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

(10) **DE 693 33 287 T2** 2004.09.23

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 656 061 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 33 287.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/07406**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **93 918 681.3**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/003603**
(86) PCT-Anmeldetag: **06.08.1993**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **17.02.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.06.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **05.11.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **C07K 14/705**
C12N 15/12, A61K 38/17, A61P 7/02, A61K 39/00, A61P 37/06

(30) Unionspriorität:
927099 **07.08.1992** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Avant Immunotherapeutics, Inc., Needham, Mass., US

(74) Vertreter:
Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel, 80538 München

(72) Erfinder:
MARSH, C., Henry, Reading, US; SMITH, Richard A.G., Epsom Surrey KT18 5XQ, GB; YEH, Chang-Jing Grace, Newton, US; LIFTER, John, Wellesley, US; FREEMAN, Anne Mary, Epsom Surrey KT18 5XQ, GB; GOSSELIN, L., Michael, Revere, US

(54) Bezeichnung: **NEUARTIGE GLYKOFORMEN ALS LÖSLICHE KOMPLEMENT-REZEPTOREN**

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

FACHGEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Glycoformen des löslichen Komplement-Rezeptortyps 1 (sCR1), als auch deren Anwendungen in der Diagnose und Therapie von die Komplementaktivität und verschiedene entzündliche und immunologische Erkrankungen betreffenden Störungen. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Herstellen, Nachweisen und Reinigen solcher Glycoformen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

Das Komplementsystem

[0002] Das Komplementsystem, das aus etwa 10% der Globuline im normalen Serum besteht, setzt sich aus vielen verschiedenen Proteinen zusammen, die für die Reaktion des Immunsystems auf Fremdantigene wichtig sind. Das Komplementsystem wird aktiviert, wenn seine Primärkomponenten fragmentiert werden, woraufhin die Fragmente, einzeln oder gemeinsam mit anderen Proteinen, weitere Komplementproteine aktivieren, was eine proteolytische Kaskade ergibt. Die Aktivierung des Komplementsystemsführt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße, zur Chemotaxis von phagozytischen Zellen, zur Aktivierung von Entzündungszellen, zur Opsonisierung von Fremdpartikeln, zur direkten Abtötung von Zellen und zu Gewebeschädigung. Die Aktivierung des Komplementsystems kann durch Antigen-Antikörper-Komplexe (der klassische Weg) oder zum Beispiel durch in den Zellwänden pathogener Bakterien vorhandene Lipopolysaccharide (der alternative Weg) ausgelöst werden.

Der Membran-gebundene Komplement-Rezeptortyp 1

[0003] Der Komplement-Rezeptortyp 1 (CR1) ist auf den Membranen von Erythrozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen, einigen T-Zellen, dendritischen Zellen von Milzfollikeln und glomerulären Podozyten vorhanden. CR1 bindet an die Komplementkomponenten C3b und C4b und wurde auch als der C3b/C4b-Rezeptor bezeichnet. Die strukturelle Organisation und Primärsequenz von CR1 ist bekannt (Klickstein et al., 1987, J. Exp. Med. 165:1095–1112, Klickstein et al., 1988, J. Exp. Med. 168:1699–1717; Hourcade et al., 1988, J. Exp. Med. 168:1255–1270). Sie setzt sich aus 30 kurzen Konsensus-Repeats (SCRs) zusammen, die 60–70 Aminosäuren enthalten. In jedem SCR sind 29 der durchschnittlich 65 Aminosäuren konserviert. So wurde vorgeschlagen, dass jedes SCR eine dreidimensionale Dreifachschleifenstruktur durch Disulfidbindungen mit den dritten und ersten und den vierten und zweiten Halbcystinen in Disulfidbindungen bildet. CR1 ist weiterhin als 4 lange homologe Repeats (LHRs) aus jeweils 7 SCRs angeordnet. Im Anschluss an eine Leader-Sequenz, die posttranslational abgespalten wird, besteht das CR1-Molekül aus dem am N-terminalst gelegenen LHR-A, welches eine C4b-Bindungsdomäne umfasst, den nächsten beiden Repeats, LHR-B und LHR-C, die C3b-Bindungsdomänen umfassen, und dem C-terminalst gelegenen LHR-D, gefolgt von 2 zusätzlichen SCRs, einer putativen Transmembranenregion aus 25 Resten und einen cytoplasmischen Schwanz aus 43 Resten.

