

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

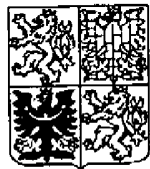
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

3576-96

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **14. 06. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.06.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/259413**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 03. 97**
(Věstník č. 3/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/07555**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 95/34328**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 K47/48

(71) Přihlašovatel:

AMGEN BOULDER INC., Boulder, CO, US;
SHEARWATER POLYMERS INC., Huntsville,
AL, US;

(72) Původce:

Kohno Tadahiko, Louisville, CO, US;
Kachensky Dave, Boulder, CO, US;
Harris Milton, Huntsville, AL, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Pegylační činidla a kompozice, které je
obsahují**

(57) Anotace:

Jsou popsány biologicky aktivní konjugáty, které jsou vytvořeny reakcí thiol skupiny biologicky aktivní molekuly s nepeptidickým polymerem, majícím aktivní sulfonovou skupinu. Popsány jsou také sloučeniny, mající vzorec R_1-X-R_2 , kde alespoň jeden z R_1 a R_2 je biologicky aktivní molekula, mající reaktivní thiol skupinu, která tvoří kovalentní vazbu s X, Michael akceptor-aktivovaný nepeptidický polymer. Dále jsou popsány způsoby výroby konjugátů a sloučenin podle předloženého vynálezu jakož i farmaceutické kompozice, které je obsahují. Navíc jsou popsány aktivované polymery vhodné pro připojení k různým molekulám a povrchům.

CZ 3576-96 A3

Oblast techniky

Předložený vynález se týká aktivních derivátů polyethylenglykolu a příbuzných hydrofilních polymerů a způsobů jejich syntézy pro použití při modifikaci charakteristik povrchů a molekul. Vynález se také týká polypeptidů, které byly kovalentně navázány k takovým aktivním derivátům a způsobů pro jejich výrobu.

Dosavadní stav techniky

Polyethylenglykol ("PEG") byl studován pro použití ve farmaceutikách, umělých implantech a jiných aplikacích, kdy je biokompatibilita důležitá. Byly navrženy různé deriváty PEG, které mají aktivní skupinu pro umožnění, aby PEG byl připojen k farmaceutikám a implantům a k molekulám a povrchům obecně. Například byly navrženy PEG deriváty pro kopulaci PEG k povrchům pro řízení smáčení, statické nanášení, a připojení jiných typů molekul k povrchu, zahrnujících proteiny nebo proteinové zbytky.

PEG deriváty byly také navrženy pro afinitní dělení, například, enzymů od buněčné hmoty. V afinitním dělení PEG deriváty zahrnují funkční skupinu pro reverzibilní kopulaci k enzymu, který je obsažen v buněčné hmotě. PEG a enzymový konjugát se odděluje od buněčné hmoty a pak se enzym odděluje od PEG derivátu, je-li to žádoucí.

V ještě dalších příkladech, kopulace PEG derivátů ("PEGylace") je žádoucí pro překonání obtíží objevujících se při klinickém použití biologicky aktivních molekul. Zveřejněná

PCT přihláška č. WO 92/16221 například uvádí, že bylo nalezeno mnoho potenciálně terapeutických proteinů s krátkým poločasem životnosti v krevním seru. Z větší části je clearance proteinů ze sera prováděn přes ledviny. Systémové zavedení relativně velkých množství proteinů, zejména těch, které jsou cizí pro lidský systém, může být zvýšena k imunogenickým reakcím, což mezi jinými problémy může vést k rychlému odstranění proteinu z těla přes tvorbu imunitních komplexů. Pro jiné proteiny je problémům s rozpustností a agregací také zabráněno optimální formulací proteinu.

PEGylace snižuje rychlost clearance z krevního proudu zvýšením zjevné molekulové hmotnosti molekuly. Až do určité velikosti je rychlost glomerulární filtrace proteinů nepřímo úměrná velikosti proteinu. Schopnost PEGylace snižovat clearance proto obecně není funkcí množství PEG skupin, které jsou připojeny k proteinu, ale celkové molekulové hmotnosti změněného proteinu. Snižená clearance může vést ke zvýšené účinnosti proti ne-PEGylovanému materiálu. Viz například Conforti a spol., Pharm.Research Commun, sv.19, str: 287 (1987) a Katré a spol., Proc.Natl.Acad.Sci. USA sv. 84, str. 1487 (1987).

Navíc PEGylace může snižovat proteinovou agregaci (Suzuki a spol., Biochem. Biophys. Acta, sv. 788, str. 248 (1984)), měnit proteinovou imunogenicitu (Abuchowski a spol., J.Biol.Chem., sv. 252, str. 3582 (1977) a zvyšovat proteinovou rozpustnost jak je například popsáno v PCT publikaci č. WO 92/16221.

PEGylace proteinů ilustruje některé problémy, které byly spojeny s připojením PEG k povrchům a molekulám. Převážná většina PEGylačních činidel reaguje s volnými primárními

aminoskupinami polypeptidu. Většina z těchto volných aminů jsou epsilon aminoskupiny lysinových aminokyselinových zbytků. Typické proteiny vykazují velký počet lysinů. V souladu s tím, se často objevuje náhodné připojení násobných PEG molekul vedoucí ke ztrátě proteinové aktivity.

Navíc, je-li PEGylovaný protein zamýšlen pro terapeutické použití, směs více druhů, která vzniká z použití nespecifické PEGylace vede k obtížím při přípravě produktu s reprodukovatelnými a charakteristickými vlastnostmi. Tato nespecifická PEGylace činí obtížným hodnotit terapeutika a poskytnout informaci o účinnosti a dávkování. Místně selektivní PEGylace takových proteinů by mohla vést k reprodukovatelně modifikovaným materiálům, které získaly žádoucí atributy PEGylace bez ztráty aktivity.

Existuje také potřeba reprodukovatelně vytvářených komplexů dvou nebo více spojených bioaktivních molekul nebo sloučenin. V některých případech podání multimerních komplexů, které obsahují více než jeden biologicky aktivní polypeptid, nebo léčivo, vede k synergickým přínosům. Například komplex, obsahující dva nebo více identických polypeptidů mohou mít podstatně zvýšenou afinitu pro ligand nebo aktivní místo, ke kterému se váže vzhledem k monomernímu polypeptidu. Alternativně, komplex, obsahující (1) bioaktivní protein, který projevuje svůj účinek na určitém místě vtěle a (2) molekulu, která může přímo řídit komplex ke specifickému místu, může představovat velký přínos.

Existuje také potřeba hydrolyticky stabilních aktivovaných polymerů, které tvoří vazby, které jsou hydrolyticky stabilní. Jinak v určitých případech může být reaktivní skupina učiněna neaktivní před tím, než proběhne

žádoucí reakce nebo konjugát vytvořený po reakci má krátký poločas životnosti ve vodném mediu, jako je krev nebo plasma.

Například Zalipsky, US patent č. 5122614, popisuje, že PEG molekuly aktivované s oxykarbonyl-N-dikarboximidovou funkční skupinou, která může být připojena za vodných, bážických podmínek urethanovým navázáním k aminové skupině polypeptidu. Aktivovaný PEG-N-sukcinimidkarbonát je uváděn jako tvořící stabilní, k hydrolýze rezistentní urethanová navázání s aminoskupinami. Aminoskupina je uváděna jako reaktivnější při bážických pH asi 8,0 až 9,5 a reaktivita ostře klesá při nižších pH. Hydrolýza nekopulovaného PEG derivátu však také ostře stoupá při pH 8,0 až 9,5. Zalipsky vylučuje problém zvýšení rychlosti reakce nekopulovaného PEG derivátu s vodou použitím přebytku PEG derivátu k navázání k proteinu. Použitím přebytku PEG derivátu je dostatečně reaktivní aminomísta navázána k PEG pro modifikaci proteinu před tím, než se PEG derivát hydrolyzuje a stane nereaktivním.

Zalipského metoda je adekvátní nespecifickému připojení lysinové frakce proteinu k PEG derivátu na aktivním místě na PEG. Jestliže rychlost hydrolýzy PEG derivátu je značná, pak je problematické poskytnout připojení na více než jednom aktivním místě PEG molekuly, protože pouhý přebytek nezpomalý rychlost hydrolýzy.

Například lineární pEG s aktivními místy na každém konci bude připojen k proteinu na jednom konci ale reaktivní místo na druhém konci může reagovat s vodou za vzniku relativně nereaktivní hydroxylové skupiny místo PEG spojení dvou proteinových skupin. Podobný problém vzniká, je-li žádoucí kopulovat molekulu k povrchu PEG spojovacího činidla, protože PEG je nejprve připojen k povrchu nebo se kopuluje k molekule

a opačný konec PEG derivátu musí zůstat aktivní pro následující reakci. Jestliže je hydrolýza problémem, pak se opačný konec typicky stává inaktivovaným.

Zalipsky US patent č. 5122614 také popisuje některé jiné PEG deriváty z předchozích patentů. PEG-sukcinoyl-N-hydroxysukcinimidester je uváděn jako tvořící esterová spojení, která mají omezenou stabilitu ve vodném mediu. PEG-kyanurchlorid je uváděn jako toxický a je nespecifický pro reakci s jednotlivými funkčními skupinami na proteinu, což vede k inaktivaci proteinu. PEG-fenylkarbonát je uváděn jako produkující toxické hydrofobní fenolové zbytky, které mají afinitu pro proteiny. PEG aktivovaný karbonyldiimidazolem je uváděn jako příliš pomalý v reakci s proteinovými funkčními skupinami, vyžadující delší reakční doby pro získání vyhovující modifikace proteinu.

Ještě další PEG deriváty byly navrženy pro připojení k funkčním skupinám jiným než je epsilon aminoskupina lysinu. Maleimid je například specifický pro cystein sulfhydryl ale maleimidová funkčnost je podrobena hydrolýze.

V souladu s tím existuje potřeba činidel a metod pro reprodukovatelně vytvářené komplexy, jejichž části jsou připojeny k neantigenickým, vysoce rozpustným, biologicky inertním molekulám. Předložený vynález uspokojuje potřebu hydrolyticky stabilních činidel, která vytvářejí hydrolyticky stabilní konjugáty.

Podstata vynálezu

Předložený vynález se týká biologicky aktivních konjugátů, obsahujících biologicky aktivní molekulu, mající

reaktivní thiolovou skupinu a nepeptidický polymer, mající aktivní sulfonovou skupinu, která tvoří vazbu s reaktivní thiolovou skupinou. Biologicky aktivní molekula může být syntetická, přirozeně se vyskytující nebo modifikovaná přirozeně se vyskytující molekula. Molekula, vykazující požadovanou biologickou aktivitu může být modifikována, aby obsahovala reaktivní thiolovou skupinu.

Zvláště vhodné biologicky aktivní molekuly zahrnují inhibitory faktoru tumorové nekrozy ("TNF"), interleukin-1 receptor antagonisty ("IL-1ra"), CR1, exon šesti peptidů PDGF, a interleukin-2 ("IL-2") inhibitory a receptory ("IL-2r").

Polymer podle předloženého vynálezu obsahuje alespoň jednu aktivní sulfonovou skupinu a má vzorec $P-SO_2-C-C^*-$, kde P je polymer a C^* je reaktivní místo pro spojení se thiolovou skupinou. Vazba mezi thiolem a aktivovaným sulfonem je na C^* a může být představena vzorcem $P-SO_2-C-C^*S-R$, kde R je biologicky aktivní molekula. Vhodné aktivované sulfonové skupiny zahrnují, například, vinylsulfon a chlorethylsulfon. Různé polymery mohou být aktivovány pro použití ve všech provedeních předloženého vynálezu, zahrnujících ve vodě rozpustné polymery jako je polyethylenglykol ("PEG") a příbuzné hydrofilní polymery.

Předložený vynález také poskytuje metody použití sulfon-aktivovaných polymerů pro přípravu výše diskutovaných biologicky aktivních konjugátů. Metoda zahrnuje stupně:
(a) reakce biologicky aktivní molekuly, mající reaktivní thiolovou skupinu s nepeptidickým polymerem, majícím aktivní sulfonovou skupinu za tvorby konjugátu; a
(b) izolaci konjugátu.

Farmaceutické kompozice, obsahující konjugáty, jsou také v rozsahu vynálezu.

Předložený vynález se dále týká sulfon-aktivovaných polymerů použitelných pro kopulaci k různým molekulám, sloučeninám a povrchům. Aktivovaná sulfonová skupina je stejná jak je diskutována výše. Zvláště použitelné aktivované polymery zahrnují bifunkční PEG deriváty aktivované sulfonovou skupinou na jednom místě na PEG molekule a na NHS-esteru nebo maleimidové funkčnosti na jiném místě.

V předloženém vynálezu jsou dále zahrnuty v podstatě čištěné biologicky aktivní sloučeniny, mající vzorec R^1-X-R^2 , nazývané "činka", kde alespoň jeden z R_1 nebo R_2 je biologicky aktivní molekula, která si udržuje svoji biologickou aktivitu, když je částí molekuly. Biologicky aktivní molekula má reaktivní thiolovou skupinu, která tvoří spojení s Michael akceptorovou skupinou na nepeptidickém polymeru. Biologicky aktivní molekuly vhodné pro použití v předloženém vynálezu zahrnují ty, které jsou uvedeny výše. Vhodné Michael akceptor skupiny například zahrnují vinylsulfon a maleimid. Polymery, které mohou být aktivovány s Michael akceptor funkčními skupinami zahrnují polymery rozpustné ve vodě uvedené výše.

R_1 a R_2 mohou být stejné nebo rozdílné skupiny. Jestliže jsou R skupiny stejné, je sloučenina homočinková; jestliže R skupiny jsou odlišné je sloučenina heteročinková. Zvláště vhodné homočinky zahrnují například PEG-spojené TNF inhibitory a PEG-spojené IL-1ra's. Vhodné heteročinky zahrnují, například, ty, které jsou vytvořeny z IL-2r- α a IL-2r- β , heteročinky, které inhibují klasickou dráhu systému komplementu a heteročinky vytvořené z IL-1ra a exon 6 PDGF.

Metody přípravy činkových sloučenin jsou v rozsahu vynálezu. Metody přípravy činek R_1-X-R_2 zahrnují stupně:

- (a) reakce X s R_1 a R_2 za vzniku R_1-X-R_2 ; a
- (b) čištění R_1-X-R_2 .

Stupeň (a) ve výše uvedených metodách přípravy činek může zahrnovat následující stupně:

- chránění jedné reaktivní skupiny X za vzniku chráněné skupiny na X;
- reakci X, majícího chráněnou skupinu s R_1 za vzniku R_1-X ;
- deprotekcí chráněné skupiny na X a
- reakci R_1-X s R_2 za vzniku R_1-X-R_2 .

Alternativně nebo navíc může stupeň (a) dále zahrnovat následující stupně:

- reakci přebytku X s R_1 za vzniku R_1-X a
- reakci R_1-X s R_2 za vzniku R_1-X-R_2 .

Farmaceutické kompozice, obsahující v podstatě čištěné sloučeniny R_1-X-R_2 jsou také v rozsahu vynálezu.

Podrobný popis

Předložený vynález poskytuje biologicky aktivní konjugáty obsahující (1) biologicky aktivní molekulu, mající reaktivní thiolovou skupinu a (2) nepeptidický polymer, mající aktivní sulfonovou skupinu, která tvoří spojení s thiolovou skupinou biologicky aktivní molekuly.

"Konjugát" znamená komplex, který je vytvořen spojením biologicky aktivní molekuly, mající aktivní thiolovou skupinu, k nepeptidickému polymeru, majícímu aktivní sulfonovou skupinu, přes vazbu mezi thiolem a sulfonem. Jak je uvedeno

výše jsou konjugáty podle předloženého vynálezu biologicky aktivní.

"Biologicky aktivní" znamená schopný působit biologický efekt, in vitro nebo in vivo. Biologicky aktivní molekula zahrnuje, ale není tak omezena, jakoukoliv sloučeninu, která může vyvolat biologický efekt při interakci s biologickou molekulou nebo s biologickým systémem jako je buňka nebo organismus. Cesty demonstrace biologické aktivity zahrnují, ale nejsou tak omezeny, in vitro bioeseje, z nichž mnohé jsou známy v oboru. Například je možno měřit biologickou aktivitu inhibitorů faktoru tumorové nekrozy ("TNF") stanovením, zda se inhibitory vážou k TNF nebo zda inhibitory blokuji TNF-zprostředkovanou lýzi určitých buněk. Posledně uvedený bioesej je uveden ve zveřejněné evropské patentové přihlášce č. 90113673.9, která je zde zahrnuta specificky jako odkaz.

Biologicky aktivní molekuly zahrnují, ale nejsou tak omezeny, farmaceutika, vitaminy, živiny, nukleové kyseliny, aminokyseliny, polypeptidy enzymové ko-faktory, steroidy, karbohydráty, organické druhy jako je heparin, činidla, obsahující kovy, receptor agonisté, receptor antagonisté, vazebné proteiny, receptory nebo části receptorů, extracelulární matricové proteiny, buněčné povrchové molekuly, antigeny, hapteny, cílové skupiny a chelatační činidla. Všechny zde zahrnuté odkazy zahrnují všechny formy receptoru, pokud jich existuje víc než jedna.

