



HU000228488B1

(19) **HU****MAGYARORSZÁG**
Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatala(11) Lajstromszám: **228 488**(13) **B1**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: **P 02 03652**(22) A bejelentés napja: **2000. 01. 19.**(51) Int. Cl.: **C07K 145/35** (2006.01)**A61K 47/48** (2006.01)(40) A közzététel napja: **2003. 03. 28.**(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlöny és Védjegyértesítőben: **2013. 03. 28.**

(86) A nemzetközi (PCT) bejelentési szám:

PCT/US 00/01264

(87) A nemzetközi közzétételi szám:

WO 0044785

(30) Elsőbbségi adatok:

60/117,917**1999. 01. 29.****US**

(73) Jogosult(ak):

Amgen Inc., Thousand Oaks, Kalifornia (US)

(72) Feltaláló(k):

**Bailon, Pascal Sebastian, Florham Park, New Jersey
(US)**

(74) Képviselő:

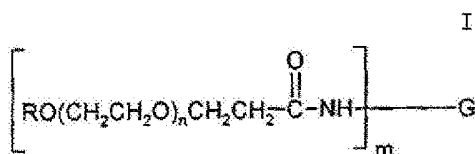
**Molnár Imre, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest**

(54)

GCSF-konjugátumok

(57) Kivonat

Az I. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátumokat tárunk fel, valamint olyan készítményeket, amelyek a konjugátumok keverékei, amelyekben m és n értéke különböző egész szám lehet a készítményben lévő konjugátumokra.



GCSF-konjugátumok

A Granulocita Kolónia-Stimuláló Faktor (GCSF) egy gyógyászatilag aktív fehérje, amely a proliferációt, a differenciációt, és neutrofil granulociták funkcionális aktiválását szabályozza [Metcalf, Blood 67, 257. old. (1986); Yan és mtsai., Blood 84, 795-799. old. (1994); Bensinger és mtsai., Blood 81, 3158-3163. old. (1993); Roberts és mtsai., Expt'l Hematology 22, 1156-1163. old. (1994); Neben és mtsai., Blood 81, 1960-1967. old. (1993)]. A GCSF képes mobilizálni az őssejteket („stem cells”) és prekursor sejteket a csontvelőből, és olyan betegek kezelésére alkalmazák, akiknek a granulocitáit kemoterápia kimerítette, vagy a csontvelő-átültetést megelőző lépésként.

Az 5 214 132. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat feltár egy humán GCSF-mutaint (mutáns proteín), amely a hGCSF-től az 1, 3, 4, 5 és 17. aminosavhelyeken különbözik, ahol a natív GCSF aminosavai helyett a mutein sorrendben Ala, Thr, Tyr, Arg és Ser aminosavakat tartalmaz [lásd még Kuga és mtsai., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 103-111. old. (1989)]. Okabe és mtsai. [Blood 75, 1788-1793. old (1990)] beszámoltak az rhGCSF egy származékáról, amelyben az rhGCSF N-terminális régiójában 5 helyen helyettesítettek aminosavakat, és amely magasabb specifikus aktivitást mutatott, mint az intakt rhGCSF egér és/vagy ember csontvelő őssejtekben két vizsgálati eljárás-

sában. Az 5 218 092. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat feltár egy humán GCSF muteint, amely a hGCSF-től az 1, 3, 4, 5, 17, 145 és 147. aminosavhelyeken különbözik, ahol a natív GCSF aminosavai helyett a mutein sorrendben Ala, Thr, Tyr, Arg, Ser, Asn és Ser aminosavakat tartalmaz. Az 5 214 132. és 5 218 092. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat tartalma hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

A fehérjetermészetű gyógyászati anyagok, mint például a GCSF biológiai elérhetősége gyakran korlátozott a plazmában való rövid féléletidő és a proteázos lebontásra való érzékenység miatt, meggátolva a maximális klinikai hatásosságot. Egyéb terápiás fehérjék vizsgálatai kimutatták, hogy az ilyen nehézségeken felül lehet kerekedni a fehérjék polimerhez, mint például polietilénglikolhoz (PEG) való konjugálásával, általában egy kapcsoló molekulán keresztül, amely kovalensen kötött mind a fehérjéhez, mind a PEG-hez.

Ilyen PEG-gel konjugált biómolekulákról kimutatták, hogy klinikailag hasznos tulajdonságokkal rendelkeznek [Inada és mtsai., J. Bioact. and Compatible Polymers 5, 343. old. (1990); Delgado és mtsai., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9, 249. old. (1992); és Katre, Advanced Drug Delivery Systems 10, 91. old. (1993)]. Ezek között van a jobb fizikai és hőmérsékleti stabilitás, enzimes lebomlásra való érzékenység elleni védelem, megnövelt oldhatóság, hosszabb *in vivo* keringési féléletidő és csökkent kiürülés, csökkent immunogenitás és antigenitás, és csökkent toxicitás.

A találmány szerinti konjugátumtól eltérő szerkezetű PEG-GCSF-konjugátumokat tárnak fel az EP 0 335 423. számú európai közzétételi irat, az EP 0 401 384. számú európai közzétételi irat, Niven és mtsai. [J. Controlled Release 32, 177-189. old (1994)], és Satake-Ishikawa és mtsai. [Cell Structure and Function 17, 157-160. old (1992)].

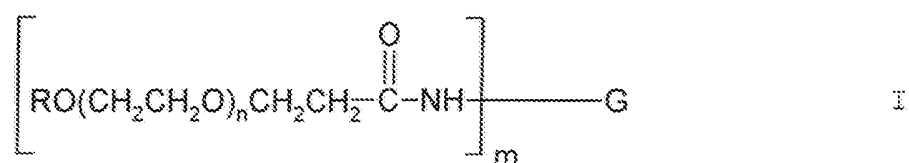
A találmány tárgyát ennek megfelelően GCSF PEG-származékainak új osztálya képezi. A találmány szerinti konjugátum amid kapcsolómolekulát tartalmaz, mint ahogy az alábbiakban feltárjuk.

A módosítatlan GCSF-hez (azaz PEG-et nem tartalmazó GCSF-hez) hasonlítva a konjugátum megnövekedett keringési féléletidővel és plazma tartózkodási idővel, csökkent kiürüléssel, és megnövekedett *in vivo* granulopoiitikus aktivitással rendelkezik. Ezenfelül PEG-GCSF konjugátumokkal összehasonlítva a találmány szerinti konjugátumnak kiváló a granulopoiitikus aktivitása. Más PEG-GCSF konjugátumokat tár fel az EP 0 335 423. számú európai közzétételi irat, az EP 0 401 384. számú európai közzétételi irat, Niven és mtsai., mint fent. Azonban a találmány szerinti konjugátum szerkezete eltér ezektől a konjugátumoktól, és kiváló tulajdonságokkal rendelkezik, különösen hosszan tartó, magas granulopoiitikus aktivitást mutat *in vivo* alacsony adagolás mellett.

A találmány szerinti előnyös GCSF GCSF-mutein, amelynek tulajdonságai egyenértékűek, vagy jobbak a natív GCSF-hez képest, és azonosak az alkalmazásai. A muteinnek meg- egyezik az aminosav-szekvenciája a natív GCSF-fel, kivéve

az 1, 3, 4, 5 és 17. aminosavhelyeket, ahol a natív GCSF aminosavai helyett a mutein sorrendben Ala, Thr, Tyr, Arg és Ser aminosavakat tartalmaz (GCSF-mutein, 1. ábra). Ezt a muteint az 5 214 132. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat tárja fel, amely hivatkozás útján a kitanítás részét képezi.

A találmány szerinti fiziológiásan aktív GCSF-konjugátum szerkezetét az I. általános képlettel adjuk meg.



A találmány tárgyát képezik az igényelt konjugátumokat tartalmazó készítmények is, ahol m és n értéke különböző egész szám lehet a készítményben lévő konjugátumokban.

A találmány szerinti konjugátum alkalmazásai megegyeznek a GCSF-éivel. A találmány szerinti konjugátum előnyösen alkalmas olyan betegek kezelésére, akiknek a granulocitáit kemoterápia kimerítette, vagy csontvelő-átültetést megelőző lépésként, ugyanolyan módon, mint ahogyan a GCSF-t alkalmazzák ezen állapotok kezelésére. Azonban a találmány szerinti konjugátum javított tulajdonságokkal rendelkezik, köztük kiváló stabilitás, nagyobb oldhatóság, megnövelt keringési féléletidő és plazmában való tartózkodási idő.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leíráshoz tartozó ábrákat:

Az 1. ábrán a GCSF-mutein elsődleges szerkezetét mutatjuk be. A bemutatott GCSF-mutein a vad típusú ember GCSF-től az 1, 3, 4, 5 és 17. aminosavhelyeken különbözik,

ahol a natív GCSF aminosavai helyett a mutein sorrendben Ala, Thr, Tyr, Arg és Ser aminosavakat tartalmaz.

A 2. ábrán pegiláló reagenseket mutatunk be.

A 3. ábrán 20 kDa molekulatömegű PEG-gel módosított és módosítatlan GCSF-mutein elválasztását mutatjuk be egy tipikus PEG-reakcióelegy elúciós profiljával.

Oszlop: 1-2 ml *Fractogel*® EMD 50, 650S

Ekvibrációs puffer: 10 mM ammónium-acetát, pH = 4,5

1. elúciós puffer: 0,15 M NaCl ekvibrációs pufferben

2. elúciós puffer: 0,5 M NaCl ekvibrációs pufferben.

A 4. ábrán PEG-GCSF konjugátum aktivitását mutatjuk be 5 nappal egyetlen injektálás után. Nőstény C57BL/6J egereket szubkután oltottunk 25,2 µg pegilált GCSF-konjugátummal; a beadást követő ötödik napon vénás vérmintát vettünk a retroorbitális szinuszból. Coulter hematológiai és leukocita differenciális elemzéseket hajtottunk végre; a kapott neutrofil-számot standardizáltuk minden kísérletben. Csoportonként 4 egér adatainak átlag ± szórását mutatjuk be.

Az 5. ábrán a PMN-szám növekedését mutatjuk be a PEG tömegének (MW, kDa-ban) függvényében amid- és urea-kapcsolt GCSF-mutein-PEG konjugátumokban. SPA reagenssel készített konjugátumokra, $PMN=0,277MW+3,95$. Urea reagenssel készített konjugátumokra, $PMN=0,152MW+2,74$.

A 6. ábrán PEG-GCSF konjugátum aktivitását mutatjuk be 7 nappal egyetlen injektálás után. Nőstény C57BL/6J egereket szubkután oltottunk 25,2 µg pegilált GCSF-konjugátummal; a beadást követő hetedik napon vérmintát vettünk a vénás retroorbitális szinuszból. Coulter hematológiai és leu-

kocita differenciális elemzéseket hajtottunk végre; a kapott neutrofil-számot standardizáltuk minden kísérletben. Csoportonként 4 egér adatainak átlag $\pm$ szórását mutatjuk be.

A 7. ábrán egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárást mutatunk be.

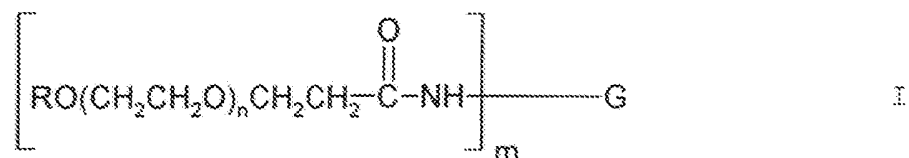
A 8. ábrán egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárást mutatunk be.

A 9. ábrán egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárást mutatunk be.

A 10. ábrán egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárást mutatunk be.

A 11. ábrán egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárást mutatunk be.

Az igényelt találmány fiziológiásan aktív GCSF-konjugátum, amelynek szerkezetét az I. általános képlettel adjuk meg.



ahol G jelentése granulocita kolónia-stimuláló faktor mínusz azok az amino-csoportok, amelyek részt vesznek az amid-kötések kialakításában a polietilén-glikol-molekulákkal az I. általános képlettel megadott módon, R jelentése kis alkil-csoport, n értéke egész szám 420 és 550 között, és m értéke egész szám 1 és 5 között.

