

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.12.2000**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.12.1999**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/459443**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **13.11.2002**
(Věstník č. 11/2002)
(86) PCT číslo: **PCT/US00/33592**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/041812**

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 1990

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 47/48

C 07 K 14/595

A 61 P 3/04

(71) Přihlašovatel:

**NOBEX CORPORATION, Research Triangle Park,
NC, US;**

(72) Původce:

Ekwuribe Nnochiri N., Cary, NC, US;

(74) Zástupce:

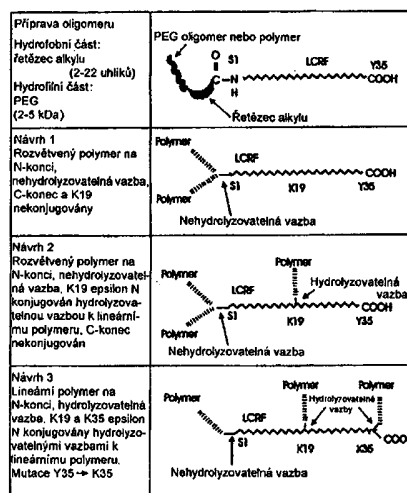
**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
14000;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Amfifilní polymery a polypeptidové konjugáty je
obsahující**

(57) Anotace:

Proteiny a/nebo peptidy jako je luminální cholecystokinin uvolňující faktor (LCRF) jsou konjugovány s amfifilními polymery. Takovéto konjugáty mohou modulovat farmakokinetický profil proteinů a/nebo peptidů a tím zlepšovat jejich klinické využití. Takovéto konjugáty mohou stabilizovat a uvolňovat proteiny a/nebo peptidy, jako je LCRF, k receptorům ve střevě bez absorbování do krevního řečiště.



Amfofilní polymery a je obsahující polypeptidové konjugáty

Oblast techniky

Příhláška se obecně týká nové technologie pro konjugaci amfofilních oligomerů a polymerů s peptidy za účelem modulování jejich farmakologického profilu a tím zlepšení jejich klinické využitelnosti. Konjugáty tohoto vynálezu mají schopnost stabilizovat a uvolňovat **luminální cholecystokinin uvolňující faktor (LCRF)** k receptorům ve střevě bez absorpce do krevního řečiště.

Dosavadní stav techniky

Endogenní LCRF se váže na receptory endoteliálních buněk na luminálním povrchu střeva, které potom uvolňují do krevního řečiště cholecystokinin (CCK), polypeptidový hormon, který indukuje pocit sytosti a snižuje příjem potravy. Stabilizovaný exogenní LCRF uvolněný do střeva bude mimikovat normální fyziologickou aktivitu. Chemická modifikace peptidů regulujících chování při příjmu potravy má potenciál pro léčbu obezity, vážného a narůstajícího veřejného zdravotního problému ve všech industrializovaných státech, zejména ve Spojených státech amerických.

V industrializovaných zemích má obezita téměř epidemický charakter s narůstající prevalencí. Patogeneze obezity je komplexní a zahrnuje vztahy mezi životními, dietetickými, behaviorálními a genetickými faktory. Předmětem předkládaného vynálezu je poskytnutí léku, která bude indukovat pocit sytosti, a bude proto snižovat tělesnou hmotnost.

Role neuro- a gastrických peptidů při regulaci příjmu potravy je v hlavním zájmu výzkumu obezity. Existují přesvědčivé důkazy, že CCK inhibuje příjem potravy. Regulace exprese CCK je dosaženo převážně regulací LCRF, který je u krys konstitutivně exprimován ve dvanáctníku. U lidí bylo pozorováno, že pro stimulaci sekrece předpokládaného CCK uvolňujícího faktoru je třeba stimulace živinami. Po požití jídla obsahujícího bílkoviny proteiny saturují dostupný trypsin a větší množství LCRF zůstává nehydrolyzováno a následně se váže na buňky uvolňující CCK. Tím dojde k uvolnění CCK, což vede k pocitu sytosti. Konjugáty příhlášky mohou být použity k zacílení LCRF (přirozeného agonisty) na receptor LCRF, aby bylo dosaženo uvolňování CCK.

Předmětem vynálezu je poskytnutí způsobu pro uvolňování LCRF k jeho cílovému receptoru. Tohoto předmětu je dosaženo konjugací oligomerů nebo polymerů PEG modifikovaných alkylovými skupinami na proteiny a peptidy pro zlepšení jejich farmakologických vlastností. Přihláška používá konjugaci amfofilního oligomeru a polymeru pro ovlivnění hydrofobicity a hydrofilicity molekul účinné látky. To snižuje imunogenitu, zabraňuje enzymatické degradaci a usnadňuje orální podávání a rozdělování do různých tkání.

Dalším předmětem vynálezu je poskytnutí konjugovaného LCRF, který bude schopen indukovat uvolňování CCK z buněk uvolňujících CCK, což povede k pocitu sytosti a ke snížení příjmu potravy. Navrhujeme uvolňování LCRF použitím naší patentované technologie pro konjugaci amfofilních polymerů, která ochrání LCRF před proteolýzou a zadrží ho v lumenu střeva po delší dobu za vzniku pocitu sytosti. Navrhujeme, že takto konjugovaný LCRF by byl účinným a bezpečným terapeutikem pro léčbu chronické obezity.

Vynález také předkládá metody syntézy pro připojování amfofilního polymeru k N-koncovým zbytkům LCRF tvořícím fragment s 35 aminokyselinami, který vykazuje všechny biologické aktivity jako LCRF celé délky.

Amfofilní konjugát obsahuje polyethylenglykol (PEG) a alkylový řetězec. Alkylový řetězec se může začlenit do membrán střevního epitelu, a tím přiblížit konjugát do těsné blízkosti k receptorům LCRF, které jsou umístěny na povrchu buněk uvolňujících CCK. Pro udržení biologické aktivity bude prodloužena stabilita peptidu. Navíc tam, kde je požadována větší stabilita a snížená tendence pro penetraci střevního epitelu, mohou být peptidy použity s konjugáty na N-konci, na K19 a C-konci.

Funkčnost molekul konjugátů LCRF může být ověřena v buněčném testu použitím čerstvě připravených buněk uvolňujících CCK získaných z krysího střeva. Radioimunotest (RIA) může být použit pro detekci uvolňování CCK.

LCRF je sekretováno ve dvanáctníku a je fyziologicky regulováno proteolýzou, zvláště trypsinem. Zabráněním proteolytického štěpení LCRF si tento udrží svoji aktivitu, vazbu a aktivaci receptoru LCRF na CCK buňkách.

Amfofilní polymer může být kovalentně připojen k ϵ -aminoskupině K19ⁱ, který se nachází vedle jediného štěpného místa pro trypsin v LCRF (1 až 41), a tak ochraňuje LCRF před trypsinovou proteolýzou sterickým bráněním. Je žádoucí, aby modifikace LCRF nebránily klíčovým zbytkům účastnícím se vazby na receptor. Protože je známo, že K19 se nachází v oblasti neubytné pro vazbu k receptoru, je výhodné spojit K19konjugát se spojovníkem, který

ⁱ V tomto návrhu jsou používány jednopísmenné kódy pro aminokyseliny.

je za podmínek ve dvanáctníku pomalu hydrolyzován. Když je K19 konjugát uvolněn, peptid znovu získá plnou aktivitu. Pomalá hydrolyza může také prodloužit působení uvolněného LCRF, a tím minimalizovat dávkování.

Okolo 55% populace USA trpí nadváhou nebo je obézní s vážnými následky pro veřejné zdravotnictví. Tři nejvážnější důsledky jsou choroby srdce, vysoký tlak a diabetes. Pro většinu lidí s nadváhou je dieta a cvičení z velké části neúspěšnou dlouhodobou strategií, a proto zde vzniká potřeba farmaceutik, které potlačují chuť k jídlu. Jedním z přístupů k potlačení chuti k jídlu je indukce uvolňování CCK, peptidového hormonu, který způsobuje pocit sytosti a snižuje příjem potravy.

CCK je jednou ze složek hormonálního systému, který přesně reguluje pocit hladu a sytosti, trávení a nakládání s živinami. CCK má několik aktivit: indukuje pocit sytosti a redukuje příjem potravy; stimuluje kontrakce žlučníku; zvyšuje sekreci pankreatických enzymů a zpožďuje vyprazdňování žaludku. Když se potrava, specificky tuky a proteiny, dostanou do tenkého střeva, je CCK uvolňován do krve, kde se váže na receptory na periferních nervech, slinivce, žlučníku a žaludku.

Uvolňování CCK ve střevě je negativně regulováno zpětnou vazbou. Za tuto negativní zpětnou vazbu je částečně odpovědný LCRF, konstitutivně produkovaný, trypsin senzitivní, intestinální CCK uvolňující peptid. Obrázek 1ⁱⁱ shrnuje regulaci uvolňování CCK pomocí LCRF. Při půstu nebo v základním stavu je všechen LCRF rychle rozštěpen trypsinem. Po požití proteinu nebo inhibitoru trypsinu zůstanou některé LCRF intaktní a vážou se na buňky uvolňující CCK, čímž je způsobeno uvolňování CCK a pocit sytosti. Když je LCRF zavedeno do dvanáctníku krys s inhibitory trypsinu, dochází ke snížení příjmu potravy.

LCRF je účinný CCK uvolňující faktor. LCRF patří mezi minimálně tři peptidy, které jsou zodpovědné za uvolňování CCK z CCK buněk do krevního řečiště. LCRF je z těchto peptidů nejúčinnější. Dva další peptidy – inhibitor vázající diazepam a monitor peptid – jsou sekretovány do střeva a také stimuluji uvolňování CCK. Druhý z nich kontroluje uvolňování CCK pozitivní zpětnovazebnou regulací. Avšak účinnost těchto dvou peptidů pro stimulaci uvolňování CCK je nižší než u LCRF (100 až 1000x, respektive 6x).

Charakteristika vazby receptor-LCRF není známa, protože tento receptor nebyl zatím identifikován. Jsou však silné důkazy pro to, že se receptor nachází na buněčném povrchu. Náš spolupracovník, Dr. Rodger Liddle z Duke University, ukázal, že LCRF stimuluje uvolňování CCK z intestinálních endokrinních buněk pomocí dráhy uvolňující vápník. Zvýšení

ⁱⁱ Převzato z Miyasaka K & Funakoshi A (1998) *Pancreas* 16:279

intracelulárního vápníku je typickým signálním mechanismem pro receptorovou signalizaci a silně tak naznačuje, že je receptor umístěn na povrchu buněk.

Požívání trypsinových inhibitorů nebo odvedení žluči a pankreatických šťáv stimuluje u krys a lidí pankreatickou exokrinní sekreci a uvolnění CCK. CCK stimulující peptid, který je citlivý na štěpení trypsinem, by poprvé purifikován z kryších střevních výplachů. Tento peptid pojmenovaný luminální cholecystokinin uvolňující faktor (LCRF) stimuluje uvolňování CCK z izolovaných kryších, myších a lidských střevních buněk a buněčné linie odvozené z intestinálního endokrinního tumoru (buňky STC-1). N-koncový fragment 35 zbytků LCRF má všechny biologické aktivity přirozeného peptidu, který je dlouhý 60 až 65 aminokyselin (8136 Da). Pomocí syntetických peptidů bylo zjištěno, že za vlastnosti LCRF vedoucí k uvolňování CCK jsou zodpovědné aminokyseliny 11 až 25, které vykazují přibližně 60% aktivitu vzhledem k fragmentu 1 až 41. Dosud však nebyl identifikován gen kódující LCRF a zatím ve veřejně přístupných databázích proteinových sekvencí nebo sekvencí DNA neexistují jeho homology (prosinec 1999).

Tato přihláška obsahuje konjugáty LCRF, které si zachovaly schopnost vázat se na receptor LCRF na CCK buňkách; jsou chráněny před proteolytickým štěpením a jsou zadrženy v lumenu střeva díky své molekulové hmotnosti. Navázání LCRF na receptor vede k uvolňování CCK z CCK buněk do krve, což vede k pocitu sytosti a snížení příjmu potravy. Proto přihláška zahrnuje konjugáty LCRF vhodné pro orální léčbu obezity.

Pro používání peptidů jako léčiv existují praktická omezení. Největší překážkou pro použití peptidů jako terapeutik je proteolýza, ať již ve střevě, nebo v krevním řečišti. Vskutku, jedním z rysů regulační funkce mnoha endogenních peptidů včetně LCRF je jejich přechodný výskyt. Dalším problémem neendogenních peptidů je jejich imunogenita. V návaznosti na tyto problémy se farmaceutický průmysl zaměřil na vytváření malých nepeptidových molekul pomocí lékařské chemie. Ačkoliv je lékařská chemie úspěšná, je velmi časově náročná. Navíc chemická léčiva mohou vykazovat neočekávanou toxicitu nebo teratogenost.

Přestože použití „PEGovaných“ proteinů je dobře zavedeno, byly do dnešní doby omezeny pouze pro injekční použití. Tato přihláška obsahuje orálně použitelné konjugáty polypeptidů, jako jsou insulin, leu-enkefalin a kalcitonin. Specificky tato přihláška zahrnuje konjugáty obsahující jednotky PEG připojené na alkylové řetězce. Přizpůsobením počtu monomerů PEG, typu a délky alkylového řetězce a přesného charakteru spojení PEG-peptid mohou být požadované lipofilní vlastnosti ušity na míru pro konkrétní použití. Navíc může být přesný charakter spojení PEG-peptid pozměněn tak, že je stabilní nebo senzitivní k hydrolýze při

fyziologickém pH. Hydrolyzovatelný spojovník umožňuje postupné uvolňování neporušeného nekonjugovaného peptidu v průběhu času a působit jako pro-léčivo.

Testy založené na použití buněk mohou být použity pro ověřování vhodnosti amfifilních konjugátů oligomer-LCRF pro orální podávání u živočichů. Studie na zvířatech pak mohou být použity pro ověření schopností konjugátů potlačovat chuť k jídlu. Například krysy mohou být podrobeny studiím jejich chování vzhledem k jejich profilu potlačení příjmu potravy díky konjugátům LCRF. Jestliže daný konjugát vykazuje požadovanou schopnost potlačovat chuť k jídlu u krys, bude tato látka dále podrobena detailním farmakokinetickým a farmakodynamickým studiím u krys a dále testům toxicity.

Pro vyvinutí léčiv pro léčbu obezity je vyvíjeno enormní úsilí. Nedávno schváleným léčivem pro obezitu je inhibitor lipasy orlistat, který zabraňuje příjmu tuků, ale neovlivňuje chuť k jídlu. Orlistat (Xenical) může vést ke snížení příjmu v tukách rozpustných vitamínů a může mít velmi nepříjemné vedlejší účinky. Na trhu dostupné prostředky potlačující chuť k jídlu zahrnují sibutramine (Meridia), smíšený inhibitor zpětného příjmu neurotransmiterů, a sympatomimetické látky. Použití těchto léčiv je však omezeno vlivy na CNS. V roce 1997 bylo zjištěno, že kombinace prostředků fenfluraminu a dexfenfluraminu (Fen-Phen) potlačujících chuť k jídlu způsobuje srdeční valvulopathii a byla stažena z trhu. Antagonisté neuropeptidu Y, antagonisté kappa opioidového receptoru, agonisté melanokortinu-4 a antagonisté beta-3 adrenergního receptoru jsou všechny v preklinickém stádiu vývoje pro potlačování chuti k jídlu. Leptin a neuropeptid Y, dva endogenní peptidy, se účastní kontroly dlouhodobé regulace příjmu potravy a výdeje energie. Přestože byly oba tyto peptidy intenzivně studovány, ani jeden z nich neprošel úspěšně klinickými studiemi.

CCK dráha se podílí na modulaci potravního profilu spíše než na dlouhodobém udržování hmotnosti. Na CCK dráhu se přímo zaměřují tři přístupy směřující k objevu a vývoji léčiv pro obezitu a zahrnují agonisty CCK-A, inhibitory proteolýzy CCK a agonisty receptoru LCRF.

