(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 36 409 T2** 2008.04.17

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 421 956 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 36 409.4**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 003 053.8**
(96) Europäischer Anmeldetag: **28.04.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.05.2004**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **27.06.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.04.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 47/48*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
83339 P **28.04.1998** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Laboratoires Serono S.A., Coinsins, Vaud, CH

(74) Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert, 80539 München

(72) Erfinder:
El Tayar, Nabil, Milton MA 02186, US; Roberts, Michael J., Madison, AL 35758, US; Harris, Milton, Huntsville AL 35801, US; Sawlivich, Wayne, Wilmington MA 01887, US

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur schrittweise Bindung von Polyethylenglykol (PEG) an Polypeptide**

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 bezieht sich auf ein Verfahren für die schrittweise Bindung von zwei oder mehr PEG-Gruppierungen an ein Polypeptid.

[0002] Offenbart werden auch Polyol-IFN-β-Konjugate, in denen eine Polyol-Einheit kovalent an Cys^{17} gebunden ist, und das Verfahren für ihre ortsspezifische Produktion sowie ihre Verwendung in der Therapie, Prognose oder Diagnose von bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, Autoimmunerkrankungen und inflammatorischen Erkrankungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Humanes Fibroblasten-Interferon (IFN-β) hat antivirale Aktivität und kann auch natürliche Killerzellen gegen neoplastische Zellen stimulieren. Es ist ein Polypeptid mit etwa 20.000 Da, das durch Viren und doppelt-strängige RNAs induziert wird. Aus der Nucleotidsequenz des Gens für Fibroblasten-Interferon, kloniert durch DNA-Rekombinations-Technologie, leiteten Derynk et al. (Nature, 285:542–547, 1980) die vollständige Aminosäuresequenz des Proteins ab. Es ist 166 Aminosäuren lang.

[0004] Shepard et al. (Nature, 294:563–565, 1981) beschrieben eine Mutation an der Base 842 (Cys-Tyr an Position 141), die seine antivirale Aktivität aufhob, und einen varianten Klon mit einer Deletion der Nucleotide 1119–1121.

[0005] Market al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(18):5662–5666, 1984) insertierten eine künstliche Mutation durch Ersetzen der Base 469 (T) mit (A), was einen Aminosäure-Switch von Cys-Ser in Position 17 verursacht. Das resultierende IFN-β wurde als ebenso aktiv wie das "native" IFN-β beschrieben und während einer Langzeitlagerung (–70°C) als stabil beschrieben.

[0006] Eine kovalente Bindung des hydrophilen Polymers Polyethylenglycol, (PEG), auch bekannt als Polyethylenoxid, (PEO), an Moleküle hat in der Biotechnologie und in der Medizin wichtige Anwendungen. In der gängigsten Form ist PEG ein lineares Polymer, das an jedem Ende Hydroxylgruppen hat: $HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2\text{-}OH$.

[0007] Diese Formel kann kurz als HO-PEG-OH dargestellt werden, wobei gemeint ist, dass -PEG- die Polymerhauptkette ohne die terminalen Gruppen darstellt: "-PEG-" bedeutet "$-CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2-$".

[0008] PEG wird üblicherweise als Methoxy-PEG-OH, (m-PEG), verwendet, bei dem ein Ende die relativ inerte Methoxygruppe ist, während das andere Ende eine Hydroxylgruppe ist, die einer chemischen Modifikation unterzogen wird. $CH_3O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}OH$.

[0009] Verzweigte PEGs sind ebenfalls in gängiger Verwendung. Die verzweigten PEGs können als $R(\text{-}PEG\text{-}OH)_m$ dargestellt werden, worin R eine zentrale Kern-Gruppierung, z.B. Pentaerythrit oder Glycerin, darstellt und m die Anzahl der Verzweigungsarme darstellt. Die Anzahl der Verzweigungsarme (m) kann im Bereich von drei bis einhundert oder mehr liegen. Die Hydroxylgruppen werden einer chemischen Modifikation unterzogen.

[0010] Eine andere verzweigte Form, z.B. die, die in der PCT-Patentanmeldung WO 96/21469 beschrieben ist, hat ein einzelnes Ende bzw. einen einzelnen Terminus, das/der einer chemischen Modifikation unterzogen wird. Dieser PEG-Typ kann als $(CH_3O\text{-}PEG\text{-})_pR\text{-}X$, dargestellt werden, worin p gleich 2 oder 3 ist, R einen zentralen Kern, z.B. Lysin oder Glycerin darstellt, und X eine funktionelle Gruppe, z.B. Carboxyl, darstellt, die einer chemischen Aktivierung unterzogen wird. Noch eine andere verzweigte Form, das "Pendant-PEG" bzw. "vorstehende PEG", hat reaktive Gruppen, z.B. Carboxyl, entlang der PEG-Hauptkette anstatt am Ende der PEG-Ketten.

[0011] Zusätzlich zu diesen Formen von PEG kann das Polymer auch mit schwachen oder abbaubaren Bindungen in der Hauptkette hergestellt werden. Beispielsweise hat Harris in der US-Patentanmeldung Nr. 06/026,716 gezeigt, dass PEG mit Esterbindungen in der Hauptkette hergestellt werden kann, die einer Hydrolyse unterzogen werden. Die Hydrolyse resultiert in der Spaltung des Polymers in Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht, und zwar nach dem Reaktionsschema: $\text{-PEG-}CO_2\text{-PEG} + H_2O \rightarrow \text{-PEG-}CO_2H + HO\text{-PEG-}$

[0012] Gemäß der vorliegenden Erfindung soll der Ausdruck Polyethylenglycol oder PEG alle oben beschriebenen Derivate umfassen.

[0013] Die Copolymere von Ethylenoxid und Propylenoxid sind in ihrer Chemie eng mit PEG verwandt, und sie können anstelle von PEG in vielen seiner Anwendungen eingesetzt werden. Sie haben die folgende allgemeine Formel: $HO\text{-}CH_2CHRO(CH_2CHRO)_nCH_2CHR\text{-}OH$, worin R für H oder CH_3 steht.

[0014] PEG ist ein nützliches Polymer mit der Eigenschaft hoher Wasserlöslichkeit wie auch hoher Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln. PEG ist auch nicht-toxisch und nicht-immunogen. Wenn PEG chemisch an eine in Wasser unlösliche Verbindung gebunden wird (PEGylierung), ist das resultierende Konjugat im Allgemeinen wasserlöslich sowie auch in vielen organischen Lösungsmitteln löslich.

[0015] PEG-Protein-Konjugate werden derzeit in Proteinersatztherapien und für andere therapeutische Zwecke eingesetzt. Beispielsweise wird PEGylierte Adenosindeaminase (ADA-GEN®) verwendet, um schweren kombinierten Immundefekt ("severe combined immunodeficiency disease" (SCIDS) zu behandeln; PEGylierte L-Asparaginase (ONCAPSPAR®) wird verwendet, um akute Lymphoblasten-Leukämie (ALL) zu behandeln, und PEGyliertes Interferon-α (INTRON(R) A) ist in Versuchen der Phase III zur Behandlung von Hepatitis C.

[0016] Für eine allgemeine Übersicht von PEG-Protein-Konjugaten mit klinischer Wirksamkeit wird auf N.L. Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15:210–218, 1994, verwiesen.

[0017] Es wurde eine Vielzahl von Verfahren entwickelt, um Proteine zu PEGylieren. Goodson R.J. et al., Bio/Technology, Band 8, Nr. 4, 1. April 1990, Seiten 343–346, offenbarten z.B. die ortsspezifische PEGylierung von rekombinantem Interleukin-2 an seiner Glycosylierungsstelle.

[0018] Außerdem bezieht sich WO 98/32466 A auf ein Verfahren für eine direkte kovalente PEGylierung eines Substrats, umfassend die Reaktion eines halogenierten PEG mit dem Substrat, wobei das Halogen des halogenierten PEG als Abgangsgruppe in der PEGylierungsreaktion wirkt.

[0019] Zusätzlich beschreibt WO 97/11957 A Konjugate eines Polypeptids und eines biokompatiblen Polymers, insbesondere von Faktor VIII mit einer hohen spezifischen Aktivität unter Verwendung von Monomethoxypolyalkylenoxid (mPEG) als das biokompatible Polymer; und EP 0 690 127 A bezieht sich auf ein mono-PEGyliertes MGDF-Polypeptid.

[0020] Ein Binden von PEG an reaktive Gruppen, die an dem Protein gefunden werden, erfolgt typischerweise unter Nutzung von elektrophil aktivierten PEG-Derivaten. Ein Binden von PEG an die α- und ε-Aminogruppen, die an Lysinresten gefunden werden, und an das N-Ende bzw. den N-Terminus resultiert in einem Konjugat, das aus einem Gemisch von Produkten besteht.

[0021] Im Allgemeinen bestehen solche Konjugate aus einer Population der verschiedenen PEG-Moleküle, die pro Proteinmolekül gebunden sind ("PEGmere"), die im Bereich von Null bis zu der Anzahl von Aminogruppen im Protein reichen. Für ein Proteinmolekül, das einzeln modifiziert ist, kann die PEG-Einheit an eine Reihe von unterschiedlichen Aminstellen gebunden sein.

[0022] Dieser Typ einer nicht-spezifischen PEGylierung resultierte in einer Reihe von Konjugaten, die fast inaktiv werden. Eine Aktivitätsverringerung wird typischerweise durch Abschirmen der aktiven Bindungsdomäne des Proteins bewirkt, wie es bei vielen Cytokinen und Antikörpern der Fall ist. Beispielsweise beschreiben Katre et al. im US-Patent 4,766,106 und im US-Patent 4,917,888 die PEGylierung von IFN-β und IL-2 mit einem großen Überschuss an Methoxy-polyethylenglycolyl-N-succinimidylglutarat und Methoxy-polyethylenglycolyl-N-succinimidylsuccinat. Beide Proteine wurden in mikrobiellen Wirtszellen produziert, die die ortsspezifische Mutation des freien Cysteins zu einem Serin erlaubten. Die Mutation war in der mikrobiellen Expression von IFN-β notwendig, um eine Proteinfaltung zu erleichtern. Das in diesen Experimenten verwendete IFN-β ist insbesondere das kommerzielle Produkt Betaseron®, in dem der Cys^{17}-Rest durch ein Serin ersetzt ist. Zusätzlich reduzierte das Fehlen einer Glycosylierung seine Löslichkeit in wässriger Lösung. Eine nicht-spezifische PEGylierung resultierte in einer erhöhten Löslichkeit, allerdings waren der verringerte Aktivitätslevel und die verringerte Ausbeute ein Hauptproblem.

