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

(10) **DE 699 25 830 T2** 2006.05.04

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 075 282 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 25 830.8**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/09160**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 921 497.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/055376**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1999**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **04.11.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.02.2001**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.06.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.05.2006**

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

(30) Unionspriorität:
83340 P **28.04.1998** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Applied Research Systems ARS Holding N.V., Curacao, AN

(72) Erfinder:
EL TAYAR, Nabil, Milton, US; ZHAO, Xuan, Huntsville, US; BENTLEY, D., Michael, Huntsville, US

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

(54) Bezeichnung: **PEG-LHRH ANALOG KONJUGATE**

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

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

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf PEG-LHRH-Analogon-Konjugate, in denen eine PEG-Einheit direkt oder über ein bifunktionelles Linkermolekül, z.B. eine Aminosäure, an Ser^4 gebunden ist. Das Verfahren zu ihrer Herstellung sowie ihre Verwendung in der Therapie, Prognose oder Diagnose der Krankheiten, in denen eine Verabreichung von LHRH-Analoga ratsam ist, sind außerdem Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Eine kovalente Anknüpfung des hydrophilen Polymers Polyethylenglykol, (PEG), auch bekannt als Polyethylen (PEO), an Moleküle hat in der Biotechnologie und der Medizin wichtige Anwendungen. In seiner gängigsten Form ist PEG ein lineares Polymer, das an jedem Ende eine Hydroxylgruppe hat:

$HO\text{-}CH_2\text{-}CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2\text{-}OH$

[0003] Diese Formel kann abgekürzt als HO-PEG-OH dargestellt werden, wobei -PEG- die Polymergrundkette ohne die terminalen Gruppen bedeutet:

"-PEG-" bedeutet "$\text{-}CH_2CH_2O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2\text{-}$"

[0004] PEG wird üblicherweise als Methoxy-PEG-OH, (M-PEG) verwendet, in dem ein Ende die relativ inerte Methoxygruppe ist, während das andere Ende eine Hydroxylgruppe ist, die Gegenstand chemischer Modifizierung ist.

$CH_3O\text{-}(CH_2CH_2O)_n\text{-}CH_2CH_2\text{-}OH$

[0005] Auch verzweigte PEGs sind in gängiger Verwendung. Die verzweigten PEGs können als $R(\text{-PEG-OH})_m$ dargestellt werden, worin R eine zentrale Kerngruppierung, z.B. Pentaerythrit oder Glycerin, darstellt, und m die Anzahl der Verzweigungsarme darstellt. Die Anzahl der Verzweigungsarme (m) kann von drei bis einhundert oder mehr reichen. Die Hydroxylgruppen sind Gegenstand einer chemischen Modifikation.

[0006] Eine andere verzweigte Form, z.B. die, die in der PCT-Patentanmeldung WO 96/21469 beschrieben wird, hat ein einzelnes Ende, das Gegenstand einer chemischen Modifikation ist. Dieser PEG-Typ kann als $(CH_3O\text{-PEG-})_pR\text{-}X$ dargestellt werden, worin p gleich 2 oder 3 ist, R einen Zentralkern, wie z.B. Lysin oder Glycerin, darstellt und X eine funktionelle Gruppe, wie z.B. Carboxyl, darstellt, die Gegenstand einer chemischen Aktivierung ist. Noch eine andere verzweigte Form, das "pendant PEG", hat reaktive Gruppen, z.B. Carboxyl, eher entlang der PEG-Hauptkette als am Ende der PEG-Ketten.

[0007] Zusätzlich zu diesen Formen von PEG kann das Polymer auch mit schwachen oder abbaubaren Verknüpfungen in der Hauptkette hergestellt sein. Beispielsweise hat Harris in der US-Patentanmeldung 06/026716 gezeigt, dass PEG mit Esterverknüpfungen in der Polymerhauptkette hergestellt werden kann, welche Gegenstand einer Hydrolyse sind. Diese Hydrolyse führt zur Spaltung des Polymers in Fragmente mit niedrigerem Molekulargewicht, und zwar gemäß dem obigen Reaktionsschema:

$\text{-PEG-}CO_2\text{-PEG-} + H_2O \rightarrow \text{-PEG-}CO_2H + HO\text{-PEG-}$

[0008] Der Ausdruck Polyethylenglykol oder PEG, wie er hier verwendet wird, soll alle oben beschriebenen Derivate einschließen.

[0009] Die Copolymere von Ethylenoxid und Propylenoxid sind in ihrer Chemie eng mit PEG verwandt, und sie können in vielen dieser Anwendungen anstelle von PEG verwendet werden. Sie haben die folgende allgemeine Formel:

$HO\text{-}CH_2CHRO(CH_2CHRO)_nCH_2CHR\text{-}OH$

worin R H oder CH_3 ist.

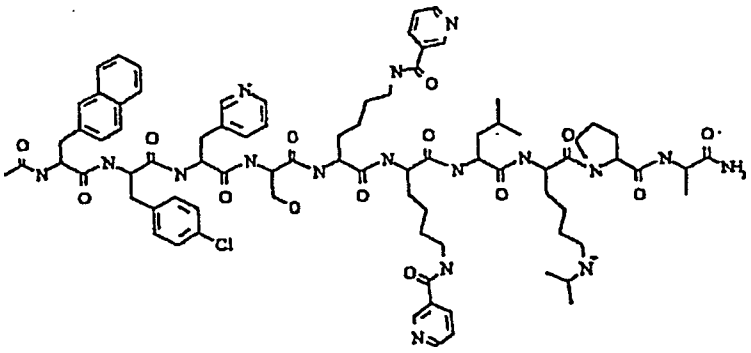
[0010] PEG ist ein nützliches Polymer, das die Eigenschaften hoher Wasserlöslichkeit und auch hoher Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln hat. PEG ist auch nicht-toxisch und nicht-immunogen. Wenn PEG chemisch an eine wasserunlösliche Verbindung angeheftet wird (PEGylierung), so ist das resultierende Konjugat im Allgemeinen wasserlöslich, wie auch in vielen organischen Lösungsmitteln löslich.