Některé benzodiazepinové analogy a peptidomimetika jsou v preklinickém vývoji jako agonisté CCK-A. U těchto látek bylo prokázáno, že snižují příjem potravy u krys a jsou v preklinickém vývoji pro léčbu obezity firmami Abbott Laboratories a Glaxo Wellcome. Dalším potvrzením tohoto přístupu je použití *antagonistů* CCK-A pro léčbu anorexia nervosa.

Butabindide je inhibitorem cholecystokinin-inaktivující peptidasy, který je v preklinickém vývoji u firmy INSERM, Francie pro léčbu obezity. Trvání účinků butabindidu je však příliš krátké pro klinické použití a výzkum dalších analogů pokračuje.

Malé syntetické molekuly, které jsou agonisty receptoru LCRF, mohou být použity pro stimulaci uvolňování CCK. Design léčiv založený na struktuře však není v této době příliš vhodnou strategií, neboť není známa struktura LCRF ani jeho receptoru.

Do roku 2005 se očekává, že bude držet dietu pro snížení váhy ze zdravotních důvodů 5,8 milionů lidí. Za produkty a služby pro zhubnutí včetně dietních potravin se pro zdravotní a kosmetické důvody v USA utratí přibližně 30 miliard dolarů. Navzdory nedostatku bezpečnosti a účinných produktů utratili Američané v roce 1998 243 milionů dolarů za léky proti obezitě. Trh bezpečné, efektivní a chronické léčby obezity je jasně enormní.

Podstata vynálezu

Příhláška zahrnuje prostředek obsahující protein nebo peptid, jako je LCRF, spojený s jednou nebo více molekulami přirozeně se nevyskytujícího polymeru obsahujícího lipofilní skupinu a hydrofilní polymerickou skupinu, které prostředku propůjčují vyvážené lipofilní a hydrofilní vlastnosti, že je tento prostředek rozpustný ve farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech a schopný interagovat s biologickými membránami.

Příhláška zahrnuje prostředek tvořený proteinem nebo peptidem, jako je LCRF, spojený s jednou nebo více molekulami přirozeně se nevyskytujícího polymeru obsahujícího: i) lipofilní skupinu a ii) hydrofilní polymerickou skupinu, které konjugátu propůjčují vyvážené lipofilní a hydrofilní vlastnosti, že je tento konjugát rozpustný ve farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech a schopný interagovat s biologickými membránami.

Příhláška zahrnuje prostředek obsahující protein nebo peptid, jako je LCRF, spojený s jednou nebo více molekulami přirozeně se nevyskytujícího polymeru obsahujícího lipofilní skupinu a hydrofilní skupinu, tento prostředek je rozpustný ve vodných roztocích a LCRF je aktivní v profylaxi nebo léčbě obezity.

Příhláška zahrnuje prostředek tvořený proteinem nebo peptidem, jako je LCRF, kovalentně spojeným s jednou nebo více molekulami polymeru obsahujícího: i) lineární polyalkylenglykolovou skupinu a ii) lipofilní skupinu, ve kterém jsou fyziologicky aktivní peptid, lineární polyalkylenglykolová část a lipofilní část vzájemně konformačně uspořádány tak, že LCRF má *in vivo* v prostředí obsahujícím LCRF zvýšenou odolnost vůči enzymatické degradaci vzhledem k samotnému LCRF.

Příhláška obsahuje prostředek obsahující triglyceridovou páteř s: LCRF kovalentně spojeným s triglyceridovou páteří přes polyalkylenglykolový můstek navázaný na uhlíkový atom

triglyceridové páteře a nejméně jednou mastnou kyselinou, buď kovalentně navázanou přímo na atom uhlíku triglyceridové páteře, nebo kovalentně připojenou přes polyalkylenglykolový můstek.

Příhláška zahrnuje polysorbátový komplex obsahující polysorbátovou skupinu včetně triglyceridové páteře s kovalentně navázanou mastnou kyselinou na jednom z jeho α , α' a β uhlíkových atomů a polyethylenglykolovou skupinou kovalentně navázanou na jednom z jeho α , α' a β uhlíkových atomů.

Příhláška zahrnuje stabilní, ve vodě rozpustný, konjugovaný komplex LCRF tvořený LCRF stabilizačně a konjugačně spojeným s polyethylenglykolem modifikovaným glykolipidovou skupinou.

Příhláška obsahuje polysorbátový komplex obsahující polysorbátovou skupinu s kovalentně navázanou triglyceridovou páteří na jeden z uhlíkových atomů nezávisle vybraných z jeho α , α' a β uhlíkových atomů a funkcionalizační skupiny tvořené: mastnou kyselinou a polyethylenglykolovou skupinou s kovalentně navázanou fyziologicky aktivní skupinou.

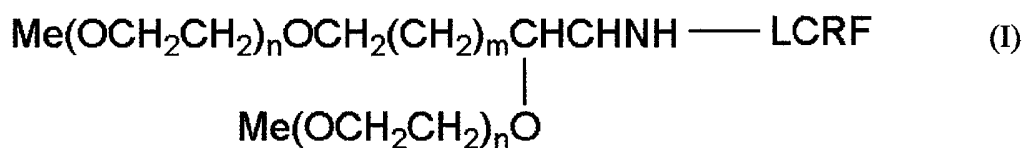
Příhláška obsahuje formu dávek pro orální podávání pro léčbu obezity, která obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a stabilní, ve vodě rozpustný, konjugovaný komplex LCRF obsahující LCRF navázané na fyziologicky přijatelnou glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem.

Příhláška také zahrnuje metodu léčby obezity u člověka nebo jiných savců s těmito problémy zahrnující orální podávání efektivního množství konjugovaného prostředku LCRF tvořeného stabilním, ve vodě rozpustným, konjugovaným komplexem LCRF obsahujícím LCRF kovalentně navázané na fyziologicky přijatelnou glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem.

Příhláška obsahuje metodu profylaktické nebo intervenční léčby potenciální nebo vyvinuté obezity u člověka nebo u jiných savců pomocí LCRF, zahrnující podávání účinného množství prostředku obsahujícího konjugované LCRF tvořeného stabilním, ve vodě rozpustným, konjugovaným komplexem LCRF obsahujícím LCRF navázané na fyziologicky přijatelnou glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem.

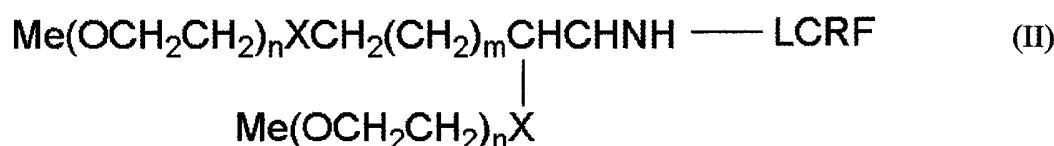
Příhláška obsahuje metodu prodloužení aktivity LCRF v systémech *in vivo* nebo *in vitro* zahrnující konjugační připojování LCRF s jednou nebo více molekulami přirozeně se nevyskytujícího polymeru obsahujícího lipofilní skupinu a hydrofilní polymerickou skupinu za vzniku prostředku obsahujícího konjugativně spojený polymer-LCRF a zavedení prostředku obsahujícího konjugativně spojený polymer-LCRF do *in vivo* nebo *in vitro* systémů.

Příhláška také zahrnuje ve výhodném provedení látku s obecným vzorcem I:



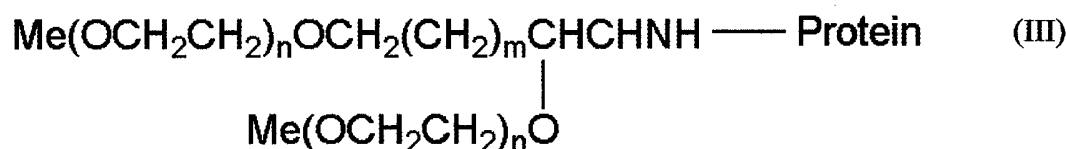
kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20.

Přihláška také zahrnuje ve výhodném provedení látku s obecným vzorcem II:



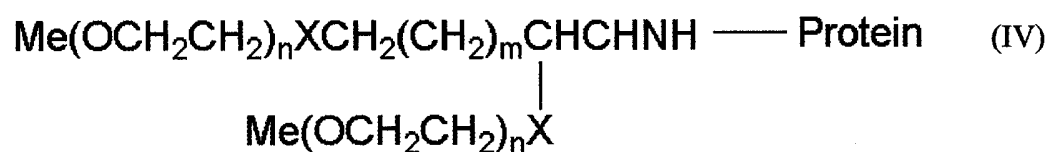
kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20 a X je vybráno ze skupiny obsahující N, O nebo S.

Přihláška také zahrnuje ve výhodném provedení látku s obecným vzorcem III:



kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20 a kde je proteinem s výhodou terapeutický protein.

Přihláška také zahrnuje ve výhodném provedení látku s obecným vzorcem IV:



kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20 a X je vybráno ze skupiny obsahující N, O nebo S a kde je proteinem s výhodou terapeutický protein.

Krátký popis obrázků

Obrázek 1 shrnuje regulaci uvolňování CCK pomocí LCRF.

Obrázek 2 ukazuje tři základní návrhy technik pro konjugaci LCRF.

Obrázek 3 zobrazuje základní schéma syntézy pro přípravu polymerů podle vynálezu.

Detailní popis vynálezu

Přestože je následující popis primárně a ilustrativně určen pro použití LCRF jako peptidové složky v různých prostředcích a složeních vynálezu, budiž hodnocen tak, že tím není vynález omezen, ale že je spíše použitelný pro jakýkoliv druh peptidu, který je kovalentně nebo asociativně konjugovatelný způsobem popsáním ve vynálezu, zahrnující, ale ne omezený na, následující druhy peptidů: kalcitonin, ACTH, glukagon, somatostatin, somatotropin, somatomedin, parathyroidní hormon, erythropoietin, hypothalamické uvolňující faktory, prolaktin, thyroidní stimulující hormon, endorfiny, protilátky, hemoglobin, rozpustný CD-4, srážlivostní faktory, aktivátor tkáňového plasminogenu, enkefaliny, vasopresin, v přírodě se nevyskytující opioidy, superoxidismutasa, interferon, asparaginasa, arginasa, arginindeaminasa, adenosindeaminasaribonukleasa, trypsin, chymotrypsin a papain, alkalická fosfatasa a další vhodné enzymy, hormony, proteiny, polypeptidy, konjugáty enzym-protein, konjugáty protilátka-hapten, virové epitopy atd.

Jedním cílem přihlášky je poskytnutí vhodných polymerů pro konjugaci s peptidy pro získání požadovaných vlastností vyjmenovaných výše. Dalším cílem je využití takto modifikovaných peptidů pro trvalé uvolňování peptidu *in vivo*. Ještě dalším předmětem je použití technologie pro orální podávání peptidů v jejich aktivní formě.

Dalším cílem je využití asociativně konjugovaných peptidů pro imunotesty, diagnostické a další neterapeutické (např. *in vitro*) aplikace. Ještě dalším cílem přihlášky je poskytnutí stabilizované konjugovaných peptidových prostředků, včetně kovalentně vázaných, různě vhodných pro *in vivo*, stejně tak jako ne-*in vivo* aplikace, a alternativně poskytnutí nekovalentně asociativně konjugovaných peptidových prostředků různě vhodných pro *in vivo*, stejně tak jako ne-*in vivo* aplikace.

V rámci širokého pole přihlášky může být použit jeden druh molekul polymeru pro konjugaci s mnoha druhy peptidů a stejně tak může být výhodné v širokém využití vynálezu použít různé druhy polymerů jako konjugačních látek pro daný peptid; kombinace obou přístupů může být taktéž využita. Stabilizačně konjugované peptidové prostředky mohou nalézt použití v *in vivo* a taktéž i v ne-*in vivo* aplikacích. Dále bylo zjištěno, že konjugovaný polymer(y) může využívat jakékoliv další skupiny, zbytky nebo jiné konjugované látky vhodné pro konečné použití. Například v některých aplikacích může být užitečné kovalentně navázat na polymer funkční skupinu propůjčující molekule rezistenci vůči degradaci UV nebo antioxidační vlastnosti nebo další vlastnosti charakteristické pro polymer. V dalším příkladě může být výhodné pro

některé aplikace funkcionalizovat polymer pro získání stejných reaktivních nebo vazebných vlastností pro zesílení různých vlastností nebo charakteristik celého konjugátu. Proto může polymer obsahovat funkční skupiny, opakující se skupiny, vazby nebo další složky struktury, které předem nevylučují účinnost konjugovaného prostředku pro jeho zamýšlený cíl. Další cíle a výhody přihlášky budou více zřejmé z následujícího popisu a patentových nároků.

Ilustrativní polymery, které mohou být výhodné pro dosažení těchto žádoucích charakteristik, jsou popsány níže ve vzorovém reakčním schématu. U aplikací využívajících kovalentně navázané peptidy mohou být polymery funkcionalizovány a pak připojeny k volné aminokyselině(ám) peptidu(ů) za vzniku labilních vazeb, které umožňují zachování aktivity při neporušených labilních vazbách. Přerušení vazby chemickou hydrolýzou a proteolýzou pak zesiluje aktivitu peptidu.

Polymery využívané ve vynálezu mohou mít ve své molekule vhodně inkorporovány složky jako jsou jedlé mastné kyseliny (lipofilní konec), polyethylenglykoly (ve vodě rozpustný konec), přijatelné cukerné skupiny (konec interagující s receptorem) a spojovníky pro připojení peptidu. Z polymerů, které jsou na výběr, jsou zvláště preferovány polysorbáty a jsou vybrány pro ilustrování různých provedení vynálezu v následující diskusi. Pole vynálezu však samozřejmě není limitováno na polysorbáty a různé jiné polymery obsahující výše zmíněné skupiny mohou být úspěšně využity v širokém uplatnění vynálezu. Někdy může být žádoucí vynechat jednu z těchto skupin a ponechat zbylé části polymerové struktury bez ztráty účelu. Tam, kde je to žádoucí, je výhodné vynechat bez ztráty účelu a užitků vynálezu cukernou a/nebo spojovníkovou skupinu.

Je výhodné pracovat s polymery, jejichž molekulová hmotnost je mezi 100 a 10 000 Daltony.

V praxi přihlášky jsou polyalkylenglykolové zbytky C_2 až C_4 alkyl(polyalkylen)glykolů, s výhodou polyethylenglykolu (PEG), výhodně inkorporovány do zamýšleného polymerního systému.

Přítomnost těchto zbytků PEG bude polymeru a odpovídajícím konjugátům polymer-peptid dodávat hydrofilní vlastnosti. O určitých glykolipidech je známo, že stabilizují proteiny a peptidy. Mechanismus této stabilizace pravděpodobně zahrnuje asociaci zbytků glykolipidové mastné kyseliny s hydrofobními doménami peptidu nebo proteinu; tím je zabráněno agregaci proteinu nebo peptidu. Je také známo, že agregované peptidy jsou v tenkém střevě v porovnání s přirozenými peptidy málo absorbovány. Vynález má proto v úmyslu polymer-peptidové produkty, ve kterých je peptid, např. LCRF, konjugován s hydrofilní nebo hydrofobní částí polymeru. Funkcí části polymeru tvořené mastnou kyselinou je asociovat s hydrofobní doménou

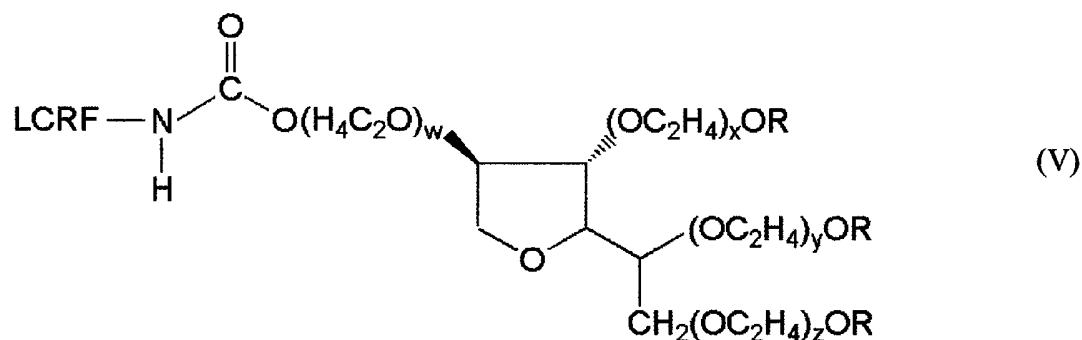
peptidu a tak zabráňovat agregaci v roztoku. Výsledné konjugáty polymer-peptid proto budou: stabilizované (vůči chemické a enzymatické hydrolyze); ve vodě rozpustné díky zbytkům PEG a díky interakcím mezi mastnou kyselinou a hydrofobní doménou nebudou náchylné k agregaci.

