



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 34 373 T2** 2005.12.29

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 258 497 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 373.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 013 613.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **27.09.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.11.2002**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **16.02.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.12.2005**

(51) Int Cl.7: **C07K 14/755**
A61K 47/48

(30) Unionspriorität:

9503380 **29.09.1995** **SE**

(73) Patentinhaber:

Biovitrum AB, Stockholm, SE

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Röstin, Johanna, 135 62 Tyresö, SE; Sandberg,
Helena, 161 37 Bromma, SE; Smeds, Anna-Lisa,
756 46 Uppsala, SE; Akerblom, Eva, 756 52
Uppsala, SE**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung von Konjugaten vom Faktor VIII mit einem biologisch verträglichen Polymer**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der in vivo-Funktion eines Polypeptids durch Abschirmen von exponierten Zielstellen dieses Polypeptids durch Immobilisieren des Polypeptids an einem Gruppen-spezifischen Adsorbens, das Anionenaustauschliganden trägt, welche durch organisch-chemische Synthese hergestellt wurden, Aktivieren des biokompatiblen Polymers, Konjugieren des so aktivierten biokompatiblen Polymers mit dem immobilisierten Polypeptid und danach Eluieren des Konjugats von dem Adsorbens. Insbesondere ist das Polypeptid Faktor VIII. Die Erfindung ist besonders vorteilhaft für Konjugate, wo das Polypeptid Faktor VIII mit einer hohen spezifischen Aktivität ist, wobei Monomethoxy-Polyalkylenoxid (mPEG) als das biokompatible Polymer verwendet wird.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es ist wohlbekannt, dass die in vitro-Stabilität und die in vivo-Halbwertszeit von Polypeptiden durch kovalente Befestigung von biokompatiblen Polymeren (im Folgenden als Konjugation oder Modifikation bezeichnet) erhöht werden können. Die Modifikation der Polypeptidoberfläche weist ebenfalls den Vorteil auf, dass die Immunogenität, die von dem Polypeptid gezeigt wird, verringert wird.

[0003] US 4,970,300 (Fulton et al.) offenbart ein Konjugat, welches ein Protein mit Faktor VIII-Aktivität umfasst, das kovalent mit einem nicht antigenen Liganden verknüpft ist.

[0004] Die Pegylierung, d.h. das Koppeln von verschiedenen Polyethylenglycolen (PEG) an ein Polypeptid, ist eine Technik, die weithin zur Erhöhung der in vitro-Stabilität und der in vivo-Halbwertszeit von z.B. Proteinen verwendet wird. Bei der Pegylierung wurden über die Jahre hinweg viele Techniken vorgeschlagen. Hier wird Bezug genommen auf Zalipsky, S. et al. in Poly(Ethylene Glycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, Plenum, New York (1992) und Katre N. V., Adv. Drug Deliv. Rev., 10, 91–114 (1993).

[0005] WO 92/16555 (Enzon) offenbart makromolekulare Konjugate von biologisch aktiven Polypeptiden oder Glycopolypeptiden mit Acylhydrazinderivaten von Polyethylenglycol.

[0006] Ebenfalls JP 59 172425 offenbart Blutgerinnungsfaktor-Derivate, welche an Polyethylenglycol gebunden sind.

[0007] Für einige Polypeptide wurde ein Verlust an Aktivität oder Funktion als Folge dieser Konjugation festgestellt – eine Wirkung, die mit dem Grad der Modifikation zunimmt (Inada, Y. et al., Trends in Biotechnology, 13, 86–91 (1995)). Es wurden Methoden entwickelt, um das Koppeln selektiver zu machen, um dieses Problem zu umgehen. Beispielsweise wurde eine gezielte Mutagenese auf rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2) angewendet. Ein spezifisches Target kann durch Insertion eines Cysteins erzeugt werden (Goodson, R. J. und Katre, N. V., Bio/Technology 8, 344–346 (1990); Katre 1993, siehe oben). Ein solcher Weg ist nicht generell für therapeutische Proteine anwendbar, da die Aminosäuresubstitution die ursprünglichen Charakteristika des Moleküls verändern kann, und ist daher umstritten. Alternativ kann das Polymer zu Glycosylierungsstellen eines Proteins, z.B. Faktor IX, wie in der WO 94/29370 (Enzon) offenbart wird, oder Faktor VIII, wie in der WO 94/15625 offenbart wird, dirigiert werden. Dieses beinhaltet jedoch die Oxidation der Kohlenhydratanteile, was erreicht werden kann, indem das Glycoprotein mit Natriumperiodat oder enzymatisch mit Galactoseoxidase umgesetzt wird. Diese Bedingungen sind oft schädlich für das Molekül.

[0008] In der WO 94/13322 (Farmitalia Carlo Erba) wird gezeigt, dass die Pegylierung durchgeführt werden kann, ohne die Funktion gewisser Stellen zu beeinträchtigen, welche für die Funktion des bestimmten Proteins („erste Substanz“) wesentlich sind. Dieses wird erreicht durch das Schützen der Stellen durch Inkontaktbringen der ersten Substanz mit einer zweiten Substanz, die spezifisch an diese Stellen bindet. Insbesondere wird die Pegylierung durchgeführt, indem das bestimmte Protein an einem Harz mit Liganden immobilisiert wird, die eine spezifische Affinität zu dem Protein aufweisen. Zweite Substanzen sind beispielsweise komplementäre biologische Moleküle. Beispiele für Paare, die in der WO 94/13322 offenbart sind, sind Antikörper (erste Substanz) – entsprechendes Antigen (zweite Substanz); spezifischer Inhibitor (erste Substanz) – Enzym (zweite Substanz); Wachstumsfaktor (erste Substanz) – entsprechender Rezeptor (zweite Substanz), oder das Umgekehrte von jedem dieser Paare.

[0009] In einem Verfahren, das zur pharmazeutischen Produktion gedacht ist, ist es jedoch vorteilhaft, wenn

die Verwendung von Substanzen, die biologisch komplex sind, bei einem Minimum gehalten werden kann. Dieses beruht hauptsächlich auf den strengen Anforderungen an die Dokumentation über die biochemische Homogenität und Sicherheit für die Verwendung dieser Substanzen. Daher wäre die Verwendung von Affinitäts-liganden, die durch organisch-chemische Synthese hergestellt wurden, vorteilhaft.

[0010] DE 37 17 210 betrifft ein Verfahren zur Modifikation von Biopolymeren, vorzugsweise ladungstragenden Biopolymeren, durch Immobilisieren des Biopolymers an beispielsweise einem Ionenaustauschadsorbens, Umsetzen des Biopolymers mit Reagenzien, z.B. Enzymen oder anderen biochemischen Reagenzien, zum Erhalt eines Reaktionsprodukts und anschließend Desorbieren des Reaktionsprodukts von dem Adsorbens. Das Reaktionsprodukt ist vorzugsweise eine Nukleinsäure, die mit einem Restriktionsenzym gespalten wird. In der DE 37 17 210 wird der adsorbierte Zustand des Biopolymers verwendet, um das Biopolymer besser an Reagenzien zu exponieren, wodurch die Effizienz der Modifikation erhöht wird. Es gibt keinen Hinweis auf die Abschirmung von exponierten Zielstellen, noch einen Zweck zur Erhaltung der Aktivität des Biopolymers, welche zu einem Vorteil für die Funktion des Biopolymers in vivo führen würden. Die Erfindung der DE 37 17 210 zielt lediglich darauf ab, Eigenschaften von Biopolymeren, wie z.B. Nukleinsäuren, zu kartieren, indem der ursprüngliche Charakter durch konkrete Bearbeitung oder Erhöhung der Anzahl an funktionellen Einheiten des Makromoleküls, wie z.B. den Einbau von radioaktiven Isotopen, verändert wird.