[0011] Luteinizing-Hormone-Releasing-Hormone (LHRH oder GnRH = Luteinisierungshormon-freisetzendes Hormon) ist ein Decapeptid, das durch den Hypothalamus sezerniert wird und fähig ist, die Freisetzung sowohl von LH als auch von FSH zu induzieren. Es hat die folgende Formel: pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2.

[0012] LHRH kann entweder die Hypophysengonadotropin-Sekretion stimulieren oder ein wirksamer Inhibitor sein. Wenn es in einem genauen pulsatilen Muster verabreicht wird, kann LHRH die normale zyklische Gonadotropin-Sekretion wiederherstellen. Eine pulsatile Verabreichung von LHRH unter Verwendung einer computergesteuerten Pumpe wurde bei der Induzierung einer Ovulation bei anovulatorischen Frauen mit hypothalamischer Dysfunktion mit guten Resultaten eingesetzt. Bei chronischer Verabreichung erwies sich LHRH oder sein Agonist als potenter Inhibitor der gonadotropischen Sekretion, wobei eine temporäre (vollständig reversible) Gonadotropin-spezifische medizinische Hypophysektomie bereitgestellt wurde.

[0013] Bis jetzt wurden Tausende von LHRH-Analoga synthetisiert, die entweder als Agonisten oder Antagonisten wirken können. Um LHRH-Antagonisten zu produzieren, die durch Rezeptorbesetzung wirken, ist es notwendig, mehrere Aminosäuren am LHRH-Molekül zu ersetzen. Antagonisten erfordern auch genaue topologische Merkmale, um eine hohe Bindungsaffinität an den Rezeptor zu erreichen. Es gibt viele in jüngerer Zeit synthetisierte LHRH-Analoga, in denen die Aminosäuren aromatische oder andere funktionelle Gruppen enthalten, welche zu der sogenannten hydrotropen Wechselwirkung fähig sind. Die Verwendung von LHRH-Antagonisten mit ihrer unverzüglichen Inhibierung der Gonadotrophin-Freisetzung kann auf therapeutischen Gebieten, wie z.B. Kontrazeption und bei der Behandlung hormonabhängiger Störungen, nützlich sein. In Fall von hormonabhängigen Tumoren kann eine Vermeidung der anfänglichen stimulatorischen Phase, die durch LHRH-Agonisten produziert wird, ein besonderer Vorteil sein. Für eine Übersicht über LHRH-Analoga siehe Karten und Rivier, 1986.

[0014] Insbesondere Antid ist ein wirksamer LHRH-Antagonist mit der Formel, der biologischen Aktivität und der Herstellung, wie sie im EP-Patent 377 665 beschrieben und nachfolgend angegeben sind.



ANTID

[Acetyl-D-3-(2'-naphthyl))alanin)[1], D-(4-chlorphenyl)alanin[2], D-3-(3'-pyridyl)alanin[3], lysin(NE-nicotinoyl)[5], D-lysin(NE-nicotinoyl)[6], lysin(NE-isopropyl)[6], D-alanin[10]]-Gonadotropinfreisetzendes Hormon (GnRH)'

[0015] Aus Studien, die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung durchgeführt wurde, wurde z.B. festgestellt, dass Antid eine sehr schlechte Löslichkeit in 0,9% NaCl-Lösung (Löslichkeit 25 µg/ml) oder anderen isotonischen Medien, z.B. Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (die Löslichkeit war 60 µg/ml), hat. Frühere Antid-Formulierungen (z.B. Antid 1 mg/ml in 5% Glucose) haben schlechte Bioverfügbarkeit und schlechte pharmakokinetische Reproduzierbarkeit gezeigt.

[0016] Eine koωalente Anbindung von PEG an Peptide ist ein möglicherweise nützlicher Ansatz zur Abgabe von wasserunlöslichen Peptid-Arzneimitteln, wie es von Felix gezeigt wurde (A. M. Felix in J. M. Harris und S. Zalipsky, Hrsg., Poly(ethylenglykol) Chemistry and Biological Applications, A. C. S Symposium Series 680, S. 218–238, A. C. S. Washington, DC, 1997).

[0017] Die JP-Patentanmeldung JP 3148298 beschreibt Peptide (z.B. einschließlich GnRH)-PEG-Konjugate, die durch Umsetzung der Guanidinogruppe, die z.B. im Argininrest vorhanden ist, mit PEG, während die in den Molekülen vorliegenden Aminogruppen geschützt sind, erhalten werden.