Odvození od polyalkylenglykolu přináší konjugátům polymer-peptid v praxi tohoto vynálezu mnoho výhodných vlastností, které jsou spojeny s následujícími vlastnostmi polyalkylenglykolových derivátů: zlepšení rozpustnosti ve vodě bez navození antigenních nebo imunogenních odpovědí; vysoký stupeň biokompatibility; absence biodegradace polyalkylenglykolových derivátů *in vivo* a snadnost jejich vylučování živými organismy.

Polymery používané při uplatnění této přihlášky obsahují lipofilní a hydrofilní skupiny činící výsledný konjugát polymer-peptid vysoce účinným (bioaktivním) při orálním a stejně tak i parenterálním či jiných způsobech fyziologického podávání a vysoce účinným při nefyziologických aplikacích.

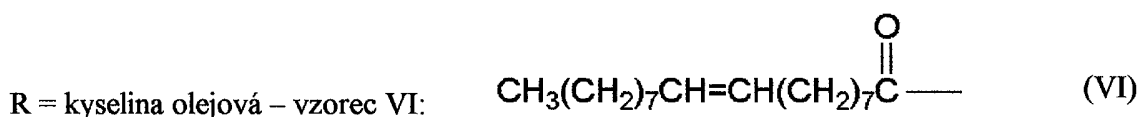
Níže jsou ukázány jako ilustrativní příklady konjugátů polymer-peptid této přihlášky obecné vzorce kovalentně vázaných konjugátů označené pro jednoduchost následných odkazů jako konjugát 1 – obecný vzorec V, konjugát 2 – obecný vzorec VII a konjugát 3 – obecný vzorec VIII, specifické hodnoty pro m , n , w , x a y budou popsány v následující diskusi.

Konjugát 1:

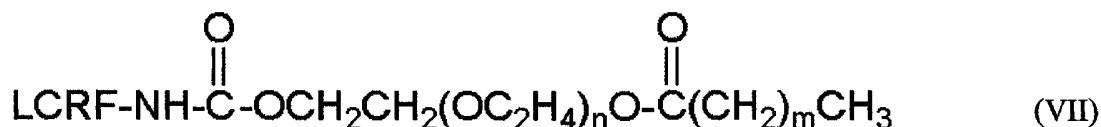


kde:

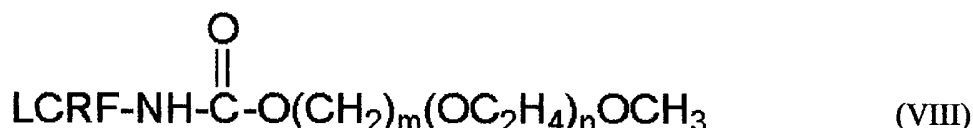
$$w + x + y + z = 20 \text{ a}$$



Konjugát 2:



Konjugát 3:



Konjugát 1 obsahuje v centru polymerického systému komerčně dostupný polysorbát-monooleát, cukerný derivát používaný v mnoha farmaceutických aplikacích. Vlastnosti zesilující lipofilitu a absorpci jsou propůjčovány řetězcem kyseliny olejové, zatímco zbytky polyethylenglykolu (PEG) zajišťují hydrofilní (vytvářející vodíkové můstky) prostředí. Insulin je připojen přes karbamátovou vazbu vedle PEG části polymeru.

V konjugátu 2 je vynechán cukerný zbytek, ale LCRF je opět připojeno k polymeru přes karbamátovou vazbu vedle hydrofilní PEG části polymeru. Lipofilní oblast mastné kyseliny polymeru je proto vzdálena od místa připojení LCRF.

Uspořádání popsané výše pro konjugát 2 je obráceno v případě konjugátu 3. Opět je vynechán cukerný zbytek, ale v této struktuře je lipofilní zbytek mastné kyseliny nejbliže k místu připojení LCRF a hydrofilní oblast PEG je vzdálena od místa připojení LCRF, které je opět přes karbamátovou vazbu.

V obecné praxi vynálezu jsou použitelné různé metody pro spojení polymeru a peptidu a jsou více diskutovány dále. Při práci s proteiny a polypeptidy by mělo být bráno na vědomí, že určité skupiny zbytků v peptidu jsou důležité pro jejich celkovou biologickou celistvost. Je důležité vybrat vhodnou spojovací látku, která by nadměrně interferovala s těmito zbytky. V některých případech může být těžké vyhnout se spojení a tím zamaskování aktivity těchto zbytků, ale část aktivity může být obětována pro zvýšení stability při zachování daných užitečných vlastností. Například v *in vivo* aplikacích může být proto snížena frekvence dávkování, jehož výsledkem je snížení ceny a zvýšení pohodlí pacienta.

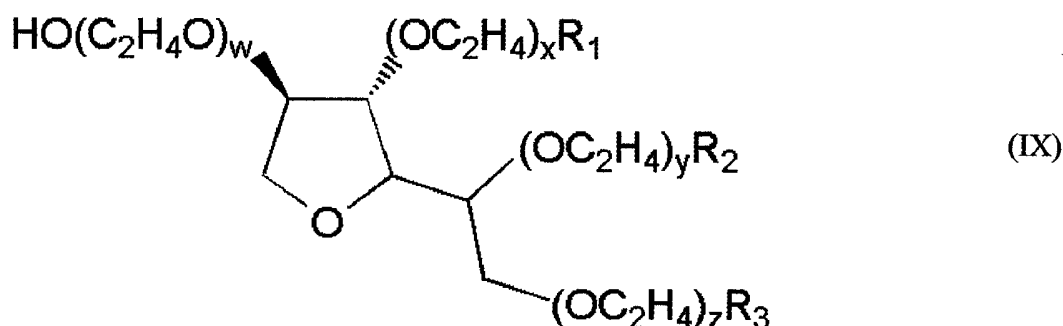
Polymery používané podle vynálezu pro konjugaci s proteinem/peptidem jsou navrženy tak, aby zajišťovaly dobré fyzikální charakteristiky, které jim umožní dosáhnout požadovaných záměrů. Zesilovače absorpce, které umožňují pronikání peptidů přes buněčnou membránu, nezlepšují stabilitní vlastnosti peptidů, proto mohou být tyto zesilovače pronikání vynechány

v konjugátech polymer-peptid vynálezu pro *in vivo* aplikace. Jedna stránka přihlášky se proto týká inkorporace derivátů mastné kyseliny do polymeru pro mimikování zesilovačů pronikání.

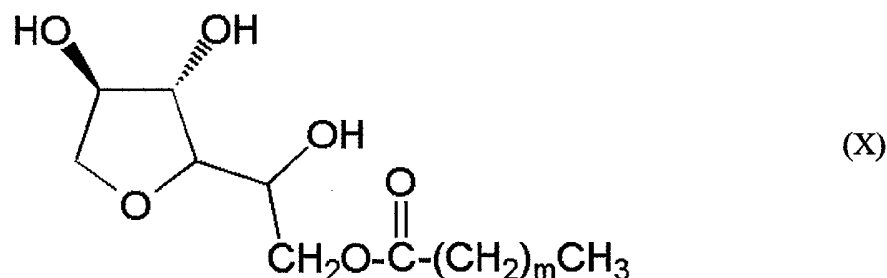
U kovalentně konjugovaných konjugátů polymer-peptid této přihlášky může být peptid kovalentně připojen na ve vodě rozpustný polymer labilní chemickou vazbou. Tato kovalentní vazba mezi peptidem a polymerem může být přerušena chemickou nebo enzymatickou reakcí. Produkt polymer-peptid si ponechává přijatelné množství aktivity; plné aktivity peptidové složky je dosaženo po kompletním odštěpení polymeru od peptidu. Současně jsou polyethylenglykolové části přítomné v konjugovaném polymeru a poskytují polymer-peptidu vysokou rozpustnost ve vodě a prodlužují dobu jeho cirkulace v krvi. Glykolipidy jsou s užitkem asociovány s polymerem tak, aby zbytky mastné kyseliny obsadily hydrofobní doménu peptidu a zabráňovaly tak agregaci. Výsledkem agregace peptidů je jejich špatná absorpce v tenkém střevě. Neagregované peptidy jsou v tenkém střevě mnohem snáze absorbovány. Důvodem pro inkorporaci glykolipidů do konjugovaných polymerů jsou zvyšování stability a zabránění agregaci peptidů po konjugaci. Modifikace popsané výše udělují peptidu lepší rozpustnost, stabilitu a membránovou afinitu. Výsledkem těchto zlepšených vlastností vynález zamýšlí parenterální a orální podávání aktivních druhů polymer-peptid a po hydrolytickém štěpení biodostupnost peptidu *per se* v *in vivo* aplikacích.

Polymery použité v provedení popsaném níže mohou být klasifikovány jako polyethylenglykolem modifikované glykolipidy a polyethylenglykolem modifikované mastné kyseliny. Mezi výhodnými konjugovanými polymery mohou být zmíněny polysorbáty zahrnující monopalmitát, dipalmitát, tripalmitát, monolaurát, dilaurát, trilaurát, monooleát, dioleát, trioleát, monostearát, distearát a tristearát. Průměrná molekulová hmotnost polymerů vznikající z každé kombinace je preferována v rozmezí 500 až 10 000 Daltonů. Alternativními výhodnými polymery pro toto provedení jsou polyethylenglykol-ethery nebo estery mastných kyselin, v nichž je mastnou kyselinou kyselina laurová, palmitová, olejová a stearová, a průměrná molekulová hmotnost polymeru se pohybuje v rozmezí 500 až 10 000 Daltonů. Je výhodné mít v polymeru derivatizovatelnou skupinu, která může být na konci zakončeném polyethylenglykolem nebo zakončeném mastnou kyselinou. Derivatizovatelná skupina může být také umístěna uvnitř polymeru a tvořit spojovník mezi peptidem a polymerem.

Dále bude detailně spolu se strukturními obrázky diskutováno několik metod modifikací mastné kyseliny sorbitanu za účelem dosažení požadovaného polymeru. Polysorbáty jsou estery sorbitolů a jejich anhydrátů, které jsou kopolymerizovány s přibližně dvaceti moly ethylen-oxidu na každý mol sorbitolu a anhydrátu sorbitolu. Níže je ukázána struktura reprezentativního polymeru – obecný vzorec IX.



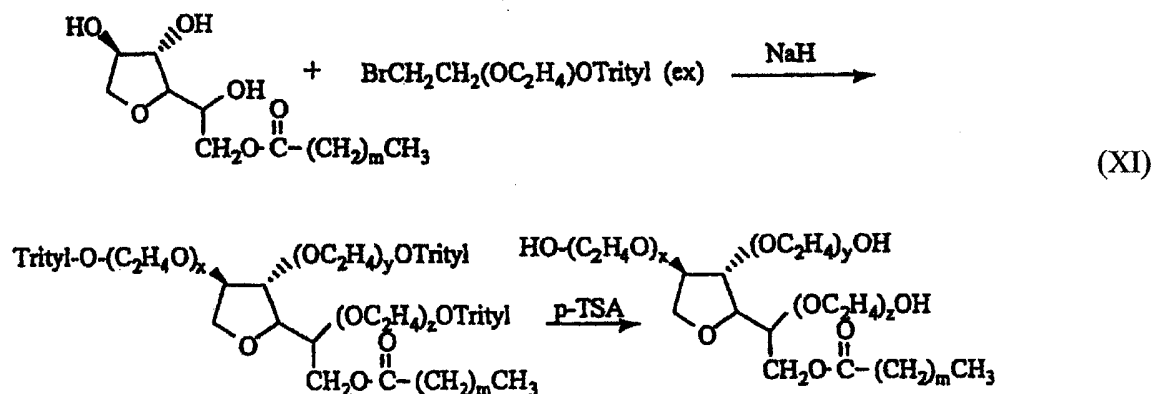
Součet w , x , y , z je 20 a R_1 , R_2 a R_3 jsou nezávisle na sobě vybrány ze skupiny obsahující radikály kyselin laurové, palmitové, olejové a stearové nebo jsou R_1 a R_2 hydroxylové skupiny, zatímco R_3 je radikál kyseliny laurové, palmitové, olejové nebo stearové. Tyto polymery jsou komerčně dostupné a jsou používány ve farmaceutických prostředcích. Tam, kde je vyžadována vyšší molekulová hmotnost polymeru, mohou být pro syntézu využity glykolipidy, jako jsou sorbitan-monolaurát, sorbitan-monooleát, sorbitan-monopalmitát nebo sorbitan-monostearát, a vhodný polyethylenglykol. Struktury glykolipidů, které mohou být použity jako výchozí látky, jsou ukázány níže – obecný vzorec X.



$$m = 10 \text{ až } 16$$

Pro syntézu glykolipidových polymerů substituovaných ve třech pozicích polyethylenglykolem je požadovaný polyethylenglykol se dvěma volnými hydroxyly na koncích, který je chráněn na jednom konci tritylovou skupinou pyridinu za použití jednoho molu tritylchloridu. Zbylé volné hydroxylové skupiny polyethylenglykolu jsou konvertovány na tosylát nebo bromid. Požadovaný glykolipid je rozpuštěn ve vhodném inertním rozpouštědle za působení hydridu sodného. Tosylát nebo bromid chráněného polyethylenglykolu je rozpuštěn v inertním rozpouštědle a v nadbytku se přidá k roztoku glykolipidu. Produkt se nechá reagovat s roztokem para-toluensulfonové kyseliny v bezvodém inertním rozpouštědle při pokojové

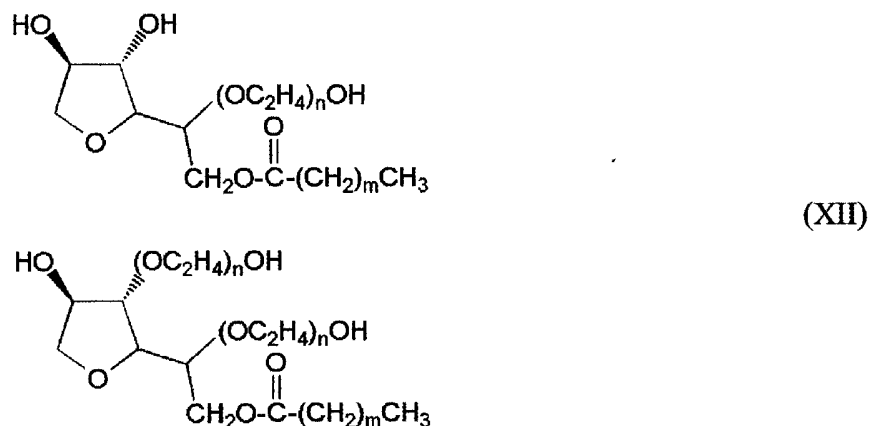
teplotě a purifikuje se sloupcovou chromatografií. Struktury přeměny je zachyceno níže – reakce XI.



$m = 10$ až 16

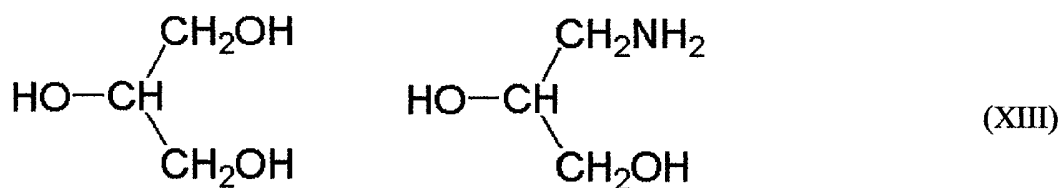
součet $x, y, z = 8$ až 240

Přízpůsobením molárních množství reagujících látek na ekvimolární a použitím polyethylenglykolu o vhodné molekulové hmotnosti mohou být podle výše zmíněného postupu získány mono a disubstituované glykolipidy o požadovaném rozmezí molekulové hmotnosti – obecné vzorce XII.

