

(19)



Octrooiencentrum
Nederland

(11) 1031067

(12) C OCTROOI²⁰

(21) Aanvraag om octrooi: 1031067

(51) Int.Cl.:
C07K14/575 (2006.01) A61K38/22 (2006.01)
A61K47/48 (2006.01)

(22) Ingediend: 03.02.2006

(30) Voorrang:
04.02.2005 US 60/650366
04.11.2005 US 60/733656

(41) Ingeschreven:
07.08.2006 I.E. 2006/10

(47) Dagtekening:
13.03.2007

(45) Uitgegeven:
01.05.2007 I.E. 2007/05

(73) Octrooihouder(s):
Pfizer Products Inc. te Groton, Connecticut,
Verenigde Staten van Amerika (US).

(72) Uitvinder(s):
Rory Francis Finn te Chesterfield, Missouri
(US).
Ned Roger Siegel te Chesterfield, Missouri
(US).
Neena Lynne Summers te St. Charles,
Missouri (US).
Nancy Ann Nardone te Groton, Connecticut
(US).

(74) Gemachtigde:
Mr. G.L. Kooy c.s. te 2514 BB Den Haag.

(54) PYY-agonisten en toepassingen daarvan.

(57) De onderhavige uitvinding voorziet in PYY₃₋₃₆-varianten en gepegyleerde derivaten daarvan en preparaten en werkwijzen die bruikbaar zijn bij de behandeling van aandoeningen die worden gemoduleerd door een agonist van de NPY Y2-receptor. De uitvinding voorziet verder in een polynucleotide dat codeert voor de PYY₃₋₃₆-varianten. Ook voorziet de uitvinding in een monoklonaal antilichaam dat specifiek bindt aan de PYY₃₋₃₆-varianten.

NL C 1031067

De inhoud van dit octrooi wijkt af van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en). De oorspronkelijk ingediende stukken kunnen bij het Octrooiencentrum Nederland worden ingezien. Octrooiencentrum Nederland is het Bureau voor de Industriële Eigendom, een agentschap van het ministerie van Economische Zaken

PYY-AGONISTEN EN TOEPASSINGEN DAARVAN

Terrein van de uitvinding

De onderhavige uitvinding betreft PYY-agonisten, meer in het bijzonder PYY₃₋₃₆-varianten en gepegyleerde derivaten van PYY₃₋₃₆ en PYY₃₋₃₆-varianten, preparaten die dergelijke agonisten bevatten, geïsoleerde nucleïnezuren die coderen voor dergelijke PYY-agonisten en het gebruik van dergelijke agonisten of preparaten bij de behandeling van obesitas en co-morbiditeiten daarvan, of het verminderen van de eetlust, de voedselopname of de calorie-opname van een zoogdier.

10

Achtergrond van de uitvinding

Obesitas is een belangrijk probleem voor de volksgezondheid doordat dit steeds meer voorkomt en risico's oplevert voor de gezondheid. Bovendien kan obesitas de levenskwaliteit van een persoon beïnvloeden door de beperkte mobiliteit en een verminderd fysiek uithoudingsvermogen en kan men discriminatie op sociaal en academisch terrein, alsmede op het werk ondervinden.

Obesitas en overgewicht worden in het algemeen gedefinieerd door middel van de lichaamsmassa-index (body mass index; BMI), die een correlatie kent met de totale hoeveelheid vet en dient als een maat voor het risico op bepaalde ziekten. BMI wordt berekend door het gewicht in kilogrammen te delen door de lengte in meters in het kwadraat (kg/m²). Overgewicht wordt in een typisch geval ge-

definieerd als een BMI van 25-29,9 kg/m², en obesitas wordt in een typisch geval gedefinieerd als een BMI van 30 kg/m² of meer. Zie bijv. National Heart, Lung and Blood Institute, Clinical Guidelines on the Identification,

- 5 Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults, The Evidence Report, Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, NIH publication no. 98-4083 (1998).

10 Bij recente studies is ontdekt dat obesitas en de daarmee gepaard gaande gevaren voor de gezondheid niet beperkt blijven tot volwassenen, maar eveneens kinderen en adolescenten treffen in een mate die verontrustend mag worden genoemd. Volgens het Center for Disease Control is het percentage kinderen en adolescenten waarvoor de defi-
15 nitie van overgewicht geldt meer dan verdubbeld sinds de vroege jaren zeventig en lijdt ongeveer 15% van de kinderen en adolescenten aan overgewicht. Risicofactoren voor hartziekte, zoals een hoog cholesterolgehalte en een hoge bloeddruk, komen vaker voor bij kinderen en adolescenten
20 wanneer wordt vergeleken met personen met een normaal gewicht van dezelfde leeftijd. Ook is type 2 diabetes, eerder als een ziekte van volwassenen beschouwd, dramatisch toegenomen bij kinderen en adolescenten. Overgewicht en obesitas kennen een nauw verband met type 2 diabetes. Een
25 recente schatting stelt dat adolescenten met overgewicht 70% kans hebben om te zware of obese volwassenen te worden. De kans stijgt tot ongeveer 80% indien ten minste een ouder overgewicht heeft of obees is. Het meest rechtstreekse gevolg van overgewicht is in de beleving van de
30 kinderen zelf de sociale uitsluiting.

Personen met overgewicht of obesitas lopen een groter risico op kwalen als hypertensie, dyslipidemie, type 2 (niet-insuline afhankelijke) diabetes, insulineresistentie, intolerantie voor glucose, hyperinsulinemie, coronai-
35 re hartziekte, angina pectoris, congestieve hartinsufficiëntie, beroerte, galstenen, cholecystitis, cholelithiasis, jicht, osteoartritis, obstructieve slaapapnoe en ademha-

lingsproblemen, ziekte van de galblaas, bepaalde vormen van kanker (bijv. van endometrium, borst, prostaat en colon) en psychologische stoornissen (zoals depressie, eetstoornissen, verstoord beeld van eigen lichaam en gering
5 gevoel van eigenwaarde). De negatieve gevolgen voor de gezondheid van obesitas maken dit in de Verenigde Staten tot de tweede doodsoorzaak die kan worden voorkomen en hebben een aanzienlijk economisch en psychosociaal effect op de maatschappij. Zie McGinnis M., Foege W.H., "Actual Causes
10 of Death in the United States," *JAMA*, 270:2207-12, 1993.

Obesitas wordt nu onderkend als een chronische ziekte die behandeling behoeft om de daarmee gepaard gaande gevaren voor de gezondheid te verminderen. Hoewel gewichtsverlies een belangrijk resultaat van de behandeling is, is
15 één van de voornaamste doelen van de beheersing van obesitas toch het verbeteren van de cardiovasculaire en metaboolische waarden, hetgeen de morbiditeit en mortaliteit met betrekking tot obesitas vermindert. Men heeft aangetoond dat 5-10% vermindering van het lichaamsgewicht de metaboolische waarden, zoals het glucosegehalte in het bloed, de
20 bloeddruk en de lipideconcentraties, aanzienlijk kan verbeteren. Derhalve wordt aangenomen dat een vermindering van 5-10% van het lichaamsgewicht de morbiditeit en mortaliteit kan verlagen.

25 De tegenwoordig beschikbare geneesmiddelen die worden voorgeschreven voor het beheersen van obesitas verminderen in het algemeen het gewicht door de absorptie van vetten uit de voeding te verlagen, zoals bij orlistat, of door het creëren van een energietekort door de voedselopname te
30 verminderen en/of het energieverbruik te verhogen, zoals wordt waargenomen bij sibutramine. De zoektocht naar alternatieven voor de tegenwoordig beschikbare middelen tegen obesitas verloopt langs diverse routes. Eén ervan heeft zich gericht op bepaalde peptiden uit de darmen die
35 in verband zijn gebracht met het moduleren van een gevoel van verzadiging, zoals peptide YY (PYY).

PYY is een lid van een familie van hormonen die bestaan uit polypeptiden uit de pancreas (PP) (tezamen met PP en neuropeptide Y (NPY)). Zoals bij de andere leden van de familie is PYY een aan het C-uiteinde geamideerd peptide dat bestaat uit 36 aminozuren. Het is een endocrien peptide uit de darmen dat aanvankelijk werd geïsoleerd uit varkensdarm (Tatemoto en Mutt, *Nature*, 285:417-418, 1980) en later werd gerapporteerd dat het de opname van voedsel met een hoog vetgehalte bij ratten na perifere toediening verminderde (Okada et al., *Endocrinology Supplement*, 180, 1993) en dat het bij muizen na perifere toediening gewichtsverlies veroorzaakte (Morley en Flood, *Life Sciences*, 41:2157-2165, 1987). Bekend is dat verscheidene opgeslagen en in circulatie zijnde moleculaire vormen van PYY bestaan (Chen et al., *Gastroenterology*, 87:1332-1338, 1984; en Roddy et al., *Regul. Pept.*, 18:201-212, 1987). Een dergelijke vorm, PYY₃₋₃₆, werd geïsoleerd uit extracten van de slijmvliezen van de menselijke colon (Eberlein et al., *Peptides*, 10:797-803, 1989) en bleek de overheersende vorm van PYY in humaan postprandiaal plasma te zijn (Grandt et al., *Regul. Pept.*, 51:151-159, 1994). Van PYY₃₋₃₆ is gerapporteerd dat het een selectieve agonist met grote affiniteit voor de NPY Y2-receptor (Y2R) is (Keire et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279:G126-G131, 2000). Er is beschreven dat de perifere toediening van PYY₃₋₃₆ de hoeveelheid opgenomen voedsel en gewichtsvermeerdering in ratten aanzienlijk verminderde, de eetlust en de hoeveelheid opgenomen voedsel bij mensen aanzienlijk deed afnemen en ook de hoeveelheid opgenomen voedsel bij muizen verlaagde, maar niet bij zgn. Y2R-null-muizen, hetgeen deed vermoeden dat voor het effect op de opgenomen hoeveelheid voedsel het Y2R nodig is. Bij studies op mensen werd van een infuus van PYY₃₋₃₆ gevonden dat het de eetlust duidelijk deed afnemen en de hoeveelheid opgenomen voedsel in 24 uur met 33% verminderde. Een infuus van PYY₃₋₃₆, zodat de normale postprandiale in circulatie zijnde concentraties van het peptide werden bereikt,

had binnen 15 minuten piekgehalten van PYY₃₋₃₆ in het serum tot gevolg, waarna binnen 30 minuten een snelle afname tot basaalwaarden volgde. Bovendien werd genoemd dat er een duidelijke remming van de hoeveelheid opgenomen voedsel was in de periode van 12 uur die op het infuus met PYY₃₋₃₆ volgde, maar dat er in wezen geen effect was met betrekking tot de hoeveelheid opgenomen voedsel in de periode tussen 12 uur en 24 uur daarna. Bij een studie op ratten verminderde een herhaalde toediening van PYY₃₋₃₆ (IP injecties tweemaal daags gedurende 7 dagen) de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel (Batterham, et al., *Nature*, 418-650:654, 2002).

Geneesmiddelen op basis van polypeptiden zijn vaak covalent gebonden aan polymeren zoals polyethyleenglycolen zodat hun halfwaardetijd *in vivo* wordt verlengd. Dit leidt echter vaak ook tot een drastisch verlies van biologische of farmacologische activiteit (Shechter et al., *FEBS Letters*, 579:2439-2444, 2005; Fuerteges en Abuchowski, *J. Control Release*, 11:139-148, 1990; Katre, *Adv. Drug Del. Sys.*, 10:91-114, 1993; Bailon en Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today*, 1:352-356, 1996; Nucci et al., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 6, 1991; Delgado et al., *Critical Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 9:249-304, 1992; Fung et al., *Polym. Preprints*, 38:565-566, 1997; Reddy, *Ann. Pharmacother.*, 34:915-923, 2000; Veronese, *Biomaterials*, 22:405-417, 2001). Shechter et al., hierboven, rapporteerde bijvoorbeeld dat de pegylering met 40 kD van PYY₃₋₃₆ met standaardchemie door middel van de vorming van een stabiele binding (40 kD PEG-PYY₃₋₃₆) leidde tot de volledige inactivering van de voedselopname bij studies met muizen (s.c. injectie). Ook maakten ze melding van het feit dat de reversibele pegylering van PYY₃₋₃₆ (40 kD PEG-FMS-PYY₃₋₃₆) een achtvoudige stijging van de functionele halfwaardetijd tot gevolg had (24 uur vs. 3 uur). Zie eveneens PCT octrooi-aanvraag no. WO 2004/089279 en WO 03/026591.

Samenvatting van de uitvinding

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op PYY-agonisten die varianten van PYY₃₋₃₆ zijn.

Volgens een aspect van de onderhavige uitvinding is de PYY-agonist een variant van PYY₃₋₃₆ van zoogdieren waarin rest 10 (glutaminezuur) of rest 11 (asparaginezuur) is vervangen door een aminozuur "X" dat wordt gekozen uit de groep die bestaat uit cysteïne, lysine, serine, threonine, tyrosine en niet-natuurlijke aminozuren, met een functie die kan worden geconjugeerd met een hydrofiel polymeer zoals polyethyleenglycol (PEG), bijv. een keto-, thiol-, hydroxyl-, carboxyl- of een vrije aminozuurfunctie, waarbij een dergelijke variant wordt aangeduid als respectievelijk (E10X)PYY₃₋₃₆ of (D11X)PYY₃₋₃₆.

De rest "X" is bij voorkeur cysteïne en de overeenkomstige varianten zijn derhalve (E10C)PYY₃₋₃₆ en (D11C)PYY₃₋₃₆.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding is de PYY-agonisten variant van humane PYY₃₋₃₆ (hPYY₃₋₃₆), honden-PYY₃₋₃₆, katten-PYY₃₋₃₆ of paarden-PYY₃₋₃₆, en liever hPYY₃₋₃₆.

In een voorkeursuitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding is de PYY-agonist het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆, met de aminozuursequentie IKPEAPGC_{DAS}PEELNRY_{YAS}LRHYLN_{LV}TRQRY-NH₂ [SEQ ID NO: 3], of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

In een andere voorkeursuitvoeringsvorm is de PYY-agonist het polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ dat de aminozuursequentie IKPEAPGEC_{AS}PEELNRY_{YAS}LRHYLN_{LV}TRQRY-NH₂ [SEQ ID NO: 4] heeft, of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

Liefst is de agonist (E10C)hPYY₃₋₃₆.

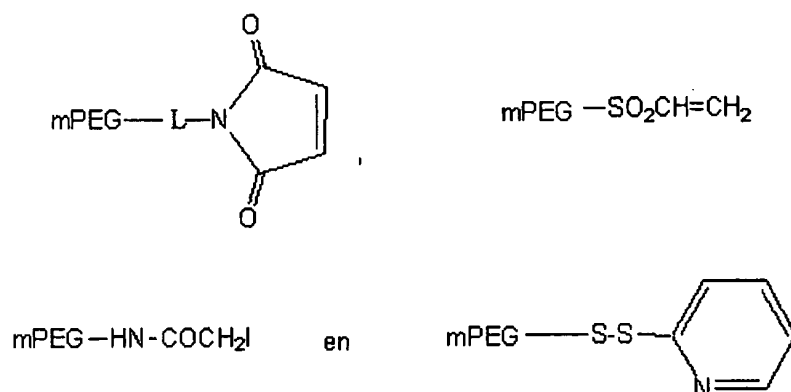
De PYY-agonist van de onderhavige uitvinding is bij voorkeur geconjugeerd met een hydrofiel polymeer, bij voorkeur een PEG. De agonist is bij voorkeur mono-gepegyleerd, dat wil zeggen dat de verhouding van agonist tot PEG ongeveer 1:1 is, en deze is gebonden aan de functie die kan worden geconjugeerd, zoals een keto-, thiol-, hy-

droxyl-, carboxyl- of een vrije aminozuurfunctie, van "X" in (E10X)PYY₃₋₃₆ en (D11X)PYY₃₋₃₆. De PEG kan lineair, vertakt of hangend zijn, liever is deze lineair of vertakt, en liefst is deze lineair.

5 In lineaire PEG's is een uiteinde van de PEG voorzien van een stopgroep die inert is onder de omstandigheden van het koppelen van de PEG aan de agonist, bijv. een ethergroep, bij voorkeur een methoxygroep. PEG's die op deze wijze zijn voorzien van een stopgroep (een methoxygroep)
 10 worden gewoonlijk aangeduid als mPEG's. Het andere uiteinde wordt geactiveerd voor koppeling met de PYY-agonist. Evenzo zijn met vertakte PEG's die bruikbaar zijn in de onderhavige uitvinding alle uiteinden, op een na, voorzien van een ether-stopgroep, en wordt het niet van een ethergroep
 15 als stopgroep voorziene uiteinde geactiveerd voor koppeling. In een uitvoeringsvorm is het niet van een ethergroep als stopgroep voorziene uiteinde van de PEG voorzien van een linkerrest ("L") die de PEG verbindt met een functionele groep die kan reageren met de conjugeerbare
 20 re functie van het aminozuur X in (E10X)PYY₃₋₃₆ of (D11X)PYY₃₋₃₆, hetgeen een conjugaat produceert waarin de PEG covalent gebonden is aan de conjugeerbare functie van X. In een andere uitvoeringsvorm is de PEG rechtstreeks gebonden aan de reactieve groep, zonder dat een linkerrest
 25 is opgenomen. Dergelijke PEG's worden vaak PEG's "zonder linker" genoemd.

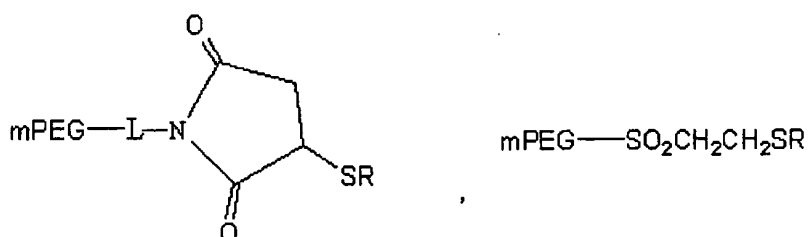
Voor de (E10C)PYY₃₋₃₆- en (D11C)PYY₃₋₃₆-polypeptiden is het niet van een ethergroep als stopgroep voorziene uiteinde van de PEG bij voorkeur gebonden aan een tussengroep
 30 die de PEG verbindt met een maleïmide of een andere groep die zal reageren met de thiol van de cysteïnerest, hetgeen een conjugaat produceert waarin de PEG covalent gebonden is aan de thiolgroep van cysteïne.

Geschikte reactieve PEG's voor gebruik met
 35 (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)PYY₃₋₃₆ omvatten PEG's die voldoen aan de formules



Bij voorkeur is de PEG het hierboven afgebeelde mPEG-maleïmide dat een linkerrest-L- bevat. PEG-maleïmiden zonder tussengroep zijn ook geschikt voor gebruik in de onderhavige uitvinding, in het bijzonder met (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)PYY₃₋₃₆. Dergelijke PEG-maleïmiden zonder tussengroep kunnen worden bereid als beschreven door Goodson en Katre, *Bio/Technology*, 8:343-346, 1990.

De conjugaten die worden geproduceerd uit de koppeling van de (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)PYY₃₋₃₆-polypeptiden met de hierboven getoonde mPEG's worden afgebeeld in de volgende formules, waarin -SR het (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)PYY₃₋₃₆-polypeptide is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is:

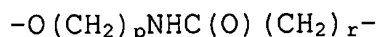


De linker -L- dient louter voor het verbinden van de PEG met de reactieve functionele groep en is derhalve niet onderhevig aan bijzondere beperkingen, maar omvat, bij voorkeur, een alkyleengroep die een esterbinding, een

urethaanbinding, een amidebinding, een etherbinding, een carbonaatbinding of een secundaire aminogroep bevat.

In een voorkeursuitvoeringsvorm voor met name lineaire PEG's is de linker een groep die voldoet aan de formule

5

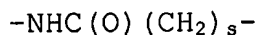


waarin p een geheel getal van 1 tot 6, bij voorkeur 1 tot 3, liever 2 of 3 en liefst 3 is, en r een geheel getal van 1 tot 6, bij voorkeur 1 tot 3, liever 2 of 3 en liefst 2 is.

Een linker die de voorkeur heeft, is de groep $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2-$.

In een andere voorkeursuitvoeringsvorm voor met name vertakte PEG's is de linker een groep die voldoet aan de formule

15



waarin s een geheel getal van 1 tot 6, bij voorkeur 1 tot 3, liever 2 of 3 en liefst 2 is.

Een linker die de voorkeur heeft, is de groep $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

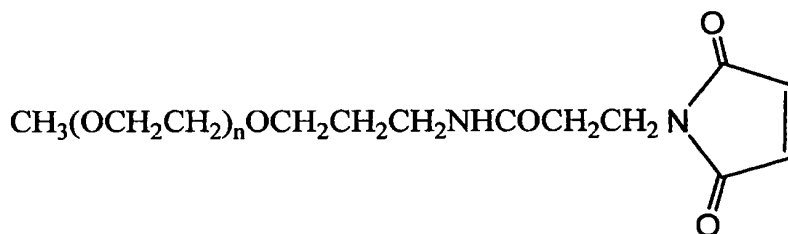
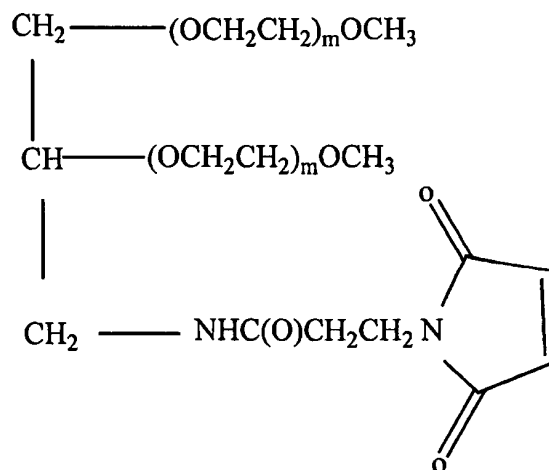
De PEG kan al of niet lineair zijn, bijvoorbeeld vertakt of hangend. Bij voorkeur is de PEG lineair of vertakt, bij voorkeur een lineair of vertakt mPEG-maleïmide. Een glycerol-vertakt mPEG-maleïmide is een vertakte PEG die de voorkeur heeft. Bij voorkeur is de PEG een lineair mPEG-maleïmide. De PEG dient een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht in het traject van ongeveer 1 kD tot ongeveer 50 kD te hebben. Bij voorkeur ligt het gemiddelde molecuulgewicht in het traject van ongeveer 5 kD tot ongeveer 45 kD; liever van ongeveer 10-12 kD tot ongeveer 40-45 kD, of ongeveer 20 kD tot ongeveer 40-45 kD. Van bijzonder belang is een lineaire mPEG, zoals wordt getoond in formule 1, met een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van ongeveer 20 tot ongeveer 30 kD. De glycerol-vertakte mPEG met for-

30

35

mule 2 is eveneens van belang en heeft bij voorkeur een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van ongeveer 20 kD of ongeveer 43 kD.

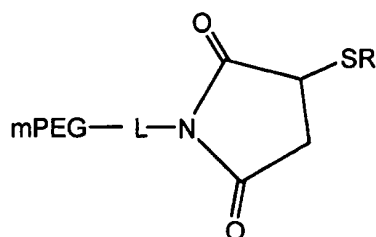
PEG's die de voorkeur hebben en geschikt geactiveerd zijn voor conjugatie met de thiolgroep van cysteïne van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)PYY₃₋₃₆ zijn de verbindingen met de formules 1 en 2. In de lineaire mPEG met de formule 1 is n een geheel getal in het traject van ongeveer 175 tot 800; bij voorkeur ongeveer 375 tot 525 of ongeveer 600 tot 750, of ongeveer 425 tot 475, of ongeveer 650 tot 700, of ongeveer 437 tot 463 of 675 tot 700. In de glycerol-vertakte mPEG met formule 2 is elke m ongeveer dezelfde en is deze een geheel getal in het traject van ongeveer 150 tot 500; bij voorkeur ongeveer 160 tot 285 of ongeveer 400 tot 525, of ongeveer 200 tot 250 of 450 tot 500.

12

Een grote verscheidenheid van PEG's, die geschikt ge-
activeerd zijn voor conjugatie met doelfunctionaliteiten
in de zijketen van aminozuren in peptiden, bijv. keto-,
thiol-, hydroxyl-, carboxyl- of vrije aminozuurfuncties,
5 zijn commercieel verkrijgbaar bij een aantal leveranciers,
bijvoorbeeld van NOF Corporation, Tokio, Japan of Nektar
Therapeutics Corporation, Huntsville, AL, VS.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding heeft
betrekking op conjugaten van de onderhavige PYY₃₋₃₆-va-
10 rianten en polyethyleenglycol.

In een uitvoeringsvorm is het conjugaat een verbin-
ding met de formule 3

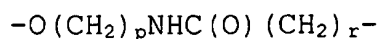


15

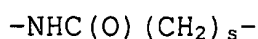
3

waarin de mPEG-rest lineair of vertakt is en een gewichts-
gemiddeld molecuulgewicht in het traject van ongeveer 1 kD
tot 50 kD, en bij voorkeur van 5 kD tot ongeveer 45 kD, en
20 liever van ongeveer 10 kD of ongeveer 12 kD tot ongeveer
40 of 45 kD, of van ongeveer 20 kD tot ongeveer 40 kD of
45 kD heeft,
L een groep is met de formule

25



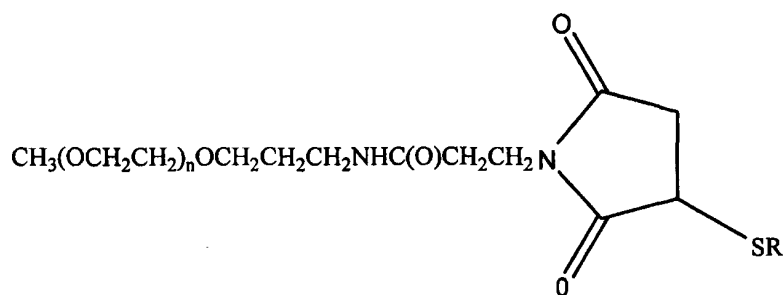
waarin p een geheel getal van 1 tot 6, bij voorkeur 1 tot
3, liever 2 of 3 en liefst 3 is (zoals afgebeeld in de on-
derstaande formule 4) en r een geheel getal van 1 tot 6,
30 bij voorkeur 1 tot 3, liever 2 of 3 en liefst 2 is,
of L een groep is met de formule



waarin s een geheel getal van 1 tot 6, bij voorkeur 1 tot 3, liever 2 of 3 en liefst 2 is, en
 -SR het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ is,
 5 waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is.

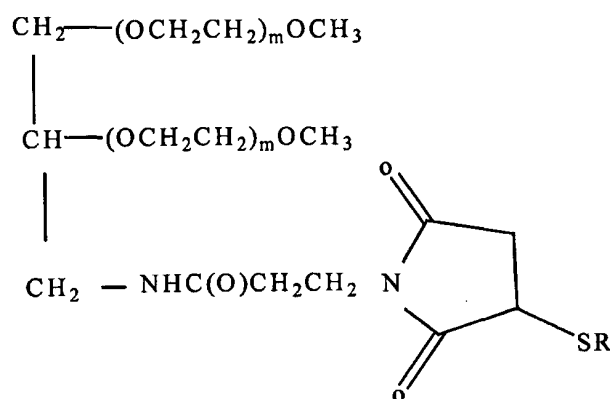
Een voorkeursuitvoeringsvorm van de onderhavige uitvinding is het lineaire conjugaat van de mPEG-PYY₃₋₃₆-variant met de formule 4

10

4

waarin n een geheel getal in het traject van ongeveer 175
 15 tot 800, en bij voorkeur ongeveer 375 tot 525 of ongeveer 600 tot 750, of ongeveer 427 tot 463, of ongeveer 675 tot 700 is, en -SR het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is, of een farmaceutisch aanvaardbaar
 20 zout daarvan. Bij voorkeur heeft de (CH₂CH₂O)_n-rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van ongeveer 20 kD of 30 kD. Het conjugaat waarin -SR het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, is van bijzonder belang.

