

## POLIOL-IFN-BÉTA KONJUGÁTUMOK

## K I V O N A T

A találmány poliol-interferon- $\beta$  konjugátumokra vonatkozik, amelyekben egy poliol-maradék kovalensen kapcsolódik a humán interferon- $\beta$  Cys<sup>17</sup>-hez. A fenti poliol-interferon- $\beta$  konjugátumot úgy állítják elő, hogy az interferon- $\beta$ -t tiol-reaktív poliollal reagáltatva egy poliol-maradékot kötnek hely-specifikusan és kovalensen a humán interferon- $\beta$  Cys<sup>17</sup>-hez, majd a kapott konjugátumot kinyerik. A fenti eljárást polietilénglikol (PEG) maradékok kapcsolása esetén úgy végzik, hogy a polipeptidet először egy kis móltömegű heterobifunkciós vagy homobifunkciós PEG-maradékkal reagáltatják, majd a polipeptidhez kötött kis móltömegű PEG-maradékot egy monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékkal reagáltatva ez utóbbi monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékot a kis móltömegű PEG-maradék szabad végéhez kötve alakítják ki a PEG-polipeptid konjugátumot. A PEG-polipeptid konjugátumok gyógyszerként alkalmazhatók.

2003. 03. 28.

Dj.

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

A2

**POLIOL-IFN-BÉTA KONJUGÁTUMOK**

A találmány polioli-IFN-béta konjugátumokra vonatkozik, ahol a polioli egység kovalensen kötődik a Cys<sup>17</sup>-hez. A találmány tárgya továbbá eljárás ezek hely-specifikus előállítására, valamint ezek alkalmazására bakteriális fertőzések, virális fertőzések, autoimmun betegségek és gyulladásos betegségek terápiájában, prognózisában vagy diagnózisában. A találmány tárgyat képezi továbbá eljárás két vagy több PEG-maradék polipeptidhez történő lépésenkénti kapcsolására.

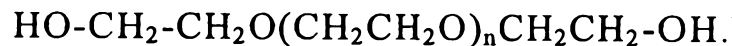
A humán fibroblaszt interferon (IFN-β) antivirális aktivitással rendelkezik, és képes a daganatos sejtek elleni természetes gyilkos sejteket is stimulálni. Ez egy körülbelül 20000 Da méretű polipeptid, amelyet vírusok és kettős-szálú RNS-ek indukálnak. A fibroblaszt interferont kódoló gén nukleotidszekvenciájából - amelyet rekombináns DNS módszerrel klónoztak Derynk és munkatársai [Nature 285, 542-547 (1980)] - következtettek a protein teljes aminosavszekvenciájára. A protein 166 aminosav hosszúságú.

Shepard és munkatársai [Nature 294, 563-565 (1981)] ismertettek egy mutációt a 842. bázisnál (Cys → Tyr a 141-es helyzetben), amely az antivirális aktivitás megszüntetéséhez vezetett, és leírtak egy, a 1119-1121. nukleotidok delécióját tartalmazó variáns klónt.



Mark és munkatársai [Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 81(18), 5662-5666 (1984)] egy mesterséges mutációt inszertáltak a 469. bázis (T) adeninnal (A) történő helyettesítésével, amely 17-es helyzetben egy Cys → Ser aminosavcserét okozott. Az így kapott IFN-β a leírás szerint ugyanolyan aktív, mint az „natív” IFN-β, és stabil hosszútávú tárolás során (-70 °C-on).

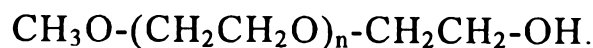
A hidrofil polimer polietilén-glikol (PEG), más néven poli(etilén-oxid) (PEO) kovalens kapcsolása különféle molekulákhoz fontos alkalmazásokkal bír a biotechnológiában és gyógyászatban. Leggyakoribb formájában a PEG egy lineáris polimer, amely mindkét terminálisán hidroxilcsoportokat tartalmaz:



Ez a képlet rövidebben mint HO-PEG-OH jelölhető, ahol -PEG- jelenti a polimer vázat a terminális csoportok nélkül, azaz

-PEG- jelentése  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2-$ .

A PEG-et gyakran metoxi-PEG-OH-ként (m-PEG) alkalmazzák, amelyben az egyik terminusz egy viszonylag inert metoxycsoport, míg a másik terminusz egy hidroxilcsoport, amely kémiai módosításoknak vethető alá:



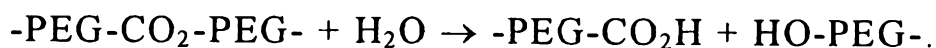
Gyakran használják az elágazó PEG-eket is. Az elágazó PEG-eket az  $\text{R}(-\text{PEG-OH})_m$  képlettel ábrázolhatjuk, amelyben R



egy centrális mag maradékot, például pentaeritritet vagy glicerint jelent, és  $m$  jelenti az elágazó „karok” számát. Az elágazó karok száma ( $m$ ) háromtól százig, vagy még nagyobb értékig változhat. A hidroxilcsoportokat kémiai módosításnak lehet alávetni.

Egy másik elágazó forma, például a WO 96/21469 számon publikált szabadalmi leírásban ismertetett, egyetlen terminuszt tartalmaz, amely a kémiai módosítás helye. Az ilyen típusú PEG a  $(\text{CH}_3\text{O-PEG-})_p\text{R-X}$  képlettel ábrázolható, ahol  $p = 2$  vagy  $3$ , és R jelentése központi mag, például lizin vagy glicerin, és X jelentése funkciós csoport, például karboxilcsoport, amelyet kémiailag aktiválni lehet. Egy másik elágazó forma, a „függő PEG” a reakcióképes csoportokat, például karboxilcsoportot a PEG váza mentén tartalmazza a PEG-láncok vége helyett.

A PEG fenti formáin kívül olyan polimer is előállítható, amely a vázban gyenge vagy lebontható kötéseket tartalmaz. Például Harris az US 06/026716 számú szabadalmi bejelentésben bemutatta, hogy a polimer váz észterkötéseket tartalmazó PEG is előállítható, amelyek hidrolizálhatók. A hidrolízis a polimer alacsonyabb móltömegű fragmensekre történő hasadását eredményezi, az alábbi reakcióvázlat szerint:

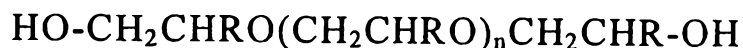


A találmány értelmében a polietilén-glikol vagy PEG kifejezés magában foglalja az összes fent említett származékokat is.

Az etilén-oxid és propilén-oxid polimerjei kémiailag nagyon hasonlítanak a PEG-hez, és ezeket PEG helyett számos al-



kalmazásban lehet használni. Ezek a



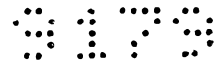
általános képlettel ábrázolhatók, ahol R jelentése H vagy CH<sub>3</sub>.

A PEG egy nagyon hasznos polimer, amely nagy vízoldhatósággal, valamint számos szerves oldószerben is nagy oldhatósággal rendelkezik. A PEG ezenkívül nem toxikus és nem immunogén. Amikor a PEG-et kémiaiilag kapcsolják egy vízoldhatatlan vegyülethez (PEG-ilezés), a kapott konjugátum általában vízoldható, valamint számos szerves oldószerben is oldódik.

A PEG-protein konjugátumokat jelenleg protein-helyettesítési terápiaiban alkalmazzák, valamint egyéb gyógyászati alkalmazásai is vannak. Például a PEG-ilezett adenzin-dezaminázt (ADAGEN<sup>®</sup>) súlyos, kombinált immunhiány betegség (SCIDS) kezelésére alkalmazzák, a PEG-ilezett L-aszparaginázt (ONCAPSPAR<sup>®</sup>) akut limfoblasztos leukémia (ALL) kezelésére alkalmazzák, és a PEG-ilezett interferon- $\alpha$ , amely a vizsgálatok harmadik fázisában van, hepatitis C kezelésére alkalmazható.

A klinikai hatékonysággal rendelkező PEG-protein konjugátumok általános áttekintését lásd N. L. Burnham munkájában [Am. J. Hosp. Pharm. 15, 210-218 (1994)].

Számos eljárást kifejlesztettek a proteinek PEG-ilezésére. A PEG kapcsolását a proteinen levő reakcióképes csoportokhoz rendszerint elektrofil módon aktivált PEG-származékok alkalmazásával végzik. A PEG kapcsolása a lizin-maradékok  $\alpha$ - és  $\epsilon$ -amino-csoportjaihoz és az N-terminálishoz termékek elegyből álló konjugátumot eredményez.



Általában az ilyen konjugátumok egy proteinmolekulához kapcsolt több PEG molekula populációjából állnak (PEGmerek), a PEG molekulák száma 0-tól a proteinben lévő aminocsoportok számáig változik. Az egyszeresen módosítottprotein molekulában a PEG egység számos különböző amino-helyhez kapcsolódhat.

A nem-specifikus PEG-ilezés fenti típusa több konjugátumot eredményezett, amelyek szinte inaktívak voltak. Az aktivitás csökkenése rendszerint a protein aktív kötő doménjének leárnyékolásából eredt, ez a helyzet sok citokin és antitest esetén. Például Katre és munkatársai (US 4766106 és US 4917888 számú szabadalmi leírások) ismertetik az IFN- $\beta$  és IL-2 PEG-ilezését metoxi-polietilén-glikolil-N-szukcinimidil-glutarát és metoxi-polietilén-glikolil-N-szukcinimidil-szukcinát nagy feleslegével. Mindkét proteint mikroba gazdasejtekben állították elő, amelyek lehetővé tették a szabad cisztein szerinné történő helyspecifikus mutációját. A mutáció az IFN- $\beta$  mikrobás expressziójában szükséges volt a protein hajtogatott szerkezetének kialakulásához. Közelebbről, a fenti kísérletekben alkalmazott IFN- $\beta$  a Betaseron<sup>®</sup> néven forgalmazott termék, amelyben a Cys<sup>17</sup> maradék szerinnel van helyettesítve. Ezenkívül a glikozilezés hiánya csökkentette az oldhatóságot vizes oldatban. A nem-specifikus PEG-ilezés fokozott oldhatóságot eredményezett, de fő problémaként megmaradt az aktivitás és hozam csökkent szintje.

Az EP 593868 számú szabadalmi leírásban (amelynek címe PEG-interferon konjugátumok) PEG-IFN- $\alpha$  konjugátumok előállítását ismertetik. Azonban a PEG-ilezési reakció nem helyspecifikus, ezért a PEG-IFN- $\alpha$  konjugátumok helyzeti izomer-



jeinek elegyét kapták [lásd még Monkarsh és munkatársai, ACS Symp. Ser. 680, 207-216 (1997)].

Kinstler és munkatársai (EP-A 675201) bemutatták a megakariocita növekedési és fejlődés faktor (MGDF) N-terminális maradékának szelektív módosítását mPEG-propionaldehiddel. Ezáltal reprodukálható PEG-ilezést és farmakokinetikai tulajdonságokat kaptak sarzsról-sarzsrá. Gilbert és munkatársai (US 5711944) bizonyították, hogy a PEG-ilezett IFN- $\alpha$  optimális aktivitással állítható elő. Ebben az esetben fáradságos tisztítási lépés kellett az optimális konjugátum előállításához.

