljárással (2,1 mmol aminosav és 10 % DIEA-t tartalmazó 3,8 ml 0,5M HBTU, azaz ötszörös aminosav-felesleg alkalmazásával) végeztük. A második Fmoc-eltávolítási lépés után az Fmoc-Lys(Fmoc)-OH kapcsolását standard aminosav-kapcsolási eljárással, 4,2 mmol aminosav és 10 % DIEA-t tartalmazó 7,6 ml 0,5M HBTU (azaz a szabad aminra vonatkoztatva ötszörös aminosav-felesleg) alkalmazásával hajtottuk végre. Az utolsó Fmoc-eltávolítási lépést követően dimetilformamidban (DMF) - a szabad aminokra vonatkoztatva - ötszörös feleslegben S-acetil-tioglikolsav-pentafluor-fenil-észterrel (SAMA-oPfp) 30 perces kapcsolási reakciót végeztünk. A C-terminális lizilgyök oldalláncának Boc-védőcsoportját tiszta trifluorecetsavval végzett kétszer egy perces mosással, majd a gyanta (10 %-os dimetilformamidos DIAE-oldattal végzett mosással végrehajtott) semlegesítésével távolítottuk el. 3 ml dimetilformamidban 2 mmol Boc-amino-oxiecetsavat és 2 mmol N-hidroxisukcinimidet (NHS) oldottunk, majd az oldathoz 2 mmol diizopropilkarbodiimidet (DIC) adtunk, és a savat 30-60 percig aktiváltuk. Az oldatot ezután hozzáadtuk a semlegesített gyantához, és a kapcsolási reakciót egy órán át hagytuk lejátszódni. Végül, az S-kötött acetilcsoportokat 20 %-os, dimetilformamidos piperidinoldattal végzett 30 perces kezeléssel eltávolítottuk. A templátot - védőcsoport-mentesítésével egyidejűleg - standard Boc-kémiai eljárásokkal, HF/p-krezol alkalmazásával (a szabad aldehid befogása céljából cisztein jelenlétében) lehasítottuk a hordozógyantáról [ld. Schnölzer, M.: Int. J. Pept. Protein Res. **40**, 180 (1992)]. A kapott poliamidot 50 % B-pufferben (azaz 0,1 % TFA-t tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben; aldehid-mentes) lefagyasztottuk és liofilizáltuk. A tisztításhoz a nyers templát-terméket 2 ml 50 %-os B-pufferben feloldottuk, és hígítása érdekében 100 ml 100 % A-puffert (0,1 % vizes TFA-oldat) adtunk, hogy elkerüljük a guanidinium-klorid vagy acetát addícióját, mivel az aldehid addíciója garantált. A templátot preparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük, melyet előzetesen 40 °C-on 3 % B-pufferrel ekvilibráltunk. A sókat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt templátot (GRFN17) lineáris gradienssel tisztítottuk. A kívánt terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, a megfelelő frakciókat összeöntöttük és liofilizáltuk.

B) Elágazó, vizoldékony GRNFP29-polimer szintézise

A GRFNFP29-polimert (amely egy 15 kD molekulatömegű, elágazó (EDA-Succ)₁₂-polimer) a tisztított, tioltartalmú templát GRFN17 és a lineáris GRFNFP31-polimer [Br-acetil-(EDA-Succ)₁₂-karboxilát] tioéterképző ligálásával szintetizáltuk. A GRFNFP31-polimert karboxilképző "Sasrin"-gyantán, standard eljárások alkalmazásával [ld. Rose és mtsai.: J. Am.

Chem. Soc. 121, 7034 (1999); és 09/379297 számú egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés (Rose és mtsai.)] szintetizáltuk.

A tisztított GRFNP31 1,3-szeres moláris feleslegét (az összes tiolhoz képest), Br-acetilezett (EDA-Succ)₁₂-polimert és a tisztított, tioltartalmú GRFNP17-templátot együttesen, kb. 10 mM koncentrációban, 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó 0,1 M Tris-HCl pufferben (pH = 8,7) oldottuk. A kapott oldatot 0,1 M Tris-HCl pufferrel (pH = 8,7) háromszoros térfogatra hígítottuk. A ligálási elegyet szobahőmérsékleten kevertük, és a reakció előrehaladását reverz fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES/MS) ellenőriztük. Az elegyhez, szükség szerint, további GRFNP31-reaktánst adtunk, mindaddig, míg a fő termékként a kívánt reakcióterméket nem azonosítottuk. A feldolgozáshoz a reakcióelegyhez (térfogatához viszonyítva háromszoros térfogatban) 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó 0,1M acetátpuffert (pH = 4) adtunk, és a kapott oldatot preparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük, majd lineáris gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A tiszta GRFNP29-konstrukciót tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

C) A GRFN1776 és GRFN1711 oximozása GRFNP29-polimerrel

A SEP-1:4 és SEP-1:1 peptidszegmenst a 2. példában leírtak szerint szintetizáltuk. A SEP-1:4-peptidszegmenst és a GRFNP29-polimert együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó - 50 % vizes acetonitrilben oldottuk. A kapott oldatot liofilizáltuk, majd a száraz port preparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra (2,54 cm-es átmérő) töltöttük. A polimerrel módosított peptidet preparatív, reverz fázisú C4 gradiens HPLC-vel elválasztottuk a nem módosított peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:4+GP29-terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük.

A SEP-1:1-peptidszegmenst és a GRFNP29-polimert együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat (TFA) tartalmazó - 50 % vizes acetonitrilben oldottuk. A kapott oldatot lefagyasztottuk és liofilizáltuk, majd a száraz port 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os acetonitrilben feloldottuk, és a kapott oldatot preparatív gélpermeációs kromatográfiás (GPC)-oszlopra (2,54 cm-es átmérő) töltöttük. A polimerrel módosított peptidet izokratikus elúcióval választottuk el a nem módosított peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximozott SEP-1:1+GP29-terméket elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) azonosítottuk, majd a frakciókat összeöntöttük.

D) A szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B50-protein szintézise

A SEP-1-B50-proteint oldat fázisban, a következő négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

SEP-1:1+GP29 (GRFN-1711 + GRFNP29; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavainak felel meg):

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporthal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP29-polimerhez van kapcsolva);

SEP-1:2 (GRFN-1712; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavainak felel meg):

CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL

LVKSSQPW-tioészter (amelyben a 33. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-1:3 (GRFN-1713, amely a 2. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavainak felel meg):

CP LQLHVDKAVS GLRSLTTLR ALGAQK-tioészter (amelyben a 89. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-1:4+GP29 (GRFN-1776 + GRFNP29; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavainak felel meg):

CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKCLKYTGEA CRTGDR-

karboxilát [amelyben a 126. pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportján levulin-oxim-kapcsolócsoporthal van módosítva, vagyis levulin-amino-oxi-acetil (Lev-AoA) oximkötéssel (K^{ox}) a GRFNP29-polimerhez van kapcsolva, és a C-terminális cisztein (Cys¹⁶¹) pikolil (pico)-védőcsoportot hordoz].

A további peptidek szintézisét, a ligálási reakciókat, karboximetilezési reakciókat, védőcsoport-eltávolítási reakciókat, a polipeptidek hajtogatását (folding) és tisztítását az 1. és 2. példában leírtak szerint hajtottuk végre, azzal a különbséggel, hogy a tisztításra "Resource Q" oszlopot alkalmaztunk. Mindezek eredményeként a teljes hosszúságú, összehajtogatott SEP-1-B50-proteint (2. azonosítószámú szekvencia) kaptuk. Az összehajtogatott SEP-1-B50-proteintermék analitikai reverz fázisú HPLC-kromatogramja és elektroforlasztásos ionizációs tömegspektruma, valamint a CD-spektrum az összehajtogatott protein jelenlétét igazolta.

5. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-3-L42-protein szintézise

Szintetizáltunk egy ötödik szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP-3-L42) is. A SEP-3-protein aminosav-szekvenciája a következő:

5 APPRLICDSR VLERYLLEAK EAECITTGCA EHCSLNECIT VPDTKVNIFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LACSSQPWEP LQLHVDKAVS
GLRSLTTLLR ALGAQKEAIS PPDAACAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR (3. azonosítószámú szekvencia)

10 A 24., 38., 83. és 126. pozíciókban lévő ciszteineket maleimiddel funkcionalizált (EDA-Succ)₁₈-polimeregységekkel (GRFNP32), Michael-addíciós reakcióval módosítottuk, miáltal a SEP-3-L42-t kaptuk. A SEP-3-L42 szerkezetét a 20. ábrán mutatjuk be.

A SEP-3-L42 kémiai szintézisének reakcióvázlatát a 19. ábrán mutatjuk be. Röviden összefoglalva: a 19/A és 19/B ábrán a SEP-3-L42-konstrukció négy peptidszegmensének (SEP-3:1 - SEP-3:4) natív kémiai ligálását szemléltetjük, melynek eredményeként a humán
15 EPO mind a négy natív glikozilációs helyének megfelelő ligálási helyeken ciszteinek helyezkednek el. Közelebbről; a 19/B ábrán a mindegyik diszulfidképző ciszteinjén védett, teljes hosszúságú polipeptidet mutatjuk be, amely lehetővé teszi a négy töltéssel bíró, lineáris, vízdékony polimer [GRFN32-maleimid (GP-32-maleimid)] cisztein-ligálási helyeken, Michael-addíciós reakcióval történő kapcsolását. A 19/B ábrán látható a diszulfidképző ciszteinek végső védőcsoport-eltávolítási lépése, és a teljes hosszúságú, polimerrel módosított termék létrehozása is.
20

A SEP-3-proteint oldat fázisban, a következő négy peptidszegmensből szintetizáltuk:

SEP-3:1-peptidszegmens (GRFN-1747; amely a 3. azonosítószámú szekvencia 1-37. aminosavainak felel meg):

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAECITTGCA EHCSLNE-tioészter

25 (amelyben a 7., 29. és 33. pozícióban lévő cisztein Acm-csoporttal van védve);

SEP-3:2-peptidszegmens (GRFN-1774; amely a 3. azonosítószámú szekvencia 38-82. aminosavainak felel meg):

CIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LA-tioészter
(amelynek 38. pozícióban lévő ciszteinje oldalláncán Acm-csoporttal van védve);

30 SEP-3:3-peptidszegmens (GRFN-1749; amely a 3. azonosítószámú szekvencia 83-125. aminosavainak felel meg):

CSSQPWEP LQLHVDKAVS GLRSLTTLLR ALGAQKEAIS PPDA-tioészter (amelynek 83. pozícióban lévő ciszteinje oldalláncán Acm-csoporttal van védve);

SEP-3:4-peptidszegmens (GRFN-1750; amely a 3. azonosítószámú szekvencia 126-166. aminosavainak felel meg):

CAAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-karboxilát (amelynek 161. pozícióban lévő ciszteinje 4-(CH₃S(O)-)-benzilcsoporttal (Pbo) van védve).

5 Peptidszintézis

A SEP-3:1, SEP-3:2 és SEP-3:3 peptideket tioészterképző gyantán, a Boc-technikához alkalmas *in situ* semlegesítési eljárással és lépésenkénti szilárd fázisú peptidszintézissel (SPPS), az 1. példában leírtak szerint - a fentebb felsorolt védőcsoportoknak megfelelő változtatásokkal - szintetizáltuk. A SEP-3:4-es szakaszt az előzőkhöz hasonló módon, -OCH₂-

10 Pam-gyantán szintetizáltuk. A peptideket - védőcsoportjaik eltávolításával egyidejűleg - az 1. példában leírtak szerint hasítottuk le a gyantáról. Az előállított peptideket preparatív reverz fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) tisztítottuk. A tiszta peptidet tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és a későbbi ligáláshoz liofilizáltuk.

15 1. lépés: 1. ligálás

A SEP-3:4-es és SEP-3:3-as peptidszegmenst 15 mM koncentrációban trifluor-
etanolban (TFE) oldottuk, majd a kapott oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot és 1 % tiofenolt
tartalmazó - telített foszfátpuffert (pH = 7,5) adtunk, miáltal a peptidszegmensek átlátszó ol-
datát kaptuk. Ligálást követően a ligálási elegyet (melyet egy térfogategységnek tekintünk) 2
20 ml TFE, 6 ml 6M guanidinium-klorid, és 25 % β-merkaptóetanolt tartalmazó 100 mM
foszfátpuffer összetételű elegy kétszeres térfogatához adtuk és 20 percig inkubáltuk. Az olda-
tot tri(2-karboxi-etil)-foszfin·HCl (TCEP) jégecetben készített, 15 mg/ml koncentrációjú olda-
tával savanyítottuk, majd preparatív, reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gra-
diens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-3:Acm+SEP-3:3+SEP-3:4 ligálási terméket
25 elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, és
a megfelelő frakciókat összeöntöttük.

2. lépés: Acm-csoport eltávolítása (1. fázis)

Az Acm-csoport eltávolítása céljából a SEP-3:Acm+SEP-3:3+SEP-3:4 összeöntött
frakcióit tartalmazó vizes acetonitril-oldatot HPLC-tisztaságú vízzel egyszerűsére hígítottuk,
30 majd az oldathoz 2 M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez
3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (a várt cisztein-
összkoncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet
egy óra hosszat kevertük. Az oldatot ezután β-merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk,

félpreparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-3:3+SEP-3:4 ligált terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

5 3. lépés: 2. ligálás

A SEP-3:3+SEP-3:4 és a SEP-3:2 peptidszegmensek azonos mennyiségeit együttesen, 15 mM koncentrációban tiszta TFE-ben oldottuk, majd a kapott oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot és 1 % tiofenolt tartalmazó - 250 mM foszfátpuffert (pH = 7,5) adtunk, miáltal a peptidszegmensek átlátszó oldatát kaptuk. Egy napos ligálás után a ligálási elegyet (melyet egy térfogategységnek tekintünk) 10 ml TFE, 10 ml β -merkaptóetanol, 10 ml piperidin és 20 ml 6M guanidinium-klorid (pH = 4) elegyének kétszeres térfogatához adtuk, és a maradék védőcsoportok eltávolítása érdekében 20 percig inkubáltuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl (TCEP) 20 %-os vizes ecetsavban készített, 15 mg/ml koncentrációjú oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív, reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt ligált terméket (SEP-3:Acm+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

4. lépés: Acm-csoport eltávolítása

Az Acm-csoport eltávolítása céljából a SEP-3:Acm+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 összeöntött frakcióit tartalmazó vizes acetonitril-oldatot HPLC-tisztaságú vízzel egyszeresére hígítottuk, majd az oldathoz 2 M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (a várt ciszteinösszkoncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet egy óra hosszat kevertük. Az oldatot ezután β -merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk, félpreparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

5. lépés: 3. ligálás

30 A SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4 és a SEP-3:1 peptidszegmensek azonos mennyiségeit együtt, 15 mM koncentrációban tiszta TFE-ben feloldottuk, majd a kapott oldathoz - 6 M guanidinium-kloridot és 1 % tiofenolt tartalmazó - 250 mM foszfátpuffert (pH = 7,5) adtunk, miáltal a peptidszegmensek átlátszó oldatát kaptuk. Egy napos ligálás után a ligálási elegyet

(melyet egy térfogategységnek tekintünk) 10 ml TFE, 10 ml β -merkaptotanol, 10 ml piperidin és 20 ml 6M guanidinium-klorid (pH = 4) elegyéhez adtuk, és a maradék védőcsoportok eltávolítása érdekében 20 percig inkubáltuk. Az oldatot tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl (TCEP) 20 %-os vizes ecetsavban készített, 15 mg/ml koncentrációjú oldatának hozzáadásával savanyítottuk, majd preparatív, reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt ligált terméket (SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

6. lépés: A GRFNP32-polimer polipeptidhez történő kapcsolása

A GRFNP32-polimert a gyártó útmutatásai szerint BMPS-sel (3-maleimido-propionsav-NHS-észter; Pierce, USA) funkcionálizálva lineáris maleimid-(EDA-Succ)₁₈-polimert (melyet GRFNP32-maleimidnek nevezünk) hoztunk létre. A SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4-polipeptidet minimálisan szükséges mennyiségű TFE-ben feloldottuk. A GRFNP32-maleimid háromszoros feleslegét 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó 100 mM foszfátpufferben (pH = 7,5) oldottuk, és ezt az oldatot hozzáadtuk a TFE-oldathoz. A Michael-addíciós reakció előrehaladását analitikai reverz fázisú HPLC-vel ellenőriztük. A reakció befejeződése után az oldatot preparatív, reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és lineáris gradienssel tisztítottuk. A kívánt, polimerrel módosított SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+pPEG terméket [vagyis a teljes hosszúságú, 166 aminosavas, ligált polipeptid-láncot, amely 24., 38., 83. és 126. ciszteinjeihez kapcsolva négy GRFNP32-polimert tartalmaz (s így SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32-nek is nevezzük)] elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

7. lépés: Pbo-védőcsoport eltávolítása

A Pbo-csoport redukálása érdekében a SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32 liofilizált porát 5 % etánditiolt tartalmazó tiszta trifluorecetsavban oldottuk. A Pbo-csoportot 10 % tioanizol és 15 % bróm-trimetilszilán hozzáadásával, 30 perces kezeléssel hasítottuk le. Az oldatot bepárlócentrifugában szárítottuk, majd 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó vizes acetonitrilben felvettük. A kapott oldatot félpreparatív, reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával tisztítottuk. A kívánt SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32-Pbo termék (amelynek 161. ciszteinjéről a védőcsoportot eltávolítottuk) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

8. lépés: Acm-védőcsoport eltávolítása

A 7., 29. és 33. pozícióban lévő ciszteinek oldalláncain lévő Acm-csoportok végső eltávolítása érdekében a SEP-3:Acm+SEP-3:1+SEP-3:2+SEP-3:3+SEP-3:4+GP32-Pbo össze-
 öntött frakcióit tartalmazó vizes acetonitril-oldatot HPLC-tisztaságú vízzel egyszeresére hígí-
 5 tottuk, majd az oldathoz 2M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (a várt cisztein-
 összkoncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet
 egy óra hosszat kevertük. Az oldatot ezután β-merkaptotetanolban 20 %-ossá hígítottuk,
 félpreparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük és szakaszos gradiens alkalmazásával
 10 tisztítottuk. A kívánt, polimerrel módosított, ligált SEP-3(1-166) terméket tartalmazó frakció-
 kat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk
 és egy éjszakán át liofilizáltuk.

9. lépés: Folding

A teljes hosszúságú, polimerrel módosított, ligált SEP-3(1-166)-peptidet - 6M guani-
 15 dinium-kloridot, 20 % TFE-t és (a SEP-3-ban lévő ciszteinekre vonatkoztatva) tízszeres molá-
 ris feleslegben ciszteint tartalmazó - 200 mM Tris-pufferben (pH = 8,7) oldottuk. A kapott
 elegyet egy éjszakán át 3M guanidinium-kloridot tartalmazó 200 mM Tris-pufferrel (pH = 8,7)
 szemben dializáltuk. Ezt követően az oldatot 4 °C-on négy óra hosszat 1 M guanidinium-
 kloridot tartalmazó 200 mM Tris-pufferrel (pH=8,7) szemben, végül 4 °C-on négy óra hosszat
 20 10 mM foszfátpufferrel (pH=7,0) szemben dializáltuk, miáltal az összehajtogatott végterméket
 kaptuk. Az összehajtogatódást (folding) elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával
 (ES-MS) és cirkuláris dikroizmus (CD) spektrometriával igazoltuk.

10. lépés: Tisztítás

Az összehajtogatott polipeptidet Centricon típusú bepárlófiolákban ötszörösére tömé-
 25 nyítettük, majd 10 mM foszfátpufferrel (pH=7,0) kiegyensúlyozott "Resource S" kationcseré-
 lő oszlopra töltöttük. Az összehajtogatott proteint lineáris NaCl-gradienssel (500 mM-ig) 10
 percig eluáltuk. Az összehajtogatott SEP-3-L42-polipeptidet tartalmazó frakciókat SDS-
 poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) azonosítottuk, majd -80 °C-on lefagyasztottuk
 és tároltuk.

6. példa

A szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek biológiai aktivitásának vizsgálata

Az összehajtogatott, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek (SEP-0, SEP-1-L26, SEP-1-L30, SEP-1-B50 és SEP-3-L42) biológiai aktivitását faktor-dependens sejtvonal-proliferációs tesztekben, UT/7-es és 32D 103197-es sejtvonalak, standard kontrollként pedig kereskedelmi forgalomban beszerezhető rekombináns erythropoietin alkalmazásával határoztuk meg. Az UT-7 egy humán megakarioblasztos leukémia-sejtvonal, amely szaporodását és túlélését tekintve abszolút függőséget mutat az interleukin-3, granulocita-makrofág kolonizációt stimuláló faktor (GM-CSF) és erythropoietin (EPO) egyikével [ld. Miura, Y. és mtsai.: Acta Haematol. 99, 180 (1998); Komatsu és mtsai.: Cancer Res. 51, 341 (1991)]. A 32D 103197-es sejtvonal egy egéregedetű hemopoietikus sejtvonal [Metcalf, D.: Int. J. Cell Cloning 10, 116 (1992)].

10 % magzati borjúsérumot (FBS), glutamint és Penstrep-et tartalmazó, Iscove-féle módosított Dulbecco (IMDM) tápközegben elkészítettük a SEP-konstrukciók törzsoldatait, és a törzsoldatok kétszeres hígítási lépésekkel készített hígítás-sorozatait mikrotiter-tálcák üregeibe helyeztük, amelyekhez 5000 sejt/50 µl mennyiségben humán UT/7-EPO-sejteket adtunk. A tálcákat 5 % CO₂ jelenlétében 37 °C-on inkubáltuk, és a sejtek szaporodását naponta ellenőriztük. Négy nap elteltével az üregekhez 20 µl 2,5 mg/ml koncentrációjú metil-tiazol-tetrazolium oldatot (foszfátpufferelt sóoldatban) adtunk, és a tálcákat négy óra hosszat inkubáltuk. 150 µl IPA hozzáadása után mindegyik üregben 562 nm-nél mértük az abszorbanciát, s ennek alapján meghatároztuk a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek ED₅₀-értékeit (azaz a maximális hatás 50 %-ának eléréséhez szükséges dózisokat), és CHO-sejtekben termeltetett rekombináns humán erythropoietin (rhEPO) ED₅₀-értékével hasonlítottuk össze. E kísérletek eredményei azt bizonyítják, hogy a vizsgált szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteinek mindegyike képes biológiai aktivitás kifejtésére. A SEP-0, SEP-1-L26, SEP-1-L30 és SEP-1-B50 ED₅₀-értékét a 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

Erythropoiesis-stimuláló protein	<i>In vitro</i> ED ₅₀ -érték (pM)	
	Humán UT-7-sejtek	Egéreredetű 32D 103 197-sejtek
SEP-0	1,570	863
SEP-1-L26	46,5	100,8
SEP-1-L30	71,5	182,5
SEP-1-B50	182	6200
rhEPO	32,5	136,3

E kísérletek további (a polimerrel módosított SEP-1-L30 protein-koncentrációjának abszorbancia alapján történő kiszámítására alkalmas extinkciós koefficiens alkalmazásával csak a peptidtartalomra normalizált) eredményeit - a SEP-0, SEP-1-L26, SEP-1-L30, SEP-1-B50, SEP-3-L42 és SEP-1-B51 vonatkozásában (a SEP-1-B51 szintézisét a 7. példában ismertetjük) - a 7. táblázatban és a 26. ábrán mutatjuk be. Ezen *in vitro* tesztek eredményei együttesen azt mutatják, hogy a polimer szerkezetének és kapcsolódási helyének változtatása hatást gyakorol az *in vitro* biológiai aktivitásra. E vegyületek hatékonysága a humán EPO-receptor-aktivitásra végzett tesztben a következő sorrendet mutatta (a leghatékonyabból a legkevésbé hatékonyig haladva): SEP-1-L26 $\approx$ SEP-1-L30 > SEP-1-B50 $\approx$ SEP-1-B51 > SEP-3-L42 > SEP-0. A hatékonyság sorrendje az egéreredetű EPO-receptor aktivitásra végzett tesztben a következő volt: SEP-1-L26 > SEP-1-L30 > SEP-0 > SEP-3-L42 > SEP-1-B50 $\approx$ SEP-1-B51.

7. táblázat

Erythropoiesis-stimuláló protein	<i>In vitro</i> ED ₅₀ -érték (pM)	
	UT-7-sejtek (humán EPO-receptor)	32D 103 197-sejtek (egéreredetű EPO-receptor)
SEP-0	11	20
SEP-1-L26	0,8	1
SEP-1-L30	0,8	4
SEP-3-L42	7	70
SEP-1-B50	2,5	125
SEP-1-B51	2	125

A 7. táblázatban és 26. ábrán látható eredmények jelentős különbséget mutatnak a polimerrel módosított SEP-konstrukciók és a polimerrel nem módosított SEP-0-konstrukció receptor-preferenciájában. Közelebbről, a SEP-1-L26-konstrukció különböző lineáris polimerekkel van módosítva, melyek a megfelelő humán EPO glikozilációs helyekhez vannak kapcsolva (a 24. pozícióban 5,5 kD-os lineáris polimer, amely negatív töltésű oldalláncot tartalmaz; a 126. pozícióban pedig 1,8 kD-os lineáris polimer, amely semleges töltésű oldalláncot tartalmaz). Ez a konstrukció a humán és az egéredetű receptorok ellen hasonló aktivitást mutatott. A SEP-1-L30-konstrukció a humán EPO glikozilációs helyeknek megfelelő, 24. és 126. pozícióban 5,5 kD-os lineáris polimerrel van módosítva, amely negatív töltésű oldalláncot tartalmaz. E konstrukció humán receptorral szembeni aktivitása kb. ötször nagyobb volt, mint az egéredetű receptorral szembeni aktivitása. A SEP-3-L42-konstrukció (amely humán EPO glikozilációs helyeknek megfelelő, 24., 38., 83. és 126. pozíciókban 5,5 kD-os lineáris polimerrel van módosítva, mely negatív töltésű oldalláncot tartalmaz), a humán receptorral szemben kb. tízszer nagyobb aktivitást mutatott, mint az egéredetű receptorral szemben. A legnagyobb különbséget a SEP-1-B50 és a SEP-1-B51 esetében tapasztaltuk, melyek a humán EPO glikozilációs helyeinek megfelelő, 24. és 126. pozíciókban negatív töltésű, 15 kD-os elágazó polimerrel vannak módosítva, és pI-értékük hozzávetőleg 5 (hasonlóan a humán EPO-hoz). Ez a két konstrukció a humán receptorral szemben kb. 60-szor nagyobb aktivitást mutatott, mint az egéredetű receptorral szemben.

Mivel az egéredetű erythropoietinből hiányzik a humán EPO 126. pozíciójának megfelelő glikozilációs hely (az egéredetű EPO a humán EPO O-glikozilált szerinje helyett nem glikozilált prolint tartalmaz), a módosított receptoraktivitás részben e különbségnek köszönhető, így az egéredetű receptor olyan EPO-t részesít előnyben, amelyből a 126. pozícióban hiányzik az O-kötött glikoziláció. Ez hasonlóan érvényes a SEP-1-L26- és SEP-1-L30-konstrukció SEP-1-B50- és SEP-1-B52-konstrukcióval történő összehasonlítására is. Például, a SEP-1-L26-konstrukció a 126. pozícióban 1,8 kD-os, töltés nélküli polimert, míg a SEP-1-L30 - ugyancsak a 126. pozícióban - 5,5 kD-os, negatív töltésű polimert tartalmaz. Bár a humán EPO-receptorral szemben hasonló aktivitást tapasztaltunk, az egéredetű EPO-receptor elleni aktivitásban négyszeres különbséget mutattunk ki. A legnagyobb különbséget a SEP-1-B50- és SEP-1-B51-konstrukció esetében tapasztaltuk, melyek a humán EPO glikozilációs helyének megfelelő 126. pozícióban negatív töltésű, 15 kD-os polimert tartalmaznak. A humán EPO mind a négy natív glikozilációs helyének megfelelő pozícióban (vagyis a 24., 38., 83. és 126. pozícióban) 5,5 kD-os, negatív töltésű polimerek hozzákapszolása (a SEP-3-L42-

konstrukció esetében) tovább csökkentette az egéredetű receptorra vonatkozó preferenciát, azonban kevésbé, mint a SEP-1-B50- és SEP-1-B51-konstrukció esetében. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a receptor-specifitás a biológiai úton termelt, glikozilált proteinben a glikozilációs helyeknek megfelelő pozíciókban végrehajtott precíziós módosítással, és a hozzá-

5 kapcsolt polimer méretének, elágazódásának és töltésének változtatásával szabályozható.

7. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B51-protein szintézise

A) A SEP-1-B51 összetétele

10 Szintetizáltunk egy hatodik szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint (SEP-1-B51) is, amelynek teljes hosszúságú aminosav-szekvenciája azonos a SEP-1-L30 aminosav-szekvenciájával:

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVNIFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW^ψP LQLHVDKAVS

15 GLRSLTTLR ALGAQK^ψAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR (2. azonosítószámú szekvencia)

amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (amely szulfhidrilcsoportján karboximetilált cisztein); és K^{ox} jelentése: nem természetes lizin, amely ϵ -aminocsoportján oxim-kapcsolócsoporttal van módosítva, amely oximkötéssel egy megadott vízdékony polimerhez kapcsolódik.

20 Mindazonáltal, ez a protein - ellentétben a SEP-1-B50-nel - lizin elágazási maghoz amidkötésekkel kapcsolt négy lineáris (Succ-TTD)₁₂-Succ-alanin-OH láncot [azaz (Succ-TTD)₁₂-Succ-Ala-OH vagy (Succ-TTD)₁₂-Succ-Ala láncot] tartalmazó - elágazó polimer-konstrukcióval van derivatizálva. A lineáris polimerek elágazási maghoz történő kapcsolásával célunk a stabilitás javítása volt. A négy lineáris polimert úgy terveztük meg, hogy alanint és ne-

25 gatív toldalék töltéseket hordozzon, ahol a negatív töltések a szílsavakat utánozzák, az alanin pedig a szénhidrát-láncok cukorgyökeihez hasonló hidrofób karakterrel bír. Ezenfelül, az elágazó polimereket úgy terveztük, hogy az elágazási mag és a proteingerincen lévő kapcsolódási hely között vízben oldható távtartó komponenst tartalmazzon - egyrészt az elágazási mag templát szintézisének és kezelhetőségének javítása érdekében, másrészt a cukor proteingerinc-

30 hez történő kapcsolódásának helye és a szénhidrát első elágazási pontja közötti, természetes szénhidrát-láncokra jellemző távolság utánzása céljából.

A 21. ábrán az elágazó, vízben oldható GRFNP41 (GP41) polimer kémiai szintézisének reakcióvázlatát mutatjuk be, mely polimert az alábbiakban ismertetett oximképző ligálással a SEP-1-B51-poli-peptidhez kapcsoltuk. A teljes hosszúságú termék összeállítását a 2. példában leírtak szerint végeztük. A SEP-1-B51 szerkezetét a 22. ábrán szemléltetjük.

5 B) Az elágazási templáthoz (GRFNP40) történő kapcsolásra alkalmas (Succ-TTD)₁₂Succ-AlaOtBu (GRFBP39) szintézise

A lineáris (Succ-TTD)₁₂Succ-AlaOtBu (GRFBP39) polimert 0,5 mmol léptékben savbomlékony, karbonsavképző "Sasrin"-gyantán szintetizáltuk. 0,5 mmol (kb. 0,5 gramm) savbomlékony, karbonsavképző "Sasrin" polisztirol-gyantát (hidroxil-szubsztitúció = 1,02 mmol/gramm) dimetilformamidban 15 percig duzzasztottunk, majd lecsepegtettük. Ehhez a hidroxilcsoporttal funkcionizált gyantához - 500 µl (3,9 mmol) diizopropil-etilamint (DIEA) tartalmazó 8 ml dimetilformamidban - 450 mg (4,5 mmol) borostyánkősav-anhidridet és 488 mg (4 mmol) 4-(dimetil-amino)-piridint adtunk, majd az elegyet vortexezéssel végzett keverés közben 30 percig reagáltattuk, és a gyantát lecsepegtettük. A kapcsolási reakciót megismételtük, majd a felesleges reaktánsokat és oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A HOOC-CH₂CH₂CO-O-gyantát (0,5 mmol) dimetilformamidban frissen készített 8 ml térfogatú, 1,0 M koncentrációjú karbonildiimidazol-oldat (8 mmol) hozzáadásával aktiváltuk, a reakciót 40 percig hagytuk folytatódni, majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A gyantához ezután (4,7,10)-trioxa-tridekán-1,13-diamin (TTD; 4 gramm, 18,2 mmol) 4 ml 0,5M dimetilformamidos HOBT-oldatban (2 mmol) készített oldatát adtuk, vortexezéssel végzett keverés közben 30 percig reagáltattuk, majd a gyantáról a folyadékot lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A gyantához - 500 µl (3,9 mmol) DIEA-t tartalmazó 8 ml 0,5 M (4 mmol) N-hidroxi-benzotriazol (HOBT) oldatban borostyánkősavat (450 mg; 4,5 mmol) adtunk, vortexezéssel végzett keverés közben 15 percig reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. Ezt a három lépést (CDI-aktiválás, TTD-kapcsolás és borostyánkősav-anhidrides reakció) még tizenegyszer (azaz összesen tizenkétszer) megismételtük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. Az így kapott HOOC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyantát (0,5 mmol) dimetilfor-

mamidban frissen készített, 8 ml térfogatú és 1,0 M koncentrációjú CDI-oldattal (8 mmol) 40 percig reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. 150 µl DIEA-t (111 mg; 0,825 mmol) tartalmazó dimetilformamidban készített 4,75 ml térfogatú, 0,5 M koncentrációjú HOBT-oldatban (2,375 mmol) 2,5 mmol H-AlaOtBu·HCl-ot oldottunk, és vortexezéssel végzett keverés közben a CDI-aktiválta HOOC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyantával (0,5 mmol) egy óra hosszat reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A tBu-OOC-CH(CH₃)-NH-OC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyanta terméket diklórmétánnal alaposan leöblítettük, lecsepegtettük, majd a gyantát vákuumban tömegállandóságig szárítottuk. A termék-gyanta jellemző tömege hozzávetőleg 2 gramm volt.