[0011] Viele Proteine, die zur therapeutischen Anwendung gedacht sind, sind gewöhnlich durch Verwendung verschiedener Pegylierungstechniken konjugiert worden (Francis, G. E. et al., in *Stability of Protein Pharmaceuticals/Series: Pharmaceutical Biotechnology* 3, 235–263 (1992); Inada, Y. et al., *Trends in Biotechnology*, 13, 86–91 (1995)). Die meisten Beispiele betreffen die intravenöse Verabreichung. Jedoch wurde die Aufnahme nach subkutaner Verabreichung in Plasma, Lunge, Leber und Milz einiger mPEG-konjugierter Allergene offenbart, und die Immuntherapie mit mPEG-konjugierten Allergenen, die subkutan gegeben wurden, hat sich als wirksam erwiesen (Dreborg, S. und Åkerblom, E. B., *Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Sys.* 6(4), 315–365 (1990)). Ebenso wurde die intramuskuläre Verabreichung in klinischen Versuchen mit Adenosindeaminase verwendet (Hershfield, M. S. et al., *New Eng. J. Med.* 316, 589–596 (1987)). Die Pegylierung wurde ebenfalls in einigen wenigen Fällen als für den oralen Weg vorteilhaft beansprucht. So wurde die Pegylierung von IgG zur oralen Verabreichung in der EP-A-0 614 373 der Mount Sinai School of Medicine offenbart. Die Pegylierung von Faktor VIII und Faktor IX zur oralen Verabreichung wurde offenbart in Sakuragawa et al., *Acta Med. Biol.*, 34(3), 77–84 (1987) und in der japanischen Patentanmeldung Nr. 44509/83 der Nippon Chemifar Company.

[0012] Faktor VIII ist ein Protein, welches an der intrinsischen Blutgerinnung beteiligt ist. Es ist ein Kofaktor bei der Reaktion, wo der Enzymfaktor IXa in Gegenwart von Phospholipid und Calciumionen das Proenzym Faktor X in die aktive Form, Faktor Xa, umwandelt, was letztendlich zu einem Fibringerinnsel führt. Der menschliche Faktor VIII wird synthetisiert als ein einzelkettiges Molekül mit ungefähr 300 kDa und besteht aus den Strukturdomänen A1-A2-B-A3-C1-C2 (Gitschier et al., 1984, *Nature* 312, S. 326; Wood et al., 1984, *Nature* 312, S. 330; Vehar et al., 1984, *Nature* 312, S. 337; Toole et al., 1984, *Nature* 312, S. 342). Das Vorläuferprodukt wird im Golgiapparat zu zwei Polypeptidketten mit 200 und 80 kDa prozessiert, und die zwei Ketten, die durch ein Metallion(en) zusammengehalten werden, werden im Blut befördert (Kaufman et al., 1988, *J. Biol. Chem.* 263, S. 6352; Andersson et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, S. 2979). Die B-Domäne von Faktor VIII scheint entbehrlich zu sein, was die Funktion als Faktor VIII-Kofaktor betrifft, während die A- und C-Domänen mehrere Interaktionsstellen für andere Makromoleküle aufweisen, die eine Rolle bei der Hämostase spielen (Sandberg et al., 1993, *Thrombos. Haemostas.* 69 S. 1204 und Lind et al., 1995, *Eur. J. Biochem.* 232, S. 19).

[0013] Aus den obigen Abschnitten ist ersichtlich, dass Faktor VIII ein Protein mit mehreren Interaktionsstellen ist, die jeweils für eine spezifische Funktion verantwortlich sind. Daher ist es schwierig, Faktor VIII unter voller Beibehaltung der biologischen Funktion zu modifizieren.

[0014] Die Pegylierungstechnik wurde zuvor auf Proteinmischungen angewendet, die Faktor VIII enthielten. So wurde in der WO 94/15625 (Enzon) offenbart, dass die Pegylierung von Faktor VIII unter Verwendung einer Carbamat(Urethan-)Verknüpfung bei einem nicht festgelegten Modifikationsgrad, der aus einem 100fachen molaren Überschuss von mPEG bezogen auf Faktor VIII resultiert, die in vivo-Halbwertszeit in Mäusen von 13 Stunden auf 55 Stunden erhöhen kann. Herkömmlicherweise wird für die Halbwertszeit in Mäusen ca. 1 Stunde angenommen. Daher sind 13 Stunden eine ungewöhnlich lange Halbwertszeit bei Mäusen. Weiterhin muss man berücksichtigen, dass bei der extrem geringen Reinheit der anfänglichen Faktor VIII-Präparation (20–50 IU/mg Protein) andere Proteine als Faktor VIII während der Kopplungsreaktion vorherrschend waren. Ein wichtiges Protein, das gewöhnlich in Faktor VIII-Präparationen mit geringer Reinheit vorhanden ist, ist der von Wilbrand-Faktor, welcher eine stabilisierende Funktion für Faktor VIII aufweist und ebenfalls sehr gut zu dem Schutz der entsprechenden funktionellen Stelle während des Konjugationsprozesses beitragen könnte. Nach

der Konjugation kann mPEG auf irgendeinem der Proteine, die in der Proteinmischung vorliegen, von welcher Faktor VIII normalerweise nur einen kleinen Anteil ausmacht, lokalisiert sein. Die pegylierte Proteinmischung, welche Faktor VIII enthielt, wurde zur intravenösen Verabreichung verwendet. Ein wohldefiniertes Ausgangsmaterial ist jedoch einer der wesentlichen Faktoren, welche die kontrollierten Bedingungen ausmachen, die für die pharmazeutische Produktion benötigt werden.

[0015] Andere Polymere wurden ebenfalls zum Konjugieren von Faktor VIII verwendet. So wurde in dem U.S.-Patent 4,970,300 offenbart, dass eine Dextranskonjugation angewendet werden kann, um die Halbwertszeit von Faktor VIII zu verlängern.

[0016] Bei den meisten Kopplungstechniken reagiert das Polymerreagens mit ϵ -Aminogruppen von Lysinresten des Polypeptids. Diese sind oft über die gesamte Polypeptidoberfläche verteilt, und können sehr wohl zu einer Konjugation in der Nähe einer funktionellen Stelle führen. Als Folge wird durch zufälliges Koppeln oft die Aktivität oder Funktion gestört. Es ist unsere Erfahrung, dass, wenn derartige Techniken auf sehr reine Präparationen angewendet werden, wie z.B. einen rekombinanten Faktor VIII mit Koagulationsaktivität, bei welchem die B-Domäne deletiert wurde, diese Aktivität schon bei einem Modifikationsgrad von ca. 5 mPEG/Faktor VI-II-Molekül drastisch verringert wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben gefunden, dass die spezifische Aktivität von konjugierten Polypeptiden in einem hohem Ausmaß beibehalten werden kann, indem einfach das Polypeptid vor der Kopplungsreaktion an einem Gruppen-spezifischen Adsorbens immobilisiert wird, worauf die Desorption des Konjugats durch herkömmliche Techniken folgt. Dieses ist sehr überraschend, da es vorher als wesentlich angesehen wurde, Adsorbentien mit spezifischen Bindungseigenschaften bezogen auf das in Frage stehende Polypeptid zu verwenden, um einen Schutz von gewissen Domänen zu erreichen, die für die biologischen Funktionen wichtig sind.

[0018] Der Nutzen der Modifizierung von biokompatiblen Polymeren hängt oft von dem Modifikationsgrad ab. Somit wird gewöhnlich ein hoher Modifikationsgrad, d.h. eine hohe Anzahl an biokompatiblen Polymeren pro Polypeptidmolekül, für einen effizienten Schutz gegenüber einer proteolytischen Aktivität benötigt. Mit Hilfe der vorliegenden Erfindung, bei welcher die biokompatiblen Polymere selektiver eingeführt werden, wurde die spezifische Aktivität besser bewahrt. So haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung gefunden, dass Faktor VIII effizient gegen den Abbau in einer in vitro-Umgebung, von welcher gezeigt wurde, dass diese eine zersetzende Wirkung auf dieses Molekül aufweist, geschützt werden kann. Diese Wirkung kann bei einem Modifikationsgrad von nur 4–5 mPEG/Faktor VIII erreicht werden.

[0019] Die Verwendung von Gruppen-spezifischen Adsorbentien gemäß der vorliegenden Erfindung ist ökonomisch günstiger im Vergleich zu den Adsorbentien, die im Stand der Technik offenbart werden. Die Verwendung Gruppen-spezifischer Adsorbentien wird ebenfalls die Registrierung der Konjugate als therapeutische Mittel erleichtern.

[0020] Das vorliegende Verfahren macht es möglich, die in vivo-Funktion von Polypeptiden zu verbessern, insbesondere indem die pharmakokinetische Funktion einschließlich der Bioverfügbarkeit verbessert wird und indem die Immunogenität, die von den Polypeptiden gezeigt wird, verringert wird.