[0018] Die internationale Patentanmeldung WO 94/27641 offenbart die orale Abgabe von Peptid- und Protein-Pharmazeutika unter Verwendung des Vitamin B_{12} (VB_{12})-Aufnahmesystems, wobei die Abgabe unter Verwendung von Polymeren amplifiziert wird. Genauer ausgedrückt, sie betrifft einen Komplex mit der allgemeinen Formel: $(V\text{-}Q_n\text{-}(Q'\text{-}A)_m$, worin V ein Träger ist, der an natürlichen intrinsischen Faktor (IF), ausgewählt aus Vitamin B_{12} oder einem Analogon davon, binden wird, n das molare Substitutionsverhältnis von V im Komplex ist und eine Zahl von 1,0 bis etwa 10 ist, P ein pharmazeutisch akzeptables Polymer ist, A eine pharmazeutisch aktive Substanz ist, m das molare Substitutionsverhältnis von A im Komplex ist und eine Zahl größer als 1,0 bis etwa 1000 ist, Q und Q' unabhängig voneinander eine kovalente Bindung oder eine Spacerverbindung sind, die V, P und A durch kovalente Bindungen bindet, sind.

[0019] Die JP-Patentanmeldung JP 890285927 beschreibt modifizierte Peptide, die durch Modifizieren einer Guanidinogruppe eines Peptids, ausgewählt aus mit Calcitonin-Gen in Verbindung stehendem Peptid, Elastase, atrialem Diuresepeptid, Gonadotropin-freisetzendem Hormon, alpha-Melanotropin, Parathinoidhormon, IGF-II, Uricase und Derivaten davon, die eine bestimmte Formel (I) haben, erhalten werden. Außerdem werden Verfahren zur Herstellung der modifizierten Peptide und ihre Verwendung als pharmazeutische Mittel beschrieben, die dahingehend vorteilhaft sind, dass sie für Menschen eine verringerte Antigenizität und eine verlängerte Wirkung im Vergleich zu den ursprünglichen Peptiden haben.

[0020] Die internationale Patentanmeldung WO 94/04193 offenbart Zusammensetzungen auf Polyalkylenoxid (PAO)-Basis, die Isocyanat- und/oder Isothiocyanatgruppen für eine kovalente Anbindung an biologisch wirksame Substanzen, wie Peptide oder Chemotherapeutika, enthalten. Die Zusammensetzungen reagieren leicht mit den biowirksamen Substanzen, und zwar unter Bereitstellung von Zusammensetzungen mit verlängertem Verbleiben im Blutkreislauf von Säugern, wesentlich reduzierter Immunogenizität und erhöhter Wasserlöslichkeit. Es werden auch Verfahren zur Herstellung solcher Zusammensetzungen auf der Basis von PAO offenbart.

[0021] Samuel Zalipsky (in: Bioconjugate Chem. 1995, 6. 150–165) beschreibt eine Übersicht über funktionalisiertes Poly(ethylenglykol) zur Herstellung von biologisch relevanter Konjugate. Die Übersicht konzentriert sich auf funktionalisierte Derivate von PEG, ihre Synthese und ihre Verwendung. Spezifisch beschrieben sind PEG-Funktionalisierungsverfahren, wobei ihrer Relevanz für verschiedene Biokonjugatanwendungen besondere Aufmerksamkeit geschenkt wird.

[0022] Die Zitierung eines beliebigen Dokuments hier soll kein Einverständnis bedeuten, dass ein solches Dokument relevanter Stand der Technik ist oder als Material bezüglich der Patentierbarkeit eines Anspruchs der vorliegenden Erfindung angesehen wird. Eine beliebige Angabe über den Inhalt oder ein Datum eines beliebigen Dokuments basiert auf den Informationen, die den Anmeldern zur Zeit der Einreichung verfügbar sind, und stellt keine Erklärung für die Korrektheit einer derartigen Angabe dar.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0023] Die vorliegende Erfindung stellt neue PEG-LHRH-Analogon-Konjugate bereit, in denen eine PEG-Einheit entweder direkt oder über ein bifunktionelles Linkermolekül, z.B. eine Aminosäure, kovalent an Ser^4 gebunden ist. PEG oder PEG-Linkermolekül ist spezifisch an die Alkoholfunktion des Serinrestes gebunden. Die Verknüpfung zwischen dem LHRH-Analogon und dem Polyethylenglykol oder dem PEG-Linkermolekül in diesen Konjugaten ist Gegenstand einer Hydrolyse bei physiologischem pH (7,2–7,4) und ist vorzugsweise auch Gegenstand der Hydrolyse durch Esterasen, die im Blut vorliegen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0024] Fig. 1 ist ein Reaktionsschema zur Herstellung eines PEG-Antid-Konjugats mit einem Glycin-Linker, der zwischen den PEG- und den Antid-Gruppierungen insertiert ist.

[0025] Fig. 2 zeigt die Kapillarelektrophorese(CE)-Diagramme der Hydrolyse des PEG-Antid-Konjugats bei 37°C in Phosphatpuffer, pH 7,2, bei t = 0, 460 und 1395 Minuten.

[0026] Fig. 3 zeigt das Diagramm der Hydrolysekinetik, abgeleitet von den Daten der Fig. 2, unter der Annah-

me einer Kinetik-Pseudo-erster Ordnung.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0027] Die erfindungsgemäßen Konjugate zeigen vorzugsweise eine Löslichkeit in Wasser von wenigstens 30 mg/ml bei Raumtemperatur und physiologischem pH (7,2–7,4) und eine Löslichkeit in physiologischer Salzlösung von wenigstens 10 mg/ml bei denselben Bedingungen.

[0028] Wenn das LHRH-Analogon z.B. Antid ist, ermöglichen solche Eigenschaften die Verwendung von Antid als Arzneimittel, wohingegen früher die Entwicklung von Antid als Arzneimittel infolge seiner schlechten Wasserlöslichkeit schwierig gemacht wurde.