A lineáris (Succ-TTD)₁₂Succ-AlaOtBu polimert diklórmétánban, 4 % trifluorecetsav jelenlétében, standard Fmoc-kémiai eljárások alkalmazásával hasítottuk le a gyantáról. A precipitált nyers terméket 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben feloldottuk, majd liofilizáltuk. A liofilizált polimert 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitril kis mennyiségében feloldottuk, és a szerves anyag koncentrációjának 1 % alá csökkentéséig hígítottuk. A nyers terméket preparatív reverz fázisú C4 oszlopra töltöttük, melyet előzetesen 40 °C-on 3 % B-pufferrel ekvibráltunk. A sókat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt templátot (GRFN17) 20-35 % B-puffer (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) lineáris gradiensével, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 60 percig tisztítottuk. A kívánt (Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu (GRFNP39) terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

C) Több, elágazási helyként szolgáló aminocsoportot és egy - a proteinhez történő (későbbi) kapcsolásra alkalmas - védett amino-oxicsoprotot tartalmazó templát (GRFNP40) szintézise

A GRFNP40-templátot 0,4 mmol-os léptékben, amidképző "Sieber"-gyantán, manuálisan szintetizáltuk. Minden egyes kapcsolási, védőcsoport-eltávolítási és aktiválási lépés között dimetilformamiddal egy perces átöblítéses mosást végezzünk. 2 mmol N^α-Fmoc-N^β-(Boc-amino-oxi-acetil)-L-diaminopropionsavat - diklórmétán/dimetilformamid elegyben 2 mmol DIC-vel és 2 mmol NHS-sel végzett 30 perces NHS-észteres előaktiválással - a gyantához

kapcsoltuk. Az Fmoc-védőcsoportot 20 térfogat%-os, dimetilformamidos HOBT-oldattal kétszer három percig végzett kezeléssel eltávolítottuk, majd a gyantához 2,2 mmol DIEA-t tartalmazó, 8 ml térfogatú 0,5 M dimetilformamidos CDI-oldatban (4 mmol) feloldott 4 mmol bo-
rostyánkősav-anhidridet kapcsoltunk (10 perces kezeléssel). E lépés után a karboxilcsoportot 8
5 ml 0,5 M koncentrációjú, friss, dimetilformamidos CDI-oldattal (4 mmol) aktiváltuk. A gyantához 4 ml 0,5M dimetilformamidos HOBT-oldatban 4 ml TTD-t (18,2 mmol) adtunk, és a kapcsolási reakciót 30 percig folytattuk.

A kapott amino-TTD-Succ-Dpr(BocAoA)-gyantához (amelyben Dpr jelentése: diaminopropionsav) - dimetilformamidban 2 mmol DIC-vel és 2 mmol NHS-sel végzett 30 perces
10 előaktiválással és egy óra hosszát végzett kapcsolással - Fmoc-Lys(Fmoc)-OH-t (2 mmol) kapcsoltunk. A kapcsolási reakciót még egyszer megismételtük. Az Fmoc-csoport 20 térfogat%-os, dimetilformamidos piperidinoldattal kétszer három perces kezeléssel végzett eltávolítása után a gyantához a fentiek szerint (ideértve az ismételt kapcsolási lépést is) 4 mmol Fmoc-Lys(Fmoc)-OH-t kapcsoltunk. Az utolsó Fmoc-eltávolítási lépés (20 térfogat%-os,
15 dimetilformamidos piperidinoldattal kétszer három percig végzett kezelés) után a templátot standard Fmoc-kémiai eljárással, 4 % trifluorecetsavat tartalmazó diklórmétán alkalmazásával lehasítottuk a hordozógyantáról. A precipitált terméket 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó vizes acetonitrilben feloldottuk és liofilizáltuk. A liofilizált, nyers terméket 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitril kis mennyiségében feloldottuk, majd a szerves anyag
20 koncentrációjának 1 % alá csökkentéséig hígítottuk. A nyers terméket preparatív reverz fázisú C4 HPLC-oszlopra töltöttük, melyet előzetesen 40 °C-on 3 % B-pufferrel (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) ekvilibráltunk. A sókat és az egyéb, nem amidtartalmú anyagokat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt templátot 5-12 % B-puffer (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) lineáris gradiensevel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 60 per-
25 cig tisztítottuk. A kívánt Lys-Lys(Lys)-TTD-Succ-Dpr(BocAOA)amid (GRFNP40) terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

D) Az amidos kapcsolású, elágazó polimer (GRFNP40) összeállítása és védőcsoportjainak eltávolítása

30 A GRFNP39 [(Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu] tisztított GRFNP40 templáthoz történő kapcsolásával 16 kD-os elágazó (TTD-Succ)₄₉-polimert (GRFNP41) szintetizáltunk. A tisztított (Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu-t (GRFNP39; 1,0 mmol) 60 °C-on dimetilszulfoxidban (DMSO) 20 mg/ml koncentrációban feloldottuk, majd 0,95 mmol O-(7-azabenzotriazol-1-il)-

1,1,3,3-tetrametil-uronium-hexafluoroszulfát DMSO-ban készített, 10 mg/ml koncentrációjú oldatával (DIEA 20-szoros moláris feleslegének jelenlétében) aktiváltuk, majd hozzáadtuk a DMSO-ban 3,9 mg/ml koncentrációban feloldott, tisztított GRFNP40 templátot (0,24 mmol). A reakció előrehaladását analitikai reverz fázisú C4 HPLC-vel és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával ellenőriztük. A kapcsolás rendszerint percek 5 belül teljesen lezajlott. A feldolgozáshoz a ligálási elegyhez - annak térfogatára vonatkoztatva - négyszeres térfogatú 0,1M nátrium-acetát/6M guanidinium-klorid összetételű oldatot (pH = 4) adtunk, és a kapott elegyet preparatív (C4) reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük. A sókat és az egyéb, nem amidtartalmú anyagokat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt, elágazó 10 polimerterméket 20-35 % B-puffer (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) lineáris gradiensével, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 80 percig tisztítottuk. A kívánt anyagot tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

A tisztított polimert - az amino-oxi-acetilgyök Boc-védőcsoportjának és az Ala-O-tBu 15 gyökök t-butil-észter-védőcsoportjainak eltávolítása érdekében - 1 mg/ml koncentrációban tiszta trifluorecetsavban feloldottuk és egy óra hosszat állni hagytuk. Az oldatot bepárlócentrifugában szárazra pároltuk, és a szárított polimert 50 % B-pufferben (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) feloldottuk. A kapott oldathoz - az adduktumképző szennyeződések eltávolítása érdekében - 0,5M végkoncentrációban amino-oxiecetsavat ("karboxi-metoxiamin") 20 adtunk. 20 perc elteltével az oldatot 3,3-szeres térfogatú A-pufferrel (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó víz) hígítottuk, preparatív (C4) reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük, és 10 % B-puffert szivattyúztunk rá, mindaddig, míg az összes amino-oxiecetsav eltávolításra nem került. Ezt követően a polimert szakaszos 15 % → 45 % B-puffer-gradienssel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben 80 percig tisztítottuk, majd az elágazó polimerterméket 25 (GRFNP41) tartalmazó, összeöntött frakciókat lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

E) A GRFN1776- és GRFN1711-peptidszegmensek oximképző ligálása (oximozása) az elágazó GRFNP41-polimerrel

A SEP-1:4-peptidszegmenst (GRFN1776; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavaiból áll) és a SEP-1:1-peptidszegmenst (GRFN1711; amely a 2. azonosító- 30 számú szekvencia 1-32. aminosavaiból áll) az 1. példában leírtak szerint, standard *in situ* semlegesítési Boc-kémiai SPPS-technika alkalmazásával szintetizáltuk. A GRFN1776-peptidet - OCH₂-Pam-gyantán, míg a GRFN1711-peptidet tioészterképző gyantán, standard eljárások alkalmazásával, a fentebb leírtak szerint állítottuk elő. A 126. ciszteinjén levulinos acilgyököt

tartalmazó GRFN1776-peptidet és az AoA-gyököt tartalmazó GRFNP41-peptidet együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó - 50 %-os vizes acetonitrilben oldottuk, majd a kapott oldatot liofilizáltuk. A nyers terméket (száraz port) 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben újra feloldottuk, és az oldatot preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük. A polimerrel módosított peptidet preparatív reverz fázisú gradiens HPLC-vel választottuk el a módosítatlan peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximkötött (oximozott) SEP-1:4+GP41 terméket tartalmazó frakciókat elektroforlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

10 A 24. lizinjén levulinos acilgyököt tartalmazó GRFN1711-peptidet és az AoA-gyököt tartalmazó GRFNP41-peptidet együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó - 50 %-os vizes acetonitrilben oldottuk, majd a kapott oldatot lefagyasztottuk és liofilizáltuk. A nyers terméket (száraz port) 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben újra feloldottuk, és az oldatot preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük. A polimerrel módosított peptidet preparatív reverz fázisú gradiens HPLC-vel választottuk el a módosítatlan peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximkötött (oximozott) SEP-1:1+GP41 terméket tartalmazó frakciókat elektroforlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

F) A szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B51-protein szintézise

20 A 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó SEP-1-B51-proteint oldat fázisban, a következő négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

SEP-1:1+GP41 (GRFN-1711+GRFNP41; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavainak felel meg):

25 APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin levulinos acilgyököt tartalmaz, amely oximkötéssel (K^{ox}) az elágazó GRFNP41-polimerhez van kapcsolva; és a 32. hisztidin Dnp-csoporttal van védve

SEP-1:2 (GRFN-1712; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavainak felel meg):

CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL

30 LVKSSQPW-tioészter (amelyben a 33. pozícióban lévő cisztein Acn-csoporttal, a három triptofán pedig formilcsoporttal van védve);

SEP-1:3 (GRFN-1713, amely a 2. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavainak felel meg):

CP LQLHVDKAVS GLRSLTLLR ALGAQK-tioészter (amelyben a 89. pozícióban lévő cisztein Ac-m-csoporttal, a 94. hisztidin pedig Dnp-csoporttal van védve);

SEP-1:4+GP41 (GRFN-1776+GRFNP41; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavainak felel meg):

- 5 CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR GKCLKYTGEA CRTGDR-karboxilát [amelyben C-terminális cisztein (Cys¹⁶¹) pikolil (pico)-védőcsoportot hordoz, és a 126. pozícióban lévő lizin levulinos acilgyököt tartalmaz, amely oximkötéssel (K^{ox}) az elágazó GRFNP41-polimerhez van kapcsolva].

- 10 A további peptidek szintézisét, a ligálási reakciókat, karboximetilezési reakciókat, védőcsoport-eltávolítási reakciókat, a polipeptidek hajtogatását (folding) és tisztítását (mely lépések a teljes hosszúságú, 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó, összehajtogatott SEP-1-B51-proteint eredményezik) az 1-4. példákban leírtak szerint (a következő módosítások beiktatásával) hajtottuk végre.

1. lépés: 1. ligálás

- 15 A SEP-1:4+GP41-peptidszegmenst egyszeres térfogatú trifluoretanolban (TFE) 3 mM koncentrációban feloldottuk, a SEP-1:3-peptidet pedig kétszeres térfogatú - 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó - 300 mM Na-foszfát pufferben (pH = 7,9) 2,25 mM koncentrációban oldottuk. A két oldatot összekevertük, s az így kapott oldatban a SEP-1:4+GP41 végkoncentrációja 1 mM, a SEP-1:3 végkoncentrációja pedig 1,5 mM lett. Ehhez az oldathoz
- 20 1 % tiofenolt adtunk, miáltal a peptidszegmensek ("három térfogatnyi") oldatát kaptuk (pH = 6,8-7,2). A ligálási reakciót szobahőmérsékleten egy óra hosszat hagytuk folytatódni. Ligálást követően a ligálási elegyhez háromszoros térfogatú β-merkaptóetanolt, majd szintén háromszoros térfogatú 6M guanidinium-klorid/300 mM Na-foszfát puffert (pH = 7,9) és TCEP-t (a peptidszegmensek össztömegére vonatkoztatva 0,25-szörös mennyiségben) adtunk, és a reak-
- 25 cióelegyet 20 percig kevertük. Az oldat kémhatását 0,6-szeres térfogatú jégcet hozzáadásával pH = 4,0 ± 0,1-re állítottuk be, s az így kapott, tiszta oldathoz 30-szoros térfogatnyi 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát puffert (pH = 4,0) adtunk. A kapott oldatot preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük, majd 5 % B-puffert pumpáltunk az oszlopra [vagyis a maradék 95 % A-puffer volt (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó víz)], mindaddig, míg az
- 30 összes nem peptid anyag kimosódott az oszlopról. Ezt követően a ligálási terméket B-puffer 25-45 % gradiensevel, 80 perces elúcióval tisztítottuk. A kívánt, ligált terméket (Cys⁸⁹(Ac-m))[SEP-1:3+SEP-1:4+GP41] tartalmazó frakciókat elektroforlasztásos tömegspektrometriával azonosítottuk és összeöntöttük.

2. lépés: Acm-csoport eltávolítása (1. fázis)

Az Acm-csoport eltávolítása érdekében a (Cys⁸⁹(Acm))[SEP-1:3+SEP-1:4+GP41] összeöntött frakcióit tartalmazó vizes acetonitril-oldatot HPLC-tisztaságú vízzel egyszeresére hígítottuk, majd az oldathoz 2M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml Hg(acetát)₂-oldatot (az összes cisztein-koncentrációhoz képest háromszoros moláris feleslegben) adtunk, majd a reakcióelegyet egy óra hosszát kevertük. Az oldatot ezután β-merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk, félpreparatív reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük és 25 % B-puffert áramoltottunk át rajta, mindaddig, míg valamennyi nem peptid anyag kimosódott, majd a terméket szakaszos gradiens alkalmazásával (50 % B-pufferig) tisztítottuk. A kívánt ligált terméket (SEP-1:3+SEP-1:4+GP41) tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos tömegspektrometria alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

3. lépés: 2. ligálás

A 2. lépésben kapott SEP-1:3+SEP-1:4+GP41 (azaz a 1713-1776-GP41) terméket egyszeres térfogatú trifluoretanolban (TFE) 3 mM koncentrációban feloldottuk. A SEP-1:2-peptidet (GRFN-1712) kétszeres térfogatú - 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó - 300 mM Na-foszfát pufferben (pH = 7,9) 2,25 mM koncentrációban oldottuk. A két oldatot összekevertük, s az így kapott oldatban a SEP-1:3+SEP-1:4+GP41 végkoncentrációja 1 mM, a SEP-1:2 végkoncentrációja pedig 1,5 mM lett. Ehhez az oldathoz 1 % tiofenolt adtunk, miáltal a peptidszegmensek ("három térfogatnyi") oldatát kaptuk (pH = 6,8-7,2). A ligálási reakciót szobahőmérsékleten egy óra hosszát hagytuk folytatódni. Ligálást követően a ligálási elegyet - a felhasznált TFE térfogatára vonatkoztatva - háromszoros térfogatú hígítópufferrel (6 M guanidinium-kloridot tartalmazó 100 mM nátrium-acetát puffer, pH = 4,0) hígítottuk, majd - három térfogatnyi β-merkaptóetanolból, három térfogatnyi piperidinből és hat térfogatnyi 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát pufferből (pH = 4,0) álló 4 °C-os oldathoz adtuk, és változatlan hőmérsékleten 20 percig kevertük, hogy eltávolítsuk az összes maradék védőcsoportot. Az oldatot 1,8-szeres térfogatú fagyasztott jégcet hozzáadásával savanyítottuk, s az így kapott, tiszta oldathoz TCEP-t (a peptidszegmensek össztömegére vonatkoztatva 0,25-szörös mennyiségben) adtunk, és a reakcióelegyet 20 percig inkubáltuk. Ezt követően az oldathoz 30-szoros térfogatnyi 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát hígítópuffert (pH = 4,0) adtunk. A kapott oldatot preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük, majd az oszlopra 30 % C-puffert (60 % izopropanol, 30 % acetonitril és 10 % víz elegyében 0,1 %

trifluorecetsav) pumpáltunk az oszlopra, mindaddig, míg az összes nem peptid anyag kimosódott az oszlopról. Ezt követően a ligálási terméket a C-puffer 37-57 % gradiensevel, 80 perces elúcióval tisztítottuk. A kívánt, ligált terméket (Cys³³(Acm))[SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41] tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

4. lépés: A 89. és 117. cisztein karboximetilezése

A (Cys³³(Acm))[SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41] terméket [azaz a (Cys³³(Acm))-1712-1713-1776-GP41 terméket] 1 mM koncentrációban trifluoretanolban (TFE) oldottuk, majd tízszeres térfogatú - 6 M guanidinium-kloridot tartalmazó - 300 mM Na-foszfát puffert (pH = 7,9) adtunk hozzá. Az így kapott oldathoz - a szulfhidrilcsoportokra vonatkoztatva 25-szörös feleslegben - brómcetsav metanolos oldatát (75 mg/ml) adtuk, és szobahőmérsékleten két óras keveréssel reagáltattuk. A reakcióelegyet ezután 11-szeres térfogatú - 6M guanidinium-kloridot tartalmazó - 100 mM Na-acetát pufferrel (pH = 4,0) hígítottuk, majd preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük, és 20 % C-pufferrel átáramoltattuk, mindaddig, míg az összes nem peptid anyag ki nem mosódott, majd a ligálási terméket szakaszos gradiensevel (55 % C-puffer koncentrációig) végzett eluálással tisztítottuk. A módosított (Cys³³(Acm);ψ^{89,117}){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41} terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, összeöntöttük és liofilizáltuk.

5. lépés: Pikolilcsoport eltávolítása

2M sósavban 5 percig cinkport (a peptid tömegére vonatkoztatva 71 mg/mg) aktiváltunk, majd az aktiválást még egyszer megismételtük, és a cinkport - a felesleges sav eltávolítása érdekében - frissen hozzáadott 35 mg/ml L-metionint és 35 mg/ml nátrium-N-dodekanoilszarkozint tartalmazó - 6M guanidinium-klorid/50 mM glicin-pufferrel (pH=2,2) mostuk. A mosást még egyszer megismételtük. A Cys¹⁶¹(Pico)-tartalmú peptidet [(Cys³³(Acm);ψ^{89,117}){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41}] tiszta trifluoretanolban (TFE) kb. 30 mg/ml koncentrációra hígítottuk, majd az oldatot a TFE térfogatára vonatkoztatva négyszeres térfogatnyi - frissen hozzáadott 35 mg/ml L-metionint és 35 mg/ml nátrium-N-dodekanoilszarkozint és 10 térfogat% TFE-t tartalmazó - 6M guanidinium-klorid/50 mM glicin-pufferrel (pH=2,2) hígítottuk. Az oldatot hozzáadtuk az aktivált cinkporhoz, és szobahőmérsékleten 50 percig kevertük. A reakció előrehaladását - azonos térfogatú β-merkaptóetanollal és néhány szemcse TCEP-vel kezelt, majd az analízishez 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát puf-

ferrel (pH = 4,0) kétszeres térfogatra hígított - alikvotok analitikai reverz fázisú C4 HPLC-kromatográfiájával kb. egy óránként ellenőriztük. A reakció 2-5 óra alatt befejeződött. Miután a pikolilcsoportok eltávolítása maradéktalanul megtörtént [amit az analitikai HPLC-csúcsok elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriájával mutattunk ki (91 D-os molekulatömegcsökkenés alapján)], a felülúszót szűréssel eltávolítottuk, a maradék cinkport 6M guanidinium-kloriddal (pH=4), 35 mg/ml L-metionint és 35 mg/ml dodecilszarkozint tartalmazó 100 mM acetát-puffer (pH=4) 20 % TFE-t tartalmazó elegyével háromszor mostuk. A felülúszót és a mosófrakciót összeöntöttük, BioRad SM-2 golyókat adtunk hozzá (az oldat térfogatára vonatkoztatva kb. 1/3 mennyiségben), szobahőmérsékleten 30 percig kevertük, majd leszűrtük. Az oldathoz 10 térfogat% végkoncentrációban β -merkaptóetanolt adtunk, majd - a peptidek össztömegére vonatkoztatva - 1/4 mennyiségű tri(2-karboxi-etil)-foszfinHCl-ot (TCEP) adtunk, és a kapott oldatot szobahőmérséklet 5 percig kevertük. Az oldatot azonos térfogatú 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát pufferrel (pH = 4,0) 1:1 arányban hígítottuk, preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük, majd 35 % C-pufferrel átáramoltattuk, mindaddig, míg az összes nem peptid anyag kimosódott, és a terméket szakaszos gradienssel (55 % C-puffer-koncentrációig) végzett elúcióval tisztítottuk. A kívánt terméket [(Cys³³(Acm); $\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41}], amelynek 161. ciszteinjéről el van távolítva a védőcsoport] tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos tömegspektrometria alkalmazásával azonosítottuk, és a frakciókat összeöntöttük.

6. lépés: Az Acm-védőcsoport eltávolítása (2. fázis)

A (Cys³³(Acm); $\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41-Pico} frakciók összeöntött oldatát HPLC-tisztaságú vízzel háromszorosára hígítottuk, majd az oldathoz 2M végkoncentrációban szilárd karbamidot adtunk. Az így kapott elegyhez 3 %-os vizes ecetsavban készített 30 mg/ml koncentrációjú Hg(acetát)₂-oldatot adtunk (az össz cisztein-koncentrációhoz viszonyítva háromszoros moláris feleslegben), majd a reakcióelegyet egy óra hosszat kevertük. Az oldatot ezután β -merkaptóetanolban 20 %-ossá hígítottuk és félpreparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük. Az oszlopon 20 % puffer-C-t áramoltattunk át, mindaddig, míg az összes nem peptid anyag ki nem mosódott, majd a kívánt terméket 55 % puffer-C-koncentrációig szakaszos gradienssel tisztítottuk. A kívánt (Cys³³; $\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41-Pico} terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk, majd ezeket a peptid tömegéhez viszonyítva kétszeres tömegű dodecyl-foszfokolint (DPC) tartalmazó vízzel kétszeres térfogat-

ra hígítottuk és egy éjszakán át liofilizáltuk.

7. lépés: 3. ligálás

A (Cys³³(Acm); $\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41-Pico} terméket [azaz a (Cys³³; $\psi^{89,117}$)-1712-1713-1776-GP41 terméket] egyszeres térfogatú trifluoretanolban (TFE) 3 mM koncentrációban feloldottuk. A SEP-1:1-peptidet (1711-GP41) kétszeres térfogatú 6 M guanidinium-klorid/300 mM Na-foszfát pufferben (pH = 7,9) feloldottuk. A két oldatot összekevertük, a kapott oldathoz 1 térfogat% tiofenolt adtunk, és a ligálási elegyet szobahőmérsékleten egy óra hosszat kevertük. Ezt követően az oldathoz - a felhasznált TFE térfogatára vonatkoztatva - háromszoros térfogatú β -merkaptotetanolt és kilencszeres térfogatú ligálópuffert (6M guanidinium-kloridot tartalmazó 300 mM nátrium-foszfát puffer, pH = 7,9) adtunk, majd az így kapott oldathoz TCEP-t (a peptidek össztömegére vonatkoztatva 0,25-szörös mennyiségben) adtunk, és a reakcióelegyet 20 percig inkubáltuk. Ezt követően az oldatot 0,6-szeres térfogatú jégecettel pH=4,0-re savanyítottuk, majd 30-szoros térfogatnyi 6M guanidinium-klorid/100 mM Na-acetát pufferrel (pH = 4,0) hígítottuk. A kapott oldatot preparatív reverz fázisú (C4) HPLC-oszlopra töltöttük, majd az oszlopra 25 % C-puffert pumpáltunk, mindaddig, míg az összes nem peptid anyag kimosódott az oszlopról. Ezt követően a ligálási terméket a C-puffer 35-55 % gradiensével, 80 perces elúcióval tisztítottuk. A kívánt, ligált SEP-1(1-166) ($\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41} terméket (2. azonosítószámú szekvencia) tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos tömegspektrometriával azonosítottuk és összeöntöttük.

8. lépés: Folding

A teljes hosszúságú, ligált SEP-1(1-166) ($\psi^{89,117}$){SEP-1:2+SEP-1:3+SEP-1:4+GP41} peptidet [1711(GP41)-1712-1713-1776-GP41] tartalmazó, összeöntött frakciókhoz szilárd guanidinium-kloridot, 1M Tris-puffert (pH=8,7) és desztillált vizet adtunk, olyan mennyiségben, hogy az oldatban a ligált SEP-1-(1-166)-peptid végkoncentrációja 0,1 mg/ml, a guanidinium-kloridé 6M, a Tris-pufferé pedig 100 mM legyen. A ligált peptid ("protein") így kapott oldatát 15 ml térfogatú dializálókazettákba töltöttük és 4 °C-on egy éjszakán át 3 M guanidinium-kloridot, 5 μ M ciszteint és 1 μ M cisztint tartalmazó 100 mM Tris-pufferrel (pH=8,5) szemben dializáltuk. A proteinoldatot ezután 4 °C-on egy éjszakán át 1M guanidinium-kloridot tartalmazó 100 mM Tris-pufferrel (pH = 8,5) szemben 8 óra hosszat, végül 4 °C-on 10 mM Tris-pufferrel (pH=7,0) szemben 14 óra hosszat dializáltuk, miáltal az összehajtogatott végterméket kaptuk. A dializálókazettákból származó proteinoldatokat

összeöntöttük, és az összehajtogatódást ("folding") elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS), reverz fázisú, nagynyomású folyadékkromatográfia és CD-spektrometria alkalmazásával igazoltuk.

9. lépés: Tisztítás

5 Az összehajtogatott proteint tartalmazó oldatot 10 mM Tris-pufferrel (pH=7,0) ekvilibrált Q-Sepharose ioncserélő oszlopra töltöttük. Az összehajtogatott proteint lineáris NaCl-gradiens (125 mM-ig) alkalmazásával eluáltuk. A ligált SEP-1-B51-terméket tartalmazó frakciókat nem redukáló SDS-PAGE alkalmazásával azonosítottuk és összeöntöttük. Az egyesített frakciókat ultraszűrővel kb. 2 mg/ml koncentrációra töményítettük, majd a proteinoldatot 2,6 cm x 100 cm-es "S-300" típusú gélszűrő oszlopra töltöttük. A tisztított SEP-1-B51-proteint 137 mM nátrium-kloridot tartalmazó 10 mM Tris-pufferrel (pH=7,0) eluáltuk. A nagy tisztaságú SEP-1-B51-proteint tartalmazó frakciókat nem redukáló SDS-PAGE alkalmazásával azonosítottuk, majd összeöntöttük, lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk. A tisztított, összehajtogatott SEP-1-B51 végterméket analitikai (C4) reverz fázisú HPLC-vel, 15 elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) és CD-spektrometriával karakterizáltuk. A 25. ábrán egy reprezentatív izoelektromos fókuszálási gélt (IEF) és nem redukáló SDS-PAGE-gélt mutatunk be, feltüntetve a megfelelően összehajtogatott, tisztított SEP-1-B51-protein relatív molekulatömegét (összehasonlításként feltüntettük az ugyanazon gélen futtatott molekulatömeg-standardot is. Ahogy az ábrán látható, a SEP-1-B51-protein nem redukáló SDS-PAGE-analízissel meghatározott relatív molekulatömege 73 kD, míg relatív pI-értéke 5,0 volt. A 25. ábrán látható az összehajtogatott, tisztított SEP-1-B51-protein reprezentatív RP-HPLC-kromatogramja is, amely igazolja a találmány szerinti, precíziós, polimerrel módosított proteinek tisztaságát és megnövekedett relatív molekulatömegét.

25 8. példa

Szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B52-protein szintézise

A) A SEP-1-B52 összetétele

A hetedik általunk előállított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein a SEP-1-B52 volt, amelynek teljes hosszúságú aminosav-szekvenciája azonos a SEP-1-B51 aminosav-szekvenciájával:

APPRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EHCSLNEKIT VPDTKVNFYA
WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW^ψP LQLHVDKA VS

GLRSLTLLR ALGAQK ψ AIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTFRK LFRVYSNFLR
GKLKLYTGEA CRTGDR (2. azonosítószámú szekvencia)

amelyben ψ jelentése: nem természetes aminosav (amely szulfhidrilcsoportján karboximetilált
cisztein); és K^{ox} jelentése: nem természetes lizin, amely ϵ -aminocsoportján oxim-kapcsolócso-
5 porttal van módosítva, amely oximkötéssel egy megadott vízőldékony polimerhez kapcsolódik.

A SEP-1-B52-protein 24. és 126. aminosaván - a SEP-1-B51-hez hasonlóan - elágazó
(Succ-TTD)₁₂-Succ-Ala polimer-konstrukcióval van derivatizálva, de ebben az esetben a poli-
mert a piruvát és az amino-oxiecentsav közötti oximkötéssel kapcsoltuk a polipeptidhez. A 24.
és 126. pozícióban lévő lizinek ϵ -aminocsoportját úgy módosítottuk, hogy a levulinsav-eredetű
10 acilgyök helyett amino-oxi-acetilcsoportot tartalmazzon, és az elágazó (Succ-TTD)₁₂-Succ-Ala
polimer-konstrukciót úgy állítottuk elő, hogy piruvát-eredetű acilgyököket hordozzon. Ezeket a
változtatásokat a szintézis és a kezelhetőség javítása, illetve az oximkötések stabilitásának to-
vábbi növelése céljából terveztük.

A 23. ábrán az elágazó, vízben oldható GRFNP43 (GP43) polimer kémiai szintézisé-
15 nek reakcióvázlatát mutatjuk be, mely polimert az alábbiakban ismertetett oximképző ligálással
a SEP-1-B52-polipeptidhez kapcsoltuk. A teljes hosszúságú termék összeállítását a 2. példában
leírtak szerint végeztük. A SEP-1-B52 szerkezetét a 24. ábrán szemléltetjük.

B) Az elágazási templáthoz (GRFNP42) történő kapcsolásra alkalmas (Succ-TTD)₁₂Succ-
AlaOtBu (GRFBP39) szintézise

20 A lineáris (Succ-TTD)₁₂Succ-AlaOtBu (GRFBP39) polimert 0,5 mmol léptékben
szintetizáltuk. 0,5 mmol (kb. 0,5 gramm) savbomlékony, karbonsavképző "Sasrin" polisztirol-
gyantát (hidroxil-szubsztitúció = 1,02 mmol/gramm) dimetilformamidban 15 percig duzzasz-
tottunk, majd lecsepegtettük. Ehhez a hidroxilcsoporttal funkcionális gyantához - 500 μ l
(3,9 mmol) diizopropil-etilamint (DIEA) tartalmazó 8 ml dimetilformamidban feloldva - 450
25 mg (4,5 mmol) borostyánkősav-anhidridet és 488 mg (4 mmol) 4-(dimetil-amino)-piridint ad-
tunk, majd az elegyet vortexezéssel végzett keverés közben 30 percig reagáltattuk, és a gyantát
lecsepegtettük. A kapcsolási reakciót megismételtük, majd a felesleges reaktánsokat és oldható
melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblí-
téssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A HOOC-CH₂CH₂CO-O-gyantát (0,5
30 mmol) dimetilformamidban frissen készített 8 ml térfogatú, 1,0 M koncentrációjú karbonil-
diimidazol-oldat (8 mmol) hozzáadásával aktiváltuk, a reakciót 40 percig hagytuk folytatódni,
majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket

vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A gyantához ezután (4,7,10)-trioxa-tridekán-1,13-diamin (TTD; 4 gramm, 18,2 mmol) 4 ml 0,5M dimetilformamidos HOBt-oldatban (2 mmol) készített oldatát (4 ml) adtuk, vortexezéssel végzett keverés közben 30 percig reagáltattuk, majd a gyantáról a folyadékot lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A gyantához - 500 µl (3,9 mmol) DIEA-t tartalmazó 8 ml 0,5 M (4 mmol) N-hidroxibenzotriazol (HOBt) oldatban borostyánkősavat (450 mg; 4,5 mmol) adtunk, vortexezéssel végzett keverés közben 15 percig reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. Ezt a három lépést (CDI-aktiválás, TTD-kapcsolás és borostyánkősav-anhidrides reakció) még tizenegyszer (azaz összesen tizenkétszer) megismételtük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. Az így kapott HOOC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyantát (0,5 mmol) dimetilformamidban frissen készített, 8 ml térfogatú és 1,0 M koncentrációjú CDI-oldattal (8 mmol) 40 percig reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. 150 µl DIEA-t (111 mg; 0,825 mmol) tartalmazó dimetilformamidban készített 4,75 ml térfogatú, 0,5 M koncentrációjú HOBt-oldatban (2,375 mmol) 2,5 mmol H-AlaOtBuHCl-ot oldottunk, és az oldatot vortexezéssel végzett keverés közben a CDI-aktivált HOOC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyantával (0,5 mmol) egy óra hosszat reagáltattuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A felesleges reaktánsokat és az oldható melléktermékeket vortexezés közben kb. 50 ml dimetilformamiddal végzett egy perces átöblítéssel eltávolítottuk, majd a gyantát lecsepegtettük. A tBu-OOC-CH(CH₃)-NH-OC-CH₂CH₂CO(TTD-szukcinil)₁₂-O-gyanta terméket diklórmetánnal alaposan leöblítettük, lecsepegtettük, majd a gyantát vákuumban tömegállandóságig szárítottuk. A termék-gyanta jellemző tömege hozzávetőleg 2 gramm volt.