"Polypeptidy" a "proteiny" se zde používají synonymně a znamenají jakoukoliv sloučeninu, která má v podstatě proteinový charakter. Nicméně může polypeptidická skupina obsahovat některé nepeptidické prvky. Například glykosylované polypeptidy nebo synteticky modifikované proteiny jsou

zahrnuty v této definici. "Cílové skupiny" mohou řídit sloučeninu k lokaci v biologickém systému. Vazebné proteiny a receptory mohou být popsány svojí afinitou pro určitý ligand.

Mnoho z polypeptidů použitelných v předloženém vynálezu je uvedeno ve zveřejněné PCT publikaci č. WO 92/16221, specificky zde zahrnuté jako odkaz. Tyto proteiny jsou dobře známé v oboru. Zvláště použitelné polypeptidy jsou TNF vazebné proteiny, nazývané také TNF inhibitory. "TNF vazebný protein" je zde definován tak, že znamená protein, který váže TNF.

Jedním TNF vazebným proteinem ("TNFbp") je extracelulární část p55 TNF receptoru nebo TNF receptor I. In vivo je extracelulární část receptoru ztracena a cirkuluje v krevním proudu jako 30 kDa glykosylovaný protein, který se váže k TNF. Tento vazebný protein je také označován jako TNFbp-I nebo 30 kDa TNFbp. Čištění a aminokyselinové a nukleokyselinové sekvence tohoto TNF vazebného proteinu jsou uvedeny ve zveřejněné evropské patentové přihlášce č. 90 113 673.9, která je zde zahrnuta jako odkaz.

Tento zveřejněný odkaz také uvádí rekombinantní produkci glykosylovaných a deglykosylovaných forem tohoto TNF inhibitoru. Ačkoliv aktuální molekulová hmotnost deglykosylované formy tohoto inhibitoru je přibližně 18 kDa, výraz "30 kDa TNF inhibitor" zahrnuje glykosylované a deglykosylované formy.

Jak jsou zde použity, výrazy "přírozně se vyskytující", "nativní" a "původního typu" jsou synonymní.

Evropská patentová přihláška č. 90 113 673.9, zahrnutá zde jako odkaz, také obsahuje čištění a aminokyselinové a

nukleokyselinové sekvence jiného TNF inhibitoru nazývaného 40 kDa TNF inhibitor. Je také nazýván TNFbp-II a tento inhibitor ve své přirozeně se vyskytující formě, je glykosylovaná extracelulární část p75 nebo p85 TNF receptoru. Evropská patentová přihláška č. 90 112 673.9 také popisuje rekombinantní produkci glykosylovaných a deglykosylovaných forem tohoto "40 kDa" inhibitoru. Nukleo- a aminokyselinové sekvence nativního 40 kDa TNF inhibitoru jsou uvedeny v tomto zveřejněném odkazu. Ačkoliv molekulová hmotnost deglykosylované formy není 40 kDa, jak glykosylované tak deglykosylované formy tohoto TNFbp jsou označovány jako "40 kDa TNF inhibitor".

Evropská patentová přihláška č. 90 112 673.9 zahrnutá zde jako odkaz, dále uvádí rekombinantní produkci dvou TNF inhibitorů, které jsou částmi plné délky "40 kDa" vazebného proteinu. Tyto dva zeslabení se nazývají "delta51" a "delta53" TNF inhibitory. Aminokyselinové a nukleokyselinové sekvence delta51 a delta 53 inhibitorů jsou uvedeny v tomto zveřejněném odkazu.

Další zvláště výhodné polypeptidy zahrnují interleukin-1 receptorové antagoisty ("IL-1ra"), jak je popsáno v US patentu č. 5075222, zahrnutém zde jako odkaz, inzulinu podobné růstový faktor vázající proteiny ("IGFbp"), CTLA4, a exon šest z destiček získaného růstového faktoru (PDGF"), gliový příbuzný neutrofní faktor ("GDNF"), ciliární neutrofní faktor ("CNTF"), interleukin-4 receptor ("IL-4r"), a inhibitory, a interleukin-1 receptor ("IL-2r"). Nukleové kyseliny, kodující přirozeně se vyskytující IL-1ra a způsob exprese proteinu v E.coli jsou uvedeny v US patentu č. 5075222 Hannuma a spol..

Charakteristiky IL-2 receptorů a CR1, nukleové kyseliny,

které je kodují a způsoby jejich přípravy jsou popsány ve zveřejněné PCT publikaci č. WO 92/16221, specificky zde zahrnuté jako odkaz.

Biologicky aktivní molekuly připojené k polymerům v konjugátech podle předloženého vynálezu mají reaktivní thiolovou skupinu před vytvořením vazby. "Reaktivní thiolová skupina" znamená -SH skupinu schopnou reakce s aktivovanými polymery jak je zde popsáno.

Příkladem reaktivního thiolu je -SH aminokyseliny cysteinu. Mnoho proteinů nemá volné cysteiny (cysteiny nezahrnuté v disulfidových vazbách) nebo jakoukoliv jinou reaktivní thiolskupinu. Navíc cysteinový thiol nemusí být vhodný pro navázání k polymeru, protože thiol není nezbytný pro biologickou aktivitu. Navíc, proteiny musí být pro aktivitu složeny do určité konformace. V aktivní konformaci může být cystein neschopný reakce se sulfonem protože je přítomen ve vnitřku proteinu. Navíc i dostupný cysteinový thiol, který není nezbytný pro aktivitu může být nevhodným místem pro tvorbu navázání k polymeru. Aminokyseliny nepodstatné pro aktivitu jsou nazývány "neesenciální". Neesenciální cysteiny mohou být v nevhodných konjugačních místech, protože cysteinová poloha vzhledem k aktivnímu místu vede k inaktivaci polymeru po konjugaci k polymeru. Podobně jako proteiny, mají mnohé jiné biologicky aktivní molekuly reaktivní thioly, které z důvodů podobných důvodům uvedeným výše, nejsou vhodné pro konjugaci k polymeru nebo neobsahují žádnou reaktivní thiolovou skupinu.

V souladu s tím se předložený vynález týká zavedení reaktivních thiolových skupin do biologicky aktivní molekuly, je-li to nezbytné nebo žádoucí. Thiolové skupiny mohou být

také zavedeny do neaktivní molekuly za tvorby biologicky aktivní molekuly pokud vazba thiol-sulfon nezničí požadovanou aktivitu.

Reaktivní thiolové skupiny mohou být zavedeny chemickými způsoby dobře známými v oboru. Chemická modifikace může být použita s polypeptidy nebo nepeptidickými molekulami a zahrnuje zavedení samotného thiolu nebo jako části větší skupiny, například cysteinového zbytku, do molekuly. Příklad chemického zavedení thiolu je uveden v práci Jue-a R. a spol., *Biochemistry*, 17, str. 5399-5406 (1978). Může být také generován volný cystein v polypeptidu chemickou redukcí cystinu s např. DTT.

Polypeptidy, které jsou modifikovány tak, aby obsahovaly aminokyselinový zbytek v poloze kde tento není přítomen v nativním proteinu před modifikací se nazývají "mutein". Pro vytvoření cysteinových muteinů mohou být neesenciální aminokyseliny nahrazeny cysteinem nebo cysteinový zbytek může být přidán k polypeptidu. Potenciální místa pro zavedení nenativního cysteinu zahrnují glykosylační místa a N nebo C konec polypeptidu. Mutace lysinu na cystein je také vhodná protože lysinové zbytky jsou často nacházeny na povrchu proteinu v jeho aktivní konformaci. Navíc může odborník v oboru použít jakoukoliv informaci o vazebném nebo aktivním místě polypeptidu při výběru možných mutačních míst.

Odborník v oboru může také použít dobře známé rekombinantní DNA techniky pro vytvoření cystein muteinů. Může měnit nukleovou kyselinu, kodující nativní polypeptid pro kodování muteinu standardní místně řízenou mutagenezí. Příklady standardních mutagenezních technik viz Kunkel T.A., *Proc.Nat.Acad.Sci.*, sv. 82, str. 488-492 (1985) a Kunkel T.A.

a spol., Methods Enzymol., sv. 154, str. 367-382 (1982), obě práce jsou zde zahrnuty jako odkaz. Alternativně je možno chemicky syntetizovat nukleovou kyselinu, kodující mutein technikami, které jsou v oboru dobře známé. Mohou být použity přístroje pro syntézu DNA a jsou například dostupné od Applied Biosystems (Foster City, CA). Nukleová kyselina, kodující požadovaný mutein může být exprimována v mnoha expresních systémech, zahrnujících živočišné, hmyzí a bakteriální systémy.

Jestliže je mutein rekombinantně produkován v bakteriálním expresním systému, provádějí se následující stupně:

- 1) Vytvoří se nukleová kyselina, kodující požadovaný mutein, místně řízenou mutagenezí nukleové kyseliny, kodující nativní polypeptid;
- 2) nukleová kyselina, kodující požadovaný mutein je exprimována v bakteriálním expresním systému;
- 3) mutein se izoluje z bakterií a čistí;
- 4) jestliže není správně složen, mutein se znovu skládá za přítomnosti cysteinu nebo jiné sulfhydryl obsahující sloučeniny;
- 5) znovu složený mutein se izoluje a čistí;
- 6) čištěný a znovu složený cílový mutein se zpracuje s mírným redukčním činidlem;
- 7) reakční směs se dialyzuje za nepřítomnosti kyslíku.

Jak je uvedeno výše, může být mutein izolován z reakční směsi před konjugací s polymerem, ale není to nezbytné. Redukční činidlo používané ve stupni 6 je dithiothreitol ("DTT") nebo tris-(karboxyethylfosfin) ("TCEP"). TCEP se používá proto, že nemusí být odstraňován před konjugací s thiol-specifickým PEG činidlem. Viz Burns J.A. a spol.,

Po vytvoření muteinu může odborník v oboru mutein zkoumat v bioeseji a porovnávat aktivitu muteinu vzhledem k nativnímu polypeptidu. Jak je plně diskutováno dále, i když je relativní aktivita muteinu snížena, konjugát vytvořený z muteinu může být zvláště vhodný. Například může konjugát mít zvýšenou rozpustnost, sníženou antigenicitu nebo imunogenicitu nebo redukovanou dobu clearance v biologickém systému vzhledem k nekonjugované molekule. Taková zlepšení ve farmaceutické účinnosti biologicky aktivní molekuly mohou zvýšit hodnotu molekuly v různých terapeutických aplikacích. Zvýšená rozpustnost může také zlepšit hodnotu molekuly pro in vitro diagnostické aplikace.

Tabulka 1 uvádí seznam muteinů IL-1ra, které byly produkovány. Příprava a čištění IL-1ra muteinů jsou uvedeny v PCT patentové publikaci č. WO 92/16221, specificky zde zahrnuté jako odkaz. Číslování zbytků je založeno na posloupnosti uvedené v této publikované přihlášce s "0" označující adici aminokyselina na N-konci; "c" označuje cystein a "s" označuje serin. Například "c0s116" označuje cystein inzertovaný na N konec a serin inzertovaný do polohy 116. Nativní IL-1ra má volné cysteinové zbytky v polohách 66, 69, 116 a 122.

Tabulka 1

Muteiny IL-1ra

c0s116	c0
c84s116	c6
c8s116	c8
c9s116	c9
c141s116	c141

Tabulka 2 představuje muteiny 30 kDa TNF inhibitoru, které byly také připraveny. Nativní 30 kDa TNF inhibitor, na rozdíl od IL-1ra, nemá žádné volné cysteinové zbytky. Tyto muteiny byly připraveny jak je uvedeno v publikované PCT přihlášce č. WO 92/16221, specificky zde zahrnuté jako odkaz a číslování je založeno na aminokyselinové sekvenci tam uvedené.

Tabulka 2

Muteiny 30 kDa TNF inhibitoru

c105 30kDa TNF inhbitor
c1 30kDa TNF inhibitor
c14 30kDa TNF inhibitor
c111 30kDa TNF inhibitor
c161 30kDa TNF inhibitor

Muteiny a jiné polypeptidy podle předloženého vynálezu zahrnují allelické variace v proteinové sekvenci a podstatně ekvivalentní proteiny. "Podstatně ekvivalentní" znamená vykazující velmi vysoký stupeň homologie aminokyselinových zbytků. (viz obecně M.Dayhoff, Atlas of Protein SEquence and Structure, sv.5, str. 124 (1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D.C., práce je zde specificky zahrnuta jako odkaz), jakož i vykazující srovnatelnou biologickou aktivitu. V rozsahu vynálezu jsou zahrnuty i zeslabené formy nativního polypeptidu nebo muteinu, které si v podstatě uchovávají biologickou aktivitu nativního polypeptidu nebo muteinu.

Konjugáty podle předloženého vynálezu obsahují, navíc k biologicky aktivním molekulám, majícím reaktivní thiol skupiny, nepeptidické polymerní deriváty, mající aktivní sulfonové skupiny. "Nepeptidické" znamená mající méně než 50 % hmotn.

α -aminokyselinových zbytků.

Polymerní část polymerního derivátu může být, například, polyethylenglykol ("PEG"), polypropylenglykol ("PPG"), polyoxyethylovaný glycerol ("POG") a polyoxyethylované polyoly, polyvinylalkohol ("PVA") a jiné polyalkylenoxidy, polyoxyethylovaný sorbitol nebo polyoxyethylovaná glukóza. Polymer může být homopolymer, náhodný nebo blokový polymer, terpolymer na bázi výše uvedených monomerů, s přímým řetězcem nebo rozvětveným, substituovaný nebo nesubstituovaný pokud má alespoň jednu aktivní sulfonovou skupinu. Polymerní část může být jakékoliv délky nebo molekulové hmotnosti ale tyto charakteristiky budou ovlivňovat biologické vlastnosti. Polymerové průměrné molekulové hmotnosti vhodné pro snížení rychlosti clearance ve farmaceutických aplikacích jsou v rozmezí 2000 až 35000 daltonů. Navíc, jsou-li dvě skupiny připojeny k polymeru, na každém konci jedna, délka polymeru může ovlivnit účinnou vzdálenost a jiné prostorové vztahy mezi dvěma skupinami. Odborník v oboru tak může měnit délku polymeru pro optimalizaci nebo získání požadované biologické aktivity. Je-li polymer PEG s přímým řetězcem, zvláště vhodné délky polymerů představované $(Z)_n$, kde Z je monomerní jednotka polymeru, zahrnují n v rozmezí 50 až 500. V určitých provedeníh předloženého vynálezu je n větší než 6 a výhodně větší než 10.

Monomethoxypolyethylenglykol je zde označován jako mPEG. Výraz "PEG" znamená jakékoliv z mnoha kondenzačních polymerů ethylenglykolu. PEG je také znám jako polyoxyethylen, polyethylenoxid, polyglykol a polyetherglykol. PEG může být také připraven jako kopolymery ethylenoxidu a mnoha jiných monomerů. Pro mnoho biologických nebo biotechnických aplikací bude používán v podstatě lineární, vinylsulfonem aktivovaný

PEG s přímým řetězcem, který je v podstatě nesubstituovaný s výjimkou vinylsulfonu.

PEG je vhodný pro biologické aplikace z mnoha důvodů. PEG je typicky čirý, bezbarvý, nezapáchá, rozpustný ve vodě, stálý za tepla, inertní k mnoha chemickým činidlům a není toxický. PEGylace může zlepšit farmakokinetickou účinnost molekuly zvýšením zjevné molekulové hmotnosti molekuly. Zvýšení zjevné molekulové hmotnosti redukuje rychlost clearance z těla po subkutánním nebo systémovém podání. V mnoha případech PEGylace může zvyšovat antigenicitu a imunogenicitu. Dále může PEGylace zvyšovat rozpustnost biologicky aktivní molekuly.

Polymerní deriváty podle předloženého vynálezu mají aktivní sulfonové skupiny. "Aktivní sulfon" znamená sulfonovou skupinu, ke které je navázána douhliková skupina, mající reaktivní místo pro thiol-specifickou kopulaci ke druhému uhlíku ze sulfonové skupiny při pH asi 9 nebo menším. Příklady aktivních sulfonů zahrnují, ale nejsou tak omezeny, vinylsulfon a aktivovaný ethylsulfon. Příkladem aktivního ethylsulfonu je $-SO_2-CH_2-CH_2-Z$, kde Z je halogen nebo jiná odštěpitelná skupina schopná substituce thiolem za vzniku sulfon-thiolového spojení $-SO_2-CH_2-CH_2-R$, kde R představuje biologicky aktivní molekulu. Sulfon-aktivovaný polymer může být dále substituován, pokud thiol-specifická reaktivita na druhém uhlíku je zachována při pH asi 9 nebo méně.

Sulfon-aktivované polymery podle předloženého vynálezu mohou být syntetizovány v alespoň čtyřech stupních. Stručně, první stupeň je zvýšení reaktivity místa na polymeru, typicky na koncové skupině, například aktivací nebo substitucí. Druhý stupeň je vazba síry přímo k atomu uhlíku v polymeru ve formě, která může být převedena na ethylsulfon nebo ethylsulfonový

derivát, mající podobné reaktivní vlastnosti. Ve třetím stupni se síra oxiduje na sulfon. Ve čtvrtém stupni je aktivován druhý uhlík ze sulfonové skupiny.