Az n és m számokat úgy választjuk meg, hogy a kapott, I. általános képlet szerinti konjugátum fiziológiás aktivitása a módosítatlan GCSF-ével összemérhető legyen, amely aktivitás ugyanakkora, több, vagy törtrészt képviselheti a módosítatlan GCSF megfelelő aktivitásának. n jelentése az etilén-oxid maradékok száma a PEG-egységben. Egyetlen OCH_2CH_2 PEG-alegység molekulatömege körülbelül 44 Dalton. m jelentése a GCSF-molekulához kapcsolt PEG-egységek száma. A találmány szerinti konjugátum egy, kettő, három, négy, öt vagy hat PEG-egységet tartalmazhat GCSF-molekulánként. Ezáltal a konjugátum molekulatömege (a GCSF molekulatömegén kívül) n és m értékétől függ.

n értéke 420 és 550 között lehet, olyan konjugátumot eredményezve, amelyben minden egyes PEG-egység átlagos molekulatömege körülbelül 18 kDa-tól körülbelül 25 kDa-ig terjedhet. Előnyösen n értéke 450 és 490 között van, olyan konjugátumot eredményezve, amelyben minden egyes PEG-egység átlagos molekulatömege körülbelül 20 kDa. m értéke 1, 2, 3, 4 vagy 5 lehet. Előnyös érték 1-4, és m különösen előnyös értéke 2. A találmány szerinti konjugátum PEG részének molekulatömeg tartománya körülbelül 18 kDa-tól ($n=420$, $m=1$) körülbelül 125 kDa-ig ($n=550$, $m=5$) terjed. Amikor n értéke 420 és 550 között van, és m értéke egész szám 1 és 4 között, a találmány szerinti konjugátum PEG részének molekulatömeg tartománya körülbelül 18 kDa-tól ($n=420$, $m=1$) körülbelül 97 kDa-ig ($n=550$, $m=4$) terjed. Egy „körülbelül” adott érték alatt azt értjük, hogy az az adott szám ésszerű

tartományán belül van hagyományos analitikai módszerekkel meghatározva.

Egy előnyös konjugátumban n értéke 450 és 490 között van, és m értéke 1-4, amely esetben a konjugátum PEG részének molekulatömeg tartománya körülbelül 20 kDa-tól ($n=450$, $m=1$) körülbelül 86 kDa-ig ($n=490$, $m=4$) terjed. Egy másik előnyös megvalósítási mód szerint n értéke 420 és 550 között van, és m értéke 2, amely esetben a konjugátum PEG részének molekulatömeg tartománya körülbelül 37 kDa-tól ($n=420$) körülbelül 48 kDa-ig ($n=550$) terjed. Egy különösen előnyös konjugátumban n értéke 450 és 490 között van, és m értéke 2, amely esetben a konjugátum PEG részének molekulatömeg tartománya körülbelül 40 kDa-tól ($n=450$) körülbelül 43 kDa-ig ($n=490$) terjed.

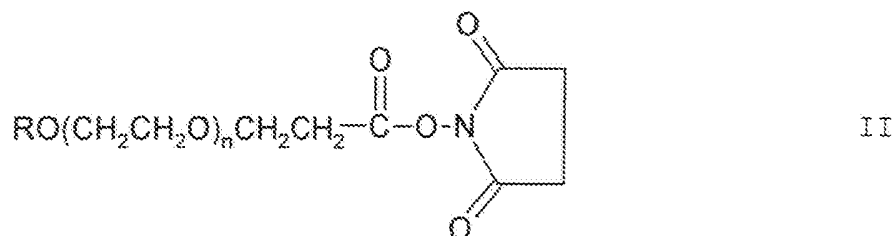
R jelentése lehet kis alkil-csoport, ami alatt olyan alkil-csoportot értünk, amely 1-6 szénatomot tartalmaz, mint például metil, etil, izopropil, stb. Elágazó alkil-csoportok is ideértendők. Egy előnyös alkil-csoport a metil-csoport.

GCSF alatt a természetes vagy rekombináns fehérjét értjük, előnyösen emberit, amelyet bármilyen hagyományos forrásból, mint például szövetekből, fehérje-szintézisből, természetes vagy rekombináns sejtek sejttenyészetéből nyerünk. Bármilyen GCSF aktivitású fehérje, mint például muteinek vagy másképpen módosított fehérjék ideértendők. GCSF kinyerése és izolálása természetes vagy rekombináns forrásból jól ismert (lásd például a 4 810 643. és 5 532 341. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi

iratokat, amelyek hivatkozás útján a kitanítás részét képezik). Előnyös GCSF-konjugátum az 5 214 132. számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat szerinti GCSF-muteinnel való konjugátum.

Az I. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátumnak van GCSF aktivitása, ami alatt bármilyen ismert GCSF aktivitásnak bármilyen töredékét vagy többszörösét értjük, a szakirodalomban ismert különféle vizsgálati eljárások szerint meghatározva. A találmány szerinti konjugátumnak előnyösen olyan GCSF aktivitása van, amit a PMN-szám növelésére való képesség mutat. Ez a GCSF egy ismert aktivitása. A konjugátum ilyen aktivitását a szakirodalomban jól ismert vizsgálati eljárásokkal határozhatjuk meg, például az alább bemutatottakkal [lásd még: Asano és mtsai., Jpn. Pharmacol. Ther. 19, 2767-2773. old. (1991); Yamasaki és mtsai., J. Biochem. 115, 814-819. old. (1994); és Neben és mtsai., Blood 81, 1960. old. (1993)].

Az I. általános képlettel megadott konjugátumot a GCSF kovalens kapcsolásával készítjük a II. általános képlettel megadott szukcínimidil-propionsav (SPA) reagenssel.



A II. általános képlettel megadott reagenst hagyományos módszerekkel állíthatjuk elő, ismert eljárásokkal (lásd az 5 672 662. számú amerikai egyesült államokbeli

szabadalmi iratot, amelynek tartalma hivatkozás útján a ki-tanítás részét képezi). n jelentése ugyanaz, mint ami az I. általános képletben fent, és a kívánt molekulatömegű konjugátum készítéséhez megfelelően választjuk meg. Azon reagensek előnyösek, amelyekben n értéke 450 és 490 között van ($MW=20$ kDa). Más molekulatömegek is elérhetők, a II. általános képlettel megadott reagens kiindulási anyagaként alkalmazott PEG-alkohol n értékének hagyományos módszerekkel történő változtatásával. A II. általános képlettel megadott SPA reagens 5, 10, 15 és 20 kDa molekulatömeggel beszerezhető a Shearwater Polymers Inc.-től (Huntsville, Alabama). A II. általános képlettel megadott reagenst hagyományos eljárásokkal konjugálhatjuk GCSF-hez. A kapcsolás amid-kötésen keresztül történik. Közelebbről, a II. általános képlettel megadott reagens elsősorban a GCSF egy vagy több primer amino-csoportjával (például N-terminális és lizin-oldalláncok) reagál, amid-kötést képezve a GCSF és a PEG polimergerince között. Az I. általános képletben szereplő NH-csoport a GCSF ezen primer amino-csoportjainak a származéka, amelyek a II. általános képlettel megadott reagenssel reagálnak amid-csoportot képezve. A II. általános képlettel megadott reagens kisebb mértékben reagálhat a GCSF 66. aminosavhelyén lévő szerin-oldallánc hidroxil-csoportjával is, észter-kötést képezve a GCSF és a PEG polimergerince között. A reakciókörülmények hagyományosak a szakember számára, és az alábbiakban részletesen megadjuk azokat.

A reagens GCSF-hez való kapcsolását hagyományos eljárásokkal valósíthatjuk meg. Bármilyen kiválasztott molekulatömegű, találmány szerinti PEG-et alkalmazhatunk (n). A reakciót például oldatban hajthatjuk végre, pH 5 és 10 között, 4°C és szobahőmérséklet között, 30 perc és 20 óra közötti időtartamban, 4:1 és 30:1 közötti reagens:fehérje molarányt alkalmazva. A reakció-körülményeket úgy választhatjuk meg, hogy a reakció elsősorban a kívánt mértékű helyettesítést eredményezze. Általában az alacsony hőmérséklet, alacsony pH (például pH = 5), és rövid reakcióidő a kapcsolt PEG-ek számának csökkentésére irányul (kisebb m). Magas hőmérséklet, semleges vagy magas pH (például pH ≥ 7), és hosszabb reakcióidő a kapcsolt PEG-ek számát növeleli (nagyobb m). Például az 5 kDa-os II. általános képlettel megadott reagens pH = 7,3-on és 30:1 reagens:fehérje arány mellett, 4°C-on és 30 perc reakcióidő alatt elsősorban mono-PEG konjugátumot eredményezett; 4°C-os hőmérséklet és 4 óra reakcióidő elsősorban di-PEG konjugátumot eredményezett; és szobahőmérséklet és 4 óra reakcióidő elsősorban tri-PEG konjugátumot eredményezett. A reakciót a reakcióelegy savanyításával és -20°C-on való lefagyasztással állítjuk le. Általában 7 és 7,5 közötti pH és 4:1 és 6:1 közötti molarány előnyös.

Tisztítási eljárások, mint például kationcserélő kromatográfia alkalmazhatók a konjugátumok töltéskülönbség szerinti elválasztására, ami hatásosan elválasztja a konjugátumokat különböző molekulatömegük szerint. Például a mintát felvihetjük kationcserélő oszlopra, és azután mos-

hatjuk körülbelül 20 mM nátrium-acetáttal, pH-4, és azután eluálhatjuk NaCl (0,5 M) lineáris pufferelt gradiensevel, pH 3,5-5 között, előnyösen pH-4,5-ön. A kationcserélő kromatográfiával kapott frakciók tartalmát molekulatömeg alapján azonosíthatjuk hagyományos eljárások alkalmazásával, mint például tömegspektroszkópiával, SDS-PAGE-val, vagy más, molekulák molekulatömeg szerinti elválasztására ismert eljárásokkal. Ezután megfelelő módon azonosítjuk az I. általános képlettel megadott konjugátumot tartalmazó frakciót a kívánt számú (m) kapcsolt PEG-gel, megtisztítjuk a módosítatlan GCSF-től és más számú PEG-et tartalmazó konjugátumoktól.

A találmány tárgyát képezik különböző m értékű konjugátumokat specifikus arányban tartalmazó készítmények is. A találmány szerinti előnyös készítmény konjugátumok keveréke, ahol m=1, 2, 3 és 4. Azon konjugátumok aránya, ahol m=1, 18-25%, azon konjugátumok aránya, ahol m=2, 50-66%, azon konjugátumok aránya, ahol m=3, 12-16%, és azon konjugátumok aránya, ahol m=4, 5%-ig terjed. Ilyen készítményt a pegiláló reagens és GCSF 4-6:1 arányú (reagens-felesleg) reagáltatásával készítünk. A reakciót 4-8°C-on 20 órán át 7,5 körüli pH-n engedjük folyni. A reakció végén ecetsavat adunk a reakcióelegyhez. Ezután a konjugátumot megtisztítjuk a megmaradt módosítatlan GCSF-től, a pegiláló reagens feleslegétől és a reakció alatt jelenlévő egyéb szennyezésektől és pufferkomponensektől. A pegilált fehérje mellett N-hidroxiszukcinimid és polietilén-glikol-karboxilsav keletkezik melléktermékként.

Az alábbi példák a feltárt találmány illusztrálását szolgálják, és nem korlátozzák azt semmilyen módon. Ezekben a példákban GCSF-muteint alkalmazunk. GCSF más fajtái szintén konjugálhatók PEG-gel a szemléltetett eljárásokkal.

1. példa

Pegiláló reagensek:

1. GABA amid-kapcsoló-molekula (P-6GA-1, P-12GA-1): A GABA-amid-kapcsoló reagensek 2 PEG szálat tartalmaznak, akár 6, akár 12 kDa molekulatömeggel. A szerkezetüket a 2-A ábrán mutatjuk be.

2. Amid-kapcsoló-molekula (P-5am-1, P-10am-1): 5 és 10 kDa-os amid-kapcsoló-molekulákat állítottunk elő. A szerkezetüket a 2-B ábrán mutatjuk be.

3. Amid-kapcsoló-molekula: Ezen reagens kereskedelmi forgalomban kapható szukcinimidil-propionsav (SPA) 5, 10, 15 és 20 kDa-os PEG-molekulákkal készítve, és az általános szerkezetüket a 2-C ábrán mutatjuk be.

4. Urea-kapcsoló-molekula: Ezen reagenst 5, 10 és 25 kDa-os PEG-molekulákkal készítettük el, és tipikus szerkezetüket a 2-D ábrán mutatjuk be.

5. Uretán-kapcsoló-molekula: 10 és 20 kDa-os uretán-kapcsoló-molekulát készítettünk, és a szerkezetüket a 2-E ábrán mutatjuk be.

6. Uretán-kapcsoló-molekula: Mint ahogy a 2-G ábrán bemutatott, 36 kDa-os kereskedelmi forgalomban kapható reagens szerkezete mutatja, a PEG-reagens egyik végén t-butil-

csoport található. Ezen reagensnek volt a legnagyobb a példában alkalmazott PEG-ek között a molekulatömege.