[0004] CR1 stellt ein Mitglied einer Protein-Superfamilie dar, die durch diese SCR-Homologie gekennzeichnet ist. Zu einigen Mitgliedern dieser Superfamilie, die eine C3/C4-bindende Funktion aufweisen, zählen CR2, C4-Bindungsprotein, Faktor H, Faktor B und C2, wohingegen zu Proteinen, denen diese Funktion fehlt, Interleukin-2-Rezeptor, β2-Glycoprotein I, C1r, die Haptoglobin-α-Kette und Faktor XIIIb zählen.

[0005] CR1 ist als ein Glycoprotein bekannt, dessen hergeleitete Aminosäuresequenz 25 potentielle Stellen für eine N-gebundene Glycosylierung (Aminosäure-Konsensus-Sequenz NXS oder NXT) in der extrazellulären Region aufweist. Lediglich von 6 bis 8 der verfügbaren Stellen wurde eine Bindung an Oligosaccharide berichtet (Sim 1985, Biochem. J. 232:883). Eine nicht-glycosylierte Form von CR1 wurde in Gegenwart von Tunicamycin erzeugt und zeigte eine verminderte Bindung an iC3 (Lublin et al., 1986. J. Biol. Chem. 261:5736). Der N-Terminus des Glycoproteins scheint blockiert zu sein. Bisher wurden vier verschiedene CR1-allele Formen oder Allotypen identifiziert, die durch Größenzuwächse von 30 bis 50 kDa voneinander abweichen. Die Genhäufigkeiten dieser Allotypen variieren innerhalb der menschlichen Population (Holer et al. 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2459–2463). Der F-(oder A-)-Allotyp setzt sich aus 4 LHRs zusammen und weist ein Molekulargewicht von etwa 250 kDa auf; der größere S- (oder B)-Allotyp enthält bei einem Molekulargewicht von etwa 290 kDa ein fünftes LHR, das eine Chimäre der 5'-Hälfte von LHR-B und der 3'-Hälfte von LHR-A darstellt und vorhersagegemäß eine dritte C3b-Bindungsstelle aufweist (Wong et al., 1989, J. Exp. Med. 169:847). Der kleinste F- oder (C)-Allotyp, der höchstwahrscheinlich aus der Deletion von LHR-B und einer C3b-Bindungsstelle entsteht, zeigt eine weitere Verbreitung bei Patienten mit systemischem Lupus erythematosus (SLE) (Van Dyne et al., 1987, Clin. Exp. Immunol. 68:570; Dykman et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1698).

[0006] Eine natürlich vorkommende lösliche Form von CR1 wurde im Plasma gesunder Individuen und bestimmter Individuen mit SLE nachgewiesen (Yoon et al., 1985, J. Immunol. 134:3332–3338). Seine Eigenschaften sind sowohl strukturell als auch funktionell ähnlich denen des Erythrozyten-(Zelloberflächen)-CR1. Hourcade et al., 1988, J. Exp. Med. 168:1255–1270, beobachteten auch eine alternative Polyadenylierungsstelle in der humanen CR1-Transkriptionseinheit, von der die Erzeugung einer sekretierten Form von CR1 vorhergesagt wurde. Die durch diese verkürzte Sequenz codierte mRNA umfasst die ersten 8,5 SCRs von CR1 und codiert ein Protein von etwa 80 kDa, welches die C4b-Bindungsdomäne enthält. Wurde eine cDNA entsprechend dieser verkürzten Sequenz in COS-Zellen transfiziert und exprimiert, so zeigte sie die erwartete C4b-Bindungsaktivität, band jedoch nicht an C3b (Krych et al., 1989, FASEB J. 3:A368). Krych et al. beobachteten in mehreren humanen Zelllinien auch eine mRNA ähnlich der vorhergesagten und postulierten, dass solch eine verkürzte lösliche Form von CR1 mit einer C4b-Bindungsaktivität im Menschen synthetisiert werden kann.