A citokinek többsége, és egyéb proteinek sem rendelkeznek specifikus PEG-kapcsolódási hellyel, és a fenti példától eltekintve nagyon valószínű, hogy a PEG-ilezési reakcióban képződött izomerek némelyike teljesen vagy részlegesen inaktív lesz, ezáltal a végtermék elegy aktivitása csökken.

Tehát a hely-specifikus monoPEG-ilezés nagyon kívánatos lenne az ilyen protein konjugátumok előállításában.

Woghiren és munkatársai [Bioconjugate Chem. 4(5), 314-318 (1993)] előállítottak egy tiol-szelektív PEG-származékot egy ilyen hely-specifikus PEG-ilezéshez. Egy ortopiridil-diszulfid reakcióképes csoport formájában lévő stabil, tiol-védett PEG-származékról kimutatták, hogy specifikusan kötődik a papain proteinben lévő szabad ciszteinhez. A papain és PEG a között így kialakult diszulfid kötés enyhe redukciós körülmények között hasítható volt, ezáltal natív protein keletkezett.

A leírásban említett dokumentumokról nem állítjuk, hogy a technika állásának ideillő részét képezik, vagy az igénypontok szabadalmazhatóságát tekintve figyelembe veendő anyag. Az



idézett dokumentumok tartalmára vagy adataira való hivatkozás pusztán információs jellegű, amely a bejelentés benyújtásának időpontjában rendelkezésünkre állt, és ezek helyességéért nem szavatolunk.

A találmány poliol-IFN- $\beta$  konjugátumokra, és főleg PEG-IFN- $\beta$  konjugátumokra vonatkozik, amelyekben a poliol egység kovalensen kötődik a Cys<sup>17</sup>-hez. A specifikus konjugációt azáltal érjük el, hogy egy tiol-reaktív poliol reagenst reagáltatunk az IFN- $\beta$  Cys<sup>17</sup> maradékával. Az ilyen konjugátumok várhatólag fokozott hatékonyságot mutatnak *in vivo*. Célunk semleges pH-n fokozott oldhatóság, fokozott stabilitás (csökkent aggregáció), csökkent immunogén jelleg és a natív IFN- $\beta$  aktivitásának megőrzése volt. Az ilyen konjugáció eredménye a kívánt hatás eléréséhez szükséges dózis nagyságának csökkenése a gyógyászati készítmény forma egyszerűsödése és stabilizálása, és a hosszútávú hatékonyság valószínű növekedése lehet.

A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás PEG-maradékok lépésenkénti sorozatos kapcsolása egy polipeptidhez.

A leírás ábráit röviden az alábbiakban ismertetjük.

Az 1. ábrán látható a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum kapilláris elektroforézis (CE) görbéje tisztítás előtt.

A 2A-2C ábrán látható a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum tisztítása méret szerinti kizárásos kromatográfiával (Superose 12): 2A ábra - első átvezetés; 2B ábra - második átvezetés; 2C ábra - harmadik átvezetés.

A 3. ábrán látható a harmadik kromatográfiás tisztítással kapott tisztított PEG-IFN- $\beta$  konjugátum SDS-PAGE kromatogramja. 1. és 4. sáv: protein móltömeg standardek, 2. sáv: „na-



tív” IFN- $\beta$ , 3. sáv: PEG-IFN- $\beta$  konjugátum.

A 4. ábrán látható a tisztított PEG-IFN- $\beta$  konjugátum kapilláris elektroforézis (CE) görbéje, ahol az IFN- $\beta$  mPEG-OPSS<sub>5k</sub>-val van PEG-ilezve.

Az 5. ábrán látható a tisztított PEG-IFN- $\beta$  konjugátum MALDI MS spektruma.

A 6. ábrán látható egy összehasonlítás a natív IFN- $\beta$  és a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum antivirális aktivitása között. A WISH sejteket az IFN- $\beta$  minták megadott koncentrációinak jelenlétében inkubáltuk 24 órán keresztül a vezikuláris stomatitis vírus citopatikus dóziséval történő provokálás előtt. A citopatikus hatást további 48 óra elteltével határoztuk meg MTT konverzióval.

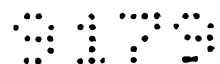
A 7. ábrán látható az IFN- $\beta$  és a PEG-IFN kötődési profilja Daudi sejtekben.

A 8. ábrán látható az IFN- $\beta$  és PEG-IFN farmakokinetikai profilja, egérnek történő intravénás adagolás után. A pontozott vonalak jelzik az LOQ vizsgálatot az egyes standard görbékhez.

A 9. ábrán látható az IFN- $\beta$  és PEG-IFN farmakokinetikai profilja, egérnek történő szubkután adagolást követően. A pontozott vonalak jelzik az LOQ vizsgálatot az egyes standard görbékhez.

A találmányt részletesen az alábbiakban ismertetjük.

A találmány azon a felismerésen alapul, hogy egy polioldék, közelebbről egy PEG-maradék kapcsolása a humán IFN- $\beta$  Cys<sup>17</sup> maradékához előre nem várt módon fokozta (vagy legalábbis nem változtatta meg, vagy nem csökkentette) az IFN- $\beta$  biológiai aktivitását a natív humán interferon- $\beta$ -hoz viszonyítva. Tehát az IFN- $\beta$  a Cys<sup>17</sup> maradékhoz kapcsolt polioldék-



radékkal nemcsak azonos vagy fokozott IFN- $\beta$  biológiai aktivitást mutat, hanem ez a poliol-IFN- $\beta$  konjugátum a polil-maradék által biztosított kívánatos tulajdonságokkal, például fokozott oldhatósággal rendelkezik.

IFN- $\beta$  alatt a leírásban humán fibroblaszt interferont értünk, amely biológiai folyadékokból történő izolálással vagy prokariota vagy eukariota gazdasejtekből DNS rekombinációs módszerekkel állítható elő, valamint ennek sóit, funkcionális származékait, prekursorait és aktív frakcióit, feltéve, hogy ezek tartalmazzák a természetben előforduló forma 17-es helyzetében lévő cisztein-maradékot.

A találmány szerinti poliol-IFN- $\beta$  konjugátum poliol-maradéka bármely vízoldható, egyenes vagy elágazó szénláncú mono- vagy bifunkciós poli(alkilén-oxid) lehet. Rendszerint a poliol egy polialkilénglikol, például polietilénglikol (PEG). Azonban szakember számára nyilvánvaló, hogy egyéb poliolo, például polipropilénglikol és polietilénglikol és polipropilénglikol kopolimerjei is alkalmazhatók a találmány értelmében.

A leírás PEG-maradék alatt például - a korlátozás szándéka nélkül - egyenes vagy elágazó szénláncú PEG, metoxi-PEG, hidrolitikusan vagy enzimatikusan hasítható PEG, függő PEG, dendrimer PEG, PEG és egy vagy több poliol kopolimerjei, és PEG és PLGA [poli(tejsav)/glikolsav] kopolimerjei értendők.

Só alatt a leírásban a vegyületnek mind a karboxilcsoportokkal előállítható sóit, mind az aminocsoportokkal előállítható sóit értjük, amelyek ismert módon állíthatók elő. A karboxilcsoportok sói közé tartoznak a szervetlen sók, például nátrium-, kálium-, kalciumsók, és a szerves bázisokkal képzett sók, pél-



dául egy aminnal, így például trietanol-aminnal, argininnel vagy lizinnel alkotott sók. Az aminocsoportok sói közé tartoznak például a szervetlen savakkal, így például sósavval, és a szerves savakkal, például ecetsavval képzett sók.

Funkcionális származékok alatt a leírásban az aminosavak oldalláncában lévő funkciós csoportokból, vagy a terminális N- vagy C-csoportokból ismert módon előállított származékokat értjük, ha azok gyógyászatilag elfogadhatók, azaz nem rontják le a protein aktivitását, vagy ezektől nem lesz toxikus az ezeket tartalmazó gyógyászati készítmény. Ilyen származékok közé tartoznak például a karboxilcsoportok észterei vagy alifás amidjai, és a szabad aminocsoportok N-acil-származékai, vagy a szabad hidroxilcsoportok O-acil-származékai, amelyek acilcsoportokkal, például alkanoil- vagy aroilcsoportokkal állíthatók elő.

Prekurzor alatt olyan vegyületeket értünk, amelyek az emberi vagy állati testben IFN- $\beta$ -vá alakulnak át.

A protein aktív frakciói alatt a találmány értelmében a vegyület polipeptid láncának bármely fragmentumát vagy prekurzorát értjük, önmagukban, vagy a kapcsolódó hozzájuk kötött molekulákkal vagy maradékokkal, például cukrok vagy foszfátok maradékaival kombinációban, vagy a peptidmolekula aggregátumait, ha ezek a fragmentumok vagy prekurzorok gyógyszerként az IFN- $\beta$  aktivitásával rendelkeznek.

A találmány szerinti konjugátumokat bármely ismert eljárással előállíthatjuk. A találmány egyik kiviteli módja szerint az IFN- $\beta$ -t PEG-ilező szerrel reagáltatjuk megfelelő oldószerben, és a kívánt konjugátumot izoláljuk és tisztítjuk, például egy vagy több kromatográfiás módszer alkalmazásával.



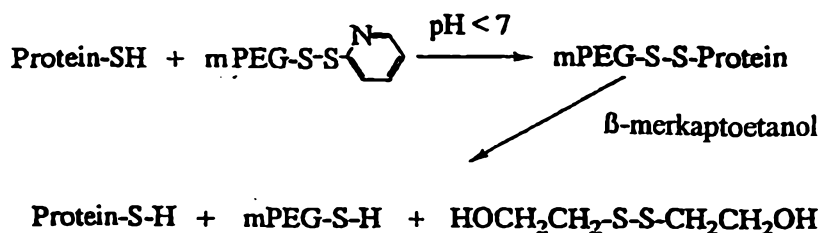
Kromatográfiás módszer alatt a leírásban bármely olyan technikát értünk, amelyet egy elegy komponenseinek szétválasztására lehet alkalmazni azáltal, hogy az elegyet egy hordozóra (stacioner fázis) visszük fel, amelyen egy oldószer (mobil fázis) folyik keresztül. A kromatográfiás módszerek elválasztási elvei a mobil bázis és a stacioner fázis eltérő fizikai tulajdonságain alapulnak.

A kromatográfiás eljárások típusai közelebbről szakirodalomból jól ismertek, ilyenek például a folyadék-, nagynyomású folyadék-, ioncserés, adszorpciós, affinitási, megoszlásos, hidrofób, fordított fázisú, gélszűréses, ultraszűréses vagy vékonyréteg-kromatográfiás eljárások.

Tiol-reaktív PEG-ilező szer alatt a leírásban bármely olyan PEG-származékot értünk, amely a cisztein-maradék tiolcsoportjával képes reagálni. Ez lehet például egy funkciós csoportot, például ortopiridil-diszulfidot, vinilszulfont, maleimidet, jódacetimidet vagy egyebet tartalmazó PEG. A találmány egyik előnyös kiviteli módja szerint a tiol-reaktív PEG-ilező szer a PEG ortopiridil-diszulfid (OPSS) származéka.

