

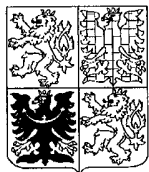
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 2055

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **01.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **03.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/97121264**

(33) Země priority: **EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/07748**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/27897**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

C 07 K 17/02

C 12 N 11/02

A 61 P 5/02

(71) Přihlašovatel:

APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.
V., Curaçao, NL;

(72) Původce:

Veronese Francesco Maria, Padova, IT;
Caliceti Paolo, Padova, IT;
Schiavon Oddone, Padova, IT;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob selektivní přípravy specifických
konjugátů polyethylenglykol - GRF**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu selektivní preparace specifických konjugátů hGRF-PEG, jež obsahují jednu nebo více jednotek PEG (na mol hGRF) kovalentně vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N α , přičemž tento způsob spočívá v tom, že konjugační reakce mezi peptidem hGRF a aktivovaným PEG se provádí v roztoku a požadovaný konjugát hGRF-PEG se může chromatograficky purifikovat. Konjugáty připravené tímto postupem, jakož i jejich využití při léčbě, prevenci nebo diagnóze deficiencie růstového hormonu jsou rovněž předmětem předkládaného řešení.

CZ 2000 - 2055 A3

Způsob selektivní přípravy specifických konjugátů polyethylenglykol - GRF

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu selektivní přípravy
5 specifických konjugátů hGRF-PEG, které v molekule hGRF (lidského
GRF) obsahují jednu nebo více jednotek polyethylenglykolu (PEG)
kovalentně vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N^α, přičemž tento
způsob spočívá v tom, že konjugační reakce mezi peptidem hGRF
a aktivovaným PEG se provádí v roztoku a požadovaný konjugát
10 hGRF-PEG se purifikuje chromatografickými metodami.

Vynález se dále týká konjugátů připravených tímto způsobem,
jakož i jejich využití v léčbě, prevenci nebo diagnose poruch
souvisejících s růstovým hormonem.

Dosavadní stav techniky

15 Na začátku 80. let několik skupin izolovalo a charakterizovalo
faktor uvolňující růstový hormon (GRF, growth hormone releasing
factor).

GRF (také nazývaný somatorelin) je peptid, secernovaný
hypothalamem, který prostřednictvím příslušného receptoru může
20 stimulovat uvolňování růstového hormonu (GH, growth hormone)
z předního laloku hypofysy. Vyskytuje se jako peptid o 44, 40 nebo 37
aminokyselinách; 44-aminokyselinová forma může přecházet
fyziologicky na kratší formy. Všechny tři formy vykazují aktivitu,
přičemž za aktivitu zodpovídá hlavně prvních 29 aminokyselinových
25 zbytků. Syntetický peptid odpovídající aminokyselinové sekvenci 1-29
lidského GRF [hGRF(1-29)], nazývaný též Sermorelin, byl připraven

metodami rekombinantní DNA technologie, jak je popsáno v evropském patentu EP 105 759.

Sermorelin se ve formě acetátu používá pro diagnostiku a léčbu deficience růstového hormonu.

5 GRF má prokázaný terapeutický účinek při léčbě některých poruch souvisejících s růstovým hormonem. Použití GRF ke stimulaci uvolňování růstového hormonu (GH) představuje fyziologický způsob posilování růstu dlouhých kostí nebo proteinového anabolismu.

10 Jeden z problémů provázejících využití GRF je jeho krátký biologický poločas (přibližně 12 až 30 minut). Peptid hGRF(1-29)-NH₂ podléhá enzymatické degradaci a v plasmě je rychle degradován dipeptidylpeptidasou IV (DPP-IV), která jej štěpí mezi aminokyselinovými zbytky Ala² a Asp³.

15 Bylo by tedy výhodné, vyvinout biologicky stálejší a dlouhodobě působící analogy GRF, u nichž by specifická chemická modifikace GRF bránila enzymatické degradaci, nebo ji zpomalovala.

20 Polyethylenglykol (PEG) je hydrofilní, biokompatibilní a netoxický polymer o obecném vzorci H(OCH₂CH₂)_nOH, kde n ≥ 4. Jeho molekulová hmotnost se může pohybovat mezi 200 až 20 000 daltony.

25 Bylo prokázáno, že přetrvávání biologického účinku proteinů a/nebo peptidů se výrazně zvýší chemickou konjugací s monomethoxylovanou formou polyethylenglykolu. Podobně jako cukerné zbytky v glykoproteinu, PEG poskytuje ochranný povlak a zvyšuje velikost molekuly, čímž snižuje její metabolickou degradaci a rychlost clearance v ledvinách.

Konjugace s PEG představuje již osvědčenou metodologii používanou pro vnášení peptidů a proteinů, která vychází z průkopnických studií Davise a Abuchowského (Abuchowski et al.,

1977, J. Biol. Chem. 252:3571-3581; Abuchowski et al., 1977, J. Biol. Chem. 252:3582-3586). Konjugace PEG k peptidům nebo proteinům vede obecně k nesespecifickému chemickému připojení molekul PEG k více než jednomu aminokyselinovému zbytku. Jednou z klíčových otázek této technologie je proto nalezení vhodných chemických postupů, jak kovalentně konjugovat molekuly PEG k specifickým aminokyselinovým zbytkům.

Původně používaný PEG, aktivovaný trichlortriazinem, který byl toxický a reagoval nespecificky, byl například později nahrazen rozmanitými polyethylenglykolovými činidly s chemickými linkery, které umožňovaly specifickou reakci s aminoskupinami (Benchamp et al., 1983, Anal. Biochem. 131:25-33; Veronese et al., 1985, Appl. Biochem. 11:141-152; Zalipsky et al., 1990, *Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems*, adrs. 9-110 ACS Symposium series 469; a Delgado et al., 1990, Biotechnol. and Appl. Biochem. 12:119-128), se sulfhydrylovými skupinami (Sartore et al., 1991, Appl. Biochem. Biotechnol. 31:213-222; a Morpurgo et al., 1996, Biocon. Chem. 7:363-368) nebo s guanidinovými zbytky (Pande et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:895-899).

U různých konjugátů PEG-protein byla zjištěna odolnost vůči proteolyse a/nebo snížená imunogennost (Monfardini et al., 1995, Biocon. Chem. 6:62-69; a Yamsuki et al., 1988, Agric. Biol. Chem. 52:2185-2196).

Další technická potíž při modifikaci proteinů pomocí konjugace s PEG (při "pegylaci" proteinů) vyplývá z faktu, že konjugáty PEG-protein obsahují obvykle různé počty připojených PEG molekul, takže výsledkem bývá směs konjugátů s rozdílnými stechiometriemi PEG:protein. Selektivní pegylace ke specifickým místům zůstává nadále chemickým problémem. Konjugace polyethylenglykolu k růstovému hormonu je typickým příkladem takového problému

(Clark et al., 1996, J. Biol. Chem. 271:21969-21977). Tito autoři ukázali, že Lys zbytky v GH byly pegylovány v náhodných pozicích.

Aby se zabránilo ztrátě nebo snížení enzymové aktivity, je možné předem chránit aktivní centrum tak, aby pegylace enzymu
5 nastávala v místě (místech) mimo aktivní centrum (Caliceti et al., 1993, J. Bioactive Compatible Polymer 8:41-50).

Jiný přístup k selektivní pegylaci byl nedávno navržen pro peptidy o nízké molekulové hmotnosti, jako je například GRF, které se připravují peptidovou syntézou na pevném nosiči. U takovýchto
10 konjugátů se konkrétní, předem připravená pegylovaná aminokyselina zavede do sekvence peptidu v průběhu syntézy na pevné fázi. Tento postup však výrazně komplikuje purifikaci výsledného produktu, což je při syntéze na pevném nosiči vždy kritický krok. Přítomnost PEG, vzhledem k jeho vysoké molekulové hmotnosti a polydispersnímu
15 charakteru, vede k finálním produktům majícím nepříjemnou míru nečistot a/nebo produktům s chybějícími aminokyselinami, což je poměrně častý úkaz při syntéze peptidů na pevném nosiči podle Merrifielda.

V nedávné době byla popsána (Felix et al., 1995, Int. J. Peptide
20 Protein. Res. 46:253-264) mono-pegylace, tj. připojení pouze jedné molekuly PEG, s použitím syntézy na pevném nosiči a připojením PEG k specifickým aminokyselinovým zbytkům v [Ala¹⁵]-hGRF(1-29)-NH₂. Tato studie ukázala, že [Ala¹⁵]-hGRF(1-29)-NH₂ pegylovaný na aminokyselinovém zbytku 21 nebo 25 si zachovává plnou *in vitro*
25 účinnost, stejnou jako má výchozí [Ala¹⁵]-hGRF(1-29)-NH₂. K dispozici však nejsou žádné *in vivo* údaje o tom, zda mají tyto pegylované konjugáty prodlouženou dobu účinku v porovnání s nekonjugovaným peptidem.

Nedávno bylo na myším a prasečím modelu prokázáno
30 (Campbell et al., 1997, J. Peptide Res. 49:527-537), že připojení

molekul PEG o různých molekulových hmotnostech na C-konec několika analogů hGRF, opět s použitím syntézy na pevném nosiči, prodloužilo dobu účinku ve srovnání s nepegylovanými preparáty.

5 **Podstata vynálezu**

Na rozdíl od přípravy mono-pegylovaného hGRF s použitím syntézy na pevném nosiči, jak bylo uvedeno shora, týká se předkládaný vynález selektivní pegylace hGRF prováděné v roztoku.

10 hGRF je málo rozpustný v roztocích neutrálních/alkalických pufrů, tedy za chemických podmínek, při nichž dochází nejúčinněji k pegylační reakci. Ve zředěném roztoku hGRF je výtěžek pegylační reakce snižován v důsledku hydrolysy aktivovaného polyethylenglykolu (jako například PEG-esteru).

15 Předkladatel vynálezu objevil, že ve vhodném rozpouštědle, ve kterém má hGRF vysokou rozpustnost, je možné provést selektivní pegylaci specifických míst reakcí v roztoku. V tomto provedení se i v situaci, kdy je výchozí hGRF peptid nechráněný, vážou řetězce PEG s vysokým výtěžkem a, v závislosti na reakčních podmínkách, téměř výhradně k primárním aminoskupinám (ϵ -aminoskupinám) Lys¹², Lys²¹
20 a/nebo N^α. Byly získány následující čtyři konjugáty, které jsou rovněž součástí předkládaného vynálezu, přičemž stechiometrický poměr hGRF:PEG v konjugátech závisí hlavně na molárním poměru PEG a hGRF:

25 hGRF-PEG konjugát, ve kterém je 1 molekula PEG kovalentně vázána k Lys¹²,

hGRF-PEG konjugát, ve kterém je 1 molekula PEG kovalentně vázána k Lys²¹,

hGRF-2PEG konjugát, ve kterém jsou 2 molekuly PEG kovalentně vázány k Lys¹² a k Lys²¹; a

hGRF-3PEG konjugát, ve kterém jsou 3 molekuly PEG kovalentně vázány jak k Lys¹² a Lys²¹, tak rovněž k N^α.

5 V celém textu vynálezu, "N^α" znamená aminoskupinu v N-koncové pozici peptidu (Tyr).

V dalším kroku je možné provést jednoduchou chromatografickou frakcionací získaných konjugátů, buď gelovou filtrací nebo přímou aplikací na HPLC kolonu C18, s následnou elucí koncentračním gradientem acetonitrilu ve vodě. Posledně jmenovaný
10 postup je výhodnější, neboť umožňuje purifikaci produktů po preparaci ve velkém měřítku.

Hlavním provedením vynálezu je tedy způsob selektivní přípravy různých konjugátů hGRF-PEG obsahujících jednu nebo více
15 jednotek PEG (na molekulu hGRF) kovalentně vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N^α, přičemž tento způsob se vyznačuje tím, že pegylační reakce probíhá v roztoku a požadovaný konjugát hGRF-PEG se purifikuje, například chromatografickými metodami.

Konjugáty hGRF-PEG, které obsahují jednu nebo více jednotek
20 PEG (na mol hGRF) vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N^α jsou rovněž pokryty předkládaným vynálezem. Výhodné produkty podle vynálezu jsou konjugáty hGRF-PEG, ve kterých je jedna molekula PEG kovalentně vázána k Lys¹² nebo k Lys²¹.

Podle jiného provedení vynálezu, pokud je jedna nebo více
25 z těchto tří aminoskupin, k nimž se vážou řetězce PEG, reversibilně chráněna určitými chemickými skupinami před pegylací, poskytne pegylační reakce přímo žádaný konjugát se specificky pegylovanými místy, a tento konjugát pak může být izolován z reakční směsi, například ultrafiltrací nebo jinými chromatografickými postupy.

Preparační postup může případně zahrnovat i reakci, kterou se odstraní chránící skupiny.

Reakce k odstranění chránící skupiny ("deprotektce") se s výhodou provádí podle známých postupů a v závislosti na chemické povaze chránící skupiny, jež má být odstraněna.

V tomto vynálezu se termínem "hGRF", pokud není jinak specifikováno, míní jakékoli lidské GRF peptidy, se zvláštním poukazem na peptidy 1-44, 1-40, 1-29 a jejich odpovídající amidy (obsahující amidovou skupinu na N-konci nebo na C-konci). Výhodný hGRF peptid je hGRF(1-29)-NH₂, jehož aminokyselinová sekvence je uvedena v SEQ ID NO:1.

"Aktivovaný PEG" (nebo "pegylační činidlo") je jakýkoli derivát PEG, který může být použit k modifikaci proteinu, neboť obsahuje funkční skupinu schopnou reakce s některou funkční skupinou v proteinu/peptidu za vzniku konjugátů PEG-protein/peptid. Přehled derivátů PEG využitelných pro modifikaci proteinů podává Harris, 1985, Rev. Macromol. Chem. Phys. C25, str. 325-376. Aktivovaný PEG může být alkylačním činidlem, jako například PEG aldehyd, PEG epoxid nebo PEG tresylát, anebo může být činidlem acylačním, jako například PEG ester.

Výhodné je používat aktivovaný PEG v monomethoxylované formě. Jeho molekulová hmotnost je s výhodou mezi 2 000 až 20 000 daltony. Pro přípravu aktivovaného PEGu podle vynálezu je zvláště výhodný monomethoxylovaný PEG₅ 000.