Syntéza sulfon-aktivovaného polymeru je popsána podrobněji dále za použití syntézy sulfon-aktivovaného PEG jako příkladu. První stupeň je hydroxylová aktivace hydroxylové skupiny v PEG. Výraz "hydroxylová aktivace" by zde měl být interpretován jako znamenající substituci jakož i esterifikaci a jiné metody hydroxylové aktivace. Typicky v hydroxylové aktivaci reaguje kyselina nebo derivát kyseliny jako je halogenid kyseliny s PEG za vzniku reaktivního esteru, ve kterém jsou PEG a kyselá skupina spojeny přes esterovou vazbu. Kyselá skupina je obecně reaktivnější než hydroxylová skupina. Typicky jsou estery sulfonátové, karboxylátové a fosfátové estery.

Halogenidy sulfonylkyselin, které jsou vhodné pro použití ve vynálezu zahrnují, ale nejsou tak omezeny, například methansulfonylchlorid (známý také jako mesylchlorid) a p-toluensulfonylchlorid (známý také jako tosylchlorid). Methansulfonátové estery jsou někdy označovány jako mesyláty. Toluensulfonátové estery jsou někdy označovány jako tosyláty.

V substitučním typu hydroxylové aktivace je celá skupina na PEG nahrazena reaktivnější skupinou, typicky halogenidem. Například thionylchlorid může reagovat s PEG za vzniku reaktivnějšího chlorem substituovaného PEG.

Je-li PEG výchozím materiálem, je typicky reakční produkt prvního stupně ester nebo halogenem substituovaný PEG.

Ve druhém stupni je ester nebo halogen nahrazen

alkoholem, který obsahuje reaktivní thiol připojený k ethylové skupině, thiolethanolovou skupinu. Thiolethanol je příklad vhodného alkoholu. V tomto stupni je síra ve thiolu navázána přímo k uhlíku na polymeru.

Dále ve třetím stupni se síra oxiduje na sulfon. Vhodná oxidační činidla například zahrnují peroxid vodíku, boritan sodný, nebo peroxykyseliny.

Ve čtvrtém stupni se aktivuje hydroxylová skupina alkoholu použitého ve stupni dvě. Tento stupeň je podobný prvnímu stupni v reakční sekvenci. Substituce je typicky halogenem za vzniku halogenethylové skupiny nebo jejího derivátu, majícího reaktivní místo na druhém atomu uhlíku odstraněném ze sulfonové skupiny. Typicky bude druhý uhlík na ethylové skupině aktivován chloridovým nebo bromidovým halogenem. Hydroxylová aktivace by měla poskytnout místo podobné reaktivity jako je sulfonátový ester. Vhodná činidla jsou, například kyseliny, halogenidy kyselin a jiné dříve uvedené při diskusi o prvním stupni reakce. Thionylchlorid je zvláště vhodný pro substituci hydroxylové skupiny atomem chloru.

Výsledný polymerní aktivovaný ethylsulfon je stabilní, izolovatelný a vhodný pro thiolselektivní kopulační reakce. PEG chlorethylsulfon je stabilní ve vodě při pH asi 7 nebo menším, ale přesto může výhodně být použit pro thiol-selektivní kopulační reakce při podmínkách bázeického pH až alespoň asi pH 9. Při pH nad 9 je thiolová selektivita potlačena a sulfonová skupina se stává o něco reaktivnější a aminoskupinami. Vazba vytvořená po reakci s thiolem je také hydrolyticky stabilnější.

V pátém stupni, který může být přidán k syntéze reaguje aktivovaný ethylsulfon s bází za vzniku PEG vinylsulfonu nebo některého z jeho aktivních derivátů pro thiol-selektivní kopulaci. Vhodné báze zahrnují, například, hydroxid sodný nebo triethylamin. Podobně jako aktivované ethylsulfony, je vinylsulfon hydrolyticky stabilní, izolovatelný, thiol-selektivní a tvoří hydrolytický stabilní vazby při reakci s thiolem.

Jak je zde použito "hydrolyticky stabilní" znamená že vazba mezi polymerem a sulfonovou skupinou a mezi sulfon-thiolem po konjugaci nereaguje s vodou při pH menším než asi 11 po alespoň tři dny. Hydrolytická stabilita je žádoucí, protože je-li rychlost hydrolýzy podstatná, může polymer být deaktivován před tím, než proběhne reakce mezi polymerem a thiolem biologicky aktivní molekulou.

Jak je uvedeno výše, například lineární PEG s aktivními místy na každém konci se bude připojovat k proteinu na jednom konci, ale, je-li rychlost hydrolýzy podstatná, bude reagovat s vodou na jednom konci pro začepičkování s relativně nereaktivní hydroxylovou skupinou, spíše než vytvoření "činkové" molekulární struktury s připojenými proteiny nebo jinými žádoucími skupinami na každém konci. Podobný problém vzniká při kopulaci molekuly k povrchu u PEG spojovacího činidla, protože PEG je nejprve připojen k povrchu nebo kopulován k molekule a protilehlý konec PEG derivátu musí zůstat aktivní pro následující reakci. Jestliže je hydrolýza problémem, pak se protilehlý konec typicky stane inaktivovaným.

Alternativně, sulfon-aktivované deriváty mohou být připraveny připojením spojovacího činidla, majícího sulfonovou

skupinu k PEG (nebo jinému polymeru) aktivovanému s jinou funkční skupinou. Například amino aktivovaný PEG může reagovat za vhodných podmínek při pH asi 9 nebo méně, s malou molekulou, která má sukcinimidylou aktivní esterovou skupinu na jednom konci a vinylsulfonovou na druhém konci. Amino-aktivovaný PEG tvoří stabilní spojení se sukcinimidyl esterem. Výsledný PEG je aktivován s vinylsulfonem na konci a je hydrolyticky stabilní: $\text{PEG-NH-OC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{CH=CH}_2$.

Podobně aktivovaného PEG je možno dosáhnout reakcí amin-reaktivního PEG jako je sukcinimidyl aktivní ester PEG, $\text{PEG-CO}_2\text{-NHS}$, s malou molekulou, která má aminoskupinu na jednom konci a vinylsulfonylskupinu na druhém konci.

PEG chlorethylsulfon a PEG vinylsulfon byly připraveny jak je uvedeno v příkladu 1. Thiol-selektivní reaktivita PEG vinylsulfonu a chlorethylsulfonu je uvedena v příkladu 2. Hydrolytická stabilita spojení polymer-sulfon u dvou sloučenin je uvedena v příkladu 3. Hydrolytická stabilita spojení mezi thiolem a sulfonem je uvedena v příkladu 16.

Jestliže polymer nemá hydroxylovou skupinu, může tato být adována chemickými metodami dobře v oboru známými před provedením stupňů popsaných výše. Aktivované polymerní deriváty podle předloženého vynálezu mohou mít více než jednu reaktivní skupinu. Deriváty mohou být monofunkční, bifunkční nebo multifunkční. Reaktivní skupiny mohou být stejné (homofunkční) nebo odlišné (heterofunkční) pokud zde je alespoň jedna aktivní sulfonová skupina.

Dva zvláště vhodné homobifunkční deriváty jsou PEG-bis-chlorsulfon a PEG-bis-vinylsulfon. Odborník v oboru může syntetizovat tyto molekuly za použití PEG, majícího

hydroxylové skupiny na každém konci jako výchozího materiálu a pak obecnou metodou uvedenou výše.

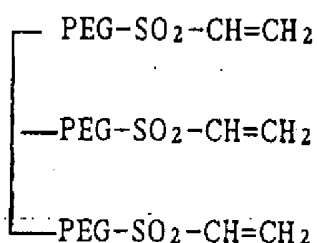
Mohou být také syntetizovány heterobifunkční deriváty. Dva zvláště vhodné heterobifunkční deriváty zahrnují například lineární PEG s buď vinylsulfonem nebo maleimidem na jednom konci a N-hydroxysukcinimidesterem ("NHS-ester") na druhém konci. NHS-ester je amin-specifický. PEG, mající NHS-ester na jednom konci a aktivovanou sulfonovou skupinu na druhém, může být připojen jak k lysinovému tak cysteinovému zbytku. Je možno dosáhnout stabilního aminového spojení, umožňujícího hydrolyticky stabilnímu nezreagovanému sulfonu, aby byl dostupný pro následující reakci s thiolem. Tyto dva heterobifunkční PEG deriváty byly syntetizovány jak je popsáno v příkladech 5 a 6. Jestliže se heterobifunkční činidlo maleimid NHS-ester vyrobí za použití PEG s přímým řetězcem, představovaným $(Z)_n$, kde Z je monomerní jednotka, je n větší než 6 a výhodně větší než 10.

Jiné aktivní skupiny pro heterofunkční sulfon-aktivované PEG mohou být vybrány ze mnoha různých sloučenin. Pro biologické a biotechnické aplikace by substituenty typicky měly být vybrány z reaktivních skupin typicky používaných v PEG chemii pro aktivaci PEG jako jsou aldehydy, trifluorethylsulfonáty (někdy nazývané tresyláty), n-hydroxylsukciimid ester, kyanurchlorid, kyanurfluorid, acylazid, p-diazobenzyllová skupina, 3-(p-diazofenyloxy)-2-hydroxypropyloxyskupina a jiné.

Příklady aktivních skupin jiných než sulfon jsou uvedeny v práci Davise a spol., US patent č. 4179337; LEE-a a spol., US patent č. 4296097 a 4430260; Iwasaki a spol., 4670417; Katre a spol., US patent č. 4766106, 4917888 a 4931554;

Nadagawa a spol. US patent č. 4791192; Nitecki a spol., US patent č. 4902502 a 5089261; Saifer US patent č. 5080891; Zalipsky US patent č. 5122614; Shadle a spol., US patent č. 5153265; Rhee a spol. US patent č. 5162430; zveřejněná evropská patentová přihláška č. 0247860; a PCT mezinárodní přihlášky č. US 86/01252; GB 8901261; GB 89/01262; GB 89/01263; US 90/03252; US 90/06843; US 91/06103; US 92/00432 a US 92/02047 jejich obsahy jsou zde zahrnuty jako odkaz.

Například trifunkční derivát je glycerolový řetězec, ke kterému jsou připojeny tři vinylsulfon PEG skupiny. Tato molekula může být znázorněna vzorcem:



Tento derivát byl připraven jak je popsáno v příkladu 12.

Jiným příkladem multifunkčního derivátu je "hvězdicová" molekula. Hvězdicové molekuly jsou obecně popsány v Merrillově US patentu č. 5171264, zahrnutém zde jako odkaz. Hvězdicové molekuly mají jádrovou strukturu, ke které je připojeno mnoho PEG řetězců nebo "ramen". Sulfonové skupiny mohou být použity pro poskytnutí aktivní, funkční skupiny na konci PEG řetězce, rozprostírající se z jádra a jako spojení pro připojení funkční skupiny nebo jiné skupiny k ramenům hvězdicové molekuly.

Odborníkům v oboru by mělo být zřejmé, že aktivované polymery diskutované výše by mohly být použity pro uskutečnění

mnoha různých substituentů a kombinací substituentů.

Jak je uvedeno výše, jsou konjugáty podle předloženého vynálezu vytvořeny reakcí thiol-obsahujících biologicky aktivních molekul se sulfon-aktivovanými polymery. Spojení mezi thiol-reaktivní skupinou a sulfon-aktivovaným polymerem je kovalentní vazba.

Obecně metoda pro přípravu konjugátů podle předloženého vynálezu zahrnuje následující stupně:

(1) volbu požadované biologicky aktivní molekuly a stanovení, zda molekula vakazuje volnou thiolovou skupinu prostředky známými v oboru. Viz například Allen G., "Sequencing of Proteins and Peptides", str. 153-54, v Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work, T.S., a Burdon R.H., vyd. (1972), zahrnuto jako odkaz. Jestliže molekula má volný thiol, pokračuje se stupněm 3. Jestliže molekula nemá volný thiol, postupuje se podle stupně 2.

(2) Jestliže v molekule neexistuje žádný volný thiol, přidá se thiol jak je popsáno výše. Po přidavku thiolu se provede bioesej pro stanovení, je-li zachována požadovaná biologická aktivita nebo část biologické aktivity.

(3) Syntetizuje se požadovaný sulfon-aktivovaný polymer jak popsáno výše.

(4) Aktivovaný polymer reaguje s molekulovou, mající volný thiol.

(5) Reakční produkt se izoluje za použití chromatografických technik dobře známých v oboru. Pro proteinové konjugáty viz například Scopes R., Protein Purification, Cantor C.R. vyd.,

Springer-Verlag, New York (1982). Pro neproteinové molekuly viz např. Still W.C. a spol., J.Org.Chem., 43, str. 2923-2925 (1978). Jestliže se nevytváří žádný konjugát, aduje se thiol k jinému místu biologicky aktivní molekuly a opakují se stupně (4) a (5).

(6) Stanoví se biologická aktivita vytvořeného konjugátu za použití relevantního bioeseje.

Odborník v oboru může přidat nebo vypustit některé stupně. Například by odborník v oboru nemusel zkoušet bioaktivitu ve stupni 2 nebo by mohl předpokládat biologickou aktivitu po PEGylaci podle předchozích pokusů. Odborník v oboru může také přidat stupeň měnění velikosti, délky nebo molekulové hmotnosti linkeru pro optimalizaci nebo udělení biologické aktivity.

Byly připraveny některé konjugáty. 30kDa TNFbp c105 mutein popsany výše byl konjugován s PEG vinylsulfonam jak je popsáno v příkladu 10. Příklad 8 ukazuje, že nativní IL-1ra, který obsahuje čtyři volné cysteiny, reaguje za podobných podmínek. c84 IL-1ra mutein reaguje také dobře. Příklad 13 ukazuje konjugaci tří 30kDa TNF inhibitorových muteinů ke třem PEG řetězcům navázaným ke glycerolovému základnímu řetězci.

Konjugáty podle předloženého vynálezu mohou být použity pro různé účely, zahrnující, ale neomezující se tak, in-vitro diagnostické eseje a přípravu farmaceutických kompozic. Mnoho z konjugátů podle předloženého vynálezu má alespoň jednu z následujících charakteristik vzhledem k nekonjugované molekule:

- (1) zvýšenou rozpustnost ve vodném roztoku;
- (2) redukovanou antigenicitu nebo imunogenicitu;
- (3) redukovanou rychlost clearance po subkutánním nebo systémovém podání díky zvýšení zjevné molekulové hmotnosti.

Zvláště vhodné jsou farmaceutické přípravky konjugátů, obsahujících IL-1ra. IL-1ra, samotný nebo v kombinaci se 30kDa TNF vazebným proteinem, může být použit pro léčení arthritidy, zánětlivé střevní choroby, septického šoku, ischemického poškození, reperfuze poškození, osteoporózy, astma, inzulinového diabetu, myelomů a jiných leukemií, psoriázy, syndromu respiračního stresu dospělce, kachexie/anorexie a pulmonární fibrozy.

Konjugáty, obsahující TNF vazebné proteiny ("TNFbp") jsou také zvláště vhodné. Takové konjugáty mohou být použity pro léčení TNF-zprostředkovaných chorob jako je syndrom respiračního stresu dospělce, pulmonární fibroza, artritida, septický šok, zánětlivá střevní choroba, skleróza multiplex, odmítání transplantátu a hemoragické trauma.

Biologicky aktivní konjugáty podle předloženého vynálezu mohou dále obsahovat nebiologicky aktivní skupiny.

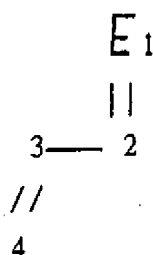
Předložený vynález také zahrnuje v podstatě čišťené sloučeniny, mající vzorec R_1-X-R_2 kde alespoň jeden z R_1 a R_2 je biologicky aktivní molekula, mající reaktivní thiolovou skupinu, která tvoří kovalentní vazbu s X, Michael akceptor-aktivovaný polymer. V předloženém vynálezu se R_1-X-R_2 zachovává biologickou aktivitu R_1 nebo R_2 . Molekuly, mající vzorec R_1-X-R_2 jsou zde označovány jako "činkové" molekuly.

Jak je uvedeno výše jsou sloučeniny podle předloženého vynálezu v podstatě čištěné. "V podstatě čištěné" jak je zde tento výraz použit, znamená "homogenní kompozici". Homogenní kompozice obsahuje molekuly R_1-X-R_2 a je v podstatě prostá sloučenin, které (1) se liší od složení R_1 R_2 , nebo (2) jsou spolu spojeny více než jedním aktivovaným polymerem. Homogenní kompozice může obsahovat molekuly R_1-X-R_2 , které se liší v délce X . Pro polymery se přímým řetězcem, představovaným $(Z)_n$, kde Z je monomerní jednotka, n je větší než 6 a výhodně větší než 10. Pro homogenní kompozici R_1 a R_2 nemusí být připojeny k X ve stejném místě na X nebo ve stejném místě kterékoliv R skupiny.