A PEG-ilező szert vagy mono-metoxilezett formájában alkalmazzuk, amikor csak az egyik vég használható fel a konjugáláshoz, vagy bifunkciós formában, amikor mindkét vég felhasználható a konjugáláshoz, például olyan konjugátum előállítására, amelyben két IFN- $\beta$  kapcsolódik kovalensen ugyanazon PEG-maradékhoz. A PEG-ilező szer móltömege előnyösen 500 és 100000 közötti.

A találmány szerinti konjugátumok előállítását tipikusan az alábbi eljárással végezzük:



A fenti reakcióvázlat második sora a PEG-protein kötés hatékonyságát mutatja be. Az mPEG-OPSS-származékok erősen szelektívek szabad szulfidrilcsoportokra, és gyorsan reagálnak savas pH körülmények között, ahol az IFN- $\beta$  stabil. A nagy szelektivitást a konjugátum natív IFN- $\beta$  formává és PEG-gé történő redukciójával bizonyíthatjuk.

A protein és a PEG-maradékok között képződött diszulfidkötésről kimutattuk, hogy a keringésben stabilak, azonban a sejt környezetbe történő bejutás után redukálhatók. Ezért várható, hogy az a konjugátum, amely nem jut be a sejtbe, stabil marad a keringésben, amíg onnan ki nem tisztul. Megjegyezzük, hogy a fenti reakció hely-specifikus, mivel a humán IFN- $\beta$  természetes formájában a 31-es és 141-es helyzetben jelenlévő másik két cisztein-maradék nem reagál a tiol-reaktív PEG-ilező szerrel, ugyanis ezek diszulfidhidat alkotnak.

A találmány tárgya továbbá eljárás két vagy több PEG-maradék polipeptidhez történő lépésenkénti kapcsolására. Az eljárás azon a felismerésen alapul, hogy egy kis móltömegű aktivált PEG tökéletesebben reagál a proteinen lévő szterikusan gátolt reakcióhellyel, mint egy nagy móltömegű aktivált PEG. A terápiás hatású drága proteinek PEG-módosításának költségkímélő-



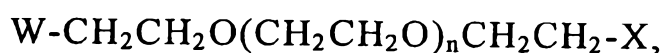
nek kell lennie annak érdekében, hogy a PEG konjugátum előállítására gyakorlatban megvalósítható legyen. Ezenkívül a PEG-protein konjugátum glomeruláris kiszűrődésének csökkentése és farmakológiai tulajdonságainak optimalizálása érdekében a konjugátumnak a 70 kDa móltömegű proteinnel ekvivalens effektív mérettel kell rendelkeznie. Ez azt jelenti, hogy egy olyan hely-specifikus módosításhoz, ahol egyetlen PEG-et kapcsolunk, a PEG-származéknak előnyösen 20 kDa-nál nagyobb móltömegeggyel kell rendelkeznie. Ha a módosítás helye sztérikusan zsúfolt, a nagyméretű PEG-maradékon lévő reakcióképes csoport nehezen fér hozzá a módosítás helyéhez, ezáltal kis hozamokat kapunk. A polipeptid PEG-ilezésére szolgáló találmány szerinti előnyös eljárással úgy növeljük a hely-specifikus PEG-ilezés hozamát, hogy először egy kisméretű hetero- vagy homobifunkciós PEG-maradékot kapcsolunk, amely - viszonylag kisebb mérete következtében - képes reagálni a sztérikusan zsúfolt helyekkel. Ezután a kisméretű PEG-hez egy nagy móltömegű PEG-származékot kapcsolva nagy hozammal kapjuk a kívánt PEG-ilezett proteint.

A találmány szerinti eljárás tehát egy vagy több maradék polipeptidhez történő sorozatos, lépésenkénti kapcsolására alkalmas oly módon, hogy először egy kis móltömegű heterobifunkciós vagy homobifunkciós PEG-maradékot kapcsolunk a polipeptidhez, majd a polipeptidhez kapcsolt kis móltömegű PEG-maradék szabad végéhez ezután monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékot kapcsolunk. Két vagy több PEG-maradék polipeptidhez - amely előnyösen az IFN- $\beta$ , ahol a PEG kapcsolódásának előnyös helye egy sztérikusan zsúfolt helyen loka-



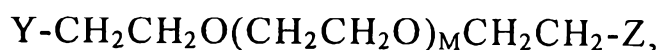
lizálódó Cys<sup>17</sup> - történő sorozatos lépésenkénti kapcsolása után a PEG-polipeptid konjugátumot egy vagy több tisztítási módszerrel, például ioncserés kromatográfiával, méret szerinti kizárásos kromatográfiával, hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfiával, affinitási kromatográfiával és fordított fázisú kromatográfiával tisztíthatjuk.

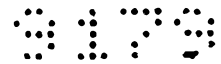
A kis móltömegű PEG-maradék képlete



ahol W és X jelentése olyan csoport, amelyek egymástól függetlenül amin, szulfidril, karboxil vagy hidroxil funkciós csoportokkal reagálva a kis móltömegű PEG-maradékot a polipeptidhez kapcsolják. W és X jelentését előnyösen egymástól függetlenül ortopiridil-diszulfid, maleimidek, vinil-szulfonok, jód-acetamidok, aminok, tiolok, karbonsavak, aktív észterek, benzo-triazol-karbonátok, p-nitrofenol-karbonátok, izocianátok és biotin közül választjuk. A kis móltömegű PEG-maradék móltömege előnyösen körülbelül 100 és 5000 Da között lehet.

A polipeptidhez kapcsolt, kis móltömegű PEG szabad végéhez kapcsolandó monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradék móltömege előnyösen körülbelül 100 Da és 200 kDa között van, és ez előnyösen egy metoxi-PEG, elágazó láncú PEG, hidrolitikusan vagy enzimatikusan hasítható PEG, függő PEG vagy dendrimer PEG. A monofunkciós vagy bifunkciós PEG általános képlete





ahol Y a polipeptidhez kapcsolódott kis móltömegű PEG-maradék szabad végén lévő terminális csoporttal reagálni képes csoportot jelent, és Z jelentése  $-OCH_3$ , vagy egy olyan csoport, amely X-szel reagálni képes, ezáltal bifunkciós konjugátumot képez.

Az egy vagy több PEG-maradék lépésenkénti kapcsolására szolgáló fenti eljárással előállított PEG-polipeptid konjugátum hatóanyagként olyan gyógyszerek vagy gyógyászati készítmények előállítására alkalmazható, amelyek a fenti polipeptiddel hatékonyan kezelhető betegségek vagy rendellenességek kezelésére alkalmazhatók.

A találmány további tárgyát alapvetően tiszta formában lévő konjugátumok képezik, amelyek hatóanyagként alkalmazhatók gyógyászati készítményekben bakteriális és virális fertőzések, valamint autoimmun, gyulladáshoz kapcsolódó betegségek és tumorok kezelésére, diagnózisára és prognózisára. Az ilyen gyógyászati készítmények a találmány további tárgyát jelentik.

A fenti betegségekre a korlátozás szándéka nélkül említjük az alábbiakat: szeptikus sokk, AIDS, reumás arthritis, lupus erythematosus és szklerózis multiplex.

A találmány további előnyei és kiviteli alakjai az alábbi leírásból nyilvánvalóak.

A találmány értelmében a találmány szerinti konjugátumok farmakológiailag hatékony mennyiségei olyan egyedeknek adagolhatók, amelyekben fennáll a veszélye a fent említett betegségek kifejlődésének, vagy olyan egyedeknek, amelyekben a fenti betegségek már megmutatkoztak.

Az adagolást a hatóanyaggal összeférhető bármely adago-



lási módszerrel elvégezhetjük. Előnyös a parenterális adagolás, például a szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás injekció. A beadandó hatóanyag dózisa a gyógyászati előírásoktól függően változik, a beteg életkora, testtömege és egyedi válasza alapján.

A dózis 10  $\mu\text{g}$  és 1 mg között változhat naponta egy átlagos, 75 kg testtömegű beteg esetén, az előnyös napi dózis 20  $\mu\text{g}$  és 200  $\mu\text{g}$  között lehet.

A parenterális adagolásra alkalmas gyógyászati készítményt hatóanyagot és megfelelő vivőanyagot tartalmazó injektálható formában állíthatjuk elő. Vivőanyagként parenterális adagolásra jól ismert anyagok alkalmazhatók, például víz, sóoldat, Ringer-oldat és/vagy dextróz. A vivőanyag tartalmazhat kis mennyiségben segédanyagokat is, a gyógyászati készítmény stabilitásának és izotonicitásának biztosításához. Az oldatok előállítását gyógyszerkészítésben szokásosan alkalmazott módszerek szerint végezhetjük.

A találmányt közelebbről specifikus kiviteli alakokkal ismertetjük, azonban magától értetődően a szakember számára nyilvánvaló módosítások és helyettesítések szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

A találmányt közelebbről - a korlátozás szándéka nélkül - az alábbi példákkal ismertetjük.

#### 1. példa

#### **PEG-IFN- $\beta$ konjugátum előállítása**

#### IFN- $\beta$ módosítása mPEG<sub>5K</sub>-OPSS-sel

A PEG-IFN- $\beta$  konjugátum előállítására rekombináns humán IFN- $\beta$ -t alkalmaztunk, amely 50 mmol/l nátrium-acetát puffer-



ben (pH 3,6) 0,37 mg/ml koncentrációban stabil. Körülbelül 1,0 ml 6 mol/l koncentrációjú karbamidot adtunk 2 ml 0,37 mg/ml koncentrációjú IFN- $\beta$ -oldathoz (0,74 mg,  $3,7 \times 10^{-8}$  mol). 1 mol IFN- $\beta$ -hoz 50 mol moláris feleslegben adtunk mPEG<sub>5K</sub>-OPSS-t, és a két anyagot polipropilén csőben reagáltattuk 37 °C-on 2 órány keresztül, vagy 50 °C-on 1 órány keresztül. A reakcióelegyet kapilláris elektroforézissel (CE) analizáltuk, hogy meghatározzuk a tisztítás előtt a PEG-ilezési reakcióval keletkezett PEG-IFN- $\beta$  konjugátum mennyiségét (1. ábra). A fenti reakció tipikus hozama 50% PEG-IFN- $\beta$ . A reakcióelegyből a reakciótermékeket 0,22 mm-es fecskendőszűrővel elválasztottuk, és a szűrt oldatot ezután méret szerinti kizárásos oszlopra (Superose 12 vagy Superdex 75, Pharmacia) vittük fel, és 50 mmol/l nátrium-foszfát, 150 mmol/l NaCl (pH 7,0) pufferrel eluáltuk. A 2A ábrán látható a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum Superose 12 méret szerinti kizárásos kromatográfiás oszlopon történő tisztításával kapott elúciós profil. A csúcsokat összegyűjtöttük, és SDS-PAGE eljárással analizáltuk (3. ábra). A PEG-IFN- $\beta$  konjugátumot tartalmazó frakciókat egyesítettük, és a koncentrátumot ugyanazon méret szerinti kizárásos oszlopra vittük fel a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum további tisztítása céljából, a „natív” IFN- $\beta$  csúcs közelsége miatt (2B ábra). Ezt az eljárást megismételtük (harmadik felvitel), hogy a terméket tiszta formában nyerjük (2C ábra). A 4. és 5. ábrán látható a tisztított PEG-IFN- $\beta$  konjugátum kapilláris elektroforézis görbéje, és MALDI MS spektruma.