[0021] Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verbesserung der in vivo-Funktion von Faktor VIII, indem exponierte Zielstellen des Polypeptids abgeschirmt werden, indem

- a) Faktor VIII durch Interaktion mit einem Gruppen-spezifischen Adsorbens, das Anionenaustauschliganden trägt, welche durch organisch-chemische Synthese hergestellt wurden, immobilisiert wird;
- b) das biokompatible Polymer aktiviert wird;
- c) das aktivierte biokompatible Polymer mit dem immobilisierten Faktor VIII konjugiert wird; und danach
- d) das Konjugat von dem Adsorbens eluiert wird.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck Interaktionsstelle auf verschiedene Stellen, die für die biologische Funktion des bestimmten Polypeptids wesentlich sind.

[0023] In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck exponierte Zielstellen auf externe Stellen auf

dem in Frage stehenden Polypeptid, die für unerwünschte Reaktionen in vivo anfällig sind. Beispiele für exponierte Zielstellen umfassen antigene Epitope und Stellen für eine proteolytische Spaltung. Gewisse Stellen für eine proteolytische Spaltung werden dennoch als Interaktionsstellen bezeichnet.

[0024] Die vorliegende Erfindung macht es in einem bisher unerreichbaren Ausmaß möglich, den Einfluss von unerwünschten Reaktionen in vivo, z.B. proteolytische Spaltung und möglicherweise Aggregation, zu verringern, während gleichzeitig die Interaktionsstellen, die für die biologische Funktion des Polypeptids wesentlich sind, unbeeinflusst gelassen werden. Dieses wurde bei der Anwendung der mPEG-Konjugation von (rekombinantem) Faktor VIII offenbart. Insbesondere werden durch Immobilisieren des Polypeptids durch Interaktion mit einem Gruppen-spezifischen Adsorbens, das Liganden trägt, welche durch organisch-chemische Synthese hergestellt wurden, die Interaktionsstellen auf dem Polypeptid von der Konjugation mit dem biokompatiblen Polymer ausgeschlossen. Weiterhin werden durch Konjugieren des aktivierten biokompatiblen Polymer mit dem Polypeptid an den gewünschten, externen Stellen die exponierten Zielstellen vor der Wirkung von z.B. Proteasen versteckt.

[0025] In der vorliegenden Anmeldung beziehen sich Polypeptide auf Proteine und Oligopeptide mit wenigstens 20 Aminosäuren in der Kette. Die Anzahl an Aminosäuren des Polypeptids, das gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, liegt geeigneterweise in dem Bereich von 30 bis zu 4.500 Aminosäuren und vorzugsweise in dem Bereich von 40 bis zu 3.000 Aminosäuren. Die Polypeptide können aus Säugetieren, insbesondere aus dem Menschen stammen oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt werden. Polypeptide, welche gemäß der vorliegenden Erfindung konjugiert werden können, umfassen Polypeptide, die koagulierende Aktivität zeigen oder eine unterstützende Funktion zur Koagulation aufweisen. Die Polypeptide können die volle Länge aufweisen, d.h. die Sequenz der Aminosäuren ist identisch mit der entsprechenden Sequenz, die im Allgemeinen in Säugetieren und insbesondere in Menschen gefunden wird. Die Polypeptide können ebenfalls Deletionsderivate der Polypeptide in voller Länge sein, wobei eine oder mehrere Aminosäuren fehlen. Insbesondere ist das Polypeptid der Koagulationsfaktor VIII.

[0026] Der Faktor VIII in voller Länge, welcher in menschlichem Plasma vorliegt, weist eine Molekülmasse von ca. 300 kDa auf. Faktor VIII-Konzentrate, die aus menschlichem Plasma stammen, enthalten mehrere fragmentierte vollständig aktive Faktor VIII-Formen, wie von Andersson et al. (siehe oben) beschrieben wird. Die kleinste aktive Form weist eine Molekülmasse von ca. 170 kDa auf und besteht aus zwei Ketten mit ca. 90 kDa und ca. 80 kDa, die durch ein Metallion(en) zusammen gehalten werden (siehe EP-A-0 197 901). Der biologisch aktive Faktor VIII, welcher gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wird, hat daher geeigneterweise eine Molekülmasse in dem Bereich von ca. 170 kDa bis zu ca. 300 kDa.

[0027] Pharmacia AB aus Stockholm, Schweden, hat ein rekombinantes Faktor VIII-Produkt entwickelt, welches der Faktor VIII-Form aus Plasma mit 170 kDa in therapeutischen Faktor VIII-Konzentraten entspricht. Das trunkierte rekombinante Faktor VIII-Molekül wird r-VIII SQ genannt und wird von Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) in einem Zellkulturprozess in serumfreiem Medium hergestellt. Die spezifische Aktivität von r-VIII SQ beträgt ca. 15.000 IU VIII:C pro mg Gesamtprotein. Die Struktur und Biochemie von r-VIII SQ wurden in der WO-A-91/09122 beschrieben, die auf Pharmacia AB übertragen wurde.

[0028] In der vorliegenden Erfindung kann Faktor VIII entweder Faktor VIII aus Plasma oder ein rekombinanter Faktor VIII sein. Wenn Faktor VIII rekombinant ist, kann dieser Faktor VIII in voller Länge oder vorzugsweise ein Deletionsderivat von Faktor VIII in voller Länge mit koagulierender Aktivität sein. In diesem Zusammenhang ist ein Deletionsderivat definiert als ein Koagulationsfaktor VIII, bei welchem die gesamte oder ein Teil der B-Domäne fehlt, während die koagulierende Aktivität beibehalten wird. Die verbleibenden Domänen sind geeigneterweise durch einen Aminosäurelinker verknüpft. Beispiele für verschiedene Linkerkonstrukte werden in P. Lind et al., Eur. J. Biochem., Bd. 232 (1995), Seiten 19–27 angegeben.

[0029] Die vorliegende Erfindung kann vorteilhaft verwendet werden, um selektiv biokompatible Polymere in eine große Vielzahl von Faktor VIII-Produkten einzuführen. Somit kann die vorliegende Erfindung verwendet werden, um Faktor VIII aus Plasma in vivo weiter zu stabilisieren, welcher bereits durch Assoziation mit seinem Trägerprotein, dem von Willebrand-Faktor (vWf), stabilisiert ist.

[0030] Es ist vorteilhaft, dass das Endprodukt wohldefiniert ist. Daher sollte die spezifische Faktor VIII-Aktivität in dem Kopplungsverfahren der vorliegenden Erfindung wenigstens ca. 1.000 IU/mg Gesamtprotein und geeigneterweise wenigstens 2.000 IU/mg Gesamtprotein betragen. Die spezifische Faktor VIII-Aktivität liegt vorzugsweise in dem Bereich von 5.000 bis zu 20.000 IU/mg Gesamtprotein und insbesondere in dem Bereich von 10.000 bis zu 17.000 IU/mg Gesamtprotein.

[0031] Die Faktor VIII-Aktivität in dem Kopplungsverfahren kann wenigstens ca. 1.000 IU/ml und geeigneterweise wenigstens 2.000 IU/ml betragen. Die Faktor VIII-Aktivität liegt vorzugsweise in dem Bereich von 5.000 bis zu 50.000 IU/ml und insbesondere von 20.000 bis 40.000 IU/ml.

[0032] Das biokompatible Polymer der vorliegenden Erfindung kann ausgewählt werden aus der Gruppe, bestehend aus Homopolymeren, Copolymeren oder Blockcopolymeren von Monoalkyl-verkappten Polyalkylenoxiden. Die biokompatiblen Polymere können gerade oder verzweigt sein. Das Monoalkyl-verkappte Polyalkylenoxid wird geeigneterweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycol-Homopolymeren und Polypropylenglycol-Homopolymeren. Das biokompatible Polymer ist vorzugsweise ein Polyethylenglycol(PEG)-Homopolymer. Das Molekulargewicht des PEG kann in dem Bereich von ca. 300 bis zu 20.000, geeigneterweise in dem Bereich von 1.500 bis zu 10.000 und vorzugsweise in dem Bereich von 3.000 bis zu 5.000 liegen.

[0033] Das biokompatible Polymer sollte an einem Ende endverkappt sein, um eine Kreuzderivatisierung zu vermeiden. Beispiel für Gruppen, die zu diesem Zweck geeignet sind, sind gerade oder verzweigte niedere Alkoxoxygruppen, vorzugsweise die Monomethoxygruppe. Ein besonders bevorzugtes biokompatibles Polymer in der vorliegenden Erfindung ist Monomethoxy-Polyethylenglycol (mPEG).

[0034] Andere biokompatible Polymere sind ebenfalls vorstellbar, z.B. Dextran, Polyvinylpyrrolidon und DL-Aminosäuren.