[0023] Die Europäische Patentanmeldung EP 0 593 868 mit dem Titel "PEG-Interferon-Konjugate" beschreibt die Herstellung von PEG-IFN-α-Konjugaten. Allerdings ist die PEGylierungsreaktion nicht ortsspezifisch und daher wird ein Gemisch von Positionsisomeren von PEG-IFN-α-Konjugaten erhalten (siehe auch Monkarsh et

al., ACS Symp. Ser., 680:207–216, 1997).

[0024] Kinstler et al. bewiesen in der Europäischen Patentanmeldung EP 0 675 201 die selektive Modifikation des N-terminalen Rests von Megakaryozytenwachstums- und -entwicklungsfaktor (MGDF) mit mPEG-Propionaldehyd. Dies sorgte für eine reproduzierbare PEGylierung und reproduzierbare Pharmacokinetik von Charge zu Charge. Gilbert et al. bewiesen im US-Patent 5,711,944, dass eine PEGylierung von IFN-α mit einem optimalen Aktivitätslevel produziert werden konnte. In diesem Fall war ein mühsamer Reinigungsschritt erforderlich, um das optimale Konjugat zu erhalten.

[0025] Die Mehrheit der Cytokine wie auch anderer Proteine besitzt keine spezifische PEG-Bindungsstelle und außer den oben genannten Beispielen ist es sehr wahrscheinlich, dass einige der Isomeren, die durch die PEGylierungsreaktion produziert werden, partiell oder vollständig inaktiv sind, was einen Aktivitätsverlust des Endgemisches verursacht.

[0026] Eine ortsspezifische mono-PEGylierung ist somit ein wünschenswertes Ziel bei der Herstellung von solchen Proteinkonjugaten.

[0027] Woghiren et al. synthetisierten gemäß Bioconjugate Chem., 4(5):314–318, 1993 ein Thiol-selektives PEG-Derivat für eine solche ortsspezifische PEGylierung. Es wurde gezeigt, dass ein stabiles Thiol-geschütztes PEG-Derivat in Form einer reaktiven para-Pyridyldisulfid-Gruppe spezifisch an das freie Cystein im Protein, Papain, konjugiert. Die neu gebildete Disulfidbindung zwischen Papain und PEG könnte unter milden reduzierenden Bedingungen unter Regeneration des nativen Proteins gespalten werden.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0028] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur schrittweisen Bindung von PEG-Gruppierungen der Reihe nach an ein Polypeptid bereit, umfassend die Schritte: Umsetzen eines Polypeptids mit einer heterobifunktionellen oder homobifunktionellen PEG-Gruppierung, die ein Molekulargewicht im Bereich von 100 bis 5.000 Dalton hat und die die folgende Formel hat: W-$CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2$-X, worin W und X Gruppen sind, die unabhängig mit einer funktionellen Amin-, Sulfhydryl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppe unter Bindung der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht an das Polypeptid reagieren; und
Umsetzen der an das Polypeptid gebundenen PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht mit einer monofunktionellen oder bifunktionellen PEG-Gruppierung, deren Molekulargewicht im Bereich von 100 Dalton bis 200 Kilodalton ist, um die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung an ein freies Ende der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht zu binden und ein PEG-Polypeptid-Konjugat zu bilden.

[0029] Offenbart werden auch Polyol-IFN-β-Konjugate und insbesondere PEG-IFN-β-Konjugate, in denen eine Polyoleinheit kovalent an Cys^{17} gebunden ist. Die spezifische Konjugation wird erreicht, indem ein Thiol-reaktives Polyolagens mit dem Cys^{17}-Rest in IFN-β reagieren gelassen wird. Von solchen Konjugaten wird erwartet, dass sie in vivo eine erhöhte Wirksamkeit zeigen. Das Ziel ist es, eine erhöhte Löslichkeit bei neutralem pH, erhöhte Stabilität (verringerte Aggregation), verringerte Immunogenität und keinen Aktivitätsverlust im Vergleich zu "nativem" IFN-β zu erhalten. Die Resultate einer solchen Konjugation würden die Anzahl der Dosen für eine angestrebte Wirkung verringern, die Formulierung einer pharmazeutischen Zusammensetzung vereinfachen und stabilisieren und möglicherweise die Langzeitwirksamkeit erhöhen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0030] Fig. 1 zeigt den Kapillarelektrophorese (CE)-Graph des PEG-IFN-β-Konjugats vor Reinigung.

[0031] Fig. 2A–Fig. 2C zeigen die Reinigung des PEG-IFN-β-Konjugats, die durch Größenausschlusschromatographie durchgeführt wird (Superose 12): Fig. 2A – erster Durchgang; Fig. 2B – zweiter Durchgang; Fig. 2C – dritter Durchgang.

[0032] Fig. 3 zeigt die SDS-PAGE-Chromatographie von gereinigtem PEG-IFN-β-Konjugat aus dem dritten Chromatographiedurchgang. Die Bahnen 1 und 4 sind Proteinmolekulargewichtsstandards, Bahn 2 ist "natives" IFN-β und Bahn 3 ist PEG-IFN-β-Konjugat.

[0033] Fig. 4 zeigt den Kapillarelektrophorese (CE)-Graph von gereinigtem PEG-IFN-β-Konjugat, in dem IFN-β mit mPEG-$OPSS_{5k}$ PEGyliert ist.

[0034] Fig. 5 zeigt das MALDI MS-Spektrum von gereinigtem PEG-IFN-β-Konjugat.

[0035] Fig. 6 zeigt einen Vergleich zwischen der antiviralen Aktivität von "nativem" IFN-β und von PEG-IFN-β-Konjugat. WISH-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von IFN-β-Proben für 24 Stunden vor Angriff mit einer cytophatischen Dosis von vesikulärem Stomatitis-Virus inkubiert. Die cytopathische Wirkung wurde nach weiteren 48 Stunden durch MTT-Umwandlung bestimmt.

[0036] Fig. 7 zeigt das Bindungsprofil von IFN-β und PEG-IFN in Daudi-Zellen.

[0037] Fig. 8 zeigt das pharmakokinetische Profil von IFN-β und PEG-IFN in Mäusen nach intravenöser Verabreichung. Die gestrichelten Linien zeigen das Assay-LOQ für jede Standardkurve.

[0038] Fig. 9 zeigt das pharmakokinetische Profil von IFN-β und PEG-IFN in Mäusen nach subkutaner Verabreichung. Die gestrichelten Linien zeigen das Assay-LOQ für jede Standardkurve.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0039] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass die Bindung einer Polyol-Gruppierung, spezifischer einer PEG-Gruppierung, an den Cys^{17}-Rest von humanem IFN-β die biologische IFN-β-Aktivität unerwartet erhöht (oder zumindest beibehält und nicht in einer Verringerung resultiert), und zwar im Vergleich zu nativem humanem Interferon-β. Somit weist IFN-β mit einer Polyol-Gruppierung an den Cys^{17}-Rest gebunden nicht nur dieselbe oder erhöhte biologische IFN-β-Aktivität auf, sondern dieses Polyol-IFN-β-Konjugat stellt auch die wünschenswerten Eigenschaften bereit, die durch die Polyol-Gruppierung verliehen werden, z.B. erhöhte Löslichkeit.

[0040] "IFN-β", wie der Ausdruck hierin verwendet wird, meint humanes Fibroblasten-Interferon, wie es durch Isolierung aus biologischen Flüssigkeiten oder durch DNA-Rekombinationstechniken aus prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erhalten wird, sowie seine Salze, funktionellen Derivate, Vorläufer und aktiven Fraktionen, vorausgesetzt, dass sie den Cysteinrest, der in Position 17 in der natürlich vorkommenden Form auftritt, enthalten.

[0041] Die Polyol-Gruppierung in dem Polyol-IFN-β-Konjugat kann ein beliebiges wasserlösliches mono- oder bifunktionelles Poly(alkylenoxid) mit einer linearen oder verzweigten Kette sein. Typischerweise ist das Polyol ein Poly(alkylenglycol), z.B. Poly(ethylenglycol) (PEG). Allerdings wird der Fachmann erkennen, dass andere Polyole, z.B. Poly(propylenglycol) und Copolymere von Polyethylenglycol und Polypropylenglycol, geeigneterweise verwendet werden können.

[0042] Der Ausdruck "PEG-Gruppierung", wie er hier verwendet wird, soll lineares und verzweigtes PEG, Methoxy-PEG, hydrolytisch oder enzymatisch abbaubares PEG, herausragendes PEG, Dendrimer-PEG, Copolymere von PEG und einem oder mehreren Polyolen und Copolymere von PEG und PLGA (Poly(milchsäure/glycolsäure)) umfassen, ist aber nicht auf diese beschränkt.

[0043] Die Definition "Salze", wie sie hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf Salze der Carboxylgruppen als auch auf Salze der Aminofunktionen der Verbindung, die durch bekannte Verfahren erhältlich sind. Die Salze der Carboxylgruppen umfassen anorganische Salze, wie z.B. Natrium-, Kalium-, Calciumsalze, und Salze mit organischen Basen, wie die, die mit einem Amin wie Triethanolamin, Arginin oder Lysin gebildet werden. Die Salze der Aminogruppen schließen z.B. Salze mit anorganischen Säuren wie Salzsäure und mit organischen Säuren wie Essigsäure ein.

[0044] Die Definition für "funktionelle Derivate", wie sie hierin verwendet wird, bezieht sich auf Derivate, die aus den funktionellen Gruppen, die an den Seitenketten der Aminosäure-Gruppierungen oder an den N- oder C-terminalen Gruppen vorliegen, nach bekannten Verfahren hergestellt werden können; sie sind in der vorliegenden Erfindung enthalten, wenn sie pharmazeutisch annehmbar sind, d.h. wenn sie die Proteinaktivität nicht zerstören oder den pharmazeutischen Zusammensetzungen, die sie enthalten, keine Toxizität verleihen. Solche Derivate umfassen z.B. Ester oder aliphatische Amide der Carboxylgruppen und N-Acylderivate von freien Aminogruppen oder O-Acylderivate von freien Hydroxylgruppen und werden mit Acylgruppen, wie z.B. Alkanoyl- oder Aroylgruppen, gebildet.