#### IFN- $\beta$ módosítása mPEG<sub>30K</sub>-OPSS-sel

Rekombináns humán IFN- $\beta$ -ból stabil, 0,36 mg/ml oldatot állítottuk elő 50 mmol/l nátrium-acetát pufferben (pH 3,6).



3 ml 0,36 mg/ml koncentrációjú IFN- $\beta$  oldathoz (1,08 mg,  $4,9 \times 10^{-8}$  mol) körülbelül 36 mg mPEG<sub>30K</sub>-OPSS-t adtunk 3 ml ionmentes vízben, és a két reaktánst polipropilén csőben 50 °C-on 2 órán keresztül reagáltattuk. A reakcióelegyet kapilláris elektroforézissel analizáltuk a módosítás mértékének meghatározására. A tipikus hozam ebben a reakcióban <30%. Az oldatot ezután méret szerinti kizárásos oszlopra (Superose 12, Pharmacia) vittük fel, és 50 mmol/l nátrium-foszfát, 150 mmol/l NaCl (pH 7,0) pufferrel eluáltuk. A csúcsokat összegyűjtöttük, és SDS-PAGE módszerrel analizáltuk azok tartalmát.

## 2. példa

### **PEG-IFN- $\beta$ konjugátum biológiai aktivitása**

A PEG-ilezés hatását a humán rekombináns IFN- $\beta$  antivirális aktivitására úgy határoztuk meg, hogy humán WISH amnionsejteket vagy frissen előállított IFN- $\beta$ -val (ugyanaz a sarzs, mint amelyet a PEG-ilezésre alkalmaztunk), vagy PEG-IFN- $\beta$  konjugátummal előinkubáltunk. Az IFN- $\beta$ -mediálta antivirális aktivitást - amelyet WISH-VSV citopátiás vizsgálattal mértünk - a Novick és munkatársai [J. Immunol. 129, 2244-2247 (1982)] eljárása alapján kifejlesztett antivirális WISH biovizsgálattal határoztuk meg. A WISH vizsgálatban az alábbi anyagokat alkalmaztuk:

WISH sejtek (ATCC CCL 25),

hólyagos szájgyulladás vírus törzstenyészetek (ATCC V-520-001-522), amelyeket -70 °C-on tároltunk,

humán rekombináns IFN- $\beta$  (InterPharm Laboratories LTD, 32075 típus, 205035 számú sarzs),  $82 \times 10^6$  NE (nemzetközi egység)/ml, specifikus aktivitás:  $222 \times 10^6$  NE/mg,



PEG-IFN- $\beta$  konjugátum, amelyet az 1. példában leírtak szerint állítottunk elő, és PBS-ben (pH 7,4) tartottunk,

WISH tenyésztő közeg (nagy glükóztartalmú MEM, Earle-féle sókkal + 10% FBS + 0,1% L-glutamin + 100 egység/ml penicillin vagy 100  $\mu$ g/ml streptomycin),

WISH vizsgálati közeg (nagy glükóztartalmú MEM, Earle-féle sókkal + 5% FBS + 1,0% L-glutamin + 100 egység/ml penicillin vagy 100  $\mu$ g/ml streptomycin),

MTT 5 mg/ml PBS-ben, -70 °C-on tárolt.

A WISH vizsgálatot az alábbiak szerint végezzük:

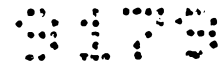
Az IFN- $\beta$  mintát a kiindulási koncentráció kétszeresére hígítjuk WISH vizsgálati közeggel.

Az IFN- $\beta$  mintából WISH vizsgálati közeggel háromszoros hígítási sort készítünk laposaljú 96-rezervoáros lemezen, oly módon, hogy minden egyes rezervoár 50  $\mu$ l hígított IFN- $\beta$  mintát tartalmaz (néhány kontroll rezervoárba 50  $\mu$ l WISH vizsgálati közeget mérünk csak).

A log szaporodási fázisban lévő WISH sejteket tripszin/EDTA oldattal összegyűjtjük, WISH vizsgálati közeggel mosuk, és  $0,8 \times 10^6$  sejt/ml végkoncentrációra állítjuk be.

Az egyes rezervoárakba 50  $\mu$ l WISH sejtszuszpenziót ( $4 \times 10^4$  sejt/rezervoár) adunk. A sejtekkel érintkeztetett IFN- $\beta$  végkoncentrációja így egyszeres lesz.

5% szén-dioxidot tartalmazó, párasított inkubátorban 24 órán keresztül történő inkubálás után 50  $\mu$ l 1:10 hígítású (WISH vizsgálati közeggel) VSV törzstenyészetet (ezt a dózist úgy határoztuk meg előzetesen, hogy a WISH sejtek 100%-át lizálja 48 órán belül) adunk az összes rezervoárba, a vírust nem tartal-



mazó kontroll rezervoárok kivételével (ezekbe csak azonos térfogatú vizsgálati közeget mérünk).

További 48 óra elteltével 25 µl MTT oldatot mérünk az összes rezervoárba, ezután a lemezeket inkubátorban 2 órán keresztül tovább inkubáljuk.

A rezervoárok tartalmát a lemez megfordításával eltávolítjuk, és 200 µl 100%-os etanolt mérünk a rezervoárokba. 1 óra elteltével a lemezeket 595 nm-en leolvassuk Soft max Pro software programcsomag és Spectramax spektrofotométer rendszer (Molecular Devices) alkalmazásával.

### 1. táblázat

#### **PEG-ilezett és ál-PEG-ilezett IFN-β minták antivirális aktivitása**

<b>IFN-β minta*</b>	<b>EC<sub>50</sub>**</b>
PEG-IFN-β konjugátum	3,9 +/- 0,7 pg/ml
IFN-β	16,4 +/- 1,0 pg/ml

\* IFN-β törzskoncentrációit a mintákban aminosav-analízissel határoztuk meg

\*\* EC<sub>50</sub> (+/- S.D.) meghatározása Microcal Origin 4.1 software csomaggal

A 6. ábrából és az 1. táblázat adataiból látható, hogy a PEG-IFN-β konjugátumban az antivirális aktivitás szintje magasabb volt, mint az IFN-β-é a frissen előállított kiindulási sarzsban. Az a megfigyelés, hogy a PEG-IFN-β konjugátum körülbelül négyszer nagyobb bioaktivitással rendelkezik, mint a



frissen előállított IFN- $\beta$ , a PEG-IFN- $\beta$  konjugátum natív IFN- $\beta$ -hoz viszonyított fokozott stabilitásának következménye is lehet a WISH vizsgálati közeg hozzáadása után.

### 3. példa

#### **PEG-IFN minták relatív aktivitásának vizsgálata in vitro**

A PEG[30 kD]-IFN- $\beta$  és PEG[2 x 20 kD]-IFN- $\beta$  relatív bioaktivitását WISH módszerrel határoztuk meg a 2. példa szerinti standard protokoll alkalmazásával (2. táblázat). A három, egymástól független vizsgálatot három különböző egyén végezte különböző időkben.

### 2. táblázat

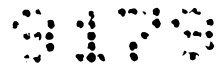
#### **PEG-IFN- $\beta$ relatív antivirális aktivitása**

Minta	Relatív interferon aktivitás* (három vizsgálatból)			
	1. vizsgálat	2. vizsgálat	3. vizsgálat	Átlag (S.D.)
PEG[30kD]-IFN- $\beta$	3,2 x nagyobb	3,1 x nagyobb	1,8 x nagyobb	3,0x(0,78)nagyobb
PEG[2x20kD]-IFN- $\beta$	4,2 x nagyobb	1,3 x nagyobb	0,85 x nagyobb	2,1 x(1,8)nagyobb

\* EC<sub>50</sub> dózisok a standard IFN- $\beta$ -val történő összehasonlítás minden egyes vizsgálatban szerepelt

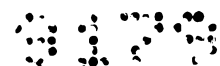
\*\* Az összehasonlítást 330  $\mu$ g/ml IFN- $\beta$  koncentráció alapján végeztük. A PEG[30 kD]-IFN- $\beta$  (5,41  $\mu$ g/ml) és a PEG[2 x 20 kD]-IFN- $\beta$  (6,86  $\mu$ g/ml) alapkonzentrációit aminosav-analízissel határoztuk meg.

A PEG-IFN- $\beta$  kötődését a sejteken lévő receptorához rögzített mennyiségű <sup>125</sup>I-IFN- $\alpha$ 2a jelenlétében értékeltük ki. Az



IFN- $\alpha$ 2a-t  $^{125}\text{I}$ -vel jeleztük radioaktívan, kloramin T módszerrel. Az IFN- $\alpha$ 2a-hoz kötődött  $^{125}\text{I}$ -t a szabad jódtól úgy választottuk el, hogy a reaktánsokat Sephadex G25 oszlopon vezettük át, és összegyűjtöttük a proteintartalmú frakciókat (Pharmacia). A  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\alpha$ 2a mennyiségét IFN- $\alpha$ 2a ELISA módszerrel (Bio-source, USA) határoztuk meg, és meghatároztuk a specifikus aktivitást. Az exponenciális szaporodási fázisban lévő Daudi sejteket összegyűjtöttük, és  $2 \times 10^6$  sejtet  $0,5 \text{ nmol/l } ^{125}\text{I}$ -IFN- $\alpha$ 2a-val szobahőmérsékleten 3 órán keresztül inkubáltunk PEG-IFN- $\beta$  vagy IFN- $\alpha$ 2a különböző koncentrációinak jelenlétében, amelyek hígítását 2% magzati borjúsérumot és 0,1% nátriumazidot tartalmazó RPMI 1640 vizsgálati pufferrel végeztük. Az inkubációs periódus végén a sejteket ftalát.olaj rétegen keresztül centrifugáltuk, és a sejthez kötött radioaktivitást gamma számlálóval mértük. A PEG[30kD]-IFN- $\beta$  és PEG[2x20kD]-IFN- $\beta$  kötődése a receptorhoz nagyon hasonló vagy közeli volt az IFN- $\beta$  kötődési aktivitásához, amint az a 7. ábrából látható.