[0035] Das biokompatible Polymer muss vor der Kopplungsreaktion aktiviert werden, um die Bildung von kovalenten Bindungen möglich zu machen. Zu diesem Zweck sollte das Ende des biokompatiblen Polymers, das dem Polypeptid gegenüber liegt, eine daran befestigte Hydroxylgruppe aufweisen, die einer Aktivierung zugänglich ist. Es gibt mehrere Wege, um das biokompatible Polymer zu aktivieren, was von der Aminosäure abhängt, die zur kovalenten Bindung ausgewählt wurde. Geeignete mPEG-Derivate zum Koppeln an Aminogruppen sind mPEG-Succinimidylsuccinat, mPEG-Succinimidylsuccinamid, mPEG-Succinimidylpropionat, Succinimidylcarbonat von mPEG, Succinimidylester von carboxymethyliertem mPEG, mPEG-Oxycarbonylimidazol, mPEG-Nitrophenylcarbonat, mPEG-Trichlorphenylcarbonat, mPEG-Tresylat (das letztere offenbart von Nilsson K., Mosbach K., *Methods in Enzymology*, Bd. 104, Seiten 56–69 (1984)), (alle erwähnten Reagenzien werden vertrieben von der Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA), mPEG-Maleinsäureanhydrid und mPEG-Methylmaleinsäureanhydrid (Garman A., Kalindjian S. B., *FEB* Bd. 223: 2, Seiten 361–365) sowie gemischte Anhydride von mPEG-Succinat, mPEG-Essigsäure bzw. mPEG-Propionsäure (Dreborg S. und Akerblom E., siehe oben).

[0036] Cysteinreste können mit mPEG-Maleimid, mPEG-Vinylsulfon und mPEG-Orthopyridyldisulfid (vertrieben von der Shearwater Polymers, Inc., Huntsville, AL, USA) konjugiert werden. Geeignete Reagenzien im Fall der Konjugation der Guanidinogruppe von Arginin sind mPEG-Derivate von Phenylglyoxal (Zalipski, siehe oben).

[0037] Kohlenhydrate müssen zuerst oxidiert werden, so dass Aldehydgruppen vorliegen, und dann können diese mit mPEG-Hydrazid konjugiert werden (Zalipski, siehe oben).

[0038] Der Kopplungsvorgang wird bei einem pH durchgeführt, der für die zu konjugierende Aminosäure geeignet ist. Es müssen ebenfalls der pH, der für das Polypeptid insgesamt geeignet ist, wie auch die pH-Abhängigkeit der Reaktivität des biokompatiblen Polymers in Betracht gezogen werden. Normalerweise liegt daher der pH zur Kopplung in dem Bereich von ca. 7 bis zu ca. 8, wobei die untere Grenze angesetzt wird, um einen verlängerten Kopplungsvorgang zu vermeiden, und die obere Grenze, um milde Bedingungen für das Polypeptid bereit zu stellen. Der obige pH-Bereich ist für eine Konjugation geeignet, an der Lysine beteiligt sind. Daher haben wir in den Beispielen der vorliegenden Erfindung eine Substanz mit FVIII-Aktivität unter derartigen milden Bedingungen konjugiert. pH-Werte außerhalb dieses Bereichs können in gewissen Fällen ebenfalls geeignet sein. So werden Konjugationen, an denen Cysteine beteiligt sind, geeigneterweise bei einem pH unter ca. 7 durchgeführt, wogegen Arginine geeigneterweise bei einem pH in dem Bereich von ca. 5,5 bis zu ca. 9,3 konjugiert werden.

[0039] Der Kopplungsvorgang sollte bei einer Temperatur über 0°C, geeigneterweise in dem Bereich von ca. 5 bis zu ca. 40°C und vorzugsweise in dem Bereich von 10 bis zu 30°C durchgeführt werden. Wiederum muss die Temperatur in Betracht gezogen werden, die für das Polypeptid insgesamt geeignet ist, wie auch der Einfluss der Temperatur auf die Reaktivität des biokompatiblen Polymers. In den Beispielen der vorliegenden Anmeldung wurden alle Kopplungsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

[0040] Das Adsorbens, das in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist Gruppen-spezifisch in Bezug auf das zu immobilisierende Polypeptid. Gruppen-spezifische Adsorbentien weisen Affinität zu mehreren Polypeptiden auf. Weiterhin binden sie oft weniger stark, und die Elution kann unter milderer Bedingungen durchgeführt werden als mit monospezifischen Adsorbentien, wobei die letzteren an ein einziges oder eine sehr kleine Anzahl an Polypeptiden binden. Beispiele für geeignete Gruppen-spezifische Adsorbentien sind angegeben in Jansson, J. C. et al., Protein Purification, Principles, High Resolution Methods, and Applications, VCH Publishers, Seiten 274–285 (1989). Das Adsorbens der vorliegenden Erfindung ist weiterhin dadurch gekennzeichnet, dass es Liganden trägt, die durch organisch-chemische Synthese hergestellt wurden.

[0041] Insbesondere sind Liganden, welche zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, Anionenaustauschgruppen, die vorzugsweise stark sind, wie quaternäres Aminoethyl (QAE), Trimethylaminoethyl (TMAE) oder quaternäres Aminomethyl (Q), insbesondere quaternäres Aminomethyl (Q). Die Liganden können weiterhin eng oder mit einem Spacer wie Alkylamin, Hexylamin, Diaminodipropylamin, Ethylaminsuccinamid (Persson & Lagerström, in Packings and stationary phases in chromatographic techniques, Unger, K. K., Herausg., Marcel Dekker Inc. 1990, S. 754) oder mit einem verzweigten Tentakel, an welchem die Liganden befestigt sind (ein geeignetes Beispiel ist Fractogel™ EMD, das von Merck aus Deutschland hergestellt wird) an die Matrix gekoppelt sein.

[0042] Nach dem Kopplungsvorgang wird das konjugierte Polypeptid durch herkömmliche Techniken eluiert. In diesen Zusammenhang ist es wesentlich, dass die physiko-chemischen Bedingungen in Betracht gezogen werden, um einen Abbau der konjugierten Polypeptide zu vermeiden. Wenn somit der Kopplungsweg eine konjugierende Bindung beinhaltet, die innerhalb eines gewissen pH-Bereichs labil ist, sollte dies vermieden werden.

[0043] Wenn das Polypeptid an dem Adsorbens immobilisiert ist, kann in dem Kopplungsvorgang der vorliegenden Erfindung das Polypeptid mit einem löslichen Blockierungsmittel in Kontakt gebracht werden, mit dem Zweck, zusätzliche Stellen von der Konjugation auszuschließen. Ein solches Blockierungsmittel sollte durch organisch-chemische Synthese hergestellt werden und sollte zusätzlich mit irgendeinem der oben identifizierten Liganden, die an ein Polymer gebunden sind, konjugiert sein, welche ausgewählt sind aus Monoalkyl-verbundenen Polyalkylenoxiden, Copolymeren oder Blockcopolymeren von Polyalkylenoxiden, Polyethylenglycol-Homopolymeren oder Polypropylenglycol-Homopolymeren. Das Blockierungsmittel kann ebenfalls Einheiten mit spezifischer Affinität zu dem Polypeptid tragen.

[0044] Nach der Elution wird das in Kontakt gebrachte lösliche Blockierungsmittel desorbiert, indem geeignete chemische Bedingungen angewendet werden. Wenn beispielsweise das Blockierungsmittel durch hydrophobe Interaktion adsorbiert wurde, könnte dieses durch ein Vermindern der Ionenstärke oder einfach durch ein Absenken der Temperatur desorbiert werden. Das lösliche Blockierungsmittel wird danach von dem Konjugat durch Gelpermeationschromatographie unter herkömmlichen Bedingungen abgetrennt.