A lineáris (Succ-TTD)₁₂Succ-AlaOtBu polimert 4 % trifluorecetsavat tartalmazó diklórmetánban, standard Fmoc-kémiai eljárások alkalmazásával hasítottuk le a gyantáról. A precipitált nyers terméket 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben feloldottuk, majd liofilizáltuk. A liofilizált polimert 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitril kis mennyiségében feloldottuk, és a szerves anyag koncentrációjának 1 % alá csökkentéséig hígítottuk. A nyers terméket preparatív reverz fázisú C4 oszlopra töltöttük,

melyet előzetesen 40 °C-on 3 % B-pufferrel ekvibráltunk. A sókat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt templátot 20-35 % B-puffer (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) lineáris gradiensevel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 60 percig tisztítottuk. A kívánt (Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu (GRFNP39) terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

C) Több, elágazási helyként szolgáló aminocsoportot és egy - a proteinhez történő (későbbi) kapcsolásra alkalmas - védett amino-oxicsoprotot tartalmazó templát (GRFNP42) szintézise

A GRFNP42-templátot Boc-Leu-OCH₂-Pam-gyantán 0,4 mmol-os léptékben, manuálisan szintetizáltuk. Minden egyes kapcsolási, védőcsoport-eltávolítási és aktiválási lépés között dimetilformamiddal egy perces átöblítéses mosást végzünk. A Boc-csoportot tiszta (azaz 100%-os) trifluorecetsavval végzett kezeléssel eltávolítottuk. Dimetilformamiddal végzett mosás után a gyantához - 1 ml DIEA-t tartalmazó 3,8 ml dimetilformamidban 1,8 mmol HBTU-val végzett aktiválást követően - 2 mmol Fmoc-(Rink-kapcsoló)-OH-t kapcsoltunk. Az Fmoc-védőcsoportot 20 térfogat%-os, dimetilformamidos piperidin-oldattal kétszer három percig végzett kezeléssel eltávolítottuk, majd a gyantához - 2 mmol DIC-t és 2 mmol NHS-t tartalmazó dimetilformamiddal végzett NHS-észteres aktiválás után - 2 mmol Fmoc-Lys(MTT)-OH-t kapcsoltunk [MTT = 4-metil-(trifenil-metil)-csoport]. Az Fmoc-védőcsoport 0,5 %-os dimetilformamidos DBU-oldattal kétszer egy perces kezeléssel végzett eltávolítása után a gyantához - 2,2 mmol DIEA-t tartalmazó, 8 ml térfogatú 0,5 M dimetilformamidos CDI-oldatban (4 mmol) feloldott - 4 mmol borostyánkősav-anhidridet kapcsoltunk (10 perces kezeléssel). E lépés után a gyantához kapcsolt karboxilcsoportot 8 ml 0,5 M koncentrációjú, friss, dimetilformamidos CDI-oldattal aktiváltuk. A gyantához 4 ml 0,5M dimetilformamidos HOBT-oldatban 4 ml TTD-t (18,2 mmol) adtunk, és a kapcsolási reakciót 30 percig folytattuk.

A kapott gyantához - dimetilformamidban 2 mmol DIC-vel és 2 mmol NHS-sel végzett NHS-észteres aktiválással - Fmoc-Lys(Fmoc)-OH-t kapcsoltunk. Az Fmoc-csoport 0,5 %-os dimetilformamidos DBU-oldattal kétszer egy perces kezeléssel végzett eltávolítása után a gyantához 3 ml dimetilformamidban 4 mmol Boc-Lys(Boc)-NHS-t kapcsoltunk.

Az MTT-védőcsoportot 2 % trifluorecetsavat tartalmazó diklórmétánnal végzett többszöri mosással eltávolítottuk. A védőcsoport eltávolítása akkor volt teljes, ha a felülszó elvesztette sárga színét. A gyantát 10 % DIAE-t tartalmazó dimetilformamiddal egy percig semlegesítettük, majd - dimetilformamidban 2 mmol DIC-vel és 2 mmol NHS-sel 45 percig végzett NHS-észteres aktiválás alkalmazásával - 2 mmol piruvátot kapcsoltunk hozzá. A

templát védőcsoportjainak eltávolítása és a hordozógyantáról történő lehasítása érdekében 5 % vizet tartalmazó trifluorecetsavval kezeltük. A hasítási oldatot bepárlócentrifugában szárazra pároltuk. A maradékot 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben feloldottuk és liofilizáltuk. A liofilizált templátot 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitril kis mennyiségében feloldottuk, majd a szerves anyag koncentrációjának 1 % alá csökkentéséig hígítottuk. A piruvát-tartalmú templátot preparatív C4-oszlopra töltöttük, melyet előzetesen 40 °C-on 0 % B-pufferrel (azaz 100 % A-puffer = 0,1 trifluorecetsavat tartalmazó víz) ekvibráltunk. A sókat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt templátot 5-12 % B-puffer lineáris gradiensevel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 60 percig tisztítottuk. A kívánt GRFNP42-terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

D) Az amidos kapcsolású, elágazó polimer (GRFNP43) összeállítása és védőcsoportjainak eltávolítása

A GRFNP39 [(Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu] tisztított GRFNP42 templáthoz történő kapcsolásával 16 kD-os elágazó (TTD-Succ)₄₉-polimert (GRFNP43) szintetizáltunk. A tisztított (Succ-TTD)₁₂-Succ-AlaOtBu-t (GRFNP39; 1,0 mmol) 60 °C-on dimetilszulfoxidban (DMSO) 20 mg/ml koncentrációban feloldottuk, majd 0,95 mmol HATU DMSO-ban készített, 10 mg/ml koncentrációjú oldatával (DIEA 20-szoros moláris feleslegének jelenlétében) aktiváltuk, majd közvetlenül ezután hozzáadtuk a DMSO-ban 3,9 mg/ml koncentrációban feloldott, tisztított GRFNP42-templátot (0,24 mmol). A reakció előrehaladását analitikai reverz fázisú C4 HPLC-vel és elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával ellenőriztük. A kapcsolás rendszerint percekben belül teljesen lezajlott. A feldolgozáshoz a ligálási elegyhez - annak térfogatára vonatkoztatva - négyszeres térfogatú 0,1M nátrium-acetát/6M guanidinium-klorid összetételű oldatot (pH = 4) adtunk, és a kapott elegyet preparatív (C4) reverz fázisú HPLC-oszlopra töltöttük. A sókat és az egyéb, nem amidtartalmú anyagokat izokratikus módon eluáltuk, majd a kívánt, elágazó polimerterméket 20-35 % B-puffer (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) lineáris gradiensevel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben, 80 percig tisztítottuk. A kívánt anyagot tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) azonosítottuk, lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

A tisztított, elágazó GRFNP43-polimerkonstrukciót - az Ala-O-tBu gyökök t-butil-észter-védőcsoportjainak eltávolítása érdekében - 1 mg/ml koncentrációban tiszta trifluorecetsavban feloldottuk és egy óra hosszat állni hagytuk. Az oldatot bepárlócentrifugában szárazra

pároltuk, és a szárított polimert 50 % B-pufferben (0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó acetonitril) feloldottuk. A polimert szakaszos 15 % → 45 % B-puffer-gradienssel, 0,1 %-os vizes trifluorecetsavval szemben 80 percig tisztítottuk, majd a kívánt anyagot (GRFNP43) tartalmazó, összeöntött frakciókat lefagyasztottuk és liofilizáltuk.

5 E) A GRFN1776- és GRFN1711-peptidszegmensek oximképző ligálása (oximozása) az elágazó GRFNP43-polimerrel

A SEP-1:4- és SEP-1:1-peptidszegmenst a 2., 3., 4. és 7. példában leírtak szerint szintetizáltuk, azzal a különbséggel, hogy a megfelelő peptidszegmensekben a 24. és 126. lizinhez, standard kapcsolási eljárásokkal - levulinsav helyett - amino-oxi-acetilgyököt (AoA) 10 kapcsoltunk. A peptid-gyanták összeállítása után az oldallánc-Fmoc-csoportot mindegyik peptid-gyantáról lehasítottuk, és a gyantához - dimetilformamidban 2 mmol DIC-vel és 2 mmol NHS-sel végzett NHS-észteres aktiválás alkalmazásával - 2 mmol Boc-amino-oxiecetsavat adtunk. A két peptid védőcsoportjainak eltávolítása és gyantáról történő lehasítása érdekében hidrogén-fluoridos kezelést alkalmaztunk, majd a peptideket reverz fázisú C4 HPLC-vel 15 tisztítottuk. A karbonilvegyületekkel bekövetkező reakció elkerülése érdekében megfelelő óvintézkedéseket tettünk. A SEP-1:4-peptidet és a GRFNP43-polimert együttesen, azonos molarányban - 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó - 50 %-os vizes acetonitrilben oldottuk, majd a kapott oldatot liofilizáltuk. A kapott száraz port 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben újra feloldottuk, és az oldatot preparatív reverz fázisú gradiens (C4) 20 HPLC-oszlopra töltöttük. A polimerrel módosított peptidet preparatív reverz fázisú gradiens HPLC-vel választottuk el a módosítatlan peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, oximkötött (oximozott) SEP-1:4+GP43 terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és összeöntöttük.

A SEP-1:1-peptidet és a GRFNP43-polimert együttesen, azonos molarányban - 0,1 % 25 trifluorecetsavat tartalmazó - 50 %-os vizes acetonitrilben oldottuk, majd a kapott oldatot lefagyasztottuk és liofilizáltuk. A kapott száraz port 0,1 % trifluorecetsavat tartalmazó 50 %-os vizes acetonitrilben újra feloldottuk, és az oldatot preparatív reverz fázisú gradiens (C4) HPLC-oszlopra töltöttük. A polimerrel módosított peptidet preparatív reverz fázisú gradiens HPLC-vel választottuk el a módosítatlan peptidtől és az el nem reagált polimertől. A kívánt, 30 oximkötött (oximozott) SEP-1:1+GP43 terméket tartalmazó frakciókat elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometria (ES-MS) alkalmazásával azonosítottuk és összeöntöttük.

F) A szintetikus erythropoiesis-stimuláló SEP-1-B52-protein szintézise

A 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó SEP-1-B52-proteint oldat fázisban, a következő négy polipeptid-szakaszból szintetizáltuk:

SEP-1:1+GP43 (GRFN-1711+GRFNP43; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 1-32. aminosavainak felel meg):

APRLICDSR VLERYLLEAK EAEK^{ox}ITTGCA EH-tioészter (amelyben a 24. pozícióban lévő lizin AoA-gyököt tartalmaz, amely oximkötéssel (K^{ox}) az elágazó GRFNP43-polimerhez van kapcsolva; és a 32. hisztidin Dnp-csoporttal van védve

SEP-1:2 (GRFN-1712; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 33-88. aminosavainak felel meg):

CSLNEKIT VPDTKVNIFYA WKRMEVGQQA VEVWQGLALL SEAVLRGQAL LVKSSQPW-tioészter (amelyben a 33. pozícióban lévő cisztein Acn-csoporttal, a három triptofán pedig formilcsoporttal van védve);

SEP-1:3 (GRFN-1713, amely a 2. azonosítószámú szekvencia 89-116. aminosavainak felel meg):

CP LQLHVDKAVS GLRSLTTLR ALGAQK-tioészter (amelyben a 89. pozícióban lévő cisztein Acn-csoporttal, a 94. hisztidin pedig Dnp-csoporttal van védve);

SEP-1:4+GP43 (GRFN-1776+GRFNP43; amely a 2. azonosítószámú szekvencia 117-166. aminosavainak felel meg):

CAIS PPDAAK^{ox}AAPL RTITADTRK LFRVYSNFLR GKLKLYTGEA CRTGDR-karboxilát [amelyben C-terminális cisztein (Cys¹⁶¹) pikolil (pico)-védőcsoportot hordoz, és a 126. pozícióban lévő lizin AoA-gyököt tartalmaz, amely oximkötéssel (K^{ox}) az elágazó GRFNP43-polimerhez van kapcsolva].

A további peptidek szintézisét, a ligálási reakciókat, karboximetilezési reakciókat, védőcsoport-eltávolítási reakciókat, a polipeptidek hajtogatását (folding) és tisztítását (mely lépések a teljes hosszúságú, 2. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazó, összehajtogatott SEP-1-B52-proteint eredményezik) az 1., 2., 3., 4. és 7. példában leírtak szerint hajtottuk végre. A SEP-1-B52-proteint analitikai reverz fázisú (C4) HPLC-vel, elektroporlasztásos ionizációs tömegspektrometriával (ES-MS) és nem redukáló SDS-PAGE-elektroforézissel karakterizáltuk. A biológiai tesztek az egyéb SEP-konstrukciókra leírtak szerint végeztük.

9. példa

A SEP-3-L42-protein hatékonyságának vizsgálata

A SEP-3-L42-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid) injektálható készítményt állítottunk elő, és a kísérlet 1., 3. és 6. napján 0, 1, 5 vagy 10 µg/kg dózisokban (tiw), intravénásan, normál hím patkányoknak (csoportonként öt patkány) adagoltuk. Az utolsó injektálás után négy nappal (9. nap) vérmintákat vettünk, melyeket hematológiai paraméterekre analizáltunk. A SEP-3-L42 megadott dózisokban végzett, utolsó injektálását követő 4. napon a vörösvértestszám (RBC), hemoglobinszám (HGB), hematokrit-érték (HCT) és retikulocitaszám (RET) a kontroll csoporthoz képest nem mutatott statisztikailag szignifikáns eltéréseket.

10. példa

A SEP-3-L42-protein farmakokinetikai vizsgálata

A SEP-3-L42-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid, pH = 6,9) injektálható készítményt állítottunk elő, és egyetlen 5 µg/kg-os dózisban intravénásan, normál hím patkányoknak adtuk be. Az injektálás utáni 0., 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120., 144. és 168. órában vérmintákat vettünk. A vérplazma SEP-3-L42-koncentrációját anti-EPO ELISA-reagenskészlet (R & D Systems, "Human Erythropoietin Quantikine IVD Immunoassay" reagenskészlet, #DEP00) alkalmazásával, a gyártó útmutatása szerint határoztuk meg. Az eredményeket a 27. ábrán mutatjuk be. Ahogy a 27. ábrán látható, a SEP-1-B50-protein "clearance"-e a SEP-3-L42-höz képest valamivel lassabb volt. Keringési felezési ideje ellenére a SEP-3-L42-protein a vörösvértest-termelés serkentésében a tesztelt dózisokban nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget. Ezzel szemben, a SEP-1-B50 ugyanazon dózisokban serkentette a vörösvértest-termelődést. Ez jól szemlélteti, hogy a polimerszerkezet felhasználható az *in vivo* biológiai tulajdonságok (köztük a farmakokinetikai viselkedés és teljesítmény) finomhangolására.

11. példa

A SEP-1-L30-protein hatékonyságának vizsgálata

A SEP-1-L30-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid) injektálható készítményt áll-

litottunk elő, és a kísérlet 1., 3. és 5. napján 0, 1, 5, 25 vagy 50 µg/kg dózisokban (tiw), intravénásan, normál hím patkányoknak (csoportonként öt patkány) adagoltuk. Az utolsó in-
jektálás után négy és nyolc nappal (9., illetve 13. nap) vérmintákat vettünk, melyeket hema-
tológiai paraméterekre analizáltunk. A SEP-1-L30-proteinnel végzett kezelés után a vörösvér-
5 testszám (RBC), hemoglobinszám (HGB) és hematokrit-érték (HCT) vonatkozásában - a kont-
roll csoportban kapott eredményekkel összehasonlítva - egyik vizsgált időpontban sem tapaszt-
altunk statisztikailag szignifikáns különbséget. A 25 és 50 µg/kg dózissal kezelt patkányokban
a retikulocitaszám az utolsó injektálás utáni 4. napon (9. nap) fokozott értéket mutatott (a
kontroll csoport értékével összehasonlítva statisztikailag szignifikáns különbséggel). A hema-
10 tológiai paraméterekben egyéb különbséget a SEP-1-L30-proteinnel kezelt állatok egyike ese-
tében sem tapasztaltunk, sem a 9., sem a 13. napon (ábrát nem közlünk).

12. példa

A SEP-1-L30-protein farmakokinetikai vizsgálata

15 A SEP-1-L30-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó
citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid, pH = 6,9) injektálható ké-
szítményt állítottunk elő, és egyetlen 5 vagy 25 µg/kg-os dózissal, intravénásan normál hím
patkányoknak adtuk be. Az injektálás utáni 0., 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120., 144. és
168. órában vérmintákat vettünk. A vérplazma SEP-1-B50-koncentrációját ELISA-reagens-
20 készlet (R & D Systems, "Human Erythropoietin Quantikine IVD Immunoassay" reagenskész-
let, #DEP00) alkalmazásával, a gyártó útmutatása szerint határoztuk meg. A SEP-1-L30-
protein az alkalmazott dózisok beadását követő egyik időpontban sem volt detektálható.

13. példa

A SEP-1-B50-protein hatékonyságának vizsgálata

25 A SEP-1-B50-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó,
steril, foszfátpufferelt sóoldatban (PBS) injektálható készítményt állítottunk elő, és a kísérlet
1., 3. és 6. napján 0, 1, 5, 25 vagy 125 µg/kg dózisokban (tiw), intravénásan, normál hím pat-
kányoknak (csoportonként öt patkány) adagoltuk. Az utolsó injektálás után 4, 9 és 14 nappal
30 (vagyis a kísérlet 10., 15. és 20. napján) vérmintákat vettünk, melyeket hematológiai paraméte-
rekre analizáltunk. Az eredményeket az alábbi, 8. táblázatban mutatjuk be. Az 5, 25 és 125 µg
SEP-1-B50-proteinnel kezelt állatokban az utolsó injektálás után négy nappal (10. nap) a vö-

rösvértests szám (RBC), a hemoglobinszám (HGB), a hematokrit-érték (HCT) és a retikulocita-
szám (RET) esetében dózisfüggő növekedést tapasztaltunk (a kontroll csoportban kapott
eredményekkel összehasonlítva statisztikailag szignifikáns különbség). Ezen állatokban az
RBC, HGB és HCT a 15. napon magasabb maradt, mint a kontroll értékek, és a 125 µg/kg dó-
zissal kezelt állatok esetében ezek az értékek a 20. napig jelentősen meghaladták a kontroll ér-
tékeket. A retikulocita-képződés a 10. nap után csökkent; a 25 és 125 µg/kg dózissal kezelt
állatokban a 15. és 20. napon lényegesen kisebb retikulocitaszámot tapasztaltunk.

8. táblázat

A SEP-1-B50-protein több dózisával végzett kezelések után meghatározott hematológiai
eredmények

RBC	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	7,01 ± 0,301	6,86 ± 0,391	6,96 ± 0,178
1 µg/kg	7,07 ± 0,482	6,85 ± 0,446	7,00 ± 0,315
5 µg/kg	7,16 ± 0,402	7,27 ± 0,229	6,92 ± 0,238
25 µg/kg	7,98 ± 0,484**	7,73 ± 0,448**	7,20 ± 0,331
125 µg/kg	8,71 ± 0, 512**	8,89 ± 0,598**	8,25 ± 0,641**
HGB	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	14,2 ± 0,49	14,0 ± 0,61	13,9 ± 0,36
1 µg/kg	14,4 ± 1,18	14,2 ± 0,44	14,1 ± 0,30
5 µg/kg	15,6 ± 0,43*	15,3 ± 0,33*	14, ± 0,30
25 µg/kg	16,1 ± 0,49**	15,1 ± 0,57	13,8 ± 0,22
125 µg/kg	16,9 ± 0,82**	16,4 ± 0,32**	15,0 ± 1,07*
HCT	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	41,1 ± 1,39	40,5 ± 0,93	40,9 ± 1,33
1 µg/kg	42,6 ± 1,82	40,6 ± 1,83	41,2 ± 1,13
5 µg/kg	44,7 ± 1,69*	44,1 ± 1,27	41,5 ± 0,90
25 µg/kg	46,6 ± 1,50**	43,6 ± 1,61	40,3 ± 1,50
125 µg/kg	49,8 2,13**	48,4 ± 3,95**	44,3 ± 3,39*

RET	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	$2,4 \pm 1,14$	$2,5 \pm 1,10$	$0,9 \pm 0,13$
1 $\mu\text{g/kg}$	$3,8 \pm 1,14$	$2,3 \pm 0,46$	$1,3 \pm 0,41$
5 $\mu\text{g/kg}$	$6,6 \pm 3,60^*$	$1,8 \pm 0,48$	$0,8 \pm 0,26$
25 $\mu\text{g/kg}$	$6,2 \pm 1,12^*$	$1,1 \pm 0,24^*$	$0,2 \pm 0,21^{**}$
125 $\mu\text{g/kg}$	$8,4 \pm 1,60^{**}$	$0,9 \pm 0,50^{**}$	$0,3 \pm 0,36^{**}$

* Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, $p < 0,05$

** Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, $p < 0,01$

5

14. példa

A SEP-1-B50-protein farmakokinetikai vizsgálata

A SEP-1-B50-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid, pH = 6,9) injektálható készítményt állítottunk elő, és egyetlen 5 vagy 25 $\mu\text{g/kg}$ -os dózissal, intravénásan normál hím patkányoknak adtuk be. Az injektálás utáni 0., 1., 2., 4., 6., 12., 24., 48., 72., 96., 120., 144. és 168. órában vérmintákat vettünk. A vérplazma SEP-1-L30-koncentrációját ELISA-reagenskészlet (R & D Systems, "Human Erythropoietin Quantikine IVD Immunoassay" reagenskészlet, #DEP00) alkalmazásával, a gyártó útmutatása szerint határoztuk meg. A SEP-1-B50-protein eliminációs felezési ideje az 5 $\mu\text{g/kg}$ -os dózis esetében 9,7 óra, míg a 25 $\mu\text{g/kg}$ -os dózis esetében 9,9 óra volt. Az átlagos tartózkodási idő 5 $\mu\text{g/kg}$ -os dózis esetében 13,9 óra, a 25 $\mu\text{g/kg}$ -os dózis esetében pedig 14,4 óra volt. A SEP-1-B50-protein reprezentatív farmakokinetikai profilját a 27. ábrán mutatjuk be.

20

15. példa

A SEP-1-B51-protein hatékonyságának vizsgálata

A SEP-1-B51-proteint két kísérletben, intravénásan normál hím patkányoknak adagoltuk.

1. kísérlet

25

A SEP-1-B51-proteinből 0,25 % patkányeredetű szérumalbumint (RSA) tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid) injektálható készítményt állítottunk elő, és a kísérlet 1., 3. és 6. napján 0, 1, 5 vagy 25 $\mu\text{g/kg}$ dózisokban (tiw),

intravénásan normál hím patkányoknak (csoportonként öt patkány) adagoltuk. Az utolsó in-
jektálás után 4, 9 és 14 nappal (10., 15., illetve 20. nap) vérmintákat vettünk, melyeket hema-
tológiai paraméterekre analizáltunk. Az eredményeket az alábbi, 9. táblázatban mutatjuk be. A
SEP-1-B51-proteinnel végzett harmadik (és egyben utolsó) injektálás után négy nappal (a kí-
sérlet 10. napja) a 25 µg/kg SEP-1-B51-dózissal kezelt állatokban a vörösvértestszám (RBC),
hemoglobinszám (HGB), hematokrit-érték (HCT) és abszolút retikulocitaszám (ART) vonat-
kozásában - a kontroll csoportban kapott eredményekkel összehasonlítva - statisztikailag szig-
nifikáns növekedést tapasztaltunk. Ezekben az állatokban az RBC-érték a 15. napon nagyobb
maradt, mint a kontroll érték, és a 20. napon a kontrollhoz hasonló lett. A retikulocitaképződés
tíz nap után csökkent - a 15. napon az 5 és 25 µg/kg dózissal kezelt állatokban lényegesen ki-
sebb retikulocitaszámot mértünk.

9. táblázat

A SEP-1-B51-protein több dóziséval végzett kezelések után meghatározott hematológiai
eredmények

RBC	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	5,66 ± 0,497	5,62 ± 0,385	5,90 ± 0,286
1 µg/kg	5,32 ± 0,275	5,23 ± 0,470	5,77 ± 0,200
5 µg/kg	6,22 ± 0,377	6,18 ± 0,298	6,39 ± 0,369
25 µg/kg	6,70 ± 0,257**	6,25 ± 0,348*	5,94 ± 0,294
HGB	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	14,3 ± 1,10	14,2 ± 0,88	14,8 ± 0,72
1 µg/kg	13,3 ± 0,41	13,2 ± 0,93	14,3 ± 0,37
5 µg/kg	15,1 ± 0,53	14,8 ± 0,30	15,4 ± 0,25
25 µg/kg	16,5 ± 0,52**	15,0 ± 0,91	14,3 ± 0,64
HCT	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	36,8 ± 3,08	36,2 ± 2,59	37,9 ± 1,93
1 µg/kg	34,5 ± 1,21	33,4 ± 2,56	37,1 ± 0,82
5 µg/kg	39,9 ± 1,51	38,6 ± 0,91	40,2 ± 1,36
25 µg/kg	43,8 ± 1,83**	39,3 ± 2,77	37,2 ± 1,60

ART	10. nap	15. nap	20. nap
Kontroll	0,29 ± 0,089	0,28 ± 0,086	0,21 ± 0,034
1 µg/kg	0,34 ± 0,50	0,23 ± 0,055	0,19 ± 0,075
5 µg/kg	0,28 ± 0,059	0,11 ± 0,021**	0,20 ± 0,081
25 µg/kg	0,48 ± 0,121*	0,06 ± 0,054**	1,45 ± 3,100

** Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, $p < 0,01$

* Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, $p < 0,05$

2. kísérlet

- 5 A SEP-1-B51-proteinből 0,25 % humán szérumalbumint tartalmazó citrátpufferben (20 mM nátrium-citrát + 100 mM nátrium-klorid) injektálható készítményt állítottunk elő, és a kísérlet 1., 3. és 5. napján 0, 1, 5 vagy 25 µg/kg dózisokban (tiw), intravénásan normál hím patkányoknak (csoportonként öt patkány) adagoltuk. Az utolsó injektálás után 2, 4 és 6 nappal (azaz a kísérlet 7., 9., illetve 11. napján) az állatoktól vérmintákat vettünk, melyeket hematológiai paraméterekre analizáltunk. Ezenfelül, a kísérlet többi napján (vagyis a 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. és 13. napon) is vettünk vérmintákat, melyeket csak a hematokrit (tömörített sejtterfogatként) meghatározására használtunk. Az eredményeket az alábbi, 10. táblázatban mutatjuk be. A 5 és 25 µg/kg dózissal kezelt állatokban az első injekció (3. nap) utáni 2. naptól kezdődően a hematokrit (tömörített sejtterfogat vagy számított) értékek jelentős mértékben növekedtek, és ez a tendencia a harmadik (és egyben utolsó) injekció (11. nap) utáni 6. napig megmaradt. Az 5 és 25 µg/kg dózissal kezelt állatokban az RBC és HGB értékek a mérési napokon (az utolsó dózis beadása utáni 2., 4. és 6. napon, vagyis a kísérlet 7., 9. és 11. napján) szintén jelentős mértékű növekedést mutattak. Az ART-érték csak a 25 µg/kg dózissal kezelt csoport esetében, az utolsó injektálás utáni 2. és 4. napon (a kísérlet 7. és 9. napján) mutatott szignifikáns növekedést.

10. táblázat

A SEP-1-B51-protein több dózisával végzett kezelések után meghatározott hematológiai eredmények[∇]

RBC	7. nap	9. nap	11. nap
Kontroll	5,61 ± 0,679	5,23 ± 0,467	5,34 ± 0,405
1 µg/kg	6,08 ± 0,141	5,70 ± 0,300	5,67 ± 0,547
5 µg/kg	6,29 ± 0,459	6,07 ± 0,308**	6,11 ± 0,248*
25 µg/kg	6,61 ± 0,295**	6,24 ± 0,268**	6,38 ± 0,173**
HGB	7. nap	9. nap	11. nap
Kontroll	13,7 ± 1,07	12,9 ± 0,79	13,3 ± 0,93
1 µg/kg	14,6 ± 0,27	13,9 ± 0,19	13,9 ± 0,90
5 µg/kg	15,8 ± 0,50**	14,9 ± 0,53**	14,8 ± 0,18*
25 µg/kg	16,7 ± 0,86**	15,1 ± 0,66**	14,6 ± 0,69*
HCT	7. nap	9. nap	11. nap
Kontroll	35,6 ± 3,61	33,2 ± 2,39	34,5 ± 3,19
1 µg/kg	38,9 ± 0,82	35,9 ± 0,94	35,9 ± 2,43
5 µg/kg	41,3 ± 1,92**	39,1 ± 1,01**	39,2 ± 0,78*
25 µg/kg	44,4 ± 2,08**	39,7 ± 2,23**	39,6 ± 2,32**
ART	7. nap	9. nap	11. nap
Kontroll	0,50 ± 0,158	0,36 ± 0,093	0,34 ± 0,079
1 µg/kg	0,30 ± 0,044*	0,30 ± 0,026	0,25 ± 0,054
5 µg/kg	0,45 ± 0,125	0,36 ± 0,056	0,25 ± 0,045
25 µg/kg	0,78 ± 0,117**	0,71 ± 0,152**	0,32 ± 0,099

* Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, p<0,05

5 ** Kontrollhoz viszonyítva szignifikáns eltérés, p<0,01

∇ 7. nap: (a 3. dózis beadása után két nappal); 9. nap (a 3. dózis beadása után négy nappal); 11. nap (a 3. dózis beadása után hat nappal).

Patkányok további csoportjait a SEP-1-B51-protein egyetlen, 25 µg/kg-os intravénás dózisával kezeltük, és az injektlás után 48 órával hematológiai paraméterek analíziséhez vér-

mintákat vettünk. A csak hematokrit (tömörített sejttérfogatként) meghatározására szánt vérmintákat az injektálást követően 8, 24 és 72 órával, illetve hét nappal vettük (1., 2., 4. és 8. nap). A SEP-1-B51-proteinnel intravénásan kezelt patkányok HCT, HGB és ART értékei a 3. napon (azaz az injektálás után két nappal) nagyobbak voltak a kontroll állatok hasonló értékei-
 5 nél (statisztikailag szignifikáns különbség), és ezekben az állatokban a hematokrit-érték a 4. napon ugyancsak szignifikáns növekedést mutatott.

16. példa

A SEP-1-B51-protein hatékonyságának vizsgálata polycythaemiás és hipoxiás modell alkalmazásával

Egyenként tíz normál egerből álló csoportokat - hordozó kontroll; CHO-sejtekben termeltetett, rekombináns glikozilált humán erythropoietin (rhEPO), négy dózismagyságban; és SEP-1-B51-protein, szintén négy dózismagysággal: 0,32, 1, 5 és 25 $\mu\text{g/kg/dózis}$ (100 mE/ng feltételezésével) - 20 napon keresztül, naponta 18 órán át, 506,8 mBar nyomáson, nagy tenger-
 15 szint feletti magasságot szimuláló kamrában tartottunk. A hipoxia utáni 4. napon az egereknek intravénásan rhEPO-t vagy a SEP-1-B51-et - 0,25 % humán szérumalbumint tartalmazó citrát-pufferben készítménybe foglalva - injektáltunk (200 μl térfogatban). Két nappal később mindegyik egeret intraperitoneálisan (i.p.) 0,2 μCi ^{59}Fe -vel oltottuk be. A radioaktív vas vörösvértestek általi felvételét három nappal később, szívpunkcióval vett 500 μl vérben mért radioakti-
 20 vitás alapján értékeltük.

A SEP-1-B51 és rhEPO esetében a 72 órás RBC- ^{59}Fe -felvétel (dózis %-a) egyértelműen azt mutatja, hogy a ^{59}Fe -felvétel 5 $\mu\text{g/kg}$ dózissal dózisfüggő módon fokozódik [nagyobb dózissal (25 $\mu\text{g/kg}$) a vasfelvétel nem fokozódott tovább]. A SEP-1-B51 és rhEPO lineáris regressziós analízisének eredményét a 28. ábrán mutatjuk be. A SEP-1-B51 és rhEPO reakci-
 25 ója lényegében azonos volt. A SEP-1-B51 "hatékonysági aránya" az rhEPO-hoz viszonyítva 1,0035 (95 %-os konfidencia-intervallum: 0,6947-1,4498), és a SEP-1-B51 e vizsgálattal meghatározott hatékonysága 100 mE/ng (95 %-os konfidencia-intervallum: 69-145).