7. Tiouretán-kapcsoló-molekula: Ezen pegiláló reagens szerkezetét a 2-F ábrán mutatjuk be. A reagensben alkalmazott PEG molekulatömege 20 kDa volt.

Az alábbi reagenseket a Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan) biztosította: G-CSF mutein, GCSF-muteinnek jelölve. A GCSF-mutein elágazó metoxi-polietilénglikol (m-PEG) reagenssel volt konjugálva, amely reagens két, 6 vagy 12 kDa-os m-PEG láncot tartalmazott (PEG-GABA-NHS, lásd 2-A ábra). A GCSF-mutein 5 és 10 kDa-os lineáris, észter/amid m-PEG reagenssel volt konjugálva (lásd 2-B ábra). Az m-PEG-szukcinimidil-propionsav-NHS (PEG-SPA) reagenst, 5, 10, 15 és 20 kDa molekulatömeggel a Shearwater Polymers cégtől (Huntsville, Alabama, lásd 2-C ábra) vásároltuk. Az alábbi pegiláló reagenseket a Hoffmann-La Roche, Inc. cégnél készítették: m-PEG-urea-kapcsoló-molekula (5, 10 és 25 kDa, lásd 2-D ábra), m-PEG-uretán-kapcsoló-molekula (10 és 20 kDa, lásd 2-E ábra), m-PEG-tiouretán-kapcsoló-molekula (10 és 20 kDa, lásd 2-F ábra). A t-butil-m-PEG-uretán-kapcsoló-molekulát 36 kDa-os átlagos molekulatömeggel a DDI Pharmaceuticals, Inc. cégtől (Mountainview, CA, lásd 2-G ábra) szereztük be.

Pegilálási reakciók

A pegilálási reakciót befolyásoló tényezők az alábbiak: 1) pH, 2) hőmérséklet, 3) reakcióidő, 4) fehérje és PEG molaránya, és 5) fehérje-koncentráció. Egy vagy több tényező szabályozásával irányíthatjuk a reakció kimenetelét túl-

nyomóan mono-, di-, tri- stb. PEG konjugátumok előállítására. Például a reakció-körülmények a Shearwater Polymer PEG-5000-N-hidroxi-szukcinimid reagenssel az alábbiak voltak: 1) pH=7,3, 2) 4°C mono- és di-PEG-hez, szobahőmérséklet tri-PEG-hez, 3) reakcióidő mono-PEG-hez 30 perc, di- és tri-PEG-hez 4 óra, és 4) fehérje és reagens molaránya 1:30. A kívánt PEG-fajták előállításához optimális reakció-körülményeket egyedileg határoztuk meg minden reagenshez. Ezeket az 1. táblázatban mutatjuk be. A reakciót savanyítással és -20°C-on való fagyasztással állítottuk le.

Módosított és szabad GCSF-mutein elválasztása a reakcióelegyből [Szulfopropil (SP) kationcserlő kromatográfiával]

A körülbelül 5 mg fehérjét tartalmazó reakcióelegyet 10-20-szorosra hígítottuk vízzel, és a pH-t 4,5-re állítottuk be jégecettel. A hígított mintát ezután előzetesen elkészített 1-2 ml-es *Fractogel*® EMD SO_3 650S (EM separations, Gibbstown, New Jersey) oszlopra vittük fel, amelyet 10 mM ammónium-acetát, pH = 4,5 pufferrel ekvilibráltunk. A fel nem használt reagens és a melléktermékeket eltávolítottuk az átfolyóval. A módosított GCSF-muteint lépcsős gradienssel eluáltuk 0,15 M NaCl-dal az ekvilibrációs pufferben. Az oszlopon maradt módosítatlan GCSF-muteint lépcsősen eluáltuk 0,5 M NaCl-dal az ekvilibrációs pufferben. Az elválasztott GCSF-mutein-PEG konjugátumot sterilén szűrtük 0,2 μ m-es szűrővel, és fagyasztva tároltuk -20°C-on.

GCSF-mutein-PEG konjugátumok jellemzése

Fehérje-meghatározás

A tisztított GCSF-mutein-PEG konjugátumok fehérje-koncentrációját 1 mg/ml-es oldatra 0,86 A_{280} -érték alkalmazásával határoztuk meg.

SDS-PAGE elemzés

Az elemzést 12 és 15%-os poliakrilamid gélek, vagy 8-16%-os gradiens gél alkalmazásával végeztük redukáló körülmények között, Laemmli [Nature 227, 680-685. old. (1970)] leírása szerint.

Százalékos összetétel meghatározása

Az egyes fajták (mono-, di-, tri-, stb.) százalékos összetételét a különböző GCSF-mutein-PEG konjugátum reakcióelegyekben Coomassie Blue-val festett SDS-PAGE gélek denzitometriás mérésével határoztuk meg (lásd 2. táblázat).

PEG tömegének meghatározása GCSF-mutein-PEG konjugátumokban

A beépített PEG totál tömegét a különböző preparátumokban a PEG átlagos molekulatömegéből, az egyes PEG-konjugátumok (mono-, di-, stb.) elektroforetikus mobilitáson alapuló azonosításából, a kapcsolt PEG-molekulák számából, és a Coomassie Blue-val festett SDS-PAGE gélek denzitometriás mérésén alapuló százalékos összetételből határoztuk meg. Egy adott preparátum totál PEG-tömege az egyedi PEG-tömegek összege. A egyedi PEG-tömeget az alábbi egyenlet szerint számítottuk:

PEG-tömeg = PEG-molekulatömeg x PEG-molekulák száma x % összetétel, ahol

PEG-molekulatömeg = 5, 10, 20 kDa, stb.

PEG-molekulák száma = 1, 2, 3 a mono-, di-, tri-PEG-re.

Tömegspektrometriát (MALDI-TOF) is alkalmaztunk a totál PEG-tömeg meghatározására. Ebben az esetben a tömegspektrum lehetővé tette a az egyedi PEG-konjugátumok azonosítását, és molekulatömegük meghatározását. Az egyedi PEG-konjugátumok PEG-molekulatömege az egyedi PEG-konjugátum molekulatömege mínusz GCSF-mutein molekulatömege (18,9 kDa). Ezeket az értékeket megszoroztuk a százalékos összetétellel, ami az egyedi PEG-tömeget eredményezte; ezek összege a totál PEG-tömeg.

Mindkét eljárást alkalmaztuk a különböző PEG-preparátumok PEG-tömegének meghatározására. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

Endotoxin szint meghatározása

Az endotoxin szintet a LAL-eljárás alkalmazásával határoztuk meg, a gyártó (Associates of Cape Cod, Inc., Woods Hople, Massachusetts) utasításai szerint.

Bioaktivitások

Az *in vitro* biológiai vizsgálati eljárást M-NFS-60 sejteken, és az *in vivo* vizsgálati eljárást nőstény C567BL/6J egereken végeztük, korábbi leírások szerint [lásd Asano és mtsai., Jpn. Pharmacol. Ther. 19, 2767-2773. old. (1991)].

Eredmények és diszkusszió

Pegilálási reakciók

Általában az eredmények azt mutatják, hogy a kevésbé reaktív reagensek, mint például az urea-kapcsoló-molekula, magasabb pH-t, hőmérsékletet, és fehérje:reagens mólarányt igényelnek a kívánt mértékű konjugálás eléréséhez, valamint hosszabb reakcióidőt (lásd 1. és 2. táblázat).

Módosított és szabad GCSF-mutein elválasztása a reakcióelegyből

Egy tipikus eluciós profilt mutatunk be a 4. ábrán. A kationcserélő kromatográfián kívül további lépések, mint például gél-permeációs kromatográfia lehetnek szükségesek nyomnyi szennyezések és endotoxinok eltávolításához, és a puffer lecserélésének végrehajtására az végtermék tárolásához. Az erős kationcserélő eljárást felnagyítottuk 30 mg-os szintre a 20 kDa-os SPA (amid) és 20 kDa-os uretán konjugátumokhoz. Ezzel az eljárással majdnem kvantitatív kitermelést kaptunk.

Százalékos összetétel és PEG-tömeg

A százalékos összetétel és PEG-tömeg eredményeket a 2. táblázatban foglaljuk össze. Tapasztalataink szerint a nagyobb molekulatömegű PEG-konjugátumok (például 20 kDa SPA di-PEG, és 12 kDa GABA) esetében a reakcióelegy százalékos összetételének meghatározására a PEG-fajta azonosítása elektroforetikus mobilitás alapján nem nagyon megbízható. A PEG-tömeg meghatározásához, és a nagyobb molekulatömegű és nagyon helyettesített PEG-konjugátumok azonosítása érdekében SDS-PAGE, SP-HPLC és MALDI-TOF elemzések kombinációjára

van szükség. Azonban a monopegilált, és kis molekulatömegű PEG-reagensekből (például 5 kDa) származó PEG-konjugátumokat viszonylag pontosan azonosíthatjuk a megfelelő SDS-PAGE profilokból.

Endotoxin szint

A LAL-eljárás alkalmazásával 1 EU/mg-nál kevesebb endotoxint detektáltunk minden PEG-konjugátumban, kivéve egy uretán reagenssel készítettet. Ezen PEG-konjugátumban csak hígítás után detektáltunk endotoxint. Megerősítettük, hogy ez nem a hígítás során bekövetkező szennyezés következménye, ezáltal az ebben a mintában lévő valamilyen ismeretlen anyag okozhatta a gátlást a LAL vizsgálati eljárásban magasabb fehérje-koncentrációknál. A minta hígításával a gátló hatású anyagot is hígítottuk, és pozitív endotoxin eredményt figyeltünk meg.

Bioaktivitás

Az összes GCSF-mutein-PEG konjugátum *in vitro* és *in vivo* bioaktivitását feltüntetjük a 2. táblázatban. Általában fordított összefüggést figyeltünk meg az *in vitro* aktivitás és a helyettesítés mértéke, valamint a PEG molekulatömege között. Ezzel ellentétben, az *in vivo* aktivitás javulását figyeltük meg a helyettesített PEG molekulatömegének növekedésével. Ezt mások is megfigyelték [Satako-Ishikawa és mtsai., Cell Struct. Funct. 17, 157-160. old. (1992)]. Javaslatunk szerint, a PEG-molekulák kémiai kapcsolása a GCSF-mutein polipeptid gerincéhez valamilyen konformációs változást hoz létre, ami hátrányosan érinti a receptor/ligandum kölcsönhatásokat, ezáltal csökkenti a köté-

si affinitást. Ezenfelül a viszonylag rövid inkubációs idő az *in vitro* vizsgálati eljárás során valószínűleg nem elegendő a csúcsaktivitás eléréséhez. Másrészt, az *in vivo* vizsgálati eljárás egerekben sokkal hosszabb (napokig tart), és napokkal a drog beadása után ér véget. Ez a hosszabb inkubációs idő, a GCSF-mutein-PEG megnövekedett keringési féléletidejével kombinálva kompenzál bármilyen, pegilálás következtében bekövetkező kötési affinitás csökkenést. A végeredmény a maximális *in vivo* bioaktivitás megvalósulása. Egy másik hipotézis az, hogy a GCSF-mutein-PEG prodrogként viselkedik, amikor az egérbe injektáljuk. Ebben a helyzetben a GCSF-mutein-PEG PEG-molekularésze valamilyen módon folyamatosan levágódik, a szabad GCSF-mutein kis mennyiségének fenntartott felszabadulását eredményezve, és ez felelős az *in vivo* aktivitás fennmaradásáért és javulásáért. Azonban a prodrog-hipotézis nem magyarázza a megfigyelt alapvonal-aktivitást 7 nappal a kezdeti adagolás után. A prodrog-mechanizmus valószínűtlen amiatt, mert az amid-kötés a fehérje és a PEG között stabil és nem egykönnyen hasítható.

A 15 tanulmányozott GCSF-mutein-PEG közül a P-12GA-1, 20 kDa SPA, 20 kDa uretán és 36 kDa uretán *in vivo* aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a többi preparátumé (lásd 4. ábra és 2. táblázat).

Általában, a PEG-molekula molekulatömege és a megnövelt *in vivo* aktivitás között egyenes összefüggést figyelünk meg. Ezt mutatjuk be az 5. ábrán, ahol a PMN-szám nö-

vekedését ábrázoljuk a totál PEG-tömeg függvényében amid- (SPA) és urea-kapcsolt PEG konjugátumoknál.