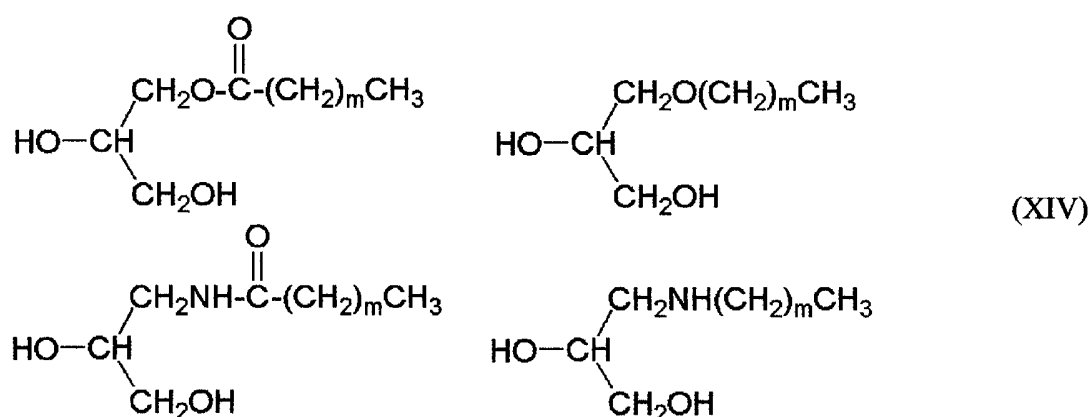


kde jednotlivá n a m jsou různá, na sobě nezávislá a mají jakoukoliv vhodnou hodnotu pro specifický peptid, který je stabilizován, např. od 1 do 16.

Cukerná část glykolipidu popsaného výše může být substituována glycerolem nebo aminoglycerolem, jejichž strukturní vzorce XIII jsou ukázány níže.

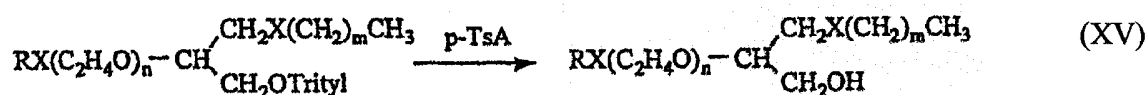


V této modifikaci je primární alkohol nejprve etherifikován nebo esterifikován zbytkem mastné kyseliny, jako jsou laurová, olejová, palmitová nebo stearová; aminoskupina je derivatizována mastnými kyselinami za vzniku amidů nebo sekundárních aminoskupin, jak je ukázáno níže – obecné vzorce XIV.



kde m může mít jakoukoliv vhodnou hodnotu, např. od 10 do 16.

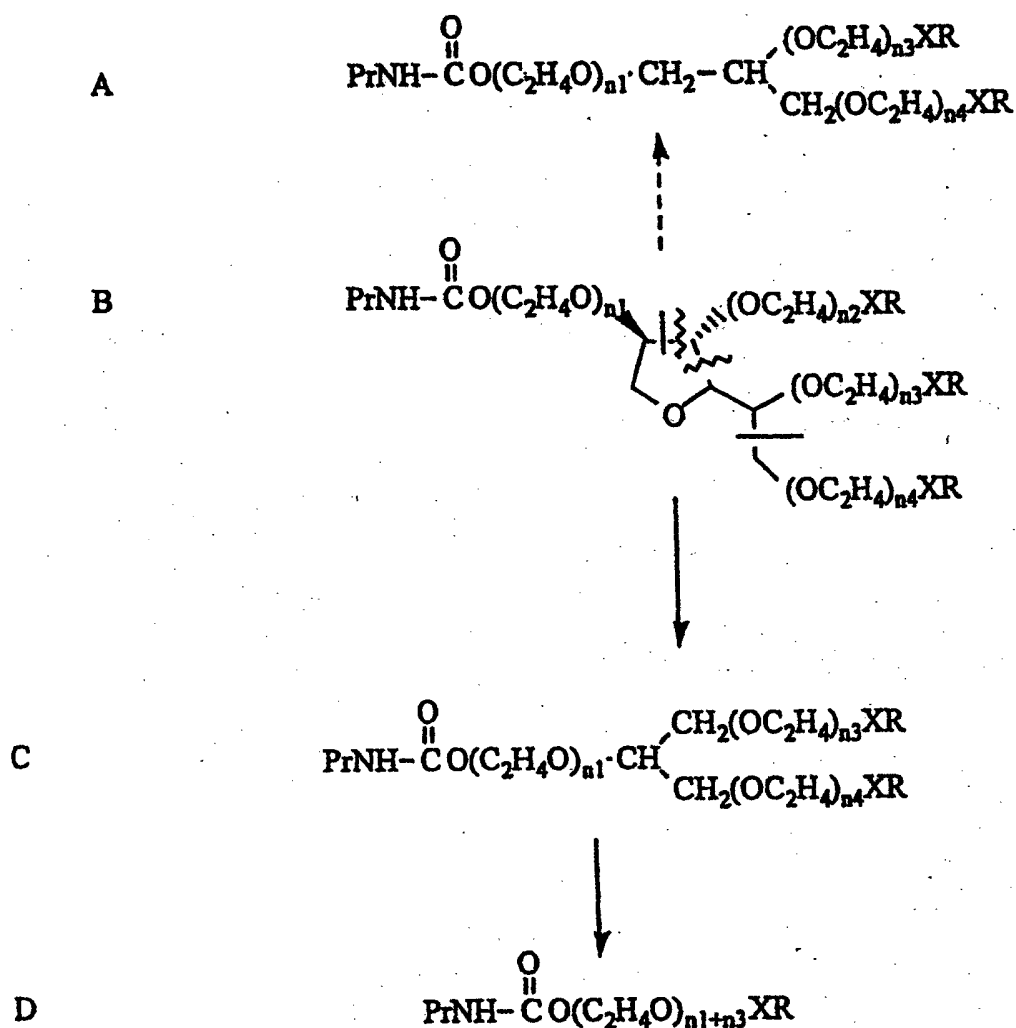
Zbývající primární alkoholová skupina je chráněna tritylovou skupinou, zatímco sekundární alkoholová skupina reaguje s polyethylenglykolem na požadovaný polymer. Obvykle polyethylenglykol nese uvolňovanou skupinu na jednom konci a methoxyskupinu na druhém konci. Polyethylenglykol je rozpuštěn v inertním rozpouštědle a přidán k roztoku obsahujícímu glykolipid a hydrid sodný. Z produktu je odstraněna ochranná skupina v para-toluensulfonové kyselině při pokojové teplotě za vzniku požadovaného polymeru, jak je zobrazeno v reakci XV.



p-TsA = para-toluensulfonová kyselina

Někdy je požadováno inkorporovat deriváty mastných kyselin do různých částí polyethylenglykolového řetězce pro dosažení určitých fyzikálně chemických vlastností podobných polysorbátům, které byly substituovány dvěma/třemi molekulami mastných kyselin, např. polysorbát-trioleát.

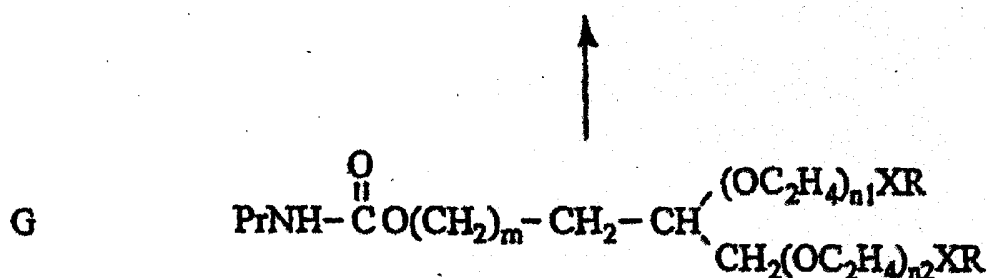
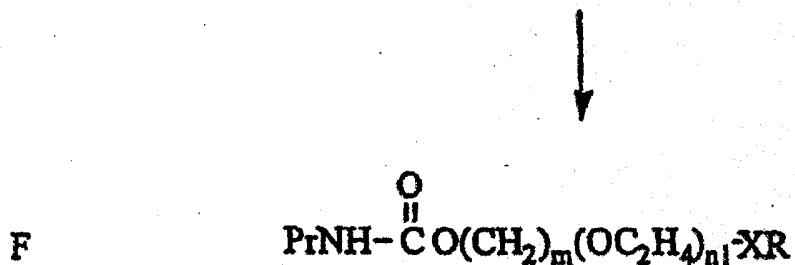
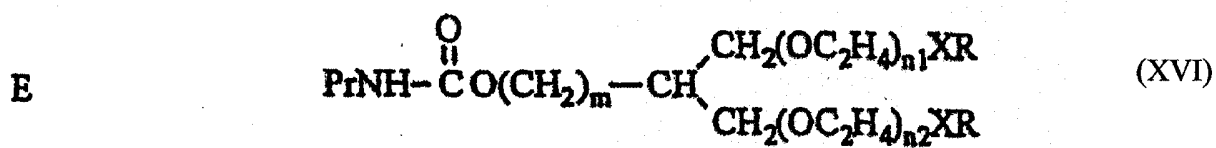
Vzorci představující polymery jsou ukázány v reakčním schématu níže jako otevřené řetězce polysorbátů – reakce XVI.



Pr = Peptidy, Proteiny, Proteinové látky ;
 R = Alkyl, C5 až C18 ;
 n = 5 až 120 ;

X = O, S, $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-$, $\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-$;

$\text{PrNH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}$: $\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-$ mohl být $-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{O}-$, $\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-$;

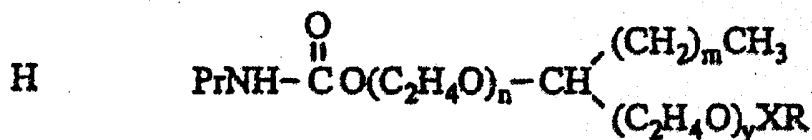
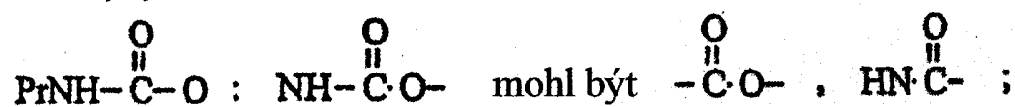
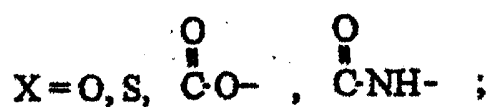


Pr = peptidy, proteiny, proteinová léčiva;

R = alkyl, C₅ až C₁₈;

n = 5 až 120;

m = 2 až 15;



Pr = peptidy, proteiny, proteinová léčiva;

R = alkyl, C₅ až C₁₈;

m = 5 až 18;

n = 2 až 15;

y = 5 až 120;

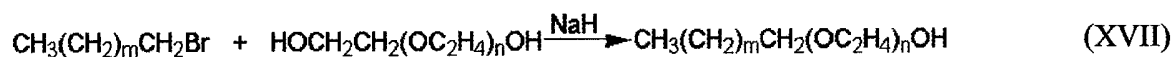
kde m, n, a y mohou být na sobě nezávisle měněna v uvedených rozmezích.

Při syntéze polymeru A je žádoucí ochránit hydroxylové skupiny na prvním a druhém uhlíku glycerolu, např. solketalem. Zbývající hydroxylová skupina je přeměněna v inertním rozpouštědle na sodnou sůl a nechá se reagovat s halogenovaným nebo tosylovaným polyethylenglykolem, kde byl jeden konec polyethylenglykolu ochráněn jako ester. Glycerolová ochrana je odstraněna a dvě výsledné volné hydroxylové skupiny jsou převedeny na odpovídající sodné soli. Tyto soli reagují v inertním rozpouštědle s polyethylenglykolem, který byl částečně derivatizován mastnými kyselinami. Reakce probíhá poté, co byl volný hydroxyl převeden na tosylát nebo bromid.

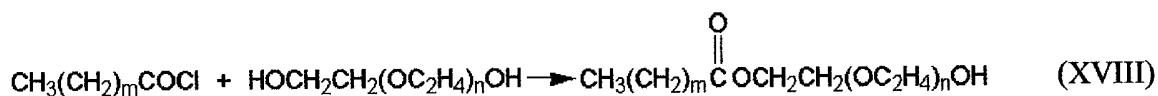
Polymer G se syntetizuje stejným způsobem s výjimkou toho, že chráněný glycerol nejprve reaguje s estery mastných kyselin, které byly na svém terminálním uhlíku halogenovány.

Při syntéze polymeru C je výhodné začít s 1,3-dihalo-2-propanolem. Dihalosloučenina se rozpustí v inertním rozpouštědle a nechá se reagovat se dvěma moly sodné soli polyethylenglykolu, který byl dříve derivatizován jedním molem mastné kyseliny. Produkt je purifikován chromatograficky nebo dialýzou. Výsledný suchý produkt je v inertním rozpouštědle ošetřen hydridem sodným. Takto vytvořená sodná sůl reaguje s haloderivátem částečně chráněného polyethylenglykolu.

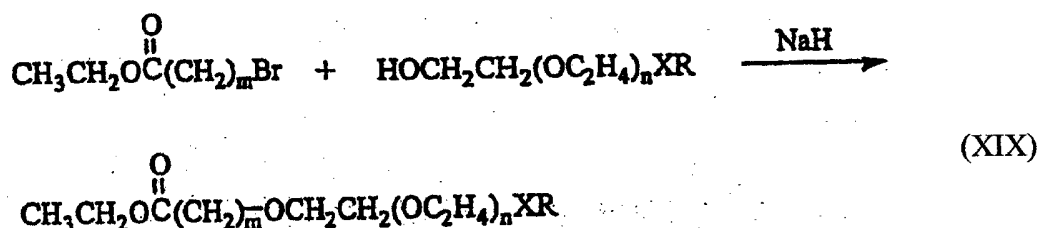
Někdy může být žádoucí vynechat cukernou část z polymeru. Výsledný polymer stále obsahuje část polyethylenglykolu. Membránová afinita mastné kyseliny může být udržena řádnou substitucí mastné kyseliny lipofilním alkanem s dlouhým řetězcem; takto je zachována biokompatibilita. V jednom případě tohoto provedení je polyethylenglykol se dvěma koncovými volnými hydroxylovými skupinami ošetřen hydridem sodným v inertním rozpouštědle. Jeden hmotnostní ekvivalent primárního bromidového derivátu se skupinou podobnou mastné kyselině je přidán ke směsi polyethylenglykolu s rozpouštědlem. Požadovaný produkt je extrahován v inertním rozpouštědle a v případě potřeby purifikován sloupcovou chromatografií – reakce XVII.



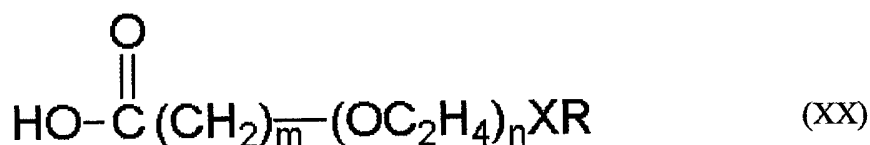
Kde je žádoucí vytvořit esterovou vazbu mezi mastnou kyselinou a polyethylenglykolem, chlorid kyseliny se nechá reagovat s nadbytkem požadovaného polyethylenglykolu ve vhodném inertním rozpouštědle. Polymer je extrahován v inertním rozpouštědle a v případě potřeby dále purifikován chromatografií – reakce XVIII.