Je-li aktivovaný PEG acylačním činidlem, pak s výhodou obsahuje buď zbytek norleucinu nebo zbytek ornithinu vázaný na PEG prostřednictvím amidové vazby. Tyto zbytky umožňují přesné stanovení množství navázaných jednotek PEG na mol peptidu (viz například Sartore et al., 1991, Appl. Biochem. Biotechnol. 31:213-

222). Obzvláště výhodný aktivovaný PEG je proto monomethoxylovaný PEG_{5 000} připojený prostřednictvím amidové vazby k alfa aminoskupině norleucinu, a který je na karboxy skupině aktivovaný jako sukcinimidylester.

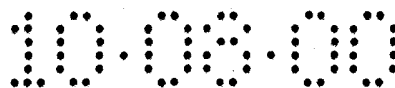
5 Běžně se užívají také rozvětvené struktury PEG. Větvené struktury PEG mohou být popsány vzorcem R(-PEG-OH)_m, ve kterém R představuje centrální část, jako například pentaerythritol nebo glycerol a m představuje počet vybíhajících větví. Počet větví (m) může nabývat hodnot od tří až do sta nebo více. Hydroxylové skupiny
10 mohou být chemicky modifikované.

Jiná rozvětvená forma, jako například forma popsaná v PCT patentové přihlášce WO 96/21469, má jediný konec, který může podléhat chemické modifikaci. Tento typ PEG struktury lze vyjádřit vzorcem (CH₃O-PEG-)_pR-X, kde p se rovná 2 nebo 3, R představuje
15 centrální část jako například lysin nebo glycerol, a X představuje funkční skupinu, např. karboxyl, která může být chemicky aktivována. Ještě jiná rozvětvená forma, "pendant PEG" má reaktivní skupiny, například karboxyly, "navěšené" podél kostry molekuly PEG a nikoli na konci řetězců PEG.

20 Všechny tyto rozvětvené formy PEGu mohou být "aktivovány", jak je uvedeno shora.

"Chromatografické metody" znamenají jakoukoli techniku používanou k separaci složek směsi, při které se směs nanese na nosič (stacionární fázi), kterým protéká rozpouštědlo (mobilní fáze).
25 Dělicí princip chromatografie je založen na rozdílné fyzikální povaze stacionární a mobilní fáze.

Některé konkrétní typy chromatografických metod, dobře známé v literatuře, zahrnují chromatografii kapalinovou, vysokotlakou kapalinovou, iontoměničovou, absorpční, afinitní, rozdělovací,



hydrofobní, na reversní fázi, gelovou filtraci, ultrafiltraci nebo chromatografií na tenké vrstvě.

"Pegylace" je reakcí, kterou se získává z aktivovaného polyethylenglykolu a odpovídajícího proteinu/peptidu konjugát
5 PEG-protein/peptid.

Molární poměr PEG:hGRF může být 1:1, 2:1 nebo 3:1, v závislosti na tom, jaký konjugát je požadován ve vysokém výtěžku.

Rozpouštědlo pro pegylační reakci se vybírá ze skupiny sestávající z vysoce koncentrovaného vodného roztoku nikotinamidu,
10 pufovaného vodného roztoku denaturačního činidla (jako je močovina) nebo polárního organického rozpouštědla vybraného ze skupiny dimethylsulfoxid, pufovaný dimethylformamid nebo pufovaný acetonitril.

Hodnota pH roztoku se obvykle udržuje v rozmezí 7 až 9.

15 Neomezující seznam chránících chemických skupin pro Lys¹² a Lys²¹ zahrnuje: Alloc (allyloxykarbonyl), Dde (1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyklohex-1-yliden)ethyl), Adpoc (1-(1'-adamantyl)-1-methylethoxykarbonyl) nebo 2-Cl-Z (2-chlorbenzyloxykarbonyl). Pro lysinový zbytek je výhodnou chránící skupinou Alloc.

20 Po ukončení pegylační reakce může být Alloc odstraněn některou z metod uvedených v Greene T W. et al., 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Inc., str. 331-333. Dde může být odstraněn 2% roztokem hydrazinu v DMF (viz W.C. Chan et al., 1995, J. Chem. Soc. Chem. Commun., str. 2209). Adpoc
25 může být odstraněn podobným způsobem jako Alloc (viz též Dick F. et al., 1997, *Peptides 1996*, Proc. of the 24th Eur. Peptide Symp. Edinburgh, Scotland). Odstranění 2-Cl-Z vyžaduje silnější kyselé působení (HF, TFMSA, HBr) nebo hydrogenaci (viz též Tam et al., 1987, Strong acid deprotection of synthetic peptides. V *The Peptides*,

9 /S. Udenfriend a J Meienhofer, eds./, Academic Press, NY, str. 185-248).

Jako chránící skupiny pro N^α lze použít alkylové skupiny, jako například methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, t-butyl, benzyl nebo
5 cyklohexyl. Výhodnou skupinou je isopropyl. Tyto alkylové skupiny se mohou zavádět redukční alkylací (viz Murphy et al., 1988, Peptide Res. 1:36, nebo Hocart et al., 1987, J. Med. Chem. 30:739-743).

[N^α-isopropyl-Tyr¹,Lys(Alloc)¹²]-hGRF a [Lys(Alloc)^{12,21}]-hGRF,
10 jakožto užitečné a nové meziprodukty pegylační reakce, jsou rovněž pokryty předkládaným vynálezem.

Dále bylo objeveno, že pegylace podle vynálezu:

1. nemodifikuje konformaci peptidu,
2. zvyšuje resistenci vůči proteolytické degradaci,
3. neovlivňuje, nebo jen mírně snižuje biologickou aktivitu, v závislosti
15 na rozsahu pegylace, a
4. umožňuje získání produktů (konjugátů), jež jsou rozpustnější ve vodných pufovaných roztocích.

Vynález dále poskytuje konjugáty hGRF-PEG v podstatě v
purifikované formě tak, aby byly využitelné jako účinné složky
20 farmaceutických prostředků.

V dalším aspektu poskytuje vynález využití konjugátů podle
vynálezu k výrobě léku pro léčbu, prevenci nebo diagnosu poruch
souvisejících s růstovým hormonem, jako jsou například deficiencie
růstového hormonu (GHD), obzvláště pediatrická deficiencie růstového
25 hormonu.

Lék je s výhodou podáván ve formě farmaceutického
prostředku obsahujícího konjugáty podle vynálezu, společně s jedním
nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a/nebo excipienty.

Takovéto farmaceutické prostředky představují ještě další aspekt předkládaného vynálezu.

Provedením vynálezu je aplikace farmakologicky účinného množství konjugátů podle vynálezu jedincům s rizikem vzniku choroby související s růstovým hormonem, nebo jedincům, kteří již vykazují takovýto patologický stav.

Dalším aspektem vynálezu je způsob léčby, prevence nebo diagnosy poruch souvisejících s růstovým hormonem, vyznačující se tím, že se podává účinné množství konjugátů podle vynálezu v přítomnosti jednoho nebo více farmaceuticky přijatelných excipientů.

Termínem "účinné množství" se míní množství účinných složek, jež postačuje k ovlivnění průběhu a závažnosti poruch popsaných shora, a vede k snížení nebo remisi takovéhoho patologického stavu. Účinné množství bude záviset na způsobu aplikace a na stavu pacienta.

Výrazem "farmaceuticky přijatelný" se rozumí, že zahrnuje jakýkoli nosič, který neovlivňuje biologickou aktivitu účinné složky a který není toxický hostiteli, jemuž je podáván. Například pro parenterální aplikaci mohou být účinné složky, uvedené shora, připraveny ve formě jednotlivých injekčních dávek v nosičích jako jsou fyziologický roztok, roztok dextrosy, sérový albumin a Ringerův roztok.

Vedle farmaceuticky přijatelného nosiče obsahují prostředky podle vynálezu rovněž malá množství aditiv, jako jsou stabilizátory, excipienty, pufrý a konzervační prostředky.

K aplikaci léku lze použít jakýkoli způsob, jenž je kompatibilní s účinnou látkou. S výhodou se užívá parenterální aplikace, jako je podkožní, nitrosvalová nebo nitrožilní injekce. Dávka účinné látky, jež má být podána, vychází z lékařského předpisu na základě věku, hmotnosti a individuální reakce pacienta.

Dávkování účinné látky při terapii u lidí se může pohybovat mezi 5 až 6000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti, přičemž výhodná dávka je 10 až 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tělesné hmotnosti.

Vynález byl popsán s odkazem na konkrétní provedení, avšak obsah popisu zahrnuje všechny modifikace a substituce, které může osoba znalá oboru provést, aniž by překročila význam a smysl nároků.

Vynález bude nyní popsán pomocí následujících Příkladů, které by v žádném případě neměly být chápány jako jakékoli omezení vynálezu. Příklady budou odkazovat na Obrázky popsané níže.

10

Přehled obrázků na výkresech

Obrázek 1 znázorňuje aminokyselinovou sekvenci hGRF(1-29)-NH₂. Šipky naznačují možná místa pegylace.

Obrázek 2 znázorňuje RP-HPLC chromatografii směsi, získané po pegylační reakci v DMSO provedené podle Příkladu 1. První dva hlavní vrcholy jsou konjugáty obsahující 1 řetězec PEG na mol hGRF. Následující malý vrchol je konjugát hGRF:2PEG a poslední malý vrchol odpovídá konjugátu hGRF:3PEG.

Obrázek 3a znázorňuje průběh degradace hGRF(1-29) a konjugátů s PEG podle vynálezu při působení subtilisinem.

Obrázek 3b znázorňuje průběh degradace hGRF(1-29) a konjugátů s PEG podle vynálezu při působení chymotrypsinem.

Obrázek 4 znázorňuje spektroskopickou charakterizaci [Lys(MPEG₅₀₀₀ - CH₂-CO-Nle-CO)^{12,21}-hGRF(1-29)-NH₂] provedenou měřením cirkulárního dichroismu. Získaná spektra se překrývají se spektry "nativního" hGRF.

25

Obrázek 5 znázorňuje biologický účinek různých konjugátů hGRF-PEG (z první DMSO preparace) v CHO-hGRFR-LUC *in vitro* testu. Uvedené hodnoty představují průměr ze tří nezávislých experimentů.

5 Obrázek 6 znázorňuje biologický účinek různých konjugátů hGRF-PEG (z druhé DMSO preparace) v CHO-hGRFR-LUC *in vitro* testu. Uvedené hodnoty představují průměr ze dvou nezávislých experimentů.

10 Obrázek 7 znázorňuje biologický účinek různých konjugátů hGRF-PEG (z nikotinamidové preparace) v CHO-hGRFR-LUC *in vitro* testu. Uvedené hodnoty představují průměr ze dvou nezávislých experimentů.

Obrázek 8 znázorňuje biologický účinek různých konjugátů hGRF-PEG (z první DMSO preparace) v *in vitro* testu uvolňování GH z buněk krysí hypofysy.

15 Obrázek 9 znázorňuje biologický účinek různých konjugátů hGRF-PEG (z druhé DMSO preparace) v *in vitro* testu uvolňování GH z buněk krysí hypofysy.

20 Obrázek 10 znázorňuje časový průběh hladin hGRF v plasmě a GH v séru, následující po i.v. injekci hGRF (400 μ g/krysa) krysím samcům. Každý bod představuje střední hodnotu \pm SEM, získanou v pokuse s devíti krysami.

25 Obrázek 11A (horní graf) znázorňuje časový průběh hladiny GH v séru po i.v. injekci, 400 μ g/krysu, konjugátů hGRF-PEG (DMSO preparace) krysím samcům. Každý bod představuje střední hodnotu získanou pro tři krysy.

Obrázek 11B (spodní graf) znázorňuje časový průběh hladiny hGRF v plasmě po i.v. injekci, 400 μ g/krysu, konjugátů hGRF-PEG (DMSO preparace) krysím samcům. Každý bod představuje střední hodnotu získanou pro tři krysy.

Obrázek 12 znázorňuje restriční mapu plasmidu pcDNA3-hGRF-R, používaného pro hodnocení aktivity GRF v testu s reportérovým genem.

Obrázek 13 znázorňuje restriční mapu plasmidu pTF5-53 LUC, používaného pro hodnocení aktivity GRF v testu s reportérovým genem.

Příklady provedení vynálezu

Použité zkratky

Acetonitril (ACN), allyloxykarbonyl (Alloc), benzyl (BZL), terc-butyl-
10 butyloxykarbonyl (Boc), dichlormetan (DCM), diisopropylethylamin (DIEA), dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid (DMSO), 9-fluorenylmethyloxykarbonyl (FMOC), 2-[1H-benzotriazol-1-yl]-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát (HBTU), 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), methyl-t-butylether (MTBE), norleucin
15 (Nle), N-methylpyrrolidon (NMP); 2,2,5,7,8-pentamethyl-chroman-6-sulfonyl (Pmc), terc-butyl (tBu), kyselina trifluoroctová (TFA), trifenylmethyl (Trt).

Příklad 1: Pegylace hGRF v roztoku

20 V těchto pokusech byl jako pegylační činidlo použit monomethoxylovaný PEG_{5 000} (MPEG_{5 000}) spojený prostřednictvím amidové vazby s alfa aminoskupinou norleucinu, který je na karboxy skupině aktivovaný jako sukcinimidylester. Příprava je popsána například v Lu et al., 1994, Int. J. Peptide Protein. Res. 43:127-138.

25 Jako hGRF peptid byl použit lidský GRF₁₋₂₉, hGRF(1-29)-NH₂, od firmy Bachem.

Vzhledem k nízké rozpustnosti hGRF(1-29) ve vodných roztocích při neutrálním nebo mírně alkalickém pH, které je potřebné pro pegylaci, byly k reakci použity alternativní podmínky A až E:

5 A. Dimethylsulfoxid: 20 mg peptidu se rozpustí v 1 ml DMSO a ihned se přidá vhodné množství pegylačního činidla.

B. Dimethylformamid / 0,2M borátový pufr, pH 8,0 v objemovém poměru 1:1. Peptid a vhodná množství pegylačního činidla se ihned přidají.

10 C. Vysoce koncentrovaný vodný roztok nikotinamidu (200 mg/ml): 200 mg nikotinamidu se přidá k roztoku 40 mg hGRF(1-29) v 1 ml 10 mM kyseliny octové. Ke kyselému roztoku se přidá 1 ml 0,2 M borátového pufru, pH 8,0, aby se dosáhlo požadované hodnoty pH před přidáním vhodného množství pegylačního činidla.

15 D. Acetonitril / 0,2 M borátový pufr, pH 8,0 v objemovém poměru 1:1. Ihned se přidá vhodné množství pegylačního činidla.