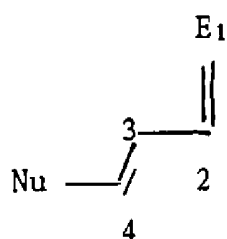
X je nepeptidický polymer, mající první reaktivní skupinu a druhou reaktivní skupinu. "Reaktivní skupina" je skupina schopná reakce s R . Alespoň jedna reaktivní skupina na X je akceptor Michael-typu. Výraz "reaktivní skupina" a "funkční skupina" se zde používá synonymně. Výrazy "Michael akceptor" a "akceptor Michael typu" se zde také používají synonymně. Polymery vhodné pro použití v předloženém vynálezu jsou také diskutovány výše a zahrnují, například, PEG, POG a PVA.

"Michael akceptory" jsou funkční skupiny náchylné k Michaelově adici. "Michaelova adice" zahrnuje nukleofilní atak na elektrofilní centrum, které je připojeno k π systému, majícímu elektronegativní atom. Příklady π systémů, majících elektronegativní atom zahrnují sulfoxid, sulfonyl, karbonyl a heterocyklické aromáty. Nukleofil aduje k elektrofilnímu centru. Nukleofil se aduje k elektrofilnímu centru.

Michaelův akceptor může být představován vzorcem:



kde E je elektronegativní atom. Adice probíhá v poloze 4 za vzniku



kde Nu představuje nukleofil nyní navázaný k atomu v poloze 4. Funkční skupiny Michael akceptoru zahrnují, ale nejsou tak omezeny, maleimid a vinylsulfon. Aktivovaný polymer, ze kterého se vytvoří činka, může ale nemusí obsahovat vinylsulfonové druhy Michael akceptoru.

Aktivované polymery podle předloženého vynálezu zahrnují PEG, mající dvě nebo více Michael akceptor skupin, zahrnujících například PEG-bis-vinylsulfon a PEG-bis-maleimid. PEG-bis-vinylsulfon byl připraven jak je popsáno v příkladu 7. PEG-bis-maleimid byl připraven jak je popsáno v PCT publikaci č. WO 92/16221, zahrnuté zde jako odkaz.

Alespoň jeden z R₁ a R₂ je biologicky aktivní před kopulací k X nebo k X-R. "Biologicky aktivní" má stejnou

definici jak je uvedeno výše. Jak je uvedeno výše zahrnuje biologicky aktivní molekula, ale není tak omezena, vazebné proteiny a cílové skupiny. Jak R_1 tak R_2 mohou být biologicky aktivní, ale není to nezbytné. V některých případech, mají-li R_1 a R_2 afinitu pro stejný ligand, může činka mít větší afinitu pro ligand než R_1 nebo R_2 samotný. Zveřejněná PCT publikace č. WO 92/16221 uvádí, že homočinka, obsahující dvě molekuly 30kDa TNFbp spojený s PEG polymerem je lepší při inhibici cytotoxicity TNF v in vitro esejích než samotná molekula 30kDa. V některých případech může R_1 být molekula, která řídí sloučeninu R_1 -X- R_2 k určitému místu v biologickém systému a R_2 může mít afinitu pro ligand v této lokaci. Alternativně může být pouze jeden z R_1 a R_2 biologicky aktivní ve sloučenině R_1 -X- R_2 . Nebiologicky aktivní skupina může být povrchová nebo jakákoliv jiná biologicky inertní molekula nebo sloučenina.

V předloženém vynálezu má biologicky aktivní R skupina reaktivní thiolovou skupinu. Biologicky aktivní R skupina může být syntetická molekula. Jak je zde použit, znamená výraz "syntetická molekula" molekulu, ke které byla přidána reaktivní thiolová skupina. Syntetické molekuly zahrnují, například, muteiny, obsahující nenativní cysteiny. Thiolová skupina reaguje s akceptorem Michael-typu v polymeru za vzniku kovalentní vazby.

Po vytvoření této kovalentní vazby si biologicky aktivní molekula zachovává svoji biologickou aktivitu. R skupina si "udržuje svoji biologickou aktivitu" v rozsahu vynálezu, jestliže, po reakci s aktivovaným polymerem, má alespoň jednu desetinu biologické aktivity, kterou měla před reakcí s polymerem, výhodně alespoň 40 % a výhodněji alespoň 60 %.

Obecně metoda pro výrobu činek zahrnuje:

(1) volbu R skupiny, umožňující požadovanou biologickou aktivitu, například proteinu jako je faktor tumorové nekrozy (TNFbp).

(2) Měření aktivity za použití relevantní bioeseje.

(3) Stanovení počtu volných sulfhydrylových skupin, například, cysteinových zbytků nezahrnutých v disulfidové vazbě, obecně za použití známých metod v oboru. Jednu z takových metod popisuje Allen G., "Sequencing of proteins and peptides", str. 153-54, v Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Work T.S. a Burdon R.H., vyd. (1972). Jestliže zde nejsou žádné volné cysteiny, postupuje se podle stupně 4(a). Je-li zde jeden volný cystein, nebo pouze jeden dostupný pro PEGylační činidlo, postupuje se podle reakčního stupně 4(c). Jestliže protein má více než jeden volný cystein, postupuje se podle stupně 5.

(4) Je-li R polypeptid a neexistuje žádný volný cystein:

(a) Vytvoří se mutein inzertováním cysteinu nebo nahrazením necysteinového zbytku cysteinem. Vhodná mutační místa zahrnují N nebo C terminální konce proteinu, glykosylační místa nebo lysinové zbytky. Muteiny mohou být vyrobeny rutinně, jak je uvedeno výše, chemickou syntézou nebo rekombinantní technologií. Alternativně se chemicky přidá thiolová skupina.

(b) Měří se aktivita a porovná s aktivitou naměřenou ve stupni 2.

(c) Jestliže si mutein udržuje aktivitu naměřenou ve stupni 2, reaguje mutein s polymerem, jako je PEG, majícím

jedinou sulfhydryl-preferovanou reaktivní skupinu. Jestliže se mutein váže k mono-reaktivnímu PEG (stává se PEGylovaným), měří se aktivita a porovná se s aktivitou naměřenou ve stupni 2. Jestliže si PEGylovaný mutein udržuje aktivitu naměřenou ve stupni 2, reaguje nePEGylovaný mutein s PEG, majícím dva thiol-specifické Michael akceptory, jako je bis-maleimid, pro vytvoření činkovým molekul. Opakuje se bioesej pro potvrzení, že si činky zachovávají biologickou aktivitu.

Jestliže odborník v oboru žádá, aby R_1 a R_2 byly odlišné, bis-reaktivní polymerní skupina může být ponechána reagovat v serii s R_1 a R_2 . Před reakcí polymeru s R_1 , je jedna ze dvou funkčních skupin polymeru blokována nebo chráněna způsoby známými v chemickém oboru za vzniku chráněné skupiny na X. Viz například Greene T.W. a spol., *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Inc. (1991), práce je zahrnuta zde jako odkaz. V tomto kontextu "chráněný" znamená funkční skupinu, která není dostupná pro reakci. Jestliže X mající chráněnou skupinu reaguje s R_1 , vznikne R_1-X a ne R_1-X-R_1 . Po vytvoření R_1-X se před reakcí s R_2 odstraní blokující nebo chránící skupina. "Deprotekce" znamená, že chránící skupina je odstraněna nebo je funkční skupina jinak dostupná pro reakci.

Alternativně mohou být vytvořeny heteročinky reakcí R_1 s přebytkem bis-aktivovaného polymeru pro posílení tvorby R_1-X . Po reakci se R_1-X oddělí z reakční směsi za použití chromatografických technik dobře známých v oboru, zahrnujících například iontovýměnnou chromatografii. R_1-X pak reaguje s R_2 za vzniku R_1-X-R_2 .

(d) Jestliže si mutein vytvořený ve stupni 4(a) nebo PEGylovaný mutein vytvořený ve stupni 4(c) nezachovává

podstatně biologickou aktivitu, vyjde se z nativního proteinu, vytvoří se jiný mutein a opakují se stupně 4(b) a 4(c). Dále může být délka nebo molekulová hmotnost polymeru X změněna pro optimalizaci nebo udělení biologické aktivity.

(5) U proteinů s více než jedním volným cysteinem se provede monoPEGylace, bioesej a reakce s bifunkčním PEGylačním činidlem. Jestliže se utvoří vyšší uspořádané struktury, tj. více než dva proteiny jsou PEG-napojeny, oddělí se činky chromatografickými metodami známými v oboru. Jestliže je separace nežádoucí z jakéhokoliv důvodu, vypustí se nebo nahradí volný cystein jinou aminokyselinou a postupuje se podle stupně 4(b).

(6) U neproteinových biologicky aktivních R skupin se použijí volné sulfhydrylové skupiny pro připojení k polymeru X. Je-li to nezbytné nebo žádoucí přidají se k molekule volné sulfhydrylové skupiny.

Odborník v oboru by měl být schopen modifikovat, přidat nebo vynechat určité stupně. Například by mohl zvolit reakci aktivních proteinů s bifunkčním-PEG a přeskočit monoPEGylační stupeň.

Byly připraveny některé činkové molekuly podle předloženého vynálezu. Publikovaná PCT přihláška č. WO 92/16221, která je zde zahrnuta jako odkaz, uvádí přípravu následujících činek za použití bis-maleimido-PEG: 30kDa TNF inhibitor homočinky, IL-2 inhibitor heteročinka, heteročinky, které inhibují klasickou dráhu komplementového systému a IL-1ra a PDGF heteročinky.

Mohou být připraveny farmaceutické kompozice, obsahující

mnohé konjugátů nebo sloučenin (kolektivně "konjugáty") podle předloženého vynálezu. Tyto konjugáty mohou být ve farmaceuticky přijatelném nosiči a tvořit farmaceutické kompozice podle předloženého vynálezu. Výraz "farmaceuticky přijatelný nosič" jak je zde použit, znamená netoxické, obecně inertní vehikulum pro aktivní složku, které nepůsobí nežádoucím způsobem na složku nebo pacienta, kterému je kompozice podávána. Vhodná vehikula nebo nosiče mohou být nalezeny ve standardních farmaceutických učebnicích, například v Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. vyd., Mack Publishing Co., Easton, PA (1980), zahrnuté zde jako odkaz. Takové nosiče zahrnují, například vodné roztoky jako jsou hydrogenuhličitanové pufry, fosfátové pufry, Ringerův roztok a fyziologický salinický roztok. Dále může nosič obsahovat jiné farmaceuticky přijatelné přísady pro modifikaci nebo udržování pH, osmolarity, viskozity, čirosti, barvy, sterility, rychlosti disoluce nebo vůně formulace.

Farmaceutické kompozice mohou být připravena metodami známými v oboru, zahrnujícími například jednoduché míšení činidel. Odborník v oboru bude vědět, že volba farmaceutického nosiče a vhodné přípravy kompozice závisí na zamýšleném použití a způsobu podání.

V jednom provedení se uvažuje o tom, že nosič a konjugát tvoří fyziologicky kompatibilní, pomalu uvolňující formulaci. Primární rozpouštědlo v takovém nosiči může mít buď vodný nebo nevodný charakter. Navíc, může nosič obsahovat farmakologicky přijatelné přísady pro modifikaci nebo udržení pH, osmolarity, viskozity, čirosti, barvy, sterility, rychlosti disoluce nebo vůně formulace. Podobně může nosič obsahovat ještě další farmakologicky přijatelné přísady pro modifikaci nebo zachování stability, rychlosti disoluce, uvolnění nebo

absorpce konjugátu. Takové přísady jsou substance obvykle a běžně používané pro formulaci dávek pro parenterální podání buď v jednotkové dávkové nebo multidávkové formě.

Jakmile se farmaceutická kompozice připraví, může být uchovávána ve sterilních lahvičkách jako roztok, suspenze, gel, emulze, pevný nebo dehydratovaný nebo lyofilizovaný prášek. Takové formulace mohou být uchovávány buď ve formě připravené pro použití nebo vyžadující rekonstituci bezprostředně před podáním. Preferované uchovávání takových formulací je při teplotě alespoň tak nízké jako jsou 4 °C a výhodně při -70 °C. Je také preferováno, že se takové formulace, obsahující konjugáty uchovávají a podávají při pH blízkém fyziologickému. Předpokládá se, že podávání ve formulaci při vysokém pH (tj. vyšším než 8) nebo při nízkém pH (tj. nižším než 5) není žádoucí.

Způsob podání formulací, obsahujících konjugáty pro systémové podání může být subkutánní, intramuskulární, intravenózní, orální, intranasální nebo vaginální nebo rektální čípkem. Výhodný způsob podání formulací, obsahujících konjugáty pro lokální podání je intraartikulární, intratracheální nebo instilací nebo inhalací do respiračního traktu. Dále může být žádoucí podávat konjugáty ke specifickým částem zažívacího traktu buď orálním podáním konjugátů ve vhodné formulaci nebo zařízením.

V dalším vhodném způsobu ošetření osteoporózy a jiných chorob ztráty kostní dřeně se podává počáteční intravenózní injekce bolusu TNF inhibitor konjugátu a IL-1 inhibitor konjugátu následovaná kontinuální intravenózní infuzí TNF inhibitor konjugátu a IL-1 inhibitor konjugátu. Pro orální podání je konjugát enkapsulován. Enkapsulovaný konjugát může

být formulován s nebo bez farmaceutických nosičů obvykle používaných pro kompondování pevných dávkových forem.

Výhodně je kapsle vytvořena tak, že účinná část přípravku je uvolňována v bodě gastrointestinálního traktu, kde je maximalizována biovyužitelnost a minimalizována pre-systémová degradace. Mohou být obsaženy další přísady pro usnadnění absorpce konjugátu. Redidla, příchutě, nízkotající vosky, rostlinné oleje, lubrikanty, suspendační činidla, činidla pro rozpad tablet a pojiva mohou být také použity.

Bez ohledu na způsob podání je specifická dávka vypočtena podle přibližné tělesné hmotnosti pacienta. Jiné faktory při stanovení vhodné dávky mohou zahrnovat chorobu nebo stav, které jsou ošetřovány nebo je prováděna jejich prevence, způsob podání, věk, pohlaví a medikální stav pacienta. V některých provedeních jsou dávka a podání navrženy pro vytvoření předem zvoleného koncentračního rozmezí konjugátu v pacientově krevním proudu. Například se předpokládá, že zachování oběhových koncentrací TNF inhibitoru a IL-1 inhibitoru menších než 0,01 ng na ml v plasmě nemusí být účinné složení; zatímco prodloužené udržování oběhové hladiny v přebytku 10 µg na ml má nežádoucí vedlejší účinky. Další zlepšení výpočtů nezbytných pro stanovení vhodné dávky pro léčení pro každý z výše uvedených přípravků, je v rukou odborníka v oboru a je možno je provést bez experimentů, zejména vzhledem ke zde popsaným informacím o dávkách a esejích. Tyto dávky mohou být stanoveny použitím uznávaných esejů pro stanovení dávek použitých ve spojení s údaji o vhodné dávce-odezvě.

Mělo by být uvedeno, že zde popsané konjugátové formulace mohou být použity pro veterinární jakož i humánní aplikace a že výraz "pacient" by neměl být vykládán omezujícím způsobem.

V případě veterinárních aplikací by dávkové rozmezí mělo být stejné jak je specifikováno výše.

Následující příklady jsou ilustrativní a neomezují nijak rozsah vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1 - Syntéza

Reakční stupně mohou být stručně ilustrovány následovně:

- (1) $\text{PEG-OH} + \text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl} \rightarrow \text{PEG-OSO}_2\text{CH}_3$
- (2) $\text{PEG-OSO}_2\text{CH}_3 + \text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{PEG-SCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- (3) $\text{PEG-SCH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- (4) $\text{PEG-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} + \text{SOCl}_2 \rightarrow \text{PEG-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$
- (5) $\text{PEG-SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} + \text{NaOH} \rightarrow \text{PEG-SO}_2\text{CH=CH}_2 + \text{HCl}$

Každá z výše uvedených reakcí je dále podrobněji popsána.

Reakce 1

Reakce 1 představuje přípravu methansulfonylesteru polyethylenglykolu, který může být označen jako methansulfonát nebo mesylát polyethylenglykolu. Tosylát a halogenidy mohou být připraveny podobnými postupy, o kterých se předpokládá, že budou zjevné odborníkům v oboru.

Pro přípravu mesylátu se dvacetpět gramů PEG o molekulové hmotnosti 3400 suší azeotropní destilací ve 150 ml toluenu. Přibližně polovina toluenu se oddestiluje při sušení PEG. Čtyřicet ml suchého dichlormethanu se přidá k toluenu a PEG roztoku a následuje ochlazení na ledové lázni. K ochlazenému roztoku se přidá 1,23 ml destilovaného methansulfonylchloridu,

což je hmotnostní ekvivalent 1,6 vzhledem k PEG hydroxylskupinám a 2,66 ml suchého triethylaminu, což je hmotnostní ekvivalent 1,3 vzhledem k PEG hydroxylskupinám. "Hmotnostní ekvivalent" jak je zde použit může být míněn jako "kombinovaná hmotnost" a vztahuje se ke hmotnosti sloučeniny, která bude reagovat se hmotnostním ekvivalentem PEG hydroxylových skupin.