U některých modifikací peptidů je žádoucí konjugovat mastnou kyselinu přímo s peptidem. V takovém případě se polymer syntetizuje s derivatizovatelnou skupinou umístěnou na mastné kyselině. Roztok monomethoxy(polyethylen)glykolu o příslušné molekulové hmotnosti v inertním rozpouštědle je ošetřen hydridem sodným a následně se přidá roztok obsahující ethyl-ester mastné kyseliny nesoucí uvolňovanou skupinu na svém koncovém uhlíku. Produkt je purifikován po extrakci rozpouštědla a v případě potřeby sloupcovou chromatografií – reakce XIX.



Esterová ochrana je odstraněna reakcí se zředěnou kyselinou nebo báží – obecný vzorec XX.

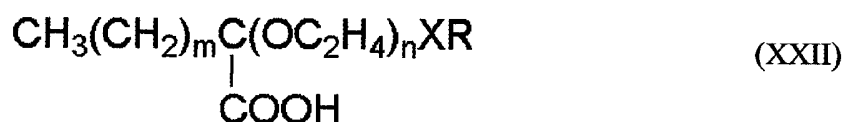


Tam, kde je požadováno vytvoření karbamátové vazby s polypeptidem, je karboxyl nebo ester převeden na hydroxylovou skupinu metodou chemické redukce, jak je známo v oboru – obecný vzorec XXI.



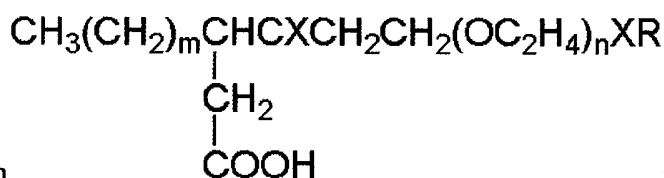
Funkční skupiny, které jsou použity při konjugaci polypeptidů, jsou obvykle na terminálním konci polymeru, ale v některých případech je upřednostňováno, když je funkční skupina umístěna uvnitř polymeru. V tomto případě slouží derivatizační skupiny jako

spojovníky. V jednom případě tohoto provedení může být mastná kyselina bromována na α uhlíku karboxylové skupiny a kyselina je esterifikována. Experimentální postup pro takovýto typ sloučenin je podobný popsanému již výše a výsledkem je produkt zobrazený níže – obecný vzorec XXII.



Pokud je požadován delší spojovník, polyethylenglykolmonoether může být převeden na aminoskupinu a zreagován s anhydridem sukcinátu, který byl derivatizován mastnou kyselinou. Požadovaný polyethylenglykol nesoucí primární amin je rozpuštěn v sodnofosfátovém pufru při pH 8,8 a reaguje se substituovaným sukcinátovým anhydridem mastné kyseliny, jak je ukázáno na schématu níže. Produkt je izolován extrakcí rozpouštědla a v případě potřeby purifikován sloupcovou chromatografií – obecný vzorec XXIII.

Mělo by být zřejmé, že výše (XXIII) uvedená



reakcn

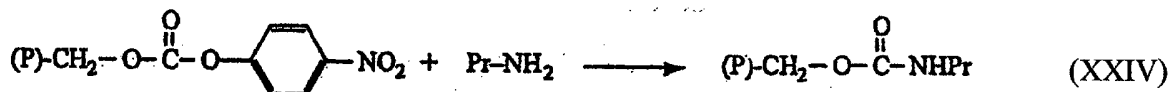
i schémata slouží pouze pro ilustrační

účely a neměla by být omezující vzhledem k reakcím a vzorcům, které mohou být výhodně využity pro modifikaci peptidů v široké praxi přihlášky, např. k dosažení rozpustnosti, stabilizace a afinity k buněčné membráně, pro parenterální a orální podávání.

Přihláška zahrnuje konjugáty biokompatibilních polymerů s biologicky aktivními makromolekulami, diagnostickými látkami, atd., které mohou například zahrnovat peptidy, proteiny, enzymy, růstové hormony, růstové faktory a podobné. Takovéto makromolekulární sloučeniny mohou být vytvořeny z alfa-aminokyselin spojených amidovou vazbou za vzniku peptidových oligomerů a polymerů. V závislosti na funkcích těchto látek mohou být těmito peptidovými částmi proteiny, enzymy, růstové hormony, atd.. Pro zkrácení jsou zde tyto látky souhrnně pojmenovávány jako peptidy a označovány jako Pr. Ve všech případech obsahují biologicky aktivní peptidy volnou aminoskupinu nebo karboxylové skupiny. Spojení mezi polymerem a peptidy je obvykle učiněno přes volnou aminoskupinu nebo karboxylovou skupinu.

Peptidy zde vybrané pro ilustraci jsou konkrétně zajímavé na poli medicíny, zemědělství, vědy a pro domácí stejně jako průmyslové aplikace. Mohou to být enzymy využitelné pro výměnnou terapii; hormony posilující růst u živočichů nebo buněčný růst v buněčných kulturách nebo aktivní proteinové sloučeniny používané pro různé aplikace, např. biotechnologie a biologickou a lékařskou diagnostiku. Mezi enzymy, které mohou být zmíněny, patří superoxiddismutasa, interferon, asparaginasa, glutamasa, arginasa, arginindeaminasa, adenosindeaminasaribonukleasa, trypsin, chymotrypsin a papain. Mezi peptidové hormony, které mohou být zmíněny, patří insulin, kalcitonin, ACTH, glukagon, somatosin, somatropin, somatomedin, parathyroidní hormon, erythropoietin, hypothalamické uvolňující faktory, prolaktin, thyroidní stimulující hormony, endorfiny, enkefaliny a vasopresin.

Reakce polymeru s peptidem pro získání kovalentně konjugovaných produktů je snadno proveditelná. Pro zkrácení je zde v diskusi označován polymer jako (P). Tam, kde polymer obsahuje hydroxylovou skupinu, je tento nejprve zkonvertován na uhličitánový derivát jako například uhličitán para-nitrofenylu. Aktivovaný derivát se nechá poté krátce za mírných podmínek reagovat s peptidem za vzniku karbamátových derivátů se zachovanou biologickou aktivitou – reakce XXIV.

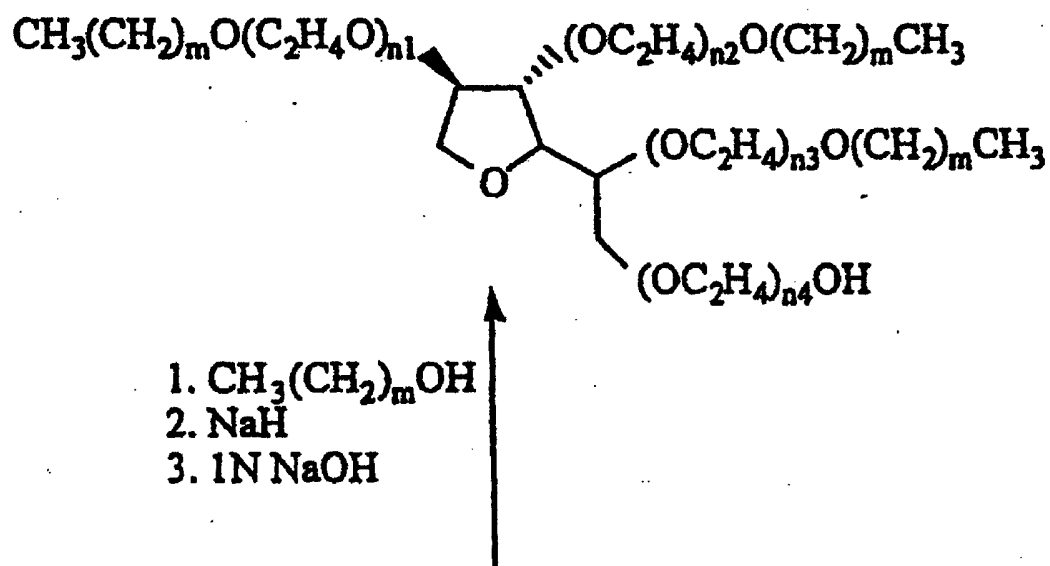


Výše zmíněná reakce a reagující látky slouží pouze jako ilustrace a nejsou omezující; mohou být využity i jiné aktivační látky, jejichž výsledkem je vznik uretanu, nebo další vazby. Hydroxylová skupina může být konvertována na aminoskupinu pomocí známých látek. Následné spojení s peptidy přes jejich karboxylovou skupinu dávají vznik amidu.

Tam, kde polymer obsahuje karboxylovou skupinu, může být tento přeměněn ve směsný anhydrid a reaguje s aminoskupinou peptidu za vzniku konjugátu obsahujícího amidovou vazbu. V dalším postupu může karboxylová skupina reagovat s ve vodě rozpustným karbodiimidem a peptidem za vzniku konjugátů obsahujících amidové vazby.

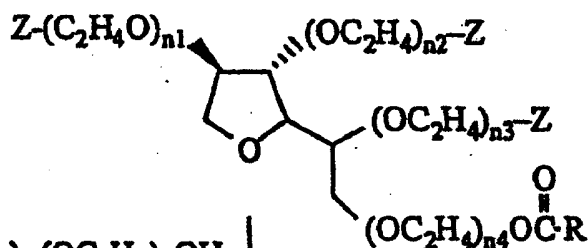
Aktivita a stabilita peptidových konjugátů může být pozměněna několika způsoby, jako jsou změna molárních poměrů polymer ku peptid a použitím polymeru s různou molekulovou hmotností. Rozpustnost konjugátů může být měněna změnou proporce a velikosti polyethylenglykolového fragmentu inkorporovaného do složení polymeru. Hydrofilní a hydrofobní charakteristiky mohou být vyvažovány pečlivou kombinací mastných kyselin a polyethylenglykolové skupiny.

Níže jsou uvedeny některé ilustrativní modifikace reakcí pro konjugáty polymer-peptid
příhlášky – reakce XXV.



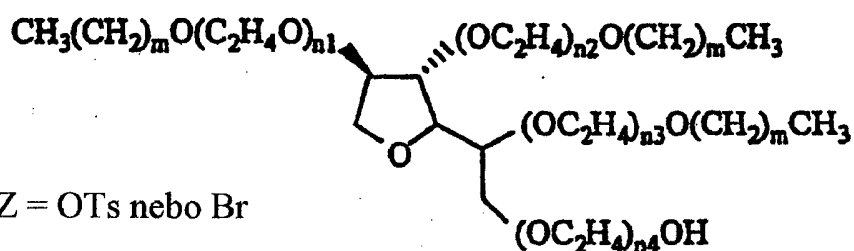
(XXV)

J

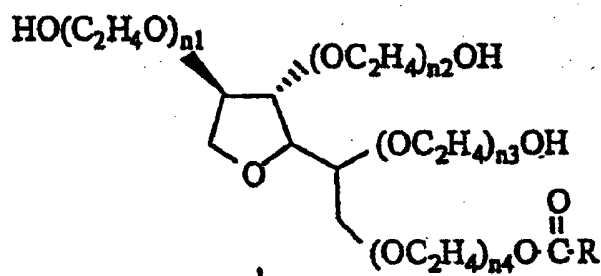


1. $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OC}_2\text{H}_4)_n\text{OH}$
2. NaH
3. $1\text{N NaOH} / ^\circ$

K

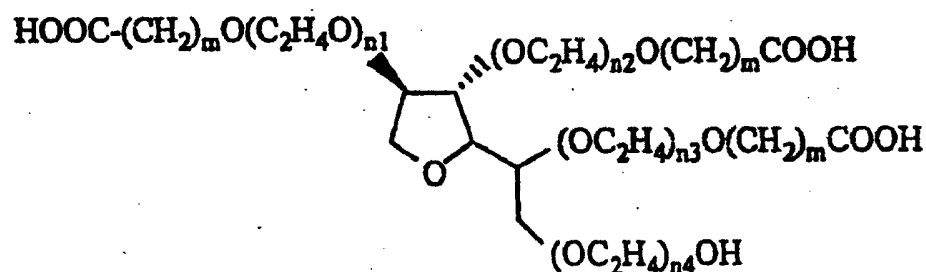


L



1. $\text{NaH} / \emptyset$
2. $\text{Br(CH}_2)_m\text{COOR}$
3. 1N NaOH

M



Ve výše uvedeném reakčním schématu zahrnujícím druhy I, J a K jsou demonstrovány cesty pro modifikaci hydrofilictní/lipofilictní rovnováhy konjugujícího polymeru. Esterové

skupiny v konjugujícím polymeru jsou citlivé k hydrolyze esterasami; konjugující polymer obsahující esterové skupiny proto může být modifikován tak, že jsou esterové skupiny přeměněny na etherové, které jsou obecně více odolné vůči hydrolyze. Reakční schéma obsahující druhy L a M znázorňuje přeměnu hydroxylových skupin na karboxylové skupiny. Z tohoto pohledu budou karboxylové skupiny poskytovat karboxylový anion, který je lepší pro funkční stabilizaci (vytváří iontové koordinační komplexy) než hydroxyl, který takové komplexy nevytváří. Další zdroje aniontů s vhodnými funkčními skupinami pro tvorbu iontové koordinačních komplexů zahrnujících druhy polymerů této přihlášky obsahují síranové a fosfátové skupiny. Obecně mohou být s výhodou použity různé techniky pro zlepšení charakteristik stability konjugátů polymer-peptid této přihlášky zahrnující: funkcionalizaci polymeru skupinami s výbornou odolností proti hydrolyze, např. dříve popsaná přeměna esterových skupin na etherové skupiny; modifikace lipofilní/hydrofilní rovnováhy konjugujícího polymeru podle požadavků peptidu, který je stabilizován polymerem a přizpůsobení molekulové hmotnosti polymeru požadované úrovni molekulové hmotnosti peptidu, který je stabilizován polymerem.

Unikátní vlastnost polymerů odvozených od polyalkylenglykolu této přihlášky cenných pro terapeutická použití je všeobecná biokompatibilita. Polymery mají různé vlastnosti vzhledem k rozpustnosti ve vodě a nejsou toxické. Jsou neantigenní, neimunogenní a neinterferují s biologickými aktivitami enzymů. Dlouho cirkulují v krvi a jsou snadno vylučovány živými organismy.

U produktů v této přihlášce byla prokázána jejich užitečnost pro udržení biologické aktivity peptidů a mohou být například připraveny pro terapeutické podávání rozpuštěním ve vodě nebo v přijatelném tekutém médiu. Podávají se buď parenterálně nebo orální cestou. Jemné koloidní suspenze mohou být připraveny pro parenterální podávání pro dosažení depotního efektu nebo orální podávání.

V suchém lyofilizovaném stavu vykazují konjugáty peptid-polymer této přihlášky dobrou skladovací stabilitu; roztoky konjugátů této přihlášky jsou také charakteristické dobrou skladovací stabilitou.

Terapeutické konjugáty polymer-peptid této přihlášky mohou být využity pro profylaxi nebo léčbu jakéhokoli stavu nebo stádia choroby, pro které je peptidová složka účinná.

Navíc konjugáty polymer-peptid této přihlášky mohou být využity pro zjištění složek, stavů nebo stádií choroby v biologických systémech nebo vzorcích, stejně tak pro diagnostické účely v nefyziologických systémech.

Dále konjugáty polymer-peptid tohoto vynálezu mohou být použity pro profylaxi nebo léčbu stavu(ů) nebo stádia(i) nemoci v rostlinných systémech. Například peptidová složka konjugátu může mít insekticidní, herbicidní, fungicidní a/nebo pesticidní účinek přízřusobitelný pro použití v různých rostlinných systémech.

Ještě dále peptidovou složkou konjugátů této přihlášky mohou být protilátky nebo alternativně antigeny pro diagnostické, imunologické a/nebo testovací účely.

Pro terapeutické použití uvažuje přihláška metodu léčby živočichů, kteří mají nebo jsou latentně náchylní k takovýmto stavům nebo stádiím choroby, a v případě nutnosti takové léčby zahrnuje podávání takového množství konjugátu polymer-peptid této přihlášky živočichům, které jsou účinné pro zmíněný stav nebo stádium nemoci.