E. 0,2 M borátový pufr, 5 M močovina, pH 8,0: ihned se přidá vhodné množství pegylačního činidla.

20 Suché PEG činidlo se za míchání přidává, aby se dosáhlo konečného molárního poměru PEG:hGRF 1:1, 2:1 nebo 3:1. Výhodný je poměr 2:1.

Použití různých molárních poměrů PEG:hGRF dává vznik reakční směsi, v níž je hlavním produktem požadovaný konjugát.

Roztok reakční směsi se před purifikací ponechá stát 5 hodin při pokojové teplotě.

25 Takto byly získány následující 4 konjugáty hGRF-PEG (A1-A4):

A1: [Lys(MPEG_{5 000}-CH₂-CO-Nle-CO)¹²-hGRF(1-29)-NH₂],

A2: [Lys(MPEG_{5 000}-CH₂-CO-Nle-CO)²¹-hGRF(1-29)-NH₂],

A3: [Lys(MPEG_{5 000}-CH₂-CO-Nle-CO)^{12,21}-hGRF(1-29)-NH₂],

A4: N^α-(MPEG_{5 000}-CH₂-CO-Nle-CO)[Lys(MPEG_{5 000}-CH₂-CO-Nle-CO)^{12,21}-hGRF(1-29)-NH₂].

Přebytek DMSO, dimethylformamidu, acetonitrilu nebo močoviny
5 a vedlejší produkt reakce (hydroxysukcinimid) se odstraní gelovou
ultrafiltrací při použití membrány s mezní hodnotou 1 000 Da. Objem
se nejprve upraví 10 mM kyselinou octovou na 10 ml a poté se
ultrafiltrací sníží na 1 ml. Tento postup se opakuje třikrát.

Konjugáty hGRF-PEG se chromatograficky izolují gelovou
10 filtrací; jinou možností je chromatografie na reversní fázi.

Příklad 2: Gelová filtrace

Gelovou filtrací se produkty frakcionují na základě rozdílných
molekulových hmotností složek směsi (v tomto případě, konjugáty
15 hGRF-PEG 1:1 mají MW = 8,358; hGRF-PEG 1:2 mají MW = 13,358;
a hGRF-PEG 1:3 mají MW = 18,358. Molekulová hmotnost, MW,
nekonjugovaného hGRF je 3,358). Separace se prováděla s použitím
sériového kolonového systému s náplní Superdex 75-Superosa 12
(Biotech, Pharmacia), který byl eluován 10 ml kyseliny octové při
20 průtoku 1,5 ml/min.

V jímaných frakcích o objemu 1 ml se stanovil obsah bílkoviny
měřením absorbance při 280 nm a obsah polyethylenglykolu se
stanovil jodovým testem (Sims et al., 1980, Anal. Biochem. 107:60-
63).

25 Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG v molárním
poměru 1:1 byly tři chromatografické vrcholy:

konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 132 ml (hlavní vrchol);

konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 108 ml (menší vrchol); a
nekonjugovaný hGRF s elučním objemem 232 ml (menší vrchol).

Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG v molárním poměru 1:2 byly tři chromatografické vrcholy:

- 5 konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 108 ml (hlavní vrchol);
konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 132 ml (menší vrchol);
a konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 73 ml (menší vrchol).

Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG v molárním poměru 1:3 byly dva chromatografické vrcholy:

- 10 konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 73 ml (hlavní vrchol);
a konjugát hGRF-PEG s elučním objemem 108 ml (menší vrchol).

Eluované vrcholy byly jímány a koncentrovány ultrafiltrací s použitím membrány (mezní hodnota 1 000 Da), lyofilizovány, rozpuštěny v 10 mM kyselině octové a charakterizovány z hlediska
15 identity a kvantity, jak je níže uvedeno.

Takto bylo zjištěno, že vrchol s elučním objemem 73 ml odpovídá sloučenině A4.

Vrchol s elučním objemem 132 ml odpovídá sloučenině A3.

Vrchol s elučním objemem 108 ml odpovídá směsi sloučenin A2
20 a A1.

Vrchol, který vytéká při elučním objemu 232 ml odpovídá nekonjugovanému hGRF.

Separace konjugátů hGRF-PEG o stejné molekulové hmotnosti, ale rozdílných místech pegylace (polohové isomery), však touto
25 metodou purifikace není možná.

Příklad 3: Chromatografie na reversní fázi

Jemnější frakcionace se provádí pomocí hydrofobní chromatografie s použitím kolony RP-HPLC C18. Tento postup umožňuje separaci případných isomerů majících shodnou molekulovou hmotnost. Touto technikou se podařilo rozdělit na dva vrcholy materiál vytvářející jeden vrchol v gelové filtraci a odpovídající konjugátům, které nesou 1 kovalentně vázanou molekulu PEG.

Chromatografie na reversní fázi se prováděla s použitím RP-HPLC C18 preparativní kolony (Vydac) a eluce koncentračním gradientem vytvořeným následujícím způsobem ze zásobních roztoků H₂O/0,05%TFA (eluent A) a

acetonitril/0,05%TFA (eluent B):

0-5 min	35% A
5-35 min	35% A → 2% A
15 35-38 min	2% A
38-40 min	2% A → 35% A

Průtok: 10 ml/min; smyčka 1 μl; UV-Vis. Detektor při 280 nm.

Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG v molárním poměru 1:1 byly 4 chromatografické vrcholy:

20 1	13,2 min	hlavní vrchol;
2	13,7 min	hlavní vrchol;
3	14,4 min	menší vrchol; a
4	8,9 min	menší vrchol.

Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG v molárním poměru 1:2 byly 4 chromatografické vrcholy:

25 1	13,2 min	menší vrchol;
------	----------	---------------

2	13,7 min	menší vrchol;
3	14,4 min	hlavní vrchol; a
4	15,5 min	menší vrchol.

Výsledkem pegylace v DMSO při použití hGRF:PEG
5 v molárním poměru 1:3 byly 2 chromatografické vrcholy:

1	14,4 min	menší vrchol; a
2	15,5 min	hlavní vrchol;

Eluované vrcholy se jímaly, odpařením se odstranil acetonitril
a TFA a poté se lyofilizovaly. Vysušený produkt se rozpustil v roztoku
10 10 mM kyseliny octové a byla provedena analýza z hlediska
identifikace a kvantifikace izolovaného materiálu, jak je níže uvedeno.

Konjugát hGRF-PEG s elučním časem 13,2 min byl
identifikován jako sloučenina A1 (GRF-1PEG, 1.vrchol).

Konjugát hGRF-PEG s elučním časem 13,7 min byl
15 identifikován jako sloučenina A2 (GRF-1PEG, 2.vrchol).

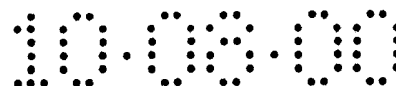
Konjugát hGRF-PEG s elučním časem 14,4 min byl
identifikován jako sloučenina A3 (GRF-2PEG).

Konjugát hGRF-PEG s elučním časem 15,5 min byl
identifikován jako sloučenina A4 (GRF-3PEG)

20 Vrchol s elučním časem 8,9 min byl identifikován jako
nekonjugovaný hGRF.

Jako typický příklad chromatografie na reversní fázi je na Obrázku 2
uvedeno dělení pegylačních produktů, získaných při použití PEG a
hGRF v molárním poměru 2:1.

25 Vysušené produkty byly získány odpařením rozpouštědla a
lyofilizací.



Příklad 3a: Pegylace hGRF v roztoku s použitím PEG_{10 000}

V tomto příkladu byl použit rozvětvený monomethoxy PEG o molekulové hmotnosti 10 000 Da s lysinovým zbytkem jako spacerem (Shearwater Polymers, Inc.). Tento rozvětvený PEG byl
5 získán tak, že k oběma aminoskupinám lysinu byl navázán PEG_{5 000}.

Karboxylová skupina lysinového spaceru, která byla aktivována jako sukcinimidylester, reagovala v DMSO s aminoskupinami hGRF(1-29)-NH₂ při použití molárního poměru 0,9 molů PEG na 1 mol GRF.

Rozpouštědlo bylo odstraněno a zbývající materiál
10 frakcionován gelovou filtrací na preparativní koloně Superosa 12 TM. Z kolony byly eluovány dva vrcholy, které odpovídaly dvěma konjugátům hGRF-PEG. První, menší, vrchol odpovídal konjugátu s dvěma jednotkami PEG_{10 000} navázanými na molekulu hGRF. Druhý, hlavní, vrchol odpovídal konjugátu obsahujícímu jednu PEG_{10 000}
15 jednotku na molekulu hGRF.

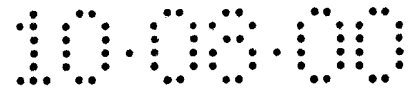
Příklad 3b: Pegylace hGRF v roztoku s použitím PEG_{20 000}

V tomto příkladu byl použit rozvětvený monomethoxy PEG o molekulové hmotnosti 20 000 Da s lysinovým zbytkem jako
20 spacerem (Shearwater Polymers, Inc.).

Tento rozvětvený PEG byl získán tak, že k oběma aminoskupinám lysinu byl navázán PEG_{10 000}.

Karboxylová skupina lysinového spaceru, která byla aktivována jako sukcinimidylester, reagovala v DMSO s aminoskupinami
25 hGRF(1-29)-NH₂ při použití molárního poměru 0,9 molů PEG na 1 mol GRF.

Rozpouštědlo bylo odstraněno lyofilizací a zbývající materiál frakcionován gelovou filtrací na preparativní koloně Superosa 12 TM.



Byl získán jeden vrchol, který odpovídal konjugátu obsahujícímu jednu PEG_{20 000} jednotku na molekulu hGRF.

Příklad 4: Analytická charakterizace konjugátů hGRF-PEG

U produktů, získaných jak uvedeno shora, byla zjišťována
5 přítomnost vázaných řetězců PEG na základě následujících testů:

1. Kolorimetrická metoda na stanovení volných aminoskupin, užívající jako činidla trinitrobenzensulfonátu (jak je popsáno v Habeed et al., 1966, Anal. Biochem. 14:328-336);
2. Kolorimetrická metoda založená na jodovém testu ke stanovení
10 obsahu PEG (jak je popsáno v Sims et al., 1980, Anal. Biochem. 107:60-63);
3. Počet řetězců PEG se určil na základě stanovení norleucinu (jeden per řetězec) při aminokyselinové analýze (jak je popsáno v Sartore et al., 1991, Appl. Biochem. Biotechnol. 31:213-222);
- 15 4. Hmotová spektrometrie k stanovení molekulové hmotnosti konjugátů.

Pomocí MALDI-hmotové spektrometrie se určila molekulová hmotnost konjugátů a jejich polydispersivita, jež vyplývá z polydispersivity výchozího polyethylenglykolu.

20 Místa připojení PEG v konjugátech hGRF-PEG se analyzovala stanovením aminokyselinové sekvence. Každý vzorek byl 100-krát zředěn a 10 μ l tohoto roztoku (asi 50 pmolů) bylo nanášeno do sekvenátoru.

Čistota konečného produktu byla též potvrzena pomocí
25 RP-HPLC analytické chromatografie.

Analýza se prováděla na C18 analytické koloně (Vydac), která byla eluována koncentračním gradientem vytvořeným z H₂O/0,05%TFA (Eluent A) a acetonitrilu/0,05%TFA (Eluent B) následujícím způsobem:

0-5 min	80% A
5-50 min	80% A → 5% A
50-52 min	5% A
52-54 min	5% A → 80% A

5 Průtok 1 ml/min, smyčka 20 μ l, UV-Vis Detektor při 226 nm.

Nekonjugovanému hGRF odpovídal eluční čas 20,7 min.

Eluční čas sloučeniny A1 byl 22,9 min, sloučeniny A2 23,4 min, sloučeniny A3 24,4 min a pro sloučeninu A4 byl eluční čas 25,5 min.

10 Charakterizace "nativního" peptidu a konjugátů peptid:PEG z hlediska konformace byla provedena měřením cirkulárního dichroismu.

Spektroskopická charakterizace nekonjugovaného hGRF a konjugátů hGRF-PEG byla provedena analýzou cirkulárního dichroismu v rozsahu 190 až 300 nm. Vzorky (50 μ g/ml) byly 15 rozpuštěny v 10 mM kyselině octové nebo ve směsi metanol/10mM kyselina octová v molárním poměru 30:70, resp. 60:40. Ve všech shora uvedených roztocích byla spektra získaná pro nekonjugovaný hGRF a konjugáty hGRF-PEG superponovatelná, jak ukazuje 20 Obrázek 4 pro sloučeninu A3. V roztoku kyseliny octové měly peptidy nahodilou konformaci, zatímco při zvyšování obsahu metanolu peptid zaujímal strukturu α -helixu.

Výsledky ukazují, že konjugace s polyethylenglykolem nevede k výrazným změnám strukturních vlastností peptidu.

Příklad 5: Hodnocení stability konjugátů hGRF-PEG

25 Proteolytická stabilita hGRF a konjugátů hGRF-PEG se sledovala v přítomnosti proteolytických enzymů, jako například subtilisinu a chymotrypsinu.

Experimenty se subtilisinem se prováděly při 4°C inkubací 0,297 mM peptidu v roztoku 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,05 M CaCl₂ při molárním poměru peptid/proteasa 1:50 000.

5 V případě chymotrypsinu byl peptid rozpuštěn v 0,08 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,1 M CaCl₂ a použitý molární poměr peptid/proteasa byl 1:15 000.

Proteolytické štěpení bylo sledováno pomocí analytické RP-HPLC na koloně C18, přičemž eluční podmínky byly stejné jako v Příkladu 4. Výška vrcholu odpovídajícího výchozímu materiálu byla 10 odečtena pro peptid před inkubací s proteolytickým enzymem a poté v určených časech během inkubace. Výška vrcholů stanovená v určených časech a vyjádřená jako procento výchozí hodnoty je uvedena v Obrázcích 3a,b.

15 **Příklad 6: Pegylace s alkylačním PEG**

Peptid hGRF byl konjugován s monomethoxylovaným PEG, který byl aktivován různými acylačními nebo alkylačními skupinami.

Alkylační PEG je výhodný v tom, že dává vznik konjugátům, které mají zachovaný kladný náboj na lysinovém zbytku.

20 Izolace a charakterizace produktů byla provedena jak je popsáno v Příkladech 1-4.

Příklad 7: Hodnocení aktivity konjugátů hGRF-PEG

Materiály

Testované sloučeniny

25 Lidský GRF₁₋₂₉ hGRF(1-29)-NH₂, šarže 1299201, od firmy Bachem;

Lidský GRF₃₋₂₉ hGRF(3-29), od firmy Bachem;

Lidský GRF₃₋₂₉, od firmy ISL; a

Konjugáty hGRF-PEG připravené jak uvedeno shora.