A SEP-1-B51-protein *in vivo* aktivitása hasonló az rhEPO aktivitásához, és hatását dózisfüggő módon feje ki (ideértve a nagyobb dózisoknál megfigyelhető reakció-platót, ami az
 30 rhEPO-ra e modellben jellemző negatív visszacsatolási (feedback) mechanizmus indukciójának köszönhető. A kapott eredmények jól szemléltetik, hogy a SEP-1-B51-molekula pontos, felhasználó által meghatározott glikozilációs helyeihez kapcsolt polimer-struktúrák képesek az

rhEPO cukorláncai által segített *in vivo* aktivitás utánpótlására.

17. példa

A SEP-1-B51-protein farmakokinetikai vizsgálatai

5 Normál hím patkányok csoportjait 0,25 % humán szérumalbumint tartalmazó citrátpufferben injektálható készítménybe foglalt SEP-1-B51-protein egyetlen 5 µg/kg-os dóziséval vagy rhEPO 500 E/kg-mal egyenértékű dózisával intravénásan kezeltük, és az állatoktól az injektálás után 5, 30, 60 perccel, 2, 4, 8 és 24 órával, illetve 2, 3, 4, 5, 6 és 7 nappal vért vettünk. A vérplazma-mintákban a SEP-1-B51 és rhEPO koncentrációját ELISA-reagenskészlet (R & D Systems, "Human Erythropoietin Quantikine IVD Immunoassay" reagenskészlet, #DEP00) alkalmazásával, a gyártó útmutatása szerint határoztuk meg.

A koncentrációk logaritmusát a legkisebb négyzetek módszerrel analizáltuk, és a kapott farmakokinetikai paramétereket a 11. táblázatban mutatjuk be. Az egyetlen 5 µg/kg-os intravénás SEP-1-B51-dózissal kezelt hím patkányokban a SEP-1-B51 vérplazmai koncentrációjának időbeli változása mono-exponenciális farmakokinetikai diszpozíciós függvénnyel írható le (felezési idő: $10,5 \pm 0,5$ óra). A SEP-1-B51-re a központi kompartment (V_c) megoszlási térfogata $32,5 \pm 2,0$ ml/kg volt. A "clearance" (CL) 2,15 ml/óra/kg-nak, az átlagos tartózkodási idő (MRT) $15,1 \pm 0,7$ órának adódott. Összehasonlításként, az egyetlen 5 µg/kg-os intravénás dózissal kezelt hím patkányokban az rhEPO vérplazmai koncentrációjának időbeli változása bi-exponenciális farmakokinetikai diszpozíciós függvénnyel írható le (α felezési idő: $1,24 \pm 0,22$ óra, β felezési idő: $5,51 \pm 0,40$ óra). Az rhEPO V_c -értéke $57,0 \pm 3,2$ ml/kg, CL-értéke $16,0 \pm 0,5$ mL/óra/kg (amely kb. nyolcszorosa a SEP-1-B51 CL-értékének). Az rhEPO átlagos tartózkodási ideje (MRT) $5,73 \pm 0,17$ óra, amely kb. háromszor kisebb, mint a SEP-1-B51-proteiné.

11. táblázat

A SEP-1-B51 és az rhEPO farmakokinetikai paramétereinek összehasonlítása

Görbe	AUC (ng/ml-óra)	C _{max} (ng/ml)	V _c (ml/kg)	CL (ml/óra/kg)
SEP-1-B51	2326 ± 121	154 ± 9	32,5 ± 2,0	2,15 ± 0,11
rhEPO	312 ± 9	87,9 ± 5,0	57,0 ± 3,2	16,0 ± 0,5
Görbe	MRT (óra)	α felezési idő (óra)	β felezési idő (óra)	
SEP-1-B51	15,1 ± 0,7	1,5 ± 0,5	n.a.	
rhEPO	5,73 ± 0,17	1,24 ± 0,22	5,51 ± 0,40	

A SEP-1-B51 és rhEPO vérplazma-"clearance"-ének grafikus megjelenítését a 29. ábrán mutatjuk be. Ahogy az ábrán látható, a SEP-1-B51 vérkeringési felezési ideje sokkal nagyobb, mint a glikozilált rekombináns humán EPO felezési ideje. Ez a különbség a molekula pontos, felhasználó által meghatározott pozícióihoz kapcsolt polimer-struktúráknak köszönhető.

Bár a találmány szerinti megoldást a találmány előnyös megvalósítási módjain keresztül szemléltettük, szakember számára kézenfekvő, hogy különböző változtatások hajthatók végre, anélkül, hogy eltérnénk a találmányi gondolatától. Az ilyen megoldások az igényelt oldalmi körön belül maradnak. Valamennyi ilyen - szakember számára nyilvánvaló - változtatást a találmány tárgyához tartozónak tekintünk.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely egy vagy több hozzákapcsolt, vízben oldható polimert tartalmaz.

5 2. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek *in vivo* biológiai aktivitása a vörösvértestek termelődésének fokozása.

3. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely egy riboszomálisan meghatározott erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot és egy vagy több nem átfedő peptidszegmenst tartalmaz, melyek egy vagy több kémiai
10 ligálási helyen vannak kapcsolva.

4. A 3. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelyben az egy vagy több, vízben oldható polimer a riboszomálisan meghatározott erythropoietin glikozilációs helyének megfelelő helyen van a polipeptid-lánchoz kapcsolva.

5. A 3. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely riboszomálisan meghatározott humán erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot tartalmaz.
15

6. A 3. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely riboszomálisan meghatározott, nem természetes erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot tartalmaz.

20 7. A 6. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely - egy vagy több nem természetes glikozilációs helyet tartalmazó - riboszomálisan meghatározott, nem természetes erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot tartalmaz.

8. A 2. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelyben a vízben oldható polimer kizárólag egy vagy több - a riboszomálisan meghatározott erythropoietin glikozilációs helyének megfelelő - pozícióban van a polipeptid-lánchoz kapcsolva.
25

9. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek egy vagy több, vízben oldható polimere ismétlődő egységet tartalmaz, amely polialkilén-oxidot, poliamid-alkilén-oxidot vagy ezek származékait tartalmazza.

10. A 9. igénypont szerinti, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelyben a
30 polialkilén-oxid és poliamid-alkilén-oxid $-(CH_2-CH_2-O)-$ képletű etilénoxid ismétlődő egységet tartalmaz.

11. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek vízben oldható polimere(i) közül egy vagy több elágazó polimer.

12. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek vízben oldható polimere(i) közül egy vagy több fiziológiai feltételek mellett negatív nettó töltéssel bír.

5 13. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek izoelektromos pontja 3 és 7 közötti.

14. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely vízben oldható polimerként monodiszperz polimert tartalmaz.

15. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely monodiszperz protein.

10 16. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb.

17. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek monomer-molekulatömege 40 kD-nál nagyobb.

15 18. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek monomer-molekulatömege 50 kD-nál nagyobb.

19. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek monomer-molekulatömege 60 kD-nál nagyobb.

20. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek monomer-molekulatömege 70 kD-nál nagyobb.

20 21. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek polipeptid-lánca egy vagy több szabálytalan aminosavat tartalmaz.

22. A 21. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely szabálytalan aminosavként nem természetes oldalláncot hordozó aminosavat tartalmaz.

25 23. A 21. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely szabálytalan aminosavként pszeudo-aminosavat tartalmaz.

24. A 23. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely pszeudo-aminosavként pszeudo-glutaminsavat tartalmaz.

25. A 22. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek nem természetes oldallánca vízben oldható polimerhez van kapcsolva.

30 26. A 25. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelyben a vízben oldható polimer kémiai ligálással létrehozott kovalens kötéssel van az oldallánchoz kapcsolva.

27. A 26. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely a kémiai ligálással létrehozott kovalens kötésként amidkötést, oximkötést, hidrazonkötést, taizolidinkötést, oxazolidinkötést vagy tioészterkötést tartalmaz.

28. A 3. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelynek kémiai ligálási helye(i) közül egy vagy több amidkötést tartalmaz.

29. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amelyben a vízben oldható polimer a polipeptid-lánc kémiai ligálási helyén lévő aminosav oldallancán keresztül kapcsolódik a polipeptid-lánchoz.

30. Az 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely a szintetikus SEP-1 vagy SEP-3 erythropoiesis-stimuláló protein aminosav-szekvenciáját tartalmazza.

31. Szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely a SEP-0-, SEP-1- vagy SEP-3-protein vagy ezek analógja.

32. A 31. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein, amely a következő analógok egyike: SEP-1-L26, SEP-1-L30, SEP-1-B50, SEP-1-B51 és SEP-1-B52.

33. Gyógyászati készítmény, amely 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint vagy gyógyászati szempontból elfogadható sóját tartalmazza.

34. A 33. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely egy vagy több segédanyagot is tartalmaz, a következők közül: puffer, hordozóprotein, aminosav, detergens, lipid, vízben oldható polimer és tartósítószer.

35. A 33. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amely egy vagy több további, a szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteintól eltérő bioaktív hatóanyagot is tartalmaz.

36. Eljárás emlős hematokrit-értékének növelésére, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein hatásos mennyiségét adagoljuk, miáltal az emlős hematokrit-értéke fokozódik.

37. Eljárás vörösvértest-termelődés fokozására emlősben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek 1. igénypont szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein hatásos mennyiségét adagoljuk, miáltal az emlősben a vörösvértestek termelődése fokozódik.

38. Eljárás hemoglobin-termelődés fokozására emlősben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek 1. igénypont szerinti, polimerrel módosított, szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein hatásos mennyiségét adagoljuk, miáltal az emlősben a hemoglobin-termelődés fokozódik.

39. Eljárás retikulocitaszám növelésére emlősben, *azzal jellemezve*, hogy az emlősnek 1. igénypont szerinti szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein hatásos mennyiségét adagoljuk, miáltal az emlősben a hemoglobin-termelődés fokozódik.

40. Eljárás szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint alkotó polipeptid-lánc előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncának nem átfedő aminosav-szekvenciáit tartalmazó peptidszegmenseket kémiai ligálással egymáshoz kapcsoljuk, miáltal a szintetikus erythropoiesis-stimuláló protein polipeptid-láncát állítjuk elő.

41. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy további lépésként előidéz-
zük a polipeptid-lánc "folding"-ját, miáltal biológiailag aktív, szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint hozunk létre.

42. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a peptidszegmensek közül egyet vagy többet részlegesen védett állapotban alkalmazunk.

43. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a peptidszegmensek közül egyet vagy többet védőcsoport nélkül alkalmazunk.

44. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan peptidszegmenseket alkalmazunk, amelyek közül egyhez vagy többhöz vízben oldható polimer van kapcsolva.

45. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a kémiai ligálás során kemoselektív ligálási kémiát alkalmazunk, a következők bármelyikét: natív kémiai ligálás, bővített natív kémiai ligálás, pszeudo-natív kémiai ligálás, oximképző kémiai ligálás, hidrazonképző kémiai ligálás, oxazolidinképző kémiai ligálás, taizolidinképző kémiai ligálás vagy tioészterképző kémiai ligálás.

46. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amelyhez egy vagy több vízben oldható polimer van kapcsolva.

47. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely riboszomálisan meghatározott erythropoietin aminosav-szekvenciáját tartalmazza.

48. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vízben oldható polimerek közül egyet vagy többet a riboszomálisan meghatározott erythropoietin glikozilációs helyének megfelelő pozícióban kapcsolunk a polipeptid-lánchoz.

49. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a riboszomálisan meghatározott erythropoietin-glikoprotein rekombináns módszerekkel lett előállítva.

50. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a riboszomálisan meghatározott erythropoietin-glikoprotein nem természetes glikoprotein.

51. Az 50. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a riboszomálisan meghatározott, nem természetes erythropoietin-glikoprotein egy vagy több nem természetes glikozilációs helyet tartalmaz.

52. A 47. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a riboszomálisan meghatározott erythropoietin humán erythropoietin.

53. A 48. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vízben oldható polimert kizárólag a riboszomálisan meghatározott erythropoietin glikozilációs helyének megfelelő helyen kapcsoljuk a polipeptid-lánchoz.

54. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a vízben oldható polimerek közül egy vagy több polialkilén-oxidot, poliamid-alkilén-oxidot vagy ezek származékait tartalmazó ismétlődő egységet tartalmaz.

55. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a polialkilén-oxid és poliamid-alkilén-oxid $-(CH_2-CH_2-O)-$ képletű etilénoxid ismétlődő egységet tartalmaz.

56. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amelynek hozzákapcsolt, vízben oldható polimere(i) közül egy vagy több elágazó polimer.

57. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amelynek hozzákapcsolt, vízben oldható polimere(i) közül egy vagy több fiziológiai feltételek mellett negatív nettó töltéssel bíró polimer.

58. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek izoelektromos pontja 3 és 7 közötti.

59. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amelyben a hozzákapcsolt, vízben oldható polimer monodiszperz.

60. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy szintetikus, monodiszperz erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő.

61. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek monomer-molekulatömege 25 kD-nál nagyobb.

62. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek monomer-molekulatömege 40 kD-nál nagyobb.

63. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek monomer-molekulatömege 50 kD-nál nagyobb.

64. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek monomer-molekulatömege 60 kD-nál nagyobb.

65. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek monomer-molekulatömege 70 kD-nál nagyobb.

66. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely egy vagy több szabálytalan aminosavat tartalmaz.

67. A 66. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely szabálytalan aminosavként nem természetes oldalláncot hordozó aminosavat tartalmaz.

68. A 67. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely szabálytalan aminosavként pszeudo-aminosavat tartalmaz.

69. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely amidkötést, oximkötést, hidrazonkötést, taizolidinkötést, oxazolidinkötést vagy tioészterkötést tartalmazó kémiai ligálási helyet tartalmaz.

70. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely a vízben oldható polimert nem természetes oldalláncot tartalmazó aminosávhoz kapcsolva tartalmazza.

71. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely a vízben oldható polimert kémiai ligálással kialakított kovalens kötéssel keresztül kapcsolva tartalmazza.

72. A 71. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely a vízben oldható polimert amidkötéssel, oximkötéssel, hidrazonkötéssel, taizolidinkötéssel, oxazolidinkötéssel vagy tioészterkötéssel kapcsolva tartalmazza.

73. A 46. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan polipeptid-láncot állítunk elő, amely a vízben oldható polimert a polipeptid-lánc kémiai ligálási helyén lévő aminosav oldalláncán keresztül kapcsolva tartalmazza.

74. A 41. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan szintetikus erythropoiesis-stimuláló proteint állítunk elő, amelynek *in vivo* biológiai aktivitása a vörösvértestek

termelődésének fokozása.

75. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus SEP-1 vagy SEP-3 erythropoiesis-stimuláló protein aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot állítunk elő.

5 76. A 40. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a szintetikus SEP-0, SEP-1 vagy SEP-3 erythropoiesis-stimuláló protein (vagy ezek analógjai) aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot állítunk elő.

10 77. A 76. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a SEP-1-L26, SEP-1-L30, SEP-1-B50, SEP-1-B51 vagy SEP-1-B52 erythropoiesis-stimuláló protein-analóg aminosav-szekvenciáját tartalmazó polipeptid-láncot állítunk elő.

A meghatalmazott:

DANUBIA

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

15

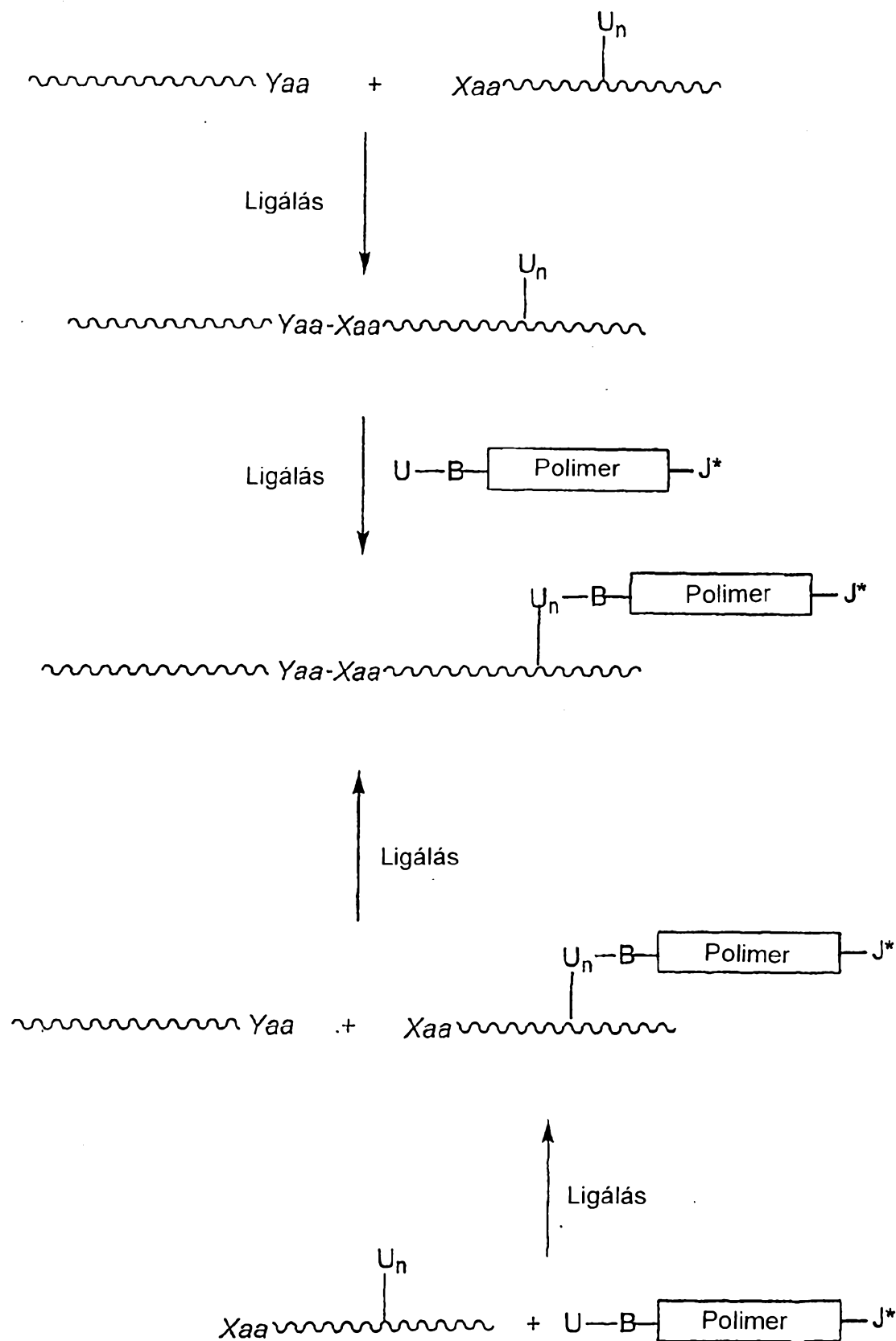

dr. Pethő Árpád

szabadalmi ügyvivő

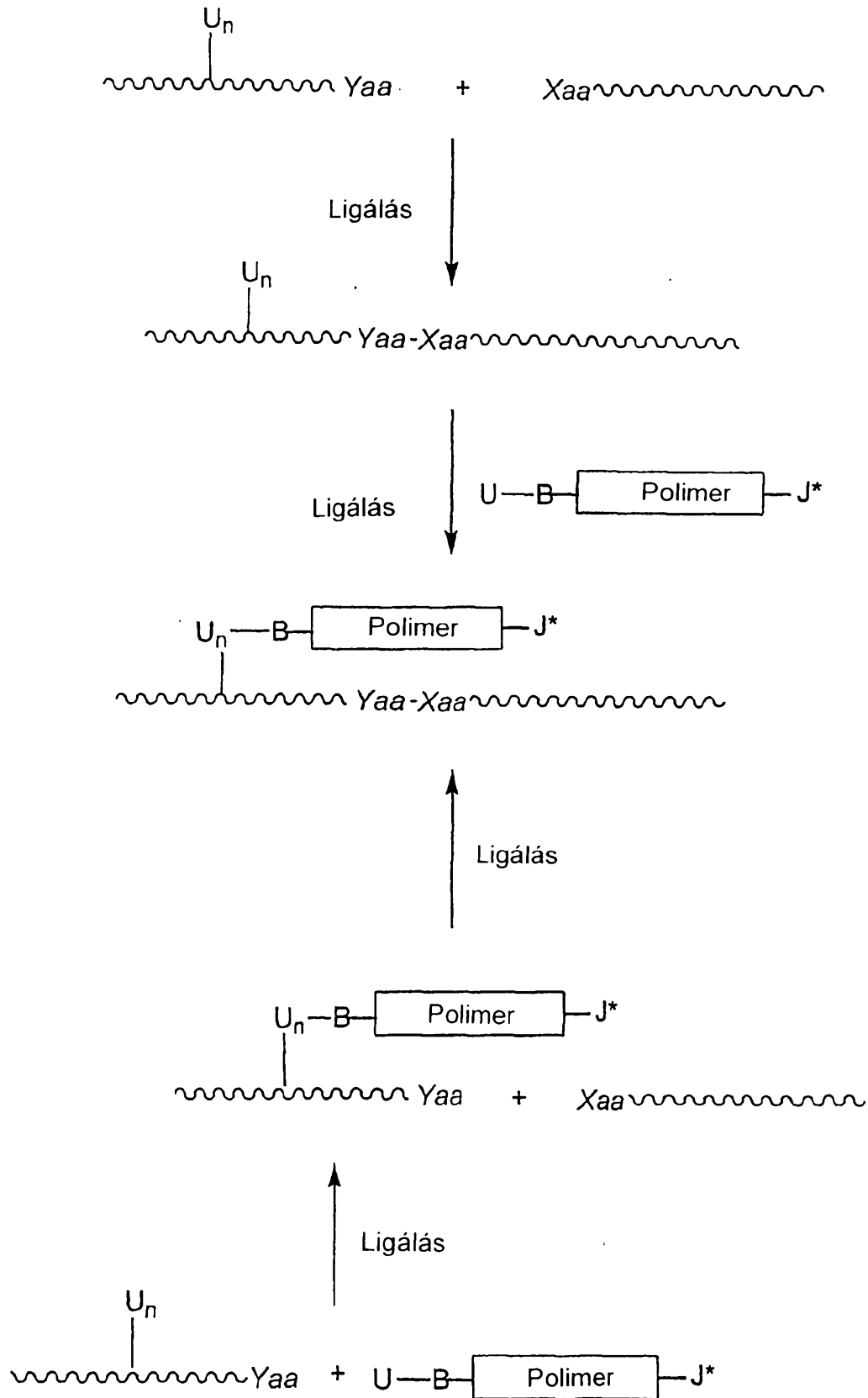
12 9 x 9 T = 179 oldal



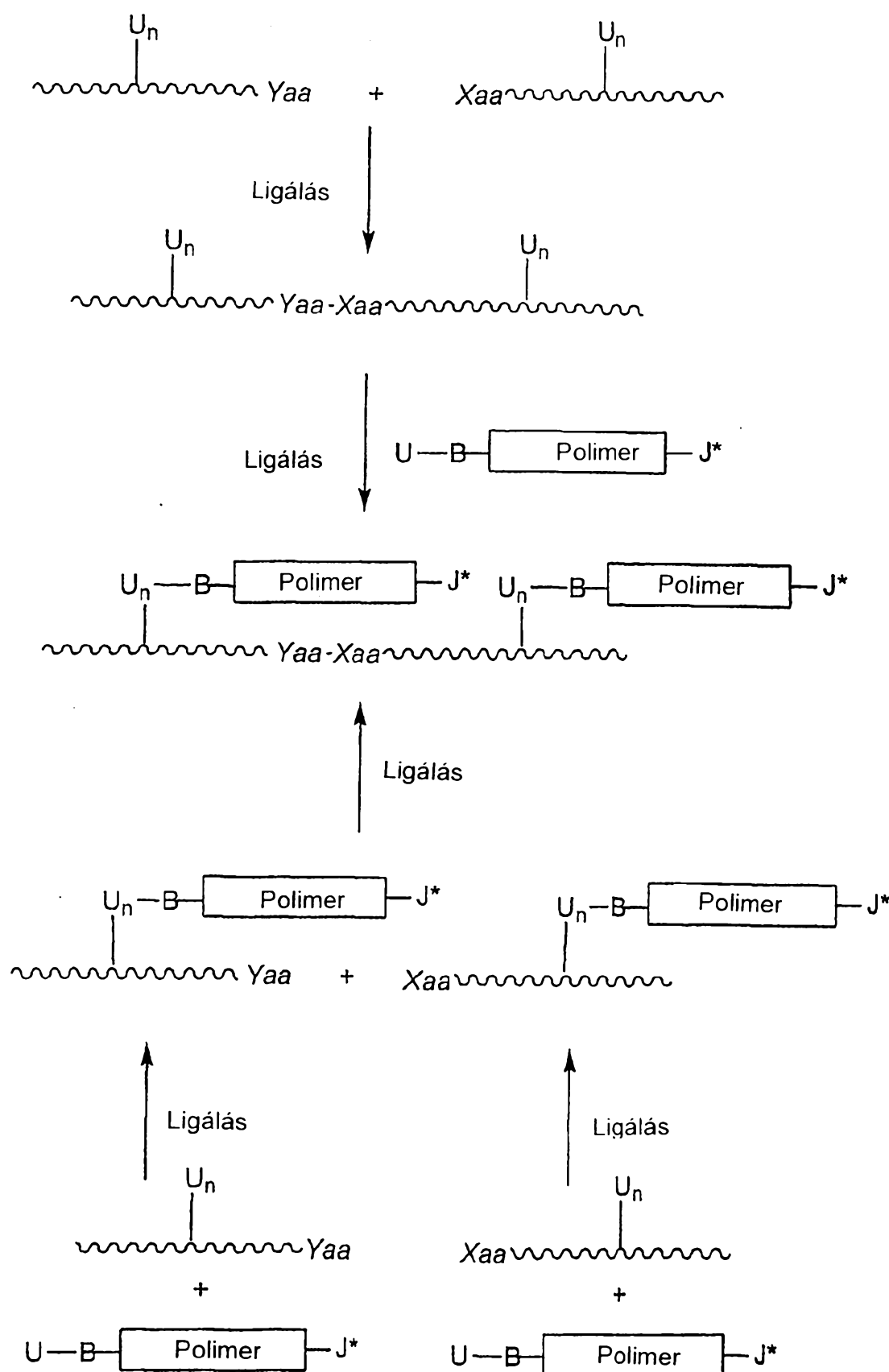
2005.12.10.