Een ander aspect van de onderhavige uitvinding heeft
 25 betrekking op conjugaten waarin de PEG-rest vertakt is. Voorkeursconjugaten in deze categorie omvatten een glycerol-vertakte PEG-rest. Van bijzonder belang is het conjugaat met de formule 5

5

waarin elke m ongeveer dezelfde is en een geheel getal in
 het traject van ongeveer 150 tot 550, bij voorkeur onge-
 5 veer 160 tot 285 of ongeveer 400 tot 525, of ongeveer 200
 tot 250 of ongeveer 450 tot 500 is, en -SR het
 (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide is, waarin S
 het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteine is, of een
 farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan. Bij voorkeur
 10 heeft elke $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ -rest een gewichtsgemiddeld molecuul-
 gewicht in het traject van ongeveer 9-11 kD of ongeveer
 20-22 kD. Bovendien is het gecombineerde gewichtsgemiddel-
 de molecuulgewicht van de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ -resten ongeveer 20 kD
 of ongeveer 43 kD. Het conjugaat waarin -SR het polypepti-
 15 de (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, is van bijzonder belang.

De onderhavige uitvinding voorziet ook in een mono-
 klonaal antilichaam dat specifiek bindt aan een polypepti-
 de dat de aminozuursequentie bevat als wordt getoond in
 SEQ ID NO: 3 of SEQ ID NO: 4. In een uitvoeringsvorm van
 20 dit aspect van de onderhavige uitvinding is het polypepti-
 de gepegyleerd op de cysteïnerest.

Bovendien voorziet de onderhavige uitvinding in po-
 lynucleotidesequenties die coderen voor de polypeptidese-
 quenties van de onderhavige uitvinding; bij voorkeur code-
 25 ren deze voor SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 4.

In een andere uitvoeringsvorm van de onderhavige uit-
 vinding wordt voorzien in een farmaceutisch preparaat dat
 een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding en een far-

maceutisch aanvaardbare drager omvat. In een andere uitvoeringsvorm bevat het preparaat eveneens ten minste een extra farmaceutisch middel, dat een middel kan zijn dat bruikbaar is bij de behandeling van de primaire indicatie voor het preparaat of een co-morbiditeit van de primaire indicatie. Het extra farmaceutische middel is bij voorkeur een middel tegen obesitas. Het preparaat bevat bij voorkeur een therapeutisch effectieve hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding of een therapeutisch effectieve hoeveelheid van een combinatie van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding en een extra farmaceutisch middel.

Ook wordt voorzien in een werkwijze voor het behandelen van een ziekte, aandoening of stoornis die wordt gemoduleerd door een Y2R-agonist bij zoogdieren, en deze omvat de perifere toediening aan een zoogdier dat aan een dergelijke behandeling behoefte heeft van een therapeutisch effectieve hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding. De PYY-agonist van de onderhavige uitvinding kan alleen of in combinatie worden gebruikt met ten minste een extra farmaceutisch middel dat bruikbaar is bij de behandeling van de ziekte, aandoening of stoornis of een co-morbiditeit van de ziekte, aandoening of stoornis. De ziekten, aandoeningen of stoornissen die worden gemoduleerd door een Y2R-agonist bij zoogdieren omvatten obesitas en het hebben van overgewicht. Co-morbiditeiten van dergelijke ziekten, aandoeningen of stoornissen zouden overigens waarschijnlijk worden verbeterd door behandeling van dergelijke ziekten, aandoeningen of stoornissen. Bovendien wordt voorzien in een werkwijze voor het behandelen van obesitas bij een zoogdier dat aan een dergelijke behandeling behoefte heeft, en deze omvat de perifere toediening aan het zoogdier van een therapeutisch effectieve hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding.

Ook wordt voorzien in een werkwijze voor het verminderen van het gewicht of het bevorderen van gewichtsver-

lies (met inbegrip van het voorkomen of het tegengaan van gewichtsvermeerdering) bij een zoogdier, en deze omvat de perifere toediening aan het zoogdier van een hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding die het gewicht beheerst of het gewicht vermindert.

Ook wordt voorzien in een werkwijze voor het vermindern van de hoeveelheid opgenomen voedsel bij een zoogdier, en deze omvat de perifere toediening aan het zoogdier van een hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding die de hoeveelheid opgenomen voedsel vermindert.

Ook wordt voorzien in een werkwijze voor het induceren van een gevoel van verzadiging bij een zoogdier, en deze omvat de perifere toediening aan het zoogdier van een hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding die een gevoel van verzadiging induceert.

Ook wordt voorzien in een werkwijze voor het vermindern van de hoeveelheid opgenomen calorieën bij een zoogdier, en deze omvat de perifere toediening aan het zoogdier van een hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding die de hoeveelheid opgenomen calorieën verlaagt. De PYY-agonist kan alleen of in combinatie worden toegediend met ten minste een extra farmaceutisch middel, bij voorkeur een middel tegen obesitas.

Bij elk van de hierin beschreven werkwijzen en in de aangehechte conclusies kan de PYY-agonist alleen of in combinatie worden toegediend met ten minste een extra farmaceutisch middel, bij voorkeur een middel tegen obesitas.

De onderhavige PYY-agonisten en preparaten die deze bevatten zijn ook bruikbaar bij de vervaardiging van een geneesmiddel voor de hierin genoemde farmaceutische toepassingen.

Definities en afkortingen

De frase "farmaceutisch aanvaardbaar" betekent dat de stof of het preparaat chemisch en/of toxicologisch verenigbaar dient te zijn met de andere bestanddelen die deel

uitmaken van een preparaat en/of met zoogdier dat daarmee wordt behandeld.

De term "PYY-agonist" heeft betrekking op elke verbinding die één of meer van de effecten veroorzaakt die worden uitgelokt door PYY, bij voorkeur PYY₃₋₃₆, *in vivo* of *in vitro*.

De frase "therapeutisch effectieve hoeveelheid" betekent een hoeveelheid van een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding die de hoeveelheid opgenomen calorieën vermindert, het lichaamsgewicht verlaagt en/of de hoeveelheid lichaamsvet verlaagt, ten opzichte van geschikte controlewaarden die voorafgaand aan de behandeling of in een met een vehiculum behandelde groep worden vastgesteld.

De term "zoogdier" betekent menselijke personen alsmede alle andere warmbloedige leden van het dierenrijk die in het bezit zijn van een homeostatisch mechanisme in de klasse Zoogdieren, bijv. gezelschapsdieren, dieren in dierentuinen en zoogdieren die tot voedsel dienen. Enkele voorbeelden van gezelschapsdieren zijn hondachtigen (bijv. honden), katachtigen (bijv. katten) en paarden; enkele voorbeelden van zoogdieren die tot voedsel dienen zijn varkens, rundvee, schapen en dergelijke. Bij voorkeur is het zoogdier een menselijke persoon of een gezelschapsdier. Liefst is het zoogdier een menselijke persoon, zowel mannelijk als vrouwelijk.

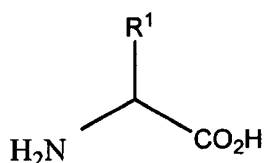
De termen "behandelen" of "behandeling" omvatten zowel de preventieve, dat wil zeggen profylactische, als palliatieve behandeling.

De term "perifere toediening" betekent toediening buiten het centrale zenuwstelsel. Perifere toediening omvat niet de rechtstreekse toediening aan de hersenen. Perifere toediening omvat, maar is niet beperkt tot, intravasculaire, intramusculaire, subcutane, orale, sublinguale, enterale, rectale, transdermale of intra-nasale toediening, of toediening door inhalatie.

Een niet in de natuur voorkomend aminozuur dat geschikt is voor gebruik in de onderhavige uitvinding is in

een typisch geval een aminozuur met de volgende formule,
 die afwijkt van de 20 in de natuur voorkomende aminozuren
 (Cantor en Shimmel, *Biophysical Chemistry*, deel 1, W.H.
 Freeman & Sons, San Francisco, VS, 42-43, 1980), waarin R¹
 5 een substituent is die een keto-, thiol-, carboxyl-, hy-
 droxyl- of een vrije aminozuurfunctie bevat, zoals die
 welke worden beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag no.
 2005/0208536, die hierin in zijn geheel is opgenomen door
 verwijzing.

10



Dergelijke niet in de natuur voorkomende aminozuren
 omvatten bijvoorbeeld thiotyrosine, ornithine, 3-mercap-
 15 tofenylalanine, 3- of 4-aminofenylalanine, 3- of 4-acetyl-
 fenylalanine, 2- of 3-hydroxyfenylalanine (*o*- of *m*-tyro-
 sine), hydroxymethylglycine, aminoethylglycine, 1-methyl-
 1-mercaptoethylglycine, aminoethylthioethylglycine en mer-
 captoethylglycine. Vele van de niet in de natuur voorko-
 20 mende aminozuren die bruikbaar zijn in de onderhavige uit-
 vinding zijn commercieel verkrijgbaar. Andere kunnen wor-
 den bereid met werkwijzen die stand der techniek zijn.
 Thiotyrosine kan bijvoorbeeld worden bereid door middel
 van de werkwijze die wordt beschreven door Lu et al. in *J.*
 25 *Am. Chem. Soc.*, 119:7173-7180, 1997, die hierin wordt op-
 genomen door referentie.

De uitdrukking "humaan PYY" of "hPYY" betekent een
 polypeptide van 36 aminozuren waarvan het C-uiteinde gea-
 mideerd is en de volgende aminozuursequentie heeft:

30 YPIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:1]

De term "hPYY₃₋₃₆" betekent het C-terminale 34-meer
 hPYY met de volgende aminozuursequentie:

IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:2]

De term "(E10C)hPYY₃₋₃₆" betekent het C-terminale 34-
 35 meer hPYY waarin de glutaminezuurrest 10 van hPYY is ver-

vangen door een cysteïnerest, en dat de volgende aminozuursequentie heeft:

IKPEAPGCDA SPEELN RYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3].

De uitdrukking "(D11C)hPYY₃₋₃₆" betekent het C-terminale 34-meer hPYY waarin de asparaginezuurrest 11 van hPYY is vervangen door een cysteïnerest en de volgende aminozuursequentie heeft:

IKPEAPGECASPEELN RYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4].

10 Korte beschrijving van de afbeeldingen

Fig. 1 is een omgekeerde fase-HPLC, waarbij het gezuiverde (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide wordt gevolgd over een Zorbax Eclipse XDB-C8-kolom.

Fig. 2 is een grootte-exclusie-HPLC, waarbij het reactiemengsel van het lineaire 30K mPEG-maleïmide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ wordt gevolgd over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 3 is een foto van SDS-PAGE van fracties uit de zuivering met SP Hitrap van het lineaire 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆. MW = molecuulgewichten van standaarden; L = opgebrachte hoeveelheid op kolom; FT = doorstroming; 4-23 = fracties van elutie.

Fig. 4 is een omgekeerde fase-HPLC waarbij het gezuiverde (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide wordt gevolgd over een Zorbax Eclipse XDB-C8-kolom.

Fig. 5 is een grootte-exclusie-HPLC, waarbij het reactiemengsel van het lineaire 30K mPEG-maleïmide plus (D11C)hPYY₃₋₃₆ wordt gevolgd over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 6 is een grootte-exclusie-HPLC die het elutieprofiel toont van het gezuiverde lineaire 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆-product over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 7 is een grootte-exclusie-HPLC die het elutieprofiel toont van het gezuiverde lineaire 30K mPEG-maleïmide (D11C)hPYY₃₋₃₆-product over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 8 is een grootte-exclusie-HPLC van het reactiemengsel van glycerol-vertakte 43K mPEG-maleïmide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 9 is een grootte-exclusie-HPLC die het elutieprofiel toont van het gezuiverde glycerol-vertakte 43K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆-product over een Shodex 804 SEC-kolom.

Fig. 10 is een grafiek van de remming van de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel bij muizen die voedsel is onthouden na intraperitoneale (IP) injectie.

Fig. 10A toont het effect van de dosis van oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ in vergelijking met de groep die vehiculum kreeg toegediend.

Fig. 10B toont het effect van de dosis van lineaire 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆.

Fig. 11 toont het effect op de hoeveelheid opgenomen voedsel bij I.P. injectie in muizen die voedsel werd onthouden van glycerol-vertakte 43K mPEG-maleïmide (E10C)PYY₃₋₃₆ in vergelijking met vehiculum en lineaire 30K mPEG maleïmide (E10C)PYY₃₋₃₆. Fig. 11A is een lijngrafiek die de respons gedurende 6 uur na injectie laat zien. Fig. 11B is een staafdiagram dat de effecten vergelijkt gedurende 24 uur na injectie.

Fig. 12 toont de effecten van I.P. injectie van vehiculum, PYY₃₋₃₆ en lineaire 30K mPEG-maleïmide-(E10C)PYY₃₋₃₆ op spontaan gevoede muizen. Fig. 12A toont het effect op de hoeveelheid opgenomen voedsel en fig. 12B toont het effect op het lichaamsgewicht.

Fig. 13 toont de effecten van subcutane (S.C.) injectie van vehiculum, PYY₃₋₃₆ en lineaire 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆ op spontaan gevoede muizen. Fig. 13A toont het effect op de hoeveelheid opgenomen voedsel, en fig. 13B toont het effect op het lichaamsgewicht.

Fig. 14 toont het in contact komen van plasma met PYY in muizen na I.P. injectie van 0,1 mg/kg. Fig. 14A demonstreert de niveaus van PYY in het plasma na injectie van

hPYY₃₋₃₆ en fig. 14B toont de niveaus van PYY in het plasma na injectie van lineaire 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆.

Fig. 15 is een grafiek van de respons tegen de concentratie voor PYY₃₋₃₆ of lineaire 30KmPEG-maleïmide-
 5 (E10C)PYY₃₋₃₆ uit de Scintillation Proximity Assay (SPA), waarbij de liganden concurreren met ¹²⁵I-PYY₁₋₃₆ voor de binding aan de Y2R die tot expressie wordt gebracht in KAN-TS-cellen.

Fig. 16 is een grafiek van de respons tegen de con-
 10 centratie voor PYY₃₋₃₆ of lineaire 30K mPEG-maleïmide- (E10C)PYY₃₋₃₆ uit de GTP-gamma[³⁵S]-binding-assay met Y2R die tot expressie wordt gebracht op KAN-TS-membranen.

Uitvoerige beschrijving van de uitvinding

15 De onderhavige uitvinding heeft betrekking op PYY-agonisten die varianten zijn van PYY₃₋₃₆ en gepegyleerde conjugaten daarvan, die ten minste een verbeterde chemische of fysiologische eigenschap kunnen hebben die wordt gekozen uit, maar niet beperkt is tot, lagere klarings-
 20 snelheid, langere verblijfsduur in het plasma, langere in vivo activiteit, hogere potentie, grotere stabiliteit, betere oplosbaarheid en lagere antigeniciteit.

Een PYY₃₋₃₆-variant van de onderhavige uitvinding die de voorkeur heeft, is (E10C)hPYY₃₋₃₆. Een andere voorkeurs-
 25 variant is (D11C)hPYY₃₋₃₆. Deze en andere varianten van de onderhavige uitvinding kunnen synthetisch worden geproduceerd en door middel van recombinatie, of op andere manieren, zoals hierna worden beschreven en in de voorbeelden hierin, of door middel van analoge werkwijzen.

30 Behalve de hierboven genoemde substituties (bijv. E10C en D11C) kunnen de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding ook één of meer conservatieve aminozuursubstituties op andere aminozuurposities omvatten. Conservatieve substituties kunnen bijvoorbeeld worden uitgevoerd volgens
 35 de onderstaande tabel. Alifatische niet-polaire, polaire-ongeladen en polaire-geladen aminozuren kunnen de vervanger voor een ander alifatisch aminozuur zijn dat respec-

5 tievelijk een niet-polair, polair-ongeladen of polair-geladen aminozuur is. Bij voorkeur treden dergelijke substituties op tussen aminozuren in dezelfde regel van de derde kolom van de onderstaande tabel. Conservatieve substituties van aminozuren kunnen ook worden gedaan tussen aromatische aminozuren die in de onderstaande tabel zijn vermeld.

ALIFATISCH	Niet-polair	GAP
		ILV
	Polair - ongeladen	CSTM
		NQ
	Polair - geladen	DE
		KR
AROMATISCH		HFY

10 Synthetische productie

De PYY₃₋₃₆-varianten van de onderhavige uitvinding, bijv. (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆, kunnen worden bereid met gebruik van standaardtechnieken voor peptidesynthese uit de stand der techniek, bijv. met vastefase-peptide-synthese uitgevoerd met een automatische peptidesynthesizer (bijv. model 433A; Applied Biosystems, Foster, CA, VS), waarbij chemie met t-Boc- of Fmoc-groepen wordt gebruikt. Een samenvatting van de vele technieken voor peptidesynthese die beschikbaar zijn kan worden aangetroffen in *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^e editie (Stewart, J.M. en Young, J.D., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, VS, 1984). Zie ook het boek *Solid-phase Organic Synthesis* (Burgess, K., John Wiley & Sons, New York, NY, VS, 2000) en het artikel van Engels et al., *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-34, 1989. Alle bovenstaande literatuurplaatsen zijn hierin opgenomen door verwijzing.

De PYY₃₋₃₆-varianten van de onderhavige uitvinding worden bij voorkeur geconjugeerd met een PEG. De conjugatiereacties, die pegyleringsreacties worden genoemd, werden in het verleden in oplossing uitgevoerd met een molaire

overmaat van polymeer en zonder rekening te houden met het feit waar het polymeer aan het eiwit zou kunnen binden. Dergelijke algemene technieken bleken echter in een typisch geval ontoereikend voor het conjugeren van biologische actieve eiwitten aan niet-antigene polymeren terwijl daarbij voldoende biologische activiteit behouden bleef. Een manier om na pegylering de biologische activiteit van PYY₃₋₃₆-agonistvariant te behouden is het bij de koppelingswerkwijze in aanzienlijke mate vermijden van de conjugatie van reactieve groepen van de variant die betrokken zijn bij de binding van de agonist aan de doelreceptor. Een aspect van de onderhavige uitvinding is het voorzien in een werkwijze voor het conjugeren van een polyethyleenglycol aan een PYY₃₋₃₆-variantagonist van de onderhavige uitvinding op specifieke reactieve plaatsen die nagenoeg niet storend werken op één of meer bindingsplaatsen van de receptor, zodat daarbij de activiteit in grote mate behouden blijft. Een ander aspect van de onderhavige uitvinding is de insertie van reactieve resten in PYY₃₋₃₆, hetgeen voorziet in de agonistvarianten daarvan voor conjugatie met een polyethyleenglycol met een beperkte verandering van de activiteit.

De chemische modificatie door een covalente binding kan worden uitgevoerd onder geschikte omstandigheden die in het algemeen worden gekozen bij een conjugatiereactie van een biologisch actieve stof met een geactiveerde PEG. De conjugatiereactie wordt onder relatief milde omstandigheden uitgevoerd, zodat inactivering van de PYY₃₋₃₆-variantagonist wordt vermeden. Milde omstandigheden omvatten het handhaven van de pH van de reactie-oplossing in een traject van ongeveer 3 tot 10 en de reactietemperaturen in het traject van ongeveer 0 tot 40°C. Functionaliteiten die geen doel zijn in de PYY₃₋₃₆-varianten en onder de omstandigheden voor pegylering reactief zijn voor de geactiveerde PEG worden bij voorkeur beschermd met een geschikte beschermende groep die na pegylering van de doel-functie kan worden verwijderd. Bij het pegyleren van vrije

aminogroepen met reagentia zoals PEG-aldehyden of PEG-succinimiden wordt in een typisch geval een pH in het traject van ongeveer 3 tot 10, en bij voorkeur van ongeveer 4 tot 7,5 gehandhaafd. De koppelingsreactie wordt bij voorkeur uitgevoerd in een geschikte buffer (pH = 3 tot 10), bijv. fosfaat, MES, citraat, acetaat, succinaat of HEPES, gedurende ongeveer 1 tot 48 uur bij een temperatuur in het traject van ongeveer 4 tot 40°C. Bij het pegyleren van thiolgroepen met reagentia zoals PEG-maleïmiden, PEG-vinylsulfonen of PEG-orthopyridyldisulfiden wordt bij voorkeur een pH in het traject van ongeveer 4 tot 8 gehandhaafd. PEG-aminen zijn bruikbaar bij de pegylering van ketogroepen, bijv. in p-acetylphenylalanine, en kunnen worden bereid als beschreven door Pillai et al., *J. Org. Chem.*, 15 45:5364-5370, 1980.

De conjugatiereacties van de onderhavige uitvinding voorzien in een typisch geval in een reactiemengsel of iets dergelijks dat het gewenste mono-gepegyleerde PYY₃₋₃₆-variant-, alsmede niet gereageerd hebbend PYY₃₋₃₆-variant-peptide, niet gereageerd hebbende PEG en doorgaans minder dan ongeveer 20% moleculen met een hoog molecuulgewicht bevat, en deze omvatten conjugaten die meer dan een PEG-streng bevatten en/of geaggregeerde moleculen. Nadat de niet gereageerd hebbende moleculen en moleculen met een hoog molecuulgewicht zijn verwijderd, worden preparaten verkregen die voornamelijk mono-gepegyleerde PYY₃₋₃₆-varianten bevatten. Met het gegeven dat de conjugaten vaak een enkele polymeerstreng bevatten zijn de conjugaten genoeg homogeen.

Het gewenste conjugaat van PEG-PYY₃₋₃₆-variant kan uit het reactiemengsel worden geïsoleerd door middel van gebruikelijke werkwijzen die in een typisch geval worden gebruikt voor de zuivering van eiwitten, zoals dialyse, uitzouten, ultrafiltratie, ionenwisselingschromatografie, hydrofobe interactie-chromatografie (HIC), gelchromatografie en elektroforese. Ionenwisselingschromatografie is met name effectief bij het verwijderen van niet gereageerd heb-

bende PEG of niet gereageerd hebbende PYY₃₋₃₆-variant. De scheiding van het gewenste conjugaat van de PEG-variant kan worden bewerkstelligd door het reactiemengsel dat de gemengde moleculen bevat in een bufferoplossing te brengen
5 met een pH van ongeveer 4 tot ongeveer 10, en bij voorkeur van minder dan 8, zodat deamidering wordt vermeden. De bufferoplossing bevat bij voorkeur één of meer bufferzouten die worden gekozen uit, maar niet beperkt zijn tot, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ en
10 CH₃CO₂Na.

Als het buffersysteem dat in de pegyleringsreactie wordt gebruikt verschilt van het bij de scheidingswerkwijze gebruikte, wordt het reactiemengsel van de pegylering onderworpen aan bufferuitwisseling/diafiltratie of verdund
15 met een voldoende hoeveelheid van het aanvankelijke scheidingsbuffer.

De fractionering van de conjugaten in een mengsel dat de gewenste moleculen bevat wordt bij voorkeur uitgevoerd met gebruik van een medium voor ionenwisselingschromatografie. Dergelijke media zijn in staat tot de selectieve
20 binding van conjugaten van PEG-PYY₃₋₃₆-variant door verschillen in lading die enigszins voorspelbaar zijn. De oppervlaktelading van een PYY₃₋₃₆-variant wordt bijvoorbeeld bepaald door het aantal beschikbare geladen groepen op het
25 oppervlak van het peptide die beschikbaar zijn voor interactie met de drager op de kolom die niet in contact zijn geweest met PEG. Deze geladen groepen dienen in een typisch geval als mogelijk bindingspunt van PEG-polymeren. Derhalve zullen de conjugaten van PEG-PYY₃₋₃₆-variant een
30 lading hebben die verschilt van andere aanwezige moleculen, hetgeen een selectieve isolering mogelijk maakt.

Voor zuivering van de onderhavige conjugaten van PEG-PYY₃₋₃₆-variant hebben ionenwisselaarharsen in het bijzonder de voorkeur. Kationwisselaarharsen zoals sulfopropylharsen worden bij de zuiveringswerkwijze van de onderhavige
35 uitvinding gebruikt. Een niet-beperkende opsomming van kationwisselaarharsen die geschikt zijn voor gebruik bij

de onderhavige uitvinding omvatten SP-hitrap®, SP Sepharose HP® en SP Sepharose® voor hoge stroomsnelheid. Andere geschikte kationwisselaarharsen, bijv. S-en CM-harsen, kunnen ook worden gebruikt.

5 Bij voorkeur wordt de kationwisselaarhars op gebruikelijke wijze in een kolom gepakt en geëquilibreerd. Een buffer met dezelfde pH en osmolaliteit als de oplossing van de met PEG geconjugeerde PYY₃₋₃₆-variant wordt gebruikt. De elutiebuffer bevat bij voorkeur één of meer
10 zouten gekozen uit, maar niet beperkt tot: CH₃CO₂Na, HEPES, KCl, NaCl, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, NaHCO₃, NaBO₄ en (NH₄)₂CO₃. De oplossing die het conjugaat bevat wordt vervolgens aan de kolom geadsorbeerd, waarbij niet gereageerd hebbende PEG en enkele moleculen met hoog molecuulgewicht
15 niet worden vastgehouden. Na afloop van het opbrengen wordt een gradiënt van een elutiebuffer met oplopende zoutconcentraties door de kolom gestuurd, waarbij de gewenste fractie van met PEG-geconjugeerde PYY₃₋₃₆-variant wordt geëluëerd. De geëluëerde en samengevoegde fracties
20 worden bij voorkeur na de scheidingstap met de kationenwisseling beperkt tot uniforme polymeerconjugaten. Een niet-geconjugeerde PYY₃₋₃₆-variant kan vervolgens door middel van gebruikelijke technieken van de kolom worden gewassen. Desgewenst kunnen bovendien mono- en meervoudig
25 gepegyleerde PYY₃₋₃₆-variantmoleculen en moleculen met een hoger molecuulgewicht van elkaar worden gescheiden via extra ionenwisselingschromatografie of grootte-exclusiechromatografie.

In plaats van een lineaire gradiënt kunnen technieken
30 worden gebruikt waarbij meervoudige isocratische stappen van toenemende concentratie worden gebruikt. Meervoudige isocratische elutiestappen van toenemende concentratie zullen leiden tot de opeenvolgende elutie van meervoudig gepegyleerde/geaggregeerde en vervolgens mono-gepegyleerde
35 PYY₃₋₃₆-variantconjugaten. Ook kunnen elutietechnieken op basis van pH-gradiënten worden gebruikt. Het temperatuurtraject voor elutie ligt in het algemeen tussen ongeveer

4°C en ongeveer 25°C. De elutie van de PEG-PYY₃₋₃₆-variant wordt gevolgd door UV-absorptie bij 280 nm. Verzameling van de fracties kan worden bereikt door eenvoudige elutieprofielen in de tijd.

5

Recombinant-expressie

Nucleïnezuurmoleculen

De nucleïnezuurmoleculen die coderen voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide kunnen een van de volgende nucleïnezuursequenties omvatten (de codonmutatie voor E10C-substitutie is onderstreept):

10

15

atcaaaccgaggctcccggctgtgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacg
cctccctgcgccactacctaacctggtcacccggcagcggtat (SEQ ID NO:
5)

20

atcaaaccgaggctcccggctgcgacgcctcgccggaggagctgaaccgctactacg
cctccctgcgccactacctaacctggtcacccggcagcggtat (SEQ ID NO:
6).

25

De nucleïnezuurmoleculen die coderen voor een (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide kunnen één van de volgende nucleïnezuursequenties omvatten (de codonmutatie voor D11C-substitutie is onderstreept):

30

atcaaaccgaggctcccggcgaatgtgcctcgccggaggagctgaaccgctactacg
cctccctgcgccactacctaacctggtcacccggcagcggtat (SEQ ID NO:
7) of

35

atcaaaccgaggctcccggcgaatgcgcctcgccggaggagctgaaccgctactacg
cctccctgcgccactacctaacctggtcacccggcagcggtat (SEQ ID NO:
8).

Deze sequenties kunnen ook een stopcodon bevatten (bijv. tga, taa, tag) op het C-uiteinde en op diverse wijzen gemakkelijk worden verkregen, waaronder, zonder beperking: chemische synthese, genetische mutatie van wild type

hPYY-polynucleotidesequenties verkregen uit cDNA of onderzoek van de genoombibliotheek, onderzoek van de expressiebibliotheek en/of amplificatie met de polymerasekettingreactie (PCR) van cDNA. Nucleïnezuurmoleculen die coderen voor de (E10C)hPYY₃₋₃₆- en (D11C)hPYY₃₋₃₆-varianten kunnen worden geproduceerd met gebruik van plaats-gerichte mutagenese, PCR-versterking en andere geschikte werkwijzen, waarbij de één of meer primers de gewenste puntmutaties hebben. Recombinant DNA-werkwijzen en mutagenesewerkwijzen die hierin worden beschreven zijn in het algemeen die welke worden genoemd door Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) en *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., redacteuren, Green Publishers Inc. en Wiley and Sons, 1994). Indien het wenselijk zou zijn dat E10 of D11 wordt vervangen door een ander niet in de natuur voorkomend aminozuur, dan kan een dergelijk peptide recombinant tot expressie worden gebracht met werkwijzen die bijvoorbeeld zijn beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2005/0208536, die hierin is opgenomen door verwijzing.