GCSF-mutein-PEG konjugátumok kiválasztása és jellemzőik

A konjugációs kémia, biológiai tulajdonságok, és drog-fejlesztési szempontok gondos értékelése után a 15 konjugátum közül hármat választottunk ki további értékelésre. Ezek a 1) P-12GA-1, 2) 20 kDa SPA, és 3) 20 kDa uretán. A 20 kDa SPA-eredetű, az SP-tisztított reakcióelegyben jelenlevő mono-, di- és tri-PEG konjugátumokat egymás mellett összehasonlítottuk, ami azt mutatta, hogy mindhárom magas granulopoietikus aktivitást tartott fenn nőstény C57BL/6J egerekben 5 napon át egyetlen 25,2 µg dózissal (3. táblázat és 4. ábra). Ezzel ellentétben a módosítatlan GCSF-mutein napi dózisa volt szükséges hasonló aktivitások fenntartására (adatokat nem közlünk). Két eset kivételével (20 kDa SPA és p-12GA-1) az *in vivo* aktivitás normál szintre tért vissza 7 nappal az egerek kezdeti oltása után (6. ábra). Mind a 20 kDa SPA, mind a p-12GA-1 konjugátum megnövelt aktivitást mutatott az alacsonyabb, 8,4 µg-os dózisban, és visszatért a normál szintre 7 napon (lásd 3. táblázat). A százalékos összetételi adatok (3. táblázat) azt mutatják, hogy mind a 20 kDa SPA, mind a P-12GA-1 preparátum körülbelül 50% dimert tartalmaz, és a maradék 50% a monomer és trimer között oszlik meg. A 20 kDa uretán reagens túlnyomóan mono-PEG-et hoz létre a kísérleti körülmények között (lásd 3. táblázat). Az összes értékelt PEG-konjugátum *in vitro* aktivitása, köztük a túlnyomóan monomer uretán-származéké, ál-

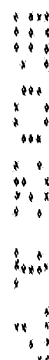
talánosan fordított összefüggést követ a helyettesítés mértékével, valamint a PEG molekulatömegével. Az értékelte PEG-konjugátumok *in vivo* aktivitása egyenes összefüggést mutatott a PEG molekulatömegével az vizsgált molekulatömeg-tartományban (5. ábra).

Következtetés

A 15 vizsgált GCSF-mutein-PEG konjugátum közül a P-12GA-1, a 20 kDa SPA és a 20 kDa uretán kapcsoló-molekulás preparátum jó *in vivo* aktivitási profilt mutatott. A 20 kDa GCSF-mutein-PEG mutatta a legjobb általános tulajdonságokat, beleértve az termelés gazdaságosságát is.

1. Táblázat Különböző PEG-konjugátumok előállításához alkalmazott reakció-körülmények

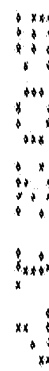
Molekulatömeg	Kémia	Reakció-körülmények			
		pH	Hőmérséklet	Idő	Mólarány
5 kDa	UREA	10	Szobahőmérséklet	1 óra	1:100
5 kDa	AMID	7,3	Szobahőmérséklet	4 óra	1:30
10 kDa	UREA	10	Szobahőmérséklet	1 óra	1:100
10 kDa	AMID	7,3	Szobahőmérséklet	4 óra	1:30
10 kDa	URETÁN	10	4°C	1 óra	1:30
15 kDa	AMID	7,3	Szobahőmérséklet	4 óra	1:30
20 kDa	AMID	7,3	Szobahőmérséklet	4 óra	1:30
20 kDa	THIOURETÁN	8	Szobahőmérséklet	17 óra	1:30
20 kDa	URETÁN	10	4°C	1 óra	1:30
25 kDa	UREA	10	Szobahőmérséklet	1 óra	1:100
36 kDa	URETÁN	8	4°C	6 óra	1:3



(b) 10 kDa	15,8	12,6	36,5	35	29050	10%	19,9	412+88
(c) 20 kDa	81,8	4	14,2	0	26800**	7%	25,83	656+52
(a) 36 kDa	50	50	0	0	54000	15%	25,05	888+132
Tiouretán								
(b) 20 kDa	70,8	12	17,3	0	28440	20%	21,85	494+71
GABA								
(b) 6 kDa	43,4	54,3	2,3	0	18100**	11%	29	598+117
(c) 12 kDa	36	47	17	0	46500**	3%	30,03	886+120

A %-os összetételt és a hozzáadott PEG tömegét Coomassie Blue-val festett SDS-PAGE denzitometriás mérésével (*) VAGY MALDI-TOF MS elemzéssel (**) számítottuk.

(a), (b), (c): mindegyik különböző biológiai vizsgálatot jelent; 5. napi PMN adatokat mutatunk



3. Táblázat A három alapmolekula összetétele, PEG-tömege, pegilált helyei és bioaktivitása

PEG-molekula	% -os összetétel*				PEG- tömeg (kDa) **	Aktivitások								
	mono	di	tri	oligo		M- NFS- 60	WBC				PMN (kontroll %-a)			
							5. nap		7. nap		5. nap		7. nap	
Hordozóeszköz (kontroll)						8,78		8,97		100		100		
ND-28: Egyetlen injekció, 25,2 µg						8,05		6,1		86		76		
ND-28: Napi injekció, 25,2 µg						26,5		24,58		1182		906		
							Adagolás							
							8,4	25,2	8,4	25,2	8,4	25,2	8,4	25,2
							µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg	µg
12 kDa GABA	36,0	47,0	17,0	0,0	46,5	3%	22,75	30,03	10,7	24,1	701	1064	140	556
20 kDa SPA	27,6	49,5	22,9	0,0	38,1	5%	13,58	21,63	7,5	15,45	519	978	103	447
20 kDa uretán	81,8	4,0	14,2	0,0	26,8	7%	8,35	17,43	6,78	7,93	222	729	74	119

Nőstény C57BL/6J egereknek 8,4 µg vagy 25,2 µg ND-28-at adtunk be naponta, vagy PEG-konjugátumot egyetlen dózisban.

Az 5. és 7. napon a kezdeti adagolás után vénás vérmintákat vettünk, és differenciális leukocita-elemzést végeztünk.

* Coomassie Blue-val festett SDS-PAGE denzitometriás mérésén alapul.

** MALDI-TOF MS-sel határoztuk meg.

2. példa

20 kDa-os PEG-gel konjugált rhG-CSF-mutein előállítás

A GCSF-mutein módosítását 20 kDa-os metoxi-PEG-szukcinimidil-propionsav (SPA) reagenssel az alábbiak szerint hajtottuk végre. A PEG-reagenst desztillált vízben feloldottuk körülbelül 200 mg/ml koncentrációban, és GCSF-mutein oldathoz (körülbelül 5 mg/ml) adtuk, 4:1 és 6:1 molarány között (reagensfelesleg). A reakciót 4 és 8°C között 20 órán keresztül pH = 7,5-ön engedték folyni. A reakció végén jégetet adtunk a reakció leállítására. A pegilált GCSF-muteint (másik jelölése PEGG) megtisztítottuk a maradék módosítatlan muteintól, felesleg PEG-reagenstől, és a reakció alatt jelenlévő egyéb szennyezésektől és pufferkomponensektől. A pegilált fehérje mellett N-hidroxiszukcinimid és polietilén-glikol-karboxilsav keletkezik melléktermékként.

A PEGG-et kationcserélő kromatográfiával tisztítottuk, melyet ultrafiltrálás követett. A mintát felvittük a kationcserélő oszlopot, és 20 mM nátrium-acetáttal, pH = 4,0

mostuk. Az elúció nátrium-klorid lineáris gradiensevel elválasztotta a PEGG-et a reakcióelegy minden más komponensétől. Ezt követően ultrafiltrálást/diafiltrálást alkalmaztunk a PEGG körülbelül 0,4 mg/ml-re való koncentrálására, és a puffer 20 mM nátrium-acetát, 50 mM nátrium-klorid, pH = 6,0 pufferre való cseréléséhez.

Öt, a fenti körülmények között végrehajtott pegilálási és tisztítási menetet elemeztünk kationcserélő kromatográfiával, és ezzel demonstráltuk a GCSF-mutein pegilálási reakciójának reprodukálhatóságát. A pegilálási reakció reprodukálhatónak bizonyult 2,5 g (végső PEGG hozam) mennyiségig az alábbi optimális körülmények között: 20 kDa-SPA-PEG:mutein molarány 4-6:1; pH ~7,5, 4°C, 20 óra. A PEGG-elegy átlagos százalékos összetétele az alábbi volt: 21,7% mono-PEGG (%RSD=6,6%), 60,3% di-PEGG (%RSD=6,6%), 15,1% tri-PEGG (%RSD=4,0%), és 2,9% tetra-PEGG (%RSD=26,1%), mint ahogy a 4. táblázatban bemutatjuk.

4. Táblázat Mono-, di-, tri- és tetra-PEGG relatív százalékos összetételének kationcserélő elemzése öt szintézis és tisztítási menetben

Menet szá- ma	Mono-PEGG (%RSD, 5 mé- rés)	Di-PEGG (%RSD, 5 mérés)	Tri-PEGG (%RSD, 5 mérés)	Tetra-PEGG (%RSD, 5 mérés)
1	21,9% (8,0)	60,3% (2,2)	15,1% (2,2)	2,7% (4,7)
2	27,5% (2,3)	54,4% (1,0)	15,7% (0,8)	2,4% (1,2)
3	18,2% (7,1)	65,5% (0,6)	14,3% (6,6)	2,0% (9,3)
4	21,7% (2,7)	60,1% (1,0)	14,8% (0,5)	3,5% (0,9)
5	19,2% (1,8)	61,3% (0,9)	15,7% (3,7)	3,8% (4,5)
Átlagolt Összetétel	21,7% (16,6)	60,3% (6,6)	15,1% (4,0)	2,9% (26,1)

3. példa

Perifériás vér őssejtek mobilizálása

Számos módszert fejlesztettek ki mind primitív őssejtek („stem cell”), mind elkötelezett prekurzorok mobilizálására csontvelőből, és keringő elősejtek („progenitor cell”) szaporítására perifériás vérben. Ezen stimulált sejtek képesek lehetnek korai és fenntartott beépülés közvetítésére, letális besugárzást és csontvelő- vagy őssejt-átültetést követően [Neben és mtsai., Blood 81, 1960. old. (1993)]. A perifériás vér őssejtek („peripheral blood stem cells”, PBSC) összetoborzása segítheti a hemopoietikus felgyógyulás megrövidítését kemoterápiával kiváltott csontvelő hipopláziás betegekben, vagy azokban, amelyek egyéb mieloablatív kezelésen mennek keresztül [Roberts és Metcalf, Experimental Hematology 22, 1156. old. (1994)]. Mind növekedési faktorokat, mind kemoterápiás drogokat alkalmaztak a mobilizálás stimulálására [Bodine, Experimental Hematology 23, 293. old. (1995)]. A PBSC stimulálását követően a mobilizált sejteket leukaferézissel összegyűjtik, és fagyasztva tárolják, amíg szükség nem lesz rájuk. A jelenlegi klinikai eljárások PBSC-koncentrátumok leukaferézissel való ismételt összegyűjtését írják elő szokásos nagy dózisú kemoterápiát (CHT) követően, és növekedési faktorok ismételt napi dózisát vagy folyamatos infúziót, néha két hétig is vagy tovább [Brugger és mtsai., Blood 79, 1193. old. (1992)]. Az alább leírt vizsgálatokat a PBSC mobilizálásának két egérmodelljében végeztük, az elsőt normál egérben, és a másodikat kemoterápiás modellben. A kísérletek demonstrálják a talál-

mány szerinti pegilált G-CSF-mutein (PEGG) megnövelt haté-
sságát összejték mobilizálására NEUPOGEN-nel (G-CSF)
összehasonlítva. A pegilált mutein felsőbbrendűségét szig-
nifikánsan csökkentett és hatásosabb adagolás mellett szín-
tén megalapoztuk.

Ezen vizsgálatok értékelték többféle növekedési fak-
torral *in vitro* stimulált, immobilizált értelen egér PBSC
szaporodási képességét hétnapos agarkolónia vizsgálati el-
járásban. A kolónia formáló képesség mellett teljes hemato-
lógiai profilt, és az abszolút neutrofil szám (ANC) értéke-
lését végeztük el az összes egér vérében. A szérumban G-CSF-
szinteket is meghatároztuk. A vizsgálati eljárás optimali-
zálását követően számos időfüggési kísérletet hajtottunk
végre, és megvizsgáltuk G-CSF magas és alacsony dózisát. A
kísérleti modellek G-CSF- és ciklofoszfamid (Cytosan)-
indukált immobilizációt, valamint CHT-t és citokint alkal-
mazó kombinált kezelést tartalmaztak.