Ezenkívül, meghatároztuk a relatív aktivitást Daudi sejten (humán B-sejtes limfóma) végzett antiproliferációs vizsgálattal (3. táblázat). Az összes IFN minta koncentrációja  $200 \text{ ng/ml}$  kétszerese volt. A mintákból háromszoros hígítási sort készítettünk a lemezen,  $100 \mu\text{l}$  végtérfogatban. Az egyes rezervoárakba  $1 \times 10^5$  sejt/rezervoár ( $100 \mu\text{l}$ ) mennyiségben adtuk a sejteket, és összesen 72 órán keresztül inkubáltuk  $37^\circ\text{C}$ -on szén-dioxidot tartalmazó párásított inkubátorban. 48 óra elteltével triciált ( $^3\text{H}$ ) timidint adtunk hozzá  $1 \mu\text{Ci}$ /rezervoár mennyiségben,  $20 \mu\text{l}$  térfogatban. 72 órás inkubációs periódus végén a lemezeről Tomtek Plate Harvester segítségével össze-



gyűjtöttük a sejteket. Az eredményeket a 3. táblázatban közöljük, amelyek jelzik, hogy a PEG-ilezés nem eredményezett detektálható IFN-aktivitás veszteséget. Valójában az aktivitás valamivel nagyobb volt, mint a szabad IFN- $\beta$  aktivitása. Ennek oka az lehet, hogy a szabad IFN-ben inaktív aggregátumok képződnek, vagy a kvantitatív módszerek különbségeiből adódhat az eltérés (aminosav-analízis a PEG-IFN minták, és RP-HPLC IFN- $\beta$  esetén).

### 3. táblázat

#### **Daudi antiproliferációs vizsgálat**

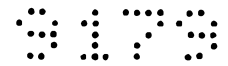
	<b>IC<sub>50</sub> dózis (pg/ml)</b>	<b>Aktivitásnövekedés IFN-hez viszonyítva</b>
IFN- $\beta$ (1. lemez)	1153,1	-
PEG[30kD]-IFN (71A)	696,6	1,6-szoros
IFN- $\beta$ (2. lemez)	1005,8	-
PEG[40kD]-IFN (71B)	629,4	1,7-szeres

### 4. példa

#### **Farmakokinetikai vizsgálatok egérben**

##### Intravénás adagolás

Az egereknek 100 ng IFN- $\beta$ -t, PEG[30kD]-IFN- $\beta$ -t vagy PEG[2x20kD]-IFN- $\beta$ -t injektáltunk, és a megadott időpontokban vérmintát vettünk. Az IFN- $\beta$  szérumkoncentrációit IFN- $\beta$ -specifikus ELIAS módszerrel (Toray Industries) határoztuk meg, és az eredményeket a 8. ábrán ismertetjük. 28 db nőstény B6D2F1 egeret (6-8 hetesek, körülbelül 20 g-osak) négy csoportra osz-



tottunk, az alábbiak szerint: az 1. csoportnak (amely 9 egérből állt) 200 µl 500 ng/ml humán IFN-β-t injektáltunk egyetlen bólusban (végső dózis 100 ng/egér); a 2. csoportnak (9 egér) 200 µl ekvivalens mennyiségű PEG[30kD]-IFN-β-t injektáltunk; a 3. csoportnak 200 µl ekvivalens mennyiségű PEG[2x20kD]-IFN-β-t injektáltunk, és a 4. csoportnak (3 egér) nem adtunk injekciót, ezek negatív kontrollként szolgáltak. A vérmintákat (körülbelül 200 µl/minta) kilenc megadott időpontban vettük, a retro-orbitális vénás plexus roncsolásával, kapilláris cső segítségével. A vérmintákat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten alvadni hagytuk, a karimát összegyűjtöttük és mikrocentrifugáltuk. Az elválasztott szérumot -70 °C-on tároltuk addig, amíg az összes mintát levettük. A szérumokat bioaktív humán IFN-β jelenlétére vizsgáltuk Toray vizsgálattal. Az eredmények azt jelzik, hogy a görbe alatti terület (AUC) jelentősen megnőtt a PEG-IFN mintákban a szabad IFN-β-hoz képest és a PEG[2x20kD]-IFN-β minta előnyösebb, mint a PEG[30 kD]-IFN-β.

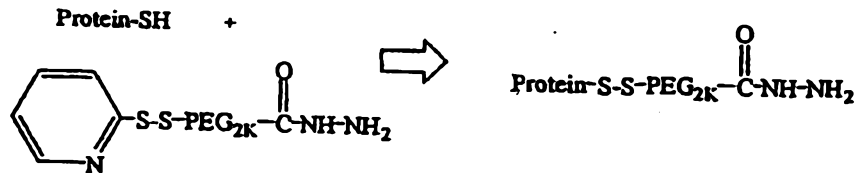
#### Szubkután adagolás

Az egereknek szubkután módon IFN-β-t és PEG-IFN-t (100 ng/egér) injektáltunk. A 9. ábrán látható, hogy a görbe alatti összes terület (AUC) drámaian megnőtt a PEG-IFN minták esetén a szabad IFN-β-hoz viszonyítva. A farmakokinetikai vizsgálatok összhangban vannak azzal, hogy a PEG-IFN minták hosszabb felezési idővel és megnövekedett AUC-val rendelkeznek.



### 5. példa

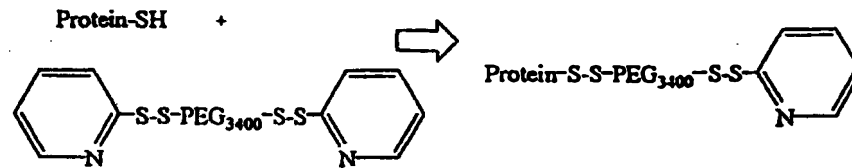
### **Kis móltömegű PEG-maradék kapcsolása polipeptidhez** **Interferon-béta „címkézése” OPSS-PEG<sub>2k</sub>-hidraziddal**



A rekombináns humán interferon- $\beta$ -ből 0,33 mg/ml oldatot készítettünk 50 mmol/l nátrium-acetát pufferrel (pH 3,8). Körülbelül 3,6 mg (40 mol% felesleg a protein móljára vonatkoztatva) heterobifunkcionális PEG reagenst, azaz OPSS-PEG<sub>2k</sub>-hidrazidot adtunk 2 ml ionmentes vízben 3 ml 0,33 mg/ml koncentrációjú IFN- $\beta$  oldathoz (0,99 mg), és a reaktánsokat poli-propilén csőben, 45 °C-on 1 órán keresztül hagytuk reagálni. A reakcióelegyet ezután kapilláris elektroforézissel analizálva meghatároztuk a módosítás mértékét. A tipikus hozam 90-97% volt, az alkalmazott interferon- $\beta$  és PEG reagens tisztaságától függően. Az oldatot ezután méret szerinti kizárásos oszlopra (Superdex 75, Pharmacia) vittük fel, és 5 mmol/l nátrium-foszfát, 150 mmol/l NaCl (pH 7,0) pufferrel eluáltuk. A csúcsokat összegyűjtöttük, és SDS-PAGE módszerrel analizáltuk. A mono-PEG-ilezett interferon- $\beta$  frakciókat összegyűjtöttük, majd ezt alkalmaztuk a nagy móltömegű PEG-gel végzett további módosítás lépésében.



### Interferon- $\beta$ „címkézése (OPSS) $_2$ -PEG $_{3400}$ -zal



A rekombináns humán interferon- $\beta$ -ból 0,33 mg/ml koncentrációjú oldatot készítettünk 50 mmol/l nátrium-acetát pufferrel (pH 3,8). Körülbelül 6,1 mg (40 mol felesleg a protein móljára vonatkoztatva) homobifunkcionális PEG reagenst, azaz (OPSS) $_2$ -PEG $_{3400}$ -at adtunk 2 ml ionmentes vízben 3 ml 0,33 mg/ml koncentrációjú interferon- $\beta$ -hoz (0,99 mg), és a két reaktánst polipropilén csőben 2 órán keresztül hagytuk reagálni 50 °C-on. A reakciót nem-redukáló SDS-PAGE módszerrel ellenőriztük, és a végső reakcióelegyet kapilláris elektroforézissel analizáltuk a módosítás mértékének meghatározására. A fenti reakcióban az interferon- $\beta$  módosítása jellemzően >95%. Az oldatot ezután méret szerinti kizárásos oszlopra (Superdex 75, Pharmacia) vittük fel, és 50 mmol/l nátrium-foszfát, 150 mmol/l NaCl (pH 7,0) pufferrel eluáltuk. A csúcsokat összegyűjtöttük, és tartalmukat SDS-PAGE módszerrel analizáltuk. A monoPEG-ilezett interferon- $\beta$  frakciókat egyesítettük.





zások vagy adaptációk, amelyek szakember számára kézenfekvők.

A leírásban idézett irodalmak, így a szakcikkek vagy kivonatok, publikált vagy publikálatlan US vagy egyéb szabadalmi bejelentések, megadott US és egyéb szabadalmak, vagy bármely egyéb dokumentum tartalmát leírásunkba referenciaként beépítettük, beleértve az összes adatot, táblázatot, ábrát és szöveget. Ezenkívül leírásunkba referenciaként beépítettük az irodalmi hivatkozásokban hivatkozott összes szakirodalom teljes tartalmát is.

Az ismert eljárási lépésekre, szokásos eljárási lépésekre, ismert eljárásokra vagy szokásos eljárásokra való hivatkozást semmiképpen nem úgy értjük, hogy a találmány szerinti leírás vagy kiviteli mód a hivatkozott szakirodalomban le lett volna írva, vagy arra kitanítás vagy javaslat található lett volna.

A specifikus kiviteli módok fenti ismertetéséből a találmány általános jellege nyilvánvaló, és egy szakember köteles tudásának alkalmazásával (amelybe beletartozik a fent idézett irodalmak tartalma is) módosítani és/vagy adaptálni képes különféle alkalmazásokra a fenti specifikus kiviteli alakokat túlzott mértékű kísérleti munka végzése és a találmány elvétől való eltérés nélkül. Ezért az ilyen módosítások és adaptációk az ismertetett kiviteli alakok ekvivalenseinek körébe tartoznak, amelynek alapját a leírásban található kitanítás képezi. Magától értetődik, hogy a leírás céljára használt terminológia nem a korlátozást szolgálja, és hogy a leírásban alkalmazott kifejezéseket szakembernek saját tudásával kombinációban a leírásban adott kitanítás tükrében kell értelmeznie.



## Szabadalmi igénypontok

1. Poliol-interferon- $\beta$  konjugátum, amely humán interferon- $\beta$  Cys<sup>17</sup>-jéhez kovalensen kötött poliol-maradékot tartalmaz.

2. Az 1. igénypont szerinti poliol-interferon- $\beta$  konjugátum, amelyben a poliol-maradék egy polialkilénglikol-maradék.

3. A 2. igénypont szerinti poliol-interferon- $\beta$  konjugátum, amelyben a polialkilénglikol-maradék egy polietilénglikol (PEG) maradék.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti poliol-interferon- $\beta$  konjugátum, ahol a poliol-interferon- $\beta$  konjugátum azonos vagy nagyobb interferon- $\beta$  aktivitással rendelkezik, mint a natív humán interferon- $\beta$ .

5. Eljárás az 1. igénypont szerinti poliol-interferon- $\beta$  konjugátum előállítására, **azzal jellemezve**, hogy interferon- $\beta$ -t tiol-reaktív poliol reaktánssal reagáltatva hely-specifikusan és kovalensen kapcsolunk egy poliol-maradékot a humán interferon- $\beta$  Cys<sup>17</sup>-hez; és az így kapott poliol-interferon- $\beta$  konjugátumot kinyerjük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy tiol-reaktív poliolreaktánsként tiol-reaktív PEG-ilező szert alkalmazunk.

7. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tiol-reaktív poliol reaktáns mono-metoxilezett.

8. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tiol-reaktív poliol reaktáns bifunkciós.

9. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tiol-reaktív poliol reaktáns egy poliolszármazék,



amely ortopiridil-diszulfid, vinil-szulfon, maleimid és jódacetimid közül választott funkciós csoportot tartalmaz.

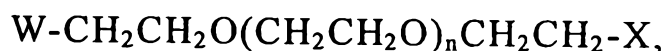
10. Az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárás, ahol a tiolreaktív poliol reaktáns egy mono-metoxilezett poliol ortopiridil-diszulfid származéka.

11. Az 5. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a reagáltatást savas pH-n hajtjuk végre, ahol az interferon- $\beta$  stabil.

12. Gyógyászati készítmény, amely hatóanyagként az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti poliol-interferon- $\beta$  konjugátumot, és gyógyászatilag elfogadható hordozót, kötőanyagot vagy segédanyagot tartalmaz.

13. A 12. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, amelynek hatékony mennyisége fertőzések, tumorok és autoimmun és gyulladásos betegségek kezelésére alkalmazható.

14. Eljárás polietilénlikol (PEG) maradékok sorozatos, lépésenkénti kapcsolására egy polipeptidhez, **azzal jellemezve**, hogy egy polipeptidet egy

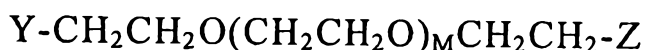


általános képletű kis móltömegű heterobifunkciós vagy homobifunkciós PEG-maradékkal - ahol W és X jelentése egymástól függetlenül amin, szulfidril, karboxil vagy hidroxil funkciós csoportokkal reagáló csoport - reagáltatva a kis móltömegű PEG-maradékot a polipeptidhez kapcsoljuk; és a polipeptidhez kapcsolt kis móltömegű PEG-maradékot egy monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékkal reagáltatva a monofunkciós vagy



bifunkciós PEG-maradékot a kis móltömegű PEG-maradék szabad végéhez kapcsoljuk, és így PEG-polipeptid konjugátumot kapunk.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy egy



általános képletű monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékot - ahol Y a polipeptidhez kapcsolt kis móltömegű PEG-maradék szabad végén lévén terminális csoporttal reagálni képes csoportot jelent, és Z jelentése  $-OCH_3$  vagy az X-szel reagálni képes csoport - alkalmazunk a bifunkciós konjugátum kialakítására.

16. A 15. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradékként metoxi-PEG-et, elágazó láncú PEG-et, hidrolitikusan vagy enzimatikusan lebontható PEG-et, függő PEG-et vagy dendrimer PEG-et alkalmazunk.

17. A 14. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy W és X jelentését egymástól függetlenül ortopiridil-diszulfid, maleimidek, vinilszulfonok, jódacetamidok, hidrazidok, aldehidek, szukcinimidil-észterek, epoxidok, aminok, tiolok, karbonsavak, aktív észterek, benzotriazol-karbonátok, p-nitrofenol-karbonátok, izocianátok és biotin közül választjuk.

18. A 14. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a kis móltömegű PEG-maradék móltömege körülbelül 100-5000 Da.



19. A 14. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradék móltömege körülbelül 100 Da - 200 kDa.

20. A 14. igénypont szerinti eljárás, ahol a kis móltömegű PEG-maradék és/vagy monofunkciós vagy bifunkciós PEG-maradék egy polietilén-glikol kopolimer.

21. A 20. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a polietilén-glikol kopolimert polietilén-glikol/polipropilén-glikol kopolimerek és polietilén-glikol/poli(tejsav/glikolsav) kopolimerek közül választjuk.

22. A 14. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy további lépésként tartalmazza a PEG-polipeptid konjugátum tisztítását a két PEG-maradék polipeptidhez sorozatos, lépésenként történő kapcsolása után.

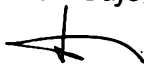
23. A 22. igénypont szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a tisztítást ioncserés kromatográfia, méret szerinti kizárásos kromatográfia, hidrofób kölcsönhatáson alapuló kromatográfia, affinitási kromatográfia és fordított fázisú kromatográfia közül választott egy vagy több tisztítási módszerrel végezzük.

24. A 14-23. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, **azzal jellemezve**, hogy a polipeptid az interferon- $\beta$ .

25. A 14-23. igénypontok bármelyike szerint előállított PEG-polipeptid konjugátumok alkalmazása gyógyszerként.

2003-03-28.  
DS.

A meghatalmazott:  
**DANUBIA**  
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

  
dr. Kiss Ildikó  
szabadalmi ügyvivő

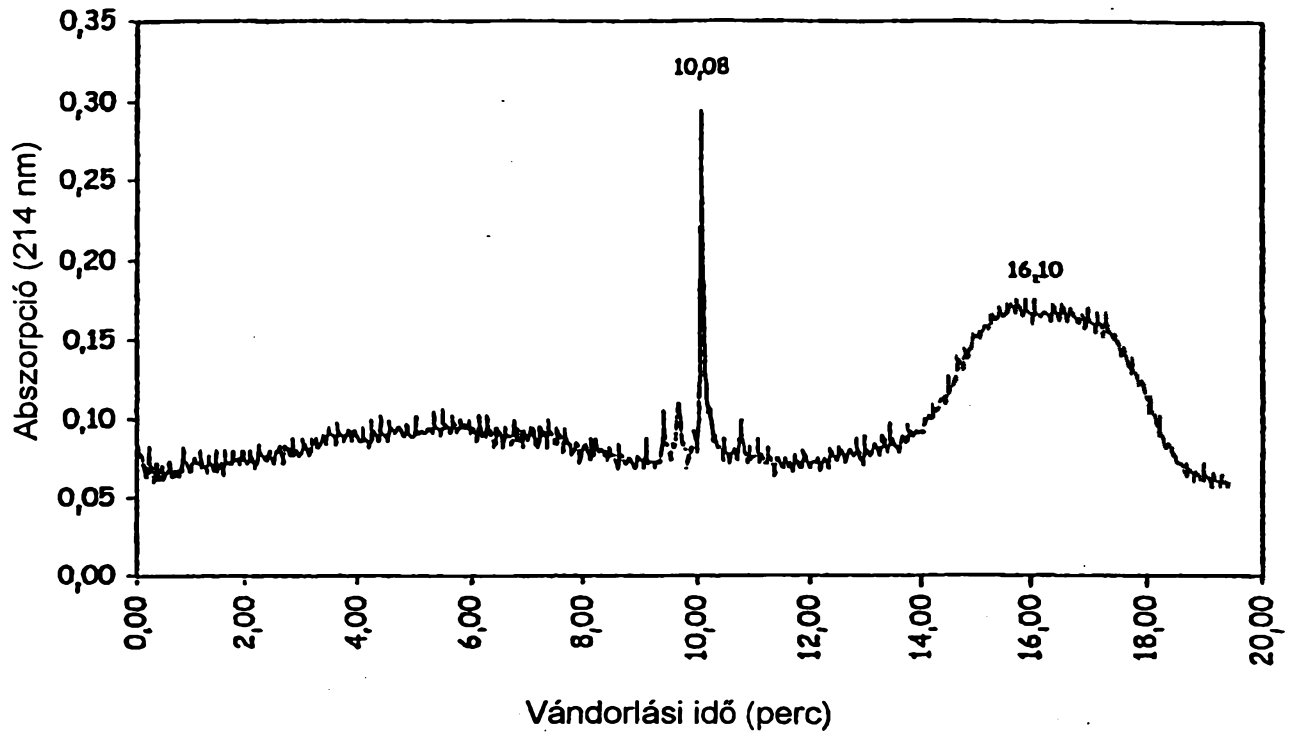
P0300548.

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

9179

1/6

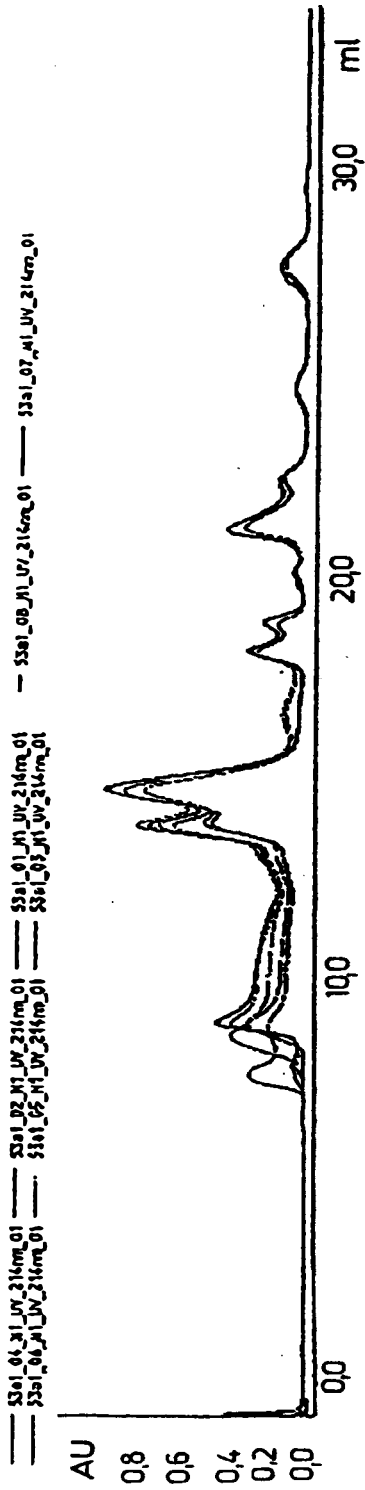
A2



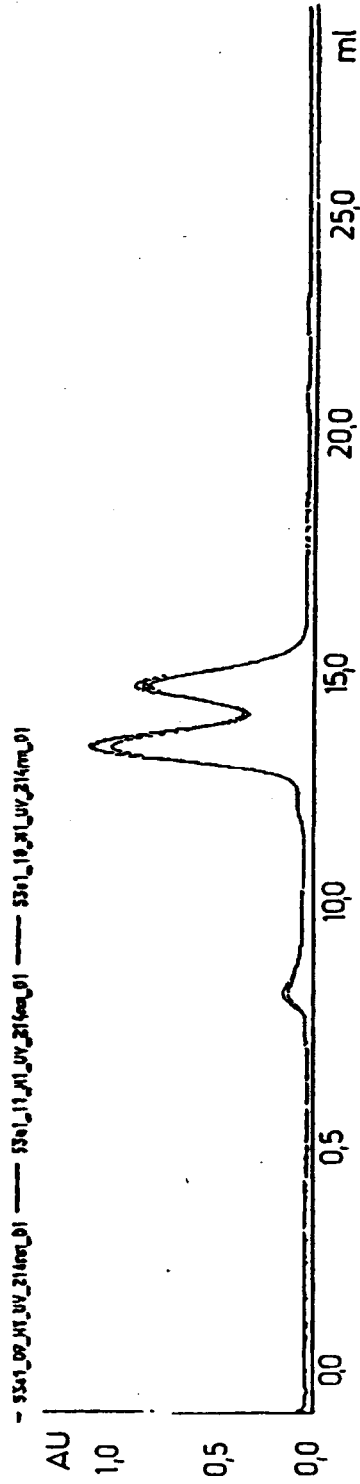
1. ábra

2003. 03. 28.