Nucleïnezuurpolynucleotiden die coderen voor de aminozuursequentie van hPYY's kunnen worden geïdentificeerd door expressiekloneren, waarbij wordt gebruikgemaakt van de detectie van positieve klonen op grond van een eigenschap van het tot expressie gebrachte eiwit. In een typisch geval worden nucleïnezuurbibliotheken onderzocht door de binding van een antilichaam of een andere bindingspartner (bijv. een receptor of ligand) aan gekloneerde eiwitten die tot expressie worden gebracht en verschijnen op een celoppervlak van een gastheer. Het antilichaam of de bindingspartner wordt gemodificeerd met een detecteerbare label, waardoor cellen kunnen worden geïdentificeerd die de gewenste kloon tot expressie brengen.

Recombinanttechnieken voor expressie die worden uitgevoerd volgens de beschrijvingen die hierna worden gegeven, kunnen worden gevolgd voor het produceren van de po-

lynucleotiden die coderen voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆ en voor het tot expressie brengen van de polypeptiden waarvoor wordt gecodeerd. Door insertie van een nucleïnezuursequentie die codeert voor de aminozuursequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of een (D11C)hPYY₃₋₃₆-variant in een geschikte vector kan een deskundige bijvoorbeeld gemakkelijk grote hoeveelheden van de gewenste nucleotidesequentie produceren. De sequenties kunnen vervolgens worden gebruikt voor de vorming van detectie-probes of primers voor amplificatie. Als alternatief kan een polynucleotide dat codeert voor de aminozuursequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of een (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide worden ingevoegd in een expressievector. Door invoeren van de expressievector in een geschikte gastheer kan de (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-variant waarvoor wordt gecodeerd in grote hoeveelheden worden geproduceerd.

Een andere werkwijze voor het verkrijgen van een geschikte nucleïnezuursequentie is de polymerasekettingreactie (polymerase chain reaction; PCR). Bij deze werkwijze wordt cDNA bereid uit poly(A)+RNA of totaal RNA met gebruik van het enzym reversetranscriptase. Twee primers, die in een typisch geval complementair zijn aan twee aparte gebieden van cDNA die coderen voor de aminozuursequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of een (D11C)hPYY₃₋₃₆-variant worden vervolgens tezamen met een polymerase zoals een Taq-polymerase toegevoegd aan het cDNA, en het polymerase vormt een uitbreiding van het cDNA-gebied tussen de twee primers.

Een andere wijze van bereiding van een nucleïnezuurmolecuul dat codeert voor de aminozuursequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of een (D11C)hPYY₃₋₃₆-variant is de chemische synthese met gebruik van werkwijzen die voor de geschoolde vakman bekend zijn, zoals die welke worden beschreven door Engels et al. in *Angew. Chem. Intl. Ed.*, 28:716-34, 1989. Deze werkwijzen omvatten de fosfotriester-, fosforamidiet- en H-fosfonaatwerkwijzen voor de synthese van nucleïnezuuren. Een voorkeurswerkwijze voor een dergelijke chemische

synthese is de synthese op een polymeer als drager, waarbij standaardfosforamidietchemie wordt gebruikt. In een typisch geval zal het DNA dat codeert voor de aminozuurse-
 5 quentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ een lengte van ongeveer hon-
 derd nucleotiden hebben. Nucleïnezuren die langer zijn dan
 ongeveer 100 nucleotiden kunnen met gebruik van deze werk-
 wijzen als verscheidene fragmenten worden gesynthetiseerd.
 De fragmenten kunnen vervolgens worden aan elkaar geli-
 10 geerd, hetgeen een nucleotidesequentie van een
 (E10C)hPYY₃₋₃₆-gen van volledige lengte vormt.

Het DNA-fragment dat codeert voor het amino-uiteinde
 van het polypeptide, kan een ATG hebben, dat codeert voor
 een methioninerest. Deze methionine kan al of niet aanwe-
 15 zig zijn in de rijpe vorm van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of
 (D11C)LP443-36, hetgeen afhankelijk is van het feit of het
 in de gastheercel geproduceerde polypeptide bestemd is om
 te worden afgescheiden uit die cel. Het codon dat codeert
 voor isoleucine kan ook als startplaats worden gebruikt.
 Andere werkwijzen die voor de deskundige bekend zijn, kun-
 20 nen ook worden gebruikt. In bepaalde uitvoeringsvormen be-
 vatten nucleïnezuurvarianten codons die zijn gewijzigd
 voor een optimale expressie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een
 (D11C)hPYY₃₋₃₆ in een bepaalde gastheercel. De desbetref-
 fende wijzigingen van het codon zullen afhankelijk zijn
 25 van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de gastheercel die
 voor expressie wordt gekozen. Een dergelijke "codonoptima-
 lisatie" kan worden uitgevoerd met diverse werkwijzen,
 bijvoorbeeld door kiezen van codons die de voorkeur ver-
 dienen voor gebruik bij sterk tot expressie gebrachte ge-
 30 nen in een bepaalde gastheercel. Computeralgoritmen voor
 codonfrequentie, zoals "Eco_high.Cod" voor de voorkeur
 voor codons van sterk tot expressie gebrachte bacteriële
 genen kunnen worden gebruikt. Deze worden geleverd door de
 University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Com-
 35 puter Group, Madison, Wis., VS). Andere bruikbare tabellen
 voor codonfrequenties omvatten "Celegans_high.cod" "Cele-

gans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod,"
 "Maize_high.cod," en "Yeast_high.cod."

Vectoren en gastheercellen

5 Een nucleïnezuurmolecuul dat codeert voor de amino-
 zuursequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆
 wordt ingevoegd in een geschikte expressievector, waarbij
 standaardligatietechnieken worden gebruikt. De vector
 wordt in een typisch geval zodanig gekozen dat deze func-
 10 tioneel is in de desbetreffende gastheercel die wordt ge-
 bruikt (de vector is dus verenigbaar met het inwendige van
 de gastheercel, zodat amplificatie van het gen en/of de
 expressie van het gen kan optreden). Een nucleïnezuurmole-
 cuul dat codeert voor de aminozuursequentie van een
 15 (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆ kan worden geamplifi-
 ceerd/tot expressie worden gebracht in prokaryotische,
 gist-, insecten (baculovirussystemen) en/of eukaryotische
 gastheercellen. Zie voor een overzicht van expressievector-
 en *Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, red., Academic
 20 Press, 1990).

Typisch zullen expressievectoren die in één van de
 gastheercellen worden gebruikt, sequenties bevatten voor
 het onderhoud van plasmiden en voor het kloneren en de ex-
 pressie van exogene nucleotidesequenties. Dergelijke se-
 25 quenties, die in bepaalde uitvoeringsvormen gezamenlijk
 worden aangeduid als "flankeringssequenties", zullen ty-
 pisch één of meer van de volgende nucleotidesequenties om-
 vatten: een promoter, één of meer versterkersequenties,
 een oorspronkelijk gedeelte voor replicatie, een sequentie
 30 voor beëindiging van de transcriptie, een complete intron-
 sequentie die een donor- en acceptor-splice-plaats bevat,
 een sequentie die codeert voor een leadersequentie voor
 polypeptidesecretie, een ribosoombindingsplaats, een poly-
 adenyleringssequentie, een polylinkergebied voor invoegen
 35 van het nucleïnezuur dat codeert voor het polypeptide dat
 tot expressie moet worden gebracht, en een selecteerbaar

markerelement. Elk van deze sequenties zal hierna worden beschreven.

Eventueel kan de vector een coderende "tag"-sequentie bevatten, dat wil zeggen een oligonucleotidemolecuul dat zich bevindt aan het 5'- of 3'-uiteinde van de coderende sequentie voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆; de oligonucleotidesequentie codeert voor polyHis (zoals hexaHis), of een andere "tag" zoals FLAG, HA (hemaglutinine influenza-virus) of myc waarvoor commercieel verkrijgbare antilichamen bestaan. Deze tag wordt bij expressie van het polypeptide in een typisch geval gekoppeld met het polypeptide en kan dienen als een middel voor affiniteitszuivering van het (E10C)hPYY₃₋₃₆ of het (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit de gastheercel. Affiniteitszuivering kan bijvoorbeeld worden gedaan door kolomchromatografie waarbij antilichamen tegen de tag als een affiniteitsmatrix worden gebruikt. Eventueel kan de tag vervolgens op diverse manier worden verwijderd uit het gezuiverde (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆, zoals het gebruik van bepaalde peptidasen voor splitsing, bijv. enterokinase digestie 3' of een FLAG tag-sequentie die zich dichterbij het begin in de sequentie van de aminozuursequenties bevindt, zoals wordt getoond in SEQ ID NO's: 3-4.

Flankeringssequenties kunnen homoloog (dus uit dezelfde soort en/of stam als de gastheercel), heteroloog (dus uit een andere soort dan de soort of stam van de gastheercel), hybride (dus een combinatie van flankeringssequenties uit meer dan een bron) of synthetisch zijn, of de flankeringssequenties kunnen oorspronkelijke sequenties zijn die doorgaans fungeren als regulatie van de expressie van hPYY₃₋₃₆. De bron van een flankeringssequentie kan een prokaryotisch of eukaryotisch organisme, een gewerveld of ongewerveld organisme, of een plant zijn, mits de flankeringssequentie functioneel is in en kan worden geactiveerd door de machinerie van de gastheercel.

Bruikbare flankeringssequenties kunnen worden verkregen door middel van verscheidene werkwijzen uit de stand der techniek. Andere hierin bruikbare flankeringssequen-

ties dan die van het PYY-gen zullen tevoren zijn geïdentificeerd door in kaart brengen en/of digestie met restrictie-endonuclease en kunnen dus uit het geschikte weefsel worden geïsoleerd met gebruik van de geschikte restrictie-

5 endonucleasen. In sommige gevallen kan de volledige nucleotidesequentie van een flankeringssequentie bekend zijn. Hier kan de flankeringssequentie worden gesynthetiseerd met de hierin beschreven werkwijze voor nucleïnezuursynthese of -kloneren.

- 10 Wanneer de gehele, of slechts een gedeelte van de, flankeringssequentie bekend is, kan het worden verkregen met behulp van PCR en/of door onderzoek van een genoombibliotheek met een geschikt oligonucleotide- en/of flankeringssequentiefragment uit dezelfde of een andere soort.
- 15 Wanneer de flankeringssequentie niet bekend is kan een fragment van het DNA dat de flankeringssequentie bevat, worden geïsoleerd uit een groter stuk DNA dat bijvoorbeeld een codeersequentie of zelfs een ander gen of andere genen bevat. De isolatie kan worden bewerkstelligd door digestie
- 20 met restrictie-endonuclease om het juiste DNA-fragment te produceren, gevolgd door isolatie met zuivering met agarosegel, Qiagen®-kolomchromatografie (Chatsworth, CA, VS) of andere voor de deskundige bekende werkwijzen.

- Een bron van replicatie is typisch een gedeelte van
- 25 die prokaryotische expressievectoren die commercieel kunnen worden aangeschaft, en de bron is behulpzaam bij de amplificatie van de vector in een gastheercel. Amplificatie van de vector tot een bepaald aantal kopieën kan in bepaalde gevallen van belang zijn voor de optimale expressie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆. Indien de
- 30 gekozen vector geen bron van replicatieplaats bevat, kan er een chemisch worden gesynthetiseerd op grond van een bekende sequentie, en in de vector worden opgenomen. De bron van replicatie uit het plasmide pBR322 (New England
- 35 Biolabs, Beverly, MA, VS) is bijvoorbeeld geschikt voor de meeste gram-negatieve bacteriën en diverse bronnen (bijv. SV40, polyoom, adenovirus, vesiculair stomatitisvirus

(VSV) of papillomavirussen zoals HPV of BPV) zijn geschikt voor kloonvectoren in zoogdiercellen. In het algemeen is voor expressievectoren bij zoogdieren geen bron van replicatie nodig (de SV40-bron wordt bijvoorbeeld vaak gebruikt omdat deze de vroege promoter bevat).

Een sequentie voor beëindiging van transcriptie bevindt zich in een typisch geval op de 3'-positie van het uiteinde van een codeergebied voor polypeptide en dient om de transcriptie te beëindigen. Doorgaans is een sequentie voor beëindiging van de transcriptie in prokaryotische cellen een fragment dat rijk is aan G-C waarop een poly-T-sequentie volgt. Terwijl de sequentie gemakkelijk wordt gekloneerd uit een bibliotheek of zelfs commercieel kan worden aangeschaft als onderdeel van een vector, kan deze ook gemakkelijk worden gesynthetiseerd met werkwijzen voor synthese van nucleïnezuren, zoals die welke hierin worden beschreven.

Een selecteerbaar markergenelement codeert voor een eiwit dat nodig is voor de overleving en groei van een gastheercel die in een selectief kweekmedium groeit. Typische gekozen markergenen coderen voor eiwitten die (a) resistentie verlenen tegen antibiotica of andere toxinen, bijv. ampicilline, tetracycline of kanamycine, voor prokaryotische gastheercellen; (b) auxotrofe deficienties van de cel aanvullen of (c) vitale stoffen leveren die niet beschikbaar zijn uit de complexe media. Selecteerbare markers die de voorkeur hebben, zijn het kanamycineresistentiegen, het ampicillineresistentiegen en het tetracyclineresistentiegen. Een neomycineresistentiegen kan ook worden gebruikt voor selectie in prokaryotische en eukaryotische gastheercellen.

Andere selectiegenen kunnen worden gebruikt voor amplificatie van het gen dat tot expressie zal worden gebruikt. Amplificatie is het proces waarbij genen waaraan een grotere behoefte bestaat voor de productie van een eiwit dat van vitaal belang is voor de groei in tandem in de chromosomen van de opeenvolgende generaties van recombi-

nantcellen worden herhaald. Voorbeelden van geschikte markers die kunnen worden gekozen voor zoogdiercellen omvatten dihydrofolaatreductase (DHFR) en thymidinekinase. De zoogdierceltransformanten worden onder selectiedruk geplaatst, waarbij alleen de transformanten uniek zijn aangepast voor overleving krachtens het selectiegen dat in de vector aanwezig is. De selectiedruk wordt opgelegd door kweken van de getransformeerde cellen onder omstandigheden waarbij de concentratie van het selectiemiddel in het medium successievelijk wordt gewijzigd, hetgeen leidt tot amplificatie van zowel het selectiegen als het DNA dat codeert voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆. Dientengevolge worden grotere hoeveelheden (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit het geamplificeerde DNA gesynthetiseerd.

Een ribosoombindingsplaats is doorgaans nodig voor het begin van translatie van mRNA en wordt geïdentificeerd door een Shine-Dalgarno-sequentie (prokaryoten) of een Kozak-sequentie (eukaryoten). Het element bevindt zich in een typisch geval op de 3'-positie van de promoter en de 5'-positie van de codeersequentie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆ die tot expressie zal worden gebracht. De Shine-Dalgarno-sequentie is gevarieerd, maar is in een typisch geval een polypurine (en heeft dus een hoog A-G-gehalte). Er zijn vele Shine-Dalgarno-sequenties geïdentificeerd, die alle gemakkelijk kunnen worden gesynthetiseerd met de hierin gegeven werkwijzen en in een prokaryotische vector kunnen worden gebruikt.

Een leader- of signaalsequentie kan worden gebruikt om een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit de gastheercel te leiden. Een nucleotidesequentie die codeert voor de signaalsequentie bevindt zich in een typisch geval in het codeergebied van het nucleïnezuurmolecuul van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆, of direct op het 5'-uiteinde van een codeergebied voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆. Er zijn vele signaalsequenties geïdentificeerd en elk hiervan die functioneel is in de gekozen gastheercel kan worden gebruikt met een nucleïnezuurmolecuul van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of

(D11C)hPYY₃₋₃₆. Derhalve kan een signaalsequentie homoloog (voorkomend in de natuur) of heteroloog zijn aan het nucleïnezuurmolecuul van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆. Bovendien kan een signaalsequentie chemisch worden gesynthetiseerd met de hierin beschreven werkwijzen. In de meeste gevallen zal de secretie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit de gastheercel door de aanwezigheid van een signaalpeptide de verwijdering van het signaalpeptide uit het afgescheiden (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ tot gevolg hebben. De signaalsequentie kan een bestanddeel van de vector, maar ook een onderdeel van een nucleïnezuurmolecuul van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ zijn dat in de vector wordt ingevoegd.

Een nucleotidesequentie die codeert voor een oorspronkelijke hPYY₃₋₃₆-signaalsequentie kan worden gekoppeld aan een codeergebied voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ of een nucleotidesequentie die codeert voor een heterologe signaalsequentie kan worden gekoppeld aan een codeergebied voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆. De gekozen heterologe signaalsequentie dient er een te zijn die wordt herkend en bewerkt, dat wil zeggen wordt afgesplitst door een signaalpeptidase, door de gastheercel. Voor prokaryotische gastheercellen die de oorspronkelijke hPYY-signaalsequentie niet herkennen en bewerken wordt de signaalsequentie vervangen door een gekozen prokaryotische signaalsequentie, bijvoorbeeld uit de groep van de basische fosfatase-, penicillinasen- of onder invloed van warmte stabiele enterotoxine II-leaders. Voor de afscheiding uit gist kan de oorspronkelijke hPYY-signaalsequentie worden vervangen door invertase-, alfa-factor- of zure fosfatase-leaders uit gist. Bij expressie in zoogdiercellen voldoet de oorspronkelijke signaalsequentie, hoewel ook andere signaalsequenties van zoogdieren geschikt kunnen zijn.

In vele gevallen wordt de transcriptie van een nucleïnezuurmolecuul verhoogd door de aanwezigheid van één of meer introns in de vector; dit geldt in het bijzonder wanneer een polypeptide in eukaryotische gastheercellen wordt

geproduceerd, in het bijzonder gastheercellen van zoogdieren. De gebruikte introns kunnen in de natuur in het hPYY-gen voorkomen, met name wanneer het gebruikte gen een genoomsequentie van volledige lengte of een fragment daarvan is. Wanneer het intron in de natuur niet in het gen voorkomt (zoals bij de meeste cDNA's), kan het intron uit een andere bron worden verkregen. De positie van het intron ten opzichte van de flankeringssequenties en het hPYY-gen is in het algemeen belangrijk, aangezien het intron dient te worden getranscribeerd om effectief te zijn. Wanneer een cDNA-molecuul dat codeert voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ wordt getranscribeerd is de voorkeurspositie voor het intron de 3'-positie ten opzichte van de beginplaats van de transcriptie en de 5'-positie ten opzichte van de poly-A-transcriptieplaats voor beëindiging van de sequentie. Bij voorkeur zullen het intron of de introns zich op één van beide zijden (dus de 5'- of de 3'-positie) van het cDNA bevinden, zodat het de codeersequentie niet onderbreekt. Elk intron uit een bepaalde bron, met inbegrip van virale, prokaryotische en eukaryotische (plant-aardige of dierlijke) organismen kan worden gebruikt, mits het verenigbaar is met de gastheercel waarin het wordt ingevoegd. Ook zijn hierin synthetische introns begrepen. Eventueel kan meer dan één intron in de vector worden gebruikt.

Expressie- en kloneringsvectoren zullen in een typisch geval een promoter bevatten die wordt herkend door het gastheerorganisme en operabel gebonden is aan het molecuul dat codeert voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆. Promoters zijn niet-getranscribeerde sequenties die zich boven (dus de 5'-positie) het startcodon van een structureel gen (in het algemeen binnen ongeveer 100 tot 1000 bp) bevinden dat de transcriptie van het structurele gen controleert. Promoters kennen een gebruikelijke onderverdeling in één of twee klassen: induceerbare promoters en constitutieve promoters. Induceerbare promoters zetten aan tot hogere niveaus van transcriptie uit DNA dat onder hun

controle staat als reactie op bepaalde wijzigingen in de kweekomstandigheden, zoals de aanwezigheid of afwezigheid van een voedingsstof of een verandering van de temperatuur. Constitutieve promoters zetten daarentegen aan tot
 5 een continue productie van genproduct; dat betekent dat er weinig of geen controle van de genexpressie bestaat. Er is een groot aantal promoters bekend dat door een verscheidenheid van mogelijke gastheercellen wordt herkend. Een geschikte promoter is operabel gekoppeld aan het DNA dat
 10 codeert voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ door verwijderen van de promoter uit de DNA-bron door middel van digestie door restrictie-enzym en inserteren van de gewenste promotersequentie in de vector. De oorspronkelijke promotersequentie van hPYY₃₋₃₆ kan worden gebruikt om de ampli-
 15 ficatie en/of expressie van een nucleïnezuurmolecuul van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ te sturen. Een heterologe promoter heeft echter de voorkeur indien deze in vergelijking met de oorspronkelijke promoter een grotere transcriptie en grotere opbrengsten van het tot expressie ge-
 20 brachte eiwit toelaat en indien deze verenigbaar is met het gastheercelsysteem dat voor gebruik wordt gekozen.

Promoters die geschikt zijn voor gebruik in prokaryotische gastheercellen omvatten de bèta-lactamase- en lactosepromotersystemen; induceerbaar RNA-polymerase van *E. Coli* T7; basische fosfatase; een tryptofaan (trp) promotersysteem; en hybride promoters zoals de tac-promoter. Ook andere bacteriële promoters zijn geschikt. Hun sequen-
 25 ties zijn gepubliceerd, hetgeen het voor een deskundige mogelijk maakt om deze te ligeren aan de gewenste DNA-sequentie, waarbij naar behoefte linkers of adapters worden gebruikt om bruikbare restrictieplaatsen te verkrijgen.
 30

Geschikte promoters voor gebruik in gisten zijn eveneens stand der techniek. Gistversterkers worden met gun-
 35 stige resultaten bij gistpromoters gebruikt. Geschikte promoters voor gebruik bij gastheercellen van zoogdieren zijn bekend en omvatten, maar zijn niet beperkt tot, die

welke worden verkregen uit de genomen van virussen zoals polyomavirus, pluimveepokkenvirus, adenovirus (zoals adenovirus 2), runderpapillomavirus, vogelsarcoomvirus, cytomegalovirus, retrovirussen, hepatitis-B-virus en liefst apenvirus 40 (SV40). Andere geschikte promoters voor zoogdiercellen omvatten heterologe promoters voor zoogdiercellen, bijvoorbeeld warmteschok-promoters en de actinepromoter.

Andere promoters die van belang kunnen zijn voor het regelen van de expressie van (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ omvatten, maar zijn niet beperkt tot: het vroege promoter-gebied van SV40 (Bemoist en Chambon, *Nature*, 290:304-10, 1981); de CMV-promoter; de promoter die zich bevindt in de 3'-positie van de lange eindstandige herhaling van Rous-sarcoomvirus (Yamamoto et al., *Cell*, 22:787-97, 1980); de herpesthymidinekinasepromoter (Wagner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1444-45, 1981); de regulerende sequenties van het metallothioninegen (Brinster et al., *Nature*, 296:39-42, 1982); prokaryotische expressievectoren zoals de bèta-lactamasepromoter (Villa-Kamaroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31, 1978) of de tac-promoter (DeBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25, 1983).

Een versterkersequentie kan in de vector worden ingevoegd, zodat de transcriptie van een DNA dat codeert voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ in hogere eukaryoten wordt verhoogd. Versterkers zijn op de cis-posities werkende elementen van DNA, doorgaans met een lengte van 10-300 bp, die op de promoter inwerken, zodat de transcriptie wordt verhoogd. Versterkers zijn relatief onafhankelijk met betrekking tot oriëntatie en positie. Deze zijn aangetroffen in de 5'- en 3'-positie van de transcriptie-eenheid. Er zijn verscheidene uit zoogdiergenen verkrijgbare versterkersequenties bekend (bijv. globine, elastase, albumine, alfa-feto-eiwit en insuline). Typisch zal echter een versterker uit een virus worden gebruikt. De SV40-versterker, de vroege promoter-versterker van het cytomegalovirus, de

polyoma-versterker en de adenovirus-versterkers zijn voorbeelden van versterkende elementen voor de activering van eukaryotische promoters. Hoewel een versterker in de vector kan worden gespliced op een 5'- of 3'-positie van een
 5 nucleïnezuurmolecuul dat codeert voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆, bevindt deze zich typisch op de 5-positie van de promoter.

Expressievectoren kunnen worden opgebouwd uit een uitgangsvector zoals een commercieel verkrijgbare vector.
 10 Dergelijke vectoren kunnen al of niet alle gewenste flankeringssequenties bevatten. Wanneer één of meer van de hierin beschreven flankeringssequenties niet reeds in de vector aanwezig zijn, kunnen deze afzonderlijk worden verkregen en in de vector worden ingevoerd. Werkwijzen die
 15 worden gebruikt voor het verkrijgen van elk van de flankeringssequenties zijn voor een deskundige bekend.

Voorkeursvectoren zijn die welke verenigbaar zijn met de bacteriën, insecten en zoogdiercellen die gastheer zijn. Dergelijke vectoren omvatten, onder andere, pCRII, pCR3 en pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, VS), pBSII
 20 (Stratagene, La Jolla, CA, VS), pET15 (Novagen, Madison, WI, VS), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, VS), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA, VS), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alfa (PCT octrooiaanvraag no. WO
 25 90/14363) en pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY, VS).

Andere geschikte vectoren omvatten, maar zijn niet beperkt tot, cosmiden, plasmiden of gemodificeerde virussen, maar het zal duidelijk zijn dat het vectorsysteem
 30 verenigbaar dient te zijn met de gekozen gastheercel. Dergelijke vectoren omvatten, maar zijn niet beperkt tot, plasmiden zoals Bluescript®-plasmidederivaten (een groot aantal kopieën van ColE1-fagemide, Stratagene), PCR-kloonplasmiden die bestemd zijn voor kloneren van met Taq
 35 geamplificeerde PCR-producten (bijv. TOPO® TA Cloning® Kit, PCR2.1®-plasmidederivaten, Invitrogen) en vectoren uit

zoogdieren, gisten of virussen, zoals een expressiesysteem voor baculovirussen (pBacPAK-plasmidederivaten, Clontech).

Nadat de vector is opgebouwd en een nucleïnezuurmolecuul dat codeert voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide is ingevoegd in de juiste plaats van de vector, kan de voltooide vector in een geschikte gastheercel worden ingevoegd voor amplificatie en/of expressie van polypeptide. De transformatie van een expressievector voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide in een gekozen gastheercel kan met bekende werkwijzen worden bewerkstelligd, waaronder werkwijzen als transfectie, infectie, elektroporatie, micro-injectie, lipofectie, werkwijze met DEAE-dextran en andere bekende technieken. De gekozen werkwijze zal ten dele een functie zijn van het te gebruiken type gastheercel. Deze werkwijzen en andere geschikte werkwijzen zijn voor de deskundige bekend, en worden bijvoorbeeld genoemd door Sambrook et al., hierboven.

Gastheercellen kunnen prokaryotische gastheercellen (zoals *E. coli*) of eukaryotische gastheercellen (zoals een cel van gist, insecten of gewervelden) zijn. De gastheercel synthetiseert, wanneer deze onder geschikte omstandigheden wordt gekweekt, een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide dat vervolgens uit het kweekmedium (indien de gastheercel dit in het medium afscheidt) of rechtstreeks uit de dit producerende gastheercel (indien het niet wordt afgescheiden) kan worden verzameld. De keuze van een geschikte gastheercel zal afhankelijk zijn van diverse factoren, zoals de gewenste expressieniveaus, modificaties van het polypeptide die gewenst of noodzakelijk zijn voor de activiteit (zoals glycosylering of fosforylering) en of het gemakkelijk in een biologisch actief molecuul kan worden opgevouwen.

In de stand der techniek is een aantal geschikte gastheercellen bekend, en vele zijn verkrijgbaar bij American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. Voorbeelden omvatten, maar zijn niet beperkt tot: zoogdiercellen, zoals ovariumcellen van de Chinese hamster (CHO), CHO

DHFR(-)-cellen (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:4216-20, 1980), niercellen van een menselijk embryo (human embryonic kidney; HEK) 293 of 293T-cellen, of 3T3-cellen. De keuze van geschikte gastheercellen van
 5 zoogdieren en werkwijzen voor de transformatie, kweek, amplificatie, onderzoek, productie en zuivering zijn stand der techniek. Andere geschikte cellijnen van zoogdieren zijn apen-COS-1- en COS-7-cellijnen, en de CV-1-celijn. Andere voorbeelden van gastheercellen van zoogdieren om-
 10 vatten cellijnen van primaten en cellijnen van knaagdieren, met inbegrip van getransformeerde cellijnen. Normale diploïde cellen, celstammen die afkomstig zijn van *in vitro* kweek van primair weefsel, alsmede primaire explantaten, zijn eveneens geschikt. Kandidaatcellen kunnen genotypisch deficiënt zijn in het selectiegen, of kunnen een
 15 dominant werkend selectiegen bevatten. Andere geschikte cellijnen van zoogdieren omvatten, maar zijn niet beperkt tot, muizenneuroblastoom N2A-cellen, HeLa, muizen-L-929-cellen, 3T3-lijnen die afkomstig zijn uit Swiss-, Balb-c- of NIH-muizen, BHK- of HaK-hamstercellijnen. Elk van deze
 20 cellijnen is bekend en verkrijgbaar voor deskundigen op het gebied van de eiwitexpressie.