[0045] Die "Vorläufer" sind Verbindungen, die im menschlichen oder tierischen Körper in IFN-β umgewandelt werden.

[0046] Als "aktive Fraktionen" des Proteins bezieht sich die Erfindung auf ein beliebiges Fragment oder einen beliebigen Vorläufer der Peptidkette der Verbindung selbst, allein oder in Kombination mit verwandten Molekülen oder Resten, die daran gebunden sind, z.B. Zucker- oder Phosphat-Reste oder Aggregate des Polypeptidmoleküls, wenn solche Fragmente oder Vorläufer dieselbe Aktivität von IFN-β als Medikament zeigen.

[0047] Ein PEG-Polypeptid-Konjugat kann nach einem beliebigen der Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, hergestellt werden. Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird IFN-β mit dem PEGylierungsmittel in einem geeigneten Lösungsmittel umgesetzt und das gewünschte Konjugat wird isoliert und gereinigt, z.B. durch Anwenden eines oder mehrerer chromatographischer Verfahren.

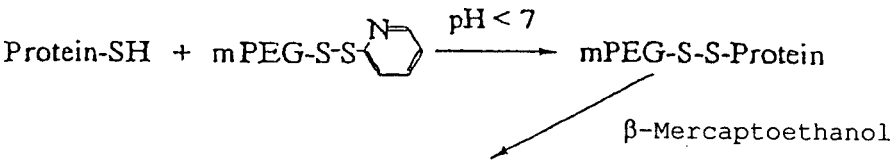
[0048] "Chromatographisches Verfahren" meint eine beliebige Technik, die verwendet wird, um die Komponenten eines Gemisches durch ihre Auftragung auf einen Träger (stationäre Phase), durch den ein Lösungsmittel (mobile Phase) strömt, zu trennen. Die Trennprinzipien der Chromatographie basieren auf der unterschiedlichen physikalischen Natur der stationären und der mobilen Phase.

[0049] Einige besondere Typen chromatographischer Verfahren, die in der Literatur gut bekannt sind, umfassen: Flüssigkeits-, Hochdruckflüssigkeits-, Ionenaustausch-, Absorptions-, Affinitäts-, Verteilungs-, hydrophobe, Umkehrphasen-, Gelfiltrations-, Ultrafiltrations- oder Dünnschichtchromatographie.

[0050] Der Ausdruck "Thiol-reaktives PEGylierungsmittel", wie er in der vorliegenden Anmeldung verwendet wird, bedeutet ein beliebiges PEG-Derivat, das fähig ist, mit der Thiolgruppe des Cysteinrests zu reagieren. Es kann z.B. PEG, das eine funktionelle Gruppe enthält, z.B. ortho-Pyridyldisulfid, Vinylsulfon, Maleimid, Iodacetimid und andere, sein. Nach einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Thiol-reaktive PEGylierungsmittel das ortho-Pyridyldisulfid (OPSS)-Derivat von PEG.

[0051] Das PEGylierungsmittel wird in seiner mono-methoxylierten Form, wenn nur ein Terminus zur Konjugation verfügbar ist, oder in einer bifunktionellen Form, wenn beide Termini zur Konjugation verfügbar sind, z.B. bei der Bildung eines Konjugats mit zwei IFN-β kovalent an eine einzelne PEG-Gruppierung gebunden, verwendet. Es hat vorzugsweise ein Molekulargewicht zwischen 500 und 100.000.

[0052] Ein typisches Reaktionsschema für die Herstellung eines PEG-Polypeptid-Konjugats wird unten dargestellt:



$$\text{Protein-S-H} + \text{mPEG-S-H} + \text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{-S-S-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$$

[0053] Die zweite Zeile des obigen Schemas beschreibt ein Verfahren zur Spaltung der PEG-Protein-Verknüpfung. Das mPEG-OPSS-Derivat ist für freie Sulfhydrylgruppen hoch selektiv und reagiert rasch unter sauren pH-Bedingungen, wo das IFN-β stabil ist. Die hohe Selektivität kann aus der Reduktion des Konjugats in die native Form von IFN-β und PEG bewiesen werden.

[0054] Die Disulfidbindung, die zwischen dem Protein und PEG-Gruppierungen erzeugt wird, erwies sich im Blutkreislauf als stabil, kann aber beim Eintritt in die Zellumgebung reduziert werden. Daher wird erwartet, dass dieses Konjugat, das nicht in die Zelle eintritt, im Blutkreislauf stabil ist, bis es ausgeschieden wird.

[0055] Es sollte betont werden, dass die obige Reaktion ortsspezifisch ist, da die anderen zwei Cys-Reste, die in den Positionen 31 und 141 in der natürlich vorkommenden Form von humanem IFN-β auftreten, nicht mit dem Thiol-reaktiven PEGylierungsagens reagieren, da sie eine Disulfidbrücke bilden.

[0056] Die vorliegende Erfindung ist auf ein Verfahren für die schrittweise Bindung von zwei oder mehr PEG-Gruppierungen an ein Polypeptid gerichtet. Dieses Verfahren basiert auf der Erkenntnis, dass ein aktiviertes PEG mit niedrigem Molekulargewicht vollständiger mit einer sterisch gehinderten Reaktionsstelle an einem Protein reagiert als dies ein aktiviertes PEG mit hohem Molekulargewicht tut. Eine PEG-Modifizierung von teuren therapeutischen Proteinen muss kosteneffektiv sein, damit die Produktion des PEG-Konjugats praktikabel ist. Um außerdem die glomeruläre Filtration zu reduzieren und die pharmakologischen Eigenschaften des PEG-Protein-Konjugats zu optimieren, sollte das Konjugat eine wirksame Größe haben, die äquivalent

derjenigen eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 70 kDa ist. Dies bedeutet, dass für eine ortsspezifische Modifikation, bei der ein PEG gebunden wird, ein PEG-Derivat mit einem Molekulargewicht von größer als 20 kDa bevorzugt gebunden wird. Wenn die Modifizierungszelle bzw. Modifikationsstelle sterisch gehindert ist, kann die reaktive Gruppe an der großen PEG-Gruppierung Schwierigkeiten haben, die Modifizierungsstelle zu erreichen, und wird so zu geringen Ausbeuten führen. Ein bevorzugtes Verfahren der PE-Gylierung eines Polypeptids gemäß der vorliegenden Erfindung erhöht die Ausbeute der ortsspezifischen PEGylierung, indem zuerst eine kleine hetero- oder homobifunktionelle PEG-Gruppierung angefügt wird, die aufgrund ihrer relativ kleineren Größe mit sterisch gehinderten Stellen reagieren kann. Eine anschließende Bindung eines PEG-Derivats mit großem Molekulargewicht an das kleine PEG resultiert in einer höheren Ausbeute des gewünschten PEGylierten Proteins.

[0057] Das Verfahren zur schrittweisen Bindung von zwei oder mehr PEG-Gruppierungen der Reihe nach an ein Polypeptid gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst ein Binden einer heterobifunktionellen oder homobifunktionellen PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht zuerst an das Polypeptid und dann Binden einer monofunktionellen oder bifunktionellen PEG-Gruppierung an den freien Terminus der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht, die an das Polypeptid gebunden ist. Nach der schrittweisen Bindung von zwei oder mehr PEG-Gruppierungen der Reihe nach an ein Polypeptid, wobei das Polypeptid vorzugsweise IFN-β ist und wobei Cys^{17}, das sich an einer sterisch gehinderten Stelle befindet, die bevorzugte Stelle der PEG-Bindung ist, kann das PEG-Polypeptid-Konjugat unter Verwendung einer oder mehrerer Reinigungstechniken, z.B. Ionenaustauschchromatographie, Größenausschlusschromatographie, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, Affinitätschromatographie und Umkehrphasenchromatographie, gereinigt werden.

[0058] Die PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht hat die Formel: $W\text{-}CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2\text{-}X$, worin W und X Gruppen sind, die unabhängig mit einer funktionellen Amin-, Sulfhydryl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppe unter Bindung der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht an das Polypeptid reagieren. W und X sind vorzugsweise unabhängig ausgewählt aus ortho-Pyridyldisulfid, Maleimiden, Vinylsulfonen, Iodacetamiden, Aminen, Thiolen, Carboxylen, aktiven Estern, Benzotriazolcarbonaten, p-Nitrophenolcarbonaten, Isocyanaten und Biotin. Die PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht hat ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 100 bis 5.000 Dalton.

[0059] Die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung zur Bindung an den freien Terminus eines PEG mit niedrigem Molekulargewicht, das an das Polypeptid gebunden ist, hat ein Molekulargewicht im Bereich von etwa 100 Dalton bis 200 Kilodalton und ist vorzugsweise ein Methoxy-PEG, ein verzweigtes PEG, ein hydrolytisch oder enzymatisch abbaubares PEG, ein vorstehendes PEG oder ein Dendrimer-PEG. Das monofunktionelle oder bifunktionelle PEG hat außerdem die Formel: $Y\text{-}CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_MCH_2CH_2\text{-}Z$, worin Y zu einer terminalen Gruppe an dem freien Terminus bzw. dem freien Ende der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht, die an das Polypeptid gebunden ist, reaktiv ist und Z $-OCH_3$ oder eine Gruppe, die zur Bildung eines bifunktionellen Konjugats reaktiv ist, ist.

[0060] Das PEG-Polypeptid-Konjugat, das durch das obige Verfahren zur schrittweisen Bindung von zwei oder mehr PEG-Gruppierungen produziert wird, kann eingesetzt werden, um ein Medikament oder eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung von Krankheiten oder Störungen, für das/die das Polypeptid als aktives Ingrediens wirksam ist, zu produzieren. Diese Verwendung ist nicht Teil der Erfindung.

[0061] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung der Konjugate in im Wesentlichen gereinigter Form, um sie für eine Verwendung in pharmazeutischen Zusammensetzungen als aktives Ingrediens für die Behandlung, Diagnose oder Prognose von bakteriellen und viralen Infektionen wie auch Autoimmun-, inflammatorischen Erkrankungen und Tumoren geeignet zu machen.