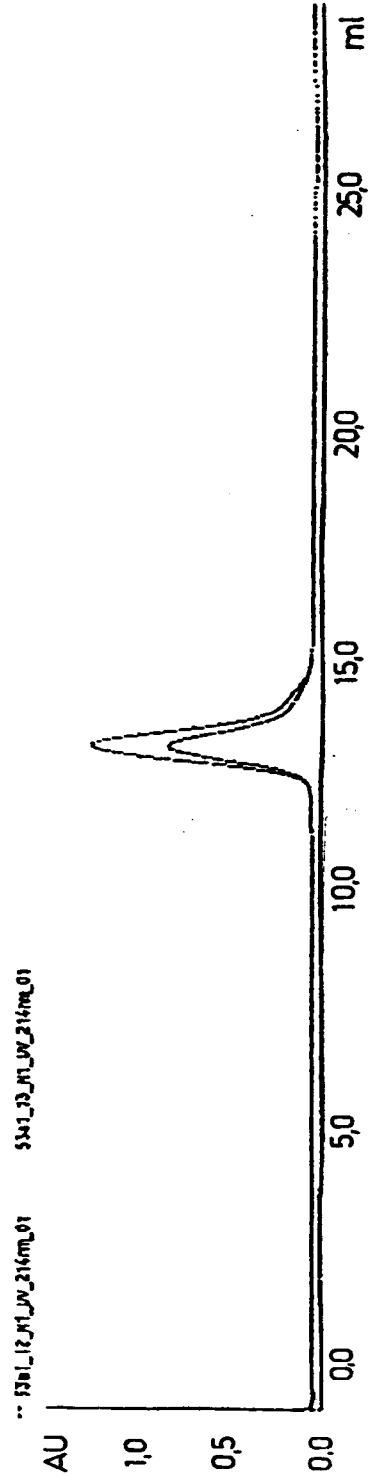
Ds.