Als gastheercellen zijn bacteriecellen evenzeer bruikbaar. De diverse stammen van *E. coli* (bijv. HB101,
 25 DH5 α , DH10 en MC1061) zijn bekend als gastheercellen op het gebied van de biotechnologie. Diverse stammen van *B. subtilis*, *Pseudomonas* spp., andere *Bacillus* spp. en *Streptomyces* spp. kunnen eveneens bij deze werkwijze worden gebruikt.

30 Als gastheercellen voor de expressie van (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆- polypeptiden zijn voor de deskundigen vele stammen van gistcellen bekend. Gistcellen die de voorkeur hebben, omvatten bijvoorbeeld *Saccharomyces cerevisiae* en *Pichia pastoris*.

35 Bovendien kunnen waar het wordt gewenst systemen van insectencellen worden gebruikt voor de expressie van (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆. Dergelijke systemen worden

bijvoorbeeld beschreven door Kitts et al., 1993, *Biotechniques.*, 14:810-17; Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-72, 1993; en Lucklow et al., *J. Virol.*, 67:4566-79, 1993. Insectencellen die de voorkeur hebben, zijn Sf-9 en
 5 Hi5 (Invitrogen).

Productie van (E10C)hPYY₃₋₃₆- en (D11C)hPY₃₋₃₆-polypeptiden

Een gastheercellijn omvattende een expressievector voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ kan worden gekweekt met
 10 gebruik van standaardmedia die voor de deskundigen bekend zijn. De media zullen doorgaans alle voedingsstoffen bevatten die noodzakelijk zijn voor de groei en overleving van de cellen. Geschikte media voor het kweken van *E. coli*-cellen omvatten bijvoorbeeld Luria Broth (LB) en/of
 15 Terrific Broth (TB). Geschikte media voor het kweken van eukaryotische cellen omvatten Roswell Park Memorial Institute-medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) en/of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), die alle kunnen worden aangevuld met een serum en/of groeifac-
 20 toren zoals noodzakelijk zijn voor de desbetreffende cellijn die wordt gekweekt. Een geschikt medium voor insectenkweken is Grace-medium dat indien noodzakelijk wordt aangevuld met gistolate, lactalbuminehydrolysaat en/of foetaal kalfsserum.

25 Typisch wordt een antibioticum of een andere verbinding die bruikbaar is voor de selectieve groei van getransfecteerd of getransformeerde cellen toegevoegd als een supplement op de media. De te gebruiken verbinding zal worden voorgeschreven door het selecteerbare markerelement
 30 dat aanwezig is op het plasmide waarmee de gastheercel werd getransformeerd. Wanneer het selecteerbare markerelement bijvoorbeeld kanamycineresistentie is, zal de verbinding die aan het kweekmedium wordt toegevoegd kanamycine zijn. Andere verbindingen voor selectieve groei omvatten
 35 ampicilline, tetracycline en neomycine.

De hoeveelheid van een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide die door een gastheercel wordt

geproduceerd kan worden beoordeeld met gebruik van werkwijzen uit de stand der techniek. Dergelijke werkwijzen omvatten, zonder beperking, Western blot-analyse, elektroforese met SDS-polyacrylamidegel, elektroforese met niet-denaturerende gel, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)-scheiding, immunoprecipitatie en/of activiteitsassays zoals DNA-binding-gel-shift-assays.

Indien een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ ontworpen is om te worden afgescheiden door de gastheercellijn, kan het grootste gedeelte van het polypeptide in het celweekmedium worden aangetroffen. Indien het polypeptide echter niet wordt afgescheiden door de gastheercellen, zal het aanwezig zijn in het cytoplasma en/of de kern (voor eukaryotische gastheercellen) of in het cytoplasma (voor gastheercellen van gramnegatieve bacteriën).

Voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ dat zich in het cytoplasma van de gastheercel en/of de kern (voor eukaryotische gastheercellen) of in het cytoplasma (voor bacteriële gastheercellen) bevindt kan het intracellulaire materiaal (met inbegrip van inclusielichamen voor gramnegatieve bacteriën) uit de gastheercel worden geëxtraheerd met gebruik van een standaardtechniek die voor de deskundigen bekend is. De gastheercellen kunnen bijvoorbeeld worden gelyseerd, zodat de inhoud van het periplasma/cytoplasma met een French-pers, homogenisatie en/of behandeling in een ultrasoonbad vrijkomt, waarna centrifugatie volgt.

Indien een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ inclusielichamen in de cytoplasma heeft gevormd, kunnen de inclusielichamen zich vaak binden aan de binnenste en/of buitenste celmembranen en dus na centrifugatie voornamelijk worden aangetroffen in het materiaal van de pellet. Het materiaal in de pellet kan vervolgens worden behandeld bij pH-extremen of met een chaotropisch middel zoals een detergens, guanidine, guanidinederivaten, ureum of ureumderivaten in aanwezigheid van een reductiemiddel zoals dithiothreitol bij een basische pH of triscarboxyethylfosfine bij een zu-

re pH, om de inclusielichamen vrij te maken, in stukken te breken en te solubiliseren. Het gesolubiliseerde (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ kan vervolgens worden geanalyseerd met gelelektroforese, immunoprecipitatie en dergelijke. Als het gewenst is om het polypeptide te isoleren kan de isolering worden gerealiseerd met behulp van standaardwerkwijzen zoals die welke hierin worden beschreven, en door Marston et al. in *Meth. Enz.*, 182:264-75, 1990.

Indien bij expressie van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of een (D11C)hPYY₃₋₃₆ geen aanzienlijke hoeveelheid inclusielichamen wordt gevormd, dan zal het polypeptide na centrifugatie van het celhomogenaat voornamelijk worden aangetroffen in de supernatant. Het polypeptide kan verder uit de supernatant worden geïsoleerd met gebruik van werkwijzen zoals die welke hierin worden beschreven.

De zuivering van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit een oplossing kan worden bewerkstelligd met een verscheidenheid van technieken. Indien het polypeptide op een zodanige wijze is gesynthetiseerd dat het een tag zoals Hexahistidine 9 of een ander klein peptide zoals FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT, VS) of myc (Invitrogen) op zijn carboxyl- of amino-terminus bevat, kan het met een eenstapswerkwijze bestaat worden gezuiverd door de oplossing door een affiniteitskolom te laten stromen waarbij de kolommatrix een sterke affiniteit voor de tag heeft.

Polyhistidine bindt zich bijvoorbeeld met grote affiniteit en specifiek aan nikkel. Een affiniteitskolom van nikkel (zoals de Quagen[®] nikkelkolommen) kan dus voor zuivering worden gebruikt. Zie bijv. *Current Protocols in Molecular Biology* & 10.11.8 (Ausubel et al., redacteurs, Green Publishers Inc. en Wiley and Sons, 1993).

Bovendien kan een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide worden gezuiverd door het gebruik van een monoklonaal antilichaam dat in staat is om specifiek een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide te herkennen en daaraan te binden.

In situaties waarin het de voorkeur heeft om een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide gedeeltelijk of volledig te zuiveren, zodat het gedeeltelijk of nagenoeg volledig vrij is van verontreinigingen, kunnen voor de
 5 deskundigen bekende standaardwerkwijzen worden gebruikt. Dergelijke werkwijzen omvatten, zonder beperking, scheiding met elektroforese gevolgd door elektro-elutie, diverse typen chromatografie (affiniteits-, immunoaffiniteits-, molzeven- en ionenwisselings-), HPLC en preparatieve iso-
 10 elektrische focussing ("Isoprime"-machine/techniek, Hoefer Scientific, San Francisco, CA, VS). In sommige gevallen kunnen twee of meer zuiveringstechnieken worden gecombineerd om een grotere zuiverheid te verkrijgen.

Een aantal andere werkwijzen voor het produceren van
 15 polypeptiden is stand der techniek, en de werkwijzen kunnen worden gebruikt voor het produceren van (E10C)hPYY₃₋₃₆- en (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden. Zie bijv. Roberts et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94:12297-303, 1997, die de productie beschrijft van fusie-eiwitten tussen een mRNA en
 20 het peptide waarvoor dit codeert. Zie ook Roberts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3:268-73, 1999.

Werkwijzen voor het produceren van peptiden of polypeptiden worden eveneens beschreven in Amerikaanse octrooischriften: 5.763.192; 5.814.476; 5.723.323 en
 25 5.817.483. De werkwijze behelst het produceren van stochastische genen of fragmenten daarvan en het vervolgens inbrengen van deze genen in gastheercellen die één of meer eiwitten produceren waarvoor wordt gecodeerd door de stochastische genen. De gastheercellen worden vervolgens onderzocht, waarbij de klonen worden geïdentificeerd die
 30 peptiden of polypeptiden met de gewenste activiteit produceren. Andere werkwijzen voor expressie van recombinant-peptide worden beschreven in Amerikaanse octrooischriften: 6.103.495; 6.210.925; 6.627.438 en 6.737.250. De werkwijze
 35 maakt gebruik van *E. coli* en de algemene secretieroute van *E. coli*. Het peptide wordt gefuseerd met een signaalsequentie; het peptide is dus bestemd voor secretie.

Een andere werkwijze voor het produceren van peptiden of polypeptiden wordt beschreven in PCT octrooiaanvraag WO 99/15650. De gepubliceerde werkwijze, die wordt aangeduid als random-activering van de genexpressie voor de
 5 ontdekking van genen, behelst de activering van endogene genexpressie of over-expressie van een gen door *in situ* recombinatiewerkwijzen. De expressie van een endogeen gen wordt bijvoorbeeld geactiveerd of verhoogd door integreren van een regulerende sequentie in de doelcel die de expres-
 10 sie van het gen kan activeren door niet-homologe of ongeoorloofde recombinatie. Het doel-DNA wordt eerst onderworpen aan straling, en een genetische promoter wordt ingevoegd. De promoter lokaliseert uiteindelijk een breuk aan het front van een gen, en begint met de transcriptie van
 15 het gen. Dit leidt tot de expressie van het gewenste peptide of polypeptide.

Amidering

Amidering van een peptide, dat synthetisch of recombinant wordt geproduceerd, wordt bewerkstelligd met een
 20 enzym dat peptidyl-glycine-alfa-amiderend monooxygenase (PAM) wordt genoemd. Wanneer (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptiden recombinant worden geproduceerd met gebruik van een bacterieel expressiesysteem, kunnen de
 25 peptiden C-terminaal worden geamideerd door een *in vitro* reactie met recombinant PAM-enzym. De bron van het PAM-enzym, werkwijzen voor de productie en zuivering ervan en werkwijzen die kunnen worden gebruikt voor het amideren van (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptiden worden bij-
 30 voorbeeld beschreven in Amerikaanse octrooischriften: 4.708.934; 5.789.234 en 6.319.685.

Selectieve antilichamen voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆

Antilichamen en antilichaamfragmenten die specifiek
 35 binden aan (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden, met of zonder pegylering op de plaats van de cysteïnesubstitutie (zoals hierin beschreven), maar die niet selec-

tief binden aan oorspronkelijk hPPY₃₋₃₆, vallen onder de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding. De antilichamen kunnen polyklonaal, met inbegrip van monospecifiek polyklonaal; monoklonaal; recombinant; chimeer; gehumaniseerd, zoals CDR-grafted; humaan; met enkele keten en/of bispecifiek zijn, alsmede fragmenten, varianten of derivaten daarvan. Antilichaamfragmenten omvatten die gedeelten van het antilichaam die binden aan een epitoom van het (E10C)hPPY₃₋₃₆- of (D11C)hPPY₃₋₃₆-polypeptide. Voorbeelden van dergelijke fragmenten omvatten Fab- en F(ab')-fragmenten die worden gevormd door enzymatische splitsing van antilichamen van volledige lengte. Andere bindingsfragmenten omvatten die welke worden gevormd door recombinant-DNA-technieken, zoals de expressie van recombinante plasmiden die nucleïnezuursequenties bevatten die coderen voor variabele gebieden van een antilichaam.

Polyklonale antilichamen die zich richten zich op een (E10C)hPPY₃₋₃₆- of (D11C)hPPY₃₋₃₆-polypeptide worden in het algemeen in dieren (bijv. konijnen of muizen) geproduceerd door middel van meervoudige S.C. of I.P. injecties van (E10C)hPPY₃₋₃₆- of (D11C)hPPY₃₋₃₆-polypeptide en een adjuvans. Het kan bruikbaar zijn om (E10C)hPPY₃₋₃₆- of (D11C)hPPY₃₋₃₆-polypeptide te conjugereren met een dragereiwit dat immunogeen is in de diersoort die zal worden geïmmuniseerd, zoals keyhole-limpet-hemocyanine, serumalbumine, runderthyroglobuline of remmer van soja-trypsine. Ook worden aggregatiemiddelen als aluin gebruikt voor het versterken van de immuunrespons. Na immunisatie wordt van de dieren bloed afgenomen en wordt het serum getest op het aantal anti-(E10C)hPPY₃₋₃₆- of anti-(D11C)hPPY₃₋₃₆-antilichamen.

Monoklonale antilichamen die zich richten op (E10C)hPPY₃₋₃₆- of (D11C)hPPY₃₋₃₆-polypeptiden worden geproduceerd met gebruik van een werkwijze die voorziet in de productie van antilichaammoleculen door continue cellijnen in kweek. Voorbeelden van geschikte werkwijzen voor het bereiden van monoklonale antilichamen omvatten de hybrido-

ma-werkwijzen van Kohler et al., *Nature*, 256:495-97, 1975, en de werkwijze met humane B-celhybridoma (Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Ook wordt door de onderhavige uitvinding voorzien in hybridoma-cellijnen die monoklonale antilichamen produceren die reactief zijn met (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden.

Voorkeurswerkwijzen voor het bepalen van de specificiteit en affiniteit van monoklonale antilichamen door middel van concurrerende remming kunnen worden gevonden bij Harlow en Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); *Current Protocols in Immunology* (Colligan et al., redacteuren, Greene Publishing Assoc. en Wiley Interscience, 1993), en Muller, *Meth. Enzymol.*, 92:589-601, 1988.

Chimere antilichamen van de onderhavige uitvinding kunnen individuele H- en/of L-immunoglobulineketens omvatten. Een chimere H-keten die de voorkeur verdient, omvat een bindingsgebied voor antigeen dat afkomstig is van de H-keten van een niet-humaan antilichaam dat specifiek is voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide, en gebonden is aan ten minste een gedeelte van een C-gebied van een humane H-keten (C_H) zoals CH₁ of CH₂. Een chimere L-keten die de voorkeur heeft, omvat een bindingsgebied voor antigeen dat afkomstig is van de L-keten van een niet-humaan antilichaam dat specifiek is voor een (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide, en gebonden is aan ten minste een gedeelte van een C-gebied van een humane L-keten (C_L). Chimere antilichamen en werkwijzen voor hun productie zijn stand der techniek. Zie Cabilly et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3273-77, 1984; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-55, 1984; Boulianne et al., *Nature*, 312:643-46, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 314:268-70, 1985; Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:3439-43, 1987, en Harlow en Lane, hierboven.

Selectieve bindingsmiddelen met chimere H-ketens en L-ketens met dezelfde of een verschillende bindingsspecificiteit voor een variabel gebied kunnen ook worden bereid door de juiste samenvoeging van de afzonderlijke polypeptideketens volgens werkwijzen die stand der techniek zijn. Zie bijv. *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., redacteurs, Green Publishers Inc. en Wiley and Sons, 1994) en Harlow en Lane, hierboven. Met gebruik van deze aanpak worden gastheercellen die chimere H-ketens (of hun derivaten) tot expressie brengen apart gekweekt uit gastheercellen die chimere L-ketens (of hun derivaten) tot expressie brengen en worden de immunoglobulineketens afzonderlijk verkregen en vervolgens samengevoegd. Als alternatief kunnen de gastheercellen tezamen worden gekweekt en kan men de ketens spontaan in het kweekmedium laten samenvoegen, waarna het geassembleerde immunoglobuline wordt geïsoleerd.

In een andere uitvoeringsvorm is een monoklonaal antilichaam van de onderhavige uitvinding een "gehumaniseerd" antilichaam. Werkwijzen voor het humaniseren van niet-humane antilichamen zijn stand der techniek. Zie Amerikaanse octrooischriften: 5.585.089 en 5.693.762. In het algemeen heeft een gehumaniseerd antilichaam één of meer aminozuurresten die zijn ingebracht uit een bron die niet-humaan is. Humanisering kan bijvoorbeeld worden uitgevoerd met gebruik van werkwijzen die in het vakgebied zijn beschreven (Jones et al., 1986, *Nature*, 321:522-25, Riechmann et al., 1998, *Nature*, 332:323-27; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-36). Dit geschiedt door de overeenkomstige gebieden van een humaan antilichaam ten minste een gedeelte van het complementairiteit bepalende gebied van een knaagdier (complementarity-determining region; CDR) te vervangen.

Technieken voor het creëren van recombinant DNA-versies voor de bindingsgebieden van antigeen van antilichammoleculen (dat wil zeggen Fab of fragmenten uit een variabel gebied) zonder dat daarvoor de vorming van mono-

klonale antilichamen nodig is, worden omsloten door de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding. Bij deze techniek worden antilichaam-specifieke boodschapper-RNA-moleculen geëxtraheerd uit cellen van het immuunsysteem die afkomstig zijn van een geïmmuniseerd dier en getranscribeerd in cDNA. Het cDNA wordt vervolgens gekloneerd in een bacterieel expressiesysteem. Een voorbeeld van een dergelijke techniek die geschikt is voor de praktijk van de onderhavige uitvinding gebruikt een lambda-vectorsysteem van een bacteriofaag met een leader-sequentie die er voor zorgt dat het tot expressie gebrachte Fab-eiwit migreert naar de periplasmische ruimte (tussen het bacteriële celmembraan en de celwand) of wordt uitgescheiden. Men kan snel grote aantallen functionele Fab-fragmenten genereren en onderzoeken welke hiervan zich aan het antigeen binden. Dergelijke bindingsmoleculen voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ (Fab-fragmenten met specificiteit voor (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden) worden specifiek omsloten door de uitdrukking "antilichaam" zoals deze hierin wordt gebruikt.

Eveneens binnen de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding vallen technieken die zijn ontwikkeld voor de productie van chimere antilichamen door splicing van de genen uit een muizenantilichaammolecuul met de juiste antigeenspecificiteit en genen uit een humaan antilichaammolecuul met de geschikte biologische activiteit (zoals het vermogen tot het activeren van het humane complement en het bevorderen van de van het antilichaam afhankelijke cellulaire cytotoxiciteit (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC)); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81:6851-55, 1984; Neuberger et al., *Nature*, 312:604-08, 1984. Selectieve bindingsmiddelen zoals antilichamen die door middel van deze techniek worden geproduceerd, vallen binnen de beschermingsomvang van de onderhavige uitvinding.

Het zal duidelijk zijn dat de onderhavige uitvinding niet beperkt is tot monoklonale antilichamen van muizen of

ratten; in feite kunnen humane antilichamen worden gebruikt. Dergelijke antilichamen kunnen worden verkregen door humane hybridomas te gebruiken. Volledig humane antilichamen die binden aan (E10C)hPYY₃₋₃₆⁻ of (D11C)hPYY₃₋₃₆⁻ polypeptiden worden dus omsloten door de onderhavige uitvinding. Dergelijke antilichamen worden geproduceerd door immuniseren met een (E10C)hPYY₃- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-antigeen (eventueel geconjugeerd met een drager) van transgene dieren (bijv. muizen) die een repertoire van humane antilichamen kunnen produceren zonder dat er een endogene immunoglobulineproductie plaatsvindt. Zie bijv. Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:2551-55, 1993; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33-40, 1993.

Eveneens omsloten door de onderhavige uitvinding zijn humane antilichamen die binden aan (E10C)hPYY₃₋₃₆⁻ of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden. Met transgene dieren (bijv. muizen) die een repertoire van humane antilichamen kunnen produceren zonder dat er een endogene immunoglobulineproductie plaatsvindt worden dergelijke antilichamen geproduceerd door immunisatie met een antigeen van (E10C)hPYY₃₋₃₆⁻ of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide (dus met ten minste 6 continue aminozuren) dat eventueel geconjugeerd is met een drager. Zie bijv. Jakobovits et al., 1993, hierboven; Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-58, 1993; Bruggemann et al., 1993, hierboven. Bij een werkwijze worden dergelijke transgene dieren geproduceerd door uitschakelen van de endogene loci die coderen voor de zware en lichte immunoglobulineketens daarin en invoegen van loci die coderen voor humane zware en lichte keteneiwitten in het genoom daarvan. Gedeeltelijk gemodificeerde dieren, dat wil zeggen die met minder dan het volledige complement van modificaties worden vervolgens gekruist, waarbij een dier wordt verkregen met alle gewenste modificaties van het immuunsysteem. Wanneer een immunogeen wordt toegediend, produceren deze transgene dieren antilichamen met humane (in plaats van bijv. muizen) aminozuursequenties, waaronder de

variabele gebieden die immunospecifiek voor deze antigenen zijn. Zie PCT octrooiaanvragen: WO 96/33735 en WO 94/02602. Andere werkwijzen worden beschreven in Amerikaans octrooischrift 5.545.807, PCT octrooiaanvragen: 5 WO 91/10741 en WO 90/04036, en in EP octrooischrift 0.546.073 B1 en PCT octrooiaanvraag WO 92/03918. Humane antilichamen kunnen ook worden geproduceerd door de expressie van recombinant DNA in gastheercellen of door expressie in hybridomacellen zoals hierin wordt beschreven,

10 In een alternatieve uitvoeringsvorm kunnen humane antilichamen ook worden geproduceerd uit faag-display-bibliotheken (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991). Deze werkwijzen bootsen immuunselectie na door display van antilichaamrepertoires op het oppervlak van een filamentachtige bacteriofaag en de daarop volgende selectie van de faag door hun binding aan een antigeen naar keuze. Een dergelijke techniek wordt beschreven in PCT octrooiaanvraag 15 no. WO 99/10494, die de isolering beschrijft van functionele agonistische antilichamen voor MPL- en msk-receptoren met grote affiniteit waarvoor een dergelijke aanpak wordt gebruikt.

Chimere, CDR-getransplanteerde en gehumaniseerde antilichamen worden typisch geproduceerd door recombinant- 25 werkwijzen. Nucleïnezuren die coderen voor de antilichamen worden in de gastheercellen gebracht en tot expressie gebracht met gebruik van materialen en procedures die hierin worden beschreven en stand der techniek zijn. In een voorkeursuitvoeringsvorm worden de antilichamen geproduceerd 30 in gastheercellen van zoogdieren, zoals CHO-cellen. Monoklonale (bijv. humane) antilichamen kunnen worden geproduceerd door de expressie van recombinant DNA in gastheercellen of door expressie in hybridomacellen als hierin wordt beschreven.

35 De anti-(E10C)hPYY₃₋₃₆- en anti-(D11C)hPYY₃₋₃₆-antilichamen van de onderhavige uitvinding kunnen in een bekende assay-werkwijze worden gebruikt, zoals concurrerende bin-

ding-assays, directe en indirecte sandwich-assays en immunoprecipitatie-assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) voor de detectie en bepaling van (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden, alsmede zuivering van polypeptiden. De antilichamen zullen zich binden aan (E10C)hPYY₃₋₃₆- of (D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptiden met een affiniteit die de juiste is voor de assay-werkwijze die wordt gebruikt.

10 In de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding kan worden voorzien in de vorm van farmaceutisch aanvaardbare zuuradditiezouten voor gebruik in het werkwijzenaspect van de onderhavige uitvinding. Voorbeelden van farmaceutische aanvaardbare zuuradditiezouten van de onderhavige uitvinding omvatten hydrochloride-, hydrobromide-, hydrojodide-, nitraat-, sulfaat-, bisulfaat-, fosfaat-, zure fosfaat-, isonicotinaat-, acetaat-, lactaat-, salicylaat-, citraat-, zure citraat-, tartraat-, pantothenaat-, bitartraat-, ascorbaat-, succinaat-, maleaat-, gentisinaat-, fumaraat-, gluconaat-, glucuronaat-, saccharaat-, formiaat-, benzoaat-, glutamaat-, methaansulfonaat-, ethaansulfonaat-, benzeensulfonaat-, p-tolueensulfonaat-, pamoaat-, palmitaat-, malonaat-, steeraat-, lauraat-, malaat-, boraat-, hexafluorfosfaat-, naftylaar-, glucoheptonaat-, lactobio-
20 naat- en laurylsulfonaatzouten en dergelijke. Zouten van de niet-gepegyleerde varianten behoeven niet farmaceutisch aanvaardbaar te zijn wanneer de variant zal worden gebruikt als een tussenproduct bij de bereiding van het conjugaat van de PEG-PYY₃₋₃₆-variant.

30 De PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding zullen in het algemeen worden toegediend in de vorm van een farmaceutisch preparaat. Het farmaceutische preparaat kan bijvoorbeeld in een vorm zijn die geschikt is voor orale toediening (bijv. een tablet, capsule, pil, poeder, oplossing, suspensie), voor parenterale injectie (bijv. een steriele oplossing, suspensie of emulsie), voor intranasale toediening (bijv. een aërosol, druppels, enz.), voor

rectale toediening (bijv. een suppositorium) of voor transdermale toediening (bijv. een pleister). Het farmaceutische preparaat kan in eenheidsdoseringsvormen zijn die geschikt zijn voor enkelvoudige toediening van nauwkeurige doseringen. Het farmaceutische preparaat zal een gebruikelijke farmaceutische drager en een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding als actief bestanddeel bevatten. Bovendien kan het andere farmaceutische middelen, adjuvantia, enz. omvatten.

10 Werkwijzen voor het bereiden van diverse farmaceutische preparaten van biologische actieve peptiden zijn bekend uit het vak van farmaceutische wetenschappen. Zie bijvoorbeeld Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2005/0009748 (voor orale toediening) en 2004/0157777, 15 2005/0002927 en 2005/0215475 (voor transmucosale toediening, bijv. intranasale of buccale toediening). Zie eveneens *Remington: The Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams en Wilkins, Baltimore, MD, VS, 20^e editie, 2000.

20 De PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding kunnen worden gebruikt met andere farmaceutische middelen voor de behandeling van de ziekte-toestanden of aandoeningen die hierin worden beschreven. Derhalve wordt door de onderhavige uitvinding ook voorzien in werkwijzen voor behandeling die toediening van verbindingen van de onderhavige uitvinding in combinatie met andere farmaceutische middelen omvatten.

30 Geschikte farmaceutische middelen die kunnen worden gebruikt in combinatie met de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding omvatten andere middelen tegen obesitas, zoals cannabinoïd-1 (CB-1)-antagonisten (zoals rimobant), 11 β -hydroxysteroiddehydrogenase-1 (11 β -HSD type 1)-remmers, MCR-4-agonisten, cholecystokinine-A (CCK-A)-agonisten, remmers van de heropname van monoamine (zoals sibutramine), sympathomimetische middelen, agonisten van de 35 β_3 -adrenerge receptor, agonisten van de dopaminereceptor (zoals bromocriptine), analoga voor de receptor van melanocytt stimulerend hormoon, agonisten van de 5HT_{2c}-

receptor, antagonisten van melanine concentrerend hormoon, leptine, leptineanaloga, agonisten van de leptinereceptor, galanineantagonisten, lipaseremmers (zoals tetrahydrolipstatine, dat wil zeggen orlistat), anorectische middelen

5 (zoals een bombesineagonist), antagonisten van de neuro-peptide-Y-receptor (bijv. antagonisten van de NPY Y5-receptor), thyromimetische middelen, dehydroepiandrosteron of een analogon daarvan, agonisten of antagonisten van de glucocorticoidreceptor, antagonisten van de orexinerecep-

10 tor, agonisten van de glucagonachtige peptide-1-receptor, ciliaire neurotrofe factoren (zoals AxokineTM dat verkrijgbaar is bij Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY, VS, en Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, VS), human agouti-related protein (AGRP)-remmers, antagonist

15 van de ghrelinereceptor, antagonisten of omgekeerde agonisten van de histamine 3-receptor, agonisten van de neuromedine U-receptor, MTP/ApoB-remmers (bijv. voor de darmen selectieve MTP-remmers, zoals dirlotapide) en dergelijke.