Reagencie

5 CHO-hGRFR-LUC *in vitro* test

MEM alfa médium s ribonukleosidy a deoxyribonukleosidy (Gibco) doplněné 10% fetálním bovinním sérem (Gibco) a 600 µg/ml geneticin G418 sulfátem (Gibco);

Činidlo lyzující buněčné kultury (Promega);

10 Činidlo pro luciferasový test (Promega);

Luclite (Packard).

In vitro biotest s buňkami krysí hypofýzy

15 Earlov vyvážený roztok solí, EBSS, (Gibco) doplněný 50 µg/ml gentamycin sulfátem (Sigma).

Médium 199 (M199) s Earlovými solemi (Gibco) a 12,5% fetálním bovinním sérem (FBS) (Gibco) a 50 µg/ml gentamycin sulfátem.

Souprava na stanovení krysího GH (Amersham)

Enzymový roztok k natrávení tkáně (připravený v 30 ml EBSS):

20 120 mg kolagenasa (Sigma)

30 mg hyaluronidasa (Sigma)

30 mg DNAsa I (Sigma)

900 mg BSA (Sigma)

Po rekonstituci byl roztok sterilizován filtrací a držen při 37°C.

In vivo biotest

Souprava pro radioimunostanovení krysího GH (Amersham).

Souprava pro radioimunostanovení lidského GRF(1-44) (Phoenix Pharmaceutical).

5

Zvířata

SPF dospělí krysí samci kmene Sprague-Dawley o tělesné hmotnosti 200-250 g, od firmy Charles River, se použili po aklimatizaci v délce nejméně 7 dní.

10

Metody

CHO-hGRFR-LUC *in vitro* test

CHO-hGRFR-LUC (klon 1-11-20) je klonovaná buněčná linie, jež byla získána kotransfekcí plasmidů pcDNA3-hGRF-R a pTF5-53 LUC do buněčné linie CHO-DUKX.

15

Při konstrukci plasmidu pcDNA3-hGRF-R se do expresního vektoru pcDNA3 vnesla cDNA pro lidský receptor faktoru uvolňujícího růstový hormon (hGRF-R). Plasmid pBluescript obsahující hGRF-R cDNA laskavě poskytl Dr. B. Gaylinn (University of Virginia), savčí expresní vektor pcDNA3 pocházel od firmy Invitrogen. Kódující sekvence hGRF-R je pod kontrolou promotoru lidského cytomegaloviru (CMV). Restrikční mapa plasmidu je na Obrázku 12.

20

Plasmid pTF5-53 LUC vznikl předřazením promotoru genu c-fos spolu s elementem odezvy na cAMP před kódující sekvencí luciferasy v plasmidu poLuc. Element odezvy na cAMP a c-fos promotor pocházely z plasmidu pTF5-53 (popsaného v práci Fish et al., 1989, Genes and Development 3:198-211). Vektor s reportérovým genem (poLuc), jemuž chybí promotor a nese pouze mnohočetné

25

klonovací místo před kódující sekvencí luciferasy, byl získán od Dr. Brasiera (University of Texas, Galveston). Restrikční mapa pTF5-53 LUC je uvedena na Obrázku 13.

5 Buňky CHO-DUKX získané shora uvedenou kotransfekcí se rutinně pěstovaly v MEM alfa médiu obsahujícím ribonukleosidy a deoxyribonukleosidy a doplněném 10% fetálním telecím sérem a 600 $\mu\text{g/ml}$ geneticin G418 sulfátem.

Buňky byly nasazeny (40 000 buněk na jamku) v bílých 96-jamkových destičkách (Dynatech) a před testem inkubovány 16-18
10 hodin v 200 μl růstového média.

Příští den bylo médium v jamkách vyměněno za médium obsahující různé koncentrace referenčního standardu hGRF(1-29) (Bachem) nebo různé koncentrace konjugátů hGRF-PEG, a destičky pak byly inkubovány 2 hodiny při 37°C, 5% CO₂. Po této inkubaci byly
15 buňky CHO-hGRF-LUC dvakrát promyty 200 μl roztoku PBS (Sigma) a poté lyzovány přidáním 50 μl činidla lyzujícího buňky (Promega) do každé jamky. Po dalších 15 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo přidáno 150 μl činidla pro stanovení luciferasy (Promega) a destičky byly změřeny v luminometru (Dynatech).

20 V alternativním postupu byly buňky CHO-hGRF-LUC, nasazené v koncentraci 50 000 buněk na jamku, po ukončení inkubace s různými konjugáty hGRF-PEG promyty roztokem PBS, jak uvedeno shora, a do každé jamky bylo přidáno 100 μl roztoku PBS obsahujícího vápenaté a hořečnaté ionty a poté 100 μl Luclite (Packard). Po 10 minutách
25 inkubace při pokojové teplotě byly destičky měřeny v luminometru (Lumicount-Packard).

Výsledky byly vyjádřeny v relativních světelných jednotkách (RLU).

In vitro biotest na hGRF(1-29) s buňkami krysí hypofýzy

Zvířata (SPF krysí samci kmene Sprague-Dawley o tělesné hmotnosti 200 g) byla usmrcena inhalováním CO₂ a byly z nich odebrány hypofýzy. Tkáň byla jemně nakrájena a dána do lahve s enzymovým roztokem pro natrávení tkáně. Lahev byla umístěna na 5 1 hod do inkubátoru při 37°C.

Buňky z natrávené tkáně byly dvakrát promyty, spočítány a jejich koncentrace upravena na 5x10⁵/ml. Buňky byly nasazeny do 48-jamkové destičky (200 μl do jamky) a destička umístěna na 72 hod 10 do inkubátoru.

Po 72 hodinách byly buňky inkubovány další 4 hodiny s různými koncentracemi hGRF. Po skončení této inkubace byly sebrány supernatanty a uloženy při -80°C.

Množství růstového hormonu (GH) v každém vzorku bylo 15 zjištěno pomocí komerční soupravy pro radioimunostanovení krysího GH.

In vivo test

Zvířeti byla podána nitrožilní injekce hGRF(1-29) (400 μg na 20 krysu). Několik minut před odběrem krve dostalo zvíře narkózu (ketamin-xylazin). Každé kryse byly odebrány z dolní duté žíly 2 ml krve. Vzorek byl rozdělen na dvě části: z 1 ml bylo získáno sérum po zhruba 3-hod inkubaci při 37°C a následné centrifugaci; zbývající 1 ml byl odebrán do lahvičky obsahující 50 μl roztoku heparinu (4 mg/ml), 25 ihned uložen do ledu a po centrifugaci při 4°C byla získána plasma.

Vzorky krve byly odebírány v různých časových intervalech, měřeno od okamžiku podání injekce testované látky; pro každý časový odběr byly použity tři krysy, a to každá trojice zvířat pouze pro jeden odběr.

Vzorky plasmy a séra byly ihned zmraženy a skladovány při -20°C.

Hladiny GH v séru byly měřeny komerční RIA soupravou; hladiny hGRF v plasmě byly měřeny komerční RIA soupravou pro hGRF(1-44).

Výsledky

POZNÁMKA: v celé této části a v souvisejících Obrázcích platí, že "GRF-1PEG 1. vrchol" odpovídá $[\text{Lys}(\text{MPEG}_{5000} - \text{CH}_2\text{-CO-Nle-CO})^{21} - \text{hGRF}(1-29)\text{-NH}_2]$, "GRF-1PEG 2. vrchol" odpovídá $[\text{Lys}(\text{MPEG}_{5000} - \text{CH}_2\text{-CO-Nle-CO})^{12} - \text{hGRF}(1-29)\text{-NH}_2]$, "GRF-2PEG" odpovídá $[\text{Lys}(\text{MPEG}_{5000} - \text{CH}_2\text{-CO-Nle-CO})^{12,21} - \text{hGRF}(1-29)\text{-NH}_2]$ a "GRF-3PEG" odpovídá $\text{N}^\alpha\text{-(MPEG}_{5000}\text{-CH}_2\text{-CO-Nle-CO)[Lys}(\text{MPEG}_{5000}\text{-CH}_2\text{-CO-Nle-CO})^{12,21}\text{-hGRF}(1-29)\text{-NH}_2]$.

CHO-hGRFR-LUC *in vitro* test

Aktivita dvou rozdílných šarží konjugátů hGRF-PEG, obou připravených s použitím DMSO, v CHO-hGRFR-LUC *in vitro* testu je ukázána na Obr. 5 a 6.

Všechny preparáty byly aktivní, i když v menší míře než "nativní" hGRF (hGRF podrobený stejným purifikačním krokům, jaké se použily pro pegylované sloučeniny), přičemž GRF-1PEG (1. i 2. vrchol) byly aktivnější než GRF-2PEG a GRF-3PEG. Mezi hGRF a "nativním" hGRF nebyl pozorován žádný rozdíl (data nejsou ukázána).

Podobná *in vitro* bioaktivita byla pozorována u konjugátů hGRF-PEG ze dvou šarží připravených v DMSO (Obr. 5 vs Obr.6), jakož

i konjugátů ze šarže připravené s použitím roztoku nikotinamidu (Obr.7). Obr. 6 rovněž ukazuje, že dva rozdílné preparáty hGRF(3-29) nevykazovaly významnou *in vitro* aktivitu ve srovnání s hGRF(1-29).

5 *In vitro* biotest na hGRF₁₋₂₉ s buňkami krysí hypofýzy

V obou testech provedených s konjugáty hGRF-PEG pocházejícími ze dvou DMSO preparací bylo zjištěno, že nejaktivnější sloučeninou je 1.vrchol GRF-1PEG, následován 2.vrcholem GRF-1PEG, GRF-2PEG a nakonec GRF-3PEG (Obr. 8 a 9). Tyto nálezy jsou v dobré shodě s výsledky získanými v testu s reportérovým genem.

In vivo test

V předběžných experimentech byly stanoveny hladiny GH v séru a hGRF v plasmě krys po nitrožilní injekci 400 µg hGRF. Výsledky znázorňuje Obr.10: hladiny GH i hGRF dosáhly maximálních hodnot 10 min po injekci hGRF. Poté koncentrace GH v séru rychle klesaly a po 60 minutách se již vrátily k bazální hladině, zatímco koncentrace hGRF v plasmě si v tomtéž časovém intervalu udržely zvýšenou hodnotu.

Na Obr. 11A 11B jsou pro různé časy ukázány hladiny GH a GRF v krvi krys, jež obdržely nitrožilně 400 µg GRF-1PEG (1. a 2. vrchol), GRF-2PEG a GRF-3PEG (vše preparáty z DMSO).

Všechny pegylované preparáty indukují do 10 min po nitrožilní aplikaci vzestup hladiny GH v séru podobně, jako je tomu po injekci hGRF₁₋₂₉. GRF-1PEG (1. a 2.vrchol) a GRF-2PEG indukují GH v hladinách srovnatelných s efektem hGRF₁₋₂₉, kdežto aktivita GRF-3PEG je, podobně jako *in vitro*, nižší.

Co se týká hladin GRF v plasmě, byl pozorován zcela odlišný účinek GRF-1PEG (1. a 2. vrchol) ve srovnání s GRF-2PEG a GRF-3PEG, bez ohledu na původ použitého preparátu (z DMSO nebo nikotinamidu). Za 48 hodin po injekci GRF-1PEG (1. a 2. vrcholu) se koncentrace GRF v plasmě vrátily k bazální hodnotě, zatímco v případě GRF-2PEG a GRF-3PEG se udržely zvýšené hladiny.

Příklad 8: Syntéza chráněných derivátů hGRF(1-29)-NH₂ na pevném nosiči, jako výchozích sloučenin pro pegylační reakci

Na pevném nosiči byla provedena syntéza derivátů hGRF (1-29)-NH₂, které obsahují na primárních aminoskupinách obou lysinových zbytků, Lys¹² a Lys²¹, specifickou N-allyloxykarbonylovou chránící skupinu. Tím se umožní selektivní pegylace na N^α-konci. Jiný derivát s chráněnými aminoskupinami se připraví tak, že se N^α-konec blokuje acylací a Lys¹² se blokuje N-allyloxykarbonylovou skupinou. Tento derivát se použije pro selektivní pegylaci na Lys²¹.

Materiály a metody

20 Peptidová syntéza

Všechny deriváty hGRF peptidu navázaného na nosič byly postupně syntetizovány, při použití Fmoc chemie, na syntetizátoru peptidů od firmy Applied Biosystems Inc., Model 431A. Při syntéze byla použita nízko substituovaná (0,16 mmol/g) PAL-PEG-PS pryskyřice a protokol, uplatňující pro každý aminokyselinový zbytek dvojnásobnou kondenzací a blokování čepičkou (capping), aby se dosáhlo optimálního množství a čistoty surového produktu. Vedle toho byla [N-isopropyl-Tyr¹, Lys(Alloc)¹²]-hGRF(1-29)-NH₂ peptidyl-

pryskyřice podrobena manuální reduktivní alkyací k vnesení N-koncové isopropylové skupiny.

Ve všech případech byly peptidy z pryskyřice odštěpovány působením směsi TFA/1,2-ethandithiol/thioanisol/voda [10:0,5:0,5:0,5 (obj/obj)] po dobu 2 hodin a surové peptidy pak byly izolovány precipitací v MTBE a následnou centrifugací. Lyofilizované surové peptidy byly purifikovány pomocí HPLC na reversní fázi (RP-HPLC) s použitím preparativní kolony Vydac C18 a koncentračního gradientu v systému 0,1%TFA/voda/acetonitril. Všechny purifikované peptidy byly charakterizovány analytickou RP-HPLC a MALDI-TOF hmotovou spektrometrií.

Materiály

Použité chemikálie a jejich zdroje: Fmoc-L-aminokyseliny (Bachem Bioscience, Perseptive Biosystems, NovaBiochem); DMF, 20-litrový sud (J.T.Baker); piperidin (Applied Biosystems, Chem-Impex); HBTU (Rainin, Richelieu Biotechnologies); NMM (Aldrich); anhydrid kyseliny octové (Applied Biosystems); pryskyřice (Perseptive Biosystems, NovaBiochem); kyselina α -kyano-4-hydroxy-skořicová (Sigma); kyselina sinapová (Aldrich); acetonitril (J.T.Baker); TFA (Sigma, Pierce), deionizovaná H₂O (Millipore Milli-Q Water System). Další rozpouštědla a reagensie jsou uvedena níže:

REAGENCIE/ROZPOUŠTĚDLA	DODAVATEL
NMP	Applied Biosystems Inc., J.T.Baker
HBTU	Applied Biosystems Inc., Richelieu Biotechnologies Inc.
0,5 M HOBt v DMF	Applied Biosystems Inc.
2,0 M DIEA v NMP	Applied Biosystems Inc.

piperidin	Applied Biosystems Inc.
dichlormethan	Applied Biosystems Inc.
acetanhydrid	Applied Biosystems Inc.