Subjekty pro léčbu konjugáty polymer-peptid této přihlášky zahrnují jak člověka, tak i ostatní živočichy (např. pták, pes, kočka, kráva, kůň) a především s výhodou savce a ještě výhodněji lidi.

V závislosti na specifickém stavu nebo stádiu choroby, kterou je třeba léčit, mohou být zvířatům podávány konjugáty peptid-polymer tohoto vynálezu při jakékoliv vhodné terapeuticky účinné a bezpečné dávce, jak může být snadno stanoveno se zkušenostmi v oboru a bez přílišného experimentování.

Obecně budou vhodné dávky sloučeniny o vzorci IX pro dosažení terapeutického prospěchu v rozsahu od 1 mikrogramu (μg) do 100 miligramů (mg) na kilogram hmotnosti příjemce na den, s výhodou v rozsahu od 10 μg do 50 mg na kilogram hmotnosti na den a ještě výhodněji v rozsahu od 10 μg do 50 mg na kilogram hmotnosti na den. Požadovaná dávka je s výhodou reprezentována jako dvě, tři, čtyři, pět, šest nebo více subdávky podávaných v patřičných intervalech během dne. Tyto subdávky mohou být podávány v podobě jednotkových dávek například obsahujících od 10 μg do 1000 mg, s výhodou od 50 μg do 500 mg a ještě výhodněji od 50 μg do 250 mg aktivní látky na jednotkovou dávku. Alternativně, pokud to stav příjemce vyžaduje, mohou být dávky podávány jako nepřetržitá infuze.

Způsob podávání a dávkování bude samozřejmě ovlivňovat terapeutická množství látek, které jsou požadovány a účinné pro danou léčebnou aplikaci.

Například při orálním podávání se dávky typicky podávají nejméně dvakrát, např. 2 až 10 krát, ve stejných dávkách jako při parenterálním podávání pro stejnou aktivní látku.

Konjugáty polymer-peptid vynálezu mohou být podávány *per se* stejně tak ve formě farmaceuticky přijatelných esterů, solí a jejich dalších fyziologicky funkčních derivátů.

Příhláška také zahrnuje farmaceutické prostředky, jak pro veterinární použití, tak i pro léčbu lidí, které obsahují jako aktivní látku jeden nebo více konjugát(ů) polymer-peptid vynálezu.

V těchto farmaceutických a léčivých prostředcích je aktivní látka s výhodou používána spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelným(i) nosičem(i) a volitelně dalšími terapeutickými látkami. Nosič(e) musí být farmaceuticky přijatelný ve smyslu kompatibility s ostatními složkami prostředku a nesmí být nadměrně škodlivý pro svého příjemce. Aktivní látka je obsažena v množství efektivním pro dosažení požadovaného farmakologického účinku, jak je popsáno výše, a v množství vhodném pro dosažení požadované denní dávky.

Prostředky zahrnují ty, které jsou vhodné pro parenterální a stejně tak neparenterální podávání, a specifické metody podávání včetně orálního, rektálního, bukalního, lokálního, nosního, očního, subkutánního, intramuskulárního, intravenózního, transdermálního, intathekálního, intraartikulárního, intraarteriálního, subarachnoidálního, bronchiálního, lymfatického, vaginálního a intrauterálního podávání. Preferovány jsou prostředky vhodné pro orální a parenterální podávání.

Pokud je aktivní látka použita v tekutém prostředku, prostředek může být s výhodou podáván orálně nebo parenterálně. Pokud je aktivní látka použita v prostředku v tekuté suspenzi nebo jako prášek v prostředku s biokompatibilním nosičem, může být prostředek s výhodou podáván orálně, rektálně nebo bronchiálně.

Pokud je aktivní látka použita přímo ve formě pevného prášku, může být aktivní látka s výhodou podávána orálně. Alternativně může být podávána bronchiálně rozprášením prášku v nosném plynu, takže se vytvoří plynná disperze prášku, která je pacientem vdechnuta z dýchacího přístroje obsahujícího vhodné rozprašovací zařízení.

Prostředky obsahující aktivní látku této přihlášky mohou být pohodlně předkládány v podobě jednotkových dávek a mohou být připraveny různými metodami dobře známými v oboru farmacie. Takovéto metody obvykle zahrnují krok, ve kterém se aktivní látka(y) asociuje s nosičem, který se skládá z jedné nebo více přídavných látek. Typicky jsou prostředky připravovány rovnoměrným a vzájemným smícháním aktivní látky(ek) s tekutým nosičem, jemně děleným pevným nosičem nebo oběma a poté je produkt v případě potřeby vytvarován do dávkových forem požadovaného prostředku.

Prostředky této přihlášky vhodné pro orální podávání mohou být podávány jako jednotlivé jednotky v podobě kapslí, oplatek, tablet nebo pastilek, z nichž každá obsahuje stanovené množství aktivní látky v podobě prášku nebo granulí; nebo jako suspenze ve vodném roztoku nebo nevodném roztoku jako jsou sirup, tinktura, emulze nebo výtažek. Tableta může

být vyrobena stlačením nebo lisováním, případně s jednou nebo více přídatnými látkami. Stlačené tablety mohou být připraveny stlačením ve vhodném stroji, kde je aktivní látka ve volně plovoucí formě, jako je prášek nebo granule, a případně je smíchána s pojivovou látkou, dezintegrační látkou, lubrikantem, inertním rozpouštědlem, povrchově aktivní látkou nebo leptací látkou. Lisované tablety obsahující směs práškové aktivní látky s vhodným nosičem mohou být vyrobeny lisováním ve vhodném stroji.

Sirup může být vyroben přidáním aktivní látky ke koncentrovanému vodnému roztoku cukru, například sacharózy, ke kterému může být také přidána přídatná látka(y). Touto přídatnou látkou(ami) mohou být ochucovadla, vhodný konzervant, látky zabraňující krystalizaci cukru a látky pro zvýšení rozpustnosti jakékoliv jiné látky jako třeba polyhydroxyalkohol, například glycerol nebo sorbitol.

Prostředky vhodné pro parenterální podávání obsahují výhodně sterilní vodný přípravek aktivní látky, který je s výhodou izotonický s krví příjemce (např. fyziologický solný roztok). Takovéto prostředky mohou obsahovat suspendující látky a látky zvětšující objem nebo jiné mikročasticové systémy, které jsou navrženy k zacílení látky na složky krve nebo jeden či více orgánů. Prostředky mohou být předkládány v jednodávkové nebo multidávkové formě.

Prostředky ve formě nosního spreje obsahují purifikované vodné roztoky aktivních látek s konzervačními látkami a izotonickými látkami. Takovéto prostředky mají s výhodou upravené pH a izotonický stav slučitelný s membránami nosní sliznice.

Prostředky pro rektální podávání mohou být předkládány jako čípky s vhodným nosičem, jako je kakaové máslo, ztužené tuky nebo ztužená mastná karboxylová kyselina.

Prostředky pro oční podávání jsou připraveny obdobnou metodou jako nosní sprej s výjimkou toho, že pH a izotonické faktory jsou s výhodou upraveny tak, aby odpovídaly očím.

Povrchové prostředky obsahují aktivní látku rozpuštěnou nebo rozptýlenou v jednom nebo více médiích, jako je minerální olej, vazelína, polyhydroxyalkoholy nebo ostatní báze používané pro povrchové farmaceutické prostředky.

Navíc mohou kromě výše zmíněných látek obsahovat prostředky tohoto vynálezu jednu nebo více přídatných látek vybraných z rozpouštědel, pufrů, ochucujících látek, dezintegračních látek, povrchově aktivních látek, látek zvětšujících objem, lubrikantů, konzervantů (včetně antioxidantů) a podobných.

Při neterapeutických použitíh této přihlášky může konjugát polymer-peptid využívat kovalentní vazbu nebo alternativně nekovalentní vazbu mezi peptidovými a polymerovými složkami. Navíc mohou být asociativně spojené peptidové a polymerní složky využity pro podávání terapeutických peptidových látek vhodnými metodami podávání jako jsou ty, které zde

byly ilustrativně zmíněny výše ve spojitosti s ilustrační diskusí kovalentně spojených konjugátů polymer-peptid tohoto vynálezu.

V těchto neterapeutických asociativně spojených prostředcích peptid-polymer mohou být peptidové a polymerové složky zpočátku spojeny dohromady pro posílení stability a odolnosti vůči degradaci; alternativně mohou být například tyto složky oddělenou částí vicesložkového prostředku, který je smíchán v okamžiku použití, a který bude díky absenci asociativní vazby mezi polymerem a peptidem ve výsledné směsi náchylný k rychlému rozpadu nebo jiné metodě degradace. Bez ohledu na formu složení asociativně spojených prostředků peptid-polymer se v přihlášce také uvažuje o asociativní vazbě, která zesiluje některé charakteristiky nebo aspekty peptidu nebo jiným způsobem zesiluje jeho funkčnost v porovnání s peptidovou složkou bez takového asociativního polymeru.

Přihláška tedy zamýšlí také zajištění vhodných polymerů pro *in vitro* stabilizaci peptidů v roztoku jako výhodný názorný příklad neterapeutické aplikace. Polymery mohou být například využity pro zvýšení teplotní stability a odolnosti peptidu vůči enzymatické degradaci. Posílení teplotní stability peptidu konjugací podle metod této přihlášky zahrnuje zlepšení skladovatelnosti, stability při pokojové teplotě, robustnost diagnostických a výzkumných látek a souprav, např. soupravy pro imunotesty. V názorném příkladě může být alkalická fosfatasa kovalentně nebo asociativně spojena s vhodným polymerem v souladu s tímto vynálezem pro poskytnutí stability takovéto fosfatase, pokud je používána jako látka v soupravě pro kolorimetrickou detekci protilátky nebo antigenu v biologických tekutinách.

Následující příklady jsou míněny jako ilustrativní pro tuto přihlášku a neměly by být chápány jako limitující.

Příklady provedení vynálezu

Konjugát LCRF-amfofilní polymer může být syntetizován a testován na aktivitu vedoucí k uvolňování CCK. Konjugát LCRF může být hodnocen na odolnost k proteolýze. Fyziologické a behaviorální účinky mohou být potvrzeny *in vivo* ve studiích na zvířatech.

Syntéza konjugátu LCRF-amfofilní polymer

Užitím amfofilních oligomerů nebo polymerů různé velikosti a chemického složení mohou být modifikovány absorpční a štěpné vlastnosti peptidového konjugátu. Je požadováno, aby polymer, který bude připojen na LCRF, neinterferoval s vazbou na receptor. Přesné vlastnosti vazby LCRF se svým receptorem nejsou známy, ale byla učiněna dvě pozorování týkající se této vazby: zbytky 11 až 25 jsou pro interakci nezbytné a rozštěpení mezi zbytky 19 a 20 zruší vazebnou aktivitu. Proto budeme používat hydrolyzovatelný spojovací článek na K19, aby byl peptid ochráněn před trypsinovou proteolýzou.

Konjugáty tohoto vynálezu mají dvě složky (PEG a alkylový řetězec), které udělují LCRF dvě užitečné vlastnosti. Za prvé, použitý rozvětvený oligomer na N-konci zabraňuje vstupu ze střeva do krevního řečiště. Pro tento účel bude na N-konec přidán oligomer 5 až 10 kDa, protože molekuly o molekulové hmotnosti větší než 4 kDa neprocházejí střevní stěnou do krevního řečiště, ale jsou zadrženy v lumenu. Za druhé, hydrofobní alkylový řetězec je schopen integrovat se do buněčných membrán střevního epitelu a tím dochází k těsnému přiblížení peptidu ke svému receptoru na povrchu epiteliálních buněk. S výhodou se připojuje konjugát PEG/alkyl na N-konec v dostatečné vzdálenosti od zbytků účastnících se vazby na receptor.

Prvních 35 zbytků LCRFⁱⁱⁱ může být syntetizováno metodami pevné fáze a mohou být získány od komerčních dodavatelů. LCRF konjugační techniky postupují podle třech základní postupů shrnutých na Obrázku 2.

LCRF obsahuje dvě reaktivní aminoskupiny, které mohou být použity pro připojení konjugátu – aminokonec a lysinový postranní řetězec. Pro první konjugát (Konjugát 1) může být použit rozvětvený oligomer s celkovou průměrnou molekulovou hmotností 4 až 10 kDa, který je připojen k N-konci LCRF pomocí nehydrolyzovatelného spojovníku. Tento konjugát má tři základní znaky. Za prvé, oligomery na N-konci LCRF jsou umístěny distálně od známé receptor vazebné domény, a proto je velmi nepravděpodobné, že by ovlivňovaly její biologickou aktivitu. Za druhé, rozvětvený oligomer na N-konci představuje sterickou překážku aminopeptidasám, které by za jiných okolností peptid štěpily. Za třetí, rozvětvené oligomery zajišťují jak extrémní rozpustnost ve vodě tak i značně zvětšují velikost konjugátu LCRF a tím zabraňují přechodu peptidu přes epiteliální stěnu tenkého střeva.

Konjugát 2 může využívat N-koncový konjugát popsáný pro Konjugát 1 a druhý lineární konjugát připojený na epsilon aminoskupinu K19. Tento lineární oligomer může být připojen hydrolyzovatelnou vazbou, takže v průběhu času bude oligomer uvolněn hydrolyzací a tím bude

umožněno vazbě LCRF na svůj receptor. K19 se nachází přibližně uprostřed předpokládané receptor vázající sekvence. Základní vlastnosti Konjugátu 2, které má vedle již popsanych u Konjugátu 1, zahrnují přidání hydrolyzovatelného oligomeru na K19, který chrání před trypsinovou hydrolýzou. Za druhé, hydrolyzovatelné připojení oligomeru by mělo umožnit patřičnou vazbu na receptor. Za třetí, pomalá hydrolýza oligomeru na K19 ($T_{1/2}$ předpokládáno 30 až 60 min) může vést k prodloužení doby účinku LCRF. Návrh 3 představuje konjugát připojený na C-konec, N-konec a K19. C-konec (tyrosin) je změněn na lysin a tím je poskytnuto třetí místo pro konjugaci. U této mutace se nepředpokládá změna vazby na receptor, protože vazebná doména se nachází nejméně 10 zbytků od zbytku 35. Rovnováhy amfifilicity je dosaženo použitím tří lineárních polymerů namísto rozvětveného polymeru. Přidání hydrolyzovatelného oligomeru na C-konec zajistí ochranu proti degradaci karboxypeptidasami. Hydrolytické odstranění všech tří oligomerů povede k obnovení plné biologické aktivity LCRF. Hydrolýza oligomerů ($T_{1/2}$ předpokládáno 30 až 60 min) může vést k prodloužení doby účinku LCRF.

Přehled syntézy LCRF konjugátu je ukázáno na Obrázku 3. Oligomerní karboxylové alkanoly se aktivují brómem a esterifikují. Oligomerní PEG se připojí k aktivovaným alkanovým oligomerům. Připojení PEG/alkan karboxylové kyseliny k volné aminoskupině peptidu se provede N-hydroxysukciamidem ve vodném roztoku při pH, při kterém je aminoskupina nukleofilní. Předtím syntetizované a purifikované oligomery se aktivují a připojí k LCRF při různých reakčních podmínkách, které umožňují připojení oligomeru na určitá místa (N-konec, C-konec nebo K19). Sledu konjugačních reakcí a purifikací produktů se může také použít pro získání specifických konjugačních vzorců. Selektivity N-koncové aminoskupiny před vedlejším řetězcem lysinu se dosáhne výběrem pH reakčního média. Připojení k N-konci ($pK_a \sim 8$) se provádí při pH ~ 9 , kdy je epsilon aminoskupina ($pK_a \sim 10,6$) stále protonizována.

Amfifilicita a řešení struktury konjugátu může být optimalizováno změnou relativní délky alkanové (hydrofobní) a PEG (hydrofilní) složky.

Reakční směs se purifikuje na preparativní HPLC koloně (C-18) se systémem gradientu rozpouštědla tvořeného isopropanolem/vodou (0,1% trifluoroctová kyselina). Pro získání vysušených produktů se rozpouštědlo odpaří za sníženého tlaku a teploty pod 20 °C. Čistota produktu se analyzuje HPLC na reverzní fázi a hmotnostní spektrofotometrií.