[0007] Außerdem wurden mehrere lösliche Fragmente von CR1 über rekombinante DNA-Methoden generiert, indem die Transmembranregion aus den zu exprimierenden DNAs eliminiert wurde (Fearon et al., Intl. Patentveröffentl. WO 89/09220, 5.10.89; Fearon et al., Intl. Patentveröffentl. WO 91/05047, 18.4.91). Die löslichen CR1-Fragmente waren funktionell aktiv, banden an C3b und/oder C4b und zeigten eine Faktor I-Cofaktoraktivität in Abhängigkeit von den Regionen, die sie enthielten. Diese Konstrukte hemmten in vitro die Folgen der Komplementaktivierung, wie z. B. den oxidativen Burst von Neutrophilen, die Komplement-vermittelte Hämolyse und die C3a- und C5a-Produktion. Ein löslicher Konstrukt, sCR1/pBSCR1c, zeigte auch eine in vivo-Aktivität bei einer umgekehrten passiven Arthus-Reaktion (Fearon et al., 1989, 1991, supra; Yeh et al., 1991, J. Immunol. 146:250), unterdrückte eine postischämische Herzmuskelentzündung und Nekrose (Fearon et al., supra; Weisman et al. Science, 1990, 249:146–151) und verlängerte die Überlebensraten nach einer Transplantation (Pruitt & Bollinger, 1991, J. Surg. Res. 50:350; Pruitt et al., 1991, Transplantation 52:868). Weiterhin führte die gemeinsame Formulierung des löslichen Produkts von Vektor sCR1/pBSCR1c mit p-anisoyliertem humanem Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex (APSAC) zu einer ähnlichen antihämolytischen Aktivität wie das sCR1/pBSCR1c-Produkt alleine, was darauf hinwies, dass eine Kombination aus dem Komplementhemmer sCR1 mit einem thrombolytischen Agens zulässig war (Fearon et al., supra).

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Glycoformen des löslichen Komplementrezeptor-1-Proteins (sCR1) als auch deren Anwendungen in der Behandlung von Störungen, an denen die Komplementaktivität und verschiedene entzündliche und immunologische Erkrankungen beteiligt sind.

[0009] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben entdeckt, dass unter bestimmten Herstellungsbedingungen neuartige Glycoformen von sCR1 erhalten werden können, die die gewünschten Eigenschaften einer verlängerten Abgabe aus dem Blut unter Aufrechterhaltung einer signifikanten funktionellen Aktivität zeigen. Eine lange funktionelle Halbwertszeit erlaubt eine vereinfachte Bolus-Dosisverabreichung und trägt zur in vivo-Wirksamkeit bei.

[0010] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben verschiedene Reinigungsmethoden zum Auftrennen und Anreichern bestimmter sCR1-Glycoformen angewendet. So wird mit der vorliegenden Erfindung ein Glycoprotein-Molekül des löslichen Komplementrezeptor-1-(sCR1)-Glycoprotein-Moleküls bereitgestellt, das eine oder mehrere komplexe Oligosaccharidstrukturen enthält, welche ein oder mehreren Strukturen mit durchschnittlich ein oder mehreren Sialinsäure-Reste beendet sind.