5 Aminokyseliny: většina FMOC aminokyselin použitých v ABI 431A syntetizátoru byla zakoupena od Applied Biosystems ve formě předvážených 1,0 mmol kartridží. FMOC-Lys(Alloc)-OH se kupoval ve velkém od Perseptive Biosystems (Framingham, MA) a plnil do kartridží vlastními silami. Všechny užívané aminokyseliny měly
10 L-konfiguraci.

Pryskyřice: základní pryskyřice použité pro analogy hGRF byly PAL-PEG-PS (Peptide Amide Linker - Polyethylene Glycol - Polystyrene) pryskyřice. Tyto PAL-PEG-PS nosiče, zakoupené od Perseptive Biosystems, vykazují trvale lepší výsledky z hlediska
15 čistoty a výtěžku surového produktu. Pro všechny deriváty byla použita nízko substituovaná pryskyřice (0,16 mmol/g). Nízko substituované pryskyřice se běžně používají pro syntézu dlouhých, obtížných sekvencí, neboť umožňují lepší kondenzaci tím, že snižují stérickou zábranu a tvorbu β -listu u rostoucích peptidových řetězců.

20

Metody

Syntéza řetězce - Peptidový syntetizátor Applied Biosystems Inc.,

Model 431A

25 Chráněné peptidové řetězce se syntetizují s použitím FMOC strategie na automatickém peptidovém syntetizátoru (Applied Biosystems Inc., Model 431A), který využívá programované rychlé FMOC cykly (FastMoc™). K aktivaci a kondenzaci se používá HBTU, k odstranění chránících skupin (deprotekcí) se používá 20% piperidin, a jako hlavní

rozpouštědlo při deprotekcí, při rozpouštění aminokyselin a při promývání pryskyřice se užívá NMP. Aminokyseliny se vnášejí v předvážených 1,0 mmol kartridžích. Pro 0,25 mmol FastMoc™ cykly se užívají 1,0 mmol kartridže a 40 ml reakční nádobka.

5

Syntéza řetězce - postup

Jednotlivé kroky programovaných cyklů pro 0,25 mmol měřítko syntézy lze shrnout takto:

1. Deprotekce piperidinem - Pryskyřice se nejprve promyje NPM, potom se dodá roztok 18% piperidin/NPM a nechá působit 3 minuty. Reakční nádobka se odsaje a dodá se roztok 20% piperidinu a deprotekce pokračuje přibližně 8 minut.
2. Rozpuštění aminokyseliny - Ke kartridži se přidají a 6 minut míchají NMP (2,1 g) a 0,9 mmolů 0,45 M HBTU/HOBt v DMF (2,0 g).
- 15 3. Promývání NMP - Reakční nádobka se odsaje a pryskyřice se 5-krát promyje NMP.
4. Aktivace aminokyseliny a její přenos do reakční nádoby (RV reaction vessel) - Ke kartridži se přidá 1 ml 2 M DIEA v NMP, aby se zahájila aktivace rozpuštěné aminokyseliny, poté je z kartridže přenesena do RV.
- 20 5. Kondenzace a konečné promytí - Kondenzační reakce mezi aktivovanou aminokyselinou a peptidyl-pryskyřicí, jež má z N-konce odstraněnou chránící skupinu, probíhá přibližně 20 minut a potom se RV odsaje a pryskyřice promyje NMP.
- 25 6. Capping (je-li žádoucí) - Přibližně 12 ml NMP roztoku obsahujícího 0,5 M anhydrid kyseliny octové, 0,125 M DIEA a 0,015 M HOBt se přidá do reakční nádoby a vortexuje se 5 minut. Tím by se měly acetylovat všechny nezreagované aminoskupiny na pryskyřici, což

vede ke zkráceným peptidům spíše než k sekvencím s delecemi,
a tím se usnadní pozdější purifikační kroky.

Úplný protokol pro tyto cykly lze nalézt v uživatelském bulletinu
5 Applied Biosystems User Bulletin No.35 (FastMoc™ 0,25 a 0,10 na
modelu 431A).

Kroky standardního protokolu při typické syntéze:

Krok 1. Promytí pryskyřice 3x roztokem DMF

10 Krok 2. Deprotekce 2x 5 minut roztokem 20% piperidin/DMF

Krok 3. Promytí pryskyřice 6x roztokem DMF

Krok 4. Kondenzace po dobu 45 minut s aminokyselinou aktivovanou
HBTU/NMM v DMF

Krok 5. Promytí pryskyřice 3x roztokem DMF

15

U obtížných sekvencí lze po kondenzaci zařadit navíc krok
k zablokování nezreagovaných konců (capping), který spočívá v
20-min působení roztoku 70% acetanhydridu v DMF, aby se
acetylovala všechna nezreagovaná místa na peptidyl-pryskyřici;
20 výsledný surový produkt tak jako kontaminaci obsahuje spíše zkrácené
sekvence, než sekvence s delecemi.

Štěpení/extrakce

Štěpící koktejl používaný k odstranění chránících skupin
25 v postranních řetězcích a k uvolnění peptidu z pryskyřice je standardní
směsí používanou pro peptidy, obsahující arginin a/nebo methionin.
Pro 0,1 - 0,5 g peptidyl-pryskyřice se užívá směs o složení: 10 ml

TFA, 0,5 ml deionizovaná voda, 0,5 ml thioanisol, 0,5 ml ethandithiol (87% TFA, 4,3% deionizovaná voda, 4,3% thioanisol, 4,3% ethandithiol).

5 Štěpící postup

100 mg - 1 g peptidyl-pryskyřice se umístí do 20 ml skleněné nádoby a ochladí v ledové lázni. Připraví se štěpící koktejl a rovněž se ochladí v ledové lázni a pak se přidá k peptidyl-pryskyřici do výsledného objemu přibližně 10 ml.

10 Nádobka se vyjme z ledové lázně a nechá se ohřát na pokojovou teplotu. Nádobka se uzavře a reakční směs se míchá při pokojové teplotě po dobu 2 hodin.

Po 2 hodinách se roztok vakuově přefiltruje přes filtr o střední až hrubé poréznosti do přibližně 30 ml studeného roztoku MTBE.
15 Reakční nádobka se promyje 1 ml TFA a obsah přefiltruje přes stejnou nálevku s filtrem do studeného MTBE. Celá suspenze se potom přenesse do 50 ml centrifugační kyvety a centrifuguje při pokojové teplotě asi 10 min při 2 000 ot/min. Supernatant se odsaje, precipitát se resuspenduje v 40 ml studeného MTBE a opět centrifuguje. Tento
20 krok se ještě jednou opakuje. Konečný supernatant se odsaje a precipitát se probublá dusíkem, aby se odpařila většina zbývajících éteru.

Peptid se pak rozpustí v 20-30 ml 1% - 10% vodného roztoku kyseliny octové, naředí se deionizovanou vodou na objem asi 100-
25 150 ml, namrazí se a lyofilizuje se.

Purifikace

RP-HPLC

Systém - Waters Delta Prep 4000

Kolona - Vydac RP C18, 10 μ m, 2,2 x 25 cm (kat.č. 218TP1022)

5 Pufry - A: voda/0,1%TFA B: acetonitril/0,1%TFA

Průtok - 15 ml/min

Detekce - Waters 484 UV detektor, 220 nm

Gradient - různý, obvykle 0,2%B/min až 1%B/min

10 Lyofilizované surové peptidy, 50-100 mg, se rozpustí v 200 ml vodné 0,1% TFA. Roztok peptidu se pak přímo nanese na preparativní kolonu prostřednictvím přívodní hadičky zásobníku pufry "A" a spustí se gradientový program.

15 Získané frakce se přes noc vyhodnotí pomocí analytického HPLC systému s autosamplrem. Překrývající se frakce, které se podle integrace vrcholu jeví jako >92% čisté, se spojí, naředí deionizovanou vodou v poměru 4:1, namrazí na vnitřní povrch baňky a lyofilizují se na lyofilizátoru Virtis 25 SL.

Charakterizace

20 HPLC na reversní fázi

Podmínky:

Systém - Waters s komponentami: 510 pumpy, 717 autosampler, 490 UV detektor s proměnnou vlnovou délkou

Kolona - Vydac C18, 5 μ m, 0,46x25 cm, (kat.č. 218TP54)

25 Pufry - A: H₂O/0,1%TFA B: acetonitril/0,1%TFA

Průtok - 1 ml/min

Detekce - UV: 214 nm, 280 nm

Gradient - 2%B/min

Vzorky z purifikovaných lyofilizovaných peptidů se připraví
rozpuštěním 0,2-1,0 mg peptidu ve vodné 0,1% TFA do koncentrace
5 0,5-1,0 mg/ml.

Vzorek o objemu 15-18 μ l se injikuje na kolonu a po dobu 25
min se eluuje koncentračním gradientem acetonitrilu (0-50%).
K záznamu a archivaci chromatografických dat se použije
softwarového systému Waters Expert-Ease.

10

Hmotová spektrometrie

Typ: MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization Time-of-flight)

Systém: Perseptive Biosystems Voyager Elite

15 Matrice: kyselina α -kyano-4-hydroxy-skořicová, 10 mg/ml v 67%
ACN/0,1%TFA; nebo kyselina sinapová, 10 mg/ml v 50%
ACN/0,1%TFA

Vzorky peptidů (1-20 μ M) se připraví v 50%ACN/0,1%TFA. Do
jamek analytické destičky se postupně nanese 0,5 μ l roztoku matrice,
20 0,5 μ l vzorku peptidu a ponechá se uschnout. Destička se umístí do
zařízení a vzorky se skenují a analyzují s použitím Reflector Delayed-
Extraction postupu optimalizovaného pro peptidy. Pro každý vzorek se
snímá kumulativní signál, získaný aplikací 32 - 128 laserových
záblesků, který se analyzuje. Každý měřicí cyklus zahrnuje analýzu
25 standardního peptidu, který je pro účely kalibrace umístěn v jedné
z jamek analytické destičky.

Specifická syntéza

Příprava [Lys(Alloc)^{12,21}]-hGRF(1-29)-NH₂

Syntézou na peptidovém syntetizátoru Applied Biosystems 431A s použitím Fmoc chemie (viz shora) byla připravena výchozí
5 [Lys(Alloc)^{12,21}]-hGRF(1-29)-PAL-PEG-PS-pryskyřice, včetně
deprotekce Fmoc skupiny na N-koncovém zbytku.

Peptidyl-pryskyřice byla štěpena po dobu 2 hodin směsí
TFA:1,2-ethandithiol:thioanisol:voda [10:0,5:0,5:0,5 (obj/obj)] a peptid
byl izolován precipitací v MTBE s výtěžkem 240 mg surového peptidu.
10 Purifikací pomocí preparativní RP-HPLC na koloně Vydac C18
(22x250 mm) se získalo 60 mg purifikovaného produktu (>95% podle
analytické HPLC). MALDI-TOF hmotové spektrum: vypočteno: 3523,8,
naměřeno: 3524,2.

15 Příprava [N-isopropyl-Tyr¹, Lys(Alloc)¹²]-hGRF(1-29)-NH₂

Syntéza výchozí [Lys(Alloc)¹²]-hGRF(1-29)-PAL-PEG-PS pryskyřice

Syntézou na peptidovém syntetizátoru Applied Biosystems 431A
s použitím Fmoc chemie (viz shora) byla připravena výchozí
[Lys(Alloc)¹²]-hGRF(1-29)-PAL-PEG-PS-pryskyřice, včetně deprotekce
20 Fmoc skupiny na N-koncovém zbytku.

N^α-isopropylace reduktivní alkylací

N^α-isopropyllová skupina byla zavedena reduktivní alkylací
peptidyl-pryskyřice při použití kyanoborhydridu sodného
25 a odpovídajícího ketonu (acetonu) jak popisuje Hocart et al., 1987, J.
Med. Chem. 30:739-743. 880 mg peptidyl-pryskyřice (přibližně 70
μmolů) se nechalo nabobtnat v 5 ml DCM po dobu 30 minut, pak se
přidalo 10 mmolů (174 μl) acetonu v 7 ml MeOH/1% HOAc a směsí

se během 2 hod při pokojové teplotě občas zamíchalo. Poté se přidaly 2 mmoly (129 mg) kyanoborhydridu sodného v 12 ml MeOH/1% HOAc, směs se během 2 hod občas zamíchalo a pak se směs ponechala stát přes noc (15 hod). Dokončení reakce bylo indikováno kvalitativní
5 ninhydrinovou reakcí (žádné modré zbarvení). Peptidyl-pryskyřice byla štěpena po dobu 2 hodin směsí TFA:1,2-ethandithiol:thioanisol:voda [10:0,5:0,5:0,5 (obj/obj)] a peptid byl izolován precipitací v MTBE s výtěžkem přibližně 200 mg surového peptidu. Purifikací pomocí preparativní RP-HPLC na koloně Vydac C18 (22x250 mm) při použití
10 koncentračního gradientu rozpouštědel voda/acetonitril/0,1%TFA se získalo 50 mg purifikovaného produktu (>95% podle analytické HPLC). MALDI-TOF hmotové spektrum: vypočteno: 3481,9, naměřeno: 3481,8.

15 **Příklad 9: Pegylace chráněného hGRF(1-29)**

Deriváty hGRF připravené podle Příkladu 8 byly konjugovány s aktivovaným polyethylenglykolem, jak je popsáno v Příkladech 1 a 6.

Purifikace v tomto případě sestávala pouze z odstranění nadbytku reagensů a vedlejších produktů, jelikož nebylo nutné
20 aplikovat postup popsáný v Příkladech 2 a 3.