[0029] Der Ausdruck "LHRH-Analoga", wie er hier verwendet wird, soll ein beliebiges Decapeptid einschließen, das ein LHRH-Agonist oder -Antagonist ist. Vorzugsweise ist das LHRH-Analogon ein LHRH-Antagonist; bevorzugter ist es Antid.

[0030] Die erfindungsgemäßen Konjugate können durch ein beliebiges der Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, hergestellt werden. Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird das LHRH-Analogon mit einem PEGylierungsmittel in einem geeigneten Lösungsmittel umgesetzt, und das gewünschte Konjugat wird isoliert und gereinigt, z.B. durch Anwendung eines chromatographischen Verfahrens oder mehrerer chromatographischer Verfahren.

[0031] "Chromatographische Verfahren" bezeichnet eine beliebige Technik, die verwendet wird, um die Komponenten eines Gemisches durch Aufbringung auf einen Träger (stationäre Phase), durch welchen ein Lösungsmittel (mobile Phase) strömt, zu trennen. Die Trennprinzipien der Chromatographie basieren auf der unterschiedlichen physikalischen Natur der stationären Phase und der mobilen Phase.

[0032] Einige besondere Typen chromatographischer Verfahren, die in der Literatur gut bekannt sind, umfassen: Flüssigkeits-, Hochdruckflüssigkeits-, Ionenaustausch-, Absorptions-, Affinitäts-, Verteilungs-, hydrophobe, Reversed-phase-, Gelfiltrations-, Ultrafiltrations- oder Dünnschicht-Chromatographie.

[0033] Das "PEGylierungsmittel", wie es in der vorliegenden Anmeldung verwendet wird, bezeichnet ein beliebiges PEG-Derivat, das fähig ist, mit dem OH eines Serinrests oder einer funktionellen Gruppe eines bifunktionellen Linkermoleküls, z.B. der Aminogruppe eines Aminosäure-Linkermoleküls, zu reagieren. Die andere funktionelle Gruppe des Linkermoleküls dient zur Bildung einer kovalenten Verknüpfung mit dem Serinrest eines LHRH-Analogons, d.h., die Carboxylgruppe eines Aminosäure-Linkermoleküls bildet eine Esterverknüpfung mit Serin. Es kann ein Alkylierungsreagenz sein, z.B. PEG-Aldehyd, PEG-Epoxid oder PEG-Tresylat, oder es kann ein Acylierungsreagenz sein, wie z.B. PEG-O-$(CH_2)_nCO_2$-Z, worin n = 1–3 und Z N-Succinimidyl oder eine andere Aktivierungsgruppe ist.

[0034] Das PEGylierungsmittel wird in seiner monomethoxylierten Form verwendet, in der nur ein Terminus zur Konjugation verfügbar ist, oder es wird in einer bifunktionellen Form verwendet, in der beide Termini zur Konjugation verfügbar sind, z.B. bei der Bildung eines Konjugats mit zwei LHRH-Analoga, die kovalent an eine einzelne PEG-Gruppierung gebunden sind. Es hat ein Molekulargewicht zwischen 500 und 100.000, vorzugsweise zwischen etwa 5.000 und 40.000 (40 kDa), und bevorzugter zwischen etwa 10 kDa und 40 kDa, und am vorteilhaftesten zwischen etwa 20 kDa und 40 kDa.

[0035] Wenn das PEGylierungsmittel ein Acylierungsmittel ist, kann es entweder einen Norleucin- oder Ornithin-Rest über eine Amidverknüpfung an die PEG-Einheit gebunden enthalten. Diese Reste ermöglichen eine präzise Bestimmung der verknüpften PEG-Einheiten pro Mol Peptid (siehe z.B. Sartore et al., 1991).

[0036] Ein Lösungsmittel für die PEGylierungsreaktion ist vorzugsweise ein polares aprotisches Lösungsmittel, z.B. DMF, DMSO, Pyridin, usw.

[0037] Wenn das LHRH-Analogon mit dem PEGylierungsmittel umgesetzt wird, kann eine Derivatisierung am OH der Ser^4-Gruppierung, wie auch am Aminstickstoff anderer Reste, wie z.B. an der ε-Aminogruppe von Lysin (im Fall von Antid am N-Isopropyl-Lys^8), erfolgen. In solchen Reaktionen kann eine hohe Selektivität für eine Amin-PEGylierung auftreten. Produkte, die durch PEGylierung an Aminen gebildet werden, sind Amide, und obgleich PEG-Amide wasserlöslich sein können, kann die Amidverknüpfung unter physiologischen Bedingungen stabil sein, und somit könnte das LHRH-Analogon in vivo im Wesentlichen hydrolytisch nicht freigesetzt

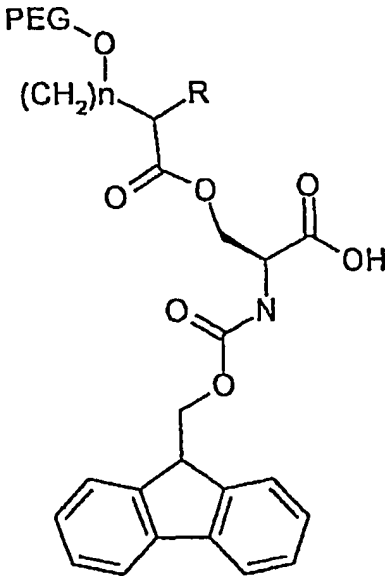
werden. Unter Verwendung dieses Verfahrens sollte daher der PEG-LHRH-Analogon-Ester unter Verwendung von Chromatographie von dem PEG-LHRH-Analogon abgetrennt werden. Eine Begrenzung dieses Verfahrens ist daher eine geringe Ausbeute des gewünschten PEG-LHRH-Analogon-Konjugats.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das LHRH-Analogon daher an den Amingruppen geschützt, die mit dem PEGylierungsmittel oder einem bifunktionellen Linkermolekül vor einer PEGylierung reagieren könnten.