Buněčné testy představují rychlý způsob potvrzení biologické aktivity konjugátů LCRF (např. schopnosti konjugátů vyvolat uvolňování CCK z buněk uvolňujících CCK).

ⁱⁱⁱ Aminokyselinová sekvence LCRF je STFWAYQPDGDNDPTDYQKYEHTSSPSQLLAPGDYPCVIEV

Buněčné testy mohou být použity pro srovnání účinku použití našich konjugátů vzhledem k použití s nosičem. Přirozeně se vyskytující LCRF vyvolává přibližně 300% zvýšení sekrece CCK. Naším cílem je vyvolat s našimi konjugáty minimálně 200% zvýšení sekrece CCK. Šest testů na jeden experiment by mělo poskytnout statisticky významné výsledky. Přirozené CCK buňky se připraví následovně: střevní slizniční buňky se připraví z 200 až 225 g vážících samic a samic krys Sprague-Dawley. Po usmrcení se rychle odejme proximálních 10 cm tenkého střeva se začátkem 2 cm distálně od pyloru a okamžitě se umístí do fyziologického roztoku a promyje. Střevo se rozkrájí na krátké kousky, obrátí se a umístí do fyziologického roztoku fosfátového pufru (PBS). Povrch sliznice se dvakrát opláchne PBS a přemístí se do disociačního média bez trypsinu při 37 °C s mírným třepáním na 2 minuty. Roztok se odstraní a nahradí se čerstvým disociačním médiem a inkubuje se 10 minut za mírného třepání. Zbylá suspenze se přefiltruje (450 μ m) a filtrát se centrifuguje (1000 rpm, 3 minuty). Peleta se rozsuspenduje v Hankově vyváženém fyziologickém roztoku s HEPES (10 mM; pH 7,4) (HHBSS) a centrifuguje se jako výše. Peleta se rozsuspenduje v 5 ml HHBSS a rozdělí se na alikvoty pro testování.

Aktivita konjugátů může být potvrzena následovně: CCK buňky se inkubují s testovanými sloučeninami (nebo nosičem) 5 až 40 minut. Inkubace se zastaví přemístěním buněk na led, centrifugací buněk a odstraněním supernatantu. Pro konjugáty obsahující hydrolyzovatelné spojovníky se inkubace zastaví po 5, 10, 15, 20, 30 a 40 minutách. Pro konjugáty bez hydrolyzovatelného spojovníku se použije pouze jeden čas (15 minut). Supernatant se použije pro měření CCK pomocí RIA, jak je popsáno níže. 50 μ l supernatantu se otestuje pomocí HPLC a MALDI-TOF, hmotnostní spektrofotometrií pro změření množství zbývajících konjugátů LCRF.

Radioimunotest (RIA) se může použít pro měření sekrece CCK. Sekrece se měří u buněk uvolňujících CCK pěstovaných ve 24-jamkových mikotitračních destičkách. Buňky se inkubují při 37 °C a opláchnou se HHBSS obsahující HEPES (10 mM, pH 7,4). K buňkám se přidá 0,5 ml pufru s nebo bez testovaných látek na dobu od 5 do 40 minut. Odebere se 350 μ l, centrifuguje se a umístí se na led nebo zamrazí. 300 μ l vzorku se použije pro RIA. RIA se provádí v PBS obsahujícím HEPES (10 mM, pH 7,5), 0,1% gama globulin s 0,01% NaN₃. 50 μ l vzorku se přidá k 200 μ l RIA pufru a 100 μ l králičí protilátky proti CCK (OAL-656) v ředění 1 : 80 000. 100 μ l ¹²⁵I-CCK-8 (3000 až 4000 cpm) se potom přidá do zkumavek při 4 °C na 12 hodin. Ke vzorkům se přidá kozi proti králičí IgG sefarosové CL4B kuličky na jednu hodinu při mírném třepání. Sefarosové kuličky se poté peletují krátkou centrifugací a peleta se odsaje. Peleta se rozsuspenduje v 0,5 ml fyziologického roztoku pufrovaného HEPES a kuličky se znovu peletují. Kuličky se vezmou a promyjí a peleta se proměří na gama počítadle 5 minut. Nekonjugované

LCRF způsobuje přibližně 300% zvýšení sekrece CCK u přirozených CCK a STC-1 buněk a použije se jako pozitivní kontrola pro buněčné testy.

V případě testovaných sloučenin s hydrolyzovatelnými konjugáty může být uvolňování CCK (RIA) korelováno s hydrolyzou konjugátu (HPLC-MS).

Přesná charakteristika konjugátů může být optimalizována pro poskytování požadovaných vlastností. Konjugace na N- a C-konci se bude testovat, aby se zjistilo, zda N- nebo C-terminální konjugace nebo obě poskytují nejlepší ochranu a biologickou aktivitu.

Po infuzi LCRF do dvanáctníku krysa je pozorována dvoufázová dávkově závislá křivka vylučování pankreatického proteinu, kdy při vyšších dávkách LCRF dochází k poklesu vylučování pankreatického proteinu. Vhodné koncentrace konjugátu mohou být stanoveny zkušenými osobami v oboru vzhledem k okamžiku objevení se a mohou být v rozsahu od 1 do 1000 nM.

U sekrece CCK se má za to, že je regulována inhibicí negativní zpětnou vazbou. LCRF je produkováno konstitutivně ve dvanáctníku krysa a u lidí jako odpověď na živiny. Pokud potrava není přítomna, LCRF je degradováno proteasami ve dvanáctníku. Protože infuze trypsinových inhibitorů do dvanáctníku krysa je postačující pro indukci zvýšení uvolňování CCK, navrhuje se, že ochrana před trypsinovým štěpením bude dostačující pro ochránění konjugátu LCRF před proteolytickým štěpením.⁹ Naši konjugáčnické techniky jsme úspěšně použili k ochraně kalcitoninu a insulinu před proteolýzou.

Stabilita konjugátu LCRF v prostředí střeva může být zjištěna zkoumáním stability peptidů k proteolytickým enzymům trypsinu, pankreatické elastase a chymotrypsinu během 40 minut, což je typický čas průchodu střevem. Roztoky konjugovaných LCRF se inkubují při 37 °C (0,1% Tween 20 [w/v], 10 mM NaHPO₄, pH 7,4) a přidají se proteasy. V případě potřeby solubilizace peptidů se přidá Tween (0,1%). Proteolýza se zastaví upravením pH na 2 až 3. Výsledné vzorky se separují HPLC použitím 5 µm, C-18 kolony a eluují se 25 minut při 0,5 ml/min na lineárním gradientu 90% H₂O/0,1% trifluoroctová kyselina a 10% 2-propanol zvyšující se na 60% 2-propanol.

Stabilita konjugovaného LCRF v žaludku může být stanovena zkoumáním stability peptidů k pepsinu. Degradace konjugovaného LCRF pepsinem se stanoví v simulovaném roztoku žaludečních šťáv (33 mM NaCl, pH 1,2). Peptidové roztoky se inkubují při 37 °C a přidá se pepsin. Proteolýza se zastaví zvýšením pH na 7,0 až 7,5.

HPLC může být použito k monitorování proteolýzy. Oblast pod absorpčními vrcholky (280 nm) se integruje, aby byla sledována míra proteolýzy v průběhu času. Pokles integrované oblasti vrcholku, který vzniká z nerozštěpeného konjugátu LCRF, se použije k monitorování

míry hydrolýzy. HPLC separace se provede podle popisu výše ve specifickém cíli 1 pro purifikaci konjugovaného LCRF.

U zbytků Y17 a Y20 existují chymotrypsinová štěpná místa. Pokud by chymotrypsin rychle štěpil peptid, přidáme ochrannou skupinu PEG k hydroxylové skupině tyrosinu takovou vazbou, která se pomalu hydrolyzuje při pH 7,4. U zbytků 5, 10, 29, 30 a 31 existují štěpná místa pro elastasu. Tyto zbytky se nacházejí mimo oblast (11 až 25), která byla identifikována jako zásadní pro vazbu na receptor. Pokud bude požadována ochrana před žaludečními šťávami, bude zajištěna potažením dobře zavedenou technologií ve farmaceutickém průmyslu.

Ve výhodném aspektu vynálezu poskytují konjugáty zvýšení uvolňování CCK nad bazální sekreci nejméně o 200% po léčbě konjugovaným LCRF, jak bylo změřeno pomocí RIA. Přirozené LCRF způsobuje 300% zvýšení sekrece CCK z přirozených CCK buněk a bude použito jako pozitivní kontrola pro tyto studie.

Navíc je požadováno, aby u konjugátů docházelo k nižší než 70% proteolýze konjugátu LCRF při vystavení serinovým proteasám (pH 7,4) na 40 minut. Je také požadováno, aby docházelo k menší než 10% proteolýze střevně potaženého konjugátu LCRF při vystavení simulovaným žaludečním šťávám na 40 minut.

Osoby zkušené v oboru mohou s pomocí předkládaného popisu potvrdit fyziologické a behaviorální následky týkající se příjmu potravy a obezity na živočišných modelech a u lidí. Krysí střevo je použito jako zdroj tkáně pro purifikaci slizničních CCK buněk. Krysy jsou usmrceny pouze za účelem shromáždění střevní tkáně. Po usmrcení je střevo chirurgicky odebráno, promyto a střevní buňky jsou připraveny rozptýlením kolagenasou a EDTA. Samci a samice Sprague-Dawley krys 2,5 až 3 měsíce starých vážících 250 až 300 g budou zdrojem CCK buněk. Přibližně 48 krys bude zapotřebí v navrhované studii pro získání smysluplných výsledků. U krys bylo již uděláno značné množství práce na regulaci sekrece CCK. Z každé krysy by mělo být získáno dostatečné množství CCK buněk na jeden experiment. Krysy jsou usmrceny z důvodů sběru střevní tkáně. Pro euthanasii se s výhodou používá narkóza v CO₂, kdy se krysy umístí do vzduchotěsné klece obsahující CO₂. Tato metoda je v souladu s doporučeními Skupiny pro euthanasii Americké veterinární zdravotní asociace.

Průmyslová využitelnost

Prostředky obsahující LCRF a amfofilní polymer jsou využitelné pro léčbu obezity u člověka nebo jiných savců s těmito problémy.

Navíc terapeutické konjugáty polymer-peptid této přihlášky mohou být využity pro profylaxi nebo léčbu jakéhokoliv stavu nebo stádia choroby, pro které je peptidová složka účinná.

Konjugáty polymer-peptid této přihlášky mohou být také využity pro zjištění složek, stavů nebo stádií choroby v biologických systémech nebo vzorcích, stejně tak pro diagnostické účely v nefyziologických systémech.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prostředek LCRF, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF spojené s jednou nebo více molekulami v přírodě se nevyskytujícího polymeru, zmíněný polymer obsahuje lipofilní skupinu a hydrofilní polymerní skupinu, tím propůjčují prostředku takové vyrovnané lipofilní a hydrofilní vlastnosti, že je tento prostředek rozpustný ve farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech a schopný interagovat s biologickými membránami.
2. Konjugát LCRF, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF spojené s jednou nebo více molekulami v přírodě se nevyskytujícího polymeru, zmíněný polymer obsahuje: i) lipofilní skupinu a ii) hydrofilní polymerní skupinu, tím propůjčují konjugátu takové vyrovnané lipofilní a hydrofilní vlastnosti, že je tento konjugát rozpustný ve farmaceuticky přijatelných rozpouštědlech a schopný interagovat s biologickými membránami.
3. Peptidový prostředek, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF spojené s jednou nebo více molekulami v přírodě se nevyskytujícího polymeru obsahujícího lipofilní skupinu a hydrofilní skupinu, kde prostředek je rozpustný ve vodných rozpouštědlech a LCRF je aktivní v profylaxi nebo léčbě obezity.
4. Peptidový prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že jeho v přírodě se nevyskytující polymer obsahuje i) lineární polyalkylenglykolovou skupinu a ii) lipofilní skupinu.
5. Peptidový prostředek podle nároku 1, vyznačující se tím, že:
 - a) v přírodě se nevyskytující polymer obsahuje:
 - i) lineární polyalkylenglykolovou skupinu a
 - ii) lipofilní skupinu a
 - b) LCRF, lineární polyalkylenglykolová skupina a lipofilní skupina jsou vzájemně konformačně uspořádány tak, že LCRF v prostředku má zvýšenou odolnost *in vivo* vůči enzymatické degradaci v porovnání s přirozeně se vyskytujícím LCRF.

6. Prostředek LCRF, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF kovalentně spojené s jednou nebo více molekulami polymeru obsahujícího i) lineární polyalkylenglykolovou skupinu a ii) lipofilní skupinu, kde jsou fyziologicky aktivní peptid, lineární polyalkylenglykolová skupina a lipofilní skupina vzájemně konformačně uspořádány tak, že LCRF v prostředí LCRF má zvýšenou odolnost *in vivo* vůči enzymatické degradaci v porovnání se samotným LCRF.
7. Multiligandový konjugovaný komplex LCRF, vyznačující se tím, že obsahuje triglyceridovou páteř s:
 - a) LCRF kovalentně připojeným na triglyceridovou páteř přes polyalkylenglykolovou spojovací skupinu navázanou na atom uhlíku triglyceridové páteře a
 - b) nejméně jednou skupinou mastné kyseliny kovalentně připojenou buď přímo na atom uhlíku triglyceridové páteře nebo kovalentně připojenou přes polyalkylenglykolovou spojovací skupinu.
8. Multiligandový konjugovaný komplex LCRF podle nároku 7, vyznačující se tím, že α' a β uhlíkové atomy triglyceridové páteře mají skupiny mastných kyselin připojeny kovalentními vazbami buď přímo na sebe, nebo nepřímo kovalentně připojené na sebe přes polyalkylenglykolové spojovací skupiny.
9. Multiligandový konjugovaný komplex LCRF podle nároku 8, vyznačující se tím, že skupina mastné kyseliny je kovalentně připojena buď přímo, nebo přes polyalkylenglykolovou spojovací skupinu na α a α' uhlíky triglyceridové páteře s LCRF kovalentně připojeným na β -uhlík triglyceridové páteře, buď přímo kovalentně navázaným na něj, nebo na něj nepřímo navázaným přes polyalkylenglykolovou spojovací skupinu.
10. Polysorbátový komplex, vyznačující se tím, že obsahuje polysorbátovou skupinu zahrnující triglyceridovou páteř s kovalentně navázanou mastnou kyselinou na její α , α' a β uhlíkové atomy a s polyethylenglykolovou skupinou kovalentně navázanou na její α , α' a β uhlíkové atomy.
11. Polysorbátový komplex podle nároku 10, vyznačující se tím, že polysorbátová skupina má na sobě kovalentně navázanou fyziologicky aktivní skupinu.

12. Polysorbátový komplex podle nároku 11, vyznačující se tím, že fyziologicky aktivní skupina je kovalentně navázána na polyethylenglykolovou skupinou.
13. Stabilní, ve vodě rozpustný, konjugovaný komplex LCRF, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF stabilizačně a konjugačně navázané na glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem.
14. Komplex LCRF podle nároku 13, vyznačující se tím, že LCRF je kovalentně navázáno na glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem labilní kovalentní vazbou na volné aminokyselinové skupině polyLCRF, kde je labilní kovalentní vazba štěpitelná *in vivo* biochemickou hydrolýzou a/nebo proteolýzou.
15. Komplex LCRF podle nároku 13, vyznačující se tím, že glykolipidová skupina modifikovaná polyethylenglykolem obsahuje polysorbátový polymer.
16. Komplex LCRF podle nároku 15, vyznačující se tím, že polysorbátový polymer obsahuje esterovou skupinu mastné kyseliny vybranou ze skupiny obsahující monopalmitát, dipalmitát, monolaurát, dilaurát, trilaurát, monooleát, dioleát, trioleát, monostearát, distearát a tristearát.
17. Komplex LCRF podle nároku 16, vyznačující se tím, že glykolipidová skupina modifikovaná polyethylenglykolem obsahuje polymer vybraný ze skupiny obsahující polyethylenglykolové ethery mastných kyselin a polyethylenglykolové estery mastných kyselin, kde mastné kyseliny zahrnují mastnou kyselinu vybranou ze skupiny obsahující laurovou, palmitovou, olejovou a stearovou kyselinu.
18. Komplex LCRF podle nároku 16, vyznačující se tím, že obsahuje polysorbátovou skupinu zahrnující triglyceridovou páteř s kovalentně navázanou mastnou kyselinou na její α , α' a β uhlíkové atomy a s polyethylenglykolovou skupinou kovalentně navázanou na její α , α' a β uhlíkové atomy.
19. Komplex LCRF podle nároku 18, vyznačující se tím, že LCRF je kovalentně navázáno na β uhlíkový atom triglyceridové páteře.