Reakce se nechá probíhat přes noc a během této doby se ohřeje na teplotu místnosti. Filtrací se odstraní vysrážený triethylamoniumhydrochlorid. Potom se objem zmenší na 20 ml na rotační odparce. Mesylát se vysráží přidavkem 100 ml studeného suchého ethyletheru. Analýza podle nukleární magnetické rezonance (NMR) ukazuje 100% konverzi hydroxylových skupin na mesylátové skupiny.

Reakce 2

Reakce 2 představuje tvorbu polyethylenglykol merkaptóethanolu reakcí mesylátu s merkaptóethanolem. Reakce způsobí odstranění methansulfonátového radikálu z PEG. Síra v merkaptóethanolovém radikálu se připojí přímo k uhlíku v základním řetězci uhlík-uhlík PEG.

Dvacet gramů mesylátu z reakce 1 se rozpustí ve 150 ml destilované vody. Roztok mesylátu a vody se ochladí ponořením do ledové lázně. K ochlazenému roztoku se přidá 2,37 ml merkaptóethanolu, což jsou 3 hmotnostní ekvivalenty vzhledem k PEG hydroxylovým skupinám. Přidá se také 16,86 ml 2N NaOH báze. Reakční směs se refluxuje 3 hodiny, což znamená, že páry stoupající ze zahřáté reakce byly kontinuálně kondenzovány a ponechány téci zpět do reakční směsi.

Polyethylenglykol merkaptóethanolový produkt byl třikrát

extrahován dichlormethanem za použití vždy přibližně 25 ml dichlormethanu. Organické frakce byly spojeny a sušeny nad bezvodým síranem sodným. Objem byl snížen na 20 ml a produkt byl vysrážen přidavkem 150 ml studeného suchého etheru.

NMR analýza v d_6 -DMSO (dimethylsulfoxid) poskytla následující píky pro PEG-SCH₂CH₃OH: 2,57 ppm, triplet, -CH₂-S-; 2,65 ppm, triplet, -S-CH₂-; 3,5 ppm řetězcový singlet; a 4,76 ppm, triplet, -OH. Integrace píku pro -S-CH₂- indikuje 100% substituci.

Reakce 3

Reakce 3 představuje peroxidovou oxidaci polyethylenglykol merkapt ethanolového produktu pro konverzi síry, S, na sulfon, SO₂. Produkován je PEG-β-hydroxysulfon.

Dvacet gramů PEG-SCH₂CH₃OH se rozpustí ve 30 ml 0,123M roztoku kyseliny wolframové a ochladí se na ledové lázni. Roztok kyseliny wolframové byl připraven rozpuštěním kyseliny v roztoku hydroxidu sodného o pH 11,5 a pak úpravou pH na 5,6 ledovou kyselinou octovou. Dvacet ml destilované vody a 2,88 ml 30% peroxidu vodíku, což je hmotnostní ekvivalent 2,5 vzhledem k hydroxylovým skupinám, bylo přidáno k roztoku kyseliny wolframové a polyethylenglykol merkapt ethanolu a reakce byla ponechána ohřát přes noc na teplotu místnosti.

Oxidovaný produkt byl třikrát extrahován dichlormethanem vždy za použití 25 ml dichlormethanu. Ochlazené organické frakce byly promyty zředěným vodným hydrogenuhličitanem sodným a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Objem byl redukován na 20 ml. PEG-β-hydroxysulfonový produkt byl vysrážen přidavkem studeného suchého ethyletheru.

NMR analýza v d_6 -DMSO ukazuje následující píky pro PEG-SCH₂CH₃OH: 3,25 ppm, triplet, -CH₂-SO₂-; 3,37 ppm triplet, -SO₂-CH₂-; 3,50 ppm základní řetězec; 3,77 ppm, triplet, -CH₂OH; 5,04 ppm, triplet, -CH₂OH; 5,04 ppm, triplet, -OH. Hydroxylový pík při 5,04 ppm indikuje 85% substituci. Nicméně pík při 3,37 ppm pro -SO₂-CH₂- indikuje 100% substituci a je považován za významnější.

Reakce 4

Reakce 4 představuje konečný stupeň syntézy, izolaci a charakterizaci polyethylenglykolchlorethylsulfonu.

Pro syntézu produktu se dvacet gramů PEG-SO₂CH₂CH₃OH, PEG- β -hydroxysulfonu, rozpustí v 10 ml čerstvě destilovaného thionylchloridu a roztok se refluxuje přes noc. Thionylchlorid se destiluje nad chinolinem. Přebytek thionylchloridu se odstraní destilací. Padesát ml toluenu a 50 ml dichlormethanu se přidá a odstraní destilací.

Pro izolaci produktu se PEG chlorethylsulfon rozpustí ve 20 ml dichlormethanu a vysráží se přidavkem 100 ml studeného suchého ethyletheru. Sraženina se krystaluje z 50 ml ethylacetátu pro izolaci produktu.

Pro charakterizaci produktu se použije nukleární magnetická rezonance. NMR analýza PEG-SO₂CH₂CH₃Cl v d_6 -DMSO poskytuje následující píky: 3,50 ppm, řetězec; 3,64 ppm, triplet, -CH₂SO₂-; 3,80 ppm, triplet, -SO₂-CH₂-. Malý triplet hydroxylové nečistoty se objevuje při 3,94 ppm. Výpočet procentické substituce byl obtížný pro toto spektrum, pro proximitu důležitých píků k velmi velkému řetězcovému píku.

Reakce 5.

Reakce 5 představuje konverzi polyethylenglykolchlorethylsulfonu z reakčního stupně 4 na polyethylenglykolvinylsulfon a izolaci a charakterizaci vinylsulfonového produktu.

PEG vinylsulfon byl snadněji připravitelný rozpouštěním pevného PEG chlorethylsulfonu v dichlormethanovém rozpouštědle s následujícím přidavkem dvou ekvivalentů NaOH báze. Roztok byl filtrován pro odstranění báze a rozpouštědlo bylo odstraněno pro izolaci konečného produktu PEG-SO₂CH₂=CH₃, PEG vinylsulfonu.

PEG vinylsulfon byl charakterizován NMR analýzou v d₆-DMSO dimethylsulfoxidu. NMR analýza vykazuje následující píky: 3,50ppm, řetězec; 3,73ppm, triplet, -CH₂-SO₂-; 6,21 ppm triplet, =CH₂; 6,97 ppm, dublet dubletů, -SO₂-CH-. 6,97 ppm pík pro -SO₂-CH- indikuje 84% substituci. 6,21 ppm pík pro =CH₂ indikuje 94% substituci. Titrace s merkptoethanolem a 2,2'-dithiopyridinem indikuje 95% substituci.

Příklad 2

Thiol-selektivní reaktivita

Příklad 2 ukazuje, že PEG vinylsulfon a jeho prekurzor PEG chlorethylsulfon jsou významně reaktivnější s thiolskupinami (-SH) než s aminoskupinami (-NH₂) nebo iminoskupinami (-NH-). Sloučeniny, obsahující thiolskupiny jsou organické sloučeniny, které se podobají alkoholům, které obsahují hydroxylovou skupinu -OH, s tím rozdílem, že ve thiolech je kyslík hydroxylové skupiny nahrazen sírou. Thioly jsou někdy nazývány také sulfhydryly nebo merkaptany. PEG vinylsulfon obsahuje vinylsulfonovou skupinu -SO₂-CH=CH₂. PEG

chlorovaný sulfon obsahuje chlorethylsulfonovou skupinu
 $-\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\text{Cl}$.

Selektivita pro thiol je důležitá v proteinové modifikaci protože znamená, že cysteinové jednotky (obsahující $-\text{SH}$) budou modifikovány za přítomnosti lysinových jednotek (obsahujících $-\text{NH}_2$) a histidinových jednotek (obsahujících $-\text{NH}-$). Selektivita PEG vinylsulfonu pro thioly znamená, že PEG může být selektivně připojen k cysteinovým jednotkám, což chrání proteinovou aktivitu pro specifické proteiny a řídí počet PEG molekul připojených k proteinu.

Relativní reaktivita PEG vinylsulfonu se thiolovými aminoskupinami byla stanovena měřením rychlosti reakce PEG vinylsulfonu a N- α -acetyllysinmethylesterem a s merkapttoethanolem. M- α -acetyllysinmethylester je lysinový model, obsahující aminoskupinu a je zkrácen jako Lys- NH_2 . Merkapttoethanol slouží jako cysteinový model, obsahující thiolovou skupinu a je zkrácen jako Cys- SH . Relativní reaktivita chlorethylsulfonu byla stanovena podobně. Tato molekula může sloužit jako "chráněná" forma vinylsulfonu, protože je stabilní v kyselině, ale konvertuje na PEG vinylsulfon po přidavku báze.

Reaktivita pro PEG vinylsulfonový a pro PEG chlorethylsulfonový prekurzor byla hodnocena při pH 8,0, pH 9,0 a pH 9,5. Pufrý pro řízení pH byly 0,1M fosfát při pH 8,0 a 0,1M boritan při pH 9,0 a při pH 9,5. Pro měření merkapttoethanolové reaktivity bylo k oběma pufrům přidáno 5 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) pro zpomalení konverze thiolu na disulfid.

pro reakci PEG derivátů podle vynálezu s Lys- NH_2 , bylo

přidáno 3 mM roztoku PEG derivátu za smíchání k 0,3 mM Lys-NH₂ roztoku ve vhodném pufru pro každou ze tří hodnot, bázičkého pH. Reakce byla sledována přidavkem fluorescaminu k reakčnímu roztoku pro získání fluorescentního derivátu z reakce se zbývajících aminoskupinami. Stupeň monitorování byl proveden za přidavku 50 μ l reakční směsi do 1,95 ml fosfátového pufru o pH 8,0 s následujícím přidavkem 1,0 ml roztoku fluorescaminu za intenzivního smíchání. Roztok fluorescaminu obsahoval 0,3 mg fluorescaminu na ml acetonu.

Fluorescence byla měřena 10 minut po smíchání. Excitace byla při vlnové délce 390 nm. Světelná emise se objevila při 475 nm. Žádná reakce nebyla pozorována 24 hodin ani pro PEG vinylsulfon ani PEG chlorsulfon při pH 8,0. Při pH 9,5 byla reakce pomalá, ale po několika dnech zreagovaly všechny aminoskupiny.

Pro reakci PEG vinylsulfonového a PEG chlorsulfonového prekurzoru s Cys-SH, byl přidán 2 mM roztok PEG derivátu k 0,2 mM roztoku Cys-SH ve vhodném pufru pro každou ze tří hodnot bázičkého pH. Reakce byla sledována přidavkem 4-dithiopyridinu k reakčnímu roztoku. 4-Dithiopyridinová sloučenina reaguje se Cys-SH za vzniku 4-thiopyridonu, který absorbuje ultrafialové záření.

Monitorovací stupeň byl proveden přidavkem 50 μ l reakční směsi k 0,95 ml 0,1M fosfátového pufru při pH 8,0, obsahujícího 5 mM EDTA, s následujícím přidavkem 2 mM 4-dithiopyridinu ve stejném pufru.

Absorbance 4-thiopyridinu byla měřena při 324 nm. Jak PEG vinylsulfon tak PEG chlorethylsulfon vykazují reaktivitu vůči Cys-SH, s tím, že PEG vinylsulfon vykazuje větší reaktivitu.

Při pH 9,0 reakce probíhá během dvou minut za použití vinylsulfonu a během 15 minut za použití chlorethylsulfonu. Nicméně byly tyto reakce příliš rychlé pro stanovení přesných rychlostních konstant. Při pH 8,0 byly reakce příliš pomalé, ale ještě kompletní během jedné hodiny pro vinylsulfon a tří hodin pro chlorethylsulfon. Konverze chlorethylsulfonu na vinylsulfon je významně pomalejší než reakce vinylsulfonu s Cys-SH. Tato reakční rychlost pro chlorethylsulfon s Cys-SH se jeví být závislá na rychlosti konverze chlorethylsulfonu na vinylsulfon. Přesto jsou tyto reakční rychlosti stále ještě příliš rychlé než je tomu pro reakci s Lys-NH₂.

Výše uvedené kinetické studie demonstrují následující body. PEG vinylsulfon je mnohem reaktivnější se thiolovými skupinami než s aminoskupinami, což indikuje, že připojení PEG vinylsulfonu k proteinu, obsahujícímu jak cysteinové tak lysinové skupiny, probíhá primárně reakcí s cysteinem. Protože reaktivita s aminoskupinami je podobná jako s iminoskupinami, pak reaktivita histidinových podjednotek bude také mnohem menší než reaktivita s cysteinovými podjednotkami. Také selektivita vůči thiol skupinám je zdůrazněna při nižších hodnotách pH pro PEG chlorethylsulfon a PEG vinylsulfon, když reakce PEG chlorethylsulfonu jsou o něco pomalejší.

Použitelnost mnoha PEG derivátů je omezena protože reagují rychle s vodou což je na závadu záměru připojit deriváty k molekulám a povrchům za vodných podmínek. Následující příklad 3 ukazuje, že PEG vinylsulfon a PEG chlorethylsulfon jsou stabilní ve vodě.

Příklad 3

Hydrolytická stabilita

PEG vinylsulfon se rozpustí v těžké vodě, D_2O deuterium oxidu a sleduje se NMR. Reakce se neobjevuje. Roztok peg chlorethylsulfonu produkuje PEG vinylsulfon v těžké vodě, která byla pufována boritanem na pH 9,0. Monitorování pomocí NMR ukazuje, že PEG vinylsulfon, jakmile byl produkován, byl stabilní po tři dny v těžké vodě.

PEG chlorethylsulfon je stabilní ve vodě jakmile se roztok stane bázičkým, kdy přechází na vinylsulfon. Konverze na vinylsulfon byla demonstrována rozpuštěním PEG chlorethylsulfonu ve vodě při pH 7 a v boritanovém pufru při pH 9. PEG derivát se extrahuje do methylenchloridu. Po odstranění methylenchloridu následuje NMR analýza, která ukazuje, že PEG chlorethylsulfon je stabilní při neutrálním pH 7,0 a reaguje s bází za vzniku PEG vinylsulfonu.

Vinylsulfon je stabilní po několik dnů ve vodě i při bázičkém pH. Extenzivní hydrolytická stabilita a thiol-specifická reaktivita PEG vinylsulfonu znamená, že PEG vinylsulfon a jeho prekurzory jsou vhodné pro modifikaci molekul a povrchů za vodných podmínek jak je uvedeno v následujícím příkladu 4.

Příklad 4

Konjugace k BSA

Proteinová modifikace byla demonstrována připojením PEG derivátu k hovězímu serovému albuminu (bovine serum albumin - BSA) dvěma odlišnými metodami. BSA je protein. Nativní nemodifikovaný BSA obsahuje cystinové skupiny, které

neobsahují thiol skupiny. Cysteinové jednotky jsou považovány za disulfidové vazby, S-S.

V prvním provedení m-PEG (monomethoxy-PEG) vinylsulfon o molekulové hmotnosti 5000 reagoval s nemodifikovaným BSA po 24 hodin v 0,1M boritanovém pufru při pH 9,5 při teplotě místnosti. Roztok obsahuje 1 mg BSA a 1 mg m-PEG vinylsulfonu o molekulové hmotnosti 5000 na ml roztoku. Výsledky z příkladu 2 modelové sloučeniny indikují, že lysinové podjednotky (a možné histidinové podjednotky) by mohly být modifikovány za těchto relativně bázičtých podmínek a za nepřítomnosti volných thiolových skupin dostupných pro reakci.

Připojení k lysinovým podjednotkám bylo demonstrováno dvěma způsoby. První, chromatografie vylučující podle velikosti, ukazuje, že molekulová hmotnost proteinu byla zvýšena přibližně o 50 % což indikuje připojení přibližně 10 PEG k proteinu. Druhá, fluorescaminová analýza ukazuje, že počet lysinových skupin v BSA molekule byl snížen přibližně na deset.

Ve druhé metodě byl BSA zpracován s tributylfosfinem pro redukci disulfidových S-S vazeb na thiolové skupiny, -SH, které jsou dostupné pro reakci. Modifikovaný BSA byl pak zpracován s PEG chlorethylsulfonem při pH 8,0 v 0,1M fosfátovém pufru při teplotě místnosti po 1 h. Roztok obsahuje 1 mg modifikovaného BSA a 1 mg m-PEG chlorethylsulfonu o molekulové hmotnosti 5000 na ml roztoku. Výsledky ukazují, že lysinové skupiny byly nereaktivní za těchto podmínek. Thiolové skupiny však byly reaktivní.

Připojení PEG k proteinu bylo demonstrováno chromatografií vylučující podle velikosti, která ukazuje

zvýšení molekulové hmotnosti proteinu o asi 25 %.
Fluorescaminová analýza neindikuje žádné změny v počtu
lysinových podjednotek v proteinu, což potvrzuje, že PEG
připojení neprobíhá na lysinových podjednotkách. Substituce na
thiolových skupinách tak byla potvrzena.