[0039] Im Fall von Antid ist es daher vorteilhaft, den N-Isopropyl-Lys^8-Rest reversibel mit einer Gruppe zu schützen, die unter Verwendung photochemischer, milder hydrolytischer oder Hydrierungsverfahren entfernt werden kann. Mit dem so geschützten Stickstoff wird die Hydroxylgruppe am Serinrest mit einem PEGylierungsreagenz unter Bildung eines PEG-Esters umgesetzt, und die Schutzgruppe am N-Isopropyl-Lys^8 wird dann entfernt, um selektiv am Hydroxyl des Serinrestes über eine Esterbindung PEGyliertes Antid zu erhalten. Die Bedingungen zur Entfernung der Aminschutzgruppe müssen ausreichend mild sein, um eine Spaltung der PEG-Antid-Ester-Verknüpfung zu vermeiden. In einer anderen Ausführungsform, in der ein bifunktionelles Linker- oder Spacermolekül verwendet wird, um eine PEG-Gruppierung an ein LHRH-Analogon, wie z.B. Antid, zu binden, wird die Schutzgruppe, vorzugsweise nachdem ein bifunktionelles Linkermolekül kovalent an den Serinrest eines LHRH-Analogons gebunden wurde, entfernt oder kann nach PEGylierung des bifunktionellen Linkermoleküls, das kovalent an das LHRH-Analogon gebunden ist, entfernt werden.

[0040] Bevorzugte Reagentien zum Schützen umfassen Benzyloxycarbonylchlorid oder Ringsubstituierte Derivate dieser Verbindung, N-Hydroxysuccinimidyl- oder 1-Benzotriazolylester von Benzyloxykohlensäure oder Ring-substituierte Derivate von t-Butoxycarbonylchlorid oder die N-Hydroxysuccinimidyl- oder 1-Benzotriazolylester von t-Butoxykohlensäure.

[0041] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung können die Konjugate der Erfindung hergestellt werden, indem ein geeignetes PEGyliertes Serin, wie z.B. Fmoc-Ser(PEG)-OH oder tBoc-Ser(PEG)-OH, anstelle von Serin während der Festphasensynthese der LHRH-Analoga verwendet wird. Ein Beispiel eines Fmoc-Ser(PEG)-OH-Derivats wird unten gezeigt.



Fmoc-Ser(PEG)-OH

[0042] Eine Regulierung der in vivo-Freisetzungsgeschwindigkeit des LHRH-Analogon kann erreicht werden, indem n und R in der PEG-Verknüpfung verändert werden. Allgemein gilt, wenn n ansteigt, nimmt die Freisetzungsrate des LHRH-Analogons ab, und wenn R Alkyl ist, ist die Freisetzungsrate des LHRH-Analogon niedriger als die Freisetzungsrate, wenn R für H steht. Allgemein gilt, wenn die Größe von R zunimmt, nimmt die Freisetzungsgeschwindigkeit des LHRH-Analogon oder von Antid im Besonderen ab. Eine Variation von n und R stellt somit eine im Wesentlichen genaue Kontrolle der in vivo-Abgabegeschwindigkeit von Antid dar, wenn dieses als Arzneimittel verwendet wird.

[0043] Nach jüngeren Studien, z.B. US-Patent Nr. 5 840 900, scheinen PEG mit höherem Molekulargewicht

in bestimmten Fällen zur Erreichung einer therapeutischen Wirksamkeit wichtig zu sein. Für Antid wurden drei PEG-Antid-Konjugate mit PEGylierungsmitteln, die Molekulargewichte von 20 kDa oder 40 kDa haben, hergestellt, indem das Schützungs-Entschützungs-Verfahren modifiziert wurde. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die PEGylierungsgeschwindigkeit von Antid, insbesondere mit PEG-Gruppierungen mit höherem Molekulargewicht, erhöht, indem zuerst ein Linkermolekül, z.B. Glycin, an das Antid gebunden wird und dann das kovalent an das Antid gebundene Linkermolekül PEGyliert wird. Das Reaktionsschema zur Herstellung eines PEGylierten Antids mit einem Glycin-Linker ist in Fig. 1 dargestellt. Das Schema in Fig. 1 kann z.B. zur Herstellung von Konjugaten, wie PEG2-Glycin-Antid 20 k (es kann ein verzweigtes 20 kDa-PEG verwendet werden), mPEG-Glycin-Antid (es kann ein lineares 20 kDa-mPEG verwendet werden) und PEG2-Glycin-Antid 40 k (es kann ein verzweigtes 40 kDa-PEG verwendet werden), eingesetzt werden. Der Fachmann wird erkennen, dass das in Fig. 1 gezeigte Schema nicht auf Antid oder Glycin-Linker beschränkt ist, sondern auch auf andere LHRH-Analoga und Linkermoleküle angewendet werden kann.