[0045] Die Matrix des Adsorbens in der vorliegenden Erfindung kann irgendein kommerzielles Harz sein, von dem bekannt ist, dass es mit biologischen Molekülen kompatibel ist. So kann die Matrix ausgewählt werden aus verschiedenen stark hydrophilen Matrices, z.B. Agarosematrices wie einer großen Vielzahl an Sepharose™-Matrices, die von Pharmacia Biotech aus Uppsala, Schweden, verkauft werden, organischen Polymermatrices wie z.B. TSK-GEL:s, das von der Tosoh Corp. aus Tokio, Japan, verkauft wird, oder hochporösen organischen Polymermatrices, die von Per Septive Biosystems aus Boston, USA, verkauft werden. Membranmatrices sind ebenfalls geeignet, z.B. Sartobind™, das von Sartorius aus Deutschland verkauft wird, und Mem-Sep™, das von Millipore aus den USA verkauft wird. Die Matrix ist vorzugsweise eine Agarosematrix. Geeignete Agarosematrices in der vorliegenden Erfindung sind, außer Sepharose™, Minileak™, das von der Kem-En-Tec A/S aus Kopenhagen, Dänemark, verkauft wird, und Bio-Gel A, das von Bio-Rad aus Brüssel, Belgien, verkauft wird. Vorzugsweise ist die Matrix quervernetzt, was einen schnellen Fluss (FF) und dadurch eine hohe Produktionskapazität ermöglicht. Insbesondere wird die Chromatographie der vorliegenden Erfindung auf einem Q Sepharose™ FF-Gel durchgeführt. Weiterhin können Harze, die aus Copolymeren von Oligoethylenglycol, Glycidylmethacrylat und Pentaerythroidimethacrylat zusammengesetzt sind, wie Fractogel™ (vertrieben von Merck aus Deutschland), Cellulose und poröses Glas ebenfalls vorteilhaft verwendet werden.

[0046] Die Konjugate von einem Polypeptid und einem biokompatiblen Polymer, die durch die vorliegende Erfindung erhältlich sind, sind neu. Mit dem vorliegenden Verfahren kann die Polypeptidaktivität nach der Konjugation zu wenigstens 30% der Aktivität vor der Konjugation, geeigneterweise wenigstens 50% und vorzugsweise wenigstens 70% der Aktivität vor der Konjugation beibehalten werden.

[0047] Die Konjugate von einem Polypeptid und einem biokompatiblen Polymer, die durch das vorliegende Verfahren erhältlich sind, können als Medikamente verwendet werden. Insbesondere Konjugate von Faktor VIII und einem biokompatiblen Polymer, die gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt wurden, können als ein Medikament verwendet werden. Es ist besonders vorteilhaft, ein Konjugat von Faktor VIII und einem biokompatiblen Polymer zu verwenden, bei welchem der Grad der Konjugation in dem Bereich von 1 bis zu 15 Monoalkyl-verkappten PEG/Faktor VIII-Molekül, geeigneterweise in dem Bereich von 2 bis zu 10 Monoalkyl-verkappten PEG/Faktor VIII-Molekül, vorzugsweise in dem Bereich von 3 bis zu 7 Monoalkyl-verkappten PEG/Faktor VIII-Molekül liegt. In diesem Zusammenhang wird der konjugierte Faktor VIII geeigneterweise durch rekombinante DNA-Technik erzeugt, ist vorzugsweise ein rekombinantes Deletionsderivat des Faktors VIII in voller Länge, das koagulierende Aktivität aufweist, und insbesondere das Deletionsderivat des rekombinanten Faktors VIII SQ (r-VIII SQ).

[0048] Die konjugierten Polypeptide der vorliegenden Erfindung werden geeigneterweise zur subkutanen, intramuskulären, intradermalen oder intravenösen Verabreichung verwendet. Insbesondere kann der konjugierte Faktor VIII zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Hämophilie A und insbesondere zur subkutanen, intramuskulären, intradermalen oder intravenösen Verabreichung eines solchen Medikaments verwendet werden.

[0049] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von Konjugaten von Faktor VIII zur Verwendung bei der Behandlung der Hämophilie A durch subkutane, intramuskuläre, intradermale oder intravenöse Verabreichung eines Konjugats von Faktor VIII und einem biokompatiblen Polymer, das gemäß dem vorliegenden Verfahren hergestellt wurde.

BEISPIELE

[0050] Die folgenden Beispiele werden nur zu Zwecken der Veranschaulichung bereit gestellt und sollen nicht so ausgelegt werden, dass diese den Umfang der vorliegenden Erfindung, welche durch die angeführten Ansprüche definiert ist, in irgendeiner Weise beschränken.

BEISPIEL 1

Herstellung des rekombinanten Faktors VIII

[0051] Die Herstellung des rekombinanten Faktors VIII SQ (r-VIII SQ) wurde in Wesentlichen so durchgeführt, wie in dem Patent WO-A-9109122, Beispiel 1–3, beschrieben wird. Eine DHFR-defizitäre CHO-Zelllinie (DG44N.Y.) wurde mit einem Expressionsvektor, welcher das r-VIII SQ-Gen enthielt, und einem Expressionsvektor, welcher das Dihydrofolatreduktasegen enthielt, elektroporiert. Nach Selektion auf selektiven Medien wurden überlebende Kolonien durch Wachstum in schrittweise ansteigenden Mengen an Methotrexat amplifiziert. Der Überstand von den resultierenden Kolonien wurde einzeln im Hinblick auf Faktor VIII-Aktivität hin gescreent. Ein Produktionsklon wurde ausgewählt, und dieser wurde anschließend an das Wachstum in serumfreier Suspension in einem definierten Medium angepasst, und schließlich wurde ein Zellkultivierungsverfahren in großem Maßstab entwickelt. Der Überstand wird nach gewissen Zeiträumen gesammelt und wie nachstehend beschrieben weiter gereinigt.

[0052] Das konditionierte Medium wurde durch Filtration aufgeklärt, der pH wurde eingestellt, und dann wurde das Filtrat auf eine S Sepharose™ FF-Säule (Säulenvolumen 3 l) geladen. Nach dem Waschen wurde Faktor VIII mit einem Salzpuffer eluiert, welcher 5 mM CaCl₂ und 0,02% Triton™ X-100 enthielt. Dieser Kationenaustauschchromatographie-Schritt wurde bei 2–8°C durchgeführt. Das Eluat von dem S Sepharose™ FF-Schritt (S-Eluat) wurde bis zur weiteren Reinigung eingefroren.

[0053] 700 ml des S-Eluats wurden aufgetaut, und die Temperatur wurde auf Raumtemperatur eingestellt. Eine Vireninaktivierung wurde durch Inkubation für 30 min mit Tri-n-butylphosphat (TNBP) und Triton™ X-100 bei einer Endkonzentration von 0,3% (v/v) bzw. 1,0% (v/v) durchgeführt. Eine Immunaффinitätssäule mit monoklonalem Antikörper (mAB) mit einem Volumen von 260 ml wurde mit einem S-Eluatpuffer äquilibriert, welcher die entsprechenden Mengen an Vireninaktivierungschemikalien enthielt. Die Faktor VIII-Lösung wurde dann auf die mAB-Säule geladen, welche anschließend gewaschen wurde. Die Elution wurde mit einem Puffer durchgeführt, welcher 50% Ethylenglycol enthielt.

[0054] Eine Q Sepharose™-Säule wurde bei einer hohen Konzentration an Natriumchlorid voräquilibriert und dann mit einem Puffer derselben Zusammensetzung wie derjenige, mit welchem die Immunaффinitätssäule elu-

iert wurde, äquilibriert. Das mAB-Eluat wurde aufgeladen, und die Säule wurde dann mit Äquilibrierungspuffer gewaschen, worauf ein Waschpuffer mit physiologischer Ionenstärke folgte. Die Säule wurde eluiert, indem die Natriumchloridkonzentration auf 0,6 M erhöht wurde. Es wurde kein Detergens für die Wäsche und Elution der Q-Säule verwendet. Eine Butyl Sepharose™ 4 FF-Säule wurde mit einem Puffer äquilibriert, der 50 mM Histidin, 1,4 M NH₄Ac, 50 mM CaCl₂ und 0,02% Tween™ 80, pH 6,8, enthielt. NH₄Ac wurde zu dem Q-Eluat bis zu einer Endkonzentration von 1,0 M und Tween™ 80 bis zu 0,02% zugegeben. Diese Lösung wurde bei einer linearen Fließgeschwindigkeit von 60 cm/h auf die Butylgelsäule geladen. Die Säule wurde dann mit 5 Säulenvolumina Äquilibrierungspuffer gewaschen und dann bei einer linearen Fließgeschwindigkeit von 35 cm/h mit einem Puffer, der 50 mM Histidin, 0,5 M NH₄Ac, 50 mM CaCl₂ und 0,02% Tween™ 80, pH 6,8, enthielt, eluiert. Die Reinheit dieses Präparats war sehr hoch, wobei sich eine spezifische Aktivität von 12.000–17.000 IU/mg Protein ergab.