Příklad 5

Syntéza vinylsulfon NHS-ester heterobifunkčního PEG (3400)
činidla

Stručně, v několika stupních byl syntetizován
sukcinimidylester kyseliny
PEG(3400)-omega-vinylsulfon- α -propionové. Nejprve byl
syntetizován ethylester kyseliny
PEG(3400)-omega-vinylsulfon- α -propionové. Zadruhé byl
ethylester kovertován na omega-mesylátový derivát. Zatřetí byl
mesylát použit pro přípravu omega-thioethanolového derivátu.
Začtvrté byl thioethanolový derivát konvertován na
omega-hydroxysulfon. Zapáté byl hydroxysulfon převeden na
omega-vinylsulfon. Poslední α -ethylester byl převeden na
kyselinu α -propionovou v šestém stupni. Nakonec byla skupina
kyseliny propionové převedena na sukcinimidylester. Podrobná
syntéza je uvedena dále.

Stupeň 1. 15,0 gramů kyseliny
PEG(3400)-omega-vinylsulfon- α -propionové, 75 ml bezvodého
ethylalkoholu a 3 ml kyseliny sírové byly zahřívány pod
refluxem 1 hodinu. Po ochlazení na teplotu místnosti bylo
přidáno 50 ml vody k reakční směsi a pro úpravu pH na hodnotu
7 byl použit hydrogenuhličitan sodný. Ethylalkohol byl
oddestilován za sníženého tlaku na rotační odparce při 55 °C
po půl hodiny. Reakční produkt byl extrahován 60, 50 a 40 ml
dichlormethanu. Extrakt byl sušen bezvodým síranem hořečnatým,

zahuštěn na 50 ml a přidán ke 400 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku. Výtěžek ethylesteru byl 13,1 gramů. NMR analýza vykazuje 49 % skupin ethylesteru kyseliny propionové a 51 % PEG-OH skupin.

Stupeň 2. Směs 13,0 gramů (0,0038 mol) ethylesterového derivátu vytvořeného ve stupni 1, 100 ml toluenu a 2,0 gramy BHT byly azeotropicky sušeny během zahřívání pod refluxem. Dále bylo přidáno při 5 °C 15 ml suchého dichlormethanu, 0,60 ml (0,0043 mol, 1,15 násobný přebytek) triethylaminu a 0,31 ml (0,0040 mol, 1,07násobný přebytek) mesylchloridu a směs byla míchána přes noc při teplotě místnosti pod atmosférou dusíku. Byly přidány 2 ml bezvodého ethylalkoholu a směs byla míchání 15 minut. Směs pak byla odfiltrována a asi 70 ml rozpouštědel bylo oddestilováno za sníženého tlaku za získání toluenového roztoku ethylesteru kyseliny PEG-omega-mesylát- α -propionové.

Stupeň 3. Dále bylo přidáno asi 40 ml (0,00375 mol) roztoku ethylesteru kyseliny PEG-omega-mesylát- α -propionové získaného ve stupni 2: 150 ml bezvodého ethylalkoholu, 1,79 ml (0,0139 mol, 3,69násobný přebytek) merkaptoethanolu a 0,45 gramů (0,0011 mol, 3,0násobný přebytek) hydroxidu sodného rozpuštěného ve 20 ml bezvodého ethylalkoholu. Směs byla zahřívána 3 hodiny na 58 až 62 °C pod atmosférou dusíku. Po ochlazení na teplotu místnosti byla použita kyselina octová pro upravení pH na asi 6,5 a bylo oddestilováno 140 ml ethylalkoholu za sníženého tlaku na rotační odparce při 55 °C za 40 minut. Po destilaci bylo ke zbytku přidáno 50 ml dichlormethanu. Výsledný roztok byl promyt destilovanou vodou a sušen bezvodým síranem hořečnatým. Roztok byl pak zahuštěn na 30 ml a přidán ke 350 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku. Výtěžek thioethanolového derivátu byl 11,5 gramů. NMR analýza ukazuje

52 % thioethanolových skupin, 35 % skupin ethylesteru kyseliny propionové a 13 % PEG-OH skupin.

Stupeň 4 Dále byl připraven roztok 11,5 g PEG- ω -thioethanol- α -propionové kyseliny ve 12 ml destilované vody. Následovně byl také připraven roztok kyseliny wolframové: 0,14 gramů kyseliny wolframové, 12,0 ml destilované vody a 0,05 gramů hydroxidu sodného rozpuštěného v 6,0 ml vody bylo smíseno za vzniku roztoku o pH 11,5. K roztoku kyseliny wolframové byl přidán 10% roztok NaH_2PO_4 pro upravení pH na 6,6. Pak bylo přidáno 12 ml roztoku ethylesteru k roztoku kyseliny wolframové o pH 6,6 a pH bylo opět upraveno na 6,6 0,1M NaOH. Bylo přidáno 1,1 ml 30% peroxidu vodíku a reakční směs byla míchána 9 hodin. pH po reakci bylo 6,7. 1M NaOH byl přidán pro úpravu pH na 7,2 a reakční směs byla míchána 1 hodinu. K reakční směsi bylo přidáno 5 gramů chloridu sodného rozpuštěného ve 45 ml destilované vody. Reakční produkt byl extrahován třikrát 50 ml dichlormethanu. Extrakt byl sušen následovně síranem hořečnatým: 10 gramů práškového síranu hořečnatého bylo přidáno k extraktu a síran hořečnatý byl po dvou hodinách odfiltrován. Extrakt sušený síranem hořečnatým byl zahuštěn na 40 ml s přidáním 350 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku. Výtěžek bylo 9,7 gramů a produkt obsahuje podle NMR stanovení 50 % skupin hydroxysulfonových, 39 % skupin ethylesteru kyseliny propionové a 11 % skupin PEG-OH.

Stupeň 5 Ke směsi 9,6 gramů (0,00271 mol) ethylesteru kyseliny PEG- ω -hydroxysulfon- α -propionové, syntetizovanému ve stupni 4, 50 ml dichlormethanu a 0,01 gramu (0,1 hmotn.% na PEG) BHT míchané při teplotě místnosti pod atmosférou dusíku bylo přidáno 3,00 ml (0,0215 mol, 3,97násobný přebytek)

triethylaminu a 0,80 ml (0,010 mol, 3,81násobný přebytek) mesylchloridu. Reakční směs byla míchána 15 minut, filtrována a zředěna se 150 ml dichlormethanu. Výsledná směs byla pak promyta 25 ml 1M HCl, 25 ml 10% NaCl a 25 ml vody. Bylo přidáno malé množství Na_2HPO_4 pro úpravu pH vodné vrstvy na 7. Reakční směs pak byla sušena síranem hořečnatým a zahuštěna na 40 ml. Získaný roztok byl přidán ke 400 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku za získání 9,1 g. NMR analýza ukazuje následující funkčnosti: 43 % vinylsulfon, 16 % mesylát a 35 % ethylester kyseliny propionové.

Stupeň 6 K roztoku 9,0 gramů ethylesteru kyseliny PEG-omega-vinylsulfon- α -propionové v 50 ml destilované vody byl přidán 1,0M NaOH pro upravení pH na 12,0 a roztok byl zpracován 1,5 hodiny při udržování pH mezi 11,9 a 12,1 periodickým přidáváním 1,0M NaOH. Pak bylo pH upraveno na 3,0 kyselinou šfavelovou, k roztoku bylo přidáno 5 gramů NaCl a reakční produkt byl třikrát extrahován 50 ml dichlormethanu. Extrakt byl sušen bezvodým síranem hořečnatým, zahuštěn na 30 ml a přidán ke 350 ml studeného diethyletheru. Sraženina byla odfiltrována a sušena za sníženého tlaku. Výtěžek byl 6,8 gramů. Funkční skupiny identifikované pomocí NMR analýzy byly: vinylsulfon 40 %, kyselina propionová 29 %, ethylester kyseliny propionové 4 % a mesylát 17 %. Sraženina byla čištěna iontovýměnnou chromatografií přes DEAE Sepharose FF kolonu. Výtěžek po čištění byl 3,2 gramy a NMR analýza ukazuje 50 % skupin kyseliny propionové, 38 % vinylsulfonových skupin a 8 % mesylátových skupin.

Stupeň 7 Směs 3,0 gramů kyseliny

PEG-omega-vinylsulfon- α -propionové, 0,12 gramů

N-hydroxysukcinimidu, 0,21 gramů DCC (dicyklohexylkarbodiimid)

ve 20 ml dichlormethanu bylo mícháno přes noc při teplotě místnosti pod dusíkem. Reakční směs pak byla odfiltrována a přidána ke 250 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku za získání 2,90 gramů. NMR vykazuje následující skupiny: sukcinimid 50 %? 38 % vinylsulfon, 10 % mesylát a 2 % hydroxysulfon.

Příklad 6

Syntéza maleimid, NHS-ester heterobifunkčního PEG(3400) činidla

Maleimid, NHS-ester PEG činidlo bylo syntetizováno ve dvou stupních. V prvním stupni byl syntetizován maleimido-PEG-OH. Specificky, 0,130 gramů maleimido-sukcinimidylpropionátu bylo rozpuštěno v 5 ml suchého dichlormethanu a ochlazeno na 0 °C. Potom bylo přidáno 0,5 gramů PEG-monoaminu, připraveného jak popsáno dále a 2 kapky triethylaminu. Po 2 hodinách při teplotě místnosti indikuje TLC, že reakce je kompletní. TLC byla provedena za použití n-BuOH-ACOH-H₂O v poměru 4:1:1. Reakční směs byla odpařena dosucha a zbytek byl rozpuštěn v 15 ml destilované vody. pH roztoku bylo upraveno na 3 použitím 15 ml 0,5M HCl a extrahováno 10 ml CH₂Cl₂. Organická vrstva byla sušena nad síranem hořečnatým, filtrována, zahuštěna na 15 ml a nalita do 75 ml studeného etheru. Sraženina byla odfiltrována a sušena ve vakuu. Výtěžek byl 0,300 gramů. NMR analýza vykazuje 77 % maleimidoskupin a 100 % PEG-OH.

Ve druhém stupni byl maleimido-PEG-OH konvertován na maleimid-PEG-NHS-ester. Směs 2 ml CH₂Cl₂, 0,05 ml pyridinu (1 ekvivalent), 1 ml acetonitrilu a 0,266 gramů maleimido-PEG-OH byla míchána při teplotě místnosti pod dusíkem. K této směsi bylo přidáno 0,070 gramů (2,5 ekvivalentu) N,N-disukciimidylkarbonátu a reakce ponechána přes noc.

Reakční směs pak byla nalita do přibližně 50 ml studeného etheru, filtrována a sušena ve vakuu. NMR ukazuje nečistoty a produkt byl vysrážen podruhé s konečným výtěžkem 0,230 gramů.

PEG-monoamin použitý v prvním stupni výše byl připraven ve třech stupních následovně. Nejprve byl vytvořen PEG-mesylátový derivát. Z mesylátu byl vytvořen amin. Nakonec byl monoamin oddělen od nederivatizovaného PEG a diaminu.

Stupeň 1 PEG-3400 (120 gramů, 0,0714 ekvivalentů OH) byl rozpuštěn v 580 ml toluenu, azeotropicky sušen a pak bylo přidáno 90 ml dichlormethanu, 1,80 ml triethylaminu (0,01291 mol) a 0,83 ml mesylchloridu (0,01072 mol). Po reakci přes noc se oddestiluje 90 ml rozpouštědel z reakční směsi za sníženého tlaku, smě se filtruje a pak se za sníženého tlaku oddestiluje 500 ml toluenu. Zbytek se přidá k 800 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt se odfiltruje a suší za sníženého tlaku. Výtěžek byl 118 gramů a substituce byla 15 %.

Stupeň 2 118 gramů mesylátu vytvořeného ve stupni 1 a 80 gramů chloridu amonného bylo rozpuštěno v 1600 ml koncentrovaného vodného NH_4OH a mícháno při teplotě místnosti 44 hodin. Reakční produkt byl extrahován 600, 400 a pak 200 ml dichlormethanu. Extrakt byl promyt 170 ml 2% KOH a 170 ml vody, sušen síranem hořečnatým, koncentrován na 200 ml a přidán k 800 ml studeného diethyletheru. Vysrážený produkt byl odfiltrován a sušen za sníženého tlaku. Výtěžek byl 106 gramů a substituce byla 15,6 %.

Stupeň 3 45 gramů aminu vytvořeného ve stupni 2 bylo rozpuštěno v 9 l vody a vloženo na SP-Sepharose FF (300 ml gelu ekvilibrovaného s 1000 ml pufru kyselina citronová-citrát lithný, 0,4%, pH 3,0 a pak promytého vodou). SP-Sepharose FF

je dostupný od Pharmacia, Uppsala, Švédsko. Nederivatizovaný PEG byl vymyt z kolony vodou. Dále byl eluován PEG monoamin 800 ml 20 mM NaCl. pH eluátu bylo upraveno na 11 1M NaOH a PEG monoamin byl extrahován dichlormethanem, sušen síranem sodným a rozpouštědlo bylo oddestilováno. Výtěžek byl 9 gramů.

Příklad 7

Syntéza PEG- α , ω -bis-vinylsulfonu

Syntéza 3400 a 20000 kDa PEG bis-vinylsulfonu byla provedena za použití PEG diolu a obecně podle výše popsané metody. PEG diol byl zakoupen od Fluka Chemical Corporation (Ronkonkoma, New York) nebo od Nippon Oil and Fat (Tokyo, Japonsko).

Příklad 8

Pegylace IL-1ra za použití PEG-20000- α , ω -bis-vinylsulfonu

IL-1ra c84 mutein byl připraven jak je uvedeno ve zveřejněné PCT přihlášce WO 92/16221, zahrnuté zde jako odkaz. Konjugace c84 muteinu nebo nativního (původní typ) IL-1ra za použití PEG- α , ω -bis-vinylsulfonu (3400 nebo 20000 kDa) byla provedena při 25 °C v citrátovém pufru, pH 6,75 - 7,5, v 1ml zkumavkách s měnícími se PEG a proteinovými koncentracemi. Při proteinové koncentraci 30 mg/ml byla za 18 hodin získána dobrá konverze na činkovou molekulu. Při koncentraci 0,94 mg/ml byly získány převážně monoaddukty. Činkové druhy se vytvářely většinou při proteinové koncentraci 100 mg/ml s 0,03 ekvivalenty PEG. Cinka může být čištěna za použití chromatografických technik jak je uvedeno v PCT publikaci č. WO 92/16221, zahrnuté zde jako odkaz.

V dalších pokusech byl 0,1M Tris-HCl pufr, pH 8,5,

obsahující 30 mg/ml původního typu IL-1ra zpracován s 0,53 molárním ekvivalentem 20 kDa PEG-bis-vinylsulfonu při 25 °C po 18 hodin. SDS PAGE analýza ukazuje konverzi jak na činku tak na monoaddukt. Při proteinové koncentraci 3,1 mg/ml s 1 molárním ekvivalentem PEG činidla byl pozorován pouze monoaddukt.

Obecně reaguje c84 mutein snadněji s PEG činidlem než s původním typem molekuly.

Příklad 9

Bioaktivita IL-1ra činky

c84 činka generovaná výše byla analyzována na svoji receptor vazebnou afinitu ve srovnání s nePEGylovaným rekombinantním IL-1ra na myších EL-4 buňkách za použití eseje uvedené v PCT zveřejněné přihlášce č. WO 92/16221, zahrnuté zde jako odkaz. Výsledky ukazují podobné vazebné afinity mezi dvěma molekulami.

Příklad 10

Pegylace TNFbp c105 muteinu s PEG-20000- α , ω -bis-vinylsulfonem.

c105 mutein TNFbp byl připraven jak je uvedeno v PCT zveřejněné přihlášce WO 92/16221, zahrnuté zde jako odkaz. Alternativně c105 mutein byl připraven následovně.

E.coli buňky, exprimující c105 mutein byly sklizeny odstředěním. Buněčný kal byl upraven přibližně na obsah 40 % pevných látek za mokra přidavkem čištěné vody. Směs pak byla dále ředěna na stejný objem rozkládacím pufrem (50 mM tromethamin, 4 mM EDTA, pH 7,2) za získání suspenze s přibližně 20 % hmotnosti pevných látek za mokra. Buněčný kal

prošel pětkrát přes vysokotlakový homogenizér, pracující přibližně při 8000 psi za získání buněčného homogenátu. Homogenát byl ochlazen na méně než nebo na 10 °C před každým průchodem homogenizérem. Homogenát byl odstředěn a pevná frakce, obsahující cI05 byla zachycena. Pevné látky byly zředěny a opět odstředěny za získání promytých inkluzních těles.

Promytá inkluzní tělesa byla pak rozpuštěna přidavkem 8M močoviny a 150 mM cysteinu v 50 mM TRIS, pH 9,5. Tato směs byla ponechána míchat po dvě hodiny před novým skládáním. Za těchto podmínek cI05 mutein byl denaturován a redukován.

Reduovaný denaturovaný cI05 mutein byl znovu složen ředěním s 1,1 M močoviny, 50 mM Tris za získání konečného znovu vytvořeného roztoku 200 µg/ml cI05 muteinu, 1,5 M močoviny, 7,5 mM cysteinu, 50 mM Tris, pH 9,7. Znovu složená směs byla udržována při 6 až 10 °C po dva dny. Účinnost znovusložení byla sledována pomocí HPLC s reverzní fází a kationtovýměnné HPLC.