[0044] Das Linkermolekül ist vorzugsweise ein kleines bifunktionelles Molekül, das schnell mit der OH-Gruppe an einem Serinrest eines LHRH-Analogon reagieren kann. Dieses Linkermolekül ist vorzugsweise ein heterobifiunktionelles Linkermolekül, z.B. eine Aminosäure, das mit einem Serinrest eines LHRH-Analogons einen Ester bildet. Die zweite funktionelle Gruppe des Linkermoleküls dient als Stelle zur PEGylierung durch das PEGylierungsmittel. Die Aminosäure, Glycin, ist ein bevorzugtes heterobifunktionelles Linkermolekül gemäß der vorliegenden Erfindung. Andere geeignete Linkermoleküle können vom Fachmann leicht gefunden oder bestimmt werden.

[0045] Eine andere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung der Konjugate in im Wesentlichen gereinigter Form, um sie für eine Verwendung in pharmazeutischen Zusammensetzungen als aktives Ingrediens für die Behandlung, Diagnose oder Prognose von Pathologien, bei denen eine Verabreichung von LHRH-Analoga angezeigt ist, geeignet zu präsentieren. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen stellen einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

[0046] Wenn das LHRH-Analogon Antid ist, umfassen die oben genannten Pathologien Endometriose, Uterusleiomyome, hormonabhängigen Krebs (Prostata, Brust), Uterusmyome, LH-Schwall bei Frauen, die eine in vitro-Befruchtung durchmachen, und all die anderen pathologischen Zustände, die in EP 377 665 beschrieben sind.

[0047] Weitere Ausführungsformen und Vorzüge der Erfindung werden in der folgenden Beschreibung offensichtlich.

[0048] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung zur Herstellung eines Medikaments für die Verabreichung einer pharmakologisch aktiven Menge der Konjugate der Erfindung an Personen mit einem Risiko, eine der oben angegebenen Krankheiten zu entwickeln, oder an Personen, die bereits solche Pathologien zeigen.

[0049] Es kann ein beliebiger Verabreichungsweg, der mit dem aktiven Prinzip kompatibel ist, verwendet werden. Der bevorzugte ist eine parenterale Verabreichung, z.B. subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion. Die zu verabreichende Dosis des aktiven Ingrediens hängt von der Basis der medizinischen Verschreibungen entsprechend dem Alter, dem Gewicht und der individuellen Reaktion des Patienten ab.

[0050] Die tägliche nicht-gewogene Dosierung für den Patienten kann zwischen 0,2 und 20 mg liegen, und die vorteilhafte Dosis liegt zwischen 0,2 und 10 mg.

[0051] Die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung kann in einer injizierbaren Form hergestellt werden, die das aktive Prinzip und ein geeignetes Vehikel umfasst. Vehikel für die parenterale Verabreichung sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und umfassen z.B. Wasser, Kochsalzlösung, Ringer-Lösung und/oder Dextrose.

[0052] Das Vehikel kann kleine Mengen an Exzipienzien enthalten, um die Stabilität und Isotonizität der pharmazeutischen Präparation aufrecht zu erhalten.

[0053] Die Herstellung der genannten Lösungen kann nach üblichen Modalitäten erfolgen.

BEISPIEL 1:

Herstellung von PEG-Antid-Konjugat

[0054] Antid (10 mg, 6,3 mmol) wurde in 15 ml wasserfreiem Pyridin aufgelöst, und die resultierende Lösung wurde unter Vakuum bei 45°C azeotrop destilliert, bis etwa 8 ml Pyridin zurückblieben. Nach Kühlen der Lösung auf Raumtemperatur wurde der Succinimidylester von carboxymethyliertem mPEG (93 mg, 19 mmol, Shearwater Polymers, Huntswille, AL) zugegeben, und die Lösung wurde für 48 Stunden unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Das Pyridin wurde dann unter Vakuum entfernt, und Produkte wurden durch Vakuumfiltration nach Präzipitation in Ether (50 ml) gesammelt und im Vakuum getrocknet.

[0055] Das aus dem vorherigen Schritt erhaltene Produkt (50 mg) wurde in entionisiertem Wasser (1,5 ml) aufgelöst, und das Gemisch wurde durch ein 0,2 ml-Spritzenfilter filtriert. Die Lösung wurde auf eine Ionenaustauscher-Chromatogaphiesäule (CM Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgebracht. Elutionsmittel waren entionisiertes Wasser und 50 mM NaCl-Lösung mit einem Gradienten von null bis 60% Salzlösung. Es wurden drei Peaks beobachtet, wobei der mittlere Peak das gewünschte PEG-Antid-Konjugat ist, in dem die PEG-Kette an Ser^4 gebunden ist.

[0056] Dieses Konjugat wurde durch Fraktionierung gesammelt und gefriergetrocknet. Das Produkt erwies sich als in hohem Maße wasserlöslich (> 30 mg/ml).

Hydrolysekinetik des PEG-Antid-Konjugats

[0057] Die Hydrolyse des Konjugats wurde unter Verwendung von Kapillarelektrophorese (CE) bestimmt. Die errechnete Halbwertszeit ist unter diesen Bedingungen 5,5 Stunden, wie es in den **Fig. 2** und **Fig. 3** dargestellt ist.

[0058] Obgleich die vorliegende Erfindung nun vollständig beschrieben wurde, wird es klar sein, dass der Fachmann dieselbe innerhalb eines weiten Bereichs äquivalenter Parameter, Konzentrationen und Bedingungen ohne übermäßiges Experimentieren durchführen kann, ohne den Geist und Rahmen der Erfindung zu verlassen.