Analyse

[0055] In den Beispielen 1–8 wurde die Faktor VIII-Aktivität mit einem chromogenen Test (Chromogenix AB aus Mölndal, Schweden) analysiert, sofern nicht anderes angegeben ist. Die Menge an Faktor VIII wurde spektrophotometrisch bei A280 und durch Aminosäureanalyse bestimmt. Die Menge an mPEG, das an das Polypeptid gekoppelt war, wurde mit einem Protonen-NMR-Verfahren gemessen (Dreborg, S. und Åkerblom, E. B., Crit. Rev. Therap. Drug Carr. Sys. 6(4), 315–365 (1990)).

BEISPIEL 2 (Vergleichsbeispiel)

Faktor VIII, konjugiert mit einem gemischten Anhydrid von mPEG-Succinat

[0056] Die Pufferzusammensetzung des HIC-Eluats, welches gemäß Beispiel 1 hergestellt wurde, wurde durch Gelpermeationschromatographie ausgetauscht, welche auf einer Superose 12-Säule (vertrieben von Pharmacia Biotech aus Uppsala, Schweden) durchgeführt wurde, die vorher mit einem Puffer der folgenden Zusammensetzung äquilibriert wurde: 0,25 M Hepes, 4 mM CaCl₂, pH 7,8. Zu Aliquots der r-VIII SQ-Lösung wurde ein 35-, 60- und 100facher molarer Überschuss (bezogen auf rVIII) eines gemischten Anhydrids von mPEG-Succinat (MG 3.000) zugegeben. Die Mischungen wurden für 1,5 Stunden auf einer rotierenden Vorrichtung bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Um den Überschuss an mPEG-Bernsteinsäure zu entfernen und die heterogene Population von konjugiertem rVIII entsprechend der Größe aufzutrennen, wurde eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, wobei nun eine Superose 6-Säule (vertrieben von Pharmacia Biotech aus Uppsala, Schweden) verwendet wurde. Aus jeder Kopplungsreaktion wurden die Fraktionen, welche der ersten und zweiten Hälfte des Proteinpeaks entsprachen, getrennt analysiert (in Tabelle I als Pool 1 und Pool 2 bezeichnet). Tabelle I stellt die Ergebnisse des Konjugierens von r-VIII SQ mit dem gemischten Anhydrid von mPEG-Succinat dar.

TABELLE I

	r-VIII SQ (mg)	Menge an zugegebenem mPEG (molarer Überschuss)	Grad der Modifikation (mPEG/rVIII)	Spezif. Aktivität (IU/mg)	Spezif. Akt. (% von nativem r-VIII SQ)
Nativer r-VIII SQ	-	0	0	15.000	100
35*mPEG Pool 1	1,2	35	2,5	4.200	28
35*mPEG Pool 2	1,2	35	1,2	6.800	45
60*mPEG Pool 1	1,6	60	2,4	2.000	13
60*mPEG Pool 2	1,6	60	na	4.800	32
100*mPEG Pool 1	1,1	100	4,8	1.300	9
100*mPEG Pool 2	1,1	100	3,8	2.700	18

[0057] Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, wurde die spezifische Aktivität von rVIII selbst bei diesem niedrigen Grad der Konjugation dramatisch verringert.

BEISPIEL 3

Faktor VIII, adsorbiert an ein O Sepharose™ FF-Gel während der Kopplung mit einem gemischten Anhydrid von mPEG-Succinat

[0058] Reaktive Lysine, die von negativen Ladungen umgeben sind, auf dem Faktor VIII-Molekül wurden vor der Konjugation mit mPEG geschützt, indem der Faktor VIII an ein Anionenaustauschgel adsorbiert wurde. Eine Säule, welche mit Q Sepharose™ FF (vertrieben von Pharmacia Biotech aus Uppsala, Schweden) gepackt war, die mit einem Puffer der folgenden Zusammensetzung äquilibriert war: 50 mM L-Histidin, 0,15 M NaCl, 4 mM CaCl₂, pH 6,5, wurde verwendet, um Faktor VIII zu adsorbieren. Ein HIC-Eluat, das gemäß Beispiel 1 hergestellt wurde, wurde auf die Säule geladen. Um geeignete Bedingungen für die Kopplung mit mPEG zu erhalten, wurde die Säule vor der Zugabe des mPEG mit einem Puffer gewaschen, der 0,25 M Hepes, 4 mM CaCl₂, pH 7,8, enthielt. Das Gel wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, ein gemischtes Anhydrid von mPEG-Succinat (MG 3.000) wurde zu der Aufschlämmung in einer Menge, welche dem molaren Überschuss bezogen auf Faktor VIII, wie er in Tabelle II angegeben ist, entsprach, zugegeben. Die Reaktion wurde unter Rotation für 1,5 Stunden inkubiert. Die Säule wurde dann erneut gepackt, und der konjugierte rVIII wurde mit einem Puffer von 50 mM L-Histidin, 0,6 M NaCl, 4 mM CaCl₂, pH 6,8, eluiert. Es wurden vier Präparationen bei einer konstanten Menge r-VIII SQ, die pro Menge an Gel geladen wurde, hergestellt. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Tabelle II stellt die Resultate mit dem konjugierten r-VIII SQ, adsorbiert an Q Sepharose™ FF-Gel, dar.

TABELLE II

	r-VIII SQ (mg)	Menge an zugegebenem mPEG (molarer Überschuss)	Grad der Modifikation (mPEG/rVIII)	Spezif. Akt. (IU/mg)	Spezif. Akt. (% von nativem r-VIII SQ)
Nativer r-VIII SQ	-	0	0	15.000	100
Präparation 1	1,9	300	3,9	8.400	56
Präparation 2	1,9	370	4,4	7.800	52
Präparation 3	1,9	430	5,6	6.800	45
Präparation 4	1,9	530	9,5	2.800	19

[0059] Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, wird die spezifische Aktivität des konjugierten r-VIII SQ in einem signifikant höheren Ausmaß im Vergleich zu dem r-VIII SQ, der in Beispiel 2 konjugiert wurde, beibehalten.

BEISPIEL 4

FVIII, adsorbiert an ein Q Sepharose™ FF-Gel während der Kopplung mit mPEG-Tresylat

[0060] In diesem Beispiel wurden alle Schritte der Adsorption, Kopplung und Elution von r-VIII SQ auf Q Sepharose™ FF-Gel wie in Beispiel 3 durchgeführt. mPEG-Tresylat (MG 5.000) wurde verwendet, um Faktor VIII zu konjugieren. Tabelle III stellt die Ergebnisse von konjugiertem r-VIII SQ, adsorbiert an ein Q Sepharose™ FF-Gel, mit mPEG-Tresylat gemäß der Erfindung dar.

TABELLE III

	r-VIII SQ (mg)	Menge an zugegebenem mPEG (molarer Überschuss)	Grad der Modifikation (mPEG/rVIII)	Spezif. Akt. (IU/mg)	Spezif. Akt. (% von nativem r-VIII SQ)
Nativer r-VIII SQ	-	0	0	15.000	100
Präparation 1	1,8	300	2,2	9.600	64
Präparation 2	1,8	400	na	8.300	55
Präparation 3	1,8	500	5,8	3.400	23

[0061] Die spezifische Aktivität war die diesem Fall, möglicherweise aufgrund des höheren Molekulargewichts von mPEG, etwas niedriger als in Beispiel 3.

BEISPIEL 5

Faktor VIII, adsorbiert an ein Tentakel-Anionenaustauschgel während der Kopplung mit einem gemischten Anhydrid von mPEG-Succinat

[0062] Eine Säule, die mit Fractogel™ EMD TMAE 650 (vertrieben von Merck) gepackt war, wurde verwendet, um r-VIII SQ zu adsorbieren. Alle Schritte wurden wie in Beispiel 3 durchgeführt. Tabelle IV stellt die Ergebnisse aus der Konjugation von r-VIII SQ, adsorbiert an ein Tentakel-Anionenaustauschgel, mit einem gemischten Anhydrid von mPEG-Succinat gemäß der Erfindung dar.