SEZNAM SEKVENČÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

(i) PŘIHLAŠOVATEL:

- 5 (A) JMÉNO: Applied Research Systems ARS Holding N V.
(B) ULICE: 14 John B. Gorsiraweg
(C) MĚSTO: Curacao
(E) ZEMĚ: The Netherlands Antilles
(F) PSČ (ZIP): žádné
10 (G) TELEFON: 639300
(H) FAX: 614129

(ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Selektivní příprava specifických GRF-PEG konjugátů v roztoku

15 (iii) POČET SEKVENČÍ: 1

(iv) POČÍTAČOVÝ FORMÁT:

- (A) TYP MÉDIA: Floppy disk
(B) POČÍTAČ: IBM PC compatible
20 (C) OPERAČNÍ SYSTÉM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(2) INFORMACE O SEQ ID NO: 1:

25 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 29 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselinová
(C) TYP ŘETĚZCE:
(D) TOPOLOGIE: lineární

30

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: NE

(iv) ANTI-SENSE: NE

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO:1:

5 Tyr Ala Asp Ala Ile Phe Thr Asn Ser Tyr Arg Lys Val Leu Gly Gln
1 5 10 15

Leu Ser Ala Arg Lys Leu Leu Gln Asp Ile Met Ser Arg
20 25

10

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob selektivní přípravy specifických konjugátů hGRF-PEG, obsahujících v molekule hGRF (lidského GRF) jednu nebo více jednotek polyethylenglykolu (PEG) kovalentně vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N^α, vyznačující se tím, že konjugační reakce mezi peptidem hGRF a aktivovaným PEG se provádí v roztoku a požadovaný konjugát hGRF-PEG se izoluje z reakční směsi a purifikuje se.
2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že roztokem je vodný roztok nikotinamidu nebo pufrovaný vodný roztok denaturujícího činidla.
3. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že rozpouštědlem je polární organické rozpouštědlo vybrané ze skupiny: dimethylsulfoxid, dimethylformamid/pufr nebo acetonitril/pufr.
4. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že konjugát hGRF-PEG se izoluje z reakční směsi a purifikuje se chromatografickými metodami.
5. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že hGRF peptid je hGRF (1-29)-NH₂.

6. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že před provedením pegylační reakce se hGRF peptid chrání na jedné nebo více ze skupin: N^α , Lys¹² a Lys²¹.
- 5 7. Způsob podle nároku 1 nebo 6, vyznačující se tím, že po pegylační reakci dále zahrnuje reakci k odstranění chránících skupin.
- 10 8. Způsob podle kteréhokoli z předcházejících nároků, vyznačující se tím, že aktivovaný PEG je alkylační nebo acylační PEG ve své monomethoxylované formě.
- 15 9. Konjugát hGRF-PEG obsahující jednu nebo více PEG jednotek (na molekulu hGRF) kovalentně vázaných k Lys¹² a/nebo Lys²¹ a/nebo N^α .
- 10 10. Konjugát hGRF-PEG podle nároku 9, kde 1 jednotka PEG je kovalentně vázána k Lys¹².
- 20 11. Konjugát hGRF-PEG podle nároku 9, kde 1 jednotka PEG je kovalentně vázána k Lys²¹.
12. Konjugát hGRF-PEG podle nároku 9, kde k Lys¹² a Lys²¹ je kovalentně vázáno po 1 jednotce PEG.
- 25 13. Konjugát hGRF-PEG podle nároku 9, kde k Lys¹², Lys²¹ a N^α je kovalentně vázáno po 1 jednotce PEG.

14. [Lys(Alloc)^{12,21}]-hGRF jako meziprodukt pro pegylační reakci podle nároku 1.
- 5 15. [N^α-isopropyl-Tyr¹,Lys(Alloc)¹²]-hGRF jako meziprodukt pro pegylační reakci podle nároku 1.
16. Použití konjugátů hGRF-PEG podle nároků 9 až 13 jako léku.
- 10 17. Použití konjugátů podle kteréhokoli z nároků 9 až 13 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu, prevenci nebo diagnostiku poruch souvisejících s růstovým hormonem.
- 15 18. Použití podle nároku 17 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčbu nebo diagnostiku deficience růstového hormonu (GHD).
19. Farmaceutický prostředek obsahující konjugáty podle kteréhokoli z nároků 9 až 13 spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči a/nebo excipienty.

20

25

10.08.00

2000-2055

1/14

↓ NH₂ - Tyr - Ala - Asp - Ala - Ile - Phe - Thr - Asn - Ser - Tyr - Arg - Lys - Val - Leu - Gly - Gln - Leu - Ser - Ala - Arg - Lys - Leu - Leu - Gln - Asp - Ile - Met - Ser - Arg - NH₂