[0059] Obgleich die vorliegende Erfindung in Verbindung mit spezifischen Ausführungsformen derselben beschrieben wurde, wird es klar sein, dass sie für weitere Modifikationen geeignet ist. Die vorliegende Erfindung soll jegliche Variationen, Verwendungen oder Anpassungen der Erfindungen abdecken, die den Prinzipien der vorliegenden Erfindung folgen, und solche Abweichungen von der vorliegenden Offenbarung abdecken, wie sie innerhalb der bekannten oder gängigen Praxis auf dem Fachgebiet, zu dem die Erfindung gehört, bekannt sind, und wie sie auf die essentiellen Merkmale, die vorstehend ausgeführt sind und wie folgt im Rahmen der beigefügten Ansprüche liegen, angewendet werden kann.

Patentansprüche

1. Polyethylenglykol-Luteinizing-Hormone-Releasing-Hormone-(LHRH)-Analogon-Konjugat, das eine Polyethylenglykol(PEG)-Gruppierung kovalent an einen Serinrest von LHRH-Analogon gebunden hat, wobei das Konjugat zur Hydrolyse unter Freisetzung des LHRH-Analogon fähig ist.

2. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 1, wobei die PEG-Gruppierung über ein bifunktionelles Linkermolekül kovalent an den Serinrest des LHRH-Analogon gebunden ist.

3. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 2, wobei das bifunktionelle Linkermolekül ein heterobifunktionelles Linkermolekül ist.

4. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 3, wobei das bifunktionelle Linkermolekül mit dem Serinrest des LHRH-Analogons einen Ester bildet.

5. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 3, wobei das heterobifunktionelle Linkermolekül eine Aminosäure ist.

6. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 5, wobei das heterobifunktionelle Linkermolekül Glycin ist.

7. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach einem der Ansprüche 1–6, wobei das LHRH-Analogon ein LHRH-Agonist ist.

8. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach einem der Ansprüche 1–6, wobei das LHRH-Analogon ein LHRH-Antagonist ist.

9. PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach Anspruch 8, wobei der LHRH-Antagonist Antid ist.

10. Verfahren zur Herstellung des PEG-LHRH-Analogon-Konjugats nach Anspruch 2, umfassend die Schritte:
– Schützen eines LHRH-Analogons mit einem schützenden Agens, um unerwünschte Reaktionen an anderen Resten als Serin zu verhindern;
– Umsetzen des geschützten LHRH-Analogons mit einem bifunktionellen Linkermolekül, um das bifunktionelle Linkermolekül kovalent an einem Serinrest des geschützten LHRH-Analogons zu befestigen;
– Entschützen des geschützten LHRH-Analogons;
– Umsetzen des entschützten LHRH-Analogons mit einem PEGylierungsreagenz, um eine PEG-Gruppierung über das bifunktionelle Linkermolekül, das kovalent an den Serinrest des LHRH-Analogons gebunden ist, an die LHRH-Gruppierung zu befestigen, und
– Isolieren des produzierten PEG-LHRH-Analogon-Konjugats.

11. Verfahren zur Herstellung des PEG-LHRH-Analogon-Konjugats nach Anspruch 1, umfassend die Schritte:
– Umsetzen eines LHRH-Analogons mit einem PEGylierungsmittel, um eine PEG-Gruppierung kovalent an einen Serinrest des LHRH-Analogons zu binden, um dadurch ein PEG-LHRH-Analogon-Konjugat zu produzieren, und
– Isolieren des produzierten PEG-LHRH-Analogon-Konjugats.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das PEGylierungsmittel Succinimidylester von carboxymethyliertem Monomethoxy-PEG ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11, das außerdem einen Schritt des Schützens von Amingruppen an dem LHRH-Analogon vor dem PEGylierungsschritt umfasst.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10–13, wobei das PEGylierungsmittel monomethoxyliert ist.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10–13, wobei das PEGylierungsmittel bifunktionell ist.

16. Verfahren zur Herstellung des PEG-LHRH-Analogon-Konjugats nach Anspruch 1, umfassend die Schritte:
– Herstellen eines PEG-LHRH-Analogon-Konjugats durch Festphasen-Peptidsynthese, wobei ein PEGylierter Serinrest während der Festphasen-Peptidsynthese in das LHRH-Analogon eingeführt wird; und
– Isolieren des produzierten PEG-LHRH-Analogon-Konjugats.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei der PEGylierte Serinrest Fmoc-Ser(PEG)-OH oder tBoc-Ser(PEG)-OH ist.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein PEG-LHRH-Analogon-Konjugat nach einem der Ansprüche 1–6 als aktives Ingredienz und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, ein pharmazeutisch annehmbares Exzipienz oder einen pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoff.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung, erhalten nach Anspruch 12, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Pathologien, bei denen eine LHRH-Analogon-Verabreichung günstig ist.

20. Verwendung des PEG-LHRH-Analogon-Konjugats nach einem der Ansprüche 1–6 als aktives Ingredienz bei der Herstellung eines Medikaments.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