TABELLE IV

	r-VIII SQ (mg)	Menge an zugegebenem mPEG (molarer Überschuss)	Grad der Modifikation (mPEG/rVIII)	Spezif. Akt. (IU/mg)	Spezif. Akt. (% von nativem r-VIII SQ)
Nativer r-VIII SQ	-	0	0	15.000	100
Präparation 1	2,0	300	na	na	
Präparation 2	2,0	500	na	2.100	14

BEISPIEL 6

Thrombinaktivierung von mPEG-konjugiertem Faktor VIII

[0063] Die Thrombinaktivierung von konjugiertem r-VIII SQ wurde in einem in-vitro-Test getestet, welcher den Fachleuten wohlbekannt ist. Eine Probe, die gemäß Beispiel 3 hergestellt wurde, was zu einem Derivatisierungsgrad von 4 mPEG/r-VIII SQ führte, wurde getestet. Der konjugierte r-VIII SQ konnte durch menschliches Thrombin in einer dosisabhängigen Weise aktiviert werden. Die Inaktivierung wurde anschließend verfolgt. In [Fig. 1](#) ist die Kurve von Aktivitätsänderungen, die erhalten wurden, gezeigt, wenn 1 NIH-Einheit an Thrombin pro 1 Einheit an konjugiertem r-VIII SQ zugegeben wurde. Ein einstufiges Gerinnungsverfahren, das im Wesentlichen gemäß Mikaelsson et al., 1983, Blood 62, S. 1006 durchgeführt wurde, wurde zum unmittelbaren Test von Proben aus der Reaktionsmischung verwendet. Eine dreißigfache Aktivierung wurde innerhalb von einer Minute erhalten, worauf eine Inaktivierung folgte. Die Aktivierungs-Inaktivierungsmuster, die mit Thrombin erhalten wurden, waren in Übereinstimmung mit früher berichteten Untersuchungen über die Interaktion Faktor VIII-Thrombin (Fulcher et al., 1983, Blood, 61, S. 807, Andersson et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, S. 2979, Eaton et al., 1986, Biochemistry, 25, S. 505, Rotblat et al., 1985, Biochemistry, 24, S. 4294).

BEISPIEL 7

Stabilitätstests mit mPEGyliertem Faktor VIII in einem Extrakt aus Schweinegewebe

[0064] Um den Einfluss der mPEG-Konjugation auf die Stabilität von Faktor VIII in einer Lösung, welche für die subkutane Umgebung repräsentativ ist, auszuwerten, wurde ein in vitro-Test unter Verwendung eines Extrakts aus Schweinegewebe durchgeführt. Zwei Präparationen von mPEG-konjugiertem Faktor VIII wurden wie in Beispiel 3 beschreiben hergestellt und in dem Extrakt inkubiert, und Aliquots wurden nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden im Hinblick auf die Koagulationsaktivität analysiert, wobei ein chromogener Test verwendet wurde. Während der ersten 6 Stunden korrelierte der Konjugationsgrad mit der verbleibenden Aktivität.

TABELLE V

	Verbleibende Aktivität (%) 0 h	Verbleibende Aktivität (%) 2 h	Verbleibende Aktivität (%) 4 h	Verbleibende Aktivität (%) 6 h	Verbleibende Aktivität (%) 24 h
Nativer r-VIII SQ (Kontrolle)	100	45	13	6	0
4,4 mPEG/rVIII	100	96	93	78	32
9,5 mPEG/rVIII	100	100	107	102	47

[0065] Die Ergebnisse in Tabelle V und [Fig. 2](#) zeigen deutlich, dass die mPEG-Konjugation die Stabilität von Faktor VIII signifikant erhöht.

BEISPIEL 8

Bioverfügbarkeitsuntersuchung von mPEGyliertem Faktor VIII in Makakenaffen

[0066] Um den Einfluss der mPEG-Konjugation auf die in vivo-Stabilität von Faktor VIII auszuwerten, wurde eine pharmakokinetische Untersuchung durchgeführt. Zwei Präparationen von mit mPEG konjugiertem Faktor VIII wurden wie in Beispiel 3 beschrieben hergestellt, und deren spezifische Aktivitäten wurden bestimmt, wie in Tabelle VI angegeben ist. Um eine hohe Homogenität des derivatisierten Materials zu erreichen, das durch den Kopplungsvorgang erzeugt wurde, wurde eine Fraktionierung jeder Präparation zweimal durch Gelpermeationschromatographie durchgeführt. Eine Superdex 200 PG XK 16/60-Säule (vertrieben von Pharmacia Biotech aus Uppsala, Schweden), welche mit 19 mM L-Histidin, 0,31 M NaCl, 3,4 mM CaCl₂, 0,02% Tween 80, pH 7,0 äquilibriert war, wurde verwendet. Eine Volumenreduktion der Faktor VIII-Lösungen vor der zweiten Gelpermeationschromatographie wurde in autoklavierten Centriplus 30-Konzentratoren, Ultrafiltrationsvorrichtungen für die Zentrifuge (Cutoff 30 kDa, vertrieben von der Amicon Inc. MA, USA) durchgeführt. Die Lösungen wurden dreimal bei 2.500 × g für 45 min konzentriert. Die gepoolten Fraktionen, die nach der zweiten Gelpermeationschromatographie erhalten wurden, wurden anschließend in einem Puffer verdünnt, welcher der folgenden endgültigen Formulierung entsprach: 19 mM L-Histidin, 0,31 M NaCl, 3,4 mM CaCl₂, 0,02% Tween 80, 17,5 mM Sucrose, pH 7,0. Die Proteinlösungen wurden schließlich filtriert, wobei 0,22 µm Millex GV-Filter (vertrieben von Millipore, MA, USA) verwendet wurden, und anschließend in autoklavierte Flaschen gefüllt. Die Lösungen wurden bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

[0067] Sechs weiblichen Makakenaffen wurden zu verschiedenen Gelegenheiten einzelne intravenöse Dosen der Präparation 1 mit 250 IU/kg und einzelne subkutane Dosen der Präparation 1 und der Präparation 2 mit 1.500 IU/kg verabreicht. Alle Lösungen wurden vor der Verabreichung 1:1 mit Wasser zur Injektion verdünnt. Die Injektionsstelle für die subkutane Verabreichung war der linke oder rechte Dorsalbereich des Tieres bzw. für die intravenöse Verabreichung die linke oder die rechte Vena cephalica. Blutproben wurden zu den folgenden Zeitpunkten nach der Injektion von allen Tieren über eine Punktion der Vena femoralis in Röhrchen entnommen, die Natriumcitrat als Antikoagulans (10% des Gesamtvolumens) enthielten:

Intravenöse Verabreichung: 0 (vor Dosis), 0,25, 1, 2, 4, 8, 24, 30, 48 h.

Subkutane Verabreichung: 0 (vor Dosis), 3, 6, 9, 12, 15, 24, 30, 48 h.

[0068] Eine pharmakokinetische Untersuchung des nicht konjugierten Faktors VIII wurde in einer getrennten Untersuchung mit derselben Spezies durchgeführt. Die Dosen, der Verabreichungsweg und die Ergebnisse (Mittelwert (\pm Standardabweichung (SD))) sind in Tabelle VI gezeigt.

TABELLE VI

	Spezifische Aktivität (IU/mg)	Verabreichungsweg	Dosen (IU/kg)	Halbwertszeit (h)	Bioverfügbarkeit (F ¹⁾) (Mittel \pm SD)
Nicht konjugierter r-VIII SQ	15.000	I.V.	250	6,7	-
mPEG - rVIII Präparation 1	10.000	I.V.	250	8,3	-
Nicht konjugierter r-VIII SQ	15.000	S.C.	2.500	-	0,053 (0,021)
mPEG - rVIII Präparation 1	10.000	S.C.	1.500	-	0,22 (0,13)
mPEG - rVIII Präparation 2	6.700	S.C.	1.500	-	0,19 (0,15)

I.V. = intravenös

S.C. = subkutan

$${}^1)F = \frac{\text{AUC (S.C.)} \times \text{DOSIS (I.V.)}}{\text{AUC (I.V.)} \times \text{DOSIS (S.C.)}}$$

wobei AUC die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve ist.

[0069] Wie aus Tabelle VI ersichtlich ist, führte die subkutane Verabreichung von beiden Präparationen des mPEG-konjugierten Faktors VIII zu einer deutlich höheren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu der subkutanen Verabreichung von nicht konjugiertem r-VIII SQ. Eine statistische Analyse unter Verwendung des Studenten-T-Tests bestätigte, dass der Unterschied signifikant war.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verbesserung der in vivo-Funktion von Faktor VIII durch Abschirmen von exponierten Zielstellen dieses Polypeptids, gekennzeichnet durch
 - (a) Immobilisieren von Faktor VIII durch Interaktion mit einem Gruppen-spezifischen Adsorbens, das Anionenaustauschliganden trägt,
 - (b) Aktivieren eines biokompatiblen Polymers,
 - (c) Konjugieren des aktivierten biokompatiblen Polymers an externe Stellen des immobilisierten Faktors VIII, und
 - (d) Eluieren des Konjugats von dem Adsorbens.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin der Faktor VIII ein rekombinanter Faktor VIII ist.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, worin das biokompatible Polymer aus der Gruppe be-

stehend aus Homopolymeren, Copolymeren oder Blockcopolymeren von Monoalkyl-verkappten Polyalkylenoxiden gewählt ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, worin das Monoalkyl-verkappte Polyalkylenoxid aus der Gruppe bestehend aus Polyethylenglycol-Homopolymeren und Polypropylenglycol-Homopolymeren gewählt ist.