Znovu složená směs pak byla upravena na pH 5,0 přidavkem kyseliny octové a HCl. Znovu složená směs byla vložena na kationtovýměnnou kolonu (S-Sepharose, velké kuličky) předem ekvilibrovanou ve 25 mM octanu sodném, 65 mM NaCl, pH 5 při 4 °C. Po vložení byla kolona promyta stejným ekvilibračním pufrem. Kolona byla eluována s gradientem od 65 do 350 mM NaCl ve 25 mM octanu sodném, pH 5. cI05 mutein eluuje při asi 200 mM NaCl a byl shromážděn v jednom poolu.

Odebraný pool obsahující cI05 mutein byl zředěn s 1,5 objemy 5M NaCl, 40 mM fosforečnanu sodného, upraven na pH 6 a vložena na hydrofobní interakční kolonu (Toyo Butyl 650 M

kolona), předem ekvilibrovanou ve 3 M NaCl, 20 mM fosforečnanu sodném pH 6. Na konci vkládání byla kolona promytá ekvilibračním pufrům. cI05 mutein byl eluován za použití osmi objemů kolony lineárně klesajícího solného gradientu od 3 M do 1 M NaCl ve 20 mM fosforečnanu sodném při pH 6. cI05 mutein byl shromážděn v jednom poolu. Pool byl zahuštěn na přibližně 3 g/l cI05 muteinu a pak diafiltrován proti 20 mM fosforečnanu sodnému, pH 6,0 dokud konečná vodivost nebyla menší než 4 mmho (přibližně šest objemů).

Diafiltrovaný pool byl vložen na vysokoúčinnou SP-Sepharose kolonu ekvilibrovanou ve 20 mM fosforečnanu sodného, pH 6,0. Po vložení byla kolona promyta dalším ekvilibračním pufrům a eluována kombinací pH/solný gradient od 20 mM fosforečnanu sodného, 50 mM NaCl, pH 6,0 do 20 mM fosforečnanu sodného, 50 mM NaCl, pH 6,5. cI05 mutein eluuje v pozdější polovině gradientu při asi 35 mM NaCl. cI05 mutein byl uchováván v tomto okamžiku zmrazený.

cI05 mutein reagoval s PEGylačním činidlem při molárních poměrech PEG činidlo k proteinu 1:1, 2:1, 4:1, 1:2 a 0:1 (kontrola). Reakce byla provedena ve 20 mM fosfátovém/20 mM acetátovém pufru při pH 7,5 po 15 hodin při 22 °C. Reakce byly také provedeny v 50 mM fosfátovém pufru, pH 7,5 nebo 8,5.

Procenta konverze na činkovou molekulu byla stanovena kationtovýměnnou HPLC přes MA7S kolonu. Procenta konverze jsou v rozmezí přibližně 40 až 60 %. Konverze na činkovou molekulu byla optimalizována přidavkem roztoku přibližně 50 mg/ml PEG činidla k proteinu při molárním poměru 0,50 až 0,65 PEG činidla k 1,0 TNFbp muteinu při pH 7,5 po 15 hodin při 22 °C. Jak stoupá poměr PEG k proteinu je upřednostňována produkce monoadduktu. Tvorba monoadduktu byla optimalizována za poměru

5:1 PEG činidlo k proteinu.

Konjugáty byly čištěny chromatografií přes S-Sepharose HP-kolonu. Reakční směs byla upravena na pH 3,0 až 4,2 a vložena na kolonu předem upravenou na stejné pH. Kolona byla promyta ekvilibračním pufrem a činka byla eluována za použití lineárního gradientu chloridu sodného a průtokové rychlosti 1,2 až 1,5 cm/min. Následující druhy byly eluovány z kolony v následujícím pořadí: 1) monosubstituovaný, 2) činka, 3) nePEGylovaný TNFbp mutein a 4) agregátovaný mutein.

Příklad 11

Bioaktivita TNFbp c105 mutein činky

c105 činky, které byly vytvořeny z PEG-bis-maleimidu jak je popsáno v PCT zveřejněné přihlášce č. WO 92/16221 nebo zde popsáno, byly zjištěny jako 50 až 100krát účinnější než nePEGylovaný 30 kDa TNF inhibitor při srovnání v L929 eseji cytotoxicity jak je uvedena ve WO 92/16221, a je zde zahrnuta jako odkaz.

Příklad 12

Příprava glyceryl-PEG-tris-vinylsulfonu

Glyceryl-PEG- α,β,γ -triol (10000 kDa a 20000 kDa) byl převeden na vinylsulfonový derivát za použití obecných výše popsaných metod. Glyceryl-PEG- α,β,γ -triol byl zakoupen od Unium Carbide, Terrytown, New York. Glyceryl-PEG- α,β,γ -triol mohl být syntetizován ethylenoxidovou polymerací glycerolu v bázi.

Příklad 13

Syntéza TNFbp c105 za použití glyceryl-PEG-tris-vinylsulfonu

Tři TNFbp c105 muteiny byly konjugovány k PEG-tris-vinylsulfonu za získání "trumbbell" molekuly. Pokusy provedené v širokém rozmezí poměru PEG:protein ukazují, že zvláště vhodný molární poměr pro konverzi na byl 0,25 až 0,35 PEG k 1 proteinu. V typickém experimentu byl c105 mutein ve 20 mM fosfátovém, 20 mM acetátovém pufru, pH 7,5 vystaven 0,03 molárním ekvivalentům glyceryl-PEG-10000- α, β, γ -triolu při 25 °C po 18 hodin. Analýza posledně uvedené reakční směsi kationtovýměnnou HPLC (BioRad MA7S kolona za eluce gradientem chloridu sodného) indikuje konverzi na trumbell ve 49% výtěžku a bisubstituci ve 34,9% výtěžku.

Příklad 14

Syntéza IL-1ra trumbellu za použití glyceryl-PEG-tris-vinylsulfonu

Roztok PEG-10000- α, β, γ -tris-vinylsulfonu reagoval se 20 mg/ml původního typu IL-1ra v 0,1M fosfátovém pufru při následujících poměrech PEG/protein: 0,10:1; 0,25:1; 0,35:1; 0,45:1; 0,55:1; 0,65:1. Reakce byly inkubovány při 25 °C po 72 hodin. SDS PAGE analýza ukazuje konverzi na mono, di a triaduktové produkty. Optimální konverze na triadukt byla pozorována při poměru PEG/protein 0,10:1. Reakční směs byla aplikována na S Sepharose vysokoúčinnou kolonu a eluována gradientem chloridu sodného.

Příklad 15

Syntéza c105 TNFbp-PEG-IL-1ra heteročinky

Roztok původního typu IL-1ra v 0,1M fosfátovém pufru, pH

8,5 reagoval s 8 mg/ml

PEG-20000-bis-vinylsulfon-mono-c105TNFbp aduktem při následujících molárních poměrech a koncentracích IL-1ra: 55:1 (12,5 mg/ml); 85:1 (18,75 mg/ml); 100:1 (25,0 mg/ml) a 150:1 (31,75 mg/ml). Po 72 hodinách byla podle SDS PAGE vytvořena heteročinka. Optimální konverze byla pozorována při poměru 1:100 monoaduktu k IL-1ra. Heteročinka byla čištěna za použití S Sepharose vysokoúčinné kolony a eluce s gradientem chloridu sodného.

Příklad 16

Stabilita PEG-vinylsulfonpolypeptidových aduktů

Byla studována stabilita vazby mezi c105 TNFbp muteinem a PEG-bis-vinyl-sulfonem. Známá množství c105 činky byla inkubována v PBS, pH 7,4 při 37 °C po jeden týden a byly odebírány vzorky pro analýzu SDS PAGE. V podstatě nebyl pozorován žádný rozklad c105 činky. Při pH 10 při 37 °C po 1 týden bylo pozorováno pouze 5 až 10 % degradace konjugátu.

Příklad 17

TNFbp c105 činka inhibuje aktivně indukovanou experimentální alergickou encefalomyelitis ("EAE")

In vivo aktivita c105 činky vyrobené s PEG-bis-vinylsulfonem byla demonstrována. EAE je myší model autoimunitní zánětlivé demyelinační choroby centrálního nervového systému, který se často používá jako model pro lidský MS. Jak je popsáno dále, inhibuje c105 činka EAE u krys.

Samice Lewis krys (150 až 200 g) byly zakoupeny od Charles River (Raleigh, NC) a ustájeny na alespoň jeden týden

před započítím pokusu. Dostávaly potravu a vodu ad libitum a byly ustájeny v prostorách se řízenou teplotou a světlem (12 h/den). V každém pokuse byla zvířata stejné stáří.

Aktivní indukce EAE

Krysy (obvykle šest na skupinu) byly anestetizovány se 2% isofluranu + O₂ a imunizována v den 0 na tlapce levé zadní nohy 0,1 ml emulze, obsahující myelin bázecký protein ("MBP") v jedné z následujících dávek: 0, 1, 3, 10 nebo 30 µg (fragment Bachem Bioscience, PA). MBP byl rozpuštěn ve fosfátem pufrovaném salinickém roztoku (PBS) a emulzifikován se stejným objemem kompletního Freudova adjuvans (CFA), obsahujícího 5 mg/ml Mycobacterium tuberculosis H37Ra (Difco Lab, MI). Kontrolní krysy dostaly 0,1 ml PBS/CFA emulze bez MPA do tlapy levé zadní nohy.

Klinické hodnocení EAE

Hodnocení klinické choroby bylo provedeno na denní bázi za použití standardní stupnice hodnocení 0 až 5. Stručně, spektrum hodnocení bylo 0 normální, 0,5 částečná ztráta tonu ocasu, 1 kompletní ztráta tonu ocasu, 2 vláčení jedné zadní nohy, 3 paralýza obou zadních noh, 4 morbidita a 5 smrt. Denní hmotnosti byly zaznamenávány pro jednotlivé krysy a hmotnostní ztráta/přírůstek byly vyjádřeny ve vztahu k počáteční hmotnosti.

Vliv imunizace s MBP

Počáteční studie hodnotí klinickou sílu různých dávek MBP (0,1 až 30 µg/0,1 ml) v emulzi popsané výše u krysy. 0,1 a 0,3 µg MBP neprodukovaly žádné zjevné klinické znaky. 30 µg dávka MBP produkuje nejsilnější klinické znaky ve srovnání s 1 µg dávkou. Tento účinek byl vysoce signifikantní ($p < 0,001$, Mann-Whitney U-test). Obecně zvyšující se dávka (1 až 30 µg)

MBP produkuje klinické znaky častěji, například 1 μ g MBP má průměrný $\pm$ S.E.M nástup $14,88 \pm 0,42$ ($n=9$) ve srovnání se $12,35 \pm 0,16$ ($n=34$; $p < 0,01$) dnů pro 30 μ g MBP dávku. Navíc byl pozorován dávkově závislý účinek MBP (1 až 30 μ g) na ztrátu hmotnosti. Zvířata se spontánně zbavila klinických znaků během 5 až 7 dnů nástupu. Podání CFA samotného neprodukuje žádné klinické znaky, nicméně byla počáteční přechodná ztráta hmotnosti porovnána s neošetřenou kontrolou.

Ve všech těchto studiích nebyly žádné významné rozdíly při jakýchkoliv mbp dávkách pozorovány mezi skupinami se žádným léčivem (pouze MBP imunizovaná) a s dávkou vehikula (MBP imunizovány a podán PBS). Vehikulum tak nemá žádný vliv na sílu choroby (viz tabulka 3 a 4). Skupiny bez léčiva a s dávkou vehikula jsou popsány dále.

Léčba EAE

Různé dávky TNF inhibitor činky (0,1 až 3 mg/kg) nebo vehikula (PBS) v různých časech byly podány subkutánní injekcí. Perioda léčení začala buď ihned po nebo devět dnů po imunizaci s MBP a pokračovala 21 dnů po imunizaci. V každém pokuse dostaly kontrolní krysy PBS ve stejném počtu injekcí jako léčené skupiny pro zmítnění sekundárních účinků vyvolaných stresem. Skupina krys, které nedostaly žádné injekce po EAE indukci, a kontrolní bez léčiva byla také pozorována.

Vlivy léčení

Dávkování každý den . Byly hodnoceny vlivy EAE denního dávkování TNF inhibitor činky na EAE, začínající v den imunizace po celkem 21 dnů. Čímkové koncentrace 0,1, 0,3, 1 nebo 3 mg/kg nemají žádné významné vlivy na klinické znaky ve skupinách 1 μ g a 30 μ g MBP. Nicméně významné zmírnění klinické

choroby bylo pozorováno při dávce 3 μ g MPB pro všechny použité činkové dávky.

Dávkování každý další den Vlivy 0,1, 0,3, 1 a 3 mg/kg dávek podávaných každý další den začínajících devátý den po imunizaci byly rovněž testovány. Jak je uvedeno tabulkách 3 a 4, významná inhibice klinických znaků se objevuje při dávkách 0,3 ($p < 0,008$), 1,0 ($p < 0,001$) a 3,0 mg/kg ($p < 0,002$, Mann Whitney test, $n=6$) ve srovnání s vehikulovými kontrolami za použití nejvyšší MBP dávky (30 μ g/0,1 ml). Nebyly pozorovány žádné významné rozdíly mezi skupinami s vehikulem a kontrolními skupinami bez jakéhokoliv ošetření. Nejnižší dávka TNF inhibitor činky neměla významný vliv na klinické znaky.

Dávky činky 1,0 ($p < 0,1$) a 3 mg/kg ($p < 0,05$, Mann Whitney test) významně zeslabují klinické znaky produkované 10 μ g MBP. I když 0,3 a 0,1 mg/kg činky zeslabují klinické znaky, redukce nebyla podstatná. Činkové dávky 0,1 až 3 mg/kg významně neinhibují klinické znaky indukované nižšími dávkami MBP (1 nebo 3 μ g).

Ztráta hmotnosti je důležitým znakem nástupu EAE. Krysy imunizované se 3, 10 a 30 μ g MBP, které dostaly c105 činku (1 nebo 3 mg/kg) ztratily méně hmotnosti ve srovnání s vehikulovými skupinami.

Tabulka 3

Prevence aktivně inhibované EAE s TNF inhibitor činkou

Tabulka 3A až 3F

Vlivy činky na denní průměrné klinické hodnocení - 30 μ g MBP

Tabulka 3A

Léčení	bez léčiva						
průměrné	0,25	1,00	1,92	2,67	1,83	0,83	0,166
klinické	±	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,18	0,50	0,52	0,44	0,53	0,44	0,10
dny	11	12	13	14	15	16	17

Tabulka 3B

Léčení	vehikulum						
průměrné	0,17	0,75	1,83	2,50	2,08	1,00	0,25
klinické	±	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,17	0,31	0,40	0,34	0,45	0,41	0,11
dny	11	12	13	14	15	16	17

Tabulka 3C

Léčení	0,1 mg/kg činky						
průměrné	0,08	0,92	1,33	2,67	2,17	1,17	0,25
klinické	±	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,08	0,35	0,21	0,21	0,30	0,28	0,11
dny	11	12	13	14	15	16	17

Tabulka 3D

Léčení	0,3 mg/kg činky					
průměrné	0,25	0,92	1,50	1,17	0,58	0,375
klinické	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,17	0,27	0,42	0,40	0,15	0,14
dny	12	13	14	15	16	17

Tabulka 3E

Léčení	1 mg/kg činky					
průměrné	0,17	0,58	0,67	0,42	0,33	0,083
klinické	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,17	0,20	0,17	0,20	0,17	0,083
dny	12	13	14	15	16	17

Tabulka 3F

Léčení	3 mg/kg činky					
průměrné	0,25	0,42	0,83	0,42	0,08	0,08
klinické	±	±	±	±	±	±
hodnocení	0,17	0,20	0,25	0,32	0,08	0,08
dny	12	13	14	15	16	17

Legenda k tabulce: Hodnocení denní průměrné síly u krys imunizovaných se 30 µg MBP a léčených buď TNF inhibitor činkou každý další den se začátkem 9 dnů po imunizaci. Vehikulová skupina dostává PBS a skupina bez léčiva nedostává žádné injekce po EAE indukci.

Tabulka 4

Inhibiční účinky TNF inhibitor činky vyjádřené jako plocha pod křivkou

Léčení	bez léčiva	vehikulum	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg
klinická	8,07	7,83	7,88	4,3	1,63	1,53
obtížnost (plocha)	± 1,40	± 0,88	± 0,83	± 1,02	± 0,60	± 1,01

Legenda k tabulce: Inhibiční účinky c105 činky na klinickou sílu vyjádřené jako plocha pod křivkou (jednotky libovolné).

Průměr $\pm$ S.E.M. (n=6) byly stanoveny pro každou skupinu a statisticky porovnány proti vehikulové skupině (Mann-Whitney test). Nebyly pozorovány žádné podstatné rozdíly mezi vehikulem a kontrolní skupinou bez léčiva. c105 činka při 0,3, 1,0 a 3,0 mg/kg (podáno jak uvedeno výše) významně (**p<0,008, 0,001 a 0,002) redukuje klinické znaky.