[0062] Beispiele für die oben genannten Krankheiten umfassen: septischer Schock, AIDS, rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes und multiple Sklerose.

[0063] Weitere Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung werden in der folgenden Beschreibung klar werden.

[0064] Weiter offenbart wird die Verabreichung einer pharmakologisch aktiven Menge der Konjugate, die gemäß der Erfindung erhalten werden, an Personen mit einem Risiko zur Entwicklung einer der oben beschriebenen Krankheiten oder an Personen, die bereits solche Pathologien zeigen, obgleich dies nicht Teil der Erfindung ist.

[0065] Es kann ein beliebiger Verabreichungsweg verwendet werden, der mit dem aktiven Prinzip kompatibel ist. Eine parenterale Verabreichung, z.B. subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion, ist bevorzugt. Die Dosis des aktiven Ingrediens, die zu verabreichen ist, hängt von der Basis der medizinischen Verschreibungen entsprechend dem Alter, dem Gewicht und der individuellen Reaktion des Patienten ab.

[0066] Die Dosierung kann zwischen 10 µg und 1 mg täglich für ein durchschnittliches Körpergewicht von 75 kg liegen, und die bevorzugte tägliche Dosis liegt zwischen 20 µg und 200 µg.

[0067] Die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung kann in einer injizierbaren Form hergestellt werden, die den Wirkstoff und ein geeignetes Vehikel umfasst. Vehikel für die parenterale Verabreichung sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und umfassen z.B. Wasser, Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und/oder Dextrose. Das Vehikel kann kleine Mengen an Exzipienzien enthalten, um die Stabilität und die Isotonizität der pharmazeutischen Präparation aufrecht zu erhalten. Die Herstellung der Lösungen kann nach üblichen Modalitäten durchgeführt werden.

[0068] Die vorliegende Erfindung wurde anhand spezifischer Ausführungsformen beschrieben, allerdings umfasst der Inhalt der Beschreibung alle Modifikationen und Substitutionen, die von einem Fachmann durchgeführt werden können, ohne die Bedeutung und den Zweck der Ansprüche zu überschreiten.

[0069] Die Erfindung wird nun anhand der folgenden Beispiele beschrieben.

BEISPIEL 1: Herstellung eines PEG-IFN-β-Konjugats (Vergleichsbeispiel)

Modifizierung von IFN-β mit $mPEG_{5k}$-OPSS

[0070] Rekombinantes humanes IFN-β, das in einer Konzentration von 0,37 mg/ml in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3,6, stabil ist, wurde für die Herstellung eines PEG-IFN-β-Konjugats verwendet. Es wurde etwa 1,0 ml 6 M Harnstoff zu 2 ml IFN-β mit einer Konzentration von 0,37 mg/ml (0,74 mg, $3{,}7 \times 1^{-8}$ mol) gegeben. $mPEG_{5k}$-OPSS wurde in einem molaren Überschuss von 50 mol pro 1 mol IFN-β zugegeben und die zwei wurden in einer Polypropylenphiole für entweder 2 Stunden bei 37°C oder für 1 Stunde bei 50°C reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Kapillarelektrophorese (CE) analysiert, um den Grad der PEG-IFN-β-Konjugat-Bildung durch die PEGylierungsreaktion vor einer Reinigung zu bestimmen (**Fig. 1**). Die typische Ausbeute für diese Reaktion ist 50 % PEG-IFN-β. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem 0,22 mm-Spritzenfilter aus dem Reaktionsgemisch abfiltriert und die filtrierte Lösung wurde auf eine Größenausschlusssäule (entweder Superose 12 oder Superdex 75, Pharmacia) geladen und mit Puffer, 50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0, eluiert. **Fig. 2A** zeigt das Elutionsprofil der Reinigung des PEG-IFN-β-Konjugats an einer Superose 12-Größenausschlusschromatographiesäule. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE analysiert (**Fig. 3**). Die Fraktionen, die das PEG-IFN-β-Konjugat enthalten, wurden gesammelt, und das Konzentrat wurde erneut auf dieselbe Größenausschlusssäule geladen, um das PEG-IFN-β-Konjugat infolge der engen Nähe des "nativen" IFN-β-Peaks weiter zu reinigen (**Fig. 2B**). Dieses Verfahren wurde wiederholt (dritter Durchgang), um Reinheit zu gewährleisten (**Fig. 2C**). **Fig. 4** und **Fig. 5** zeigen den Kapillarelektrophorese-Graph und das MALDI MS-Spektrum für das gereinigte PEG-IFN-β-Konjugat.

Modifizierung von IFN-β mit $mPEG_{30k}$-OPSS

[0071] Rekombinantes humanes IFN-β wurde als stabil in Lösung mit 0,36 mg/ml in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3,6, bereitgestellt. Etwa 36 mg $mPEG_{30k}$-OPSS in 3 ml entionisiertem H_2O wurden zu 3 ml IFN-β mit 0,36 mg/ml (1,08 mg, $4{,}9 \times 10^{-8}$ mol) gegeben, und die zwei wurden in einer Polypropylenphiole für 2 Stunden bei 50°C reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit Kapillarelektrophorese auf den Modifizierungsgrad analysiert. Typische Ausbeuten für diese Reaktion sind < 30 %. Die Lösung wurde dann auf eine Größenausschlusssäule (Superose 12, Pharmacia) geladen und mit Puffer, 50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0, eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE auf ihre Inhalte analysiert.

BEISPIEL 2: Biologische Aktivität des PEG-IFN-β-Konjugats (Vergleichsbeispiel)

[0072] Um die Wirkungen einer PEGylierung auf die antivirale Aktivität von humanem rekombinantem IFN-β zu analysieren, wurden humane amniotische WISH-Zellen entweder mit frisch hergestelltem IFN-β (selbe Charge wie für PEGylierung verwendet) oder PEG-IFN-β-Konjugat vorinkubiert. Die IFN-β-vermittelte antivirale Aktivität, wie sie durch den WISH-VSV-Cytopathizitätsassay gemessen wurde, wurde entsprechend einem antiviralen WISH-Bioassay bestimmt, der auf der Basis des Protokolls von Novick et al., J. Immunol.,

129:2244–2247 (1982) entwickelt wurde. Die in diesen WISH-Assay verwendeten Materialien sind wie folgt:
WISH-Zellen (ATCC CCL 25),
vesikuläre Stomatitis-Virus-Vorräte (ATCC V-520-001-522), gelagert bei –70°C,
humanes rekombinantes IFN-β, InterPharm Laboratories LTD (32,075-Typ, Batch # 205035), 82 × 10^6 IU/ml, spezifische Aktivität: 222 × 10^6 IU/mg,
PEG-IFN-β-Konjugat, wie in Beispiel 1 hergestellt und in PBS, pH 7,4, gehalten,
WISH-Wachstumsmedium (MEM mit hohem Glucosegehalt mit Earls-Salzen + 10 % FBS + 1,0 % L-Glutamin + Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)),
WISH-Assay-Medium (MEM mit hohem Glucosegehalt mit Earls-Salzen + 5 % FBS + 1,0 % L-Glutamin + Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/m1)),
MTT mit 5 mg/ml in PBS, gelagert bei –70°C.

[0073] Das Protokoll für den WISH-Assay ist wie folgt:
Verdünne die IFN-β-Proben in WISH-Assay-Medium bezüglich der Ausgangskonzentration 2-fach.

[0074] Stelle Dreifachverdünnungen der IFN-β-Proben in WISH-Assay-Medium in einer Platte mit 96 Wells mit flachem Boden her, so dass jedes Well 50 µl der verdünnten IFN-β-Probe enthält (einige Kontroll-Wells nehmen 50 µl nur WISH-Assay-Medium auf).

[0075] WISH-Zellen in der log-Wachstumsphase werden mit Trypsin/EDTA-Lösung geerntet, in WISH-Assay-Medium gewaschen und auf eine Endkonzentration von 0,8 × 10^6 Zellen/ml gebracht.

[0076] 50 µl WISH-Zellsuspension (4 × 10^4 Zellen pro Well) werden in jedes Well gegeben. Die Endkonzentration an IFN-β, der die Zellen ausgesetzt sind, ist jetzt 1X.

[0077] Nach 24 Stunden Inkubation in einem Inkubator, der 5 % CO_2 in angefeuchteter Atmosphäre enthielt, werden 50 µl einer 1:10-Verdünnung (in WISH-Assay-Medium) des VSV-Vorrats (eine Dosis, die vorbestimmt war, um 100 % WISH-Zellen innerhalb von 48 Stunden zu lysieren) zu allen Wells, außer die Kontroll-Wells ohne Virus (diese enthalten lediglich ein gleiches Volumen an Assay-Medium) gegeben.

[0078] Nach weiteren 48 Stunden werden 25 µl MTT-Lösung in alle Wells gegeben, wonach die Platten für weitere 2 Stunden in einem Inkubator inkubiert werden.

[0079] Die Inhalte der Wells werden durch Umdrehen der Platten entfernt, und in die Wells werden 200 µl 100%iges Ethanol gegeben.

[0080] Nach 1 Stunde werden die Platten bei 595 nm gelesen, wobei Soft max Pro-Software und das Spectramax-Spektralfotometer-System (Molecular Devices) verwendet werden.

Tabelle 1. Antivirale Aktivität von PEGylierten und Mock-PEGylierten IFN-β-Proben

IFN-β-Probe*	EC_{50}**
PEG-IFN-β-Konjugat	3,9 +/– 0,7 pg/ml
IFN-β	16,4 +/– 1,0 pg/ml

*Vorratslösungskonzentrationen von IFN-β in Proben, bestimmt durch Aminosäureanalyse
**EC_{50} (+/– S.A.) wurde durch das Software-Programm Microcal Origin 4.1 bestimmt.

[0081] Wie in **Fig. 6** und Tabelle 1 oben bewiesen wurde, hielt das PEG-IFN-β-Konjugat einen Level an antiviraler Aktivität aufrecht, der über dem der frisch hergestellten Stammcharge von IFN-β lag. Die Beobachtung, dass das PEG-IFN-β-Konjugat eine etwa viermal höhere Aktivität hat als frisch hergestelltes IFN-β, kann auch eine Folge der erhöhten Stabilität des PEG-IFN-β-Konjugats im Vergleich zu dem "nativen" IFN-β nach Zugabe von WISH-Zell-Assay-Medium sein.