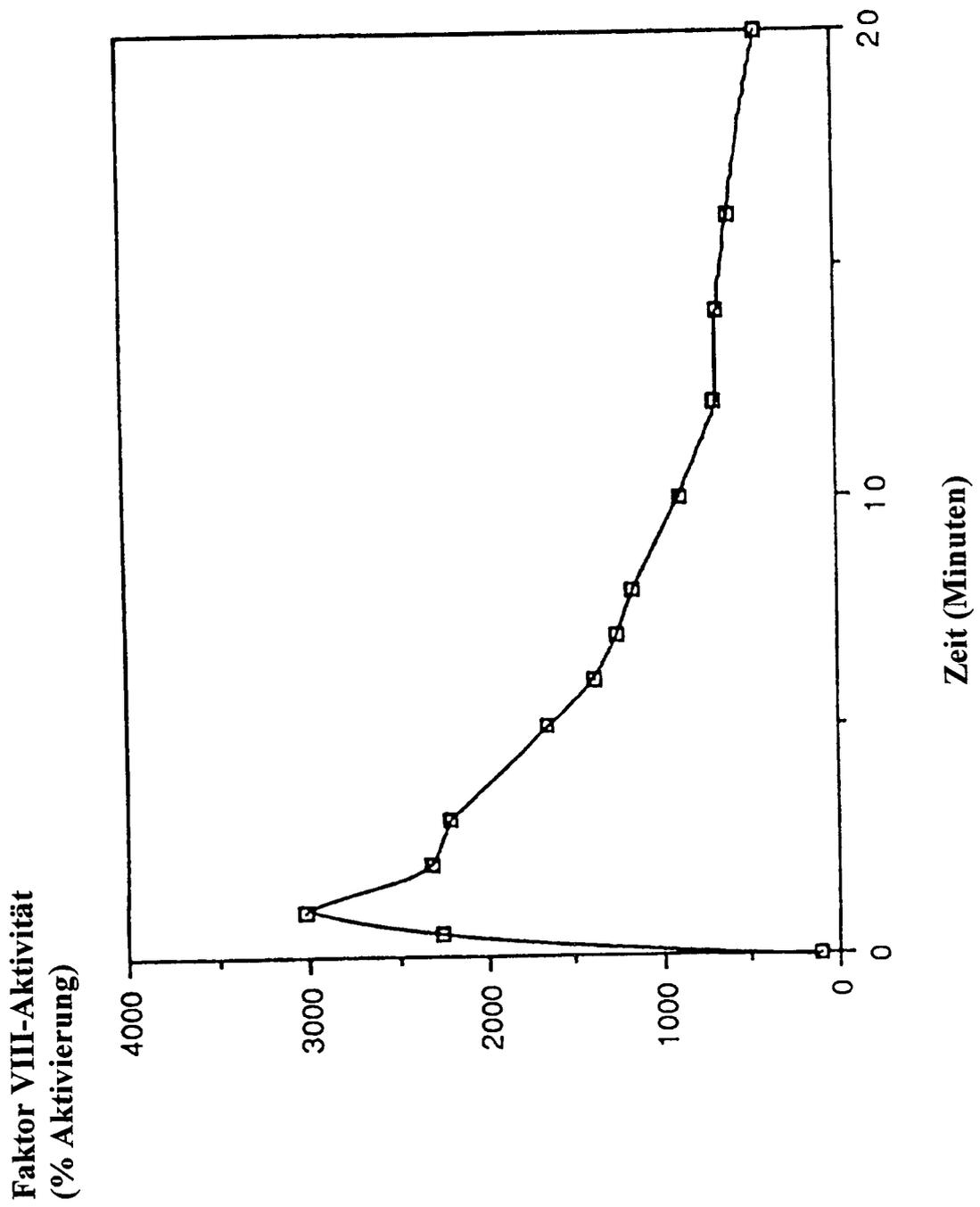
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, worin das Monoalkyl-verkappte Polyalkylenoxid ein Monomethoxy-Polyethylenglycol (mPEG) ist.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, worin die Anionenaustauschliganden aus der Gruppe bestehend aus quaternärem Aminomethyl, quaternärem Aminoethyl und Trimethylaminoethyl oder einer Mischung davon gewählt sind.

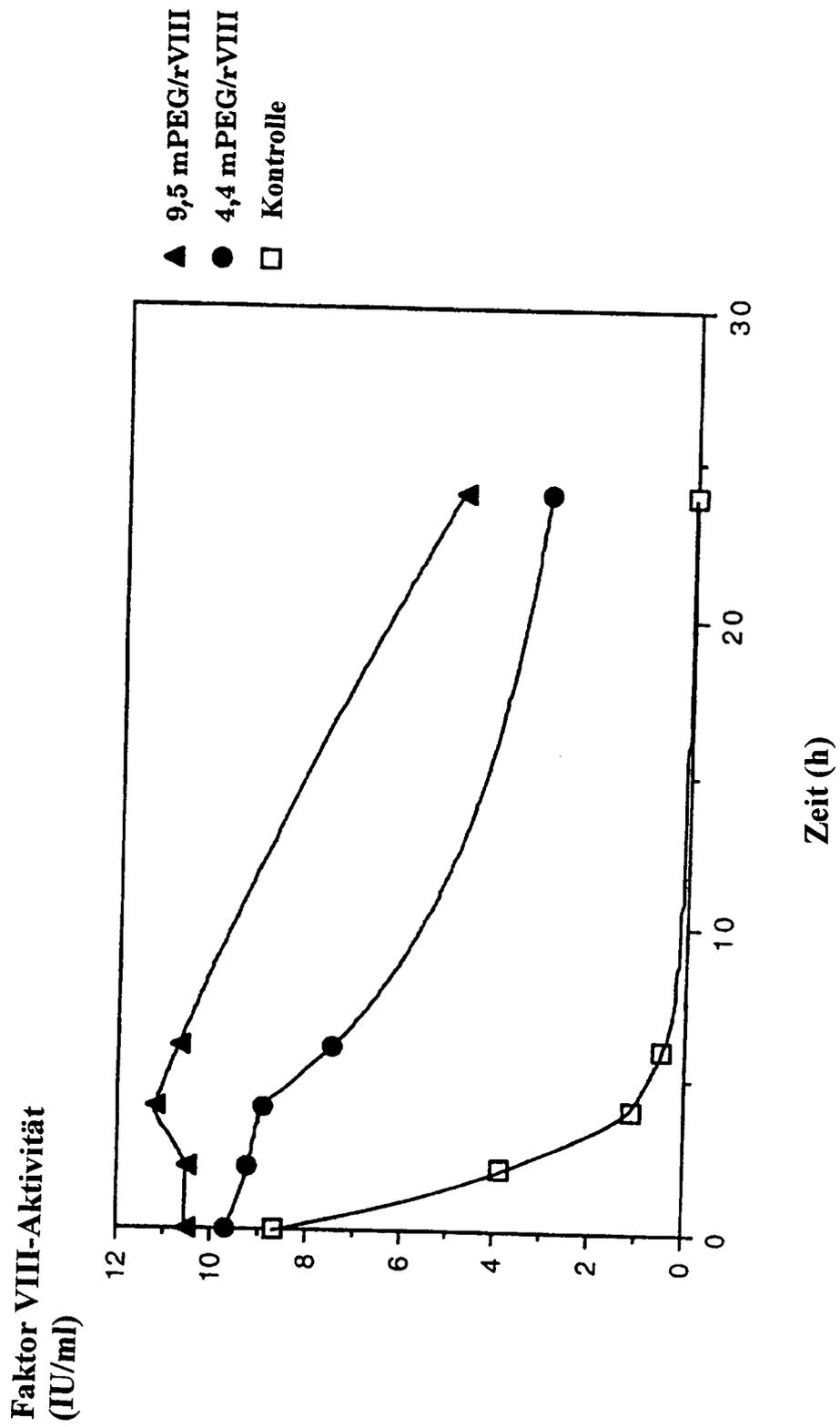
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Hämophilie A.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Verwendung bei der Herstellung eines Medikaments, das zur subkutanen Verabreichung zur Behandlung von Hämophilie A verwendbar ist.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen



Figur 1



Figur 2