Jak je uvedeno v tabulce 5, dávkování každý další den také redukuje trvání choroby měřeno počtem dnů během kterých byly pozorovány klinické znaky a průměr vypočtený pro danou skupinu krys.

Tabulka 5

Trvání choroby s dávkováním každý další den

MBO μ g	TNF inhibitor činka mg/kg				
	0	0,1	0,3	1	3
30	5,33 $\pm$ 0,21	5,50 $\pm$ 0,34	4,50 $\pm$ 0,92	2,83 $\pm$ 0,79*	2,16 $\pm$ 0,60**
10	4,33 $\pm$ 0,80	3,60 $\pm$ 0,80	4,00 $\pm$ 0,51	3,33 $\pm$ 0,49	1,83 $\pm$ 0,70*
3	2,50 $\pm$ 1,02	1,83 $\pm$ 0,83	2,00 $\pm$ 0,81	3,16 $\pm$ 0,74	0,83 $\pm$ 0,54.
1	1,83 $\pm$ 0,79	0,66 $\pm$ 0,66	1,66 $\pm$ 0,61	1,33 $\pm$ 0,49	0,66 $\pm$ 0,42.

*p<0,05 *p<0,01

Jediné dávkování Jediná dávka buď 0,3 nebo 3 mg/kg činky podaná devět dnů po imunizaci měla malý nebo žádný účinek na zeslabení MBP (1 až 30 μ g) indukované klinické znaky při porovnání s vehikulovými kontrolami.

Podání TNF inhibitorové činky každý třetí den Činka v množství 0,1 až 3 mg/kg nebo vehikulum byly podány ve dnech 9, 12, 15 a 18 po MBP-imunizaci. Jak je uvedeno v tabulce 6, významné zeslabení MBP (30 μ g) indukovaných klinických znaků bylo

pozorováno při c105 čímkových dávkách 0,3 ($p < 0,05$), 1,0 ($p < 0,01$) a 3 mg/kg ($p < 0,001$ Mann-Whitney t-test). 0,1 mg/kg dávka c105 čínky byla bez účinku ve srovnání s vehikulovou kontrolou.

MBP (10 μ g) indukované klinické znaky byly redukovány 0,3, 1,0 a 3,0 mg/kg c105 čímkových dávek. Nicméně významné ($p < 0,05$ a 0,03) účinky byly pozorovány pouze při vyšších c105 čímkových dávkách. I když c105 čínka (0,3 až 3 mg/kg) redukuje klinické znaky produkované 3 μ g MBP o přibližně 20 až 60 %, nebyly pozorované účinky významně odlišné od skupiny vehikulové kontroly.

Trvání choroby bylo obecně redukováno c105 čínkou. Například c105 čínka při 1 a 3 mg/kg významně redukuje trvání MBP (30 μ g) zprostředkovaných znaků na 37,3 % a 68,7 % (viz tabulka 10). Podobný trend byl také pozorován za použití meziproduktové MBP (10 μ g) dávky, ale ne při nejnižší MBP dávce (tabulka 7).

Nástupy choroby ve skupinách 10 a 30 μ g MBP byly významně ($p < 0,047$; $p < 0,013$; Mann Whitney U-test) zpomaleny u těch zvířat, která byla léčena se 3 mg/kg c105 čínky.

Ztráta hmotnosti spojená s EAE byla částečně inhibována c105 čínkou, zejména v dávkách 1 a 3 mg/kg. Redukce ztráty hmotnosti byla dávkově závislá. Tento účinek c105 čínky byl podobný nehledě na to, jaká byla použita dávka MBP.

Tabulka 6

Průměrná klinická síla vyjádřená jako plocha pro dávkování
každý třetí den

Léčení	vehikulum	0,1	0,3	1,0	3,0
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
průměrná	9,21	8,25	6,23	3,66	0,33
klinická	$\pm 0,64$	$\pm 0,92$	$\pm 1,37$	$\pm 0,61$	$\pm 0,17$
síla					
(plocha)					

Tabulka 7

Trvání choroby s dávkováním každý třetí den

	TNF inhibitor činka mg/kg				
MBP μ g	0	0,1	0,3	1	3
30	5,83 $\pm$ 0,44	4,83 $\pm$ 0,30	4,16 $\pm$ 0,70	3,66 $\pm$ 0,61*	1,83 $\pm$ 0,70**
10	4,66 $\pm$ 0,42	5,16 $\pm$ 0,40	4,00 $\pm$ 0,77	3,00 $\pm$ 0,96	2,50 $\pm$ 0,67*
3	4,00 $\pm$ 0,67	3,50 $\pm$ 0,62	3,00 $\pm$ 1,35	3,00 $\pm$ 1,35	3,33 $\pm$ 0,66

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Příklad 18

Patologie centrálního nervového systému (CNS)

Účinky léčení c105 činkou syntetizovanou za použití PEG-bis-vinylsulfonu byly stanoveny na patologii CNS indukované imunizací s MBP (0, 10 nebo 30 μ g). MBP imunizace (EAE indukce) byly provedeny jak je popsáno výše. c105 činka v množství 0,3, 3 mg/kg nebo vehikulum byly podávány každý další den počínaje devátým dnem po MBP. Zvířata byla usrcena (pomocí CO₂) 9.den, 14. nebo 20. po MBP-injekci. Mozek a mícha byly vyňaty z každé krysy a umístěny do 10% neutrálně

pufrovaného formalinu. Po fixaci po alespoň 72 hodin byly provedeny řezy mozku v úrovni optického chiasmu kaudálního k. připojení hypofýzy a transversních vláken mostu. Mícha byla rozřezána 4 až 6 příčnými řezy přes cervikální, thorakální a bederní část. Sakrální segment z připojených kaudálních nervů byl umístěn podélně. Tkáně byly zpracovány umístěním do parafinu a vybarvením s hematoxylinem a eosinem.

Histologická hodnocení byla provedena bez znalosti o jak léčenou skupinu jde. Každé sklíčko bylo označeno číselným hodnocením od 1 ao 4 pro označení intenzity zánětu a demyelinace. Hodnotící kritéria byla následující: 1 = minimálně 1 až 2 cévy měly malé perivaskulární manžety zánětlivých buněk, 2= slabé, 3 nebo více cév mělo malé perivaskulární manžety zánětlivých buněk s malými pokud vůbec nějakými prodlouženími zánětu do parenchymu, 3= mírné, 3 nebo více cév mělo prominentní perivaskulární manžety zánětlivých buněk s mírným prodloužením zánětu do okolního parenchymu a 4= významné, většina cév má prominentní perivaskulární manžety zánětlivých buněk s intenzivním rozšířeným zahrnutím neuropilu do zánětlivého procesu.

Celková zánětlivá hodnocení byla stanovena pro každé ze zvířat pro každou CNS oblast. Průměr $\pm$ SEM (standardní chyba průměru) hodnoty hodnocení byly vypočteny pro každou část CNS pro každý časový bod a porovnány se zvířaty ošetřenými vehikulem.

Průměrné zánětové hodnocení bylo stanoveno pro každou CNS oblast pro každou skupinu zvířat a porovnána statisticky proti vehikulové kontrolní skupině (student-t-test). Tato hodnocení jsou uvedena v tabulkách 8 a 9.

Nejsou zde významné histologické změny v CNS zvířat usmrcených 9.den po MBP injekci. Léze 14.den zahrnují minimální až významně smíšenou (mononukleární + některé neutrofilny) obecně perivaskulární zánětlivou buněčnou infiltraci. V mozku má zánět sklon být umístěn do meningů, periventrikulárních ploch a cerebelárních bílých traktů, s mozkovým kmenem a cerebelárními bílými trakty nejhůře postiženými. V těchto lokacích se zánět často rozšiřuje z perivaskulárních ploch do okolního parenchymu a byla zde zřejmé demyelinace. V míše byly nejhůře postiženy bederní a křížová část. Byly postiženy jak šedá tak bílá hmota, opět s převládajícími perivaskulárními lézemi. Zánět přetrvává do 20.dne, nicméně v této době jsou vzácně viditelné neutrofilny. Variabilita intenzity se objevuje u zvířat v každé skupině a většinou ve všech skupinách.

Tabulky 8 a 9 demonstrují přítomnost c15 činkou redukovaného stupně zánětu v různých regionech studovaného CNS. Nejdramatičtější a nejvýznamnější redukce v zánětech byla pozorována v míše, zejména v bederní a křížové oblasti. c105 činka má menší vliv na vyšší regiony CNS, cerebrum a cerebellum.

Tabulka 8

Zánětlivá hodnocení zvířat imunizovaných se 30 µg MBP a
léčených s TNF inhibitor činkou

Mozková oblast	3 mg/kg	0,3 mg/kg	vehikulum
cerebrum	1,00±0,378	0,714±0,360	0,714±0,474
cerebellum	2,57±0,429	2,714±0,360	3,280±0,286
mícha cervikální	1,71±0,360	1,428±0,298*	2,420±0,202
thorakální mícha	1,71±0,421	1,000±0,218*	2,280±0,421
bederní mícha	1,85±0,404	1,42±0,369	2,42±0,298
křížová mícha	1,28±0,360	1,42±0,298	2,714±0,522

*p<0,05 (Studentův t-test) histologie (30 µg MBP dávka)

Tabulka 9

Zánětlivá hodnocení zvířat imunizovaných se 10 µg MBP a
léčených s TNF inhibitor činkou

Mozková oblast	3 mg/kg	0,3 mg/kg	vehikulum
cerebrum	0,28±0,18	0,42 ±0,20	0,42 ±0,29
cerebellum	1,42±0,29	2,28 ±0,42	2,28 ±0,35
mícha cervikální	0,85±0,34	1,42 ±0,42	1,42 ±0,20
thorakální mícha	0,85±0,14	1,57 ±0,36	1,0 ±0,30
bederní mícha	0,71±0,28**	1,57±0,48	2,28 ±0,28
křížová mícha	0,57±0,20**	1,57±0,48	2,28 ±0,42

*p<0,01 histologie (10 µg MBP dávka)

Příklad 19

c105 TNFbp činka chrání proti endotoxinové letalitě

c105 činka syntetizovaná za použití PEG-bis-vinylsulfonu
chrání Balb/c myš proti letální dávce endotoxinu. Myš byla

injektována intraperitoneálně se 30 mg/kg endotoxinu a intravenózně s jediným podáním buď 0,1 ml PBS nebo 1 mg/kg činky v 0,1 ml PBS buď 1 hodinu nebo dvě hodiny po podání endotoxinu. Intravenózní podání 1 mg/kg činky 1 hodinu po injekci endotoxinu působí kompletní ochranu proti letalitě. Činkové podání dvě hodiny po podání neposkytlo žádnou ochranu proti letálnímu endotoxinovému poškození.

c105 činka také chrání Lewis krysy před letální dávkou endotoxinu. Krysy byly injektovány intravenózně se 12,5 mg/kg endotoxinu. Krysy byly injektovány současně s endotoxinem a buď salinickým roztokem nebo c105 činkou v dávkách buď 0,1, 0,5, 3,0 nebo 4,5 mg/kg. Srovnatelná ochrana proti letálnímu poškození byla dosažena pro všechny činkové dávky.

Ošetření jedinou dávkou činky 1,5 mg/kg c105 podané současně s 10 mg/kg dávkou endotoxinu chrání krysy proti hepatickým a metabolickým poruchám. Hepatické a metabolické parametry byly hodnoceny 24 hodin po podání endotoxinu jak je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10

Očinky léčení s c105 činkou (1,5 mg/kg) endotoxinem
indukovaných abnormalit v biochemických parametrech

Parametr	kontrola+ vehikulum	endotoxin+ vehikulum	endotoxin+ c105 činka
glukoza (mg/dl)	143±2	52±8	81±5*
SGPT ¹ (mu/ml)	47±6	679±118	141±25*
dusík močoviny v krvi (mg/dl)	19±1	88±2	39±3*
kortikosteron	146±62	750±49	489±43*

¹ serová glutamin hroznová transaminasa (Serum Glutamic
Piruvic Transaminae

Hodnoty jsou průměr ± standardní chyba pro 4 až 8 krysa
skupinu.

* Významný rozdíl od endotoxinem ošetřené skupiny při $p < 0,05$
(párovaný t test)

Je třeba chápat, že aplikace poznatků předloženého
vynálezu na specifický expresní systém nebo PEGylační činidlo
budou záležet na schopnostech odborníků v oboru pochopit zde
uvedené poznatky. Odborníkům v oboru bude také zřejmé, že je
možno provést různé modifikace variace způsobu a produktů
předloženého vynálezu. Tyto modifikace a variace jsou
považovány za pokryté předloženým vynálezem.

Č. j.	095662
DOŠLO	30. XII 96
URAD PRŮMYSL. SOUVĚHO VLASTNICTVÍ	PŘÍL.

P A T E N T O V Ě N Á R O K Y

1. Biologicky aktivní konjugát, zahrnující biologicky aktivní molekulu vybranou ze skupiny, zahrnující IL-1 inhibitor, inhibitor faktoru tumorové nekrozy (TNF), CR1, RDGF receptor, IL-2 a exon 6 peptid PDGF, kde biologicky aktivní molekula má reaktivní thiol skupinu a nepeptidický polymer, mající aktivní sulfonovou skupinu tvořící vazbu s uvedenou thiol skupinou.
2. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 1, kde uvedená aktivní sulfon skupina je vinylsulfon.
3. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 1, kde uvedená aktivní sulfon skupina je chlorethylsulfon.
4. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 1, kde uvedená biologicky aktivní molekula je TNF inhibitor vybraný ze skupiny zahrnující 30kDa TNF inhibitor, 40 kDa TNF inhibitor, delta TNF inhibitor a delta53 TNF inhibitor.
5. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 4, kde uvedený TNF inhibitor je 30kDa TNF inhibitor.
6. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 4, kde uvedený TNF inhibitor je 40kDa TNF inhibitor.
7. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 4, kde uvedený TNF inhibitor je delta51 TNF inhibitor.

8. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 4, kde uvedený TNF inhibitor je delta53 TNF inhibitor.
9. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 1, kde uvedenou biologicky aktivní molekulou je interleukin-1 (IL-1) inhibitor.
10. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 9, kde uvedený IL-1 inhibitor je interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra).
11. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 1, kde uvedený nepeptidický polymer má reaktivní NHS-ester navíc k uvedené aktivní sulfonové skupině.
12. Biologicky aktivní konjugát podle nároku 11, kde uvedená aktivní sulfonová skupina je vinylsulfon.
13. V podstatě čišťená sloučenina vzorce R^1-X-R^2 , kde X zahrnuje nepeptidický polymer, mající první reaktivní skupinu a druhou reaktivní skupinu, přičemž uvedená první reaktivní skupina je Michaelův akceptor;
 R_1 zahrnuje biologicky aktivní molekulu vybranou ze skupiny, zahrnující IL-1 inhibitor, inhibitor faktoru tumorové nekrozy (TNF), CR1, PDGF receptor, IL-2 a exon 6 peptidu PDGF, má reaktivní thiol skupinu, uvedená biologicky aktivní molekula je kovalentně navázána k uvedenému nepeptidickému polymeru reakcí uvedené thiol skupiny s Michael akceptorem a uvedená biologicky aktivní molekula si zachovává svoji biologickou aktivitu po uvedené reakci a
 R_2 obsahuje biologicky aktivní molekulu nebo nebiologicky aktivní skupinu navázanou k uvedenému nepeptidickému polymeru reakcí s uvedenou druhou reaktivní skupinou.

14. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13, kde uvedený Michael akceptor je vinylsulfon.

15. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13, kde uvedená druhá reaktivní skupina je NHS-ester.

16. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13 nebo 15, kde uvedený Michael akceptor je maleimid.

17. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13, kde uvedený nepeptidický polymer má dva Michael akceptory.

18. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 17, kde uvedené Michael akceptory jsou maleimid.

19. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 17, kde uvedené Michaelovy akceptory jsou vinylsulfon.

20. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 17, kde jeden z uvedených Michael akceptorů je vinylsulfon a druhý maleimid.

21. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13, kde uvedená biologicky aktivní molekula je TNF inhibitor.

22. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 21, kde uvedený TNFbp je 30kDa TNF inhibitor.

23. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 21, kde uvedený TNFbp je 40kDa TNF inhibitor.

24. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 21, kde uvedený TNFbp je delta51 TNF inhibitor.

25. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 21, kde uvedený TNFbp je delta53 TNF inhibitor.

26. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 13, kde uvedenou biologicky aktivní molekulou je IL-1 inhibitor.

27. V podstatě čištěná sloučenina podle nároku 26, kde uvedeným IL-1 inhibitorem je IL-1ra.

28. Ve vodě rozpustný polymer, mající NHS-ester a maleimid.

29. Ve vodě rozpustný polymer podle nároku 28, kde uvedený polymer je vybrán ze skupiny, zahrnující polyalkylenoxidy, polyoxyethylované polyoly a polyolefinické alkoholy.

30. Farmaceutická kompozice, obsahující sloučeninu podle nároku 1 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.

31. Farmaceutická kompozice, obsahující sloučeninu podle nároku 13 ve farmaceuticky přijatelném nosiči.