Anyagok és eljárások: 6-10 hetes nőstény C57BL/6J ege-
reket (The Jackson Laboratory) alkalmaztunk minden kísér-
letben. Az egereket IP oltottuk a -1. napon 200 mg/kg
Cytosannal, vagy foszfát pufferelt sóoldat (PBS) hordozó-
val. A 0. napon az állatokat SC oltottuk 0,1 ml NEUPOGEN-
nel (G-CSF), PEGG-gel (20 kDa SPA-kapcsolt mutein, Lot
#P20W3), vagy 1% normál egérszérumot tartalmazó PBS hordo-
zóval. A Neupogent kapott egerek ugyanazon dózis napi in-
jekcióját kapták, míg az összes többi egér hordozót kapott.
A feláldozás napján perifériás vért vettünk az elaltatott
egerek retroorbitális szinuszából EDTA-t tartalmazó csövek-

be. Minden csoportból összeöntött teljes vér kis mennyiségét adtuk három párhuzamosban 35 mm²-es szövettenyésztő csészékhez, amelyek 1000 U/ml rekombináns egér (rm) Interleukin-3-at, 100 ng/ml rm őssejt faktort, és 1000 U/ml rm Interleukin-6-ot tartalmaztak, 1 ml össztérfogatú RPMI 1640-tápközegben, 15% magzati marhaszérummal és 0,35% Difco-agarral kiegészítve. A megszilárdult agartenyészeteket egy hétig 37°C-on inkubáltuk párasított, 5% CO₂-ot tartalmazó atmoszférában. A kolóniákat sztereomikroszkóp alatt sötétmezős megvilágítással számoltuk meg.

Eredmények: Az első bemutatott vizsgálatban normális egerek 25 µg/egér NEUPOGEN-t kaptak a 0-5. napon, vagy 25 µg/egér PEGG-et kaptak egyetlen dózisban a 0. napon. Egereket áldoztunk fel a 3-7. napokon. Mint ahogy a 7. ábrából láthatjuk, a kolónia-formálással demonstrált mobilizáció szignifikánsan növekedett a NEUPOGEN-oltott egerekben a 3. és 4. napon, de fokozatosan visszatért az alapszintre az 5. napra (az 5. napig tartó NEUPOGEN injekciók ellenére). A PEGG-gel oltott egerek ezzel ellentétben jobban megemelkedett kolóniaszámot mutattak, ami megmaradt telítési szinten 7 napon át.

A kemoterápiás modell paradigmája hasonló volt. A CHT-csoportokban lévő egerek Cytosan-injekciót kaptak a -1. napon. Néhány egér ezután csak hordozót kapott a következő napokon, míg mások kombinált kezelést kaptak, vagy NEUPOGEN napi injekciót a 0-5. napokon, vagy egyetlen PEGG-injekciót a 0. napon. A 8. ábrán láthatjuk, hogy a Cytosan-kezelt egerekben a 4. napon csúcs van, ami fokozatosan

visszatér az alapszintre a következő napokon. Mind a NEUPOGEN-, mind a PEGG-csoportokban a csúcs az 5. napon volt, nagyon megemelkedett kolóniaszámokkal. Azonban a Cytosan + PEGG értékek nagyon szignifikánsan emelkedettek maradtak a 6. és 7. napon, a Cytosan + NEUPOGEN csoportok szintje felett. A 9. ábrán a kombinációs kezelés szinergikus hatását mutatjuk be a Cytosan vagy G-CSF kezeléshez képest.

Egy második vizsgálatot mutatunk be a 10. és 11. ábrán. NEUPOGEN alacsonyabb, 3 µg/egér dózisát 10 egymás utáni napon napi injekcióban kapó normális egerek viszonylag alacsony szintű, „többfázisú” mobilizációt mutattak a vizsgált időszakon belül. PEGG egyetlen 3 µg/egér dóziséval injektált állatok megközelítőleg ötször akkora számú elősejtet mutattak a perifériás keringésben a 4. napra, bár ez az hatás egyszeri, robbanásszerű volt, ami lényegében lecsengett a 6. napra.

A Cytosan-oltott egerekben PEGG egyetlen 3 µg/egér dózisa durván NEUPOGEN 30 µg/egér dóziséval (10, napi 3 µg/egér dózis) egyenértékű PBSC-immobilizációt váltott ki (11. ábra). Mindkét csoport elősejt-mobilizációja az 5. napon volt csúcson, és a csúcsok nagysága is azonos volt. Az egyetlen különbség látszólag a NEUPOGEN kicsit tovább tartó elhúzódnó hatása volt. A CHT-modellben a kolóniák száma 4-10-szerese volt a normál egérmódelben lévőknek.

Ezen kísérletek demonstrálják a pegilált mutein két elkülönült potenciális előnyét a NEUPOGEN felett. Először, a PEGG nagyobb hatékonysága PBSC mobilizálására nyilvánvaló

a NEUPOGEN-nel összehasonlítva, mind normál, mind kemoterápiásan kezelt egerekben. Másodszor, a pegilált muteinről megmutattuk, hogy hatásosabb egerekben, mint a NEUPOGEN, kisebb és hatékonyabb adagolás alkalmazásával, mint a jelenleg alkalmazott klinikai termék.

SZEKVENCIALISTA

<210> 1
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (36)..(42)
 <220>
 <221> DISULFID
 <222> (64)..(74)
 <400> 1

Ala	Pro	Thr	Tyr	Arg	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys
1				5					10				15		
Ser	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln
				20				25					30		
Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val
				35				40					45		
Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys
				50				55				60			
Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser
65				70				75					80		
Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser
				85				90					95		
Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp
				100				105					110		

Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro

115

120

125

Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe

130

135

140

Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe

145

150

155

160

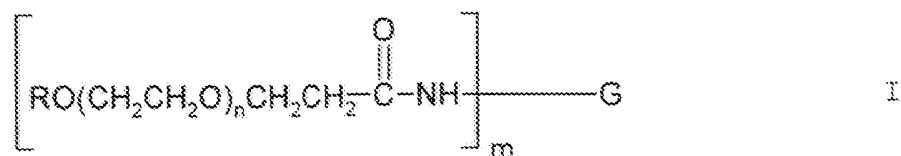
Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro

165

170

Szabadalmi igénypontok

1. Az 1. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátum,



ahol G jelentése granulocita kolónia-stimuláló faktor azon amino-csoportja vagy csoportjai nélkül, amelyek polietilén-glikol-molekulával amid-kötést alkotnak a konjugátumban; R jelentése kis alkil-csoport; n értéke egész szám 420 és 550 között; és m értéke egész szám 1 és 5 között.

2. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol R jelentése metil-csoport.

3. A 2. igénypont szerinti konjugátum, ahol n értéke 450 és 490 között van.

4. A 2. igénypont szerinti konjugátum, ahol m értéke egész szám 1 és 4 között.

5. A 4. igénypont szerinti konjugátum, ahol m értéke 2.

6. Az 2. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a granulocita kolónia-stimuláló faktor az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein.

7. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol n értéke 450 és 490 között van.

8. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, ahol m értéke egész szám 1 és 4 között.

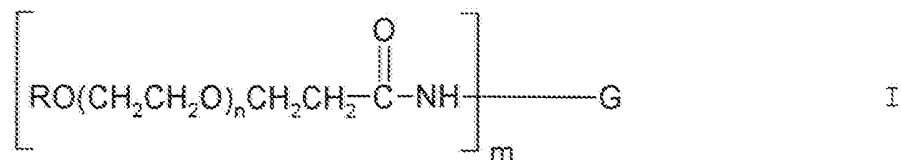
9. A 8. igénypont szerinti konjugátum, ahol m értéke 2.

10. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a granulocita kolónia-stimuláló faktor az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein.

11. Az 1. igénypont szerinti konjugátum, amelynek hosszabb keringési féléletideje és nagyobb *in vivo* granulopietikus aktivitása van, mint a megfelelő konjugálatlan granulocita kolónia-stimuláló faktornak.

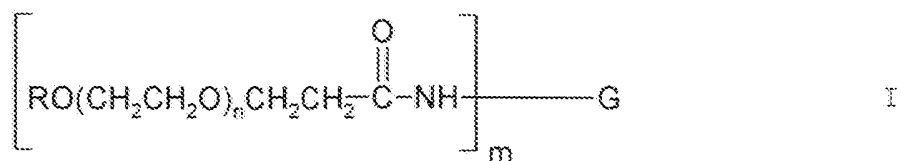
12. A 11. igénypont szerinti konjugátum, amelyben a granulocita kolónia-stimuláló faktor az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein.

13. Az I. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátum,



ahol R jelentése metil-csoport; n értéke egész szám 440 és 490 között; m értéke 2; és G jelentése az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein azon amino-csoportjai nélkül, amelyek polietilénglikol-molekulával amid-kötést alkotnak a konjugátumban.

14. Az I. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátumokat tartalmazó készítmény,



ahol G jelentése az összes konjugátumban granulocita

kolónia-stimuláló faktor azon aminos-csoportja vagy csoportjai nélkül, amelyek polietilénglikol-molekulával amidkötést alkotnak a konjugátumban; R jelentése az összes konjugátumban egymástól függetlenül kis alkil-csoport; n értéke az összes konjugátumban egymástól függetlenül egész szám 420 és 550 között; és m értéke az összes konjugátumban egymástól függetlenül egész szám 1 és 4 között; azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 1, 18-25%, azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 2, 50-66%, azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 3, 12-16%, és azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 4, 5%-ig terjed.

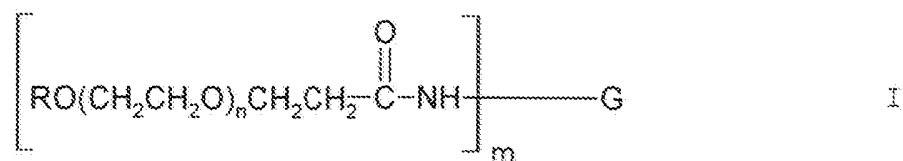
15. A 14. igénypont szerinti készítmény, ahol R jelentése az összes konjugátumban metil-csoport.

16. A 14. igénypont szerinti készítmény, ahol n értéke és R jelentése az összes konjugátumban ugyanaz.

17. A 14. igénypont szerinti készítmény, ahol n értéke 450 és 490 között van.

18. A 14. igénypont szerinti készítmény, amelyben a granulocita kolónia-stimuláló faktor az összes konjugátumban az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein.

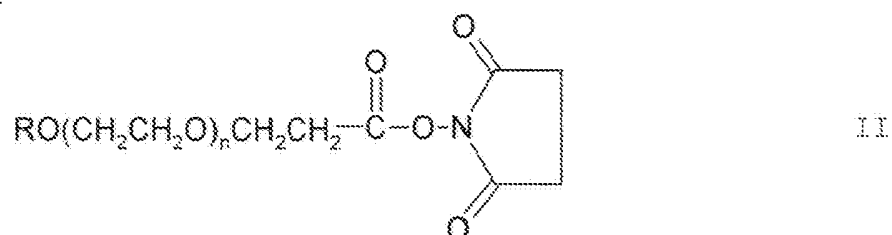
19. Az I. általános képlettel megadott fiziológiásan aktív konjugátumokat tartalmazó készítmény,



ahol R jelentése metil-csoport; n értéke az összes konjugátumban ugyanaz, és egész szám 450 és 490 között; G jelentése az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-mutein

azon amino-csoportjai nélkül, amelyek polietilén-glikol-molekulával amid-kötést alkotnak a konjugátumban; az összes konjugátumban m értéke egymástól függetlenül egész szám 1 és 4 között; azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 1, 18-25%, azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 2, 50-66%, azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 3, 12-16%, és azon konjugátumok aránya, ahol m értéke 4, 5%-ig terjed.

20. Eljárás a megfelelő konjugálatlan GCSF-nél hosszabb keringési féléletidejű és nagyobb *in vivo* granulopietikus aktivitású PEG-GCSF konjugátum előállítására, azzal jellemezve, hogy II. általános képlettel megadott reagenst



kovalensen kapcsolunk a GCSF-hez a konjugátum előállításakor.