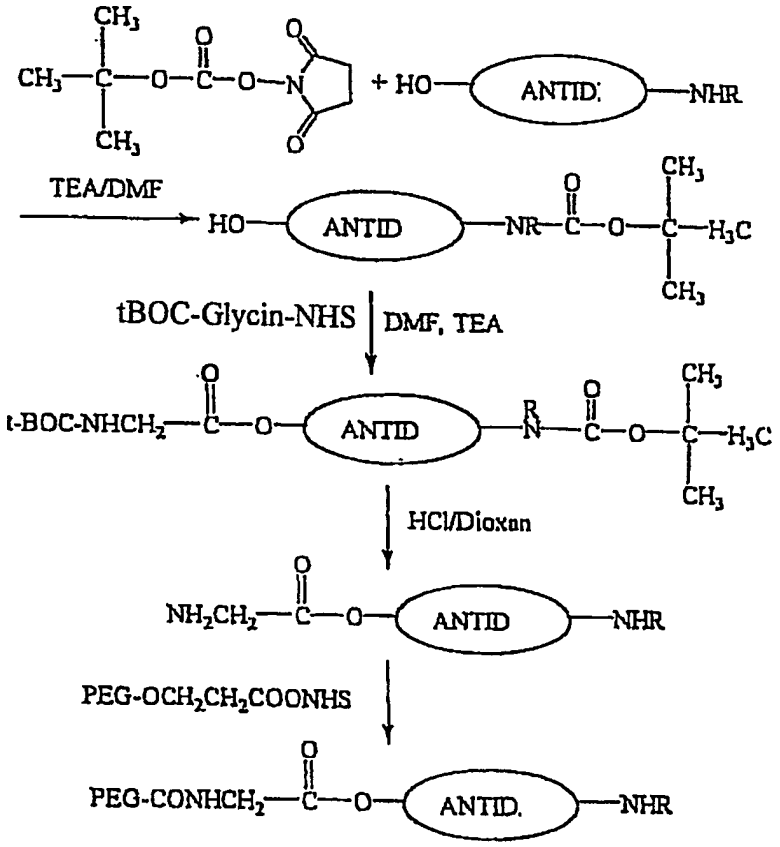


FIG. 1

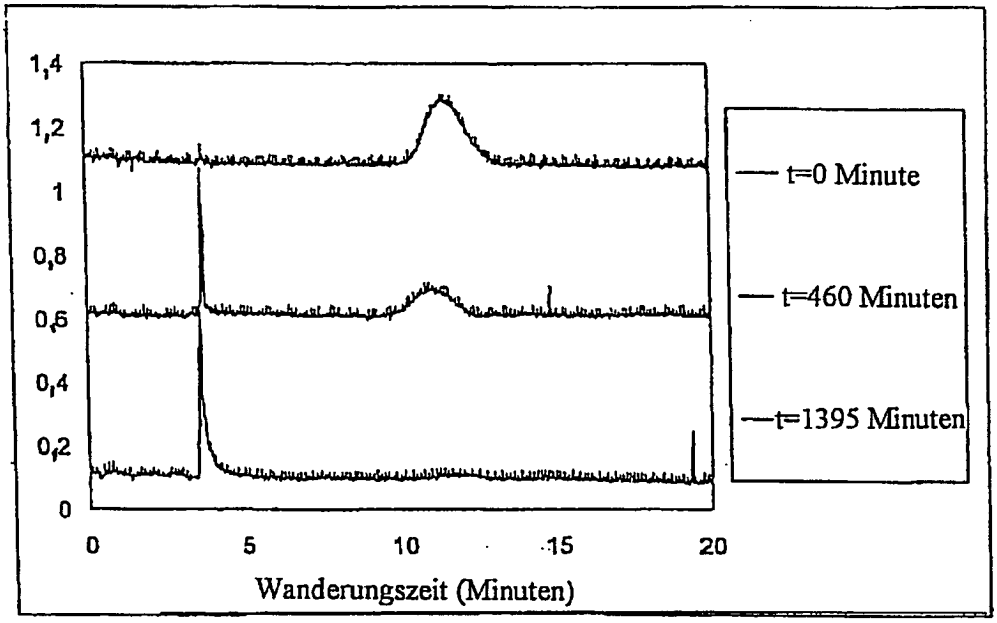

1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
Wanderungszeit (Minuten)
t=0 Minute
t=460 Minuten
t=1395 Minuten

FIG. 2

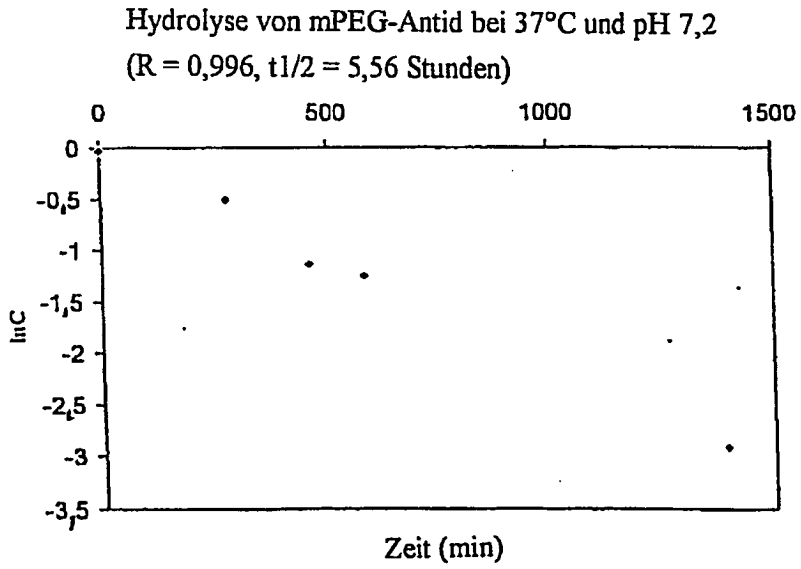

Hydrolyse von mPEG-Antid bei 37°C und pH 7,2
(R = 0,996, t1/2 = 5,56 Stunden)
0
500
1000
1500
0
-0,5
-1
-1,5
-2
-2,5
-3
-3,5
lnC
Zeit (min)

FIG. 3