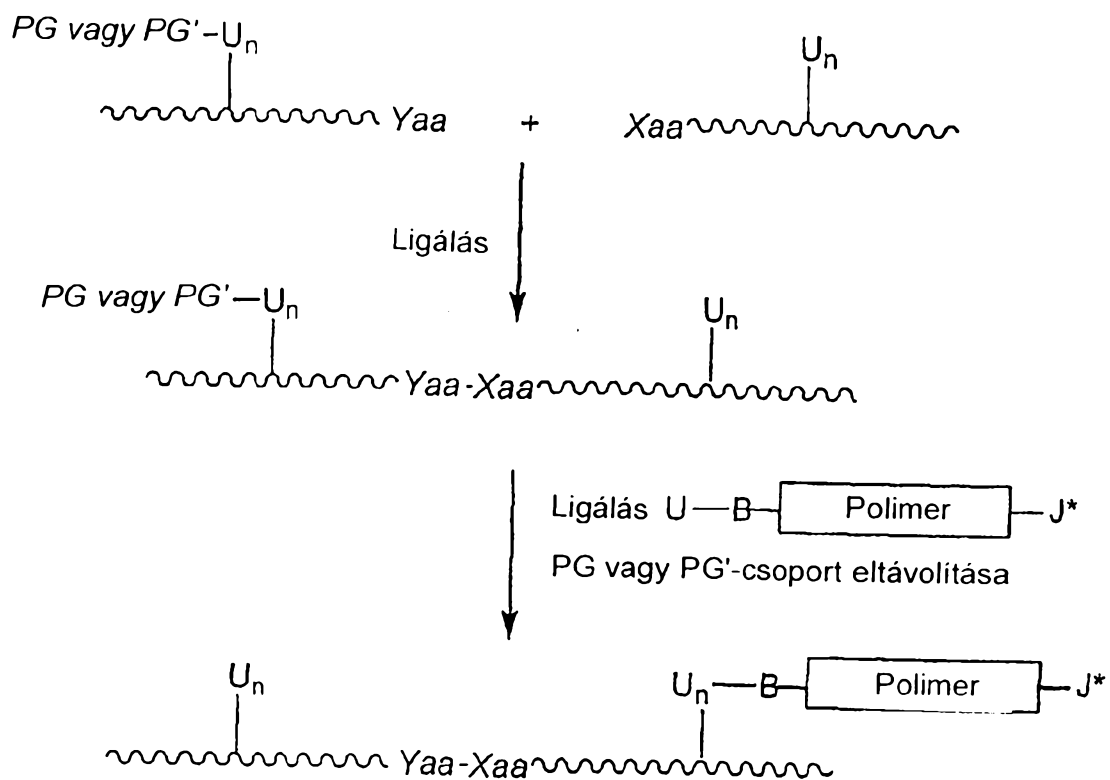
1A ábra



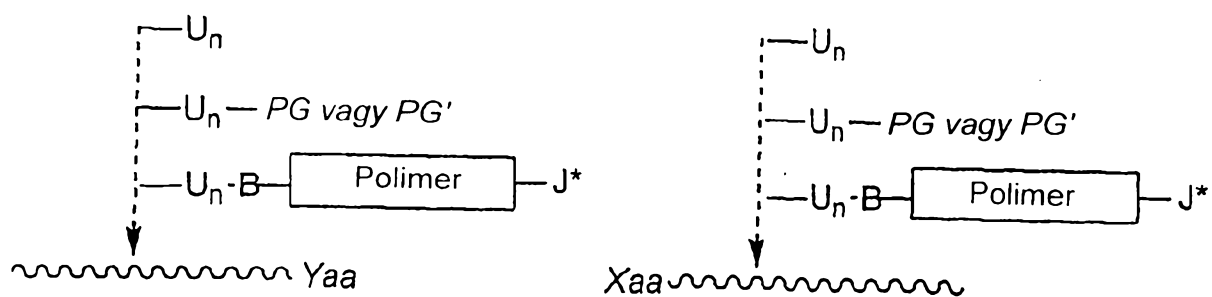
1B ábra



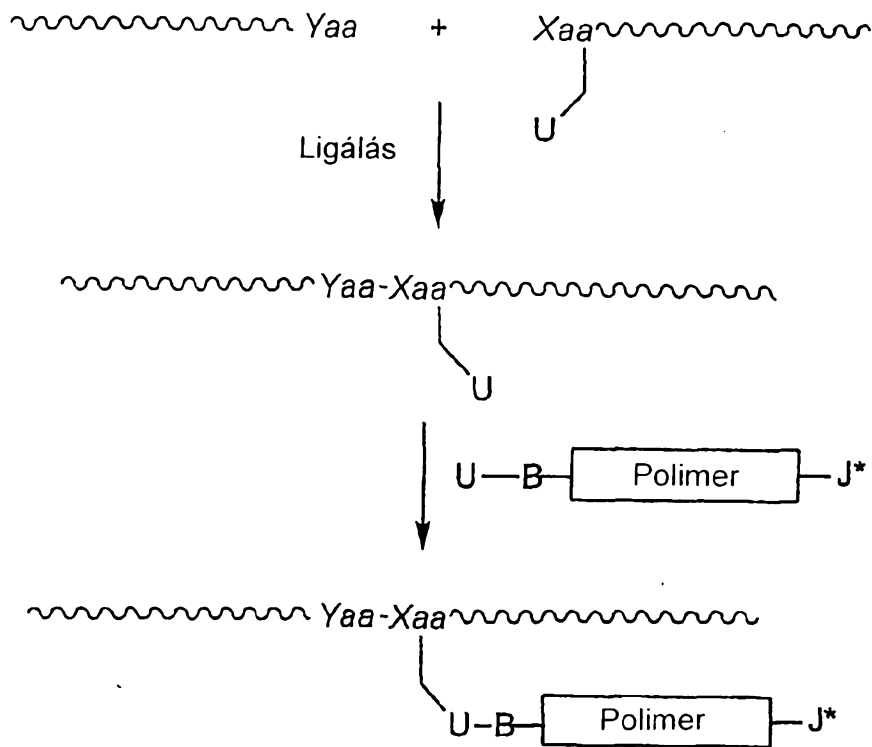
1C ábra



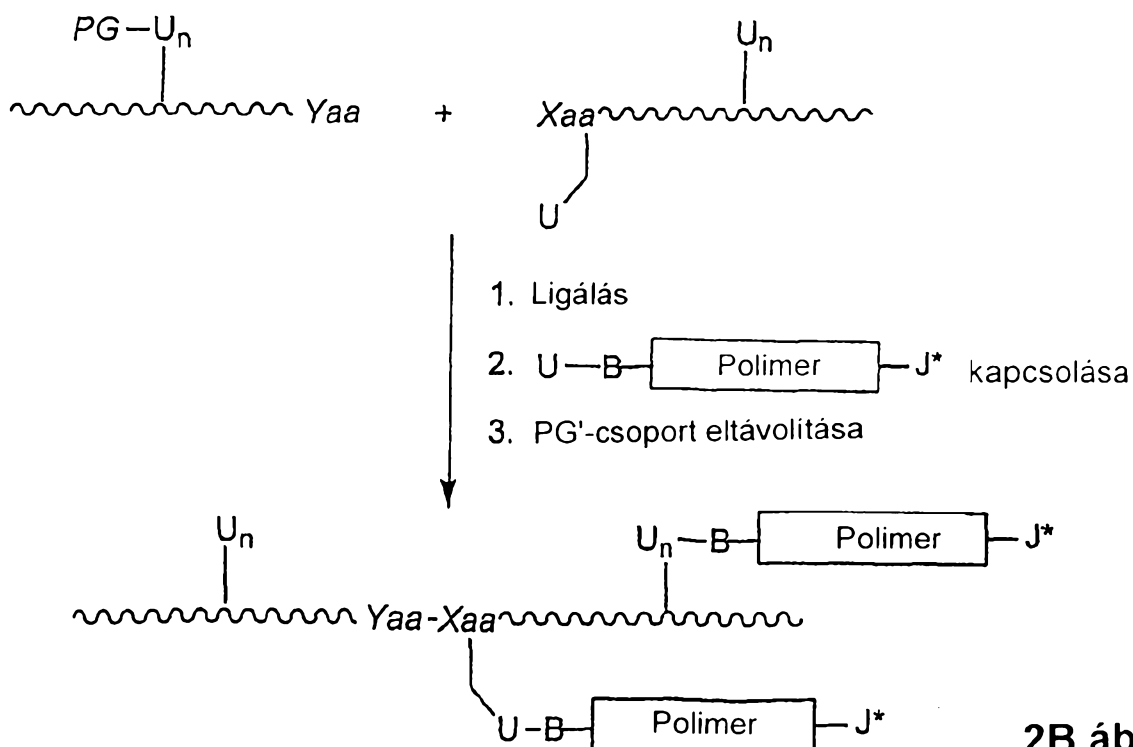
1D ábra



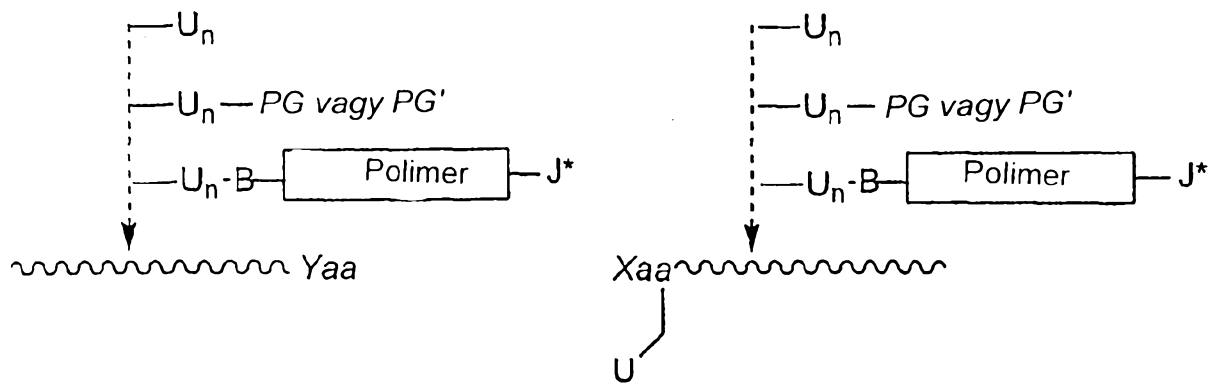
1E ábra



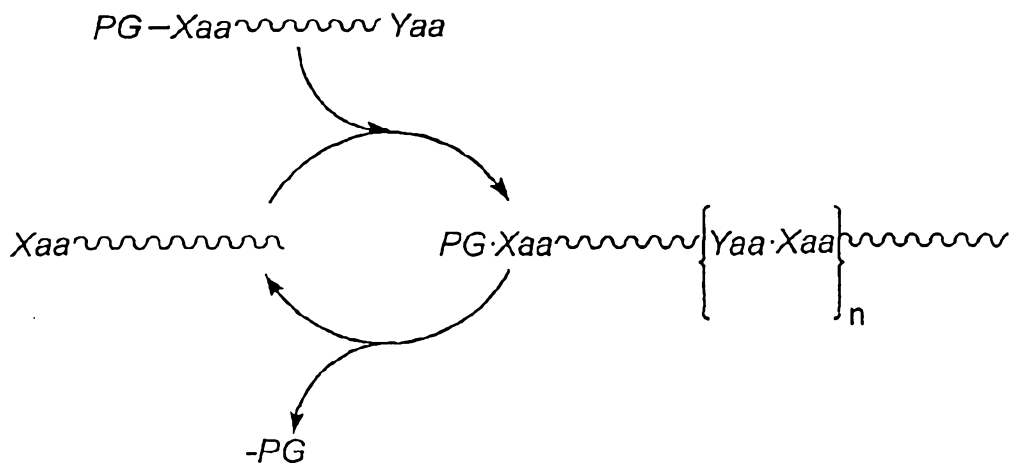
2A ábra



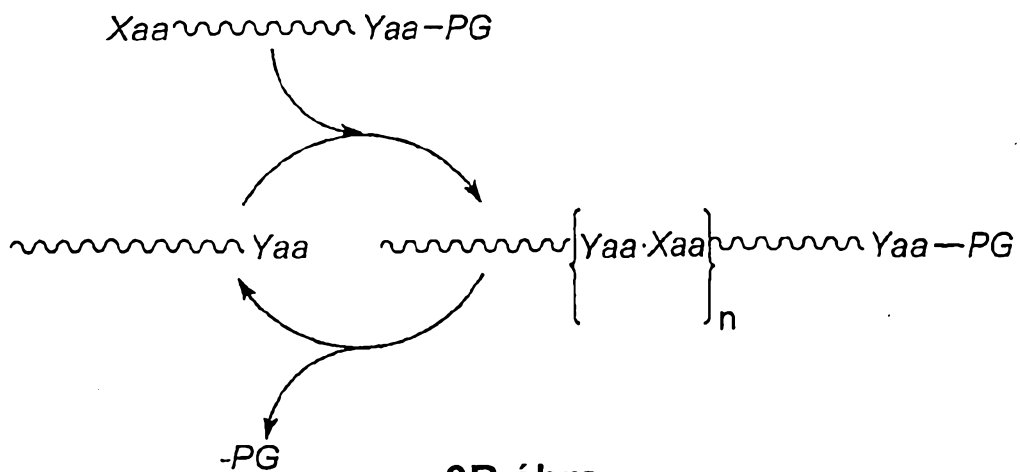
2B ábra



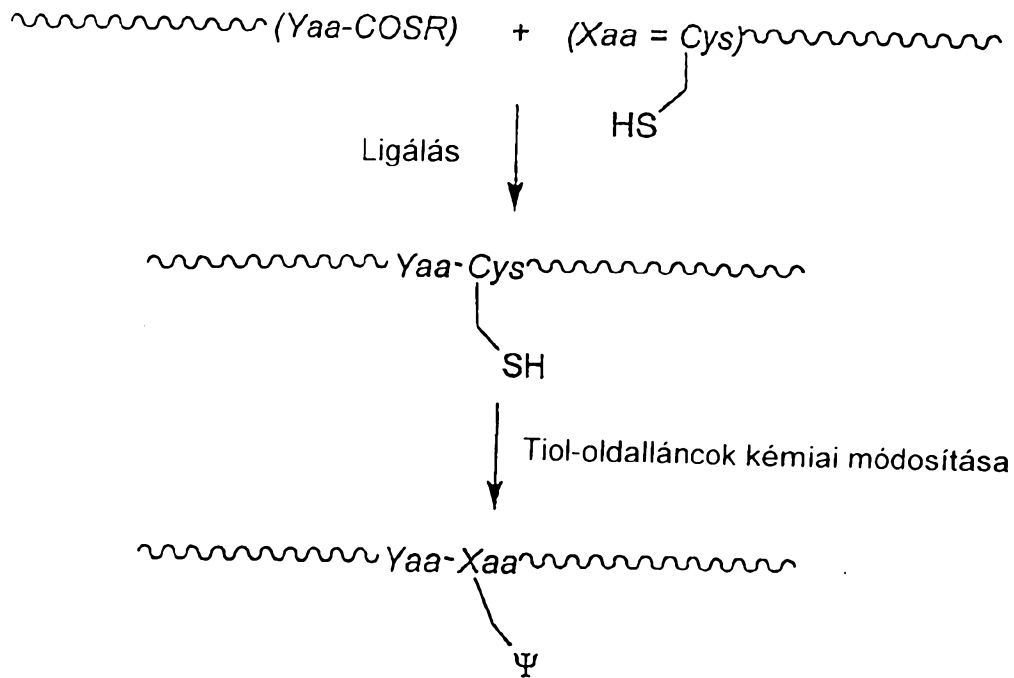
2C ábra



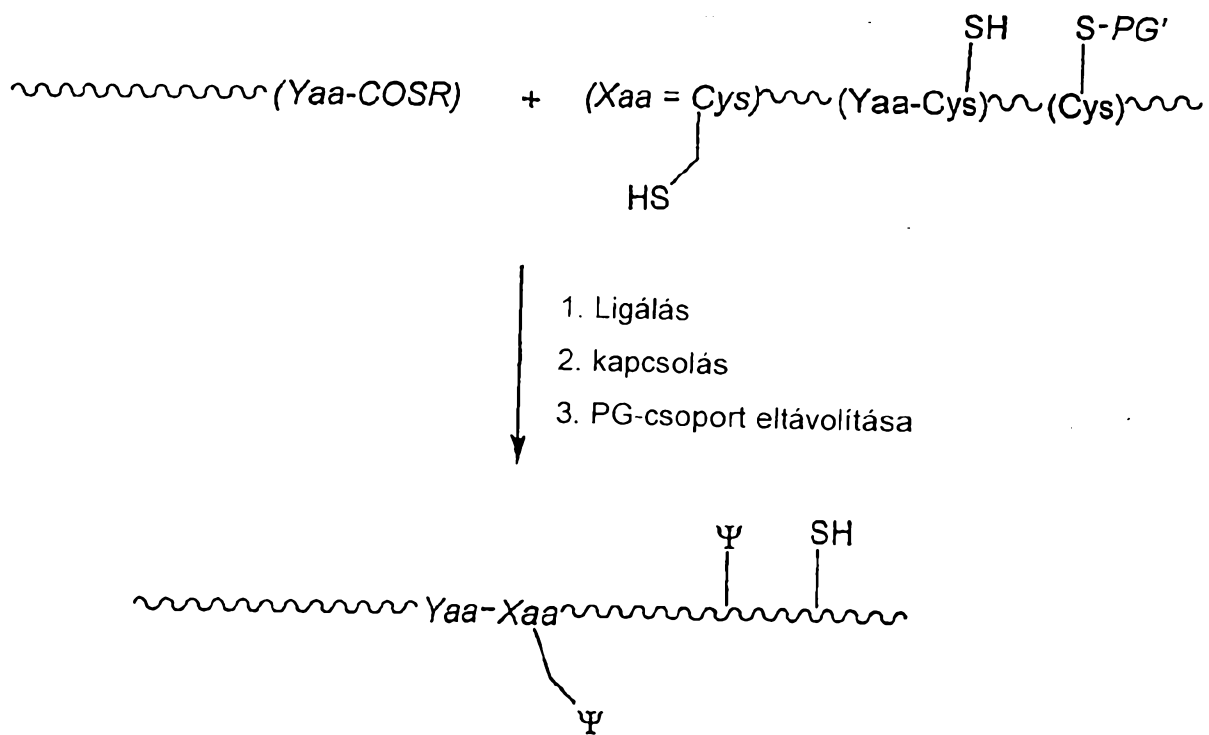
3A ábra



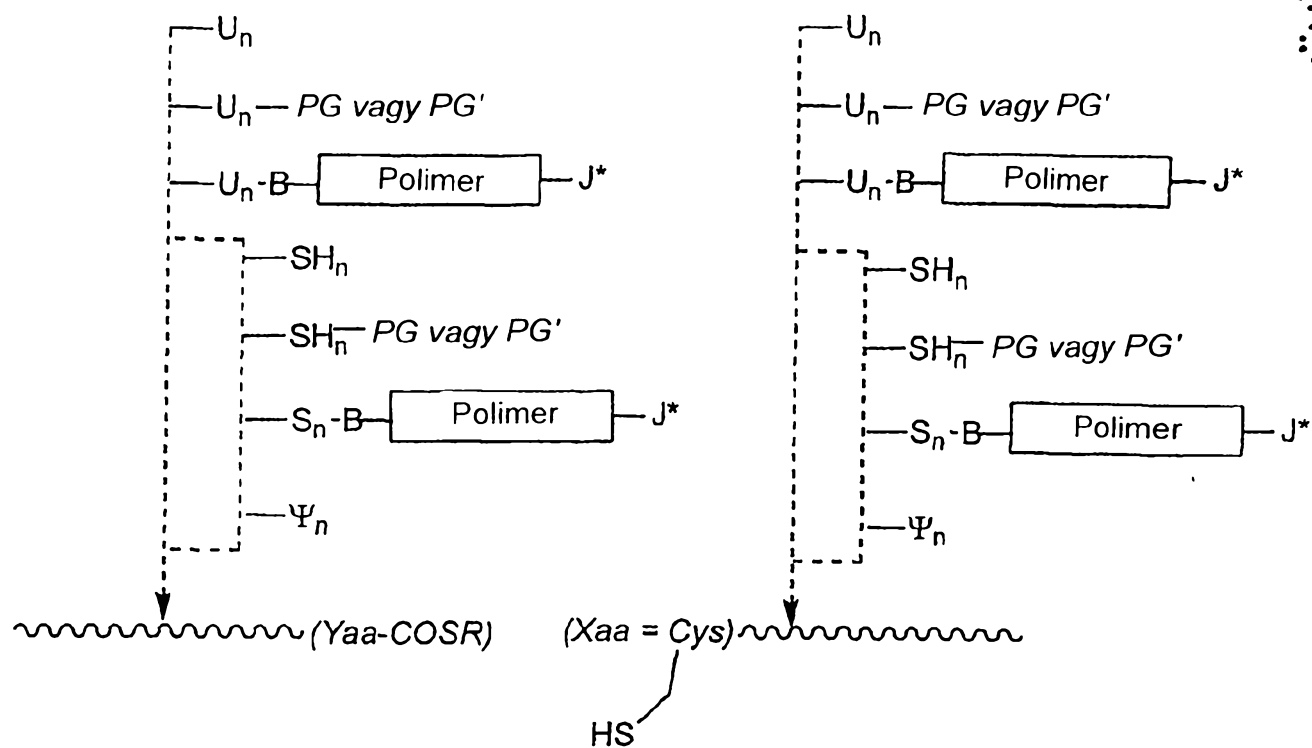
3B ábra



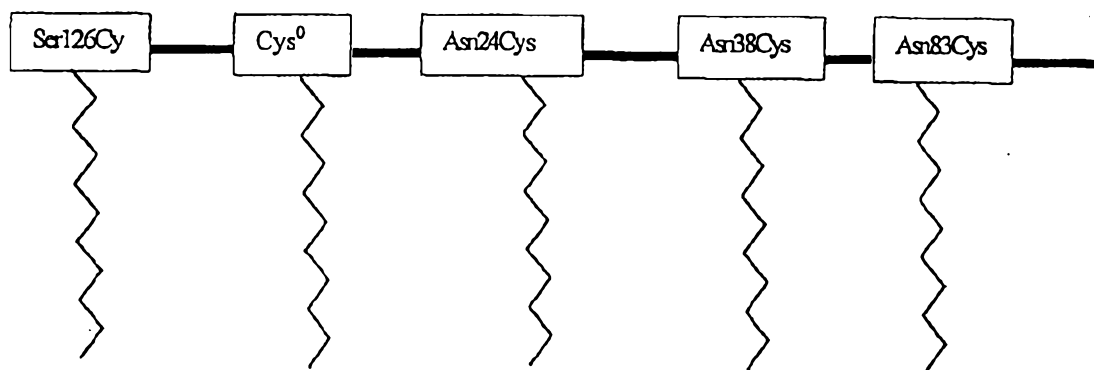
4A ábra



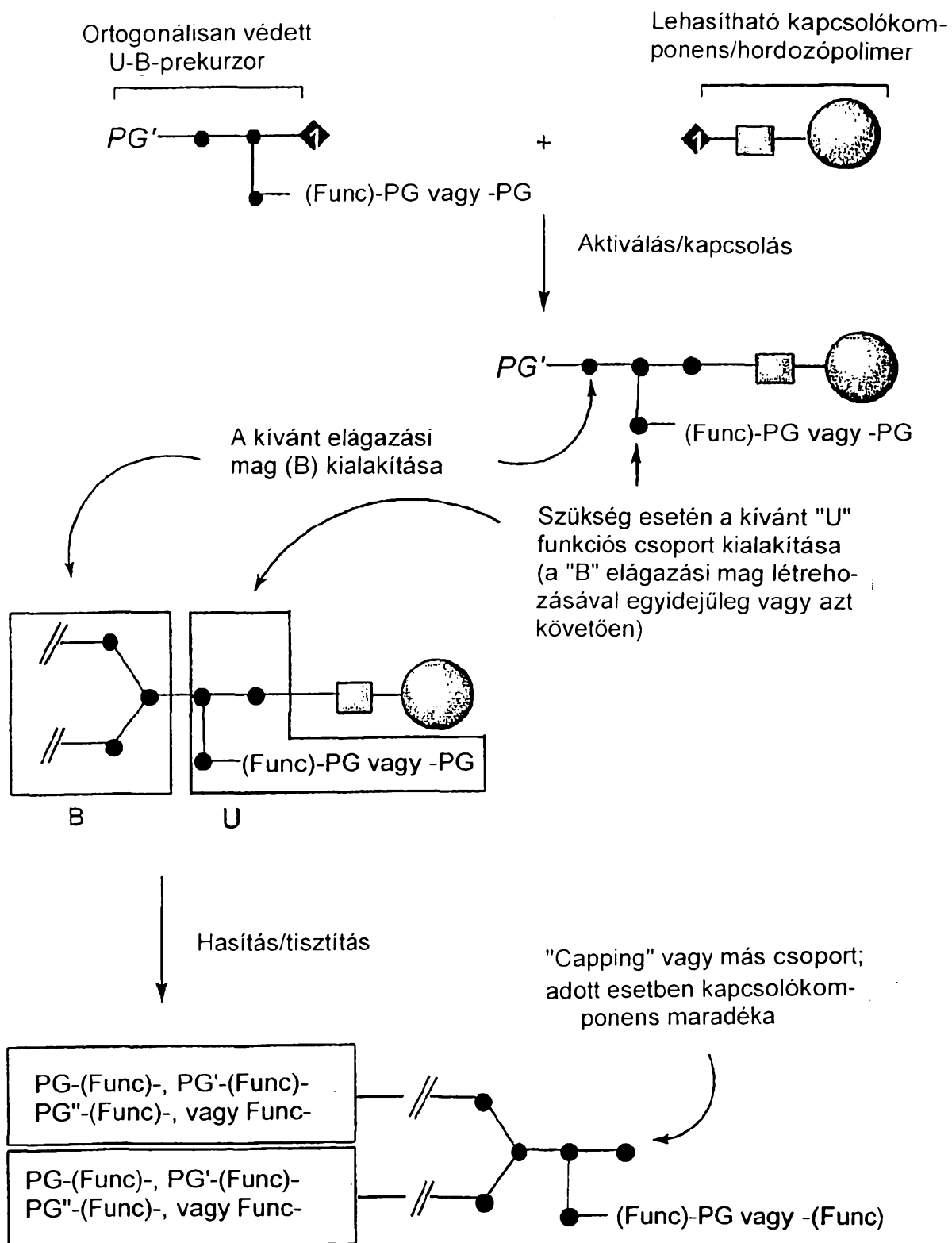
4B ábra



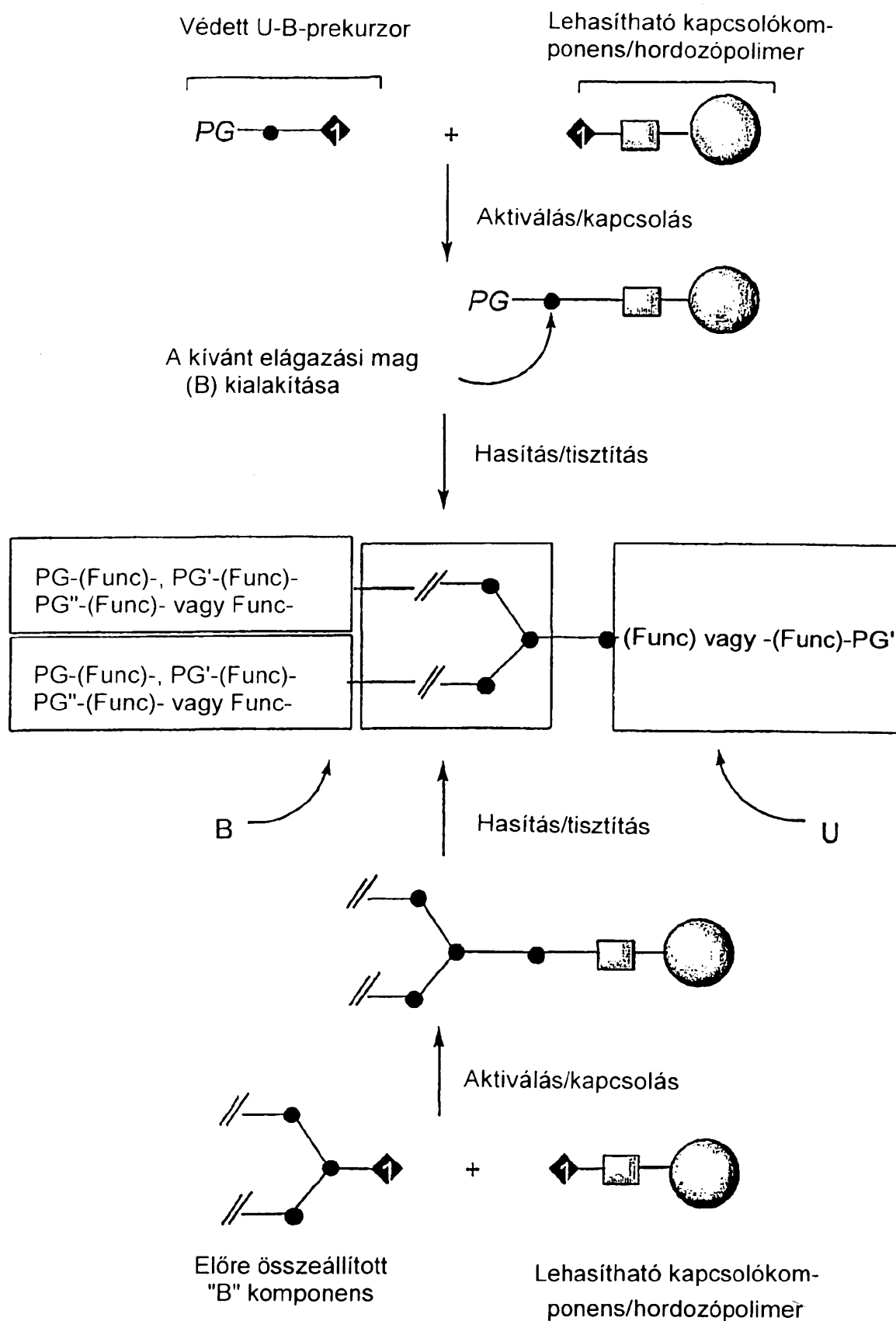
4C ábra



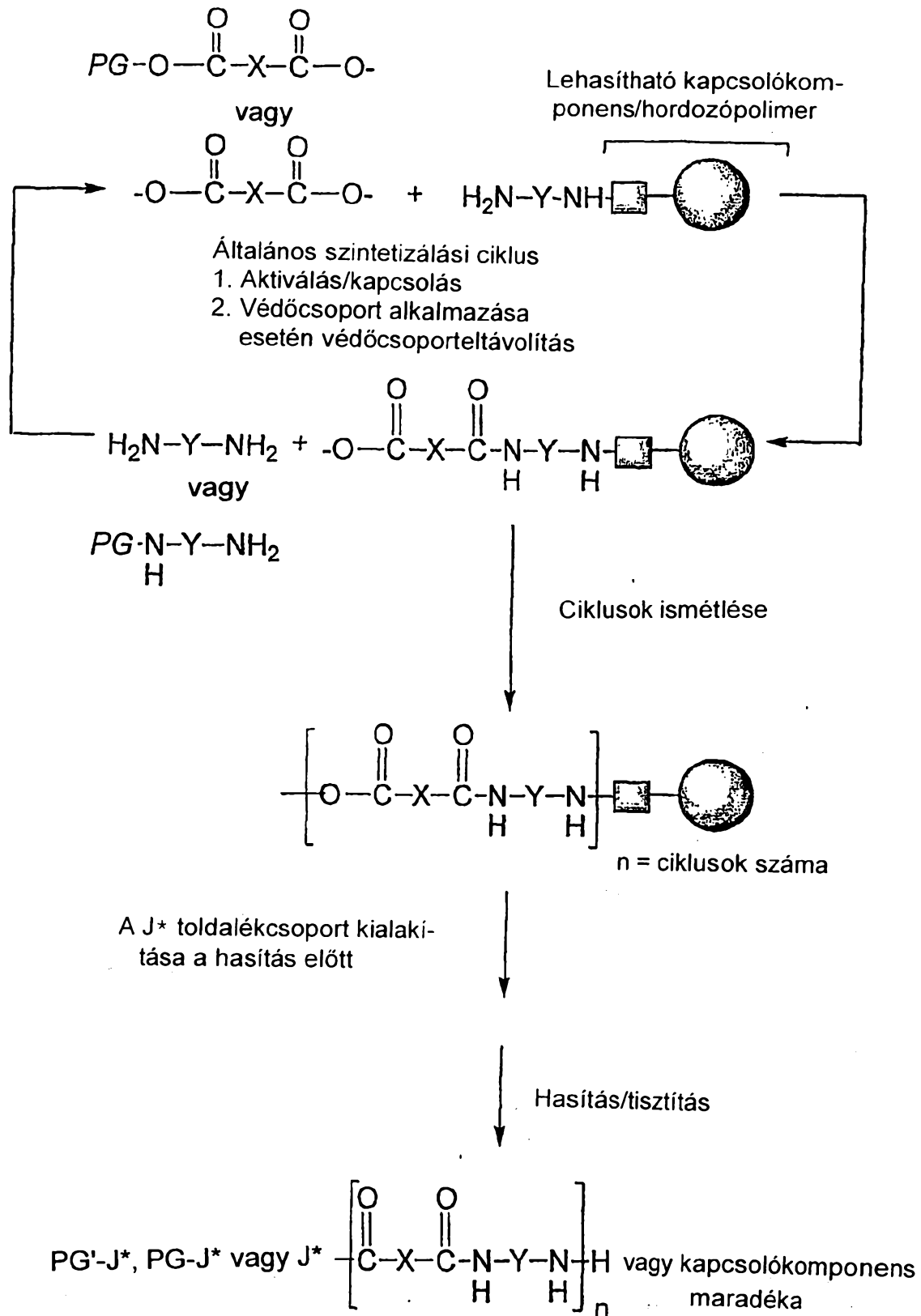
30. ábra



5A ábra

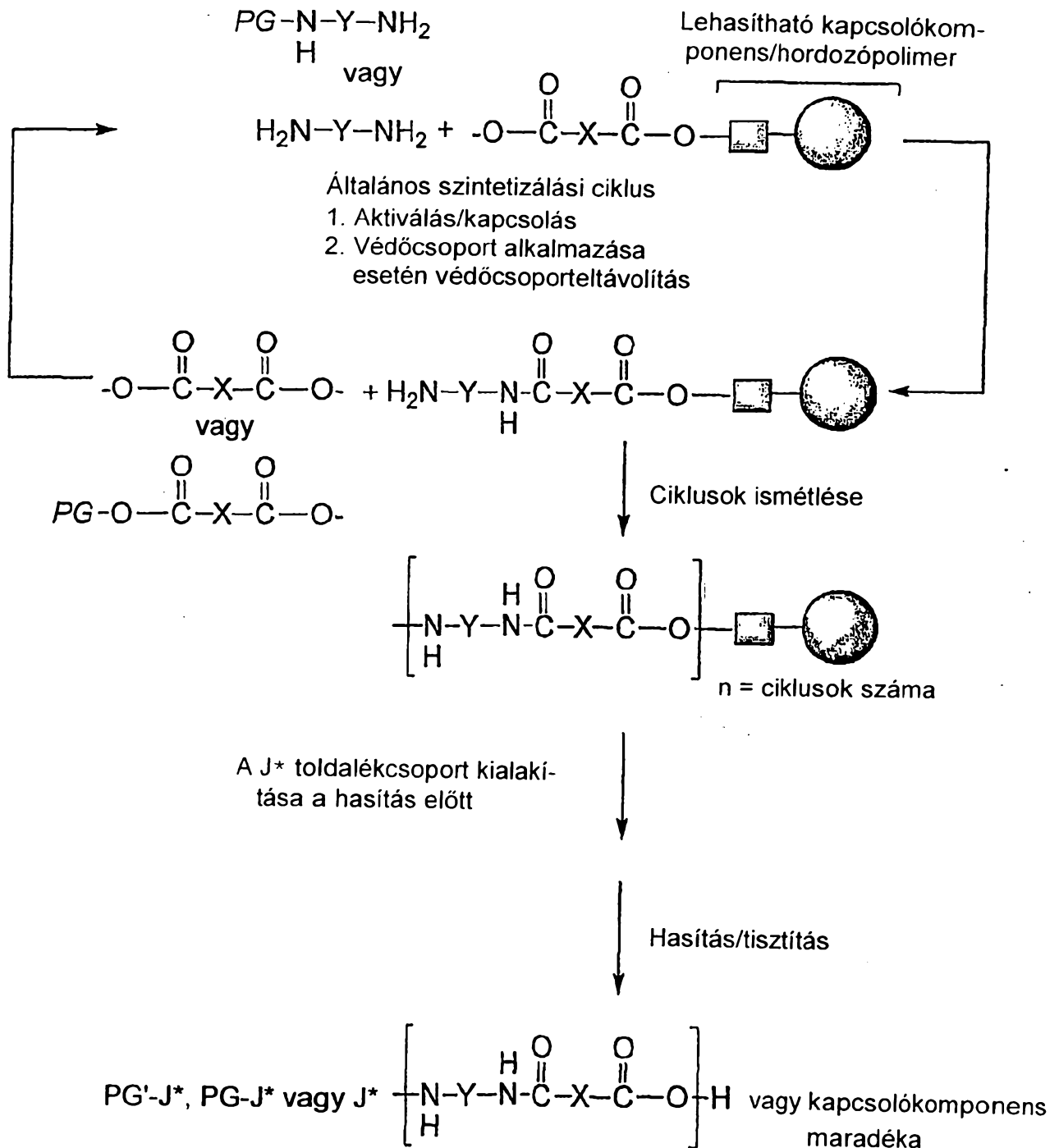


5B ábra

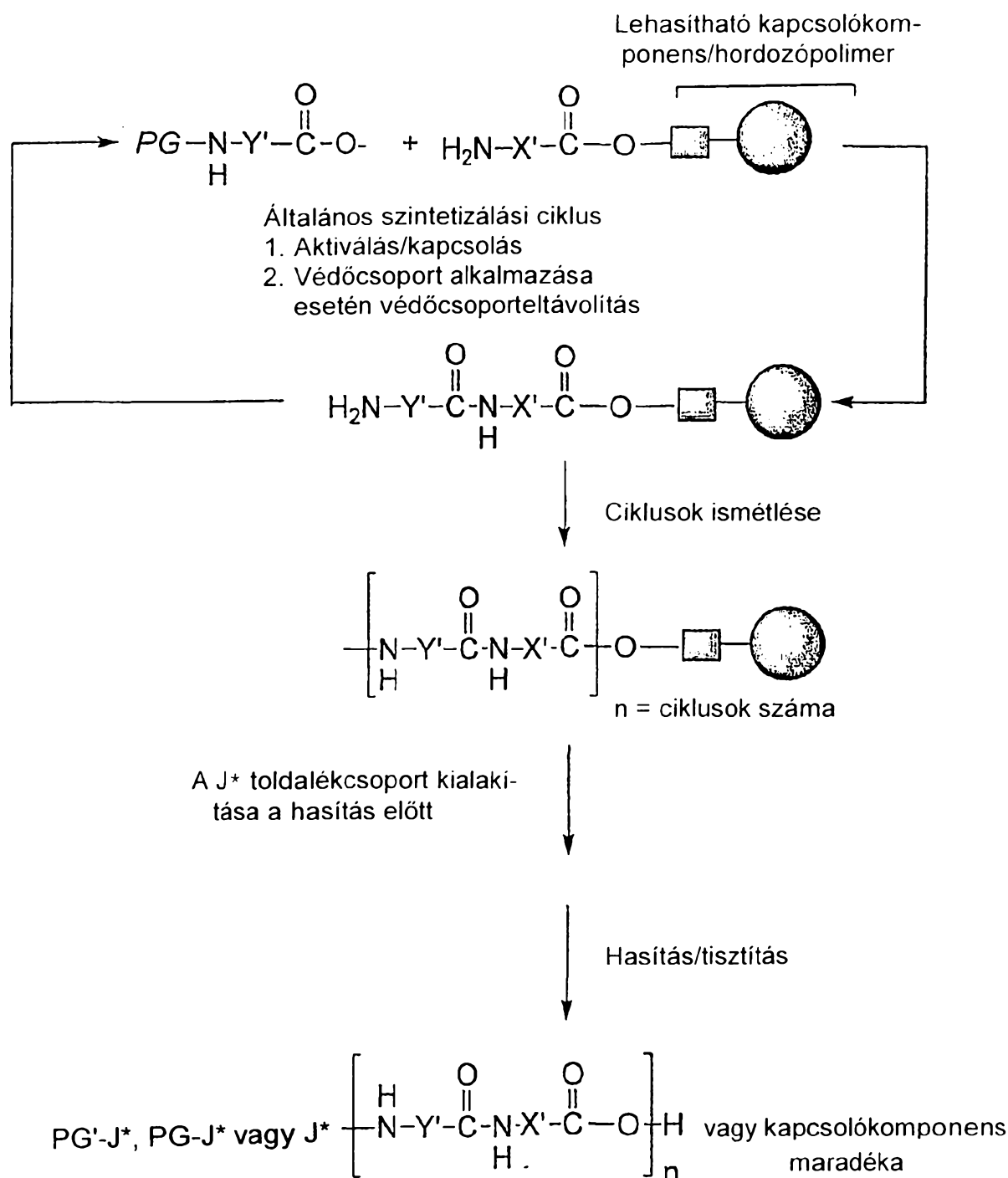