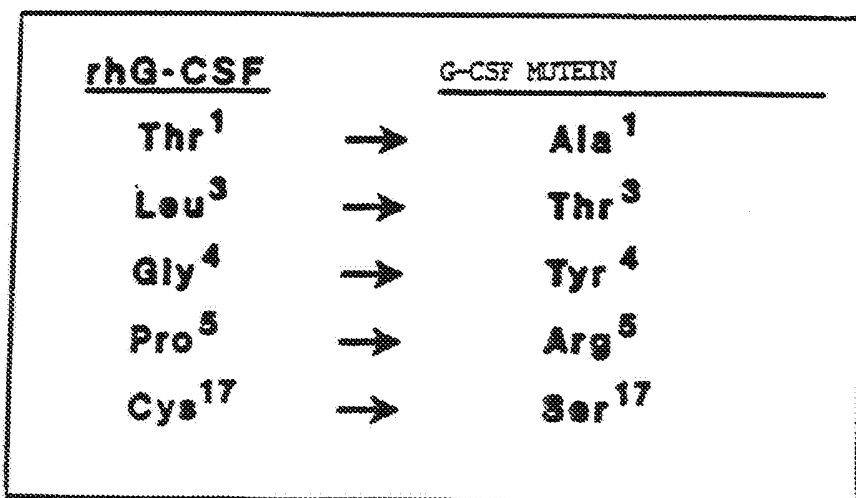
21. Az 20. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy GCSF-ként az 1. ábrán bemutatott szekvenciájú GCSF-muteint alkalmazunk.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Molnár Imre

szabadalmi ügyvivő

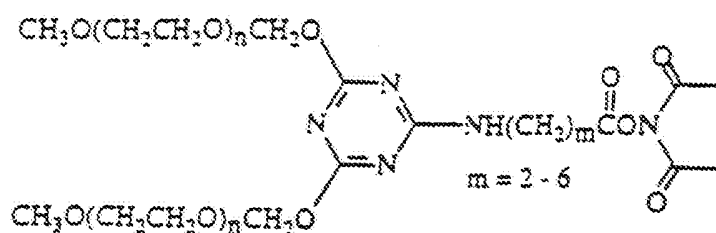


1. ábra

Pegiláló reagensek

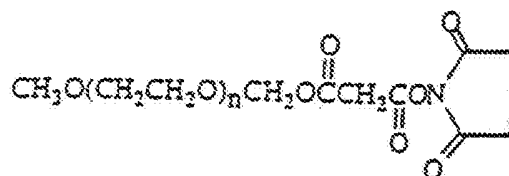
A.

GABA, amid



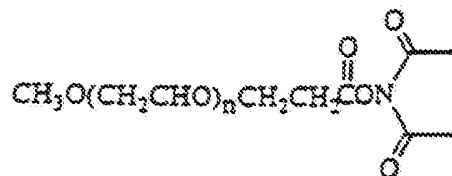
B.

amid



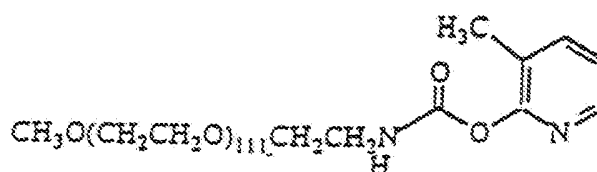
C.

amid (SPA)



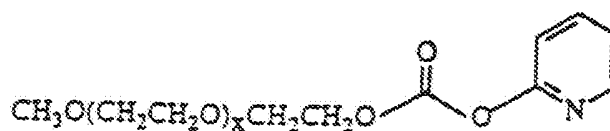
D.

Urea



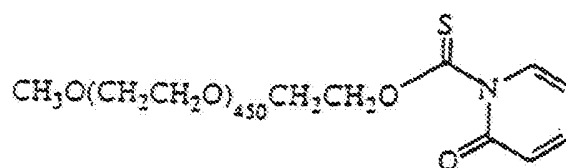
E.

Uretán



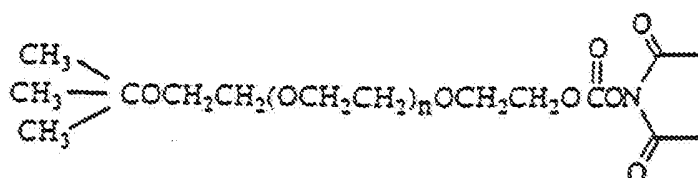
F.

Tiouretán

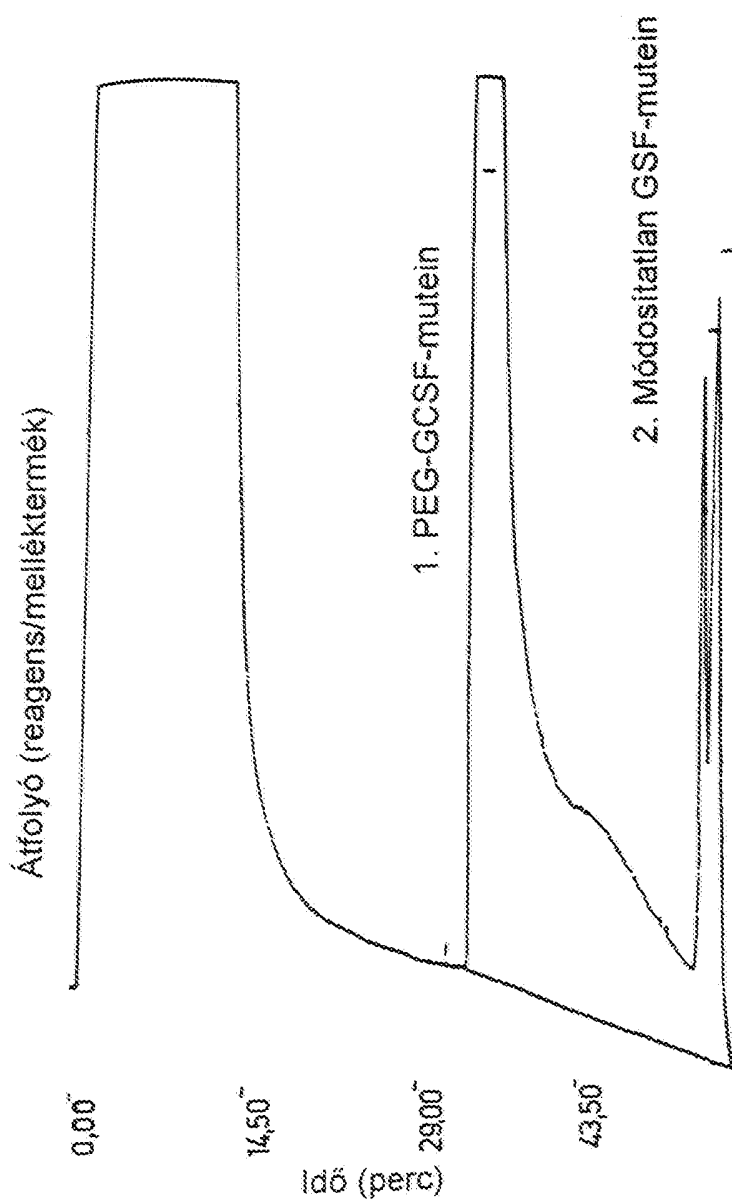


G.

Uretán



2. ábra



20 kDa molekulatömegű PEG-gel módosított és módosítatlan GCSF-mutein elválasztása. PEG-reakcióelegy tipikus elúciós profilja.

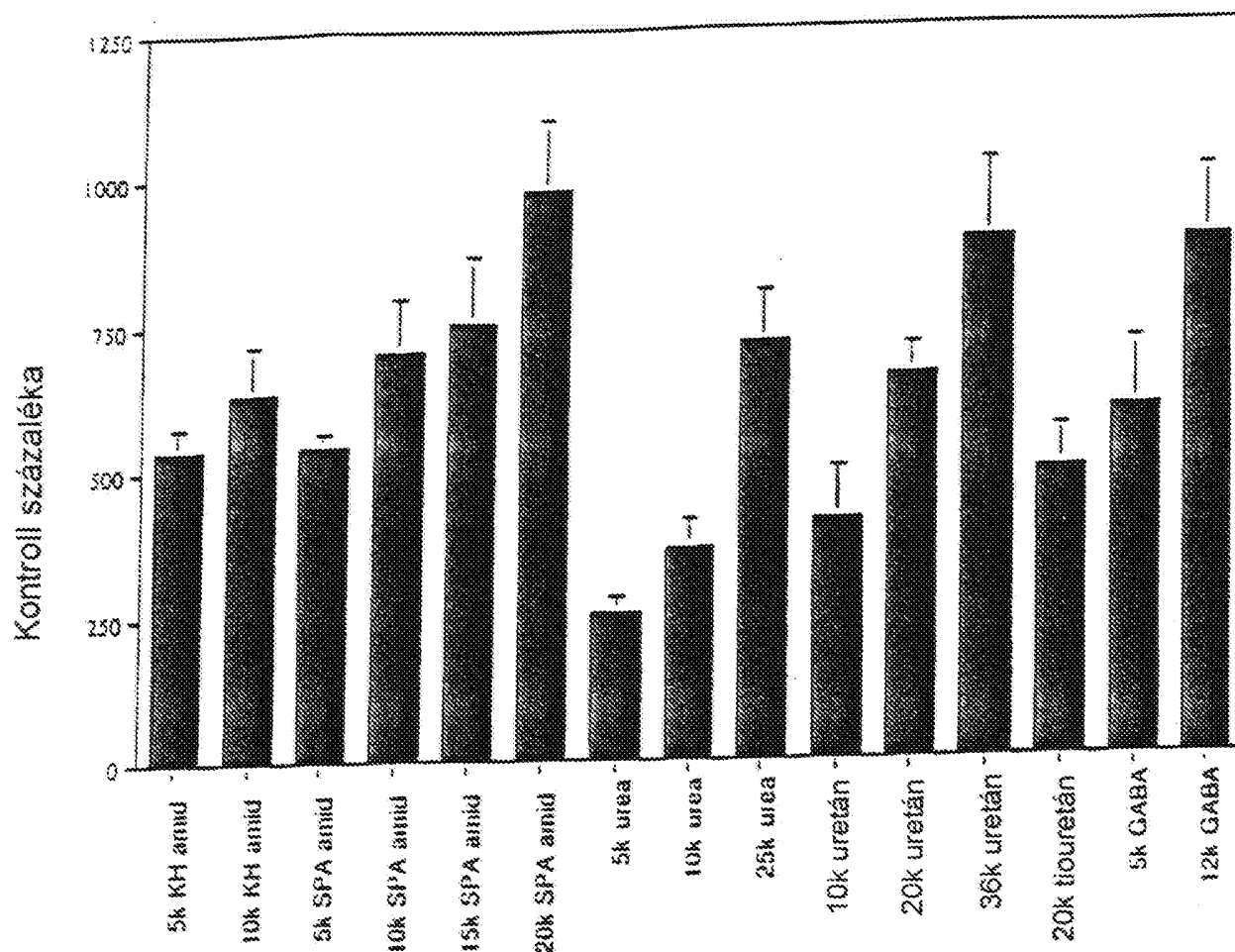
Oszlop: 1-2 ml *Fractogel*[®] EMD SO₃ 650S

Ekvibrációs puffer: 10 mM ammónium-acetát, pH = 4,5

1. elúciós puffer: 0,15 M NaCl ekvibrációs pufferben

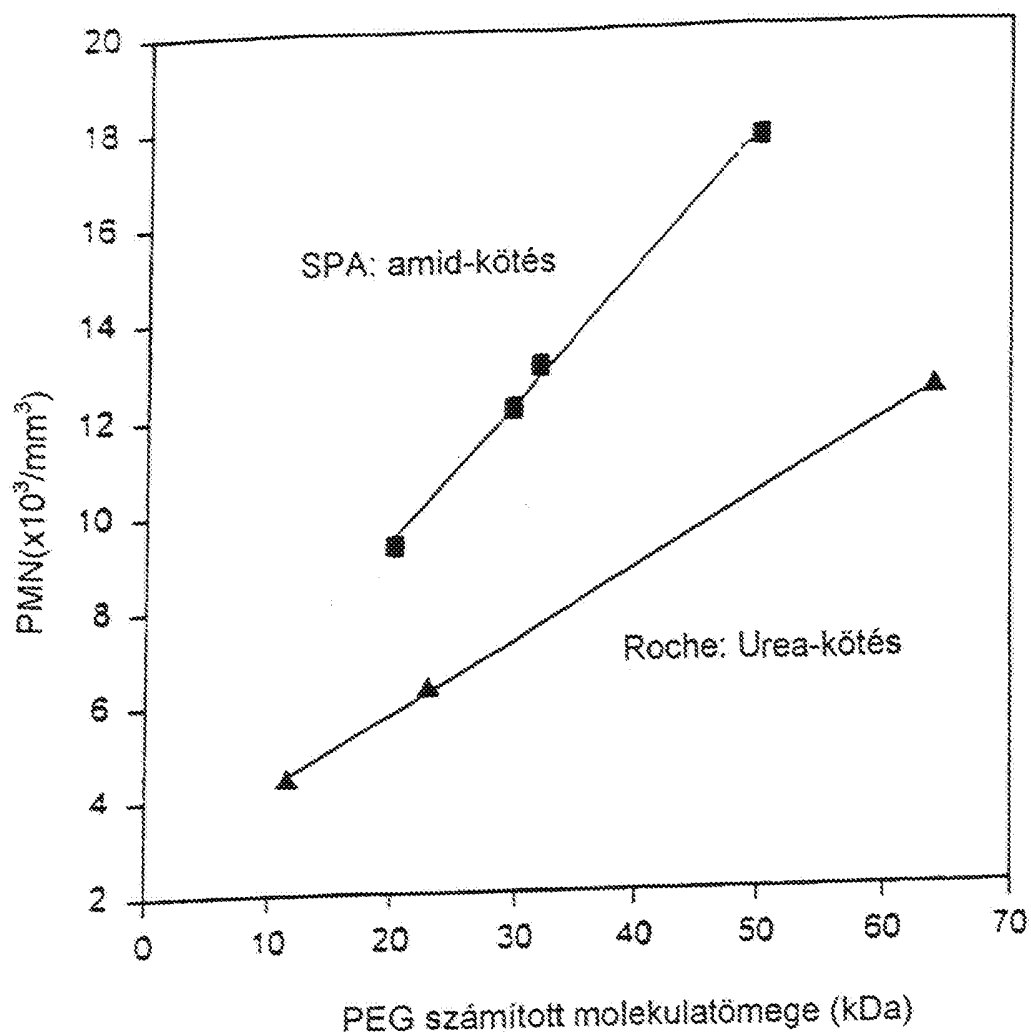
2. elúciós puffer: 0,5 M NaCl ekvibrációs pufferben

3. ábra



PEG-GCSF konjugátum aktivitása 5 nappal egyetlen injekciót követően
Nőstény C57BL/6J egereket szubkután oltottunk 25,2 μ g pegilált GCSF-konjugátummal; a beadást követő ötödik napon retroorbitális vénás GCSF-mintát vettünk. Coulter hematológiai és leukocita differenciális elemzéseket hajtottunk végre; a kapott neutrofil-számot standardizáltuk minden kísérletben. Az adatok csoportonként 4 egér átlagát $\pm$ szórását mutatják.