BEISPIEL 3: In vitro-Assay auf die relative Aktivität von PEG-IFN-Proben (Vergleichsbeispiel)

[0082] Die relative Bioaktivität von PEG[30 kD]-IFN-β und PEG[2 × 20 kD]-IFN-β wurde durch einen WISH-Assay unter Verwendung des in Beispiel 2 beschriebenen Standardprotokolls bestimmt (Tabelle 2). Es wurden drei unabhängige Assays durch drei unterschiedliche Personen zu getrennten Zeiten durchgeführt.

Tabelle 2. Relative antivirale Aktivität von PEG-IFN-β

	Relative Interferon-Aktivität* (aus drei Studien)			
Probe	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Mittelwert (S.A.)
PEG[30 kD]-IFN-β	3,2 X höher	3,1 X höher	1,8 X höher	3,0 X (0,78) höher
PEG[2 × 20 kD]-IFN-β	4,2 X höher	1,3 X höher	0,85 X höher	2,1 X (1,8) höher

*EC_{50}-Dosen im Vergleich zu Standard-IFN-β in jedem Assay eingeschlossen.
**Vergleich, basierend auf IFN-β-Konzentration von 330 µg/ml. Vorratskonzentrationen von PEG[30 kD]-IFN-β (5,41 µg/ml) und PEG[2 × 20 kD]-IFN-β (6,86 µg/ml) wurden durch AAA bestimmt.

[0083] Die Bindung von PEG-IFN-β an seinen Rezeptor an Zellen wurde in Gegenwart einer fixierten Menge von ^{125}I-IFN-α2a evaluiert. IFN-α2a wurde unter Verwendung des Chloramin T-Verfahrens mit 125_1 radiomarkiert. Das ^{125}I, das an IFN-α2a gebunden war, wurde von freiem Iod befreit, indem die Recktanten durch eine Sephadex G25-Säule laufen gelassen wurden und die Protein-enthaltenden Fraktionen gesammelt wurden (Pharmacia).125^{I}-IFN-α2a wurde durch einen IFN-α2a-ELISA-Assay (Biosource, USA) quantitativ bestimmt, und die spezifische Aktivität wurde bestimmt. Daudi-Zellen, die in der exponentiellen Wachstumsphase wuchsen, wurden geerntet und 2 × 10^6-Zellen wurden mit 0,5 nM ^{125}IIFN-α2a für 3 Stunden bei Raumtemperatur in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an PEG-IFN-β oder IFN-α2a, verdünnt in Assay-Puffer, nämlich RPMI 1640, der 2 % fötales Rinderserum und 0,1 % Natriumazid enthielt, inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen durch eine Schicht aus Phthalatöl zentrifugiert und die zellgebundene Radioaktivität wurde mit einem gamma-Zähler gezählt. Darüber hinaus war die Bindung von PEG[30 kD]-IFN-β und von PEG[2 × 20 kD]-IFN-β an den Rezeptur ähnlich oder sehr nahe an der Bindungsaktivität von IFN-β, wie es in **Fig. 7** gezeigt ist.

[0084] Außerdem wurde die relative Aktivität in einem Anti-Proliferationsassay mit Daudi-Zellen (humanes B-Zell-Lymphom) bestimmt (Tabelle 3). Alle IFNs wurden mit einer 2 × Konzentration von 200 ng/ml hergestellt. Die Proben wurden die Länge der Platte abwärts bei einem Endvolumen von 100 µl dreifach verdünnt. 1 × 10^5-Zellen/Well (100 µl) wurden in jedes Well gegeben, und es wurde für insgesamt 72 Stunden bei 37°C in einem Inkubator mit CO_2 und befeuchteter Atmosphäre inkubiert. Nach 48 Stunden wurde tritiiertes (^{3}H) Thymidin mit 1 µCi/Well in 20 µl zugesetzt. Am Ende der 72-stündigen Inkubation wurde die Platte mit dem Tomtek-Platten-Erntegerät geerntet. Die Resultate, die in Tabelle 3 gezeigt sind, geben an, dass kein detektierbarer Verlust an IFN-Aktivität aus der PEGylierung beobachtet wurde. In der Tat wurde gefunden, dass die Aktivität etwas höher war als bei freiem IFN-β.

[0085] Dies kann durch die Bildung von inaktiven Aggregaten in dem freien IFN oder durch Differenzen bei den Quantifizierungsverfahren (Aminosäureanalyse für PEG-IFN-Proben und RP-HPLC für IFN-β) bedingt sein.

Tabelle 3. Daudi-Anti-Proliferationsassay

	IC_{50}-Dosis*	-fache Zunahme vs. IFN
IFN-β (Platte 1)	1153,1	–
PEG[30 kD]-IFN (71 A)	695,6	1,6 X
IFN-β (Platte 2)	1005,8	–
PEG[40 kD]-IFN (71 B)	629,4	1,7 X

*pg/ml

BEISPIEL 4: Pharmakokinetische Studien bei Mäusen (Vergleichsbeispiel)

Intravenöse Verabreichung

[0086] Mäuse erhielten eine Injektion mit 100 ng IFN-β, PEG[30 kD]-IFN-β oder PEG[2 × 20 kD]-IFN-β, und danach wurde Blut zu den angegebenen Zeiten entnommen. Die Serumkonzentrationen an IFN-β wurden

durch einen IFN-β-spezifischen ELIAS (Toray Industries) bestimmt, und die Resultate sind in Fig. 8 gezeigt. Achtundzwanzig weibliche Mäuse vom Stamm B6D2F1 (6–8 Wochen) (etwa 20 g jeweils) wurden wie folgt in vier Gruppen aufgeteilt: Gruppe 1 enthielt neun Mäuse, denen 200 µl Einzelbolus von 500 ng/ml humanes IFN-β (Enddosis 100 ng/Maus) injiziert wurden; Gruppe 2 (neun Mäuse) erhielten 200 µl einer äquivalenten Masse an PEG30kD-IFN-β; Gruppe 3 erhielt 200 µl einer äquivalenten Masse an PEG(2 × 20 kD)-IFN-β; und Gruppe 4 ist eine Gruppe von drei Mäusen ohne Injektion, die als negative Kontrolle dienen. Blutproben (etwa 200 µl/Probe) wurden zu neun angegebenen Zeiten mit einem Kapillarröhrchen durch Unterbrechung des retroorbitalen Venenplexus gesammelt. Die Blutproben wurden für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerinnen gelassen, "rimmed" und mikrozentrifugiert. Seren, die daraus entfernt wurden, wurden bei –70°C gelagert, bis alle Proben gesammelt waren. Die Seren wurden unter Verwendung eines Toray-Assays auf das Vorliegen von bioaktivem humanem IFN-β analysiert. Die Resultate zeigen, dass die Fläche unter der Kurve (AUC) bei den PEG-IFN-Proben gegenüber freiem IFN-β deutlich vergrößert ist und dass PEG-IFN-Proben gegenüber freiem IFN-β überlegen sind und dass PEG[2 X-20 kD]-IFN-β gegenüber PEG[30 kD]-IFN-β überlegen ist.

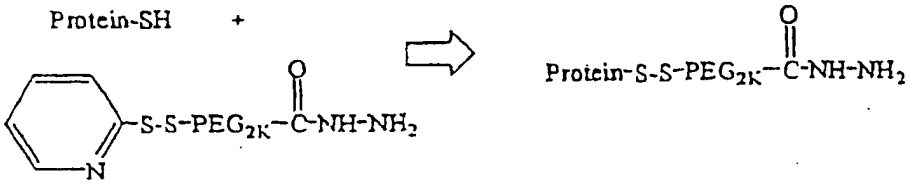
Subkutane Verabreichung

[0087] Mäuse erhielten eine subkutane Injektion mit IFN-β und PEG-IFN (100 ng/Maus). Fig. 9 beweist, dass die Gesamtfläche unter der Kurve (AUC) für die PEG-IFN-Proben im Vergleich zu freiem IFN-β drastisch erhöht ist. Die pharmakokinetischen Studien waren bei den PEG-IFN-Proben konsistent, die eine längere Halbwertszeit und eine vergrößerte AUC haben.

BEISPIEL 5: Bindung einer PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht an

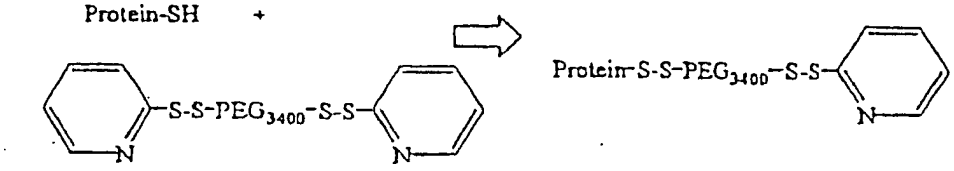
Polypeptid

Markierung von Interferon-β mit OPSS-PEG_{2k}-Hydrazid



[0088] Rekombinantes humanes Interferon-β wurde in Lösung mit 0,33 mg/ml in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3,8, bereitgestellt. Etwa 3,6 mg (40 mol Überschuss gegenüber den mol an Protein) des heterobifunktionellen PEG-Reagenzes, OPSS-PEG_{2k}-Hydrazid, in 2 ml entionisiertem Wasser wurden zu 3 ml IFN-β mit 0,33 mg/ml (0,99 mg) gegeben und die zwei wurden in einer Polypropylenphiole für 1 Stunde bei 45°C reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann mit Kapillarelektrophorese analysiert, um den Modifizierungsgrad bzw. Modifikationsgrad zu bestimmen. Typische Ausbeuten lagen im Bereich von 90 bis 97 %, die von der Reinheit des Interferon-β und des PEG-Reagenzes abhängen. Die Lösung wurde als Nächstes auf eine Größenausschlusssäule (Superdex 75, Pharmacia) aufgebracht und mit 5 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0-Puffer, eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE analysiert. Die monoPEGylierten Interferon-β-Fraktionen wurden kombiniert, dann in einem weiteren Modifizierungsschritt mit PEG mit hohem Molekulargewicht verwendet.