↓

10

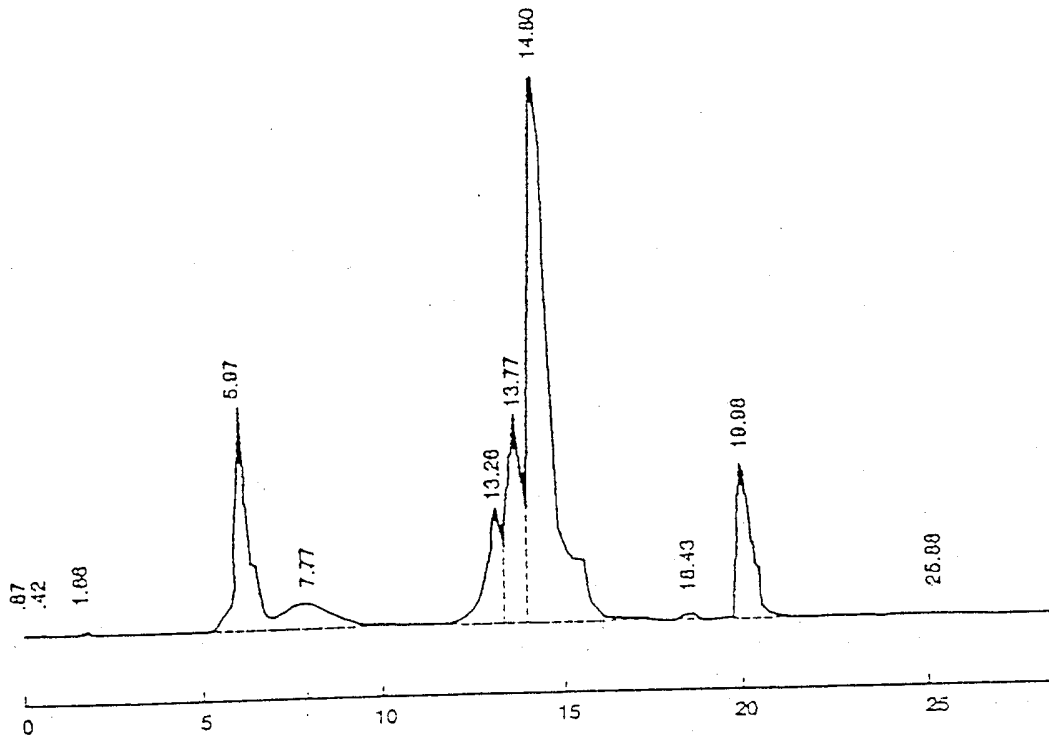
20

Obr. 1

10.08.00

2000-2055

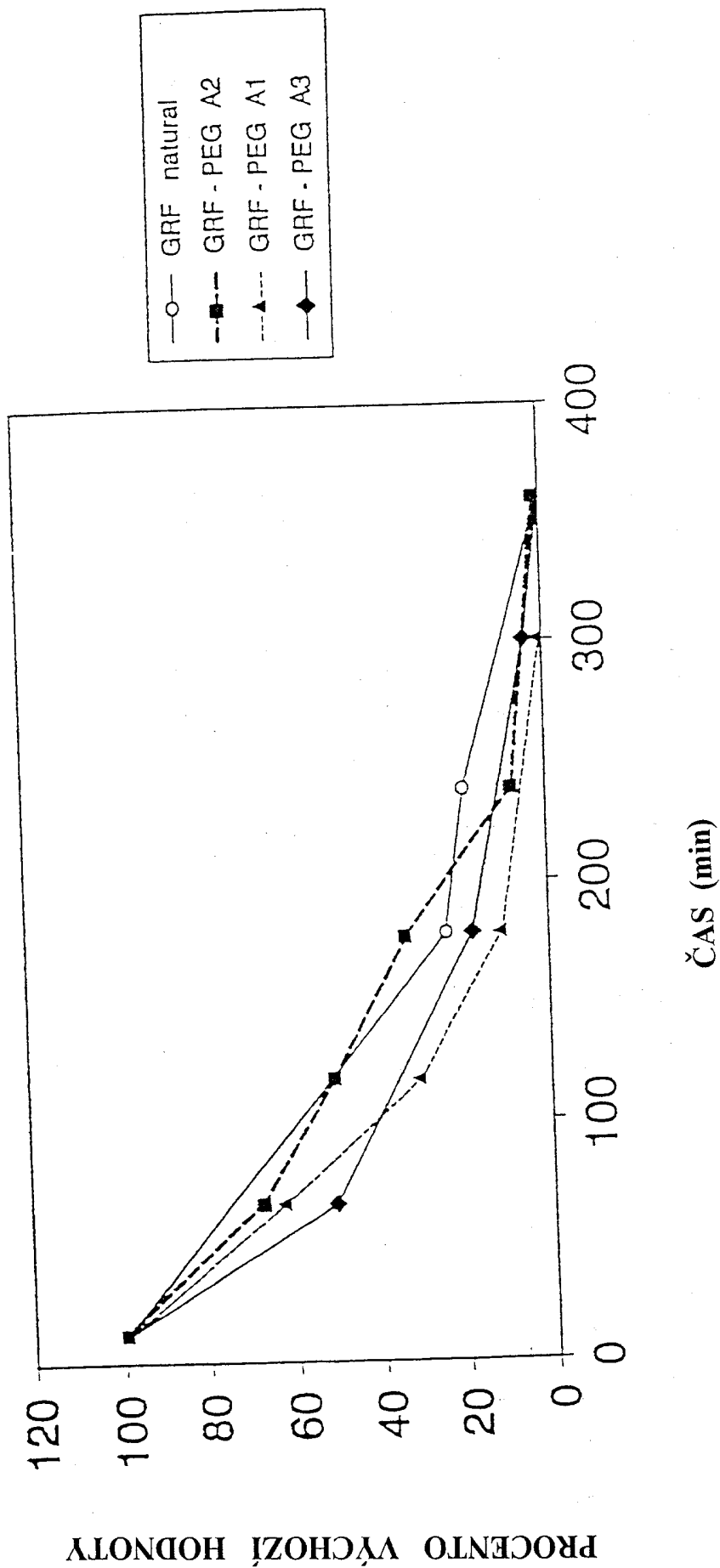
2/14



Obr. 2

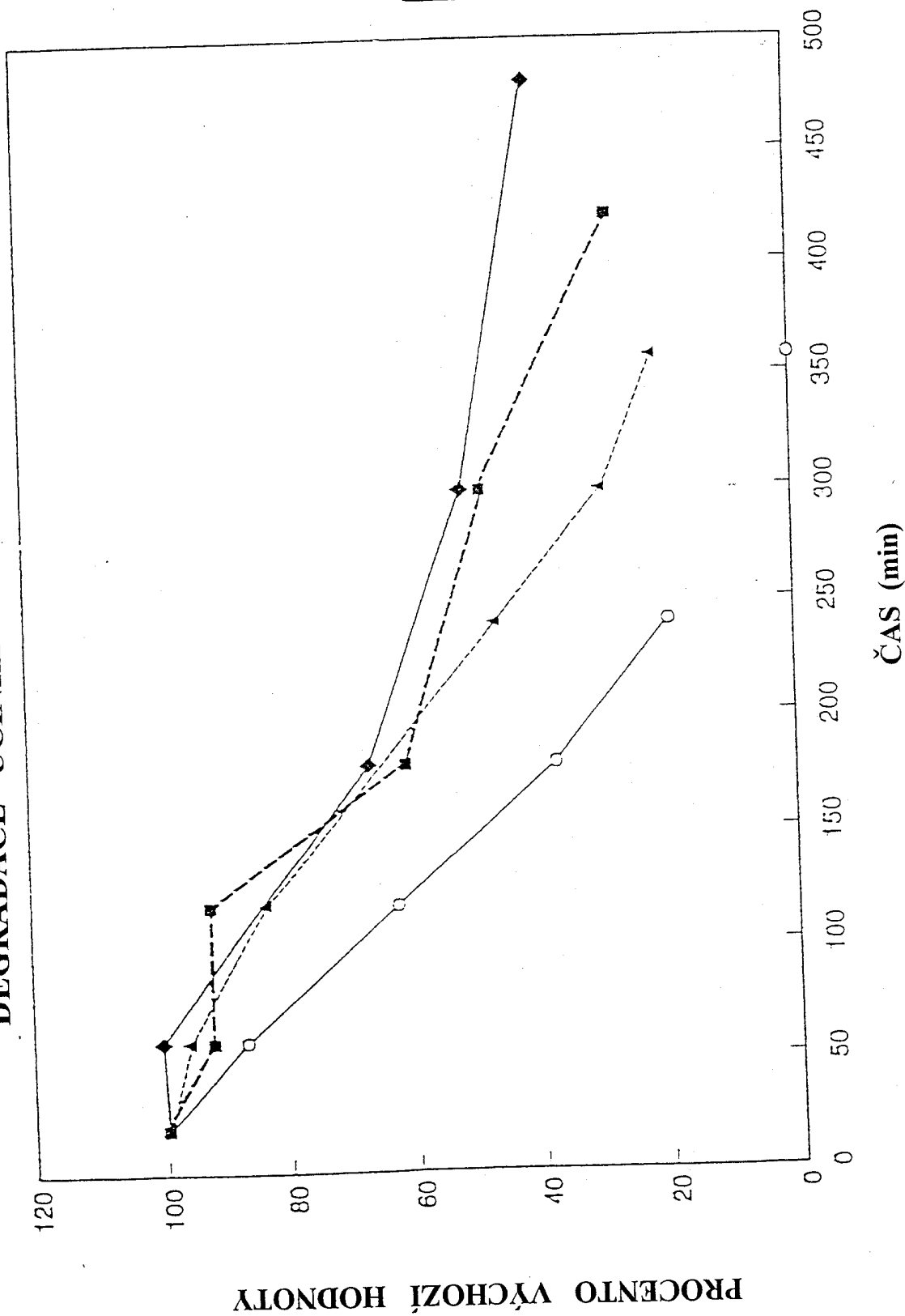
Obr. 3a

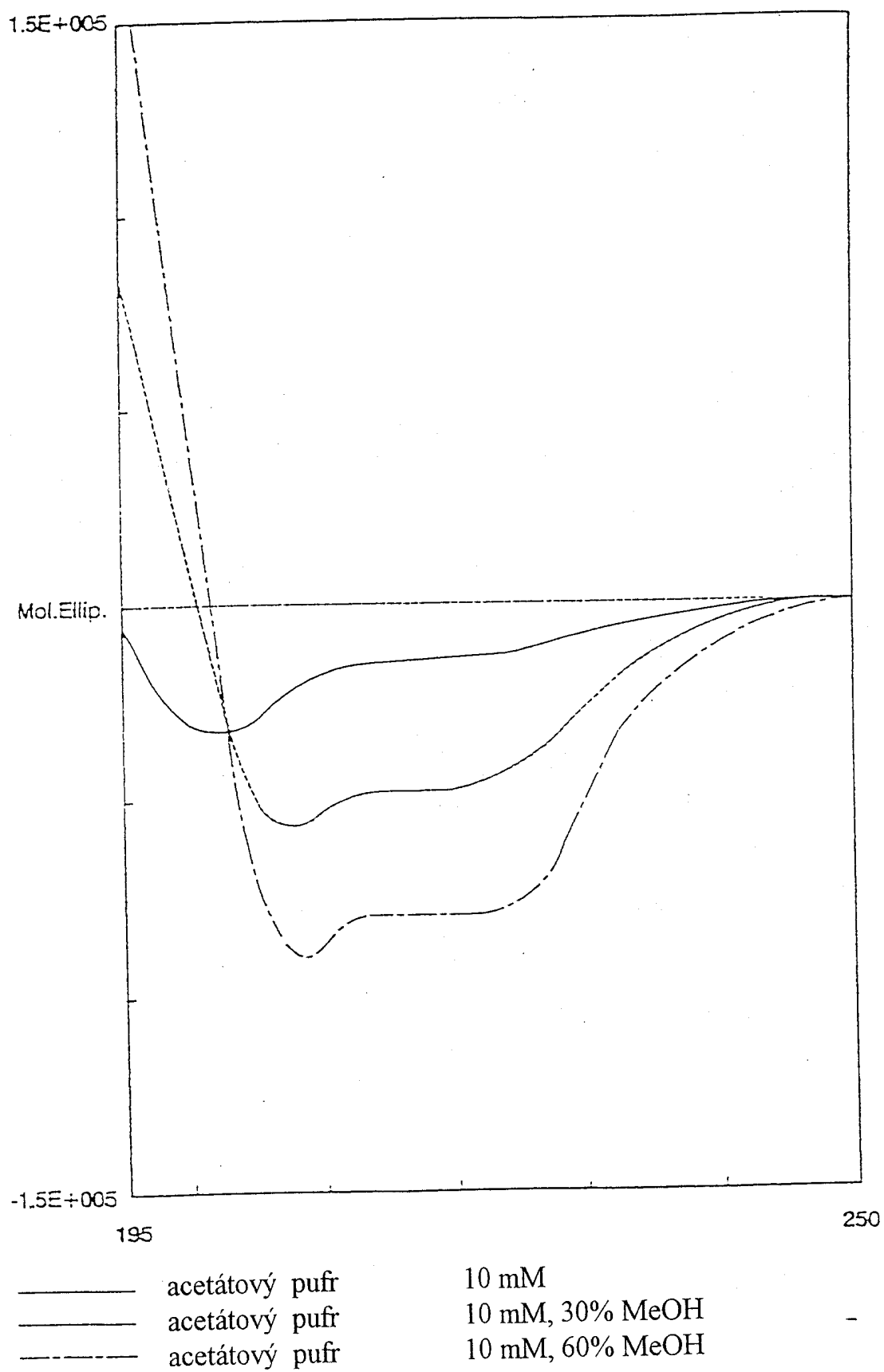
DEGRADACE ÚČINKEM SUBTILISINU



Obr. 3b

DEGRADACE ÚČINKEM CHYMOTRYPSINU



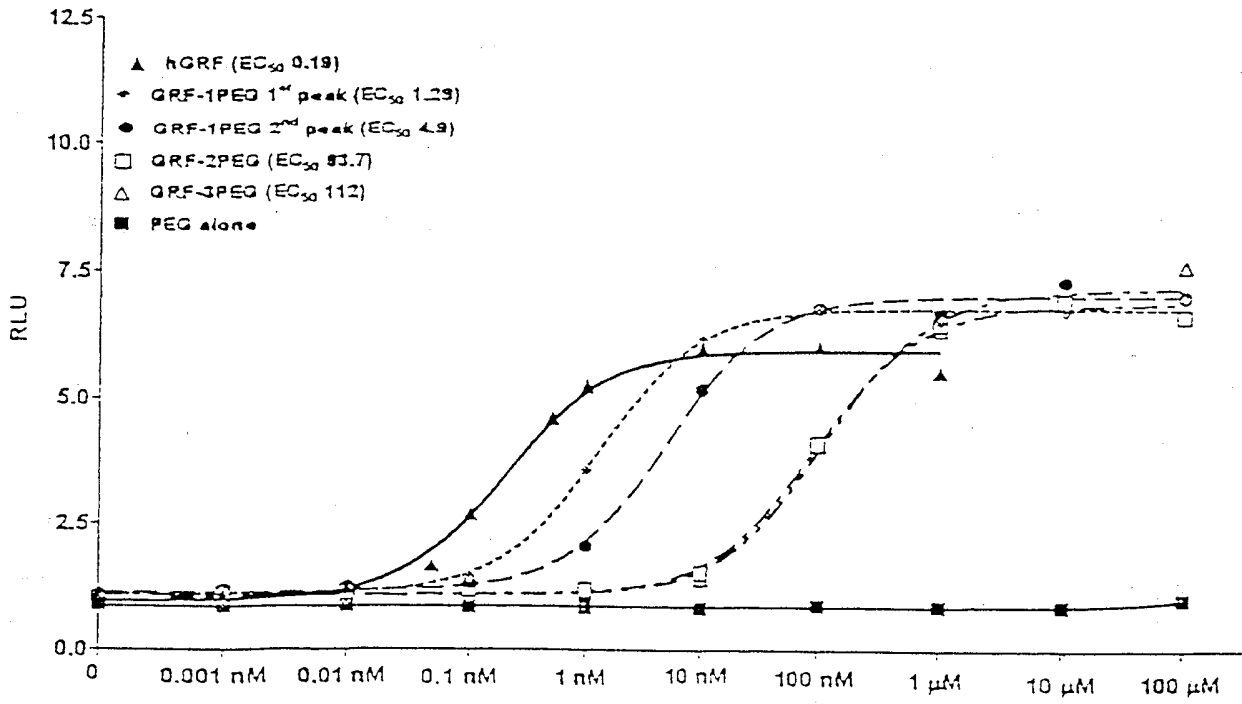


Obr. 4

6/14

10:08:00

2000-2035

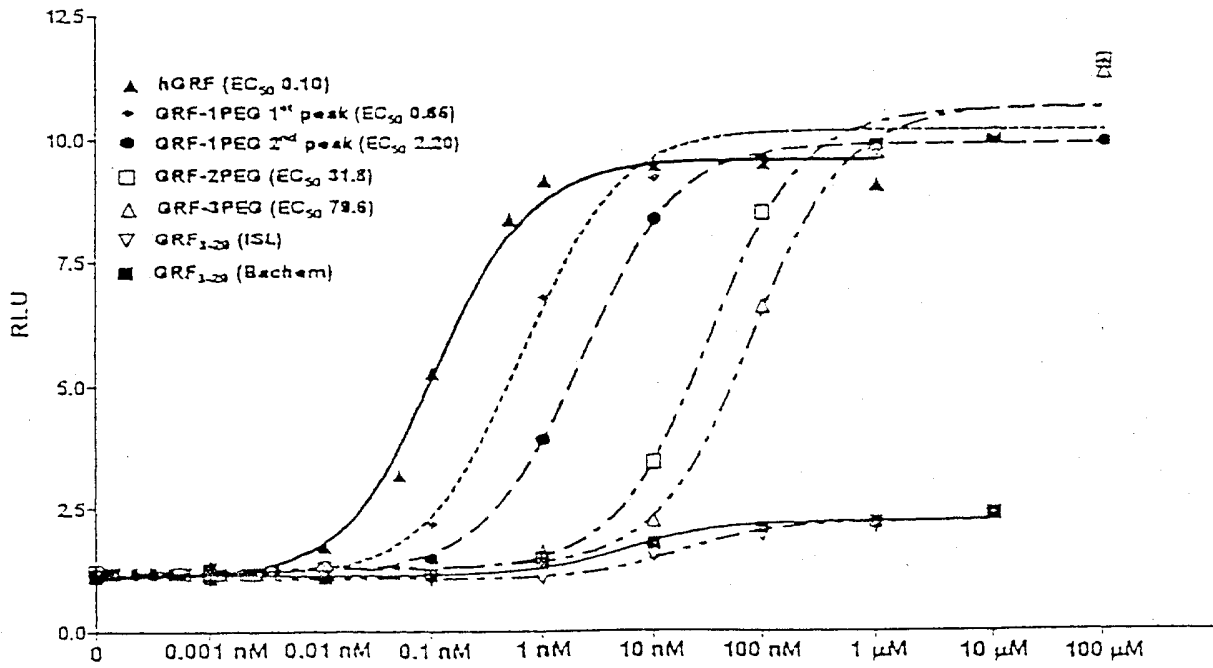


Obr. 5

10.08.00

7/14

2000-2055

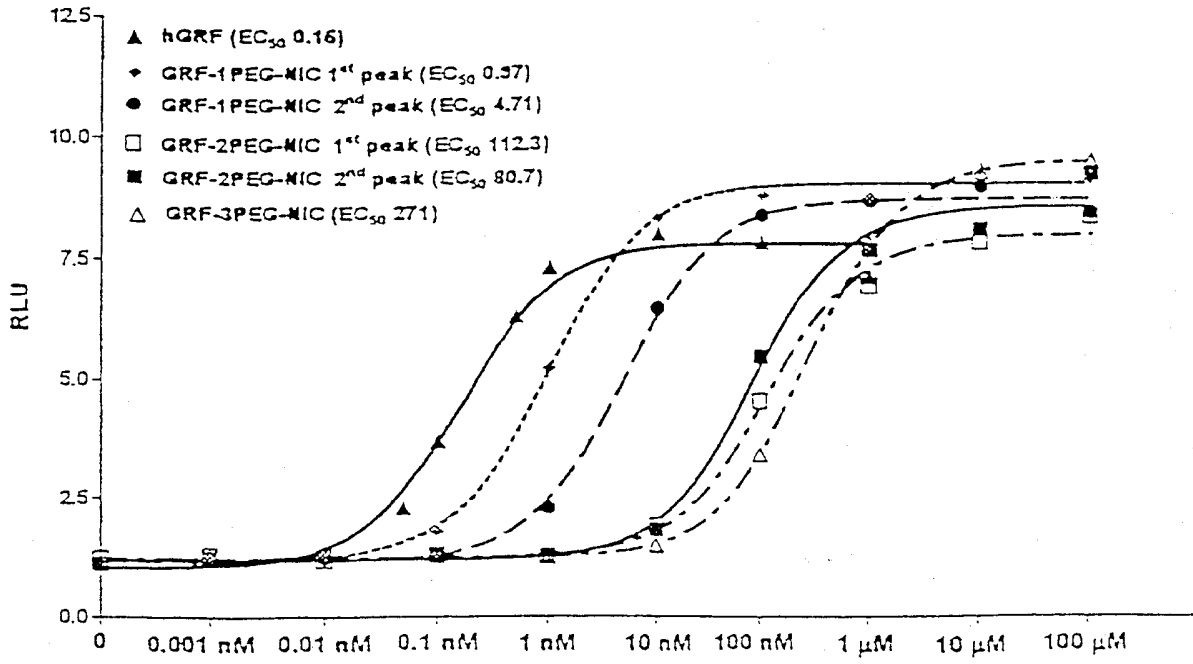


Obr. 6

10.08.00

8/14

2000-2055



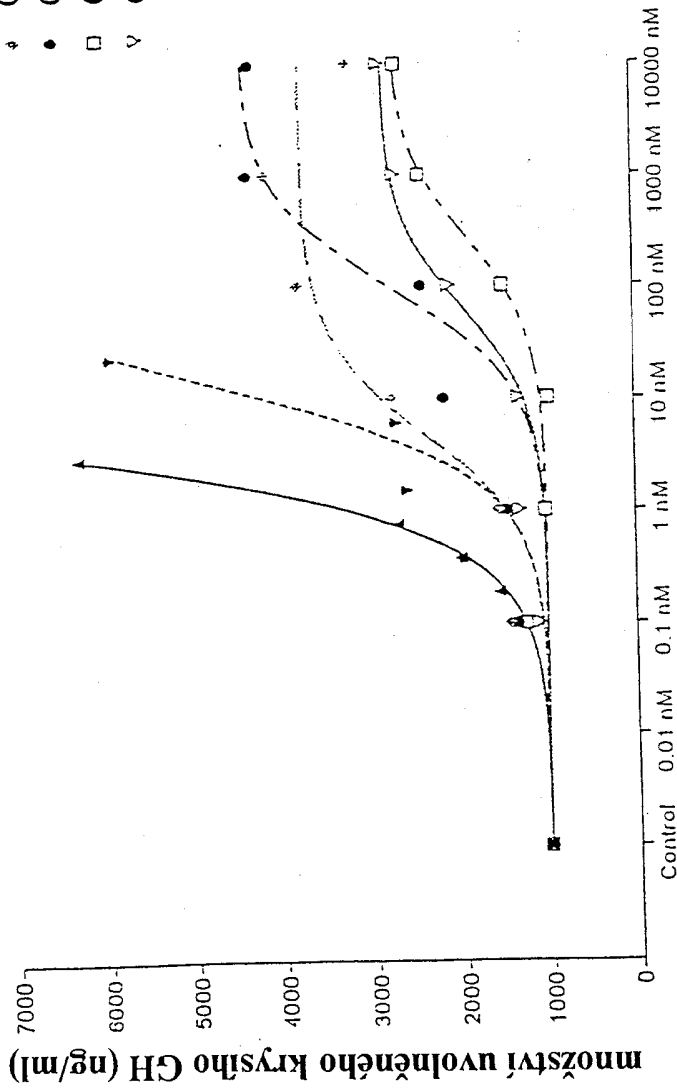
Obr. 7

10.08.00

2000-2005

9/14

- ▲ hGRF (EC₅₀ 5,96)
- ▼ GRF nativní (EC₅₀ 14,55)
- ✦ GRF-IPEG 1.vrchol (EC₅₀ 4,65)
- GRF-IPEG 2.vrchol (EC₅₀ 91,69)
- GRF-2PEG (EC₅₀ 252,3)
- ▽ GRF-3PEG (EC₅₀ 59,13)