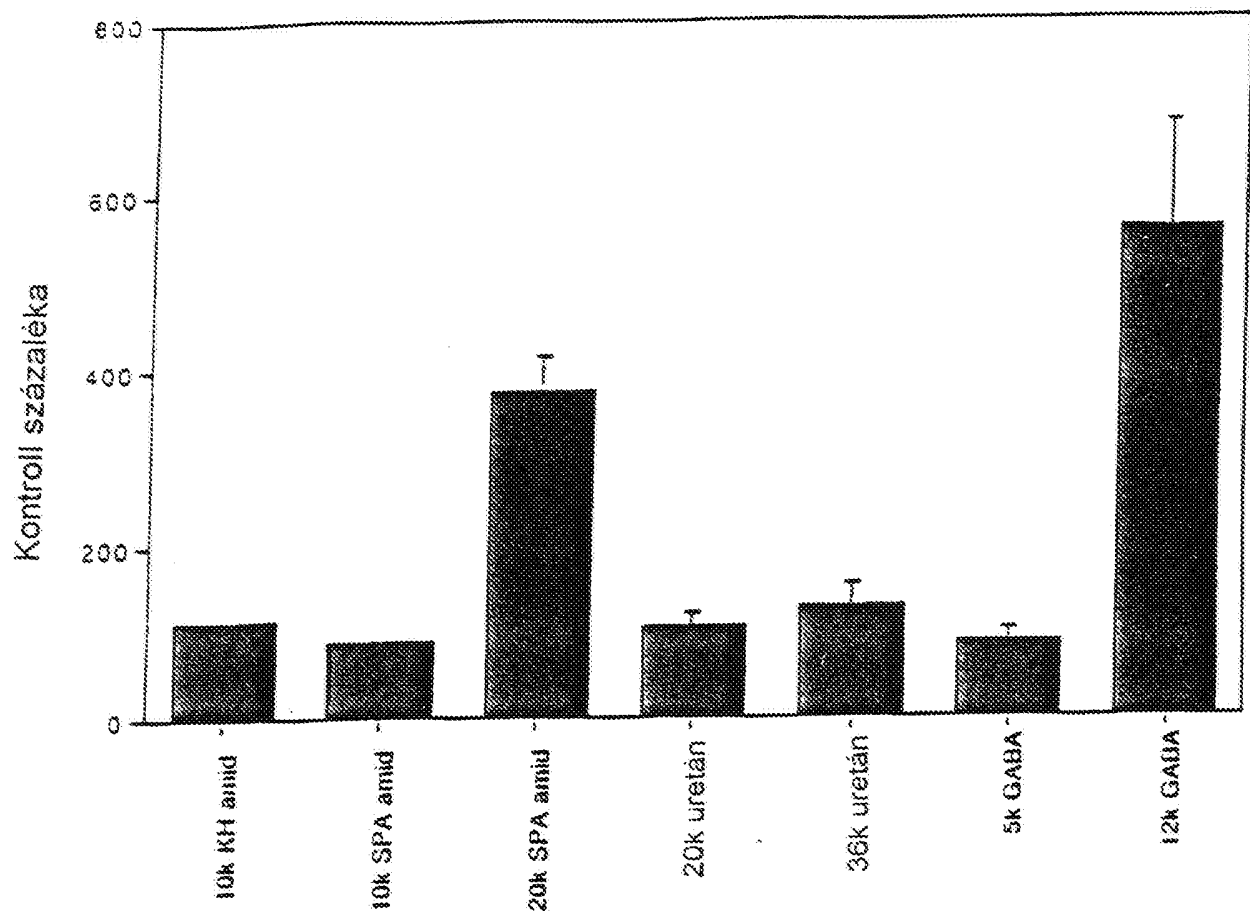
4. ábra



SPA: PMN = 0,277 molekulatömeg - 3,95
Roche: PMN = 0,152 molekulatömeg - 2,74

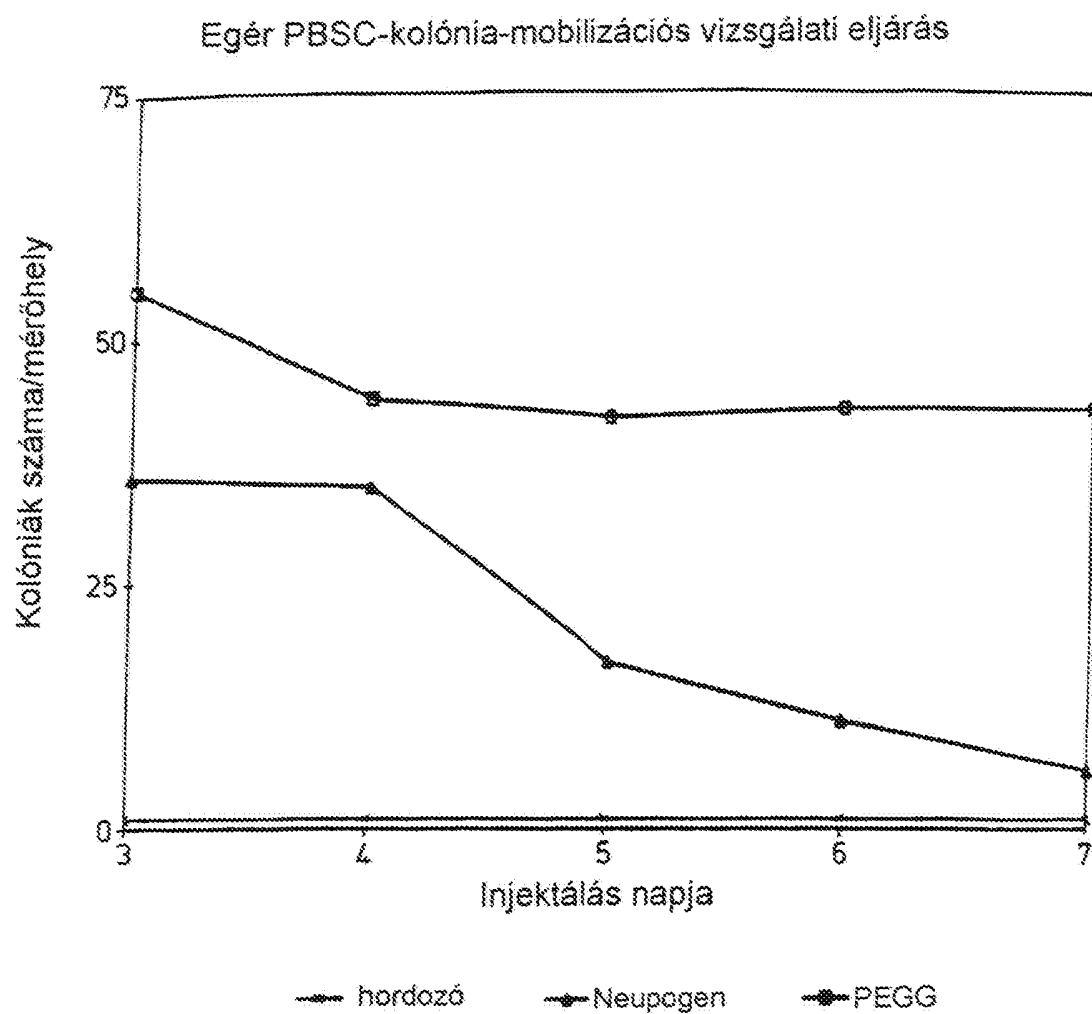
A PMN-szám növekedése a PEG tömegének (kDa) függvényében amid- és urea-kapcsolt GCSF-mutein-PEG konjugátumokban.

5. ábra



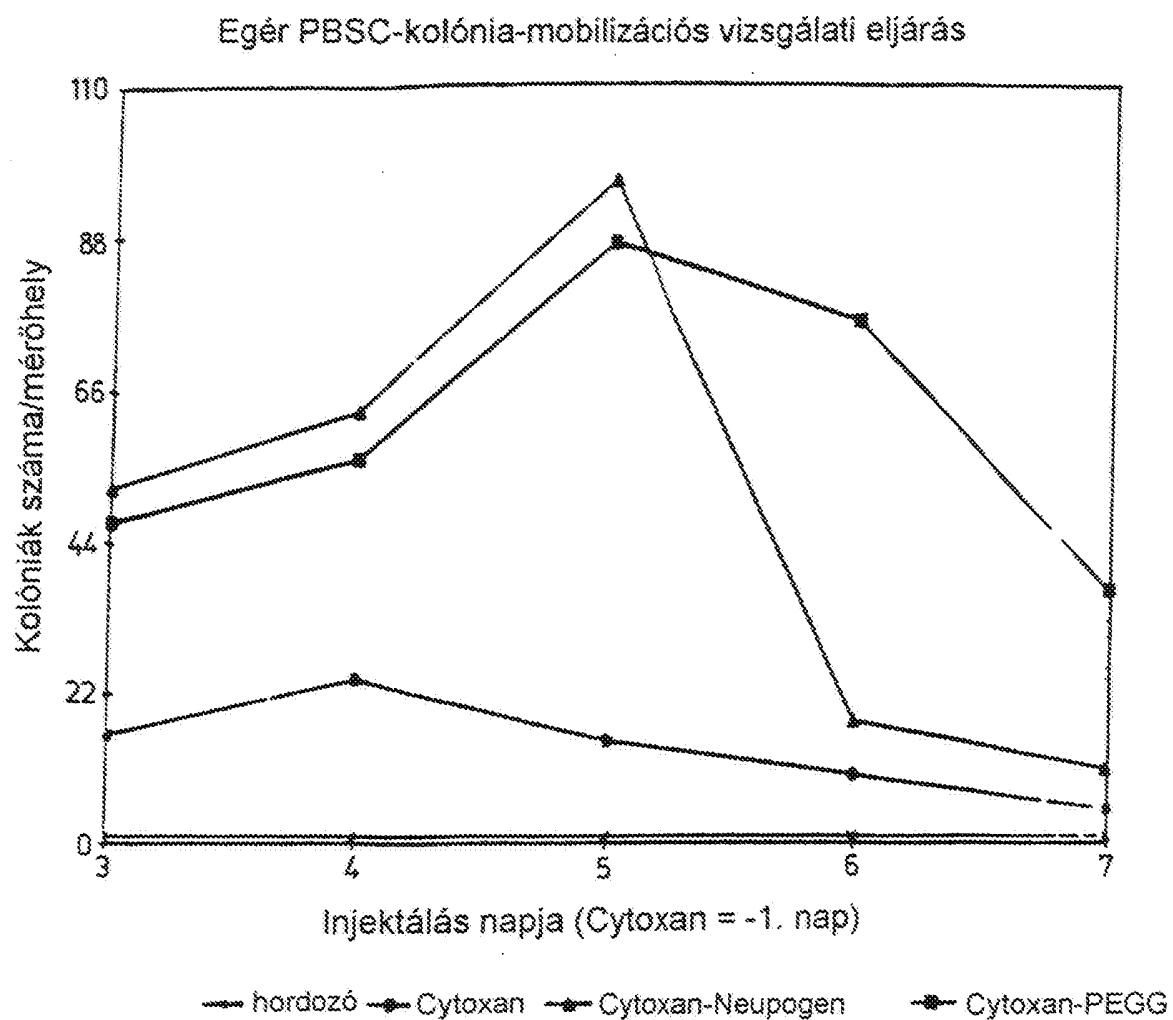
PEG-GCSF-mutain aktivitása 7 nappal egyetlen injekciót követően.
Nőstény C57BL/6J egereket szubkután oltottunk 25,2 µg pegilált konjugátumokkal; a beadást követő hetedik napon retroorbitális vénás GCSF-mintát vettünk. Coulter hematológiai és leukocita differenciális elemzéseket hajtottunk végre; a kapott neutrofil-számot standardizáltuk a hordozóra minden kísérletben. Az adatok csoportonként 4 egér átlagát ± szórását mutatják.