Markierung von Interferon-β mit $(OPSS)_2$-PEG_{3400}

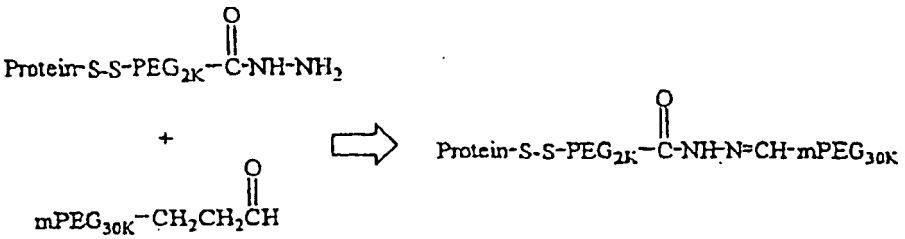


[0089] Rekombinantes humanes Interferon-β wurde in Lösung mit 0,33 mg/ml in 50 mM Natriumacetat-Puffer, pH 3,8, bereitgestellt. Etwa 6,1 mg (40 mol Überschuss gegenüber den mol an Protein) des homobifunktionellen PEG-Reagenzes, $(OPSS)_2$-PEG_{3400} in 2 ml entionisiertem Wasser wurden zu 3 ml Interferon-β mit 0,33 mg/ml (0,99 mg) gegeben und die zwei wurden in einer Polypropylenphiole für 2 Stunden bei 50°C reagieren gelassen. Die Reaktion wurde mit nicht-reduzierender SDS-PAGE überwacht und das Endreaktionsgemisch wurde mit Kapillarelektrophorese analysiert, um den Modifizierungsgrad zu bestimmen. Typische Modifizierungen für diese Reaktion mit Interferon-β waren > 95 %. Diese Lösung wurde dann auf eine Größenausschluss-

säule (Superdex 75, Pharmacia) aufgebracht und mit 50 mM Natriumphosphat, 150 mM NaCl, pH 7,0-Puffer, eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE auf ihre Gehalte analysiert. Die monoPEGylierten Interferon-β-Fraktionen wurden kombiniert.

BEISPIEL 6: Bindung einer zweiten PEG-Gruppierung an mit niedermolekulargewichtigem PEGyliertes Polypeptid

Modifizierung von IFN-S-S-PEG_{2K}-Hydrazid mit $mPEG_{30K}$-Aldehyd (ALD)



[0090] Zu den kombinierten Fraktionen von IFN-S-S-PEG_{2k}-Hydrazid in Beispiel 5 wurde $mPEG_{30k}$-ALD in einem 20 mol-Überschuss zu Protein gegeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (25°C) für 4 Stunden durchgeführt, und eine Probe wurde zu einer Größenausschlusssäule (Superose 6, Pharmacia) gegeben, um die Modifizierungsausbeute zu bestimmen. Die Modifizierungsausbeute dieser Reaktion war typischerweise > 80 %, und zwar in Abhängigkeit von der Reinheit des PEG-Reagenzes und den Reaktionsbedingungen.

[0091] Obgleich diese Erfindung nun vollständig beschrieben wurde, wird es klar sein, dass der Fachmann dieselbe in einem weiten Bereich äquivalenter Parameter, Konzentrationen und Bedingungen durchführen kann, ohne den Geist und den Rahmen der Erfindung zu verlassen, und zwar ohne unnötiges Experimentieren.

[0092] Während diese Erfindung in Verbindung mit spezifischen Ausführungsformen derselben beschrieben wurde, wird es einzusehen sein, dass sie für weitere Modifikationen geeignet ist. Diese Anmeldung soll alle Variationen, Verwendungen oder Anpassungen der Erfindung nach den Prinzipien der Erfindung abdecken und solche Abweichungen von der vorliegenden Offenbarung einschließen, wie sie bekannt sind oder gängige Praxis auf dem Gebiet sind, zu dem die Erfindung gehört, und wie sie auf die essentiellen Merkmale, die vorstehend ausgeführt wurden, wie sie aus dem Rahmen der beigefügten Ansprüche folgen, angewendet werden kann.

[0093] Alle hierin zitierten Referenzen, einschließlich Zeitschriftenartikel oder Abstracts, veröffentlichte oder unveröffentlichte US-Patentanmeldungen oder ausländische Patentanmeldungen, erteilte US-Patente oder ausländische Patente oder andere Literaturstellen werden hier durch Bezugnahme vollständig aufgenommen, einschließlich aller Daten, Tabellen, Figuren und des Textes, die in den zitierten Literaturstellen angeführt sind. Außerdem werden auch die gesamten Inhalte der Literaturstellen, die in den zitierten Literaturstellen angeführt sind, durch Bezugnahme hierin aufgenommen.

[0094] Eine Bezugnahme auf bekannte Verfahrensschritte, herkömmliche Verfahrensschritte, bekannte Verfahren oder herkömmliche Verfahren ist in keiner Weise ein Eingeständnis, dass ein Aspekt, eine Beschreibung oder eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in dem relevanten Stand der Technik offenbart, gelehrt oder nahe gelegt ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur schrittweisen Bindung von Polyethylenglycol (PEG)-Gruppierungen der Reihe nach an ein Polypeptid, umfassend die Schritte:
Umsetzen eines Polypeptids mit einer heterobifunktionellen oder homobifunktionellen PEG-Gruppierung, die ein Molekulargewicht im Bereich von 100 bis 5.000 Dalton hat und die die folgende Formel hat: $W\text{-}CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2\text{-}X$, worin W und X Gruppen sind, die unabhängig mit einer funktionellen Amin-, Sulfhydryl-, Carboxyl- oder Hydroxylgruppe unter Bindung der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht an das Polypeptid reagieren; und
Umsetzen der an das Polypeptid gebundenen PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht mit einer monofunktionellen oder bifunktionellen PEG-Gruppierung, deren Molekulargewicht im Bereich von 100 Dalton bis 200 Kilodalton ist, um die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung an ein freies Ende der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht zu binden und ein PEG-Polypeptid-Konjugat zu bilden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung die folgende Formel hat: $Y\text{-}CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_MCH_2CH_2\text{-}Z$, worin Y mit einer terminalen Gruppe am freien Ende der PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht, die an das Polypeptid gebunden ist, reaktionsfähig ist und Z $-OCH_3$ oder eine Gruppe ist, die mit X reaktionsfähig ist, um ein bifunktionelles Konjugat zu bilden.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung Methoxy-PEG, verzweigtes PEG, hydrolytisch oder enzymatisch abbaubares PEG, „pendant PEG" oder Dendrimer-PEG ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei W und -X unabhängig ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Orthopyridyldisulfid, Maleimiden, Vinylsulfonen, Iodacetamiden, Hydraziden, Aldehyden, Succinimidylestern, Epoxiden, Aminen, Thiolen, Carboxyl, aktiven Ester, Benzotriazolcarbonaten, p-Nitro-phenolcarbonaten, Isocyanaten und Biotin.

5. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die PEG-Gruppierung mit niedrigem Molekulargewicht und/oder die monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Gruppierung ein Copolymer von Polyethylenglycol ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Copolymer von Poly-ethylenglycol ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Polyethylenglycol/Polypropylenglycol-Copolymeren und Polyethylenglycol/Poly(milch/glycolsäure)-Copolymeren.

7. Verfahren nach Anspruch 1, das außerdem einen Schritt der Reinigung des PEG-Polypeptid-Konjugats nach der schrittweisen Bindung von zwei PEG-Gruppierungen der Reihe nach an ein Polypeptid umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Schritt der Reinigung eine oder mehrere Reinigungstechniken umfasst, die aus der Gruppe, bestehend aus Ionenaustauschchromatographie, Größenausschlusschromatographie, hydrophober Wechselwirkungschromatographie, Affinitätschromatographie und Umkehrphasenchromatographie, ausgewählt ist/sind.

9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid Interferon-β ist.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