20 Middelen tegen obesitas die de voorkeur hebben voor gebruik in combinatie met de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding omvatten antagonist

van de CB-1-receptor, voor de darm selectieve MTP-remmers, CCKa-agonisten, agonisten van de 5HT2c-receptor, antagonist

25 van de NPY Y5-receptor, orlistat en sibutramine. Voorkeursantagonisten van de CB-1-receptor voor gebruik in de werkwijze van de onderhavige uitvinding omvatten: rimonabant (SR141716A, ook bekend onder de handelsnaam AcompliaTM) is verkrijgbaar bij Sanofi-Synthelabo of kan worden bereid als beschreven

30 in Amerikaans octrooischrift 5.624.941; N-(piperidine-1-yl)-1-(2,4-dichloorfenyl)-5-(4-joodfenyl)-4-methyl-1H-pyrazool-3-carboxamide (AM251) is verkrijgbaar bij TocrisTM, Ellisville, MO, VS; [5-(4-broomfenyl)-1-(2,4-dichloorfenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidiny1)-1H-pyrazool-3-carboxami-

35 de] (SR147778) dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaans octrooischrift 6.645.985; N-(piperidine-1-yl)-4,5-difenyl-1-methylimidazool-2-carboxamide, N-(piperidi-

ne-1-yl)-4-(2,4-dichloorfenyl)-5-(4-chloorfenyl)-1-methylimidazool-2-carboxamide, N-(piperidine-1-yl)-4,5-di(4-methylfenyl)-1-methylimidazool-2-carboxamide, N-cyclohexyl-4,5-di(4-methylfenyl)-1-methylimidazool-2-carboxamide, N-

5 (cyclohexyl)-4-(2,4-dichloorfenyl)-5-(4-chloorfenyl)-1-methylimidazool-2-carboxamide en N-(fenyl)-4-(2,4-dichloorfenyl)-5-(4-chloorfenyl)-1-methylimidazool-2-carboxamide, die kunnen worden bereid als beschreven in PCT octrooiaanvraag WO 03/075660; het hydrochloride-, mesylaat- en besylaatzout van 1-[9-(4-chloorfenyl)-8-(2-chloorfenyl)-9H-purine-6-yl]-4-ethylaminopiperidine-4-carbonzuuramide, dat

10 kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2004/0092520; 1-[7-(2-chloorfenyl)-8-(4-chloorfenyl)-2-methylpyrazolo-[1,5-a][1,3,5]triazine-4-yl]-3-ethylaminoazetidine-3-carbonzuur en 1-[7-(2-chloorfenyl)-8-(4-chloorfenyl)-2-methylpyrazolo[1,5-

15 a][1,3,5]triazine-4-yl]-3-methylaminoazetidine-3-carbonzuuramide, die kunnen worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr.2004/0157839;

20 3-(4-chloorfenyl)-2-(2-chloorfenyl)-6-(2,2-difluorpropyl)-2,4,5,6-tetrahydropyrazolo[3,4-c]pyridine-7-on, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2004/0214855; 3-(4-chloorfenyl)-2-(2-chloorfenyl)-7-(2,2-difluorpropyl)-6,7-dihydro-2H,5H-4-

25 oxa-1,2,7-triazaazuleen-8-on, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2005/0101592; 2-(2-chloorfenyl)-6-(2,2,2-trifluorethyl)-3-(4-trifluormethylfenyl)-2,6-dihydropyrazolo[4,3-d]pyrimidine-7-on, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2004/0214838; (S)-4-chloor-N-{[3-(4-chloorfenyl)-4-fenyl-4,5-dihydropyrazool-1-yl]methylaminomethyleen}benzeensulfonamide (SLV-319) en (S)-N-{[3-(4-chloorfenyl)-4-fenyl-4,5-dihydropyrazool-1-yl]methylaminomethyleen}-4-trifluormethylbenzeensulfonamide (SLV-326), die kunnen worden bereid als beschreven in

30 PCT octrooiaanvraag WO 02/076949; N-piperidino-5-(4-broomfenyl)-1-(2,4-dichloorfenyl)-4-ethylpyrazool-3-car-

35

boxamide, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaans octrooischrift 6.432.984; 1-[bis(4-chloorfenyl)methyl]-3-[(3,5-difluorfenyl)methaansulfonylmethyleen]azetidine, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaans octrooischrift 6.518.264; 2-(5-(trifluormethyl)pyridine-2-yloxy)-N-(4-(4-chloorfenyl)-3-(3-cyaanfenyl)butaan-2-yl)-2-methylpropaanamide, dat kan worden bereid als beschreven in PCT octrooiaanvraag WO 04/048317; 4-([6-methoxy-2-(4-methoxyfenyl)-1-benzofuran-3-yl]carbonyl)benzonitril (LY-320135), dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaans octrooischrift 5.747.524; 1-[2-(2,4-dichloorfenyl)-2-(4-fluorfenyl)benzo[1,3]dioxool-5-sulfonyl]piperidine, dat kan worden bereid als beschreven in WO 04/013120 en [3-amino-5-(4-chloorfenyl)-6-(2,4-dichloorfenyl)furo[2,3-b]pyridine-2-yl]fenylmethanon, dat kan worden bereid als beschreven in PCT octrooiaanvraag WO 04/012671.

In de darm werkzame MTP-remmers die de voorkeur hebben voor gebruik in de combinaties, farmaceutische preparaten en werkwijzen van de onderhavige uitvinding omvatten dirilotapide ((S)-N-{2-[benzyl(methyl)amino]-2-oxo-1-fenylethyl}-1-methyl-5-[4'-(trifluormethyl)[1,1'-bifenyl]-2-carboxamido]-1H-indool-2-carboxamide) en 1-methyl-5-[(4'-trifluormethylbifenyl-2-carbonyl)amino]-1H-indool-2-carbonzuur(carbamoylfenylmethyl)amide, die beide kunnen worden bereid met gebruik van werkwijzen die worden beschreven in Amerikaans octrooischrift 6.720.351; (S)-2-[(4'-trifluormethylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur(pentylcarbamoylfenylmethyl)amide, (S)-2-[(4'-tert-butylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur{[(4-fluorbenzyl)methylcarbamoyl]fenylmethyl}amide en (S)-2-[(4'-tert-butylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur[(4-fluorbenzylcarbamoyl]fenylmethyl}amide, die alle kunnen worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr. 2005/0234099A1, (-)-4-[4-[4-[4-[(2S,4R)-2-(4-chloorfenyl)-2-[(4-methyl-4H-1,2,4-triazool-3-yl)sulfonyl]methyl-1,3-dioxolaan-4-yl]methoxy]fenyl]piperazine-1-yl]fenyl]-2-(1R)-1-methylpropyl]-2,4-di-

hydro-3H-1,2,4-triazool-3-on (ook bekend als Mitratapide of R103757), dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooischriften 5.521.186 en 5.929.075, en implitapide (BAY 13-9952), dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaans octrooischrift 6.265.431. De meeste voorkeur hebben dirlotapide, mitratapide, (S)-2-[(4'-trifluormethylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur (pentylcarbamoylfenylmethyl)amide, (S)-2-[(4'-tert-butylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur{[(4-fluorbenzyl)methylcarbamoyl]fenylmethyl}amide of (S)-2-[(4'-tert-butylbifenyl-2-carbonyl)amino]chinoline-6-carbonzuur-[(4-fluorbenzylcarbamoyl)fenylmethyl]amide. Voorkeursantagonisten van de NPY Y5-receptor omvatten: 2-oxo-N-(5-fenylpyrazinyl)spiro[isobenzofuran-1-(3H),4'-piperidine]-1'-carboxamide, dat kan worden bereid als beschreven in Amerikaanse octrooiaanvraag publicatienr.2002/0151456 en 3-oxo-N-(5-fenyl-2-pyrazinyl)spiro[isobenzofuran-1(3H),4'-piperidine]-1'-carboxamide; 3-oxo-N-(7-trifluormethylpyrido[3,2-b]pyridine-2-yl)spiro[isobenzofuran-1(3H)-4'-piperidine]-1'-carboxamide; N-[5-(3-fluorfenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H)-4'-piperidine]-1'-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-(5-fenyl-2-pyrimidinyl)]spiro[cyclohexaan-1,1'(3'H)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3'-oxo-N-[1-(3-chinolyl)-4-imidazolyl]spiro[cyclohexaan-1,1'(3'H)-isobenzofuran]-4-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(5-fenyl-2-pyrazinyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(3-fluorfenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-N-[5-(2-fluorfenyl)-2-pyrimidinyl]-3-oxospiro[5-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(3,5-difluorfenyl)-4-imidazolyl]-3-oxospiro[7-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-fenyl-4-pyrazolyl)spiro[4-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-N-[1-(2-fluorfenyl)-3-pyrazolyl]-3-oxospiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide; *trans*-3-oxo-N-(1-fenyl-3-pyrazolyl)spiro[6-azaiso-

benzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide en trans-3-oxo-N-(2-fenyl-1,2,3-triazool-4-yl)spiro[6-azaisobenzofuran-1(3H),1'-cyclohexaan]-4'-carboxamide, die alle kunnen worden bereid als beschreven in PCT octrooiaanvraag WO 03/082190, en de farmaceutisch aanvaardbare zouten en esters daarvan. Alle hierboven aangehaalde Amerikaanse octrooischriften en publicaties zijn hierin opgenomen door verwijzing.

Volgens het werkwijzenaspect van de onderhavige uitvinding wordt een PYY-agonist van de onderhavige uitvinding alleen of in combinatie met één of meer andere farmaceutische middelen perifeer toegediend aan een patiënt, apart of tezamen, volgens één van de gebruikelijke werkwijzen voor perifere toediening uit de stand der techniek. Dienovereenkomstig kan de PYY-agonist of een combinatie daarvan aan een patiënt parenteraal (bijv. intraveneus, intraperitoneaal, intramusculair of subcutaan), intranasaal, oraal, sublinguaal, buccaal, door middel van inhalatie (bijv. door middel van een aerosol), rectaal (bijv. door middel van suppositoria) of transdermaal worden toegediend. Parenterale toediening is een voorkeurswerkwijze voor toediening en subcutane toediening is een voorkeurswerkwijze voor parenterale toediening.

Preparaten die geschikt zijn voor parenterale injectie omvatten in het algemeen farmaceutisch aanvaardbare steriele waterige of niet-waterige oplossingen, dispersies, suspensies of emulsies, en steriele poeders voor reconstitutie in steriele injecteerbare oplossingen of dispersies. Voorbeelden van geschikte waterige en niet-waterige dragers of verdunningsmiddelen (met inbegrip van oplosmiddelen en vehicula) omvatten water, ethanol, polyolen (propyleenglycol, polyethyleenglycol, glycerol en dergelijke), geschikte mengsels daarvan, triglyceriden, waaronder plantaardige oliën zoals olijfolie, en injecteerbare organische esters zoals ethyleleaat.

Deze preparaten voor parenterale injectie kunnen ook excipiënten bevatten zoals conserveer-, bevochtigings- en

dispergeermiddelen, alsmede solubiliseermiddelen en emulgatoren. Voorkoming van verontreiniging door micro-organismen van de preparaten kan worden gerealiseerd met diverse antibacteriële en antifungale middelen, bijvoorbeeld parabenen, chloorbutanol, fenol, sorbinezuur en dergelijke. Het kan ook gewenst zijn om isotone middelen op te nemen, bijvoorbeeld suikers, natriumchloride en dergelijke. Langdurige absorptie van injecteerbare farmaceutische preparaten kan worden teweeggebracht door het gebruik van middelen die de absorptie kunnen uitstellen, bijvoorbeeld aluminiummonostearaat en gelatine.

De PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding zullen aan een patiënt worden toegediend in een dosering die varieert naar gelang van een aantal factoren, waaronder de wijze van toediening, de leeftijd en het gewicht van de patiënt, de ernst van de ziekte, aandoening of stoornis die wordt behandeld en de farmacologische activiteit van de PYY-agonist die wordt toegediend. De bepaling van de doseertrajecten en de optimale doseringen voor een bepaalde patiënt vallen binnen de normale vakkennis.

Voor parenterale toediening kunnen de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding aan een menselijke patiënt worden toegediend in doseerniveaus in het traject van ongeveer 0,01 µg/kg tot ongeveer 10 mg/kg in een doseerregime op basis van een niet-gepegyleerde variant. Voor de 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ zal het parenterale doseerniveau bijvoorbeeld in het traject van ongeveer 0,01 µg/kg tot ongeveer 10 mg/kg zijn in een doseerregime op basis van een (E10C)hPYY₃₋₃₆ en bij voorkeur in het traject van ongeveer 0,05 mg/kg tot ongeveer 1,0 mg/kg, of van ongeveer 0,05 of 0,1 mg/kg tot ongeveer 1,0 mg/kg, of van ongeveer 0,05 of 0,1 mg/kg tot ongeveer 0,3 of 0,5 mg/kg. Een dosis van 85 mg 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆, dat een molecuulgewicht van ongeveer 34024 Da (30 kDa PEG plus 4024, het molecuulgewicht van het niet-gepegyleerde peptide) heeft, is equivalent met 10 mg op basis van niet-gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆. Het doseerregime kan één of

meer doses daags, bij voorkeur voorafgaand aan een maaltijd zijn of, in het bijzonder bij het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ of het 20K mPEG-maleïmide-(E10C)hPYY₃₋₃₆, heeft een doseerregime van 2 of 3 maal per week of eenmaal
 5 per week of eenmaal per 10-14 dagen de voorkeur.

De uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding worden toegelicht door de volgende voorbeelden. Het zal echter duidelijk zijn dat de uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding niet beperkt zijn tot de specifieke
 10 bijzonderheden van deze voorbeelden, aangezien andere variaties daarvan bekend zullen zijn of in het licht van de onderhavige beschrijving en de aangehechte conclusies voor een deskundige voor de hand zullen liggen. Alle hierin aangehaalde literatuurplaatsen zijn hierdoor opgenomen door
 15 verwijzing.

VOORBEELDEN

Voorbeeld 1

Lineair 30K en 20K mPEG- en 20 K maleïmide((E10C)hPYY₃₋₃₆)

20 Dit voorbeeld voorziet in de bereiding van nagenoeg homogeen mono-gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆, waarbij mPEG (30K of 20K) gebonden is aan rest 10.

(a) Bereiding van (E10C)hPYY₃₋₃₆

25 (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd gesynthetiseerd met een vastefasewerkwijze, waarbij de Fmoc-strategie met activering door 2-(1H-benzotriazool-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorfosfaat (HBTU) (Fastmoc, cycli van 0,15 mmol) in een automatische peptidesynthesizer (model 433A; Applied
 30 Biosystems, Foster City, CA, VS) werd gebruikt. De gebruikte beschermende groepen voor de zijketen waren Trt voor Asn, Gln, Cys en His; tBu voor Ser, Thr en Tyr; Boc voor Lys; OtBu voor Asp en Glu, en Pbf voor Arg. De afsplitsing van het peptide-hars werd voltooid met een mengsel van 9 ml trifluorazijnzuur (TFA), 0,5 g fenol, 0,5 ml
 35 H₂O, 0,5 ml thioanisool en 0,25 ml 1,2-ethaandithiol, gedurende 4 uur bij kamertemperatuur. Het peptide werd neer-

geslagen in ijskoude ethylether en gewassen met ethylether, opgelost in DMSO en gezuiverd met omgekeerde fase-HPLC over een Deltapak C18-ID-kolom (Waters, 15 μ m, 100 Å, 50x300 mm; Cat # WAT011801, Waters, Milford, MA, VS),
 5 waarbij een lineaire gradiënt van 100% oplosmiddel A: 0% oplosmiddel B tot 70% oplosmiddel A: 30% oplosmiddel B in 30 min bij een stroomsnelheid van 80 ml/min werd gebruikt. Oplosmiddel A is een 0,1% oplossing van TFA (trifluorazijnzuur) in water. Oplosmiddel B is een 0,1% oplossing
 10 van TFA in acetonitril. De molecuulmassa van het gezuiverde peptide werd bevestigd door ESI-MS ($M_{\text{gem}}=4024$) en de zuiverheid werd vastgesteld met omgekeerde fase-HPLC (fig. 1).

15 (b) Bereiding van lineair 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 30.000 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokio, Japan) werd selectief gekoppeld aan (E10C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van de cysteine bij rest 10. Lineair 30K mPEG-
 20 maleïmide, opgelost in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH = 7,0, of, als alternatief, 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5, werd onmiddellijk in reactie gebracht met
 25 peptide, hetgeen een peptideconcentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG: (E10C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 opleverde. De reacties werden gedurende 0,5-24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reacties in HEPES met pH 7,0 werden gestopt door verdun-
 30 ning in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5, en onmiddellijk daarna volgde zuivering door chromatografie over een kationenwisselaar. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks onderworpen aan kolomchromatografie over een kationenwisselaar. De reactieproducten
 35 werden beoordeeld door SEC-HPLC (fig. 2).

(c) Zuivering van lineair 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van niet-gemodificeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van lineair 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd als hierboven beschreven, gescheiden over een SP-Sepharose Hitrap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ, VS) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat, pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd 7x verdund met buffer A en opgebracht op de kolom in een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. De kolom werd gewassen met 5-10 kolomvolumina van buffer A. Vervolgens werden de diverse (E10C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 20 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-100 mM. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden vervolgens samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door middel van SDS-PAGE (fig. 3). Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml in een Centriprep 3-concentrator (Amicon Technology Corporation, Northborough, MA, VS) of als alternatief met gebruik van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group, Hannover, Duitsland). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door vergelijken van het piekoppervlak van een RP-HPLC-standaardkromme van PYY₃₋₃₆ (niet afgebeeld). Als alternatief werd de concentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel bepaald door de absorptie bij 280 nm met gebruik van een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van een gezuiverd samengevoegd mengsel van gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC een profiel gemaakt, zoals wordt getoond in fig. 6.

(d) Bereiding van lineair 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 20.000 (Sunbright ME-200MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (E10C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van de cysteine bij rest 10. Lineair 20K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5, werd onmiddellijk in reactie gebracht met (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat een peptideconcentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG: (E10C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1,3:1 werd verkregen. De reacties werden in het donker bij kamertemperatuur gedurende 60 minuten en vervolgens gedurende 16 uur bij 4°C uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks onderworpen aan kolomchromatografie over een kationenwisselaar. De reactieproducten werden beoordeeld met SEC-HPLC.

20 (e) Zuivering van lineair 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodificeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met een hoger molecuulgewicht met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van lineair 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (20 mg eiwit), werd als hierboven beschreven, gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare), geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewassen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse (E10C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM

bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld met SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml met gebruik van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met gebruik van een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. De totale opbrengst van de werkwijze van gezuiverd mono-20K mPEG maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ was 38%. Het gezuiverde samengevoegde mengsel van mono-20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ werd vastgesteld op een zuiverheid van 96% met gebruik van SEC-HPLC.

Voorbeeld 2

Lineair 30K mPEG-maleïmide (D11C)hPYY₃₋₃₆

Dit voorbeeld demonstreert de bereiding van nagenoeg homogeen mono-gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆, waarbij mPEG gebonden is aan rest 11.

(a) Bereiding van (D11C)hPYY₃₋₃₆

(D11C)hPYY₃₋₃₆ werd gesynthetiseerd met een vaste-fase-werkwijze, waarbij de Fmoc-strategie met activering door 2-(1H-benzotriazool-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorfosfaat (HBTU) (Fastmoc, cycli van 0,15 mmol) in een automatische peptidesynthesizer (model 433A; Applied Biosystems, Foster City, CA, VS) werd gebruikt. De gebruikte beschermende groepen voor de zijketen waren Trt voor Asn, Gln, Cys en His; tBu voor Ser, Thr en Tyr; Boc voor Lys; OtBu voor Asp en Glu, en Pbf voor Arg. De afsplitsing van peptide-hars werd voltooid met een mengsel van 9 ml tri-fluorazijnzuur (TFA), 0,5 g fenol, 0,5 ml H₂O, 0,5 ml thioanisool en 0,25 ml 1,2-ethaandithiol, gedurende 4 uur bij kamertemperatuur. Het peptide werd neergeslagen in ijskoude ethylether en gewassen met ethylether, opgelost

in DMSO en gezuiverd met omgekeerde fase-HPLC over een Deltapak C18- ID-kolom (Waters, 15 μ m, 100Å, 50x300 mm) (Cat # WAT011801, Waters, Milford, MA, VS), waarbij een lineaire gradiënt van 100% oplosmiddel A: 0% oplosmiddel B tot 70% oplosmiddel A: 30% oplosmiddel B in 30 minuten bij een stroomsnelheid van 80 ml/min werd gebruikt. Oplosmiddel A is een 0,1% oplossing van TFA (trifluorazijnzuur) in water. Oplosmiddel B is een 0,1% oplossing van TFA in acetonitril. De molecuulmassa van het gezuiverde peptide werd bevestigd met ESI-MS ($M_{\text{gem}} = 4038$) en de zuiverheid werd vastgesteld metn omgekeerde fase- HPLC (fig. 4).

(b) Bereiding van lineair 30K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 30.000 (Sunbright ME-300MA, NOF Corporation, Tokio, Japan) werd selectief gekoppeld aan (D11C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteine bij rest 11. Lineair 30K mPeg-maleïmide, opgelost in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH = 7,0 werd onmiddellijk in reactie gebracht met (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5-24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reacties werden gestopt door verdunning in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5, en onmiddellijk daarna volgende zuivering door chromatografie over een kationenwisselaar. De reactieproducten werden beoordeeld door SEC-HPLC (fig. 5).

Als alternatief werd, in plaats van oplossen van het lineaire 30K mPEG-maleïmide in HEPES, zoals hierboven beschreven, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5, en onmiddellijk in reactie gebracht met (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat een peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De

reacties werden gedurende 0,5-24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld door SEC-HPLC.

(c) Zuivering van lineair 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van niet-gemodificeerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten en met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van lineaire 30K mPEG-maleïmide (D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals hierboven beschreven, gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ, VS), geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). De reactiemengsels werden bij pH 7,0 7x verdund met buffer A en op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. De kolom werd gewassen met 5-10 kolomvolumina van buffer A. Vervolgens werden de diverse (D11C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 20 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-100 mM. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A₂₈₀) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door SEC HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml in een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door vergelijken van het piekoppervlak van een RP-HPLC-standaardkromme van PYY₃₋₃₆ (niet afgebeeld). Van het gezuiverde samengevoegde mengsel van gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC een profiel gemaakt, zoals wordt getoond in fig. 7.

Als alternatief werden de bovenstaande reactiemengsels met pH 4,5 uit (b) hierboven rechtstreeks op de kolom gebracht, waarna werd geëlueerd bij een stroomsnelheid van 2,5 m;/min. De concentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel wordt bepaald door de absorptie bij 280 nm met gebruik van een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt.

Voorbeeld 3

10 Vertakt 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Dit voorbeeld demonstreert de bereiding van nagenoeg homogeen mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆, waarbij mPEG gebonden is aan rest 10.

15 (a) Bereiding van vertakt 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Vertakt mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 43.000 (Sunbright GL2-400MA, NOF Corporation, Tokio, Japan) werd selectief gekoppeld aan (E10C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteine bij rest 10, dat werd bereid zoals beschreven in voorbeeld (1a).

Vertakt 43K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 7,0 werd onmiddellijk in reactie gebracht met (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5-24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reacties in HEPES met pH 7,0 werden gestopt door verdunning in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5, en onmiddellijk daarna volgde zuivering door chromatografie over een kationenwisselaar. De reactieproducten werden beoordeeld door SEC-HPLC (fig. 8).

Als alternatief werd vertakt 43K mPEG-maleïmide opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5 en onmiddellijk in reactie gebracht met (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat een peptideconcentratie van 1 mg/ml en een

relatieve molverhouding van mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reactiemengsels werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht.

5

(b) Zuivering van mono-gepegyleerd vertakt 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het mono-gepegyleerde vertakte 43K mPEG-maleïmide-(E10C)hPYY₃₋₃₆-molecuul werd gescheiden van niet-gemodificeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en moleculen met een hoger molecuulgewicht met gebruik van een enkele chromatografiestap over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van vertakt 43K mPEG maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals hierboven beschreven, gescheiden over een SP-Sepharose Hitrap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). De reactiemengsels met pH 7,0 werden 10x verdund met buffer A en op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. De kolom werd gewassen met 20 5-10 kolomvolumina van buffer A. Vervolgens werden de diverse (E10C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 20 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-100 mM. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A₂₈₀) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. 25 De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml in een Centriprep 3-concentrator (Amicon Technology Corporation) of als alternatief in een 30 Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door analyse van de aminozuren. Van het gezuiverde samengevoegde mengsel van mono-gepegyleerd vertakt 43K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd met 35 gebruik van SEC-HPLC een profiel gemaakt, zoals wordt getoond in fig. 9.

Als alternatief werd de eiwitconcentratie bepaald door vergelijken van het piekoppervlak van een RP HPLC-standaardkromme van PYY₃₋₃₆ (niet afgebeeld) of door middel van de absorptie bij 280 nm met gebruik van een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt.

Voorbeeld 4

Dit voorbeeld beschouwt de bereiding van nagenoeg homogeen mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ met lineaire 12 kD mPEG of vertakte 20 kD mPEG, die gebonden is aan rest 10. Ook beschouwt het de bereiding van nagenoeg homogeen mono-gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ met lineaire 20 kD mPEG, lineaire 12 kD mPEG of vertakte 20 kD mPEG, die gebonden is aan rest 11.

15

(a) Bereiding van lineair 12K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 12.000 (Sunbright ME-120MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (E10C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteine bij rest 10. Lineair 12K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical) met pH 4,5 werd onmiddellijk in reactie gebracht met (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5 tot 24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld door SEC-HPLC of SDS-PAGE.

30

(b) Zuivering van lineair 12K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodi-

35

ficeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere moleculgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van lineair 12K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals

5 hierboven beschreven gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewas-

10 sen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse (E10C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op

15 absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml met

20 behulp van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van het gezuiverde samengevoegde mengsel van 12K

25 mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE een profiel gemaakt.

(c) Bereiding van vertakt 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Vertakt mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer

30 20.000 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (E10C)hPYY₃₋₃₆ op de sulphydrylgroep van cysteine bij rest 10. Vertakt 20K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5 werd onmiddellijk in reactie gebracht met

35 (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat een peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(E10C)hPYY₃₋₃₆ van

ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5 tot 24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtsstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE.

(d) Zuivering van vertakt 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (E10C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodificeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van vertakt 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals hierboven beschreven gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewassen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse (E10C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml met behulp van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van het gezuiverde samengevoegde mengsel van vertakte

20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE een profiel gemaakt.

(e) Bereiding van lineair 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

5 Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 20.000 (Sunbright Me-200MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (D11C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteine bij rest 11. Lineair 20K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical) met pH 4,5 werd
10 onmiddellijk in reactie gebracht met (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5 tot 24 uur in het
15 donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE.

20

(f) Zuivering van lineair 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd
25 (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodificeerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van 20K mPEG-maleïmide (D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals
30 hierboven beschreven gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewassen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse
35 (D11C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25

kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml met behulp van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van het gezuiverde samengevoegde mengsel van 20K mPEG-maleïmide (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE een profiel gemaakt.

15

(g) Bereiding van lineair 12K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Lineair mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer 12.000 (Sunbright Me-120MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (D11C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteine bij rest 10. Lineair 12K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5 werd onmiddellijk in reactie gebracht met (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat een peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ van ongeveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5 tot 24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE.

30

(h) Zuivering van lineair 12K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodi-

35

ficeerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van lineair 12K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals

5 hierboven beschreven gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewas-

10 sen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse (D11C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op

15 absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door middel van SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot

20 0,5-5 mg/ml met gebruik van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van het gezuiverde samengevoegde meng-

25 sel van 12K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE een profiel gemaakt.

(i) Bereiding van vertakt 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Vertakt mPEG-maleïmidereagens met een MW van ongeveer

30 20.000 (Sunbright GL2-200MA, NOF Corporation) werd selectief gekoppeld aan (D11C)hPYY₃₋₃₆ op de sulfhydrylgroep van cysteïne bij rest 10. Vertakt 20K mPEG-maleïmide, opgelost in 20 mM natriumacetaat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, VS) met pH 4,5 werd onmiddellijk in reactie gebracht met

35 (D11C)hPYY₃₋₃₆-peptide door rechtstreekse toevoeging van peptide, zodat peptide in een concentratie van 1 mg/ml en een relatieve molverhouding van mPEG:(D11C)hPYY₃₋₃₆ van on-

geveer 1:1 werd verkregen. De reacties werden gedurende 0,5 tot 24 uur in het donker bij kamertemperatuur uitgevoerd. De reactiemengsels in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 werden rechtstreeks op een chromatografiekolom met een kationenwisselaar gebracht. De reactieproducten werden beoordeeld met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE.