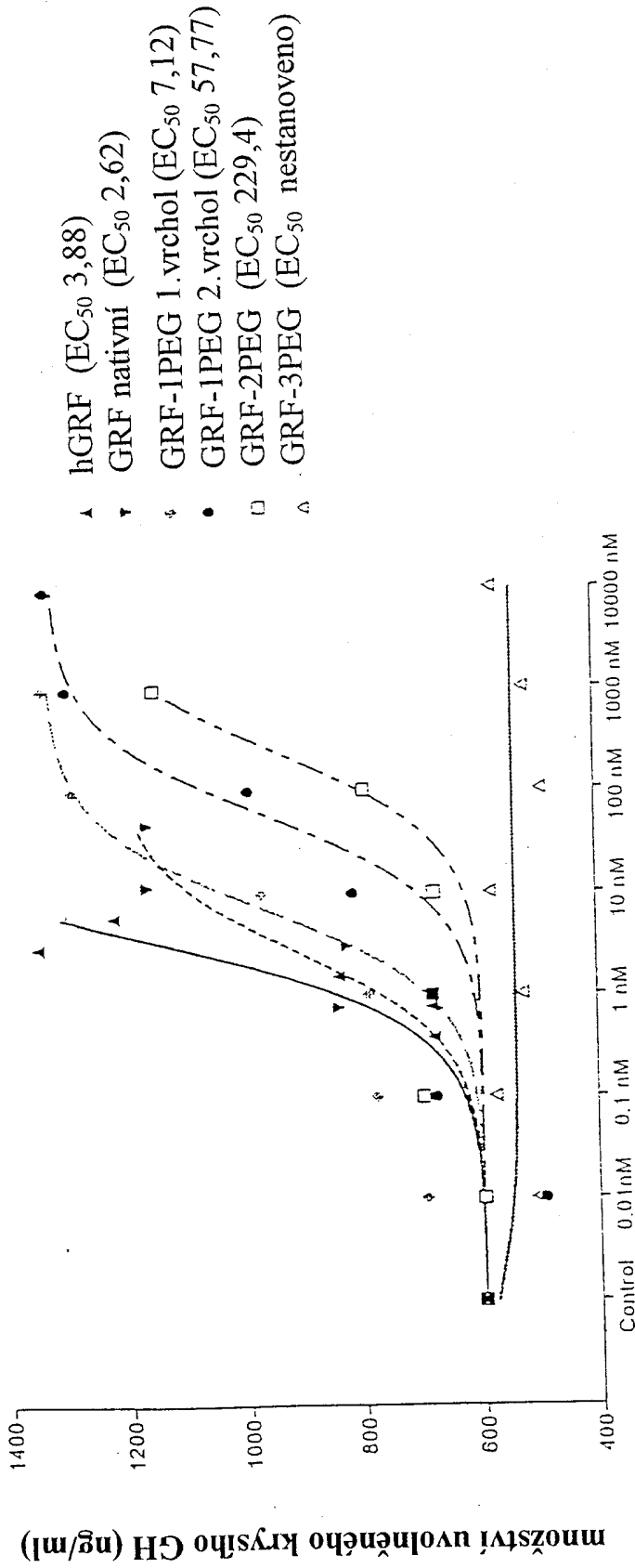
konjugáty hGRF-PEG: 2. šarže

Obr. 8

10.08.00

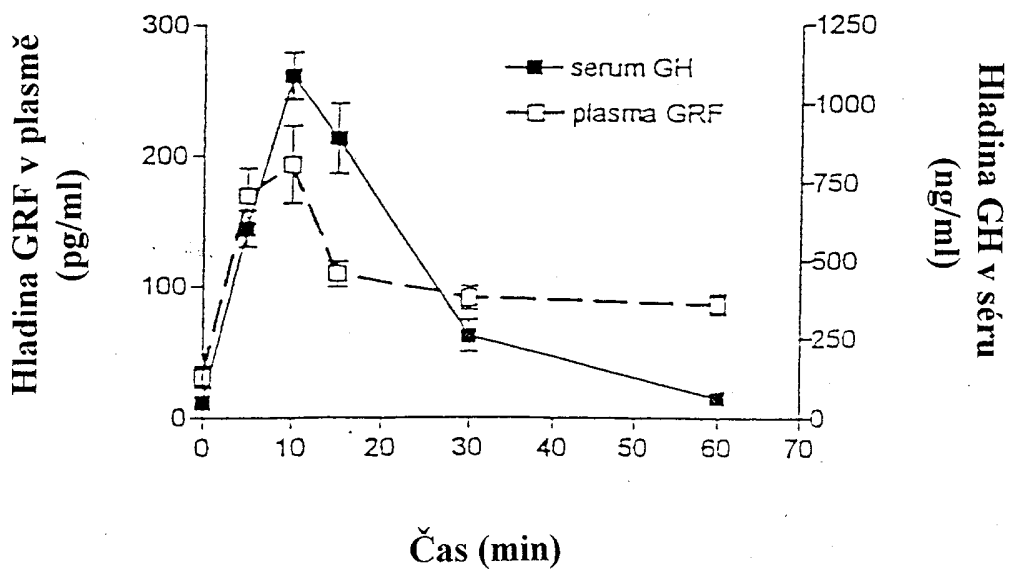
2000-2055

10/14



konjugáty hGRF-PEG: 3. řáže

Obr. 9

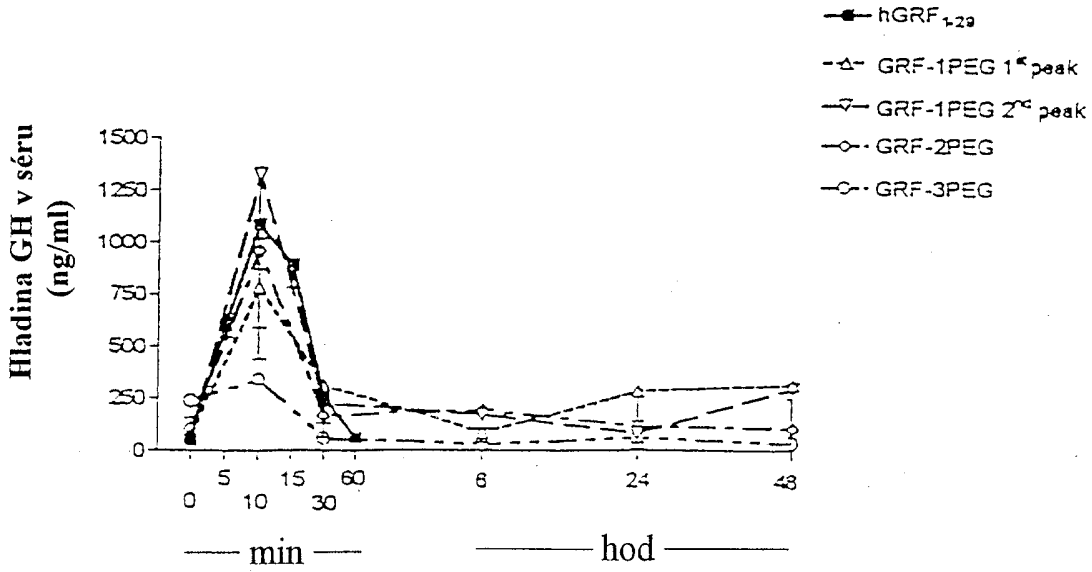


Obr. 10

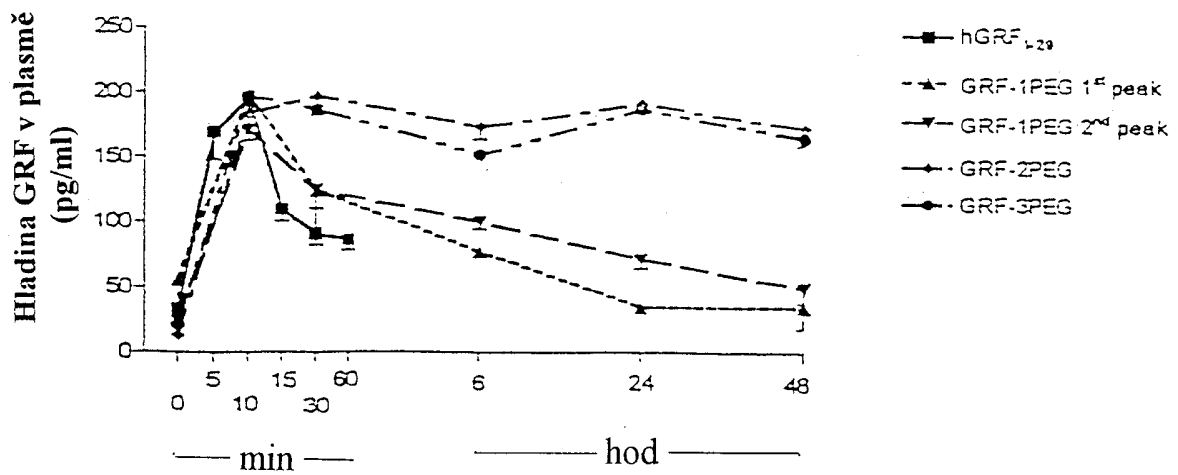
10.08.00

2000-2055

12/14



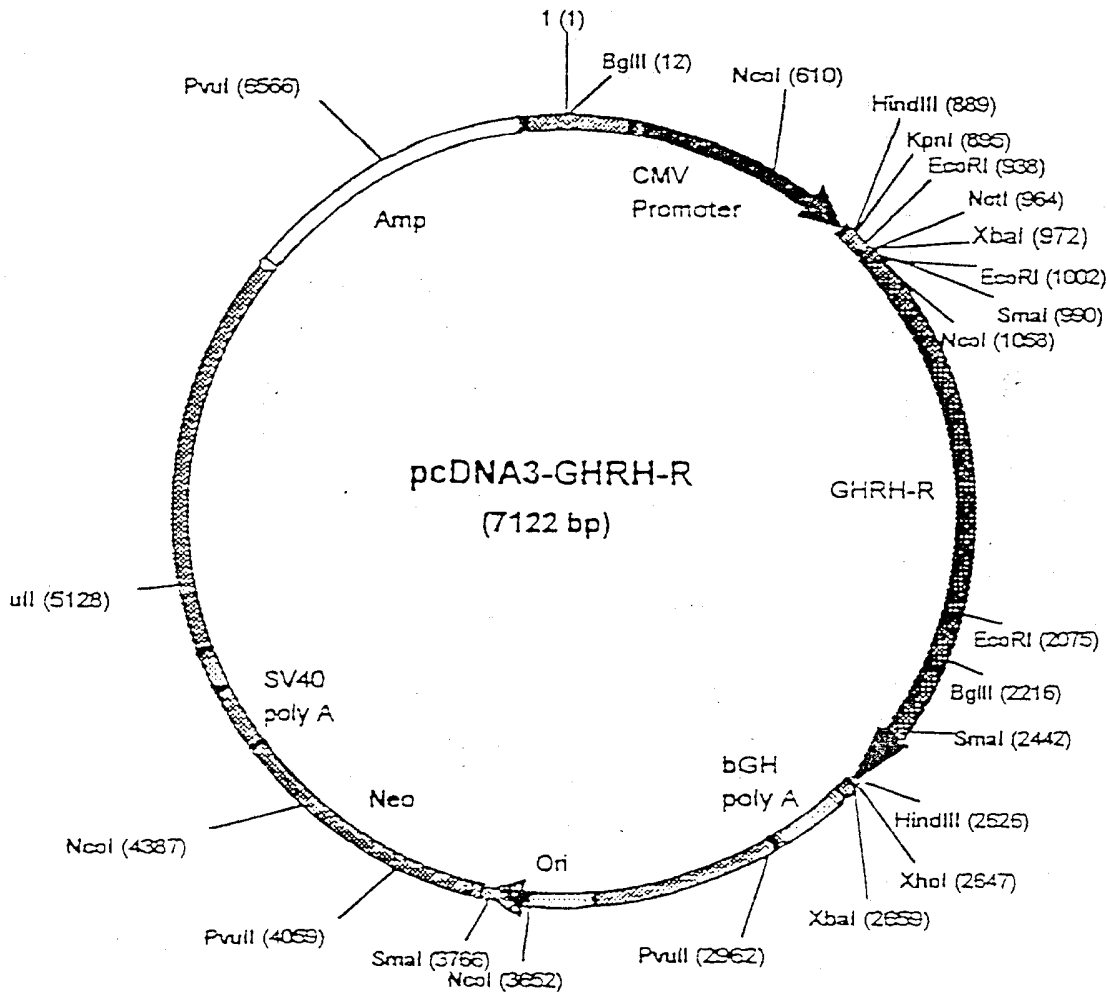
Čas



Čas

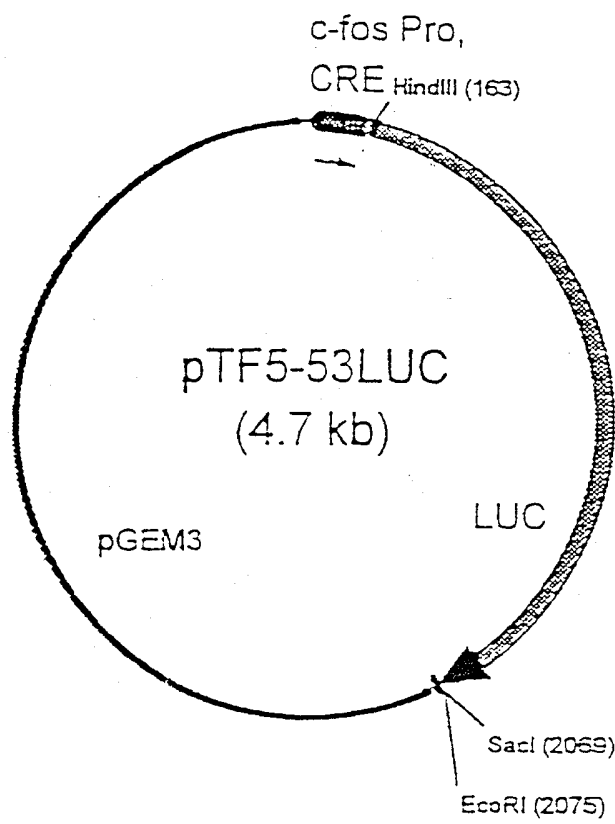
Obr. 11A a B

Vektor pcDNA3-GRF-R



Obr. 12

Vektor pTF5-53LUC



Obr. 13