6A ábra

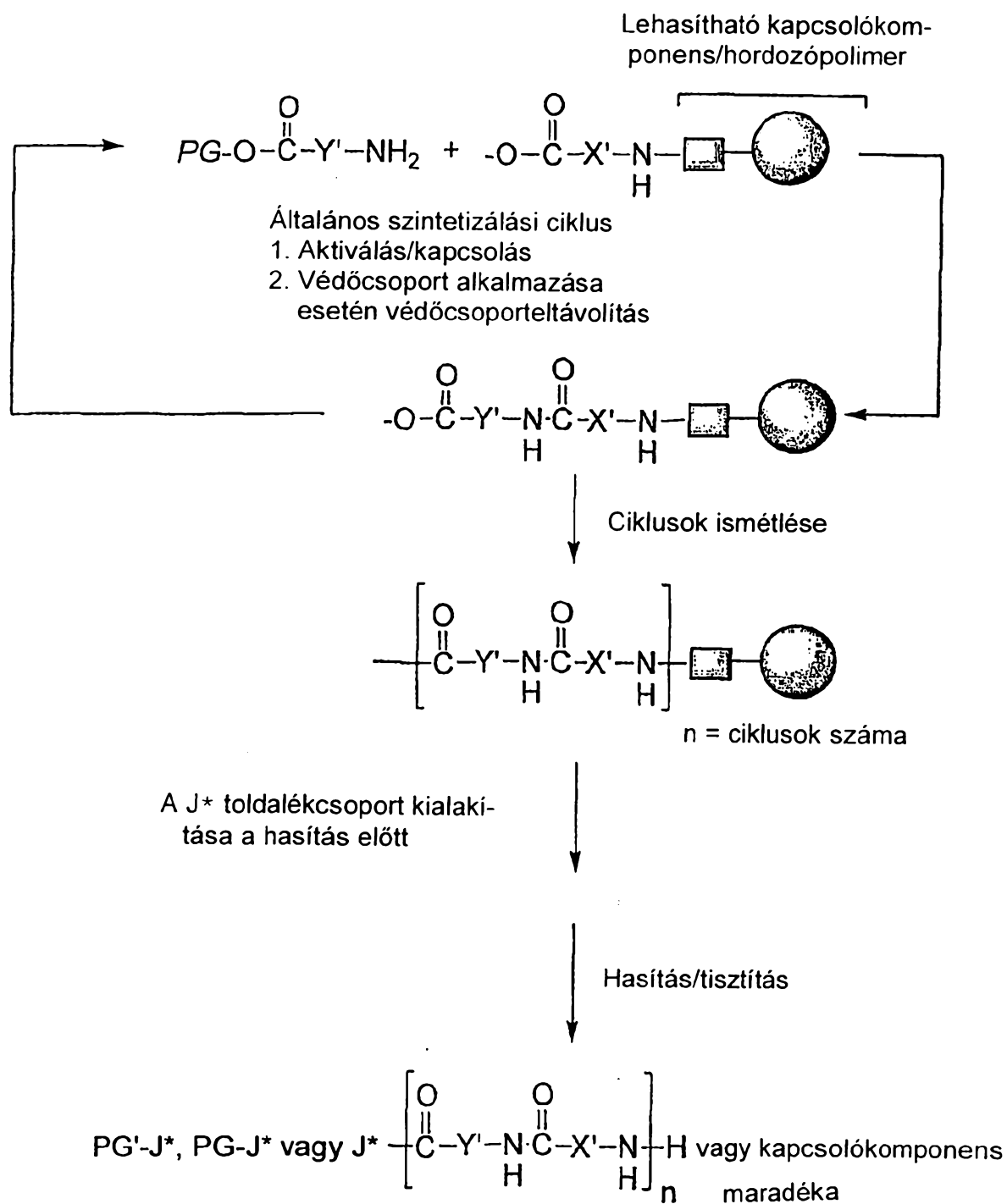
PCT/US01/21928



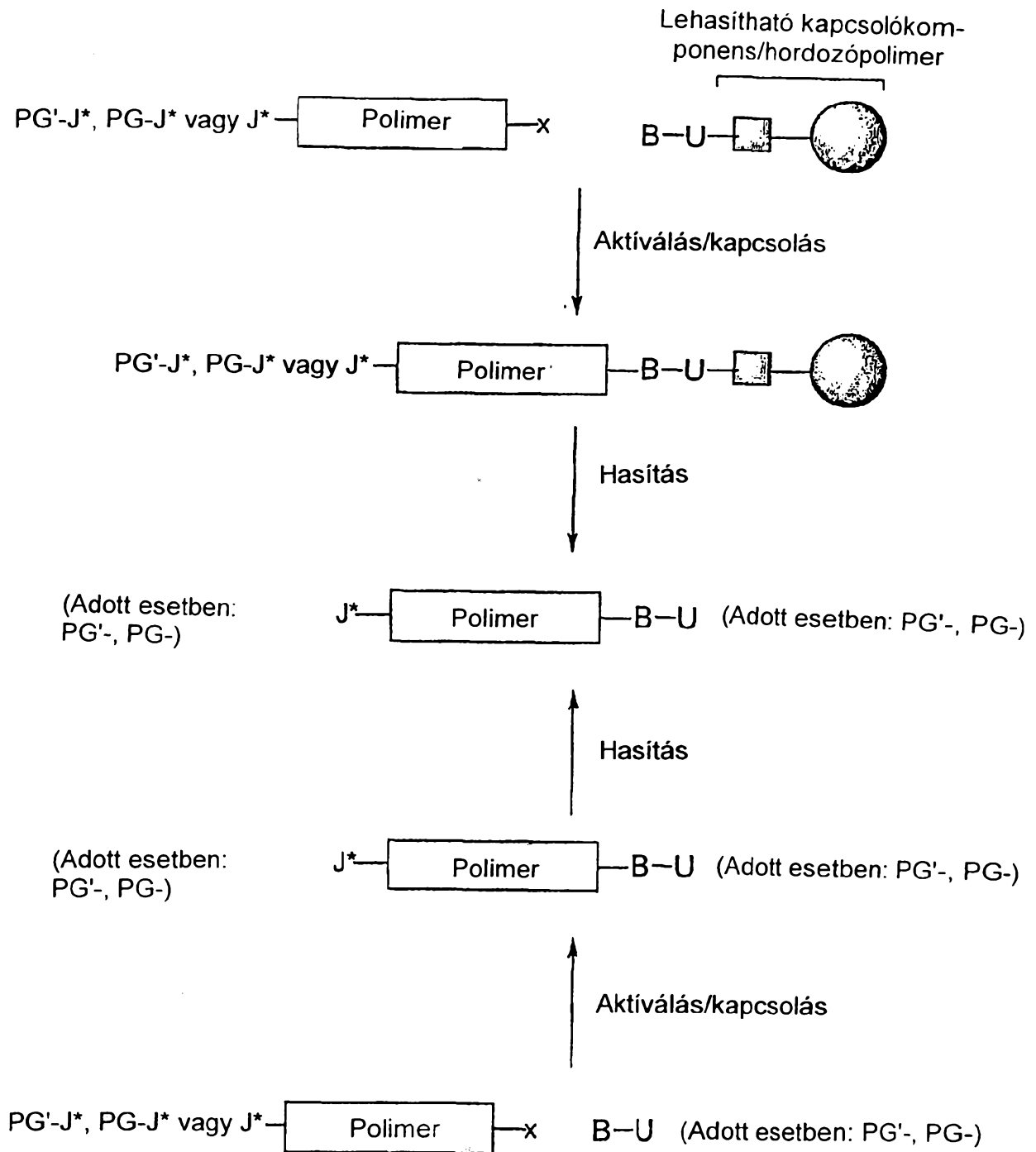
6B ábra



6C ábra

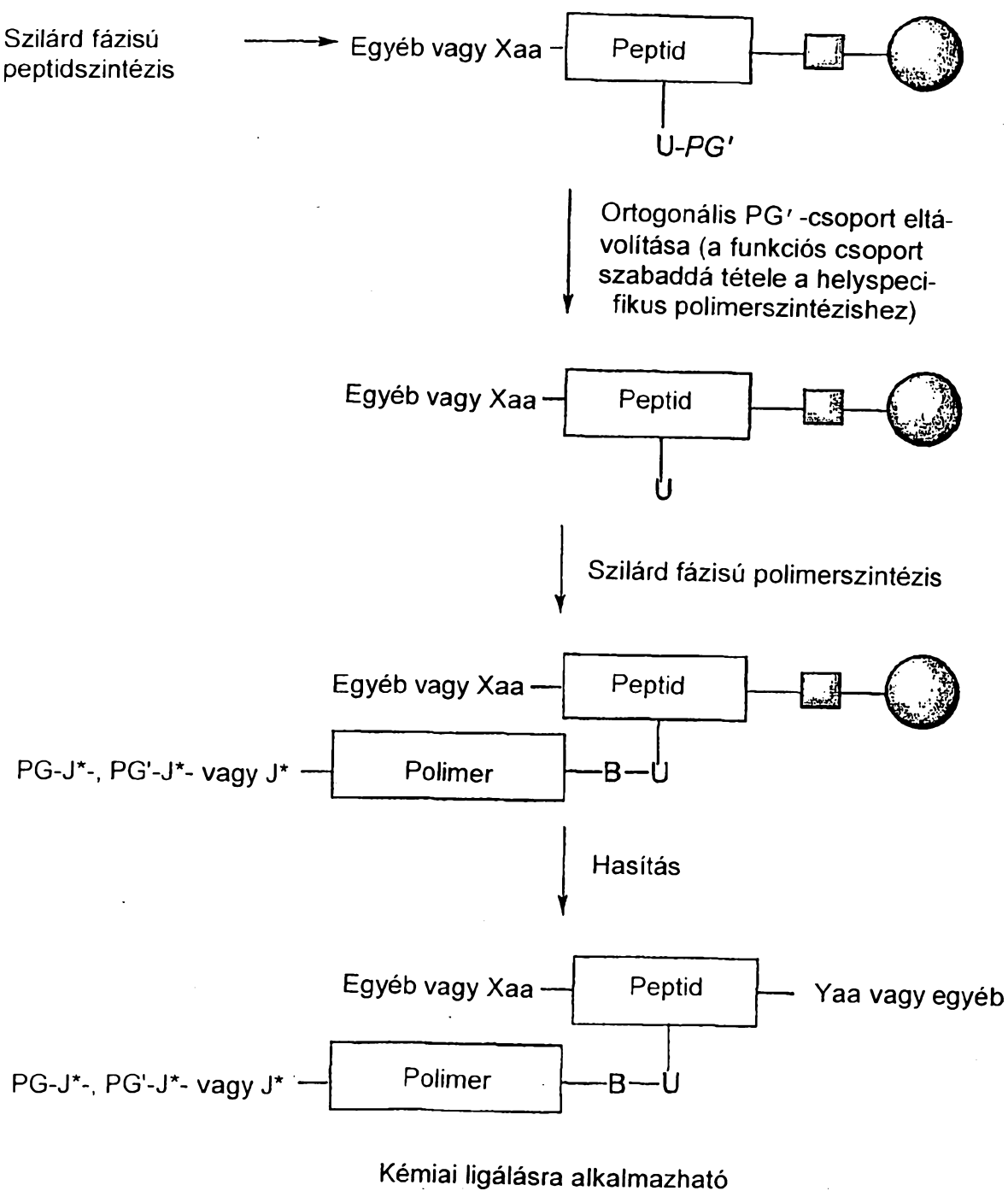


6D ábra

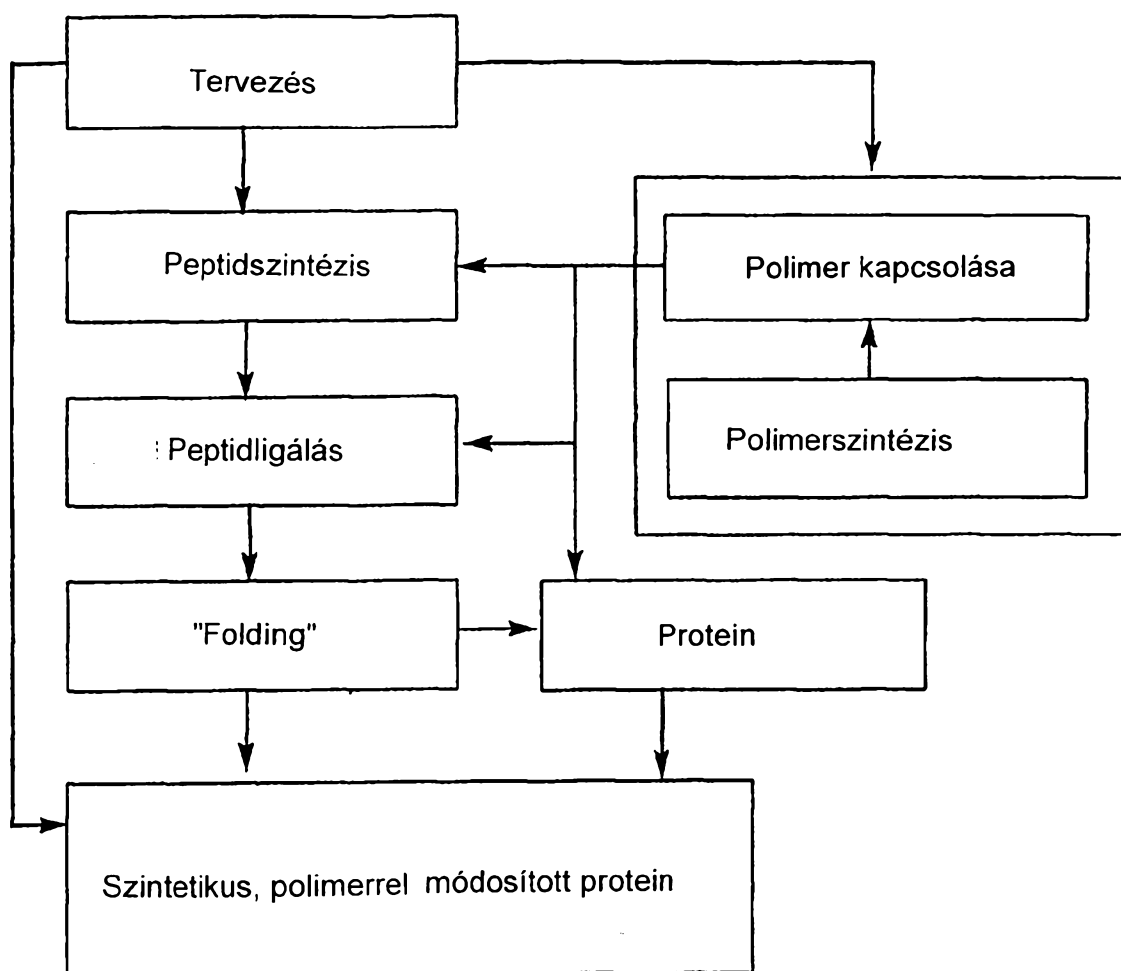


7. ábra

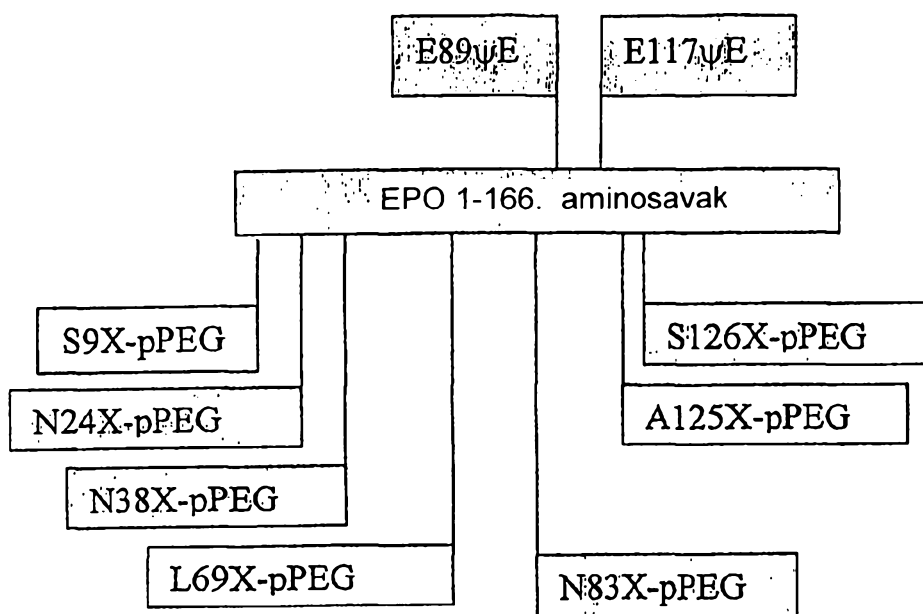
PCT/US01/21928

Szilárd fázisú
peptidszintézis

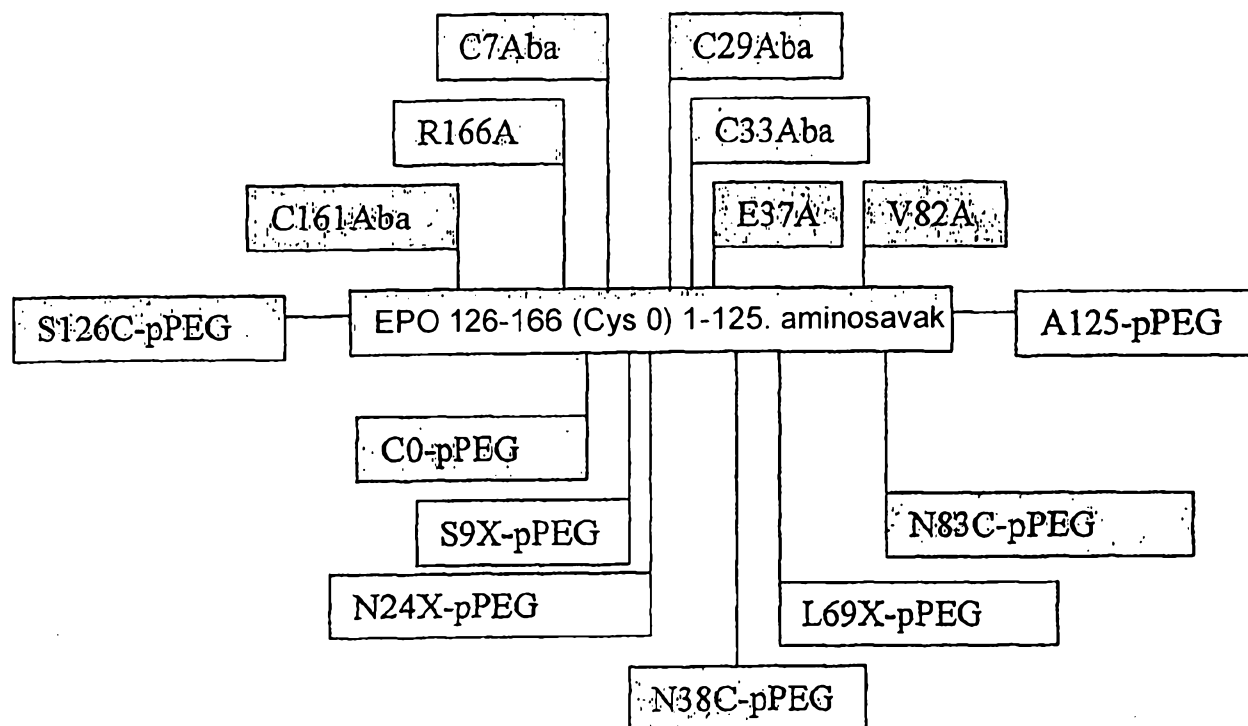
8. ábra



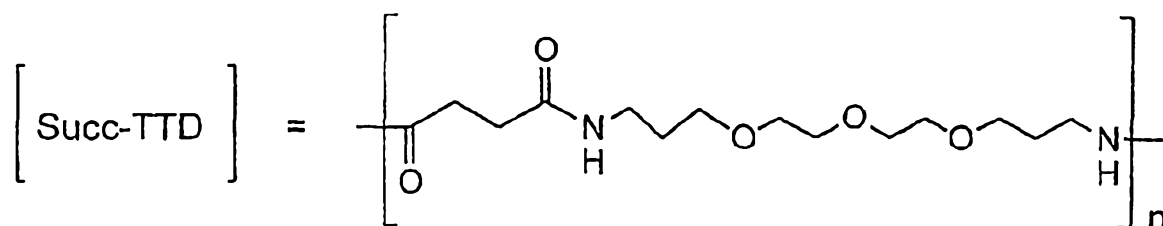
9. ábra



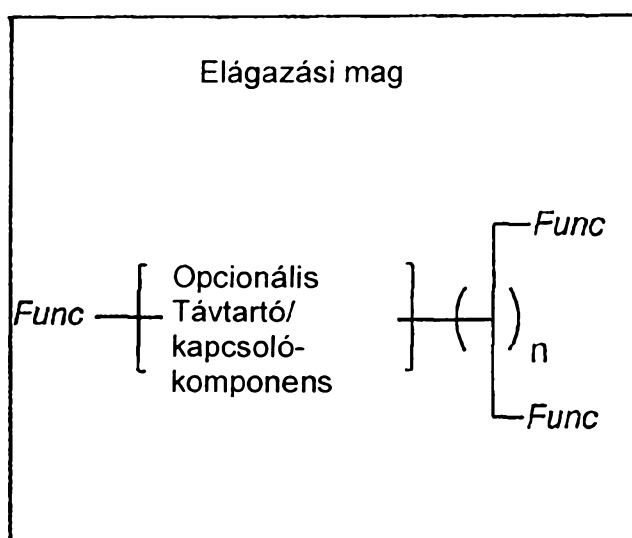
10. ábra



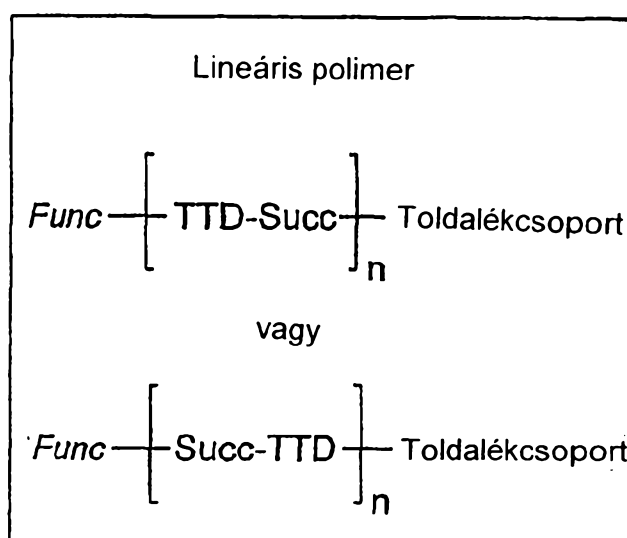
11. ábra



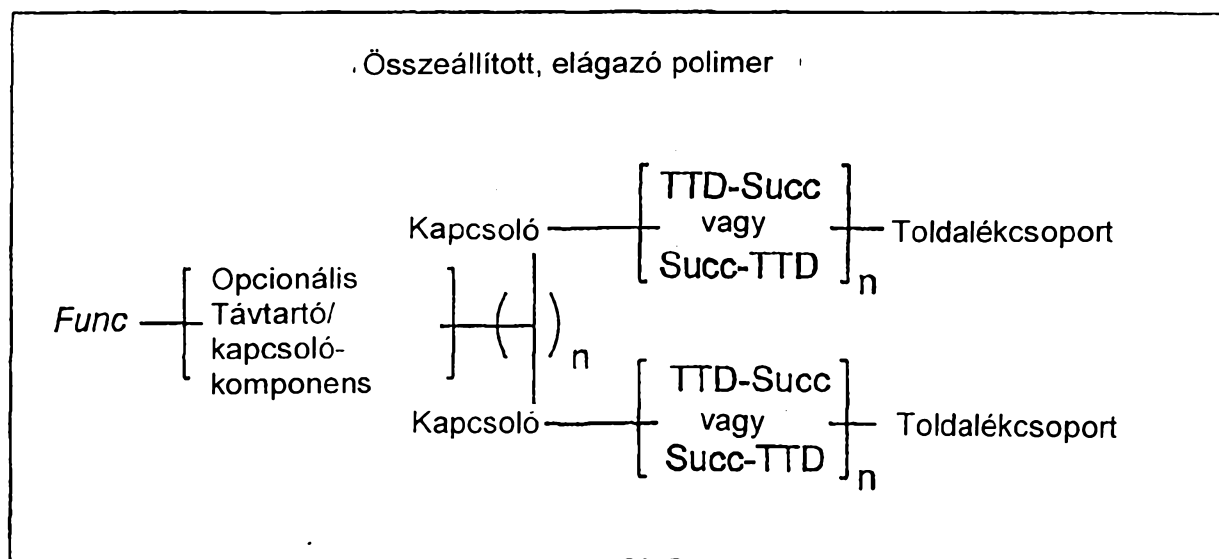
12A ábra



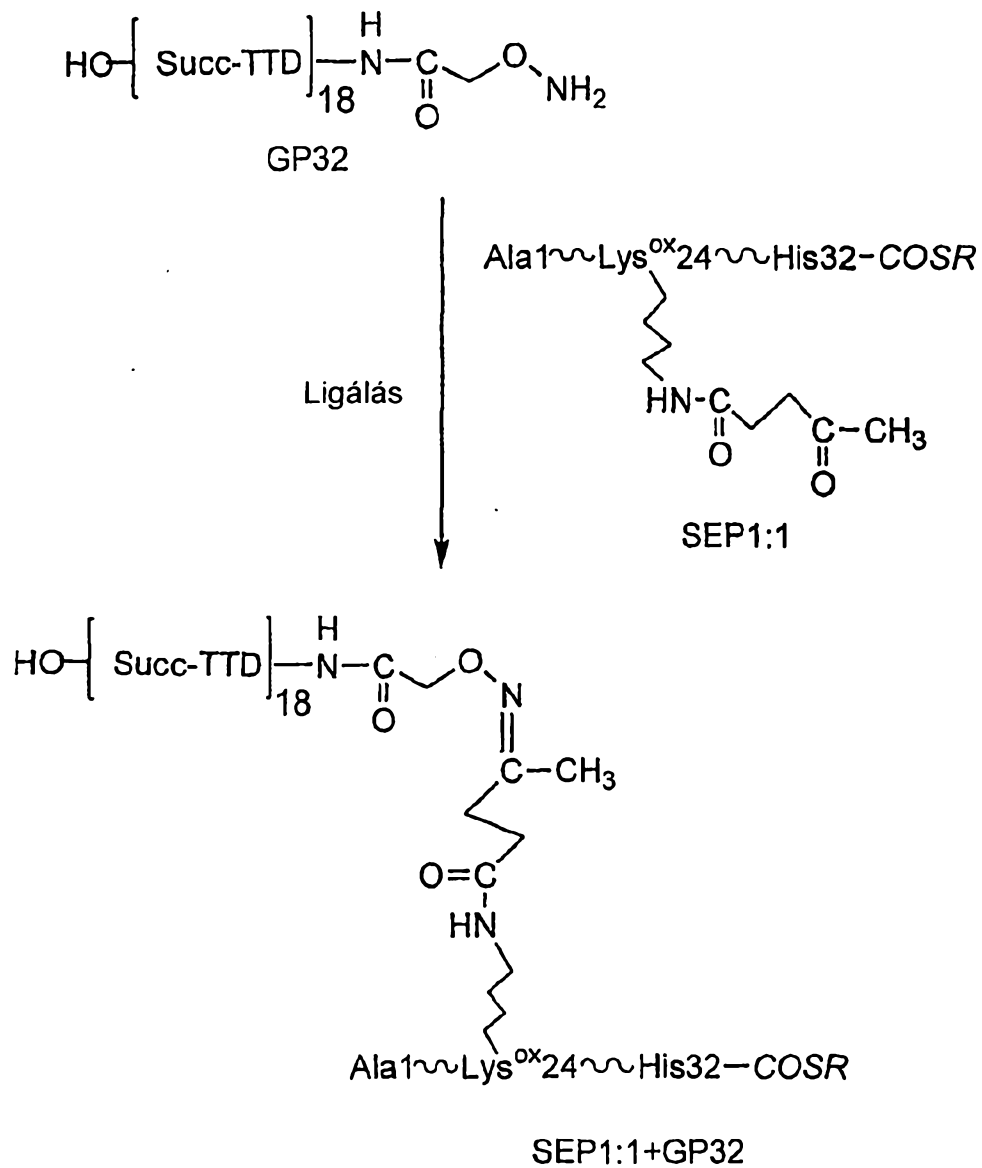
12B ábra



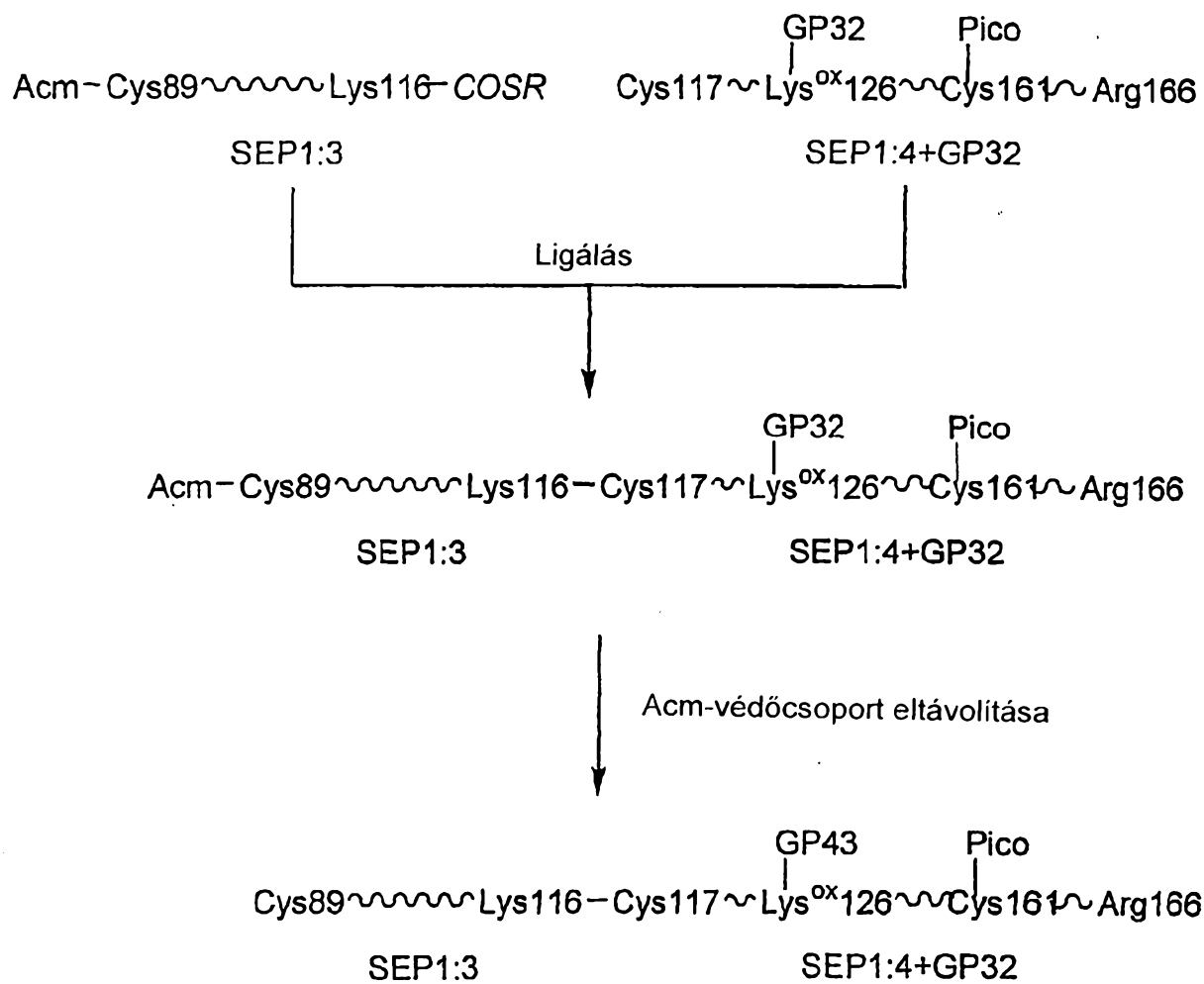
12C ábra



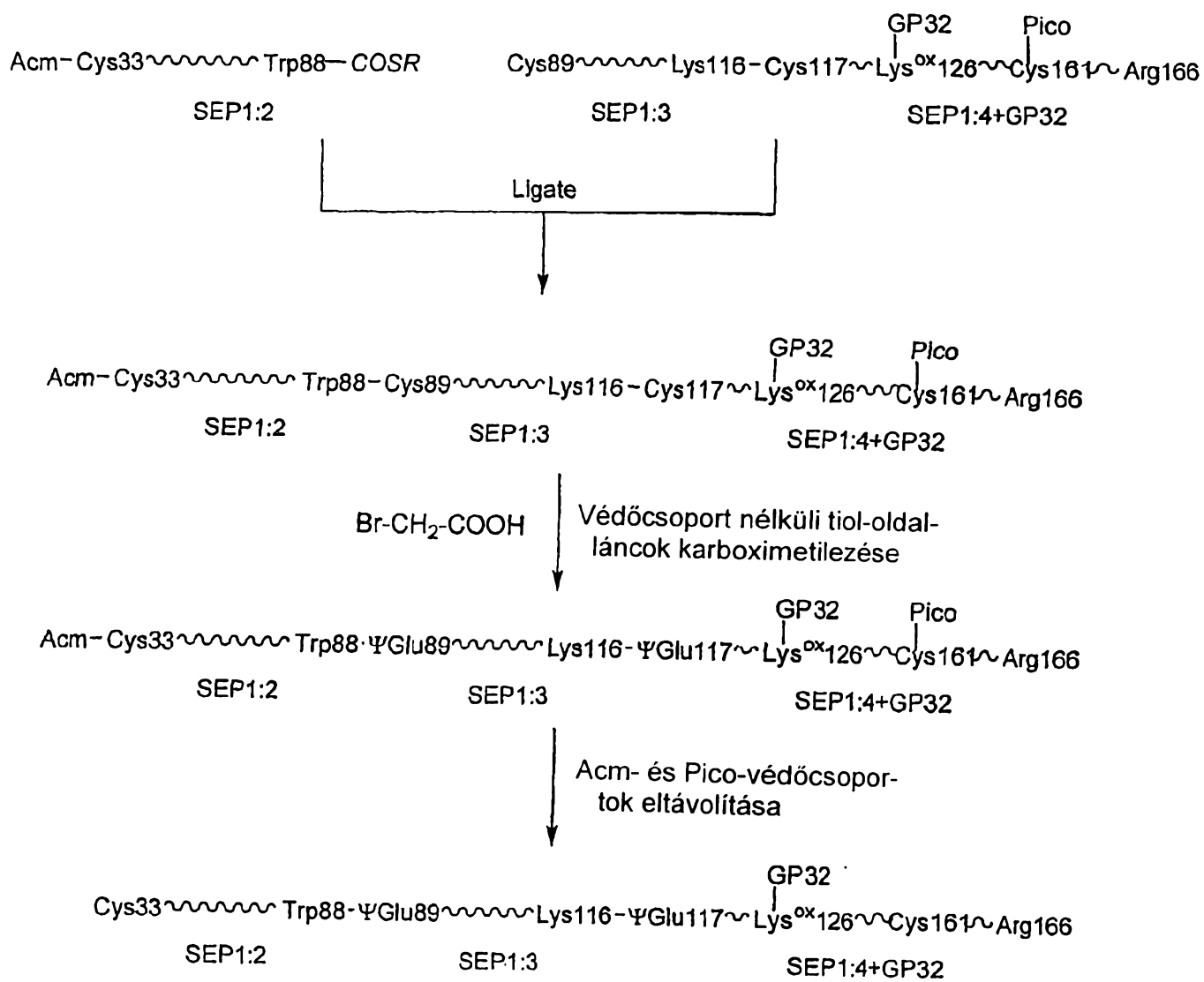
12D ábra



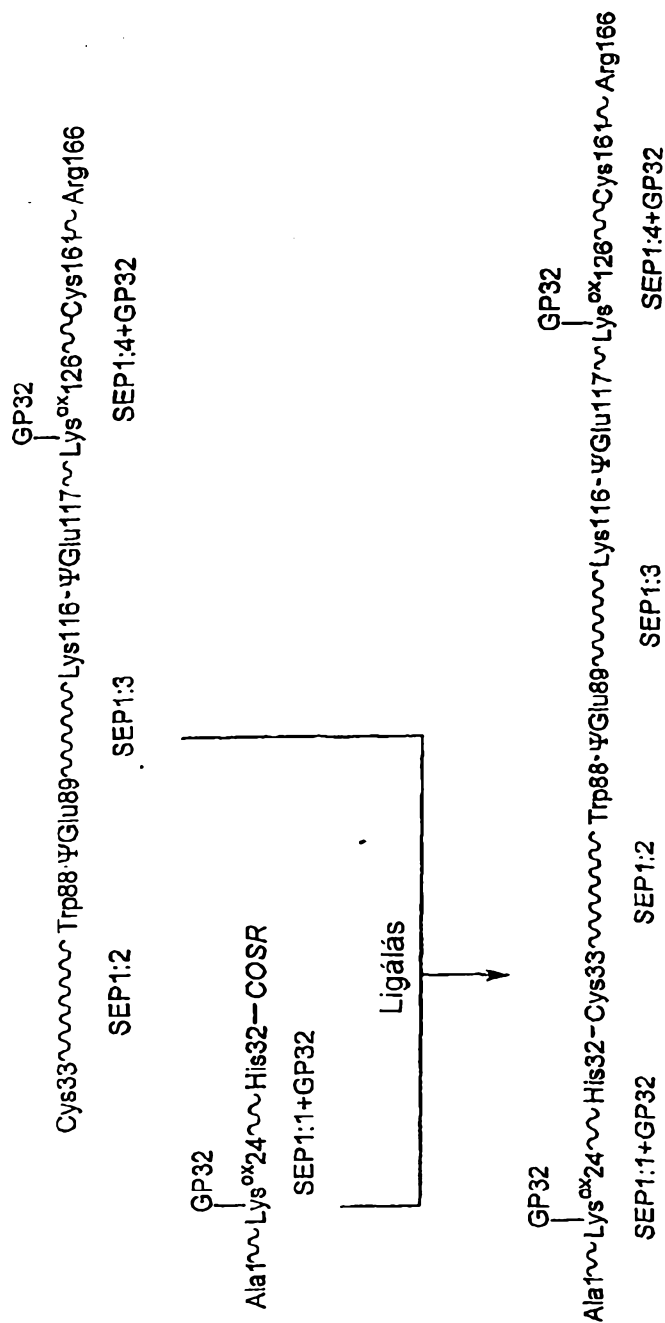
14A ábra