(j) Zuivering van vertakt 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆

Het gepegyleerde (D11C)hPYY₃₋₃₆ uit het reactiemengsel werd gezuiverd tot >95% met gebruik van een enkele chromatografiestap over een ionenwisselaar. Mono-gepegyleerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ werd gescheiden van vrije PEG, niet-gemodificeerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten met gebruik van chromatografie over een kationenwisselaar. Een typisch reactiemengsel van vertakt 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆ (10 mg eiwit) werd zoals hierboven beschreven gescheiden over een SP-Sepharose Hi-trap-kolom (5 ml) (Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare) geëquilibreerd in 20 mM natriumacetaat met pH 4,5 (Buffer A). Het reactiemengsel werd op de kolom gebracht in een stroomsnelheid van 1,0 ml/min. De kolom werd gewassen met 4 kolomvolumina van buffer A bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Vervolgens werden de diverse (D11C)hPYY₃₋₃₆-moleculen van de kolom geëluëerd in 25 kolomvolumina van een lineaire NaCl-gradiënt van 0-200 mM bij een stroomsnelheid van 2,5 ml/min. Het eluens werd op absorptie gecontroleerd bij 280 nm (A_{280}) en fracties van de juiste grootte werden verzameld. De fracties werden samengevoegd naar gelang van de mate van pegylering, zoals vastgesteld door middel van SEC-HPLC. Het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vervolgens geconcentreerd tot 0,5-5 mg/ml met behulp van een Vivaspin 10K-concentrator (Vivascience Sartorius Group). De eiwitconcentratie van de het gezuiverde samengevoegde mengsel werd vastgesteld door de absorptie bij 280 nm met een experimenteel bepaalde extinctiecoëfficiënt. Van het gezuiverde samengevoegde meng-

sel van vertakt 20K mPEG-maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆ werd met gebruik van SEC-HPLC of SDS-PAGE een profiel gemaakt.

Voorbeeld 5

5 Biochemische identificatie

(E10C)hPYY₃₋₃₆, (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de gepegyleerde vormen van (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆ werden geïdentificeerd met diverse biochemische werkwijzen, waaronder respectievelijk electrospray-massaspectrometrie (ESI-MS), SDS-PAGE
10 en SEC-HPLC en RP-HPLC.

(A) Electrospray-ionisatie-massaspectrometrie (ESI-MS) werd uitgevoerd met een LC/MSD-electrospray-massaspectrometer (1100 reeks; Agilent Technologies, Palo Alto, CA, VS) (positieve mode) (voorbeeld 1(a), 2(a)).
15

(B) Omgekeerde fase-chromatografie werd uitgevoerd voor de analyse van (E10C)hPYY₃₋₃₆-peptide (fig. 1 en 4) met een ZORBAX Eclipse XDB-C8- kolom; 4,6 x 150 mm, 5 mm
20 (Cat # 993967-906, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, VS) met een lineaire gradiënt van 100% oplosmiddel A, 0% oplosmiddel B tot 95% oplosmiddel A, 5% oplosmiddel B in 3 minuten, en vervolgens van 95% oplosmiddel A, 5% oplosmiddel B tot 50% oplosmiddel A, 50% oplosmiddel B in 12 minuten bij een stroomsnelheid van 1,5 ml/minuut (voorbeeld
25 1(a)). Oplosmiddel A is een 0,1% oplossing van TFA in water. Oplosmiddel B is een 0,1% van oplossing TFA in acetonitril.

Omgekeerde fase-chromatografie voor de bepaling van
30 gepegyleerd (E10C)hPYY₃₋₃₆ en (D11C)hPYY₃₋₃₆ (niet afgebeeld) werd uitgevoerd met een Vydac C18-kolom (2,1 x 250 mm) (Cat # 218MS552; Vydac, Hesperia, CA, VS) met een lineaire gradiënt van 80% oplosmiddel A, 20% oplosmiddel B tot 40% oplosmiddel A, 60% oplosmiddel B in 48 minuten bij een
35 stroomsnelheid van 0,2 ml/minuut (voorbeeld 1C, 2C). Oplosmiddel A is een 0,1% oplossing van TFA in water. Oplosmiddel B is een 0,085% oplossing van TFA in acetonitril.

(C) Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography (SEC-HPLC)

De reactiemengsels van lineair 30K of vertakt 43K mPEG met (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆, hun samengevoegde mengsels die zijn gezuiverd met een kationenwisselaar en de uiteindelijk gezuiverde producten werden beoordeeld met gebruik van niet-denaturerende SEC-HPLC (voorbeeld 1(b) en (c), 2(b) en (c)). Analytische niet-denaturerende SEC-HPLC werd uitgevoerd met een Shodex KW804 of TSK G4000PWXL (Tosohaas) in 20 mM fosfaatbuffer met pH = 7,4, 150 mM NaCl, bij een stroomsnelheid van 1,0 ml/minuut (eventueel Superdex 200; 7,8 mm x 30 cm, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, VS). Pegylering zorgt voor een sterke toename van het hydrodynamische volume van het eiwit, hetgeen leidt tot een verschuiving naar een kortere retentietijd. In de reactiemengsels van 30K mPEG-maleïmide plus (E10C)hPYY₃₋₃₆ werd een kleine piek waargenomen die overeenkwam met overgebleven niet-gemodificeerd (E10C)hPYY₃₋₃₆, alsmede nieuwe pieken die overeenkomen met gepegyleerde peptidemoleculen (fig. 2). Er werden nieuwe moleculen waargenomen in de reactiemengsels van 30K mPEG-(D11C)hPYY₃₋₃₆ en vertakt 43K mPEG (E10C)hPYY₃₋₃₆, waarbij zeer weinig niet-gemodificeerd (D11C)hPYY₃₋₃₆ of (E10C)hPYY₃₋₃₆ resteerde (fig. 5 en 8). Deze gepegyleerde en niet-gepegyleerde moleculen werden gefractioneerd met SP-Sepharose-chromatografie, en de ontstane gezuiverde mono-mPEG(E10C)hPYY₃₋₃₆- en mPEG(D11C)hPYY₃₋₃₆-moleculen bleken vervolgens bij niet-denaturerende SEC te worden geëlueerd als een enkele piek met een zuiverheid >95% (fig. 6, 7 en 9). De stap van SP-Sepharose-chromatografie verwijderde vrije mPEG, (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ en de verbindingen met hogere molecuulgewichten effectief uit het mono-gepegyleerde lineaire 30K en vertakte 43K mPEG(E10C)hPYY₃₋₃₆ of mPEG(D11C)hPYY₃₋₃₆.

(D) SDS-PAGE

SDS-PAGE (voorbeeld 1 (c)) werd eveneens gebruikt ter beoordeel-
 ing van de reactie, de fracties na zuivering over een kationenwisselaar (fig. 3) en de uiteindelijk gezuiverde
 5 producten. SDS-PAGE werd uitgevoerd over 1 mm dikke 10-NuPAGE-gelen (Invitrogen, Carlsbad, CA, VS) onder zowel reducerende als niet-reducerende omstandigheden en er werd gekleurd met gebruik van een zgn. Novex Colloidal Coomassie™ G-250 staining kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, VS).

10

Biologische assays

De bruikbaarheid van de PYY-agonisten van de onderhavige uitvinding als farmaceutisch actieve middelen bij de vermindering van de gewichtstoename en de behandeling van
 15 obesitas bij zoogdieren (in het bijzonder mensen) kan worden aangetoond door de activiteit van de agonisten in gebruikelijke assays en in de *in vitro* en *in vivo* assays die hierna worden beschreven. Dergelijke assays voorzien eveneens in middelen waardoor de activiteiten van de onderhavige PYY-agonisten kunnen worden vergeleken met de activiteiten van bekende verbindingen.

20

Studies naar de hoeveelheid opgenomen voedsel**Assay van door vasten geïnduceerde hervoeding:** Manne-

25 lijke C57BL/6J-muizen (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, VS) werden met zijn tweeën in een kooi gehuisvest. Ze werden onderworpen aan een cyclus van licht:donker van 12:12 uur (lichten aan om 5.00 uur 's morgens, lichten uit om 5.00 's middags) en kregen RMH3000-pellets knaagdierenvoer van Purina (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, VS) en water ad lib. De muizen arriveerden op een leeftijd van 7-8 weken en men liet ze gedurende een minimale periode van 10 dagen acclimatiseren voordat de studie plaatsvond. Op de dag van de studie waren de muizen 9-12 weken
 30 oud. De dag voor het begin van de studie werden de muizen ondergebracht in kooien met een nieuwe onderlaag en zonder voedsel, maar ze kregen wel de vrije beschikking over wa-

35

ter. Gedurende de nacht (20-24 uur) werd voedsel onthouden. Op de dag van de studie kregen de muizen een i.p. injectie (volume van de dosis = 5 ml/kg) toegediend, werden teruggebracht naar hun kooi en werd tevoren afgewogen voedsel onmiddellijk in de kooi geplaatst. Het gebruikte doseervehiculum was 20 mM Na-acetaat met pH 4,5, 50 mM Na-Cl. De dosis werd berekend op de actieve PYY-entiteit zonder pegylering. De controle met vehiculum, het oorspronkelijke PYY, 30K mPEG-maleïmi-de(E10C)hPYY₃₋₃₆ en 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ werden getest in 3 doses (0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg en 1,0 mg/kg). Het voedsel werd 2, 4, 6 en 24 uur na het doseren opnieuw gewogen. De onderlaag werd gecontroleerd op gemorst voedsel, dat werd gewogen en in de berekeningen opgenomen. De cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel werd berekend door aftrekken van het gewicht van het voedsel op elk tijdstip vanaf het gewicht van het voedsel waarmee werd begonnen. Het percentage (%) remming werd berekend door middel van $(FI_{\text{behandeling}} - FI_{\text{veh.}}) / FI_{\text{veh.}} \times 100$.

Fig. 10 toont de cumulatieve opname van voedsel gedurende 6 uur na de i.p. injectie van de drie doses van het oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ (fig. 10A) en het 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆ (fig. 10B). Zowel het oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ als het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ liet een dosisafhankelijke daling zien van de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel gedurende het verloop van 6 uur.

Het 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ produceerde in 6 uur eveneens een dosisafhankelijke daling (fig. 11A) en ook van de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel gedurende 24 uur (fig. 11B). Het effect van 43K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ op het verminderen van de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel was echter niet zo groot als werd aangetoond voor het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ bij dezelfde dosis (0,1 mg/kg) na zowel 6 uur als 24 uur.

De effecten van 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ op de door vasten geïnduceerde hervoeding na injectie van 0,1

mg/kg (s.c.) werden ook vergeleken met de effecten van 30K maleïmide(D11C)hPYY₃₋₃₆. Hoewel het 30K mPEG-maleïmide-(D11C)hPYY₃₋₃₆-polypeptide een vermindering van de cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel (food intake; FI) gedurende het verloop van 24 uur veroorzaakte, zoals wordt getoond in de onderstaande tabel, was het effect toch niet zo groot als werd waargenomen voor het 30K maleïmide-(E10C)hPYY₃₋₃₆.

Behandeling		2 uur FI	% verandering	4 uur FI	% verandering	6 uur FI	% verandering	24 uur FI	% verandering
Vehiculum	Gemiddeld	2,03	0,00	2,93	0,00	4,06	0,00	10,79	0,00
	GSA	0,16	8,06	0,22	7,46	0,46	11,30	0,67	6,23
E10C	Gemiddeld	1,89	-6,99	2,16	-26,21	2,45	-39,62	8,04	-25,48
	GSA	0,27	13,45	0,27	9,09	0,26	6,33	0,88	8,14
D11C	Gemiddeld	2,14	5,22	2,56	-12,56	3,09	-24,02	9,08	-15,88
	GSA	0,15	7,30	0,23	7,72	0,27	6,68	0,42	3,88

10

De effecten van lineair 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ werden vergeleken met 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (beide van voorbeeld 1). In een studie waarin een dosis van 0,1 mg/kg (i.p.) werd geïnjecteerd in mannelijke muizen zijn de resultaten als volgt in de onderstaande tabel.

15

% verandering in cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel versus behandeling met vehiculum

Behandeling	2 uur FI	4 uur FI	6 uur FI	24 uur FI	48 uur FI
30K E10C	-56	-65	-78	-47	-20
20K E10C	-65	-73	-79	-36	-17

20

Evenzo zijn in een tweede studie waarin de voedings-effecten van lineair 20K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ en 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ na een dosis van 0,1 mg/kg (s.c.) worden vergeleken de resultaten als volgt in de onderstaande tabel.

25

% verandering in cumulatieve hoeveelheid opgenomen voedsel
versus behandeling met vehiculum

Behandeling	2 uur FI	4 uur FI	6 uur FI	24 uur FI	48 uur FI	72 uur FI
30K E10C	-13	-24	-29	-20	-12	-2
20K E10C	-45	-55	-58	-28	-14	-5

5 De concentraties van PYY in het plasma na s.c. injectie
waren als volgt

Behandeling	2 uur FI	4 uur FI	6 uur FI	24 uur FI	30 uur FI	48 uur FI
30K E10C	151±58	204±48	308±29	139±27	79±14	40±6
20K E10C	110±21	186±37	204±14	62±16	45±12	13±3

Assay van hoeveelheid spontaan opgenomen voedsel:

10 Mannelijke C57BL/6J-muizen (The Jackson Laboratory) werden
afzonderlijk gehuisvest en men stond voor de studie een
acclimatisatie van 2 weken toe. Ze werden onderworpen aan
een licht/donker cyclus van 12/12, kregen ad lib poedervormig
voer te eten, en hadden bovendien de vrije beschikking
over water. Op de dag voor de toediening werden de muizen
15 in voedselopnamekamers, en men stond een acclimatisatie
van 1 dag toe. De volgende dag kregen de muizen een i.p.
of subcutane (s.c.) injectie toegediend juist voor de
lichten uitgingen (4 uur 's middags). De hoeveelheid opge-
nomen voedsel werd automatisch gevolgd met tussenpozen van
20 10 minuten gedurende het gehele tijdsverloop en de li-
chaamsgewichten werden dagelijks gemeten. De resultaten
worden getoond voor i.p. injectie van oorspronkelijk
PYY₃₋₃₆ en het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (fig. 12) en
voor s.c. injectie van oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ en het 30K
25 mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (fig. 13). Hoewel zowel het
oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ als het 30K mPEG-maleïmide-
(E10C)hPYY₃₋₃₆ een onmiddellijke vermindering van de cumu-
latieve hoeveelheid opgenomen voedsel te weegbrachten in
vergelijking met muizen die met vehiculum waren behandeld,
30 was het effect van de verminderde hoeveelheid opgenomen
voedsel dat door het 30K mPEG-maleïmide (E10C)hPYY₃₋₃₆ was

veroorzaakt van veel langere duur dan het effect dat door het oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ werd veroorzaakt. Gekoppeld aan een langduriger effect op de hoeveelheid opgenomen voedsel liet het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ ook een langduri-
 5 ge blootstelling aan het plasma zien na de enkele injectie (0,1 mg/kg, i.p.) (fig. 14). Terwijl het oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ een klaringssnelheid van 16 ml/min/kg en een C_{max} van 38 nM had, had het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ een klaringssnelheid van 0,2 ml/min/kg en een C_{max} van 267 nM.
 10 De PYY-waarden in het plasma werden in muizen gemeten met gebruik van een hPYY-radioimmunoassay kit (Linco Research, Inc., St. Louis, MO, VS).

Mini-pomp-assay met ob/ob-muizen: Mannelijke ob/ob-
 15 muizen (The Jackson Laboratory) met een leeftijd van 8-9 weken (n=26) kregen de normaal voer en er werden 14-daagse osmotische mini-pompen (Alza Corp., Mountain View, CA, VS) geïmplantend die vehiculum (zoutoplossing), PYY₃₋₃₆ (0,1 mg/kg/dag) of 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ (0,03 mg/-
 20 kg/dag) toedienden. De voedselgewichten en de lichaamsge-
 wichten werden dagelijks gemeten. De samenstelling van het lichaamsvet werd bepaald op dag 0 en dag 13. Aan het eind van de studie werden bloedmonsters genomen. Er waren voor deze groepen geen verschillen van betekenis voor wat be-
 25 treft de hoeveelheid opgenomen voedsel, het lichaamsge-
 wicht of de samenstelling van het lichaamsvet. Het PYY in het plasma werd bepaald na beëindiging van de studie door middel van radioimmunoassay als hiervoor werd beschreven. In de met oorspronkelijke PYY₃₋₃₆ behandelde groep waren de
 30 PYY-niveaus in het plasma na meting 15±2 ng/ml; bij de met 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ behandelde groep waren de PYY-niveaus in het plasma 132±22 ng/ml.

In vitro bindingsstudies

SPA voor ligandbinding:

De SPA voor ligandbinding meet de concurrerende verdringing van van een radio-label voorzien PYY uit Y2-re-

ceptoren en maakt gebruik van microbollen die een scintillatieverbinding (SPA-parels) bevatten en bekleed zijn met lectine-tarwekiemagglutinine (wheat germ agglutinin; WGA); deze werden verkregen bij Amersham Biosciences (Cat. No. RPNQ 0085). Suspensies van menselijke neuroblastoom KAN-TS-cellen die Y2-receptoren op hun oppervlak tot expressie brengen (Fuhlendorf et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 182-186, 1990) werden bereid met behulp van een buffer voor het oogsten van cellen bestaande uit 50 mM HEPES-buffer (pH 7,4), 145 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM glucose, 0,1% BSA, 5% DMSO en proteaseremmers (Roche). De SPA-assays werden in drievoud uitgevoerd in platen met 96 putjes, waarbij 50.000 cellen/putje, ¹²⁵I-PYY (40.000 cpm/putje) en SPA-parels (0,5 mg/putje) werden gebruikt in assay-buffer bestaande uit 50 mM HEPES-buffer met pH 7,4, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 0,1% (gew./vol.) BSA, 0,025% (gew./vol.) bacitracine en 0,025% natriumazide. De proefliganden werden in diverse concentraties (0,032 tot 500 nM) aan het assay-mengsel toegevoegd, dat vervolgens gedurende 16-24 uur bij kamertemperatuur werd geïncubeerd terwijl werd geschud. Men liet de platen gedurende 1 uur staan en vervolgens werd geteld met gebruik van een detector (MicroBeta[®] Trilux; Perkin Elmer, Boston, MA, VS). De resultaten voor hPYY₃₋₃₆ en 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ van voorbeeld 1 worden getoond in fig. 15.

GTPγ[³⁵S]-bindingsassays aan NPY Y2R-receptoren

De functionele assay is een GTPγ[³⁵S]-bindingsassay die wordt uitgevoerd in NEN Flashplates (plaat met 96 putjes). De membranen werden bereid uit KAN-TS-cellen als beschreven door Bass et al., *Mol. Pharm.*, 50: 709-715, 1990. De GTPγ[³⁵S]-bindingsassays werden in tweevoud uitgevoerd in een FlashPlate[™] met 96 putjes met gebruik van 100 pM GTPγ[³⁵S] en 10 µg membraan per putje in assaybuffer bestaande uit 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 3 mM MgCl₂, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 100 mM NaCl, 5 µM GDP, 0,1% runder-serumalbumine en de volgende proteaseremmers: 100 µg/ml

5 bacitracine, 100 µg/ml benzamidine, 5 µg/ml aprotinine, 5
µg/ml leupeptine. Het assaymengsel werd vervolgens gedu-
rende 60 minuten bij 30°C geïncubeerd met toenemende con-
centraties van testverbinding (concentratiekromme met 6
10 punten; logaritmische verdunningen in het traject van 10^{-12}
M tot 10^{-5} M). De FlashPlates™ werden vervolgens gedurende
10 minuten gecentrifugeerd bij 2000xg. Stimulering van
GTYPy[³⁵S]-binding werd vervolgens gemeten met gebruik van
een Microbeta™-detector. De EC₅₀ en de intrinsieke activi-
10 teit werden berekend met gebruik van Prism Graphpad. De
resultaten voor hPYY₃₋₃₆ en 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆
van voorbeeld 1 worden getoond in fig. 16. De EC₅₀-waarden
voor het 30K mPEG-maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ en het 20K mPEG-
maleïmide(E10C)hPYY₃₋₃₆ van voorbeeld 1 waren vergelijkbaar
15 (bijv. 4,3 nM en 4,6 nM wanneer werd gemeten in dezelfde
assay).

Sequentiellijst

<110> PFIZER PRODUCTS INC
Summers, Neena L.
Finn, Rory F.
Siegel, Ned R.

<120> PYY AGONISTS AND USES THEREOF

<130> PC32768A

<150> US 60/650,366

<151> 2005-02-04

<150> US 60/733,656

<151> 2005-11-04

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 36

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Pro Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu
1 5 10 15

Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr
20 25 30

Arg Gln Arg Tyr
35

<210> 2
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
20 25 30

Arg Tyr

<210> 3
<211> 34
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Cys Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn

1 5 10 15
 Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 4
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Cys Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
 20 25 30

Arg Tyr

<210> 5
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 atcaaaccg aggtccccg ctgtgacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctgggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 6
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atcaaaccg aggtccccg ctgcgacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctgggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 7
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 atcaaaccg aggtccccg cgaatgtgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
 tccctgcgcc actacctcaa cctgggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 8
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
atcaaaccg aggtccccg cgaatgcgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
tccctgcgcc actacctcaa cctgggcacc cggcagcggc at 102

CONCLUSIES

1. Polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ met de aminozuursequentie

IKPEAPGCDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:3]

5 of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

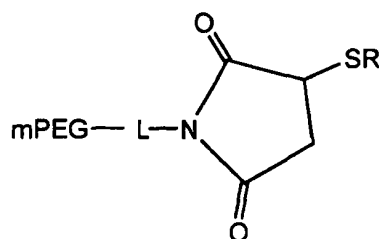
2. Polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ met de aminozuursequentie

IKPEAPGECASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY-NH₂ [SEQ ID NO:4]

10 of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

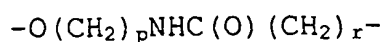
3. Conjugaat omvattende een polyethyleenglycol (PEG) en het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆.

4. Conjugaat volgens conclusie 3 met de formule 3

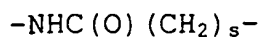


3

15 waarin de PEG methoxy-PEG is, en lineair of vertakt is, en een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht in het traject van
20 ongeveer 1 kD tot 50 kD heeft,
L een groep is met de formule



25 waarin elke p en r onafhankelijk een geheel getal van 1 tot 6 zijn,
of L een groep is met de formule

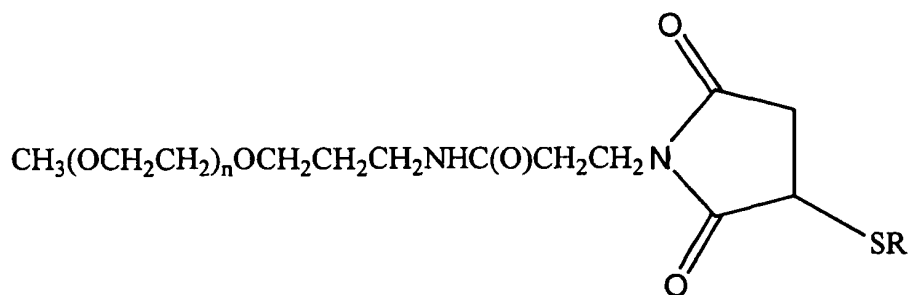


waarin s een geheel getal van 1 tot 6 is en

- 5 $-\text{SR}$ het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ of (D11C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is.

5. Conjugaat volgens conclusie 4, waarin de mPEG lineair is.

- 10 6. Conjugaat volgens conclusie 5 met de formule 4

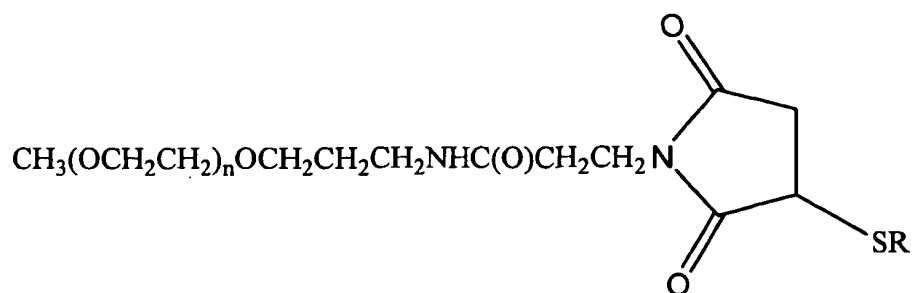


4

- 15 waarin n een geheel getal in het traject van ongeveer 600 tot 750 is en $-\text{SR}$ het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is.

7. Conjugaat volgens conclusie 6, waarin de $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$ -rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van
20 ongeveer 30 kD heeft.

8. Conjugaat volgens conclusie 5 met de formule 4

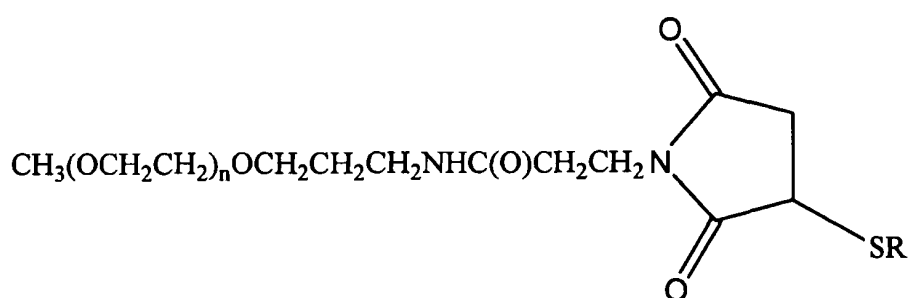


4

waarin n een geheel getal in het traject van ongeveer 375 tot 525 is en -SR het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is.

9. Conjugaat volgens conclusie 8, waarin de
5 (OCH₂CH₂)_n-rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van ongeveer 20 kD heeft.

10. Conjugaat volgens conclusie 5 met de formule 4



10

4

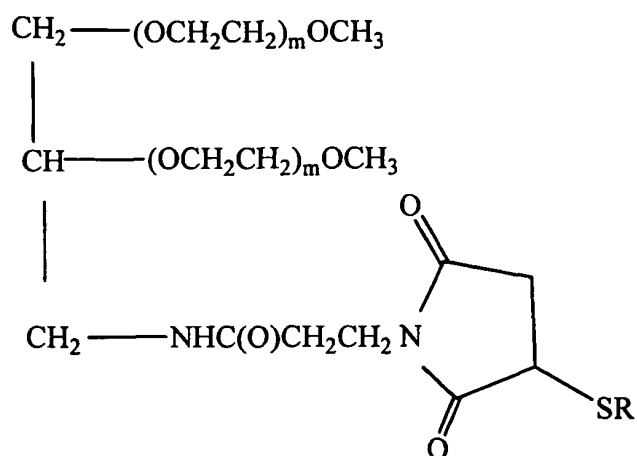
waarin n een geheel getal in het traject van ongeveer 600 tot 750 is en -SR het polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is.

15 11. Conjugaat volgens conclusie 10, waarin de (OCH₂CH₂)_n-rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht van ongeveer 30kD heeft.

12. Conjugaat volgens conclusie 4, waarin de mPEG vertakt is.

20 13. Conjugaat volgens conclusie 12, waarin de mPEG een vertakte glycerol is.

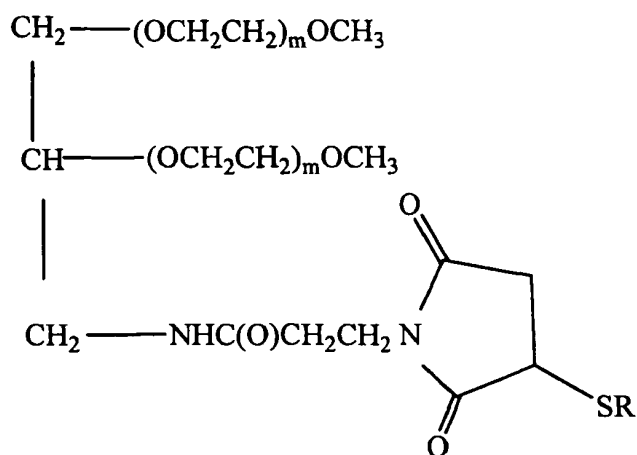
14. Conjugaat volgens conclusie 13 met de formule 5

5

waarin elke m ongeveer gelijk is en een geheel getal in
 5 het traject van ongeveer 450 tot 500 is en $-\text{SR}$ het poly-
 peptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de
 thiolgroep van cysteine is.