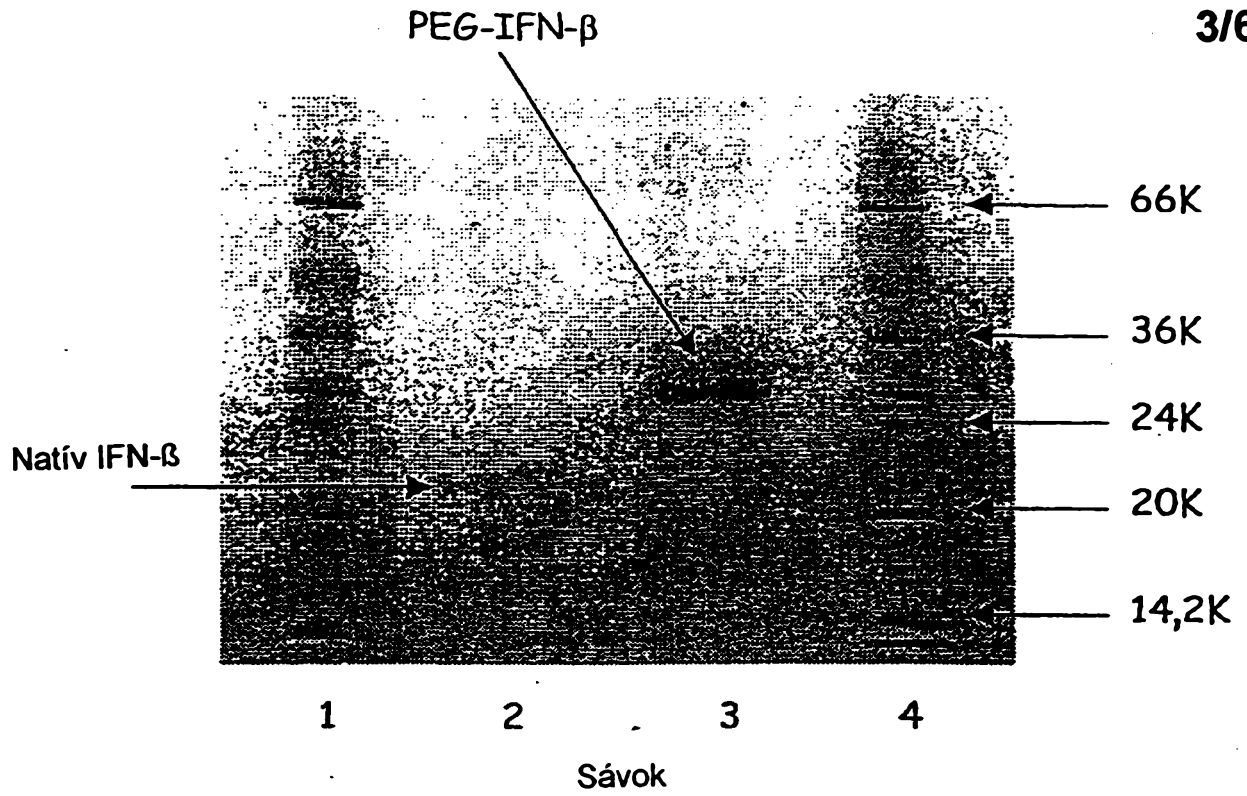
2/A ábra



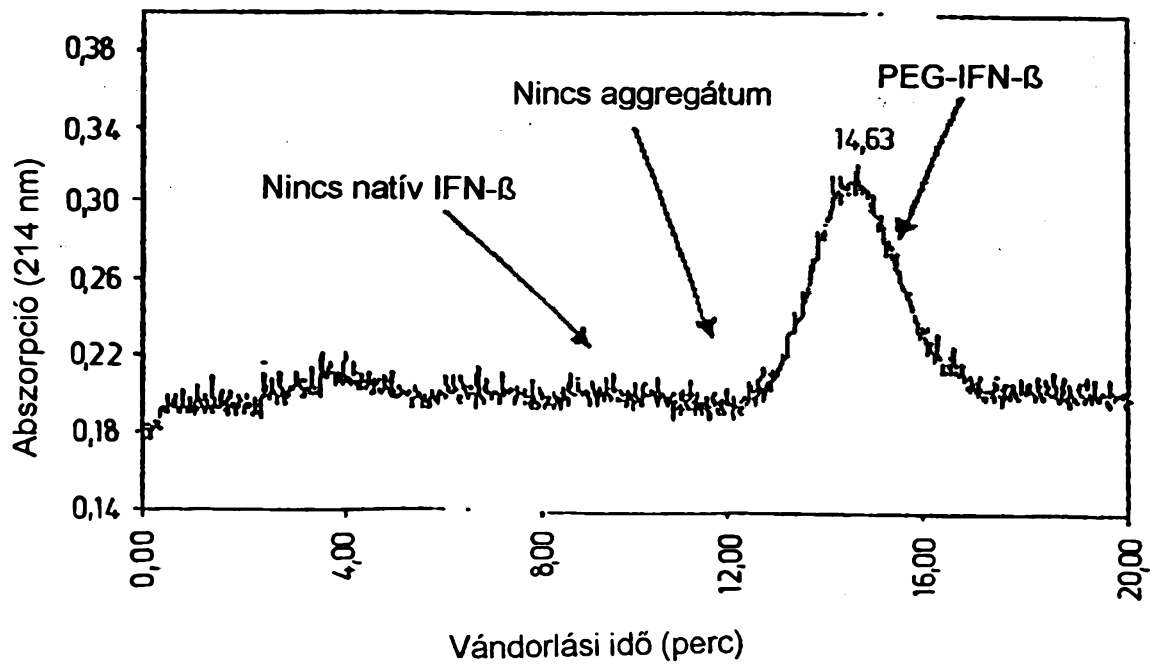
2/B ábra



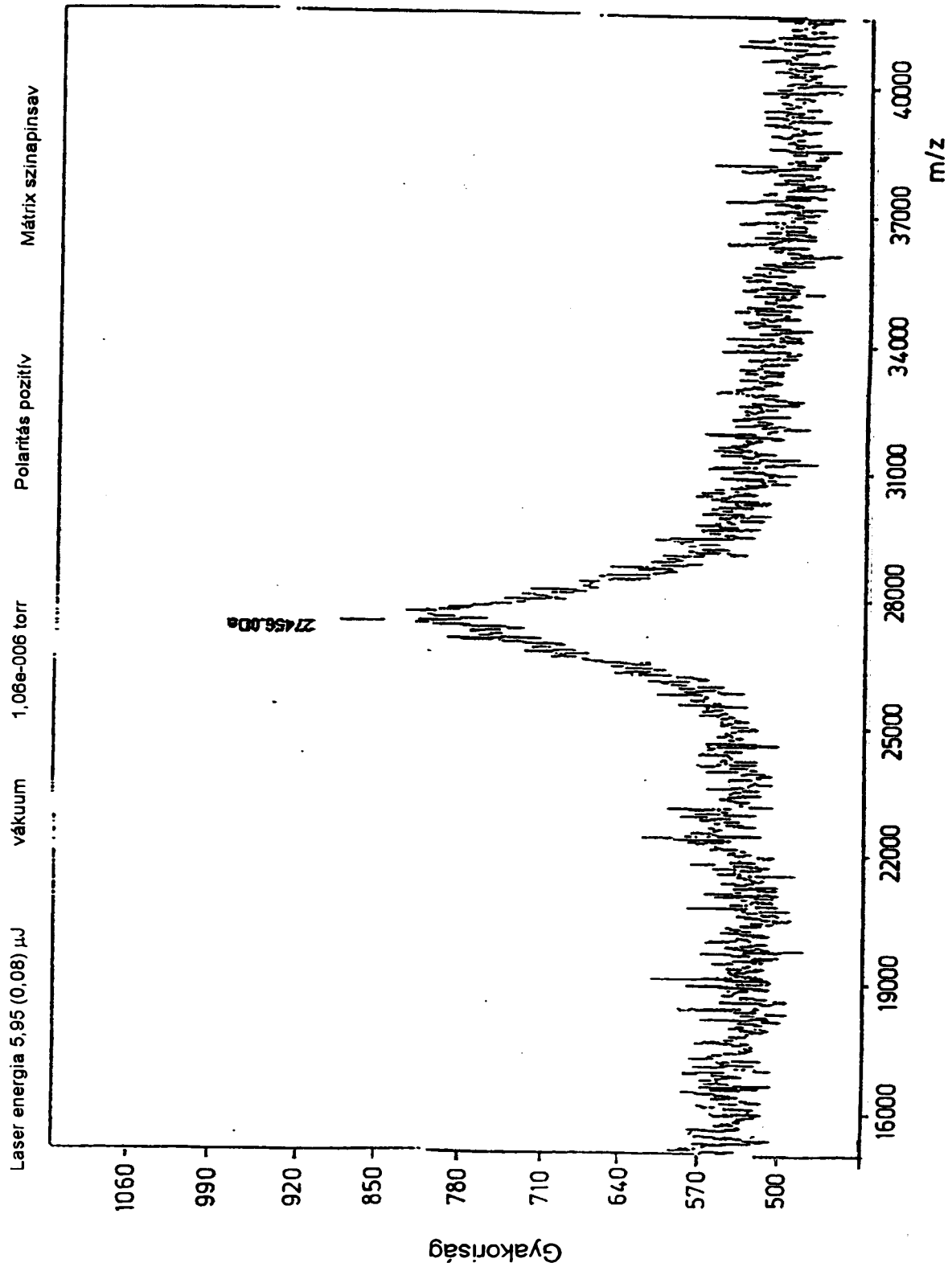
2/C ábra



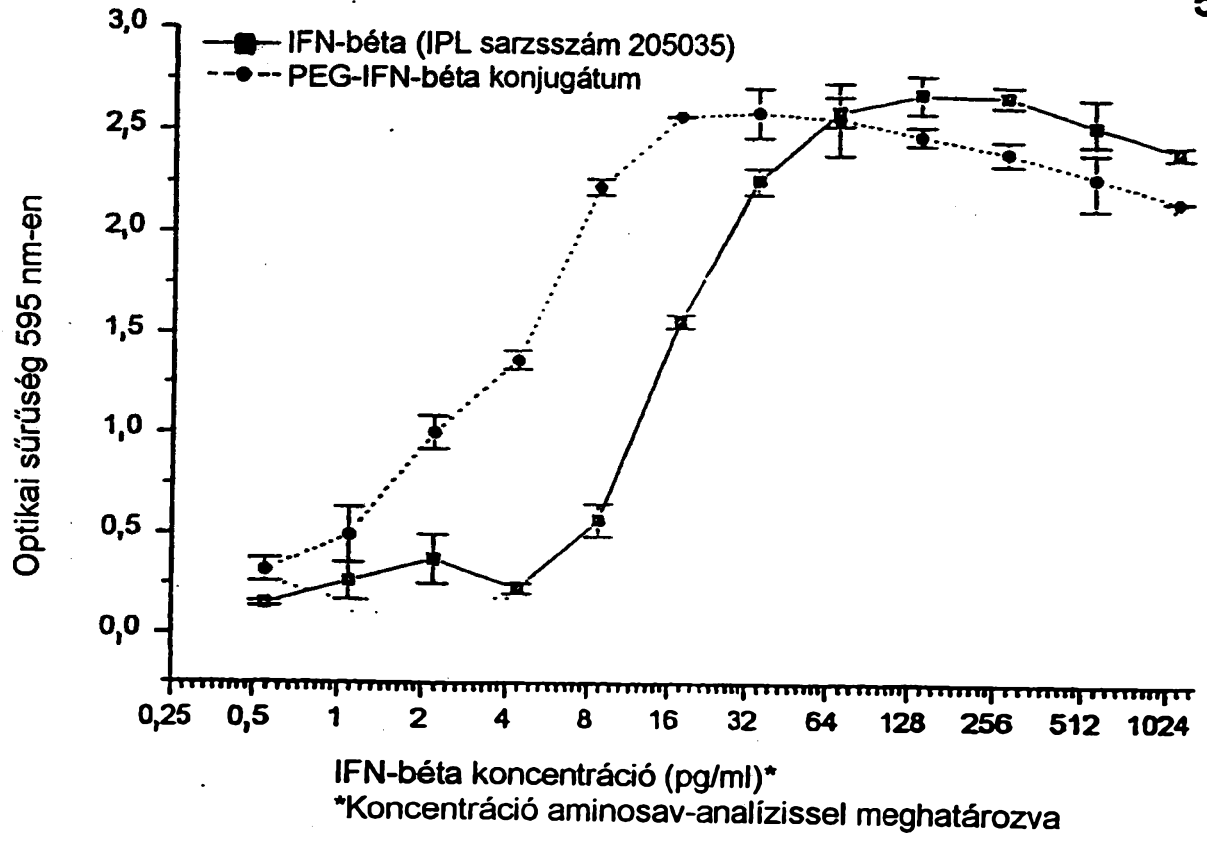
3. ábra



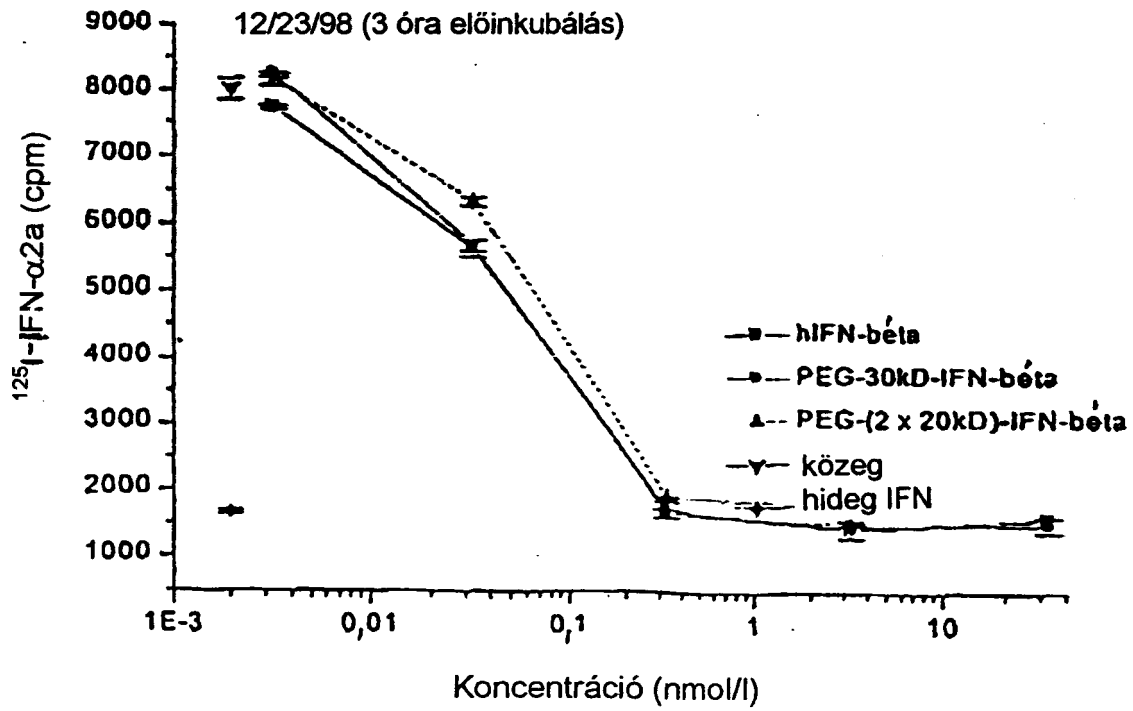
4. ábra



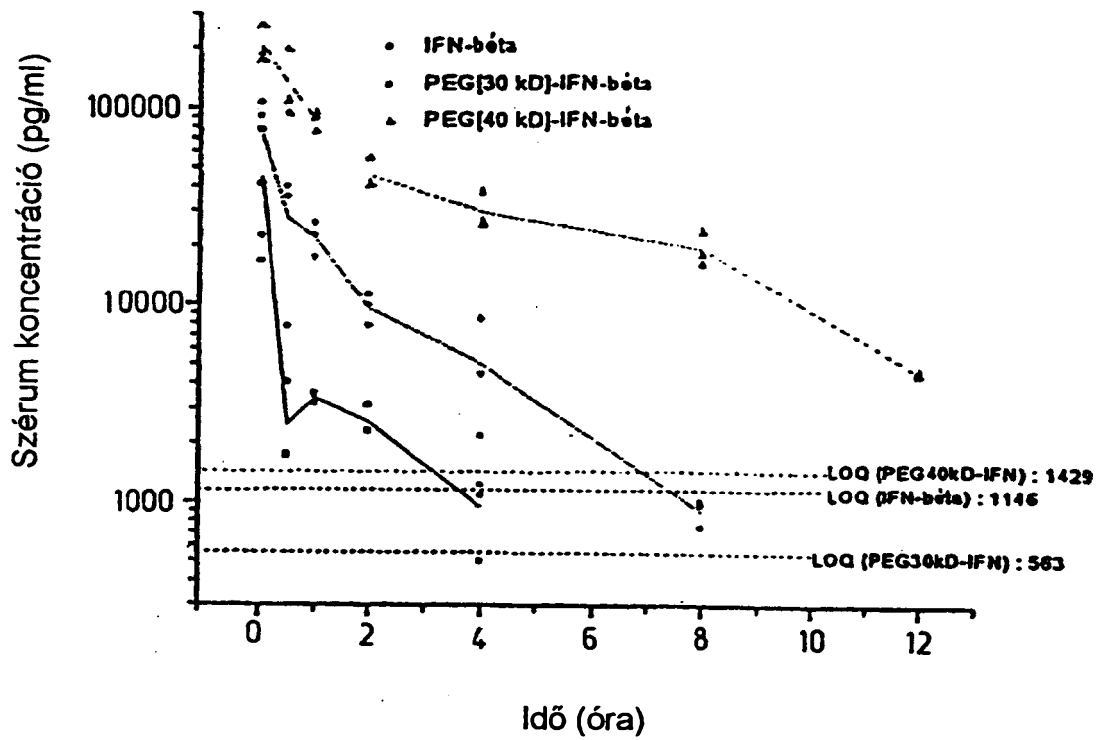
5. ábra



6. ábra

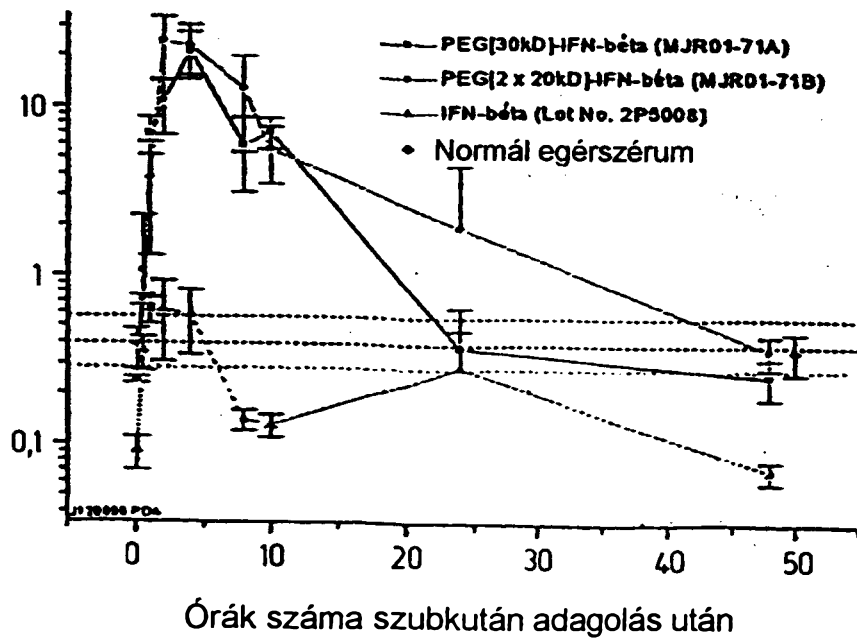


7. ábra



8. ábra

IFN-béta (vagy PEG-IFN-béta) szérumszint koncentrációja ELISA-val (Toray) meghatározva



9. ábra