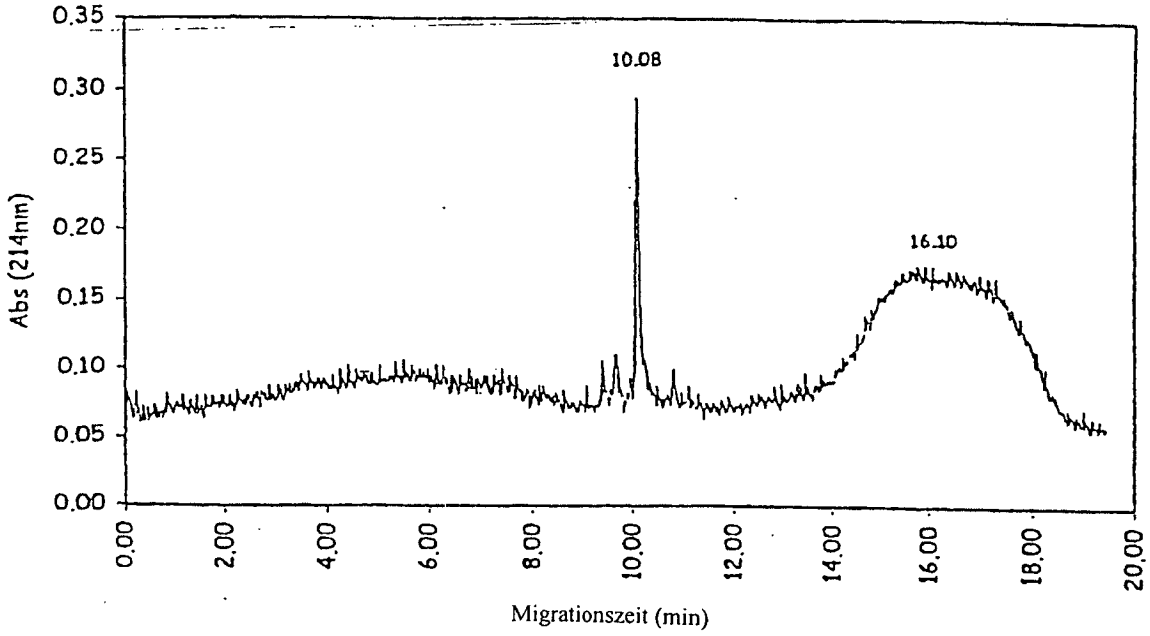


FIG. 1

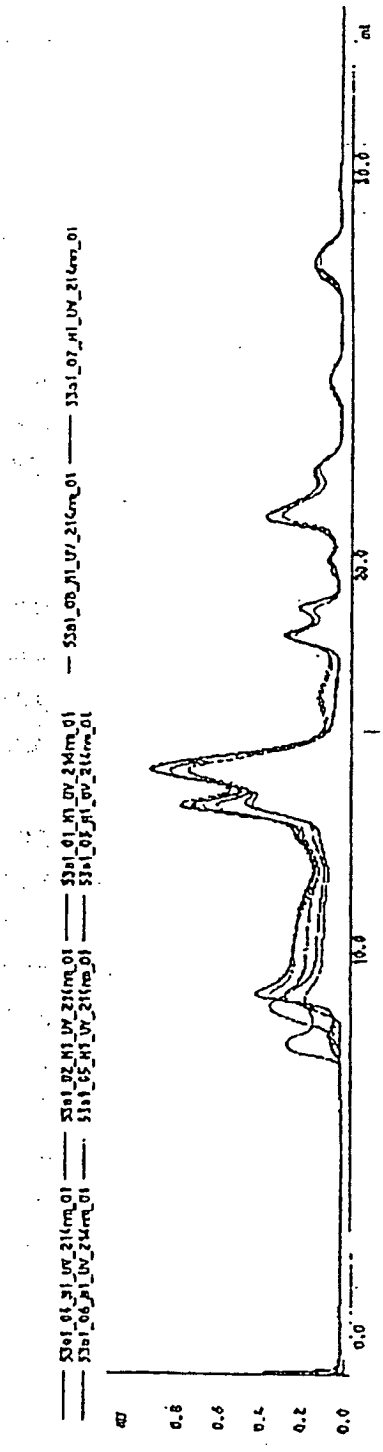


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

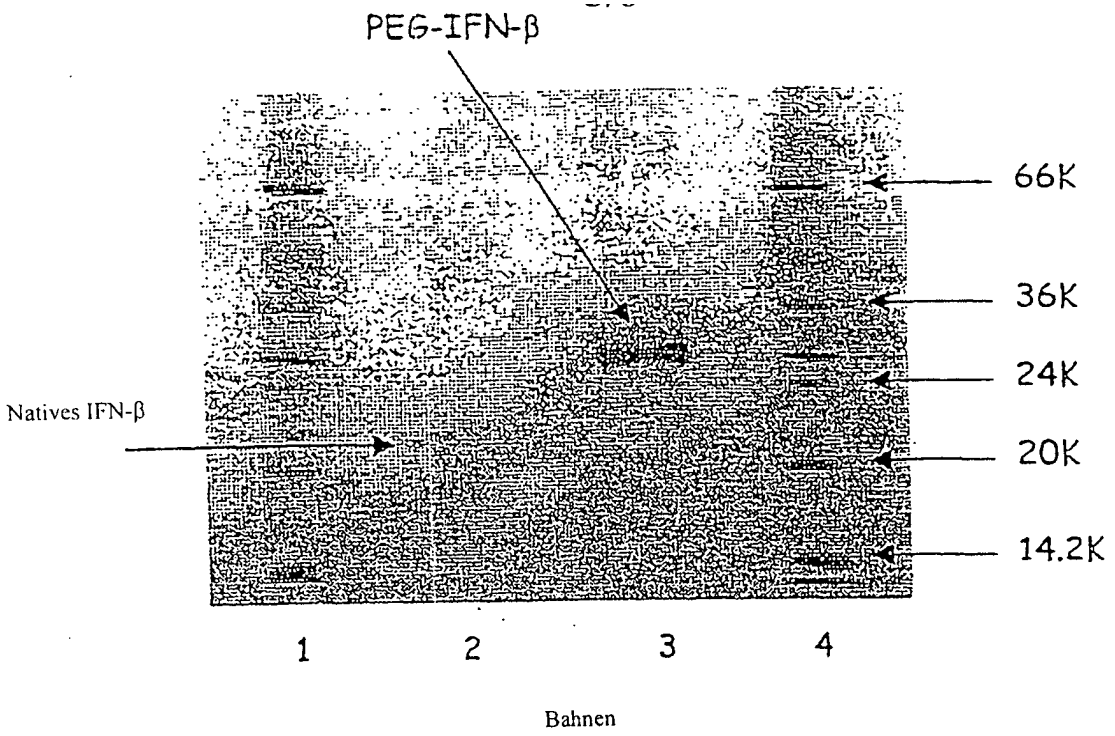

PEG-IFN-β
66K
36K
24K
20K
14.2K
Natives IFN-β
1
2
3
4
Bahnen

FIG. 3

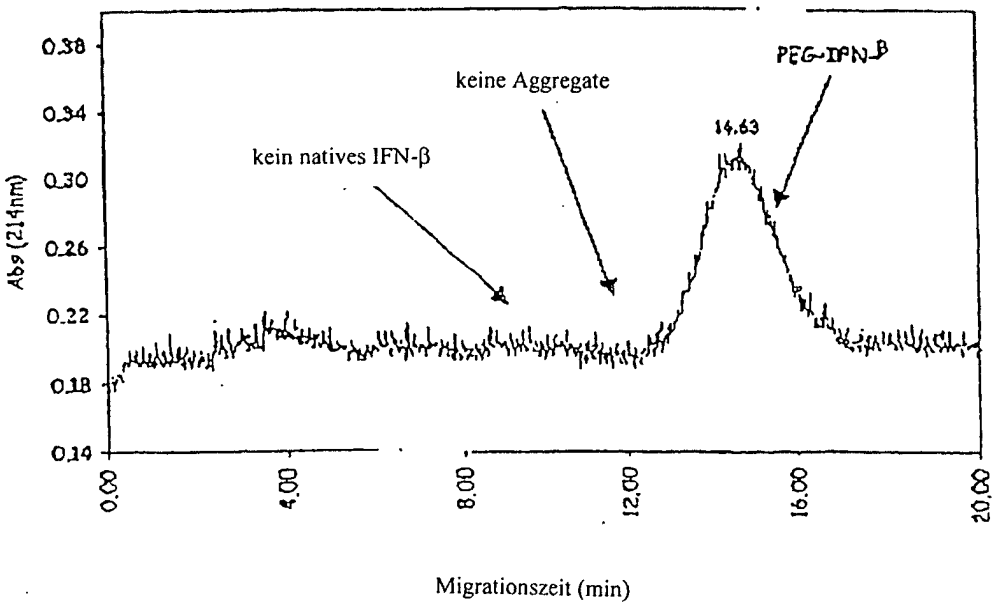

0.38
0.34
0.30
0.26
0.22
0.18
0.14
Abs (214nm)
kein natives IFN-β
keine Aggregate
14.63
PEG-IFN-β
0.00
4.00
8.00
12.00
16.00
20.00
Migrationszeit (min)

FIG. 4

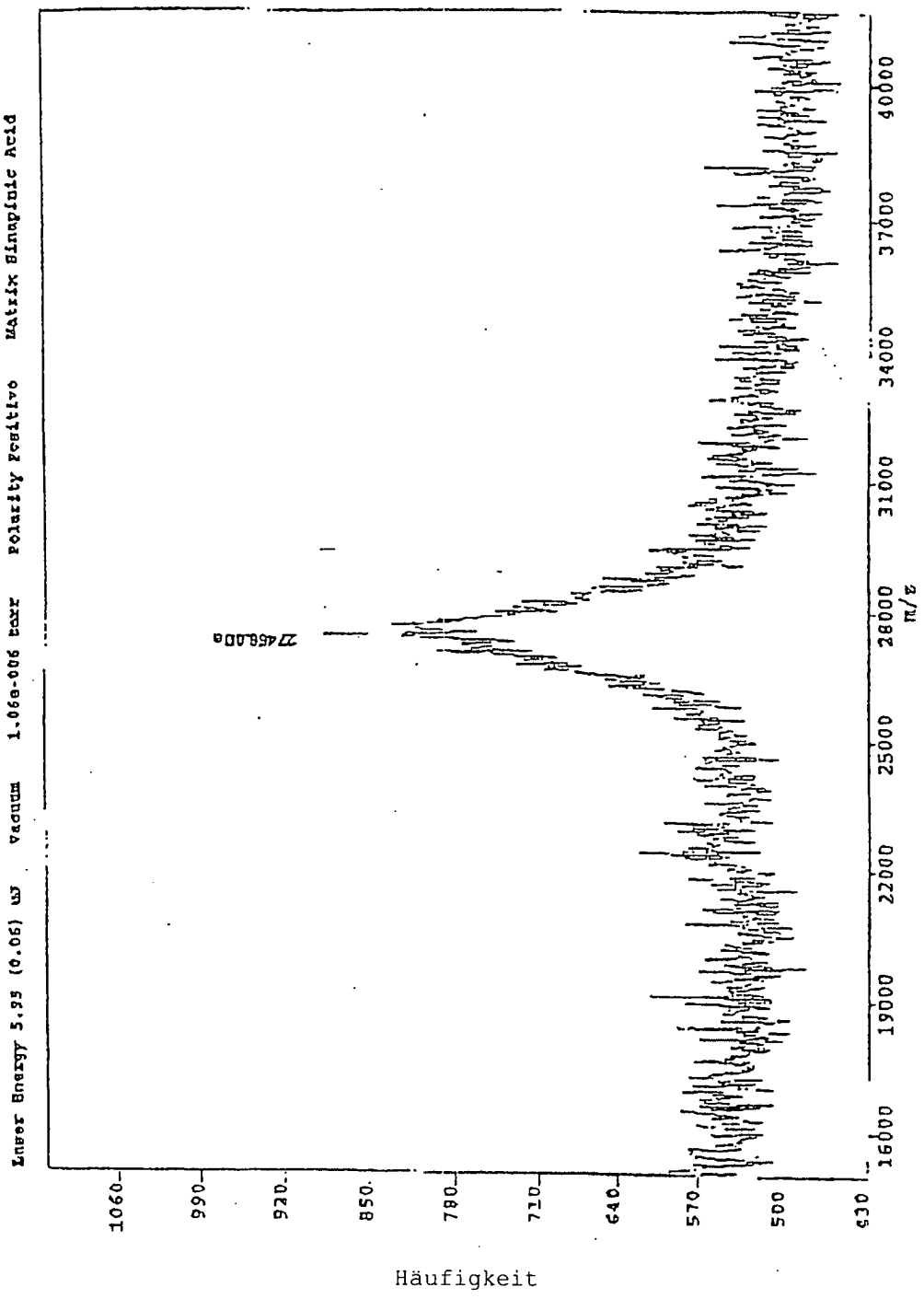

Laser Energy 5.95 (0.06) uJ Vacuum 1.06e-006 torr Polarity Positive Matrix Sinapinic Acid
77458.00a
Häufigkeit
m/z
1060
990
920
850
780
710
640
570
500
430
16000
19000
22000
25000
28000
31000
34000
37000
40000