15. Conjugaat volgens conclusie 14, waarin elke
 (OCH₂CH₂) _{m} -rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht in
 10 het traject van ongeveer 20 kD tot 22 kD heeft.

16. Conjugaat volgens conclusie 13 met de formule 5

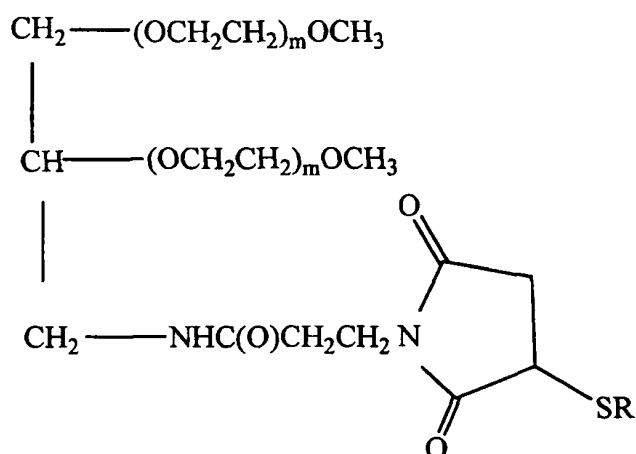
5

15

waarin elk m gelijk is en een geheel getal in het traject
 van ongeveer 450 en 500 is en $-\text{SR}$ het polypeptide
 (D11C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiol-
 groep van cysteine is.

17. Conjugaat volgens conclusie 16, waarin elke $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_m$ -rest een gewichtsgemiddeld molecuulgewicht in het traject van ongeveer 20 kD tot 22 kD heeft.

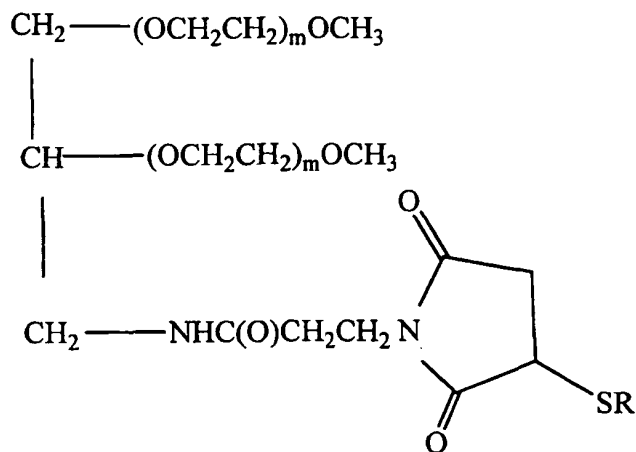
18. 43k (vertakte glycerol)mPEG-maleïmide-
5 (E10C)hPYY₃₋₃₆-conjugaat met de formule 5



5

10 waarin elke m ongeveer gelijk is en -SR het polypeptide (E10C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiolgroep van cysteïne is, of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

19. 43k (vertakte glycerol)mPEG-maleïmide-
15 (D11C)hPYY₃₋₃₆-conjugaat met de formule 5



5

waarin elke m ongeveer gelijk is en -SR het polypeptide (D11C)hPYY₃₋₃₆ is, waarin S het zwavelatoom van de thiol-groep van cysteïne is, of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan.

- 5 20. Farmaceutisch preparaat omvattende het polypepti-
de volgens conclusie 1 of 2 of het conjugaat volgens één
van de conclusies 3-19, of een farmaceutisch aanvaardbaar
zout daarvan, en een farmaceutisch aanvaardbare drager.

- 10 21. Farmaceutisch preparaat volgens conclusie 20, dat
bovendien een tweede middel omvat dat een middel tegen
obesitas is.

- 15 22. Gebruik van het polypeptide volgens conclusie 1
of 2 of het conjugaat volgens één van de conclusies 3-19
of een farmaceutisch aanvaardbaar zout daarvan bij de ver-
vaardiging van een geneesmiddel voor het behandelen van
obesitas of een aandoening met overgewicht bij zoogdieren
of voor het remmen van de gewichtstoename, het verminderen
van de hoeveelheid opgenomen voedsel of het verminderen
van de hoeveelheid opgenomen calorieën bij een zoogdier.

- 20 23. Polynucleotide dat codeert voor het polypeptide
volgens conclusie 1 of 2.

24. Monoklonaal antilichaam dat specifiek bindt aan
een polypeptide dat de aminozuursequentie bevat zoals ge-
toond in SEQ ID NO: 3 of SEQ ID NO: 4.

- 25 25. Monoklonaal antilichaam volgens conclusie 24,
waarbij het polypeptide gepegyleerd is op de cysteïnerest.

1031067

FIG. 1

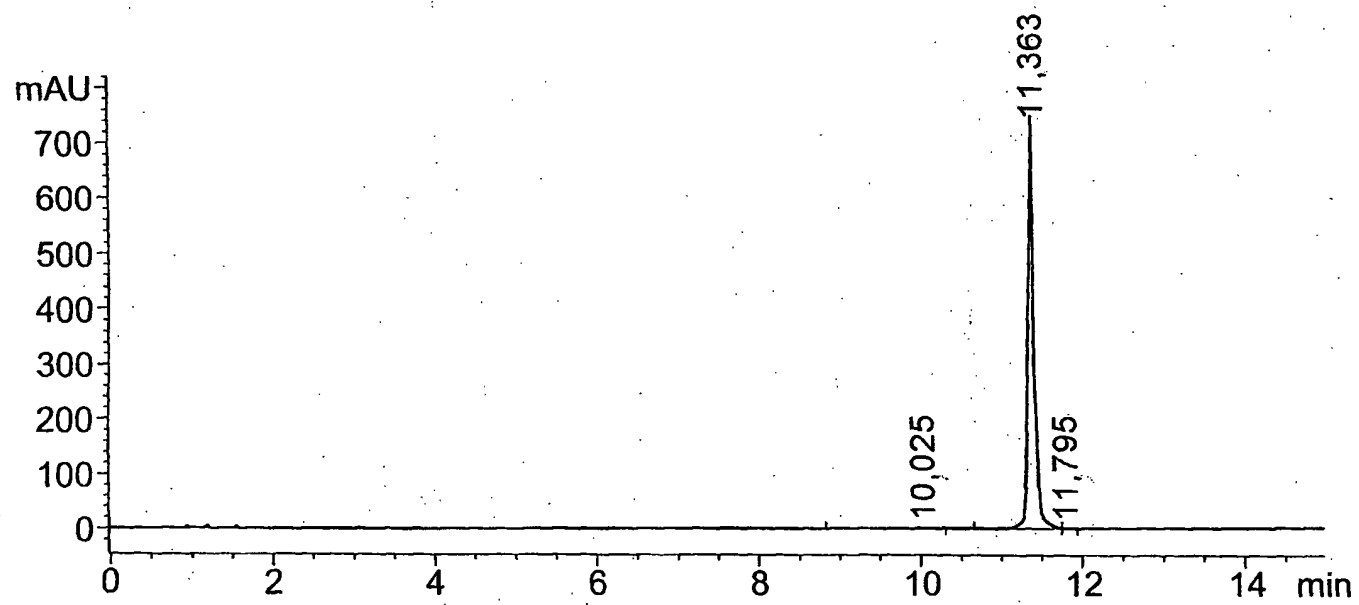


FIG. 2

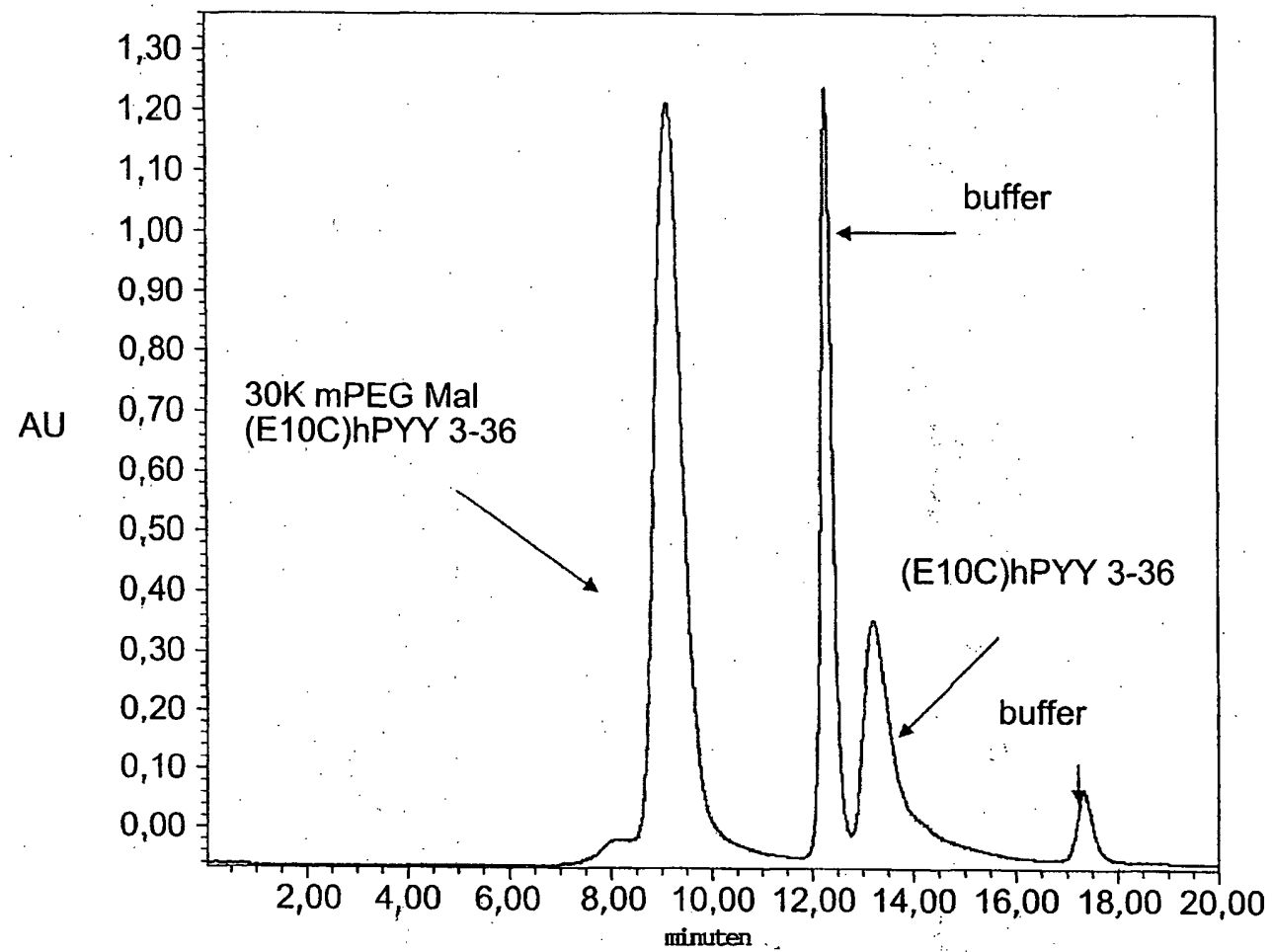
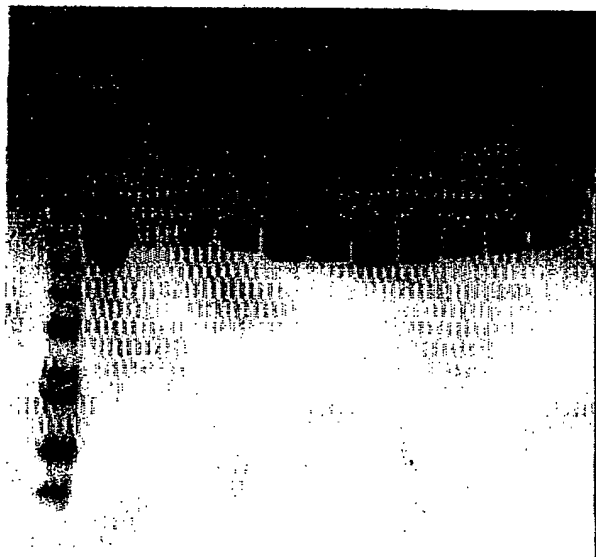