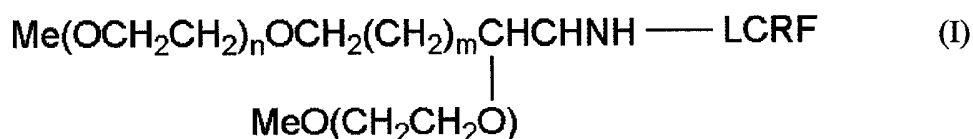
20. Komplex LCRF podle nároku 19, vyznačující se tím, že triglyceridová páteř obsahuje biokompatibilní divalentní spojovací skupinu mezi β uhlíkovým atomem a jedním z α , α' uhlíkových atomů triglyceridové páteře.
21. Polysorbátový komplex, vyznačující se tím, že obsahuje polysorbátovou skupinu zahrnující triglyceridovou páteř s kovalentně navázanou, a to na uhlíkový atom nezávisle vybraný z α , α' a β , funkcionalizační skupinou obsahující:
- a) skupinu mastné kyseliny a
 - b) polyethylenglykolovou skupinu s kovalentně navázanou fyziologicky aktivní skupinou.
22. Polysorbátový komplex podle nároku 21, vyznačující se tím, že fyziologicky aktivní skupina je kovalentně navázána na terminální funkcionalizační skupinu polyethylenglykolové skupiny.
23. Prostředek LCRF podle nároku 1, vyznačující se tím, že v přírodě se nevyskytující polymer má molekulovou hmotnost od 500 do 10 000 Daltonů.
24. Dávková forma pro orální podávání pro léčbu obezity, vyznačující se tím, že obsahuje farmaceuticky přijatelný nosič a stabilní, ve vodě rozpustný, konjugovaný komplex LCRF obsahující LCRF navázané na fyziologicky kompatibilní glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem.
25. Metoda léčby obezity u člověka a ostatních savčích subjektů vykazujících tyto nedostatky, vyznačující se tím, že zahrnuje orální podávání účinného množství prostředku konjugovaného LCRF obsahujícího stabilní, ve vodě rozpustný, konjugovaný komplex LCRF obsahující LCRF kovalentně navázané na fyziologicky kompatibilní glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem subjektu.
26. Metoda profylaktické nebo intervenční léčby potenciální nebo vyvinuté obezity u člověka a ostatních savčích subjektů LCRF, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání účinného množství prostředku konjugovaného LCRF obsahujícího stabilní, ve vodě

rozpustný, konjugovaný komplex LCRF obsahující LCRF navázané na fyziologicky kompatibilní glykolipidovou skupinu modifikovanou polyethylenglykolem subjektem.

27. Metoda prodloužení aktivity LCRF *in vivo* nebo *in vitro* systému, vyznačující se tím, že obsahuje LCRF konjugačně spojené s jednou nebo více molekulami v přírodě se nevyskytujícího polymeru obsahujícího lipofilní skupinu a hydrofilní polymerní skupinu za vzniku konjugačně spojeného prostředku polymer-LCRF a zavádění konjugačně spojeného prostředku polymer-LCRF do *in vivo* nebo *in vitro* systému.

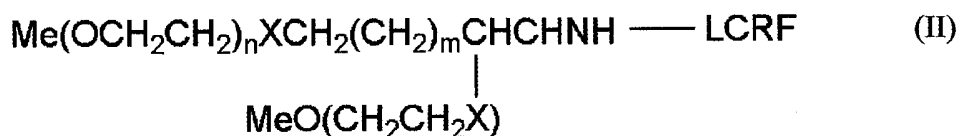
28. Konjugát polymer-LCRF podle nároku 27, vyznačující se tím, že uvedené LCRF je LCRF.

29. Prostředek, vyznačující se tím, že jeho obecný vzorec je I:



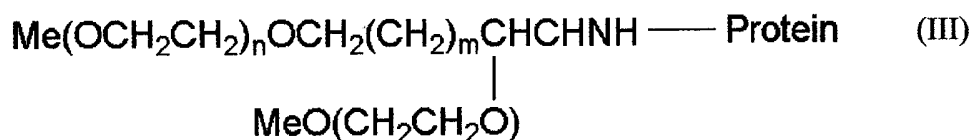
kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20.

30. Prostředek, vyznačující se tím, že jeho obecný vzorec je II:



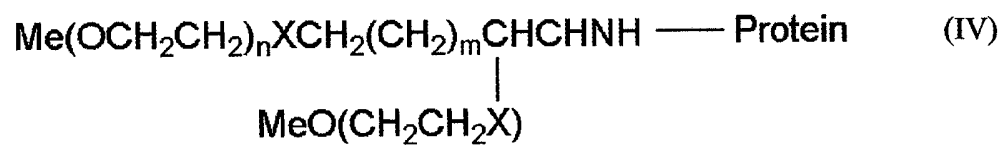
kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20 a X je vybráno ze skupiny obsahující N, O nebo S.

31. Prostředek, vyznačující se tím, že jeho obecný vzorec je III:

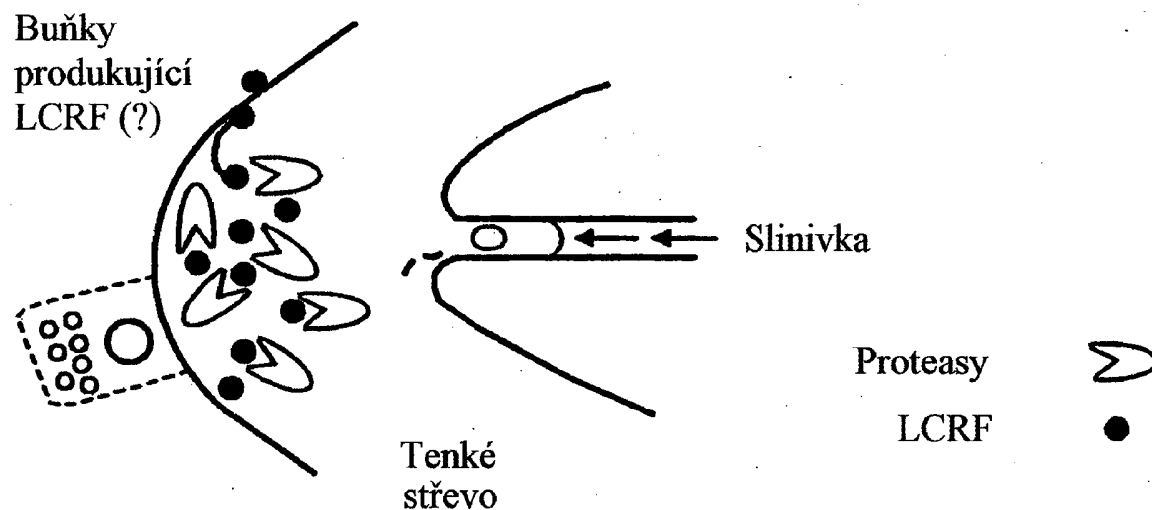


kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20.

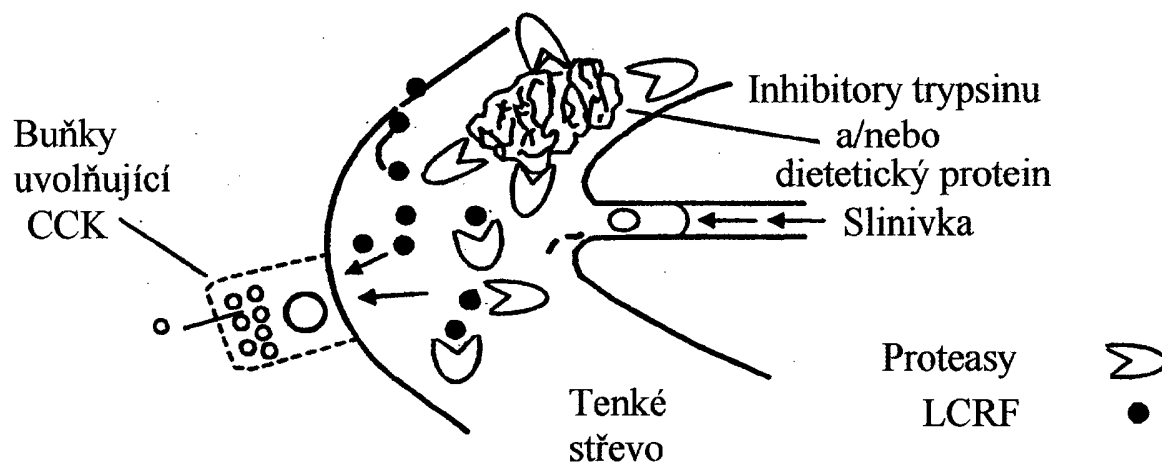
32. Prostředek, vyznačující se tím, že jeho obecný vzorec je IV:



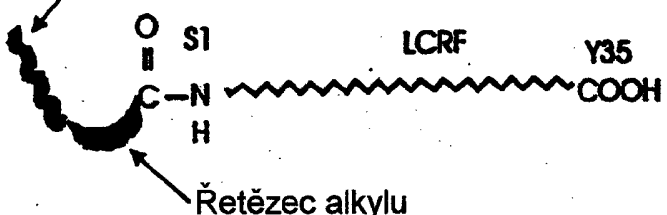
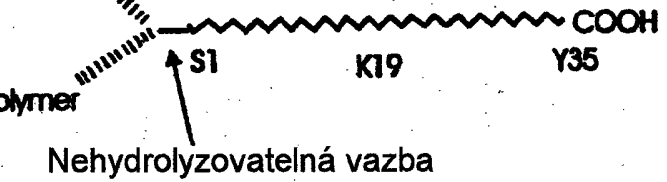
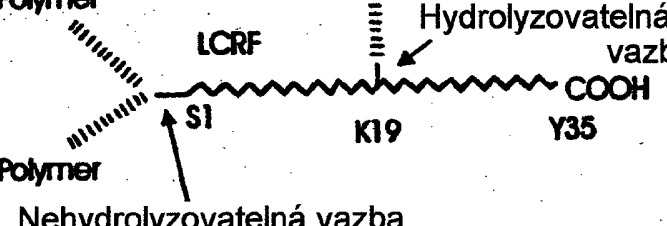
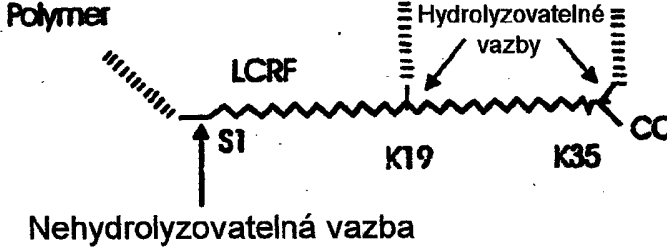
kde n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20 a X je vybráno ze skupiny obsahující N, O nebo S.

Základní stav

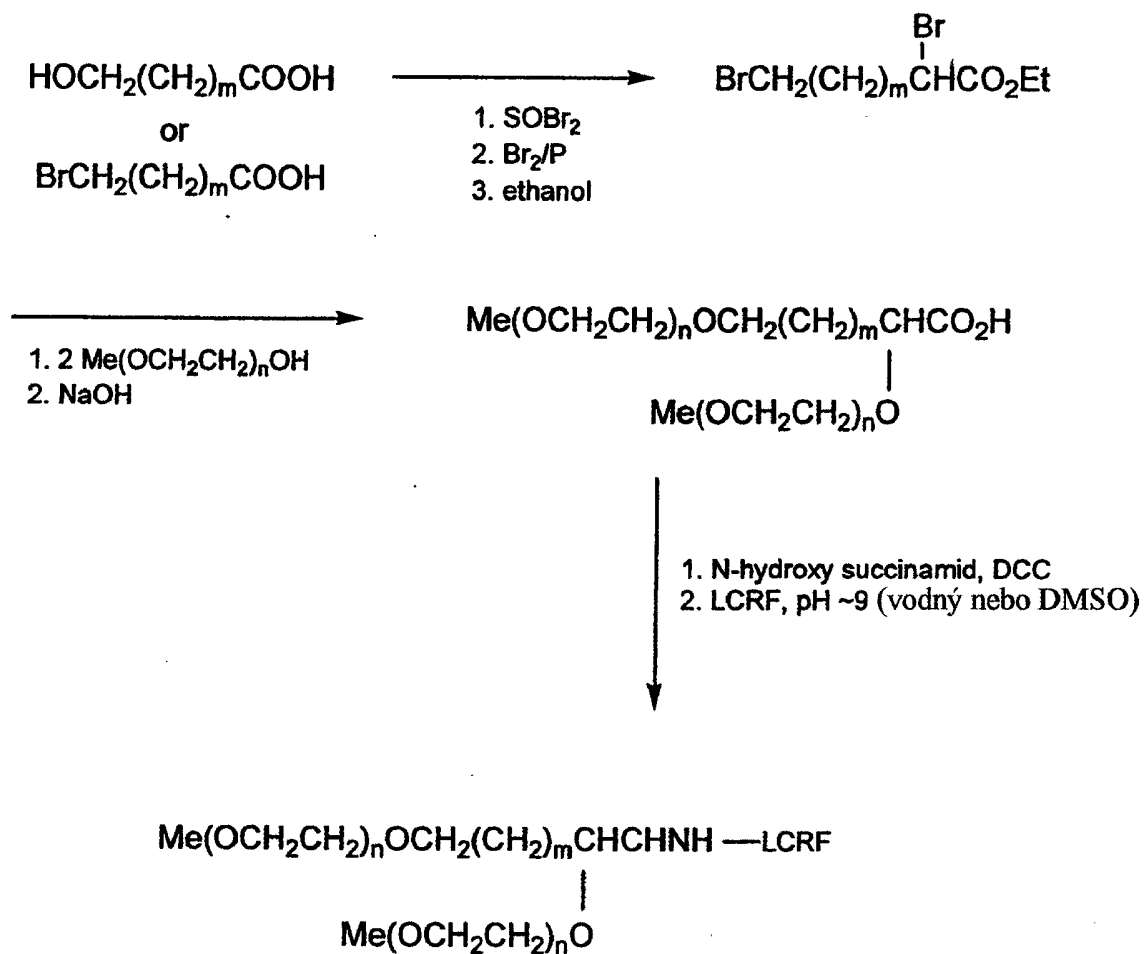
Obr. 1A

Příjem dietetického proteinu

Obr.1B

Příprava oligomeru Hydrofobní část: řetězec alkylu (2-22 uhlíků) Hydrofilní část: PEG (2-5 kDa)	PEG oligomer nebo polymer  Řetězec alkylu
Návrh 1 Rozvětvený polymer na N-konci, nehydrolyzovatelná vazba, C-konec a K19 nekonjugovány	 Nehydrolyzovatelná vazba
Návrh 2 Rozvětvený polymer na N-konci, nehydrolyzovatelná vazba, K19 epsilon N konjugován hydrolyzovatelnou vazbou k lineárnímu polymeru, C-konec nekonjugován	 Nehydrolyzovatelná vazba Hydrolyzovatelná vazba
Návrh 3 Lineární polymer na N-konci, hydrolyzovatelná vazba, K19 a K35 epsilon N konjugovány hydrolyzovatelnými vazbami k lineárnímu polymeru. Mutace Y35 → K35	 Nehydrolyzovatelná vazba Hydrolyzovatelné vazby

Obr. 2



n je od 3 do 230 a m je od 0 do 20

Obr. 3