14C ábra

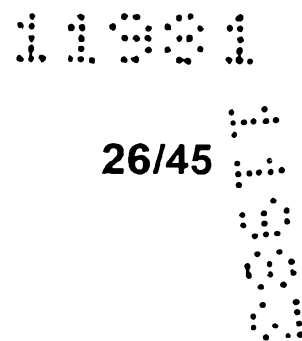


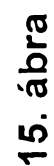
14D ábra

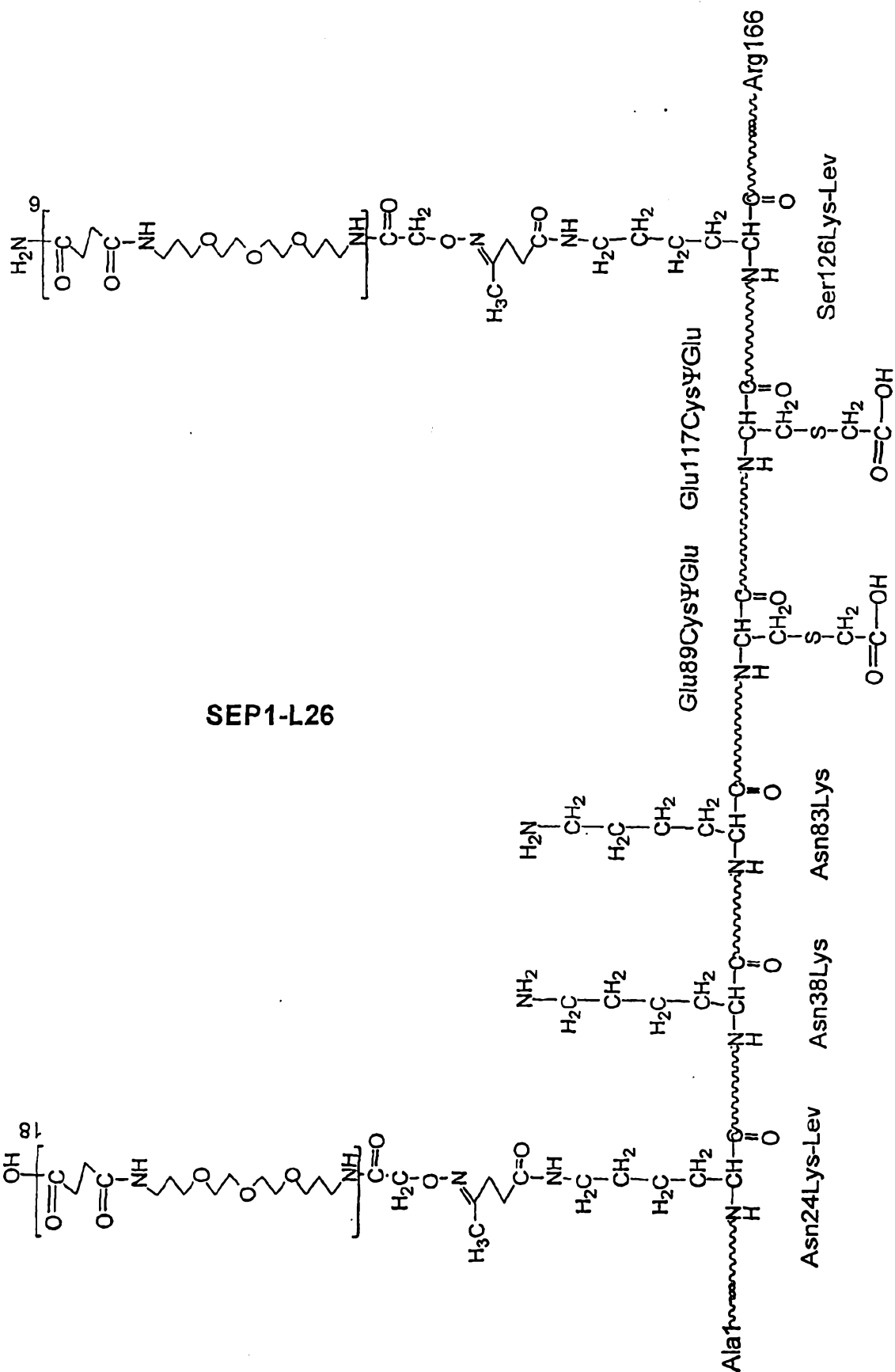


Teljes hosszúságú SEP-1-L30

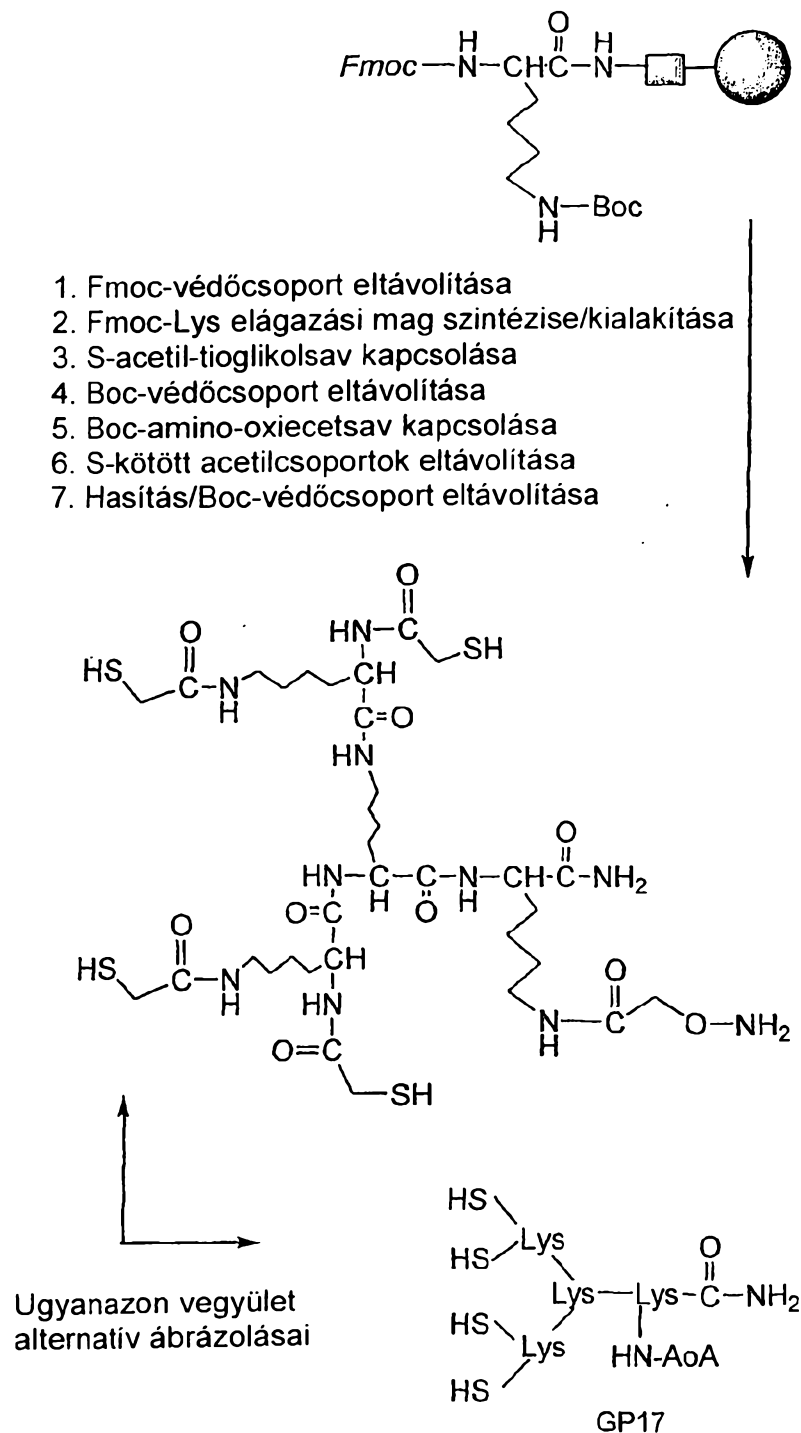
14E ábra



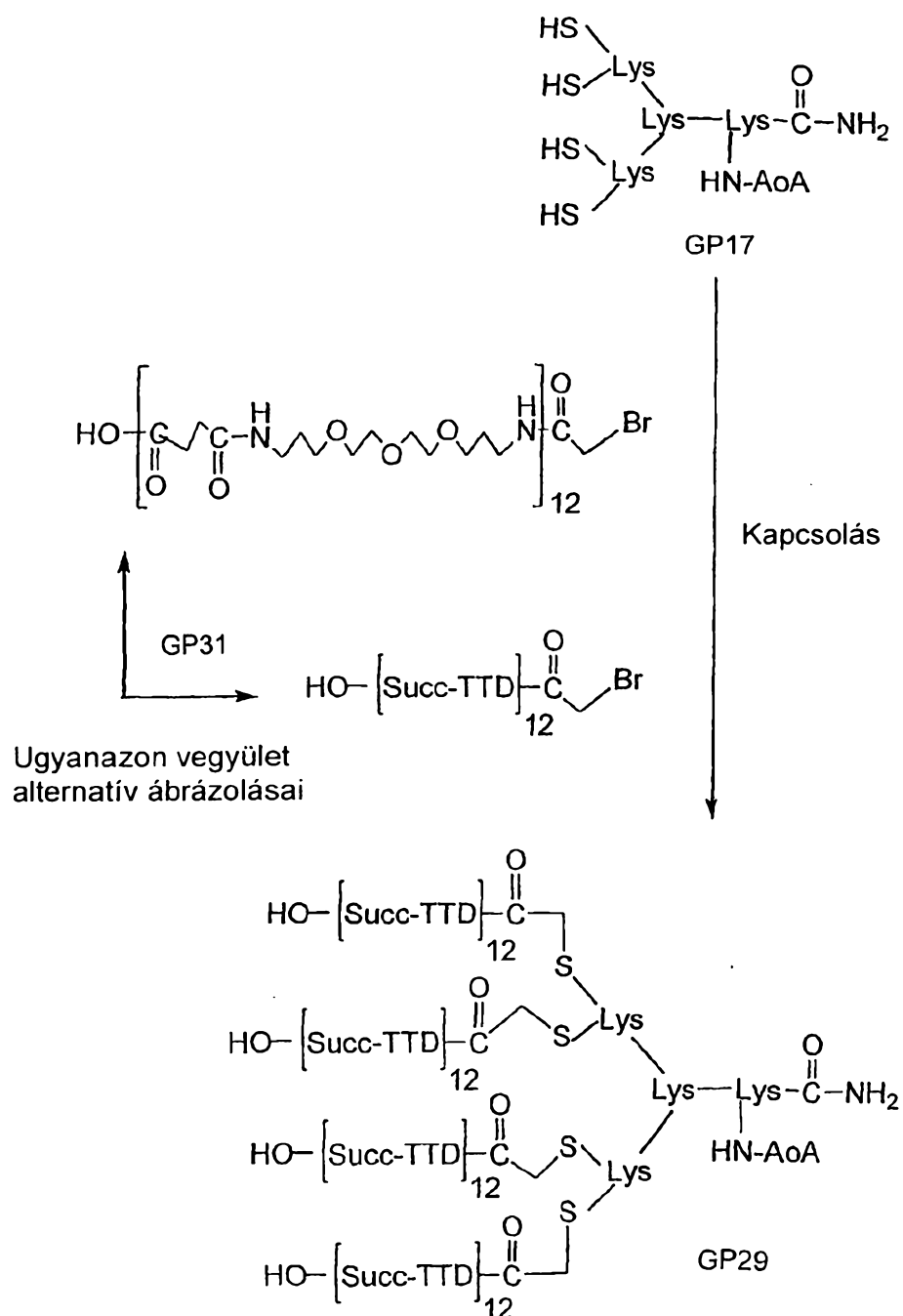




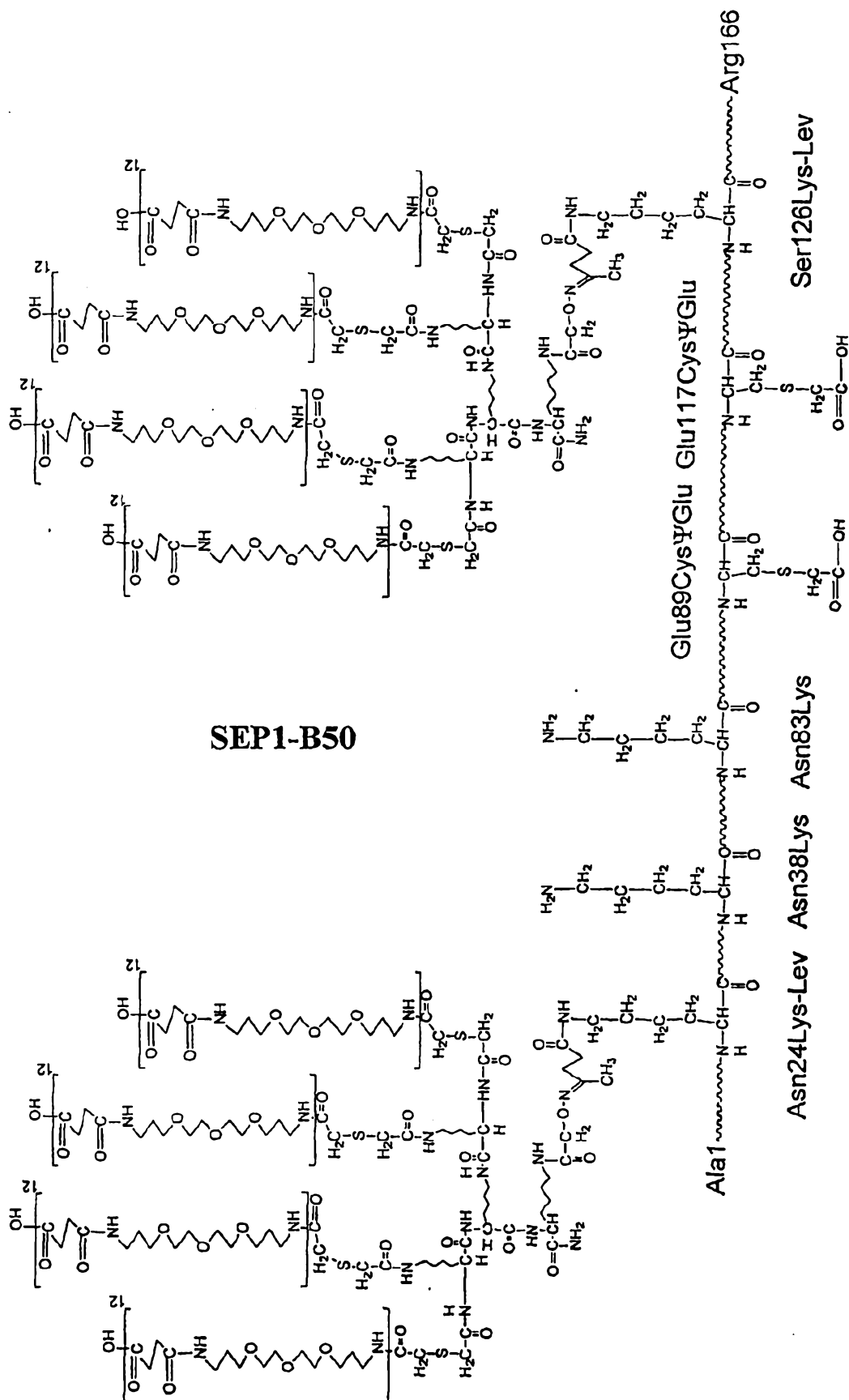
PCT/US01/21928



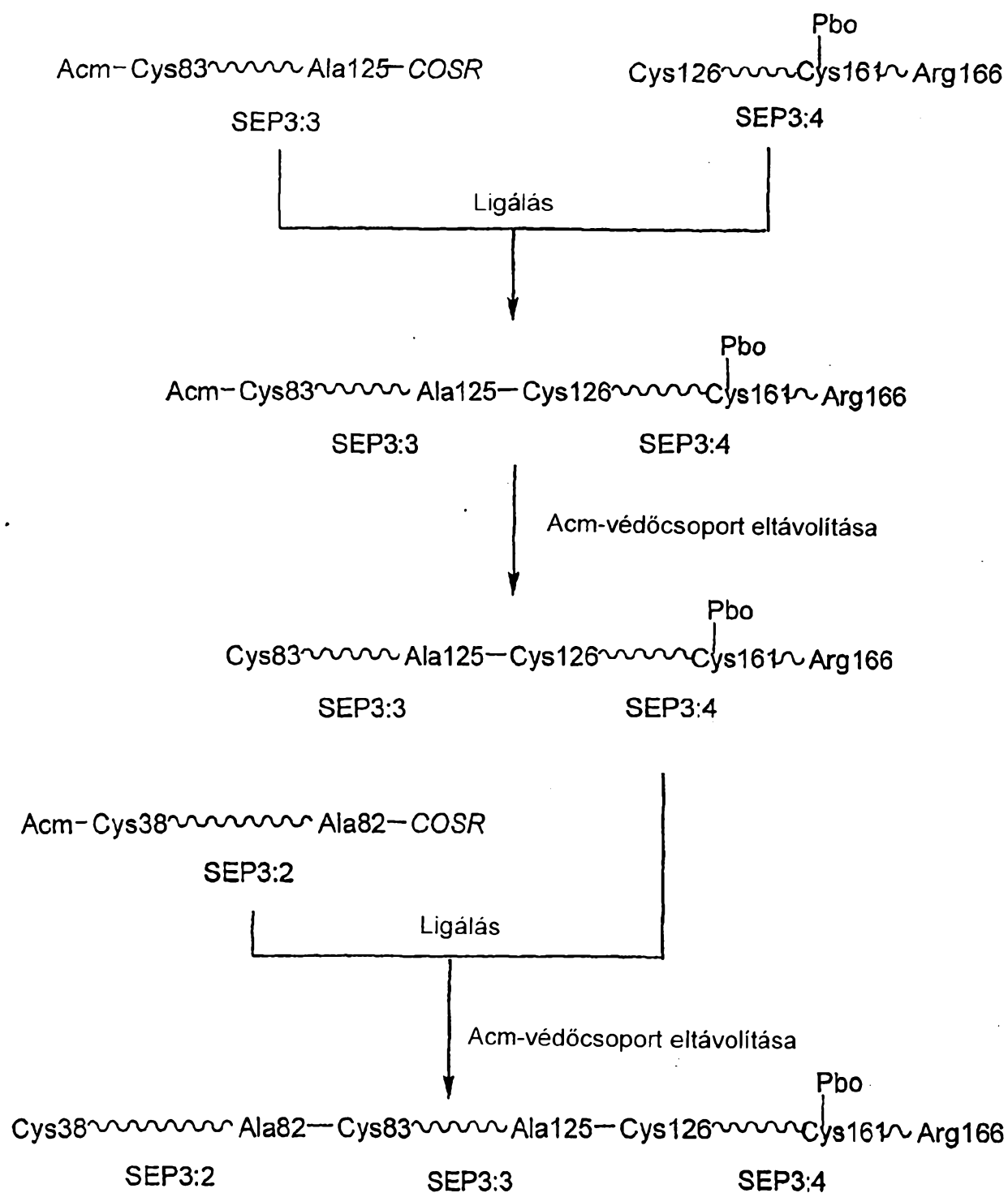
17A ábra



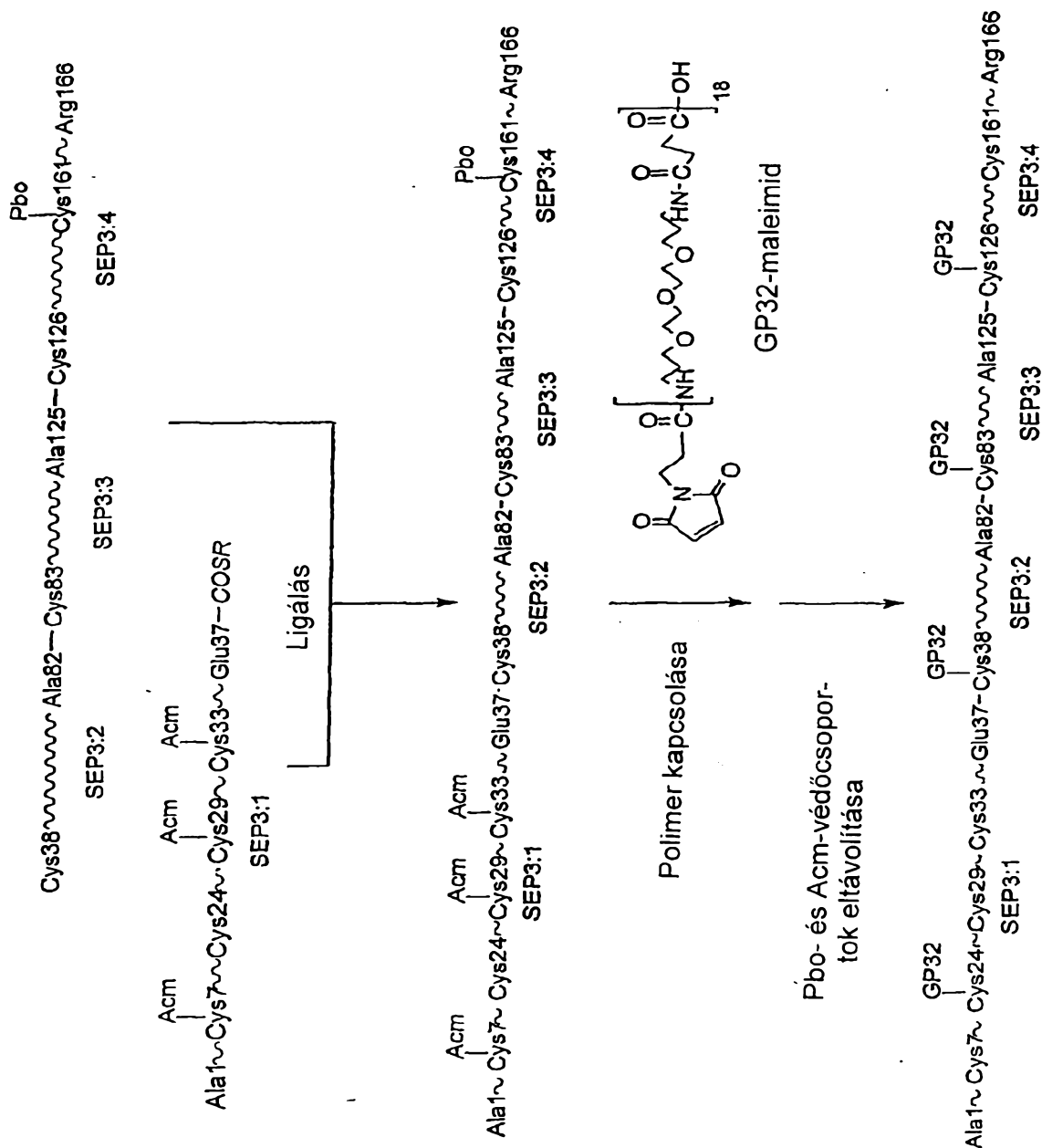
17B ábra



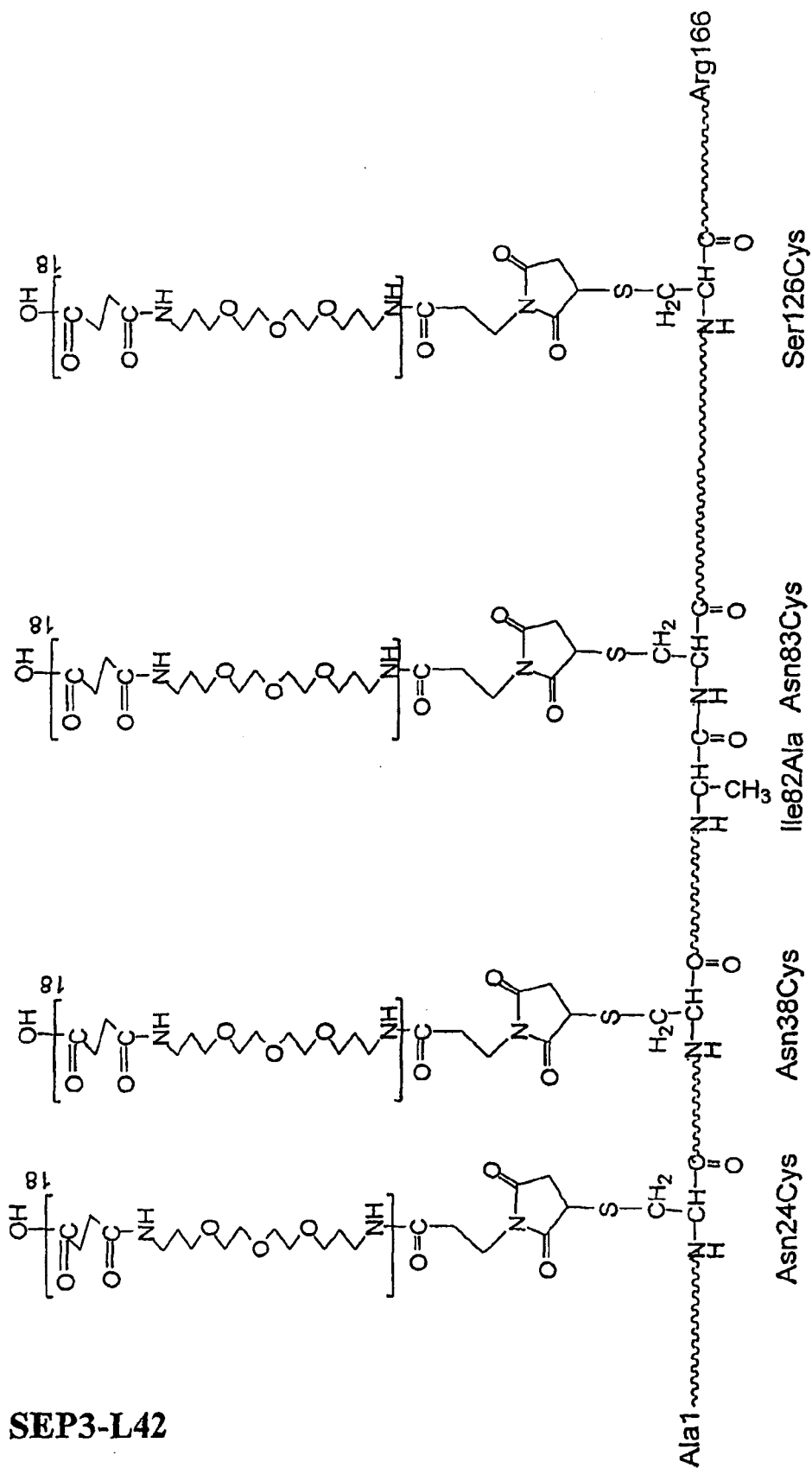
18. ábra



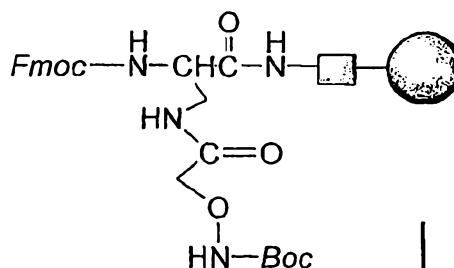
19A ábra



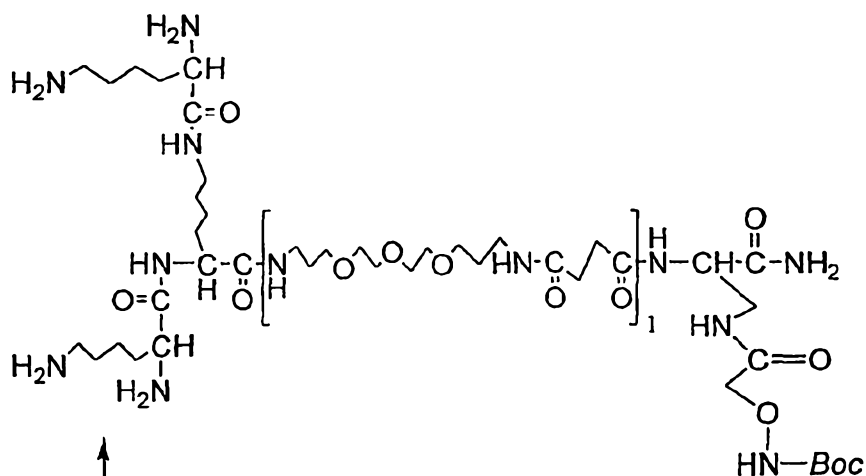
19B ábra



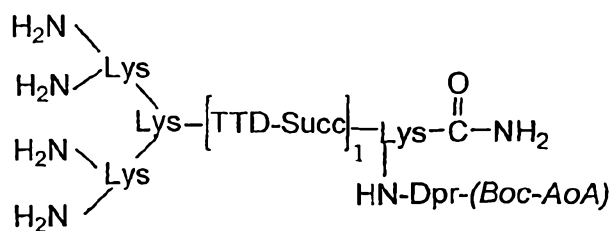
20. ábra



1. Fmoc-védőcsoport eltávolítása
2. TTD-Succ kapcsolókomponens szintézise
3. Fmoc-Lys elágazási mag szintézise/ kialakítása
4. Fmoc-védőcsoport eltávolítása