FIG. 3

MW L FT 4 5 6 7 8 9 10 11 12



MW 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

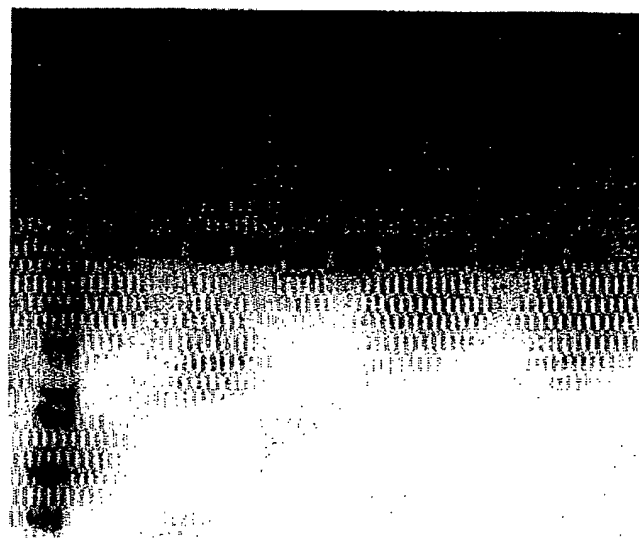


FIG. 4

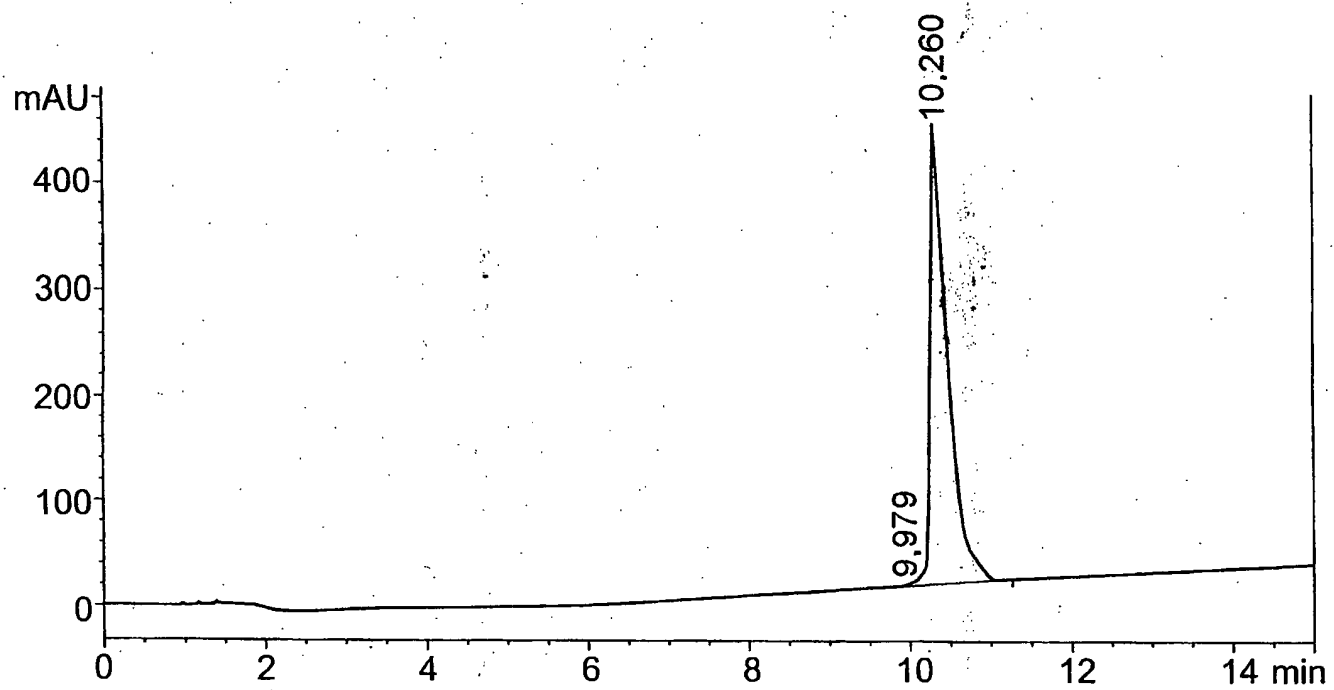


FIG. 5

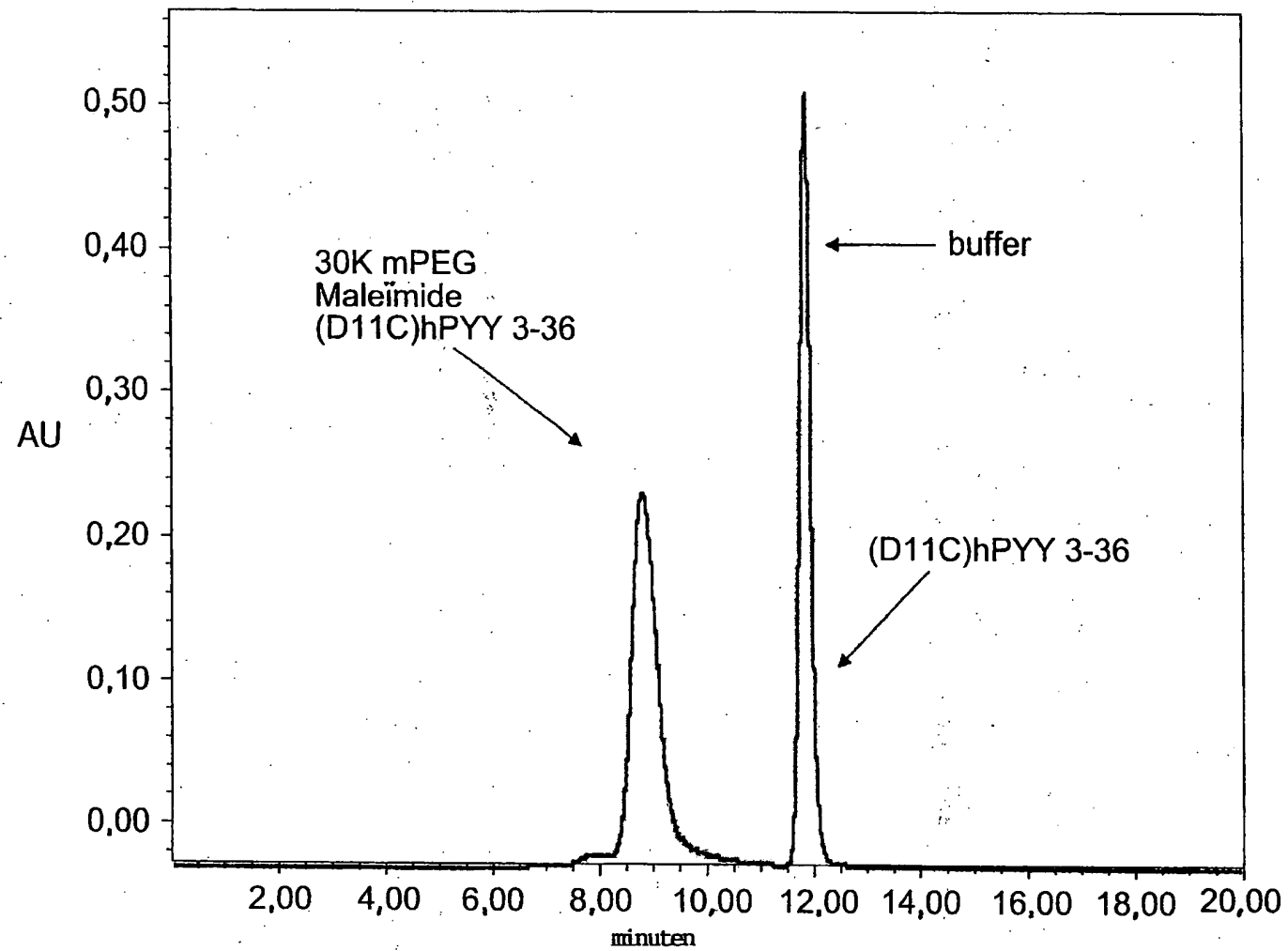


FIG. 6

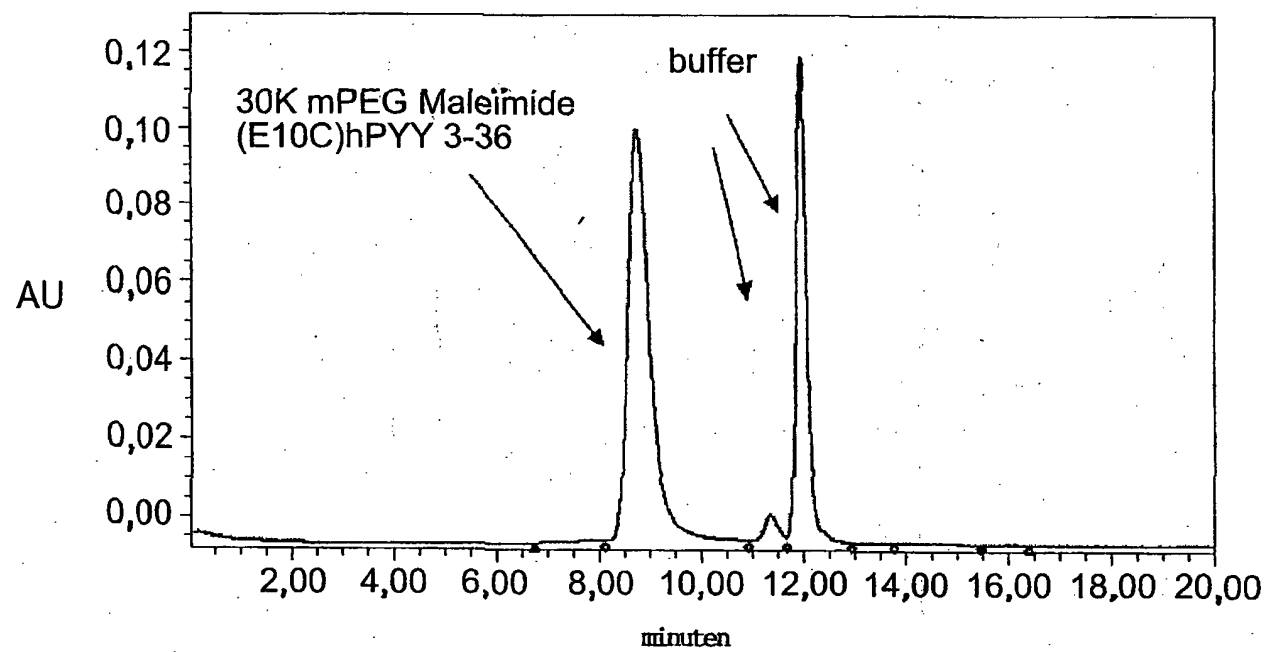


FIG. 7

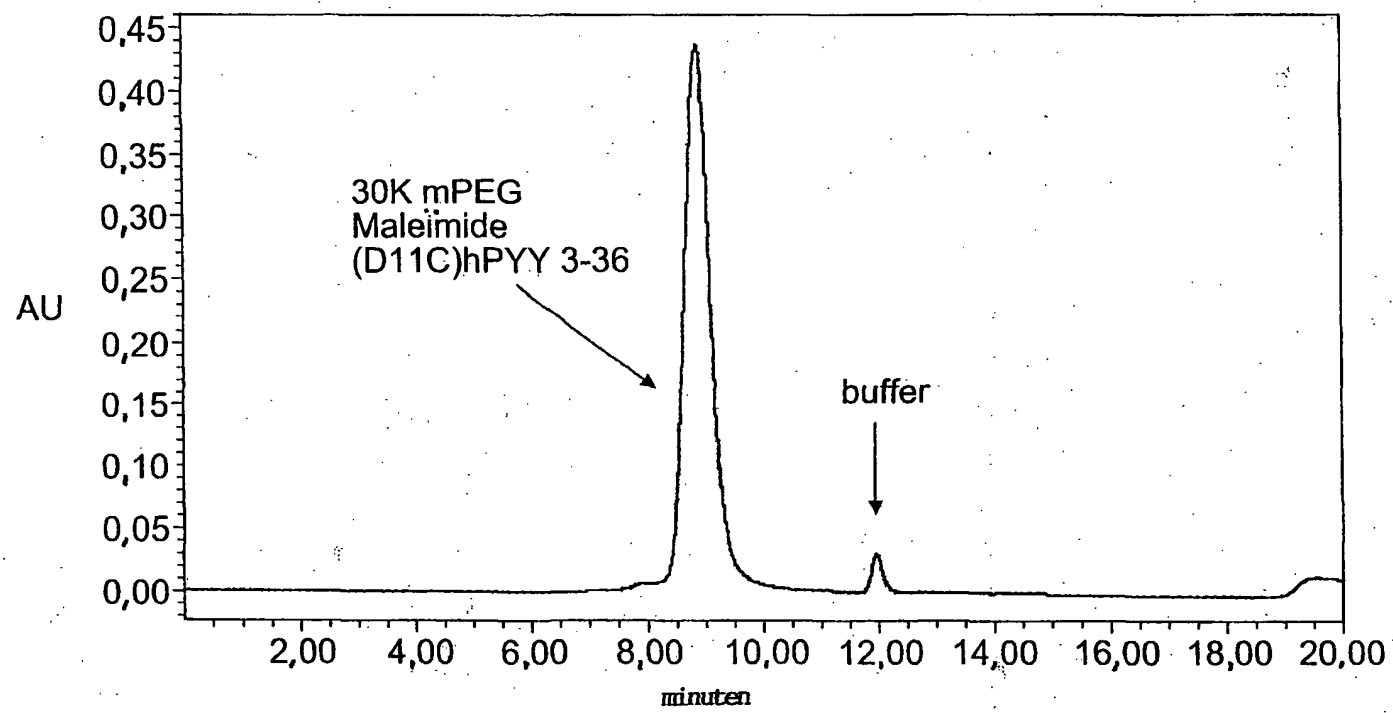


FIG. 8

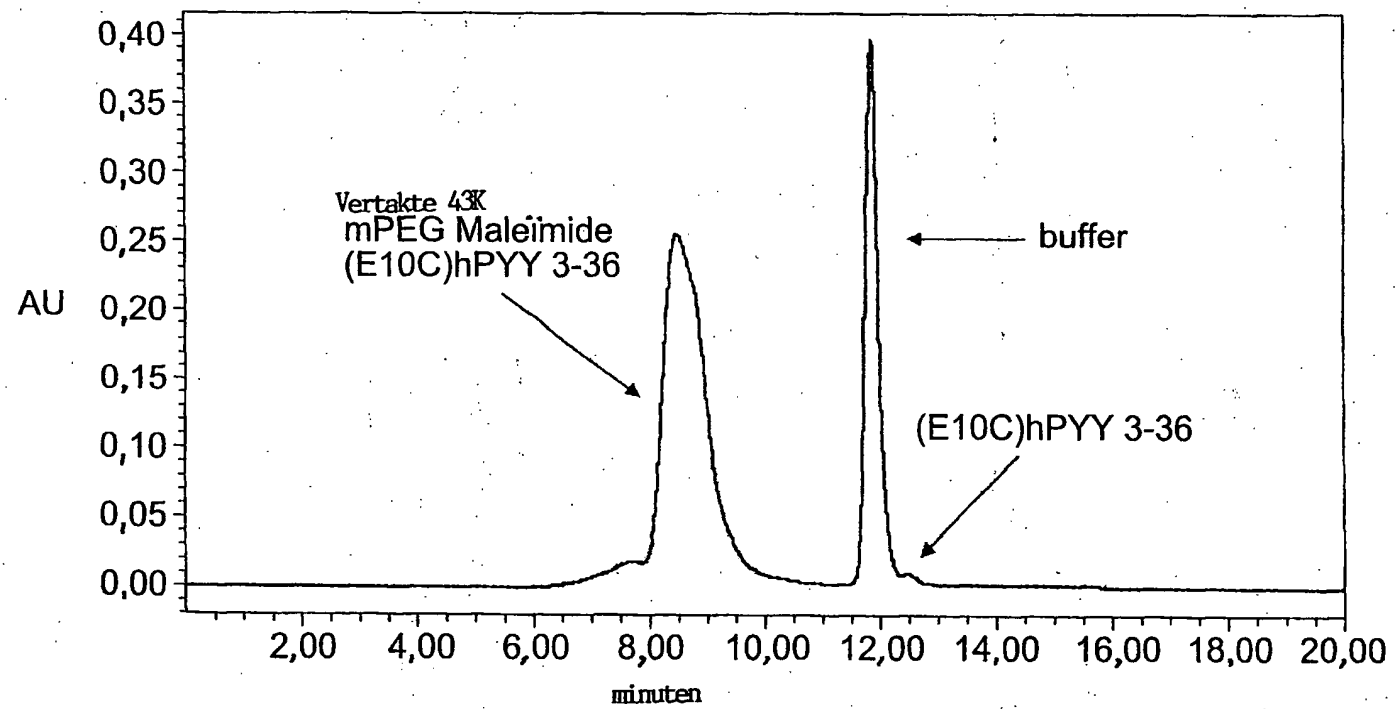


FIG. 9

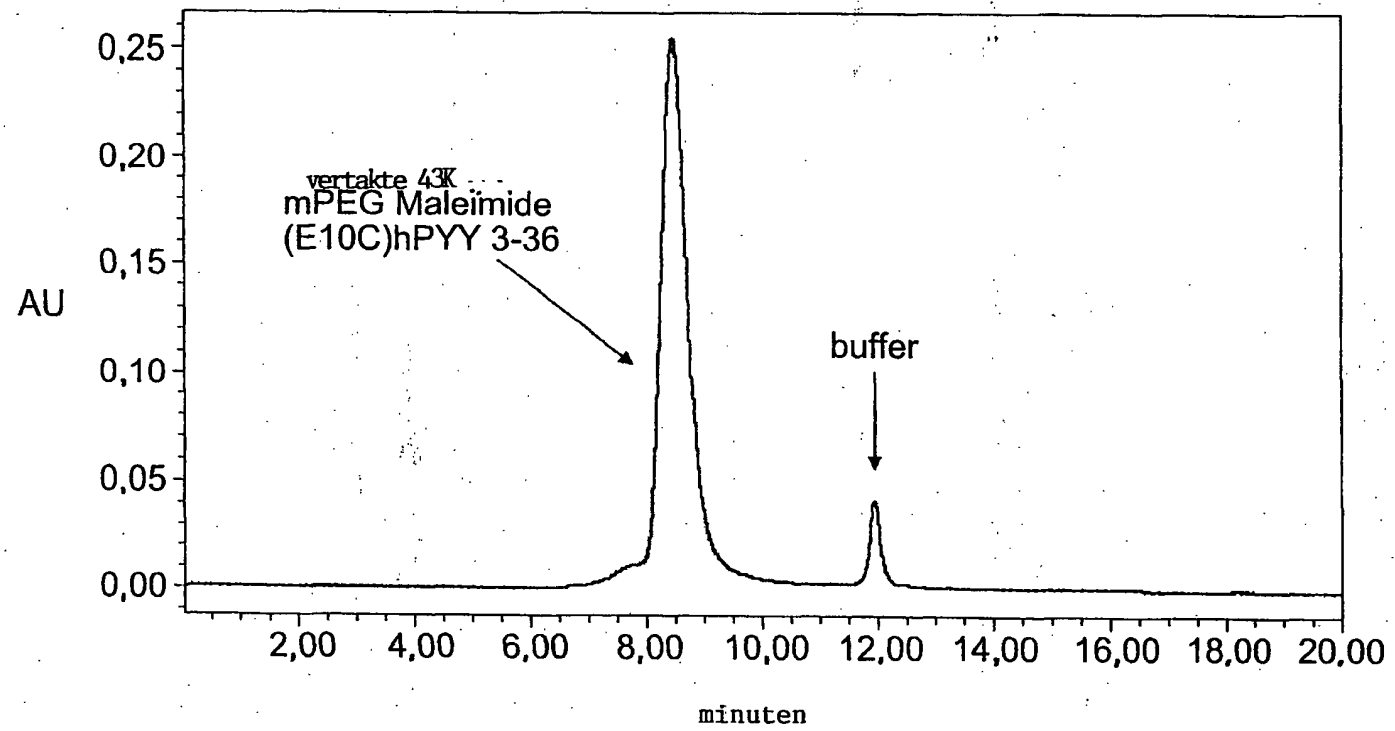
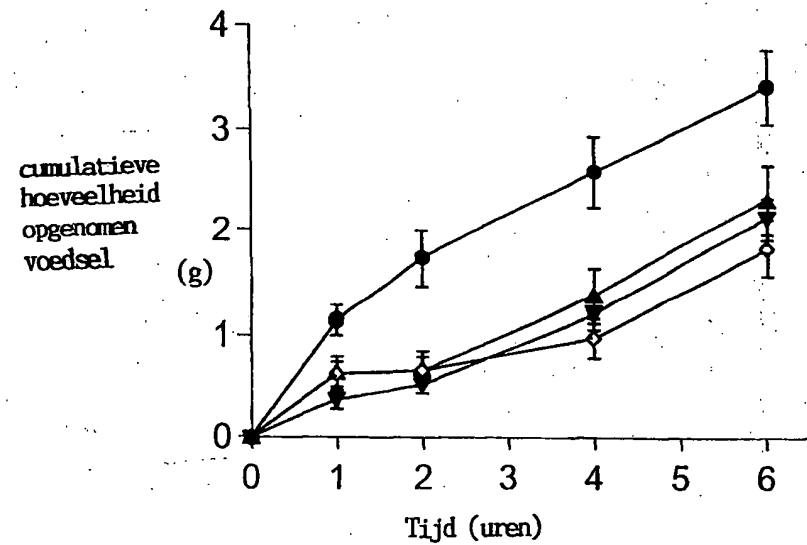
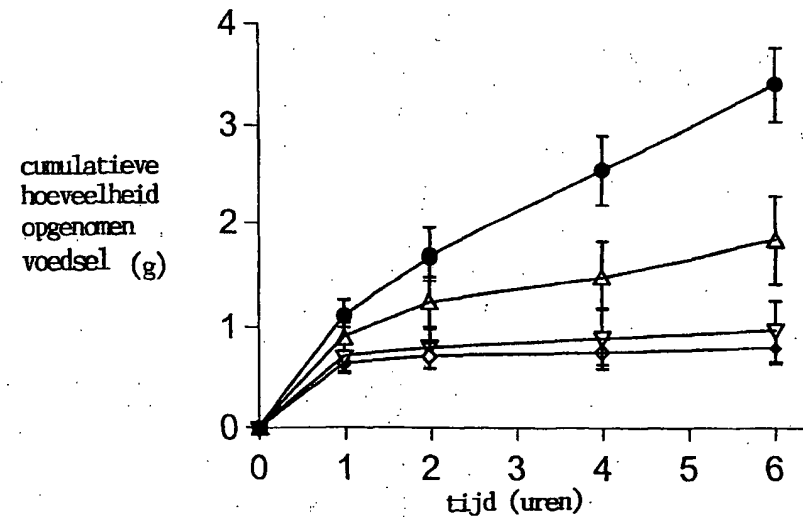


FIG. 10A



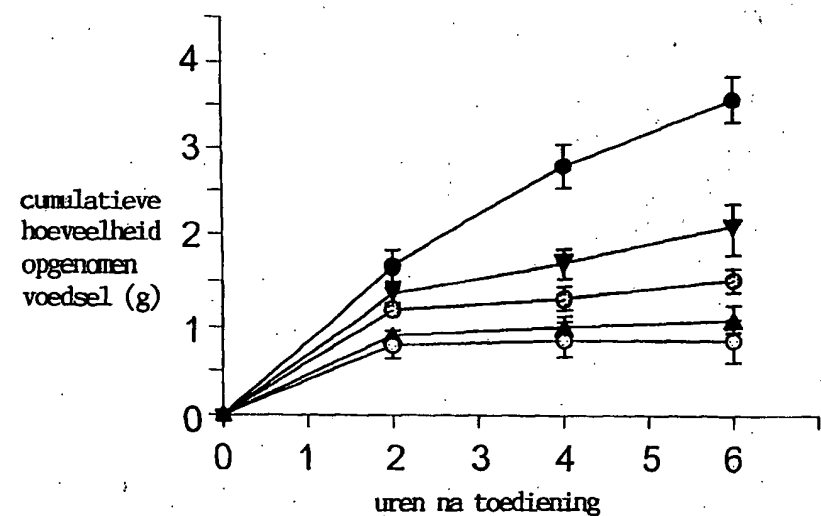
- vehiculum
- ▲ 0,1 mg/kg hPYY 3-36
- ▼ 0,3 mg/kg hPYY 3-36
- ◆ 1,0 mg/kg hPYY 3-36

FIG. 10B



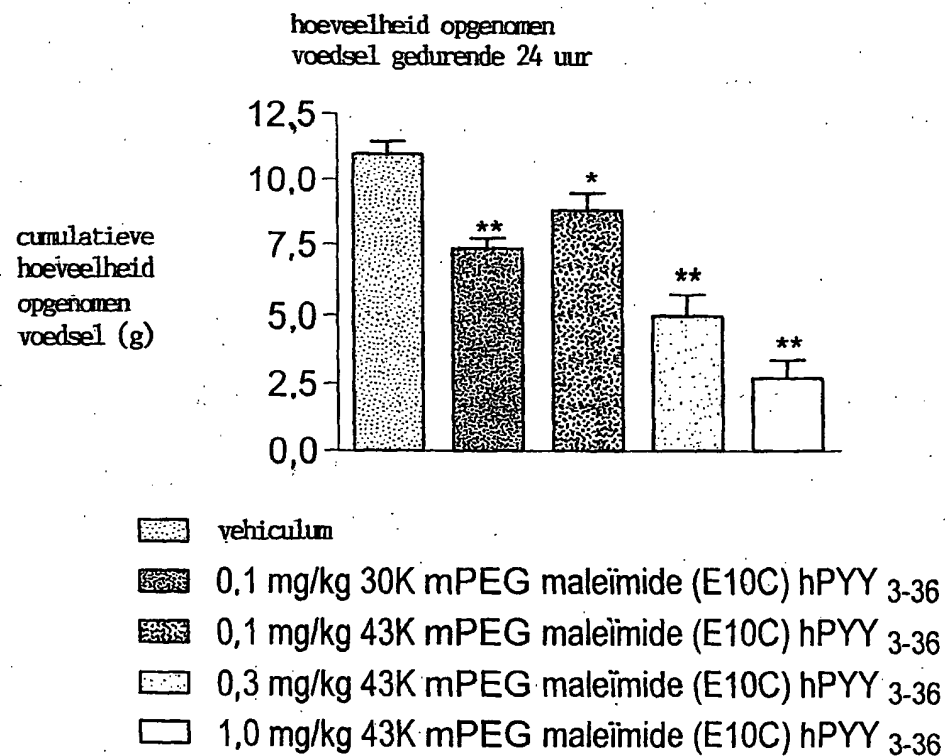
- vehiculum
- ▲ 0,1 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- ▼ 0,3 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- ◆ 1,0 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36

FIG. 11A



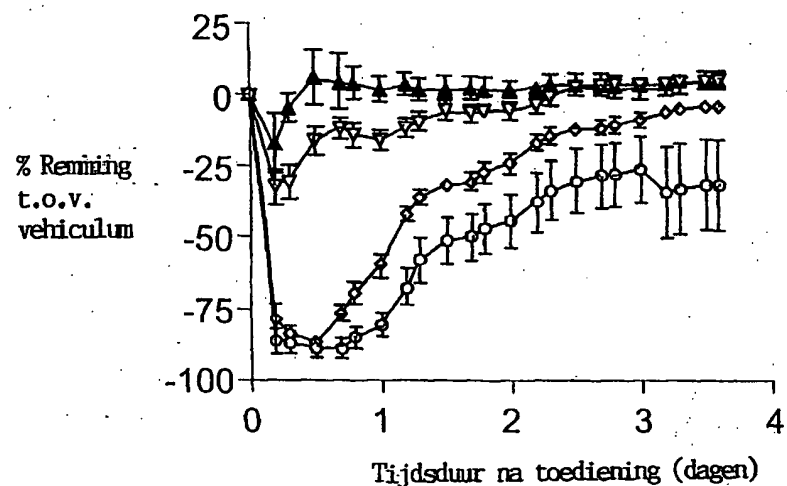
- vehicle
- 0,1 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- ▲ 0,1 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- ▼ 0,3 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- 1,0 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36

FIG. 11B



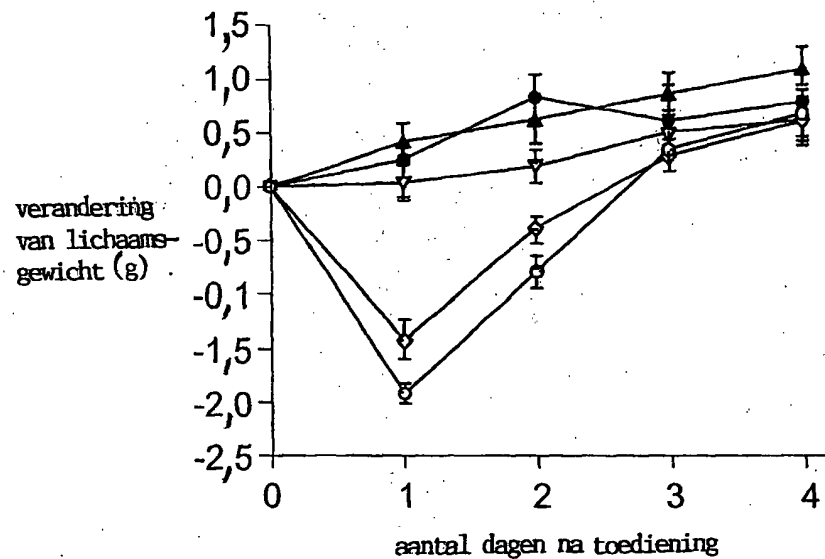
- vehicle
- 0,1 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- 0,1 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- 0,3 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36
- 1,0 mg/kg 43K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36

FIG. 12A



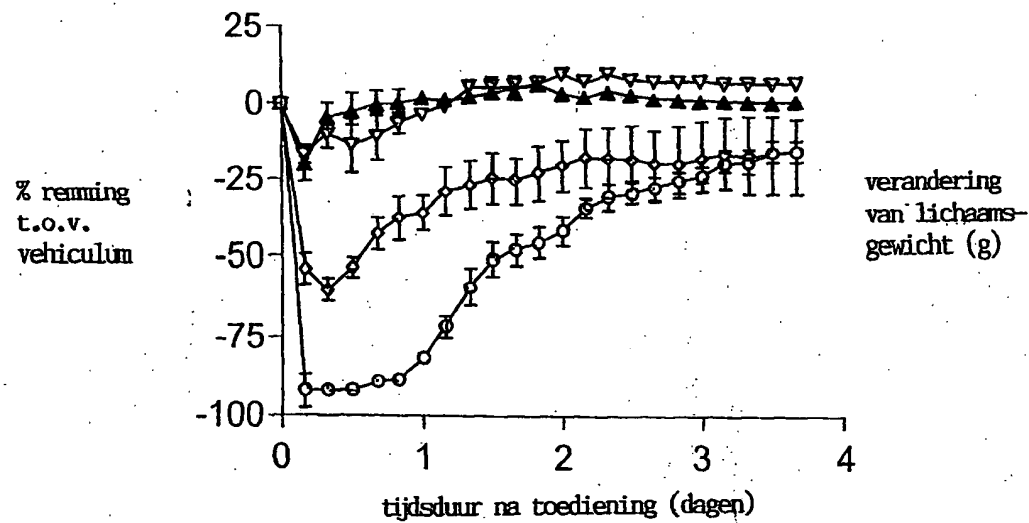
- △— 0,1 mg/kg PYY 3-36 (n=4)
- ▽— 0,03 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=3)
- ◇— 0,1 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=4)
- 0,3 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=4)

FIG. 12B



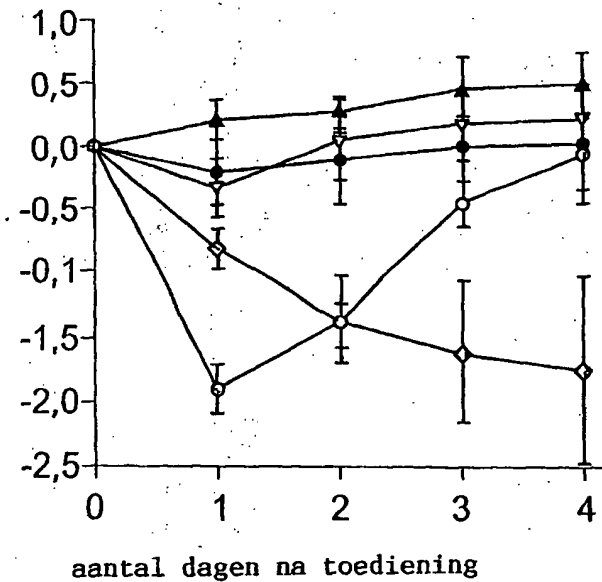
- vehiculum (n=8)
- ▲— 0,1 mg/kg PYY 3-36 (n=8)
- ▽— 0,03 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=8)
- ◇— 0,1 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=8)
- 0,3 mg/kg 30K mPEG maleimide (E10C) hPYY 3-36 (n=8)

FIG. 13A



- ▲ 0.1 mg/kg PYY₃₋₃₆ (n=4)
- ▼ 0.03 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=3)
- ◇ 0.1 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=4)
- 0.3 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=4)

FIG. 13B



- vehiculum (n=8)
- ▲ 0.1 mg/kg PYY₃₋₃₆ (n=8)
- ▼ 0.03 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=8)
- ◇ 0.1 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=8)
- 0.3 mg/kg 30K mPEG maleïmide (E10C) hPYY₃₋₃₆ (n=8)

FIG. 14A

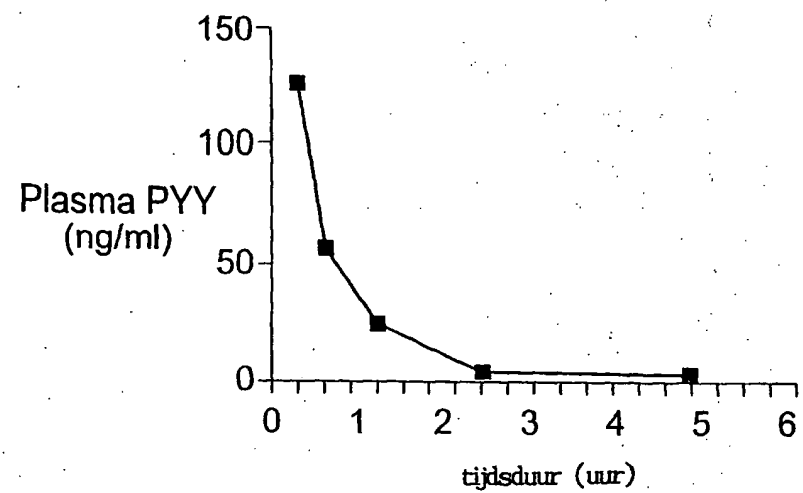


FIG. 14B

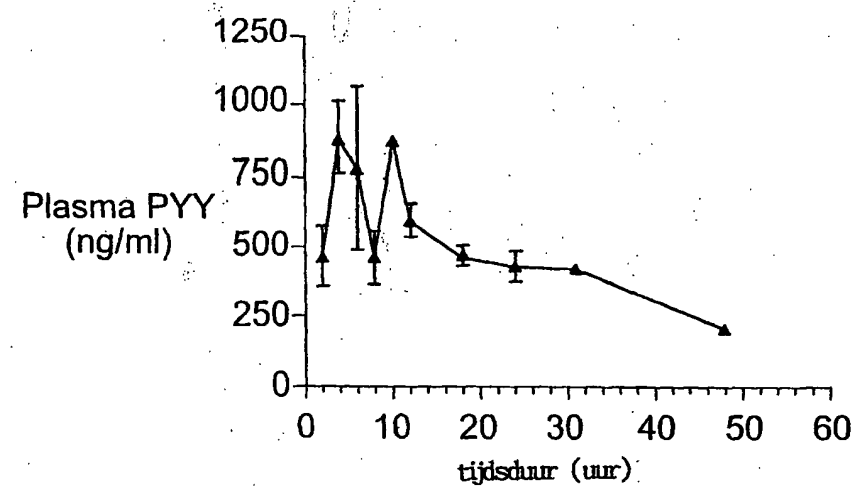


FIG. 15

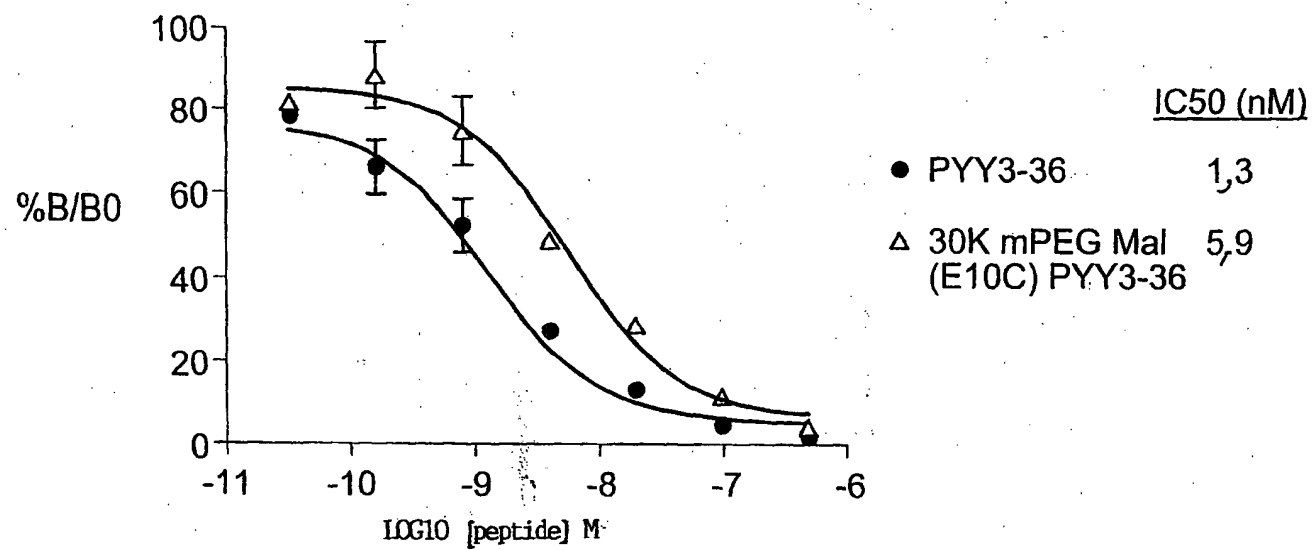
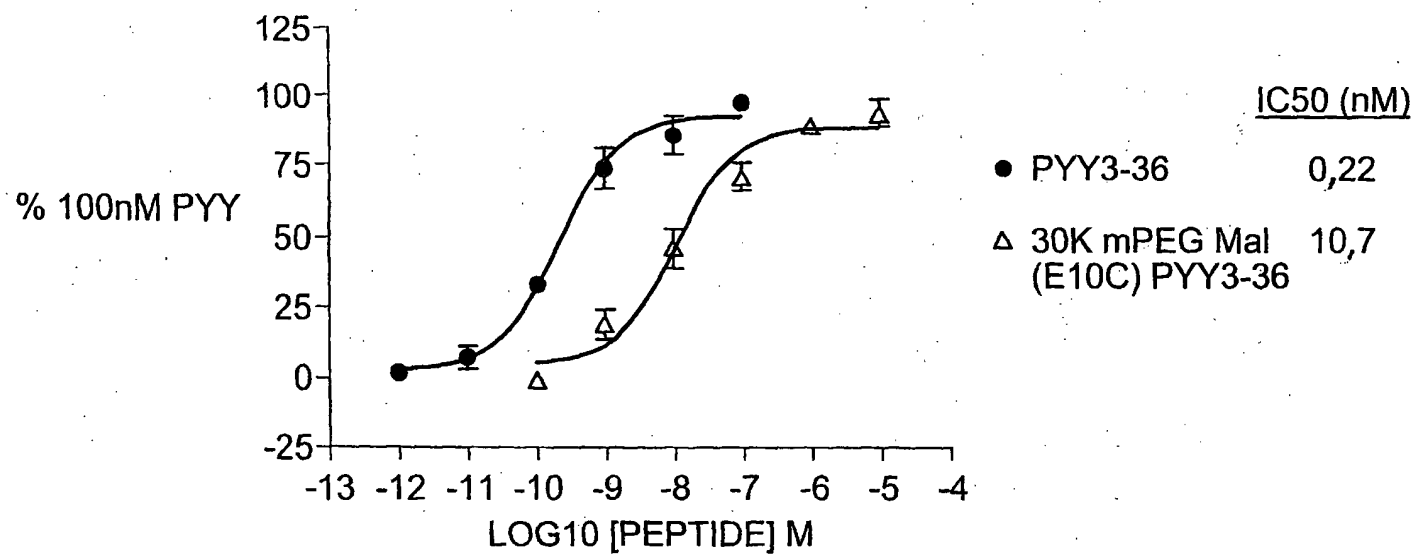


FIG. 16





RAPPORT BETREFFENDE HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK

Octroolaanvraag Nr.:

NO 135729
NL 1031067

VAN BELANG ZIJNDE LITERATUUR			
Categorie	Vermelding van literatuur met aanduiding voor zover nodig, van speciaal van belang zijnde passages	Van belang voor conclusie(s)Nr.:	Internationale classificatie
	ONVOLLEDIG ONDERZOEK zie aanvullingsblad C -----		INV. C07K14/575 A61K38/22 A61K47/48
D,A	WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 april 2003 (2003-04-03) * het gehele document * -----	1-28	
D,A	WO 2004/089279 A (YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD; RUBINSTEIN, MENACHEM; SHECHTER,) 21 oktober 2004 (2004-10-21) * het gehele document * -----	1-28	
D,P, A	SHECHTER ET AL: "Reversible PEGylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, deel 579, nr. 11, 25 april 2005 (2005-04-25), bladzijden 2439-2444, XP005344451 ISSN: 0014-5793 * het gehele document * -----	1-28	Onderzochte gebieden van de techniek C07K A61K
Indien gewijzigde conclusies zijn ingediend, heeft dit rapport betrekking op de conclusies ingediend op :			
Plaats van onderzoek		Datum waarop het onderzoek werd voltooid	Vooronderzoeker (EOB)
's-Gravenhage		12 Oktober 2006	GROENENDIJK, M
CATEGORIE VAN DE VERMELDE LITERATUUR X : op zichzelf van bijzonder belang Y : van bijzonder belang in samenhang met andere documenten van dezelfde categorie A : achtergrond van de stand van de techniek O : verwijzend naar niet op schrift gestelde van de techniek P : literatuur gepubliceerd tussen voorrangs- en indieningsdatum T : niet tijdig gepubliceerde literatuur over theorie of principe ten grondslag liggend aan de uitvinding E : andere octrooipublicatie maar gepubliceerd op of na indieningsdatum D : in de aanvraag genoemd L : om andere redenen vermelde literatuur & : lid van dezelfde octrooifamilie, corresponderende literatuur document			

**ONVOLLEDIG ONDERZOEK
AANVULLINGSBLAD C**

Octroolaanvraag Nr.:

NO 135729

NL 1031067

Aangezien de conclusies 22-24 zijn gericht op een methode ter behandeling van het menselijk/dierlijk lichaam, is de recherche t.a.v. deze conclusies gericht op het gestelde effect van de verbindingen/samenstellingen.

**AANHANGSEL BEHORENDE BIJ HET RAPPORT BETREFFENDE
HET ONDERZOEK NAAR DE STAND VAN DE TECHNIEK,
UITGEVOERD IN DE OCTROOIAANVRAGE NR.**

NO 135729
NL 1031067

Het aanhangsel bevat een opgave van elders gepubliceerde octrooiaanvragen of octrooien (zogenaamde leden van dezelfde octrooifamilie), die overeenkomen met octrooischriften genoemd in het rapport.

De opgave is samengesteld aan de hand van gegevens uit het computerbestand van het Europees Octrooibureau per

De juistheid en volledigheid van deze opgave wordt noch door het Europees Octrooibureau, noch door het Bureau voor de Industriële eigendom gegarandeerd; de gegevens worden verstrekt voor informatiedoeleinden.

12-10-2006

In het rapport genoemd octrooigeschrift	Datum van publicatie	Overeenkomend(e) geschrift(en)	Datum van publicatie
WO 03026591 A	03-04-2003	BR 0212985 A	30-08-2005
		CA 2461345 A1	03-04-2003
		CN 1596119 A	16-03-2005
		EP 1499277 A2	26-01-2005
		JP 2005508324 T	31-03-2005
		MX PA04002751 A	08-09-2005
WO 2004089279 A	21-10-2004	GEEN	