FIG. 5

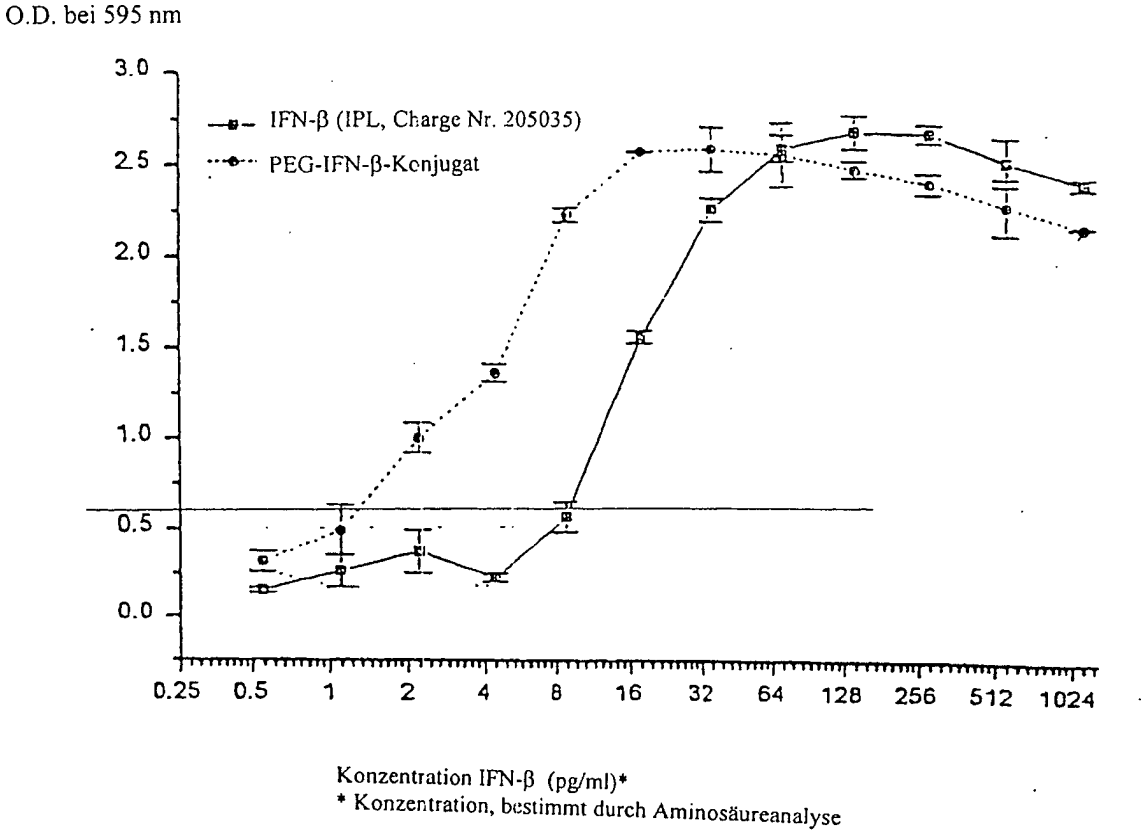

O.D. bei 595 nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
IFN-β (IPL, Charge Nr. 205035)
PEG-IFN-β-Konjugat
0.25
0.5
1
2
4
8
16
32
64
128
256
512
1024
Konzentration IFN-β (pg/ml)*
* Konzentration, bestimmt durch Aminosäureanalyse

FIG. 6

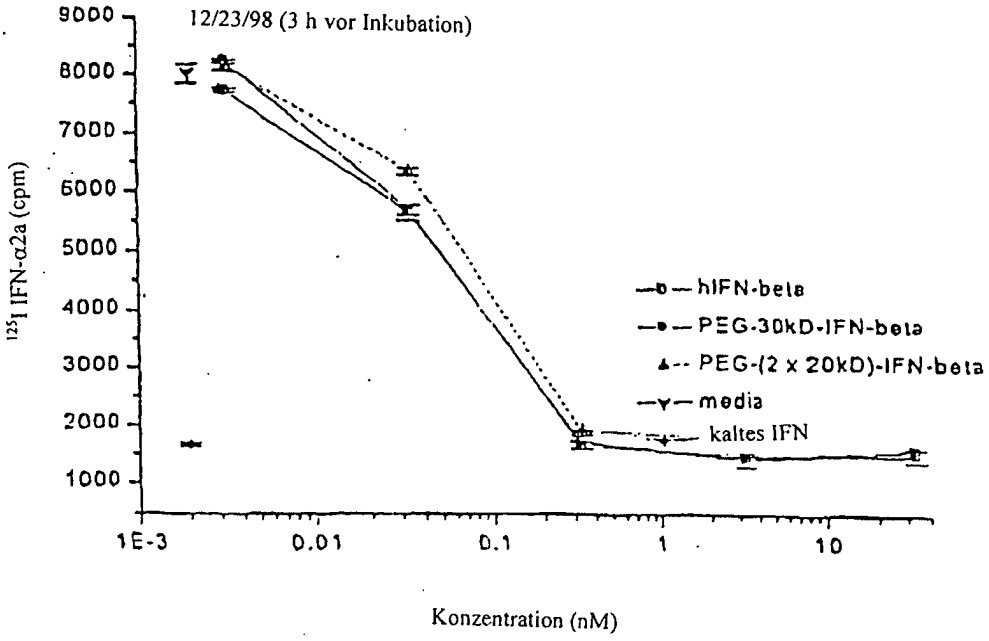

12/23/98 (3 h vor Inkubation)
^{125}I IFN-α2a (cpm)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
1E-3
0.01
0.1
1
10
hIFN-beta
PEG-30kD-IFN-beta
PEG-(2 x 20kD)-IFN-beta
media
kaltes IFN
Konzentration (nM)

FIG. 7

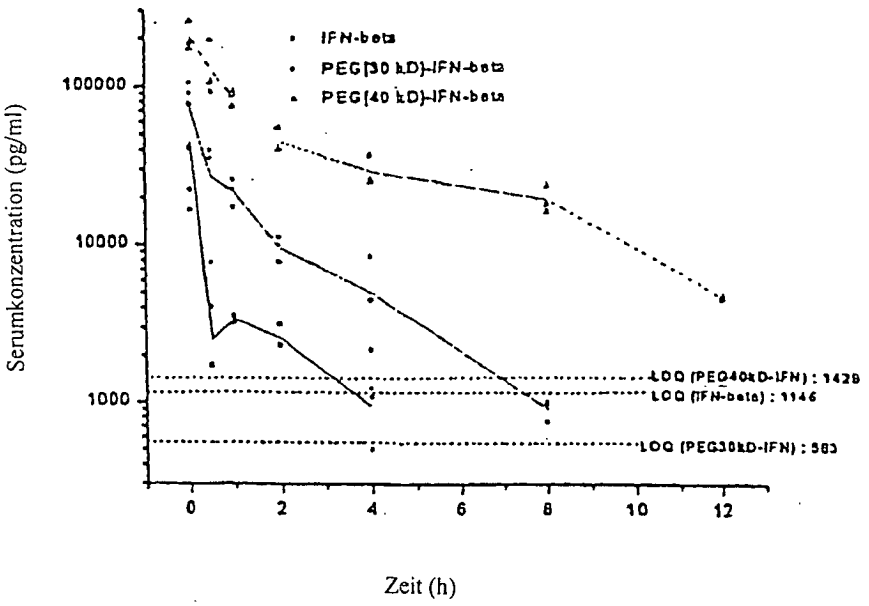

IFN-beta
PEG(30 kD)-IFN-beta
PEG(40 kD)-IFN-beta
100000
10000
1000
LOQ (PEG40kD-IFN) : 1428
LOQ (IFN-beta) : 1146
LOQ (PEG30kD-IFN) : 583
0
2
4
6
8
10
12
Serumkonzentration (pg/ml)
Zeit (h)

FIG. 8

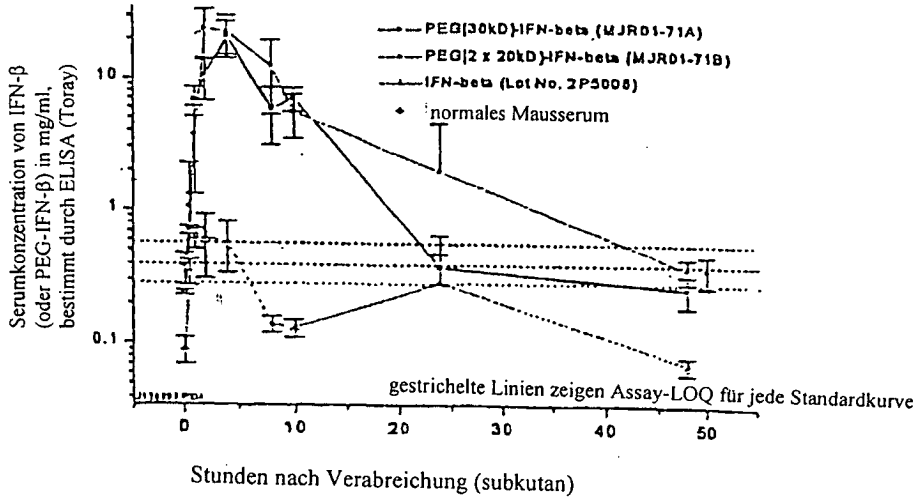

PEG(30kD)-IFN-beta (MJR01-71A)
PEG(2 x 20kD)-IFN-beta (MJR01-71B)
IFN-beta (Lot No. 2P5006)
normales Mausserum
gestrichelte Linien zeigen Assay-LOQ für jede Standardkurve
10
1
0.1
0
10
20
30
40
50
Serumkonzentration von IFN-β (oder PEG-IFN-β) in mg/ml, bestimmt durch ELISA (Toray)
Stunden nach Verabreichung (subkutan)

FIG. 9