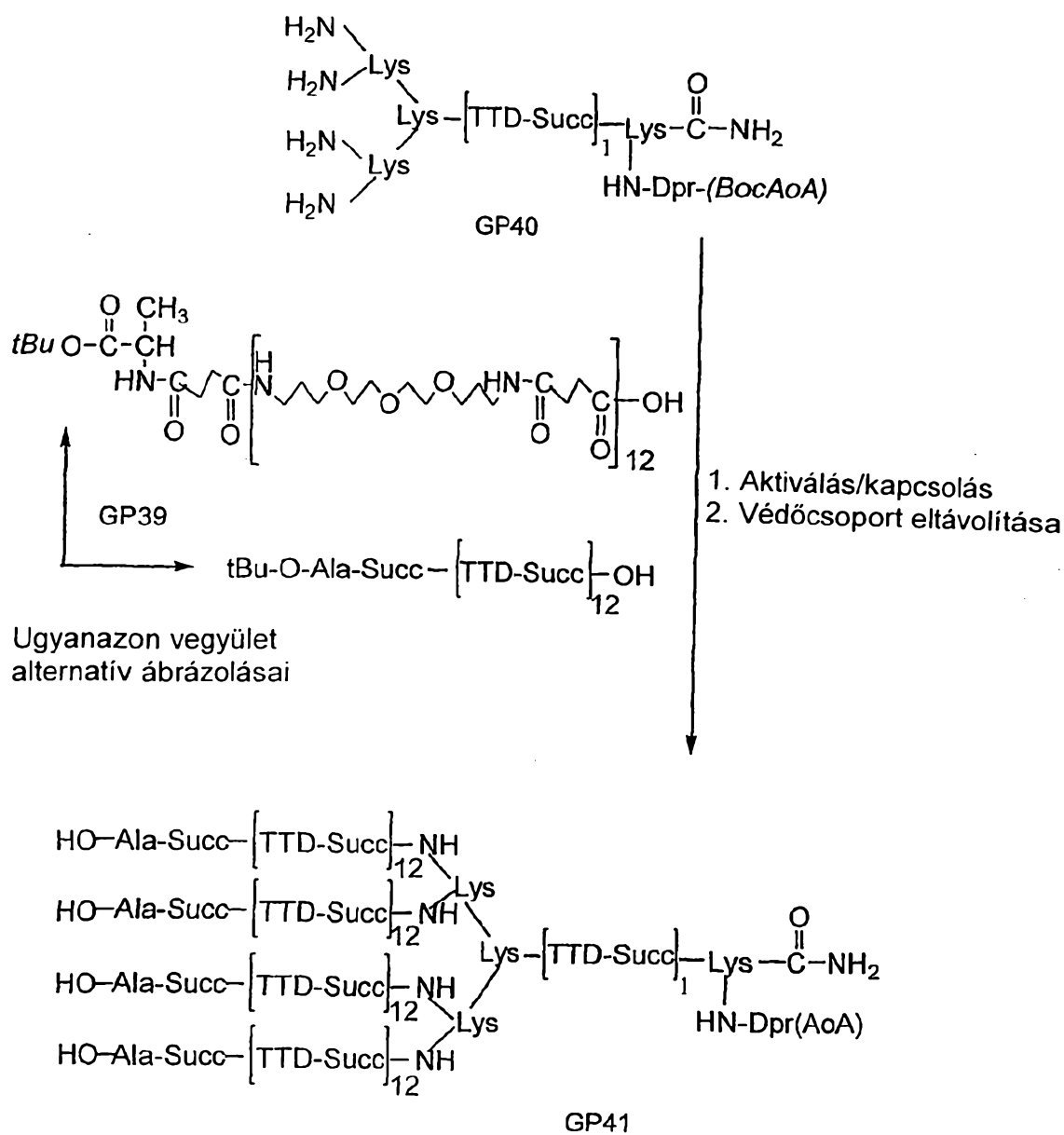


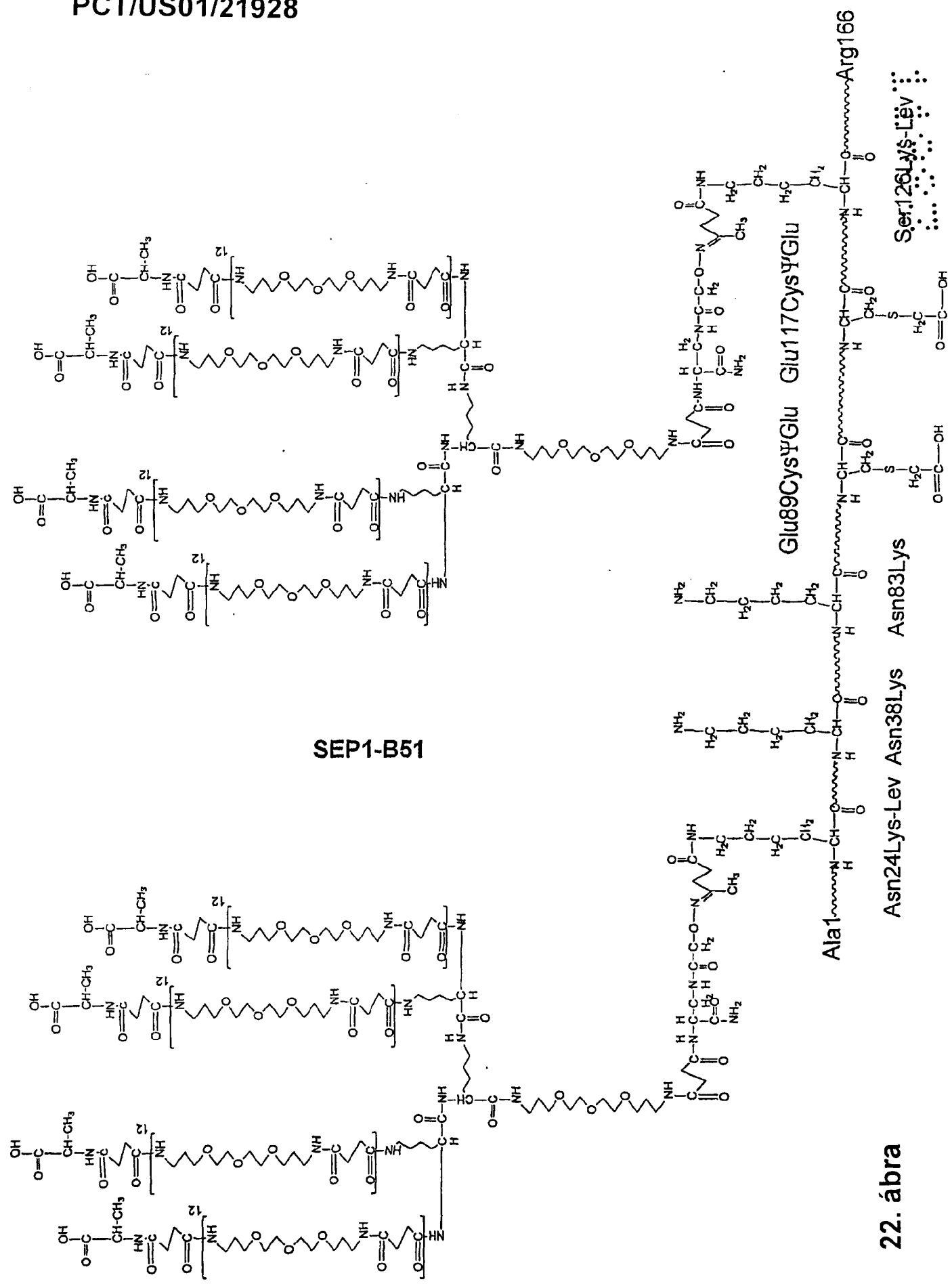
Ugyanazon vegyület
alternatív ábrázolásai



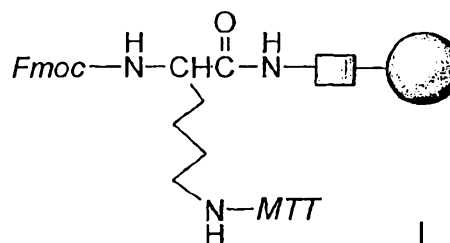
GP40

21A ábra

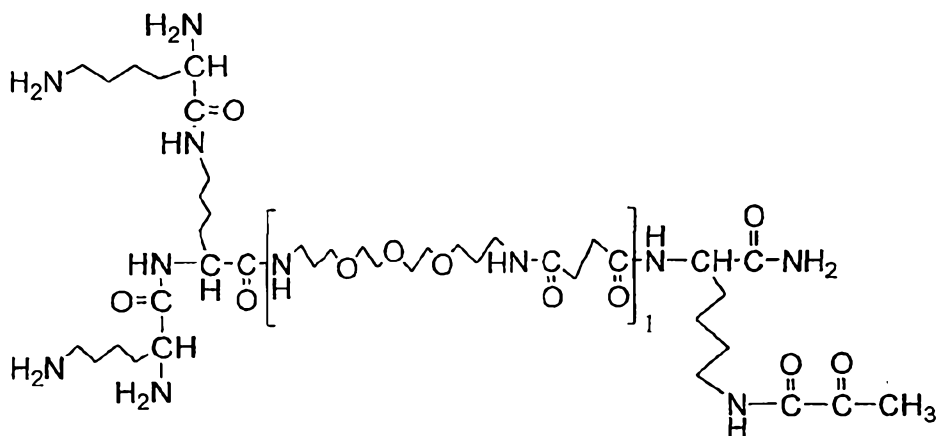




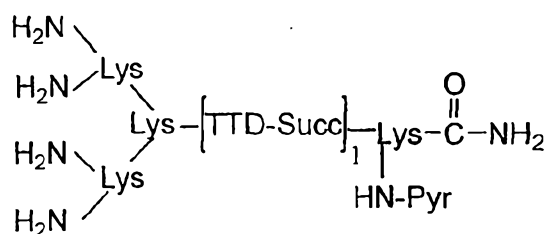
SEP1-B51



1. Fmoc-védőcsoport eltávolítása
2. TTD-Succ kapcsolókomponens szintézise
3. Boc-Lys elágazási mag szintézise/ kialakítása
4. MTT-védőcsoport eltávolítása
5. Piruvát kapcsolása
6. Hasítás/Boc-védőcsoport eltávolítása

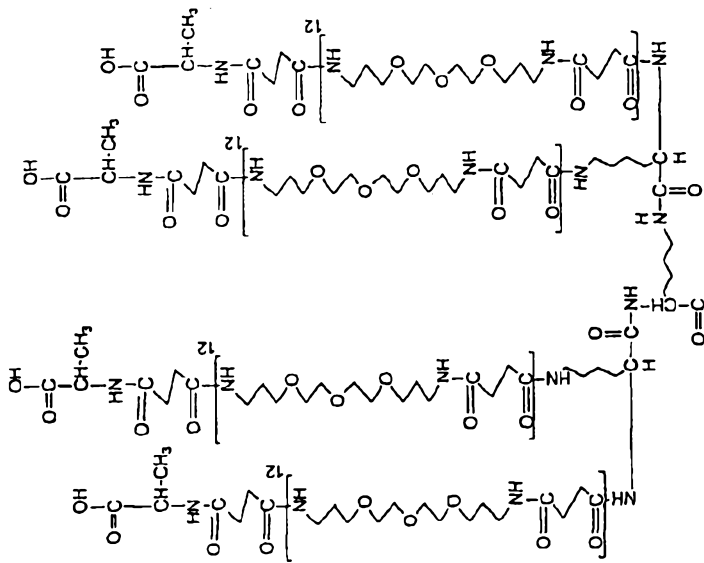


Ugyanazon vegyület
alternatív ábrázolásai

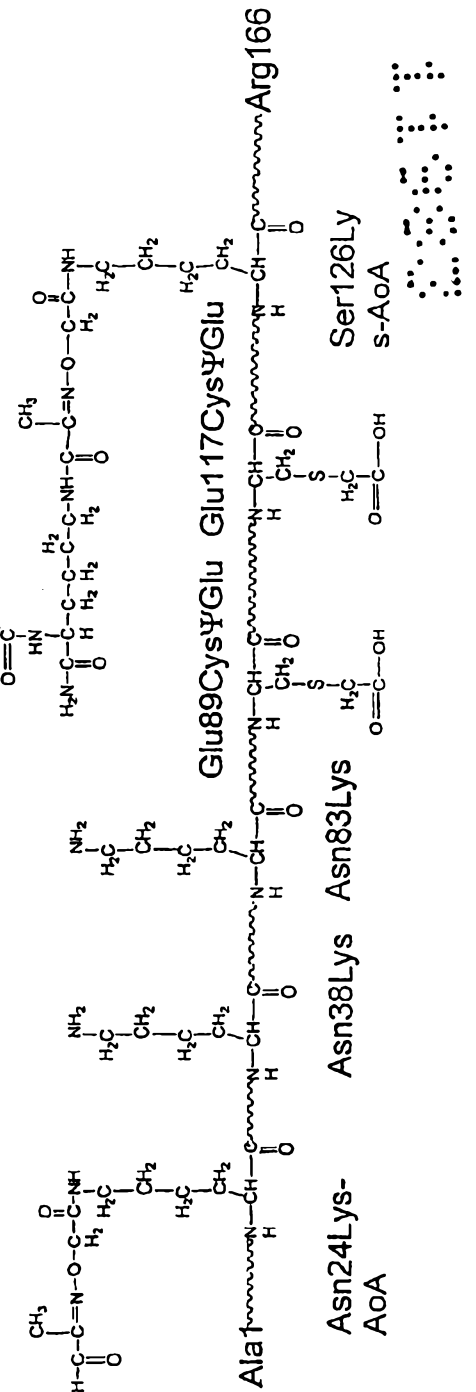
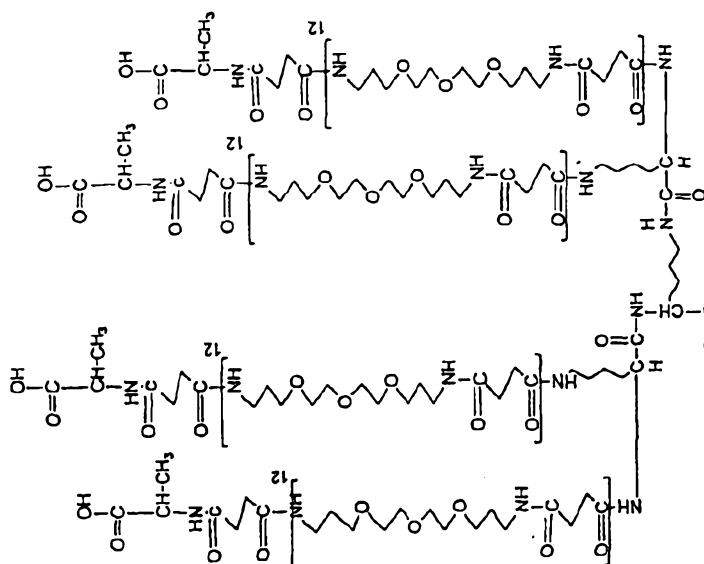


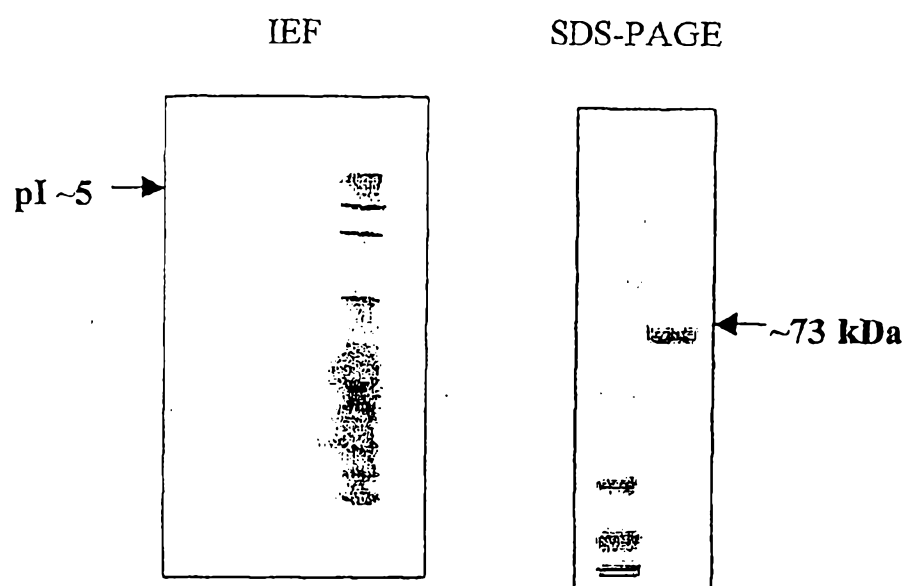
GP42

23A ábra

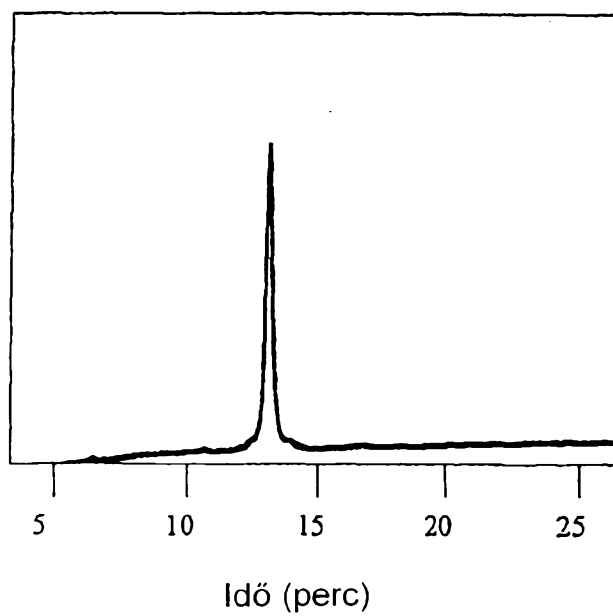


SEP1-B52

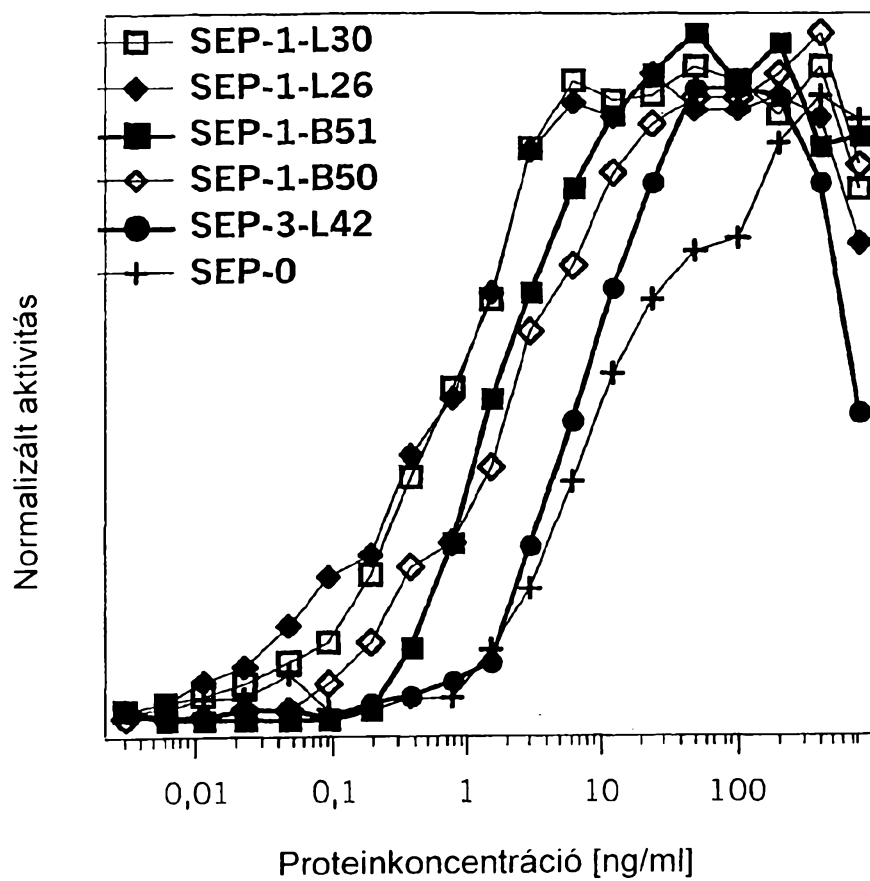




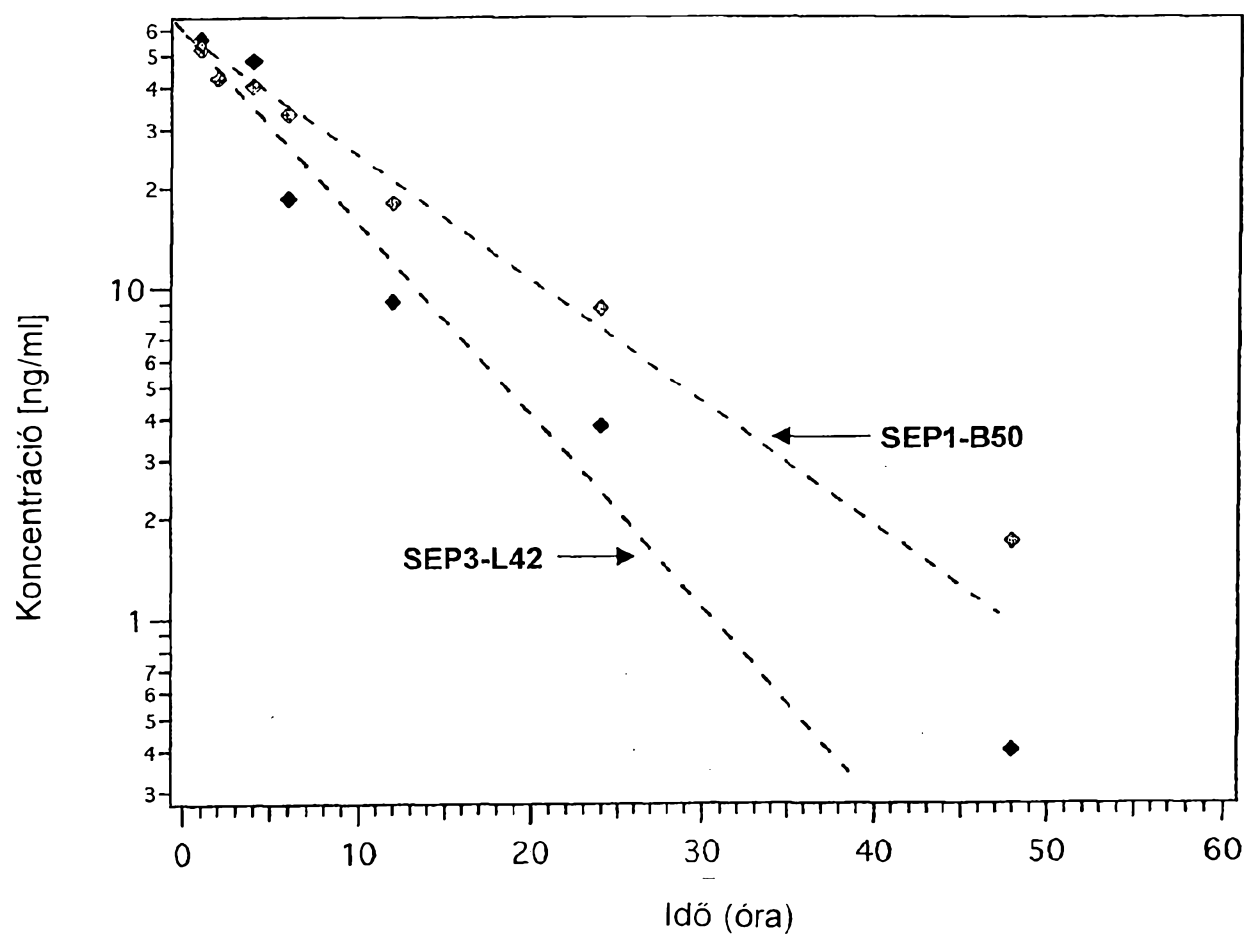
RP-HPLC



25. ábra



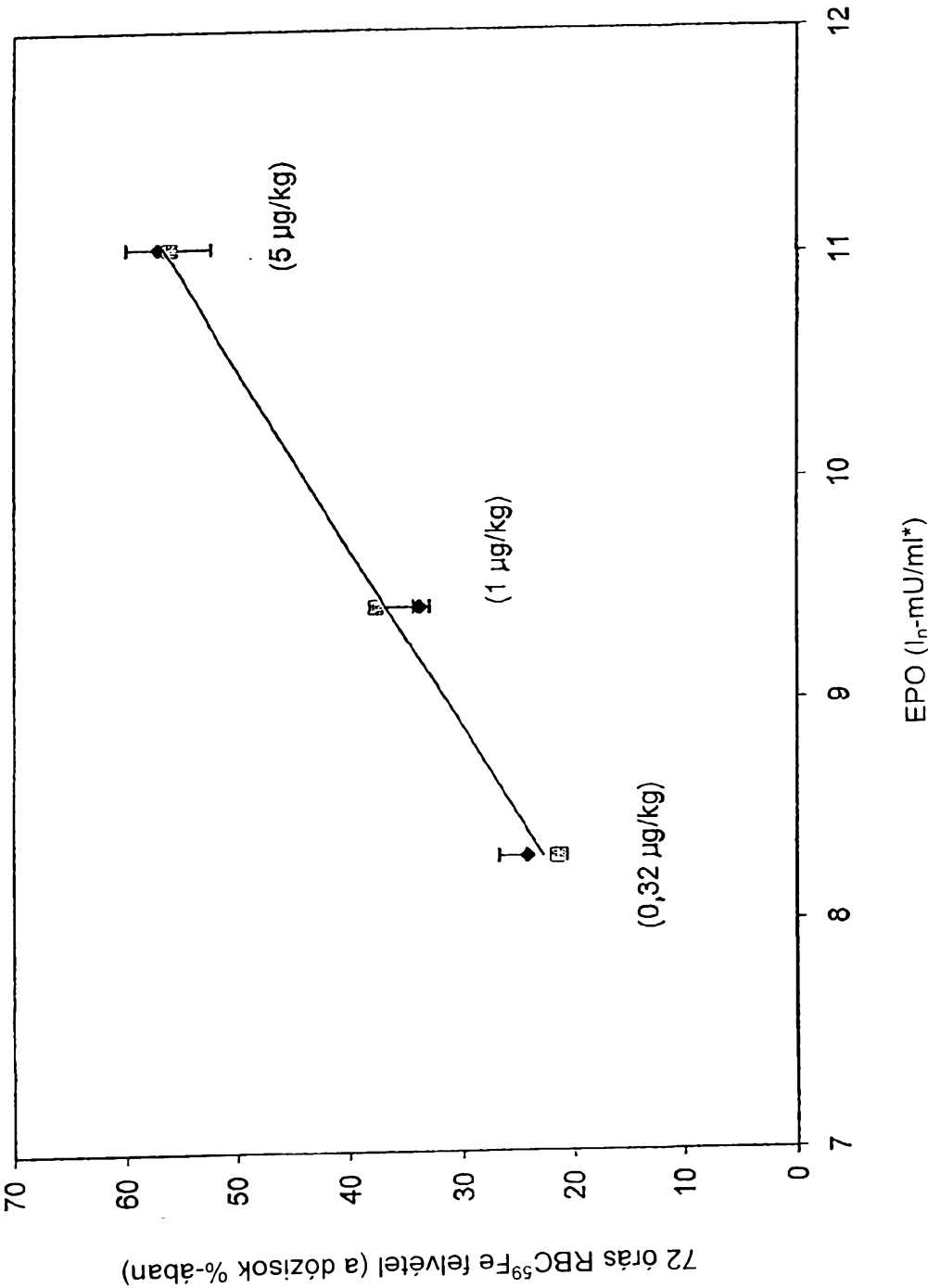
26. ábra



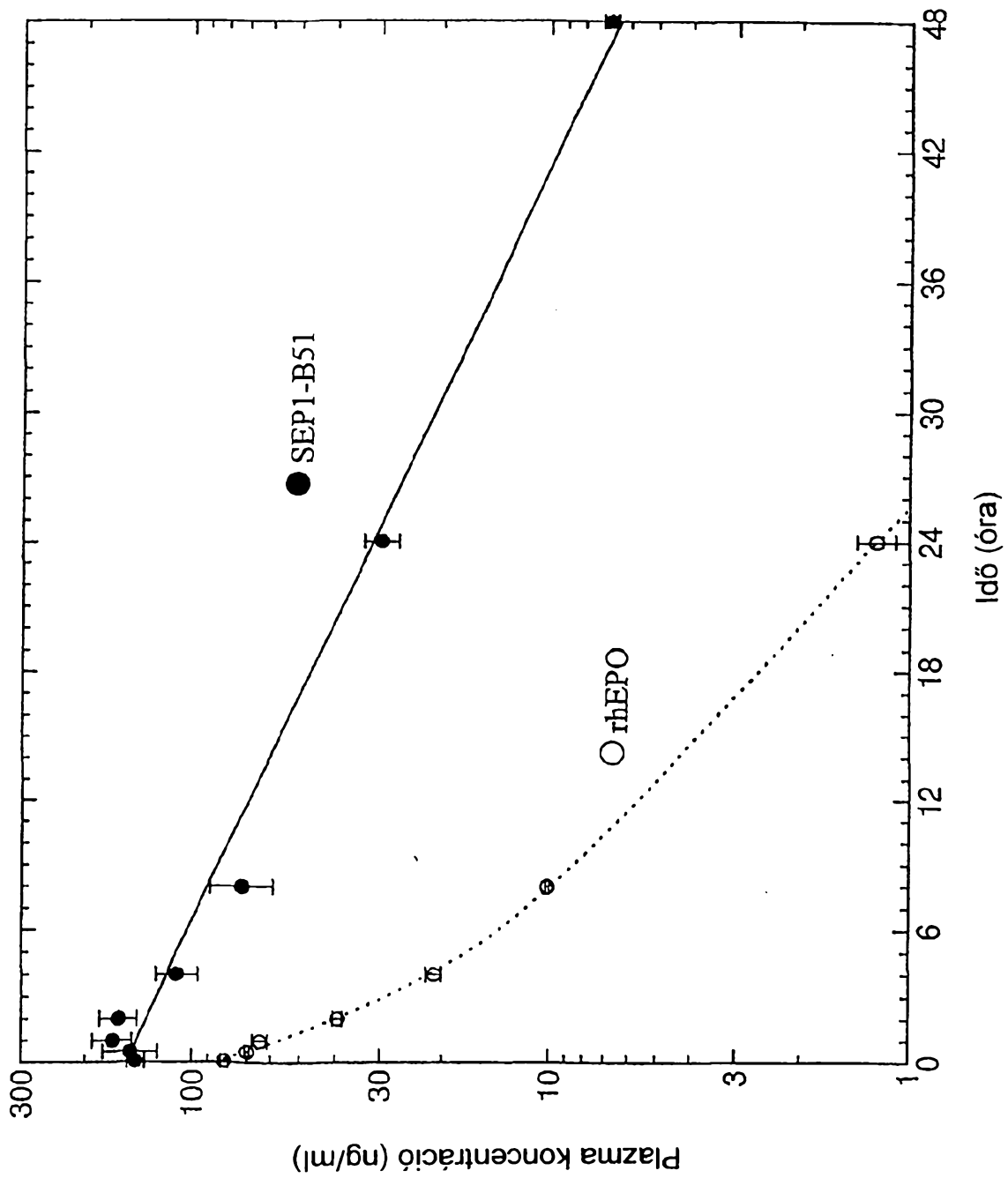
27. ábra

11981

08313



28. ábra



29. ábra

30314