6. ábra



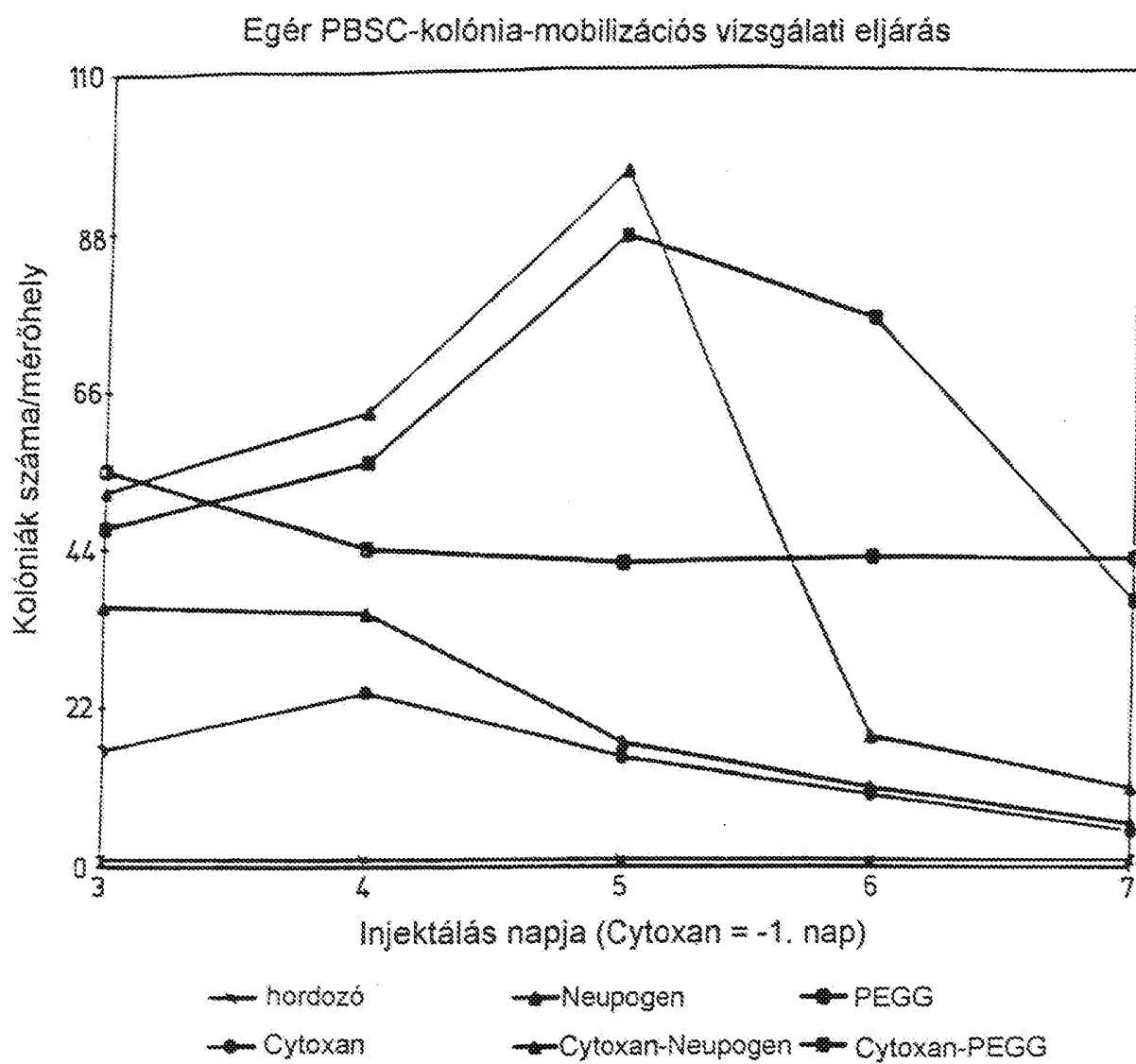
Neupogen (25 μ g/egér), 0-5. napon injektálva
PEGG (25 μ g/egér), 0. napon injektálva

7. ábra



Neupogen (25 μ g/egér), 0-5. napon injektálva
PEGG (25 μ g/egér), 0. napon injektálva

8. ábra

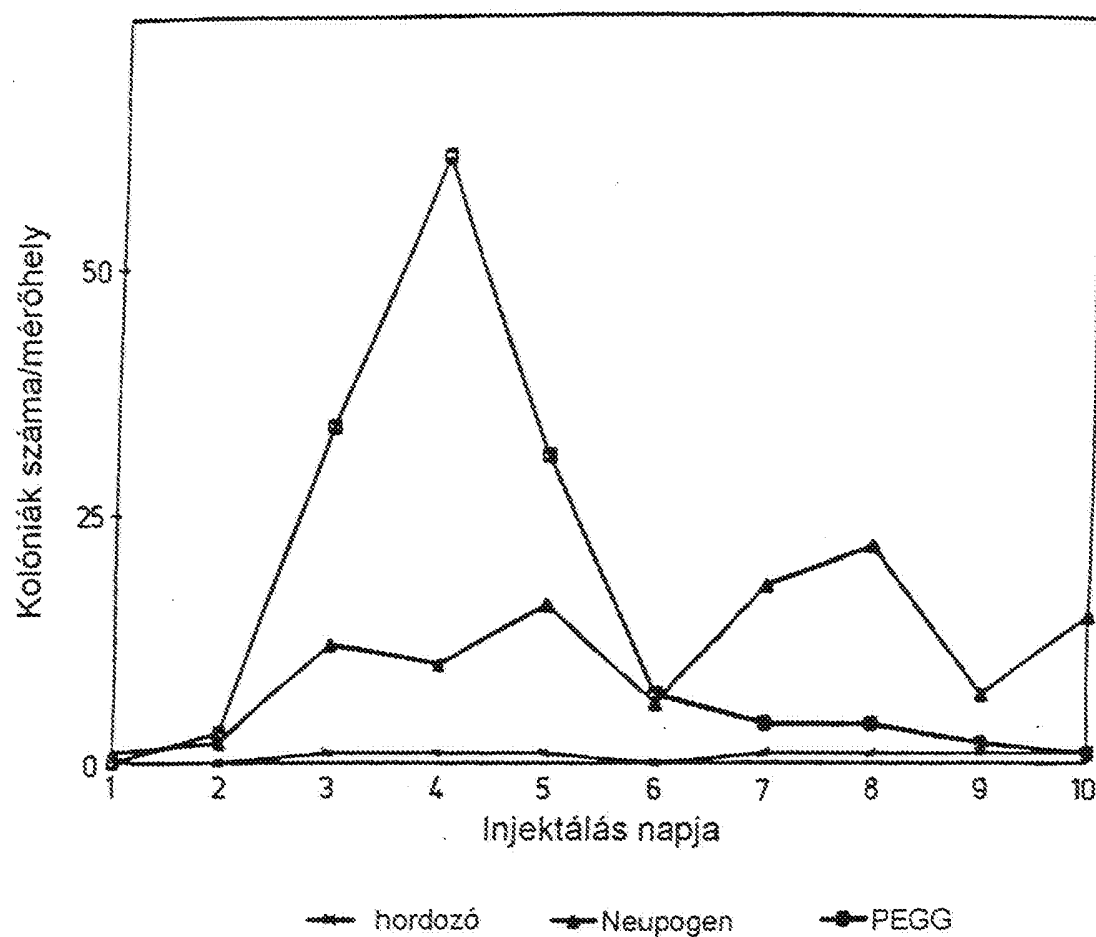


Neupogen (25 µg/egér), 0-5. napon injektálva

PEGG (25 µg/egér), 0. napon injektálva

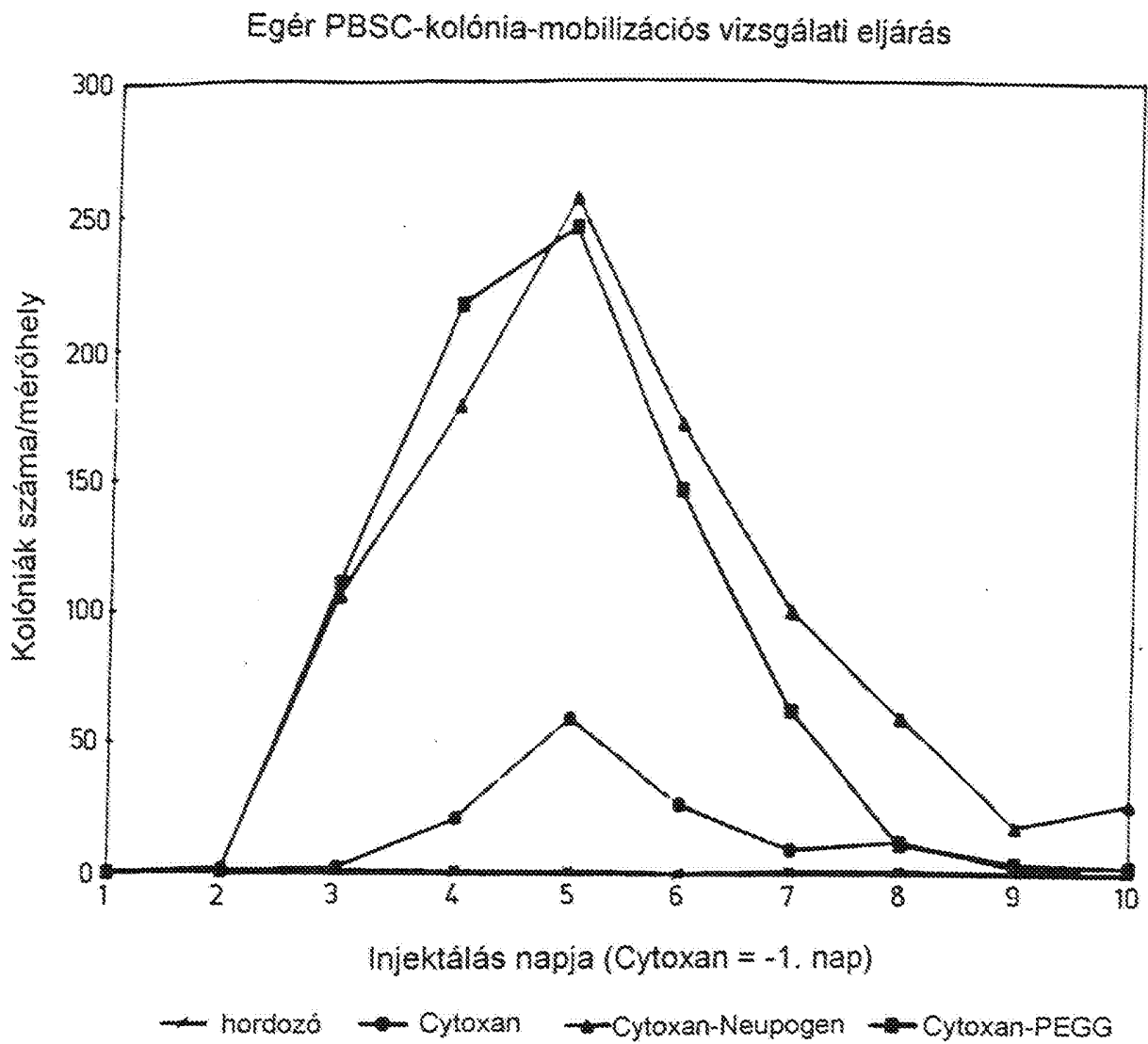
9. ábra

Egér PBSC-kolónia-mobilizációs vizsgálati eljárás



Neupogen (3 μ g/egér), 0-9. napon injektálva
PEGG (3 μ g/egér), 0. napon injektálva

10. ábra



Neupogen (3 μ g/egér), 0-5. napon injektálva
PEGG (3 μ g/egér), 0. napon injektálva

11. ábra