[0011] Bei einer Ausführungsform wird ein Arzneimittel aus einem sCR1-Glycoprotein bereitgestellt, in welchem die Moleküle ein oder mehrere komplexe Oligosaccharidstrukturen enthalten, wobei mindestens 40% der Oligosaccharidstrukturen durchschnittlich mindestens einen terminalen Sialinsäure-Rest enthalten. Vorzugsweise enthalten die Moleküle ein oder mehrere komplexe Oligosaccharidstrukturen, wobei mindestens 70% davon durchschnittlich mindestens einen terminalen Sialinsäure-Rest enthalten.

[0012] Bei einer Ausführungsform umfasst ein sCR1-Präparat sCR1-Glycoprotein-Moleküle, in welchen die dominierenden Glycoformen einen durch Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt, pI, von niedriger als oder gleich 5,1 aufweisen, wobei der pI nach einer Neuraminidasenbehandlung steigt.

[0013] Bei einer anderen Ausführungsform umfasst das sCR1-Präparat ein sCR1-Glycoprotein, in welchem das Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose im Glycoprotein mehr als oder gleich 0,25 beträgt.

[0014] Vorzugsweise zeigt ein sCR1-Präparat gemäß der vorliegenden Erfindung mindestens 25% der funktionellen komplementhemmenden Aktivität von deglycosyliertem sCR1.

[0015] Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Moleküls oder Arzneimittels der vorliegenden Erfindung enthält das Proteinrückgrat des sCR1-Glycoproteins LHR-A-, LHR-B-, LHR-C-, LHR-D-, SCR29- und SCR30-Bereiche bis zu und einschließlich dem ersten Alaninrückstand des Transmembranenbereichs.

[0016] Die vorliegende Erfindung richtet sich auch auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine therapeutisch wirksame Menge eines sCR1-Glycoprotein-Moleküls, wie oben, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Bindemittel enthält. Bei einer Ausführungsform umfasst das pharmazeutische Präparat außerdem eine therapeutisch wirksame Menge eines thrombolytischen Agens.

[0017] Vorzugsweise ist das thrombolytische Agens gewählt aus der Gruppe, welche aus folgendem besteht:

(a) einem Plasminogen-Aktivator oder einem Mutein davon;

(b) anisoyliertem Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex (APSAC);

(c) einkettiger Urokinase;

(d) zweikettiger Urokinase;

(e) Streptokinase;

(f) einem fibrinolytisch aktiven Hybridprotein, welches eine Kette einer ersten zweikettigen Protease enthält, welche mit einer Kette einer zweiten zweikettigen Protease verbunden ist, wobei mindestens eine der besagten ersten oder zweiten Proteasen eine fibrinolytische Aktivität aufweist, so dass das besagte Hybridprotein einen für fibrinolytische Aktivität wesentlichen katalytischen Ort aufweist, welcher fakultativ durch eine entfernbare Blockierungsgruppe blockiert wird; und

(g) einem reversibel blockierten in vivo-fibrinolytischen Enzym, wobei der für die fibrinolytische Aktivität wesentliche katalytische Ort in dem Enzym durch eine Gruppe blockiert ist, welche durch Hydrolyse entfernbar ist, bei einer solchen Geschwindigkeit, dass die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung für die Hydrolyse im Bereich von 10^{-6} sec^{-1} bis 10^{-3} sec^{-1} in einer isotonischen wässrigen Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 bei 37°C liegt.

[0018] Mit der vorliegenden Erfindung wird auch ein Verfahren zur Behandlung einer mit Entzündung oder unangemessener Komplementaktivation verbundenen Krankheit oder Störung bereitgestellt, welches die Verabreichung an einen Patienten, der einer Behandlung eines derartigen Zustandes bedarf, einer therapeutisch wirksamen Menge eines pharmazeutischen sCR1-Präparats wie oben umfasst.

[0019] Ebenfalls bereitgestellt wird ein Verfahren zur Behandlung einer thrombolytischen Erkrankung, welches das Verabreichen an einen Patienten, der einer Behandlung eines derartigen Zustandes bedarf, einer wirksamen Menge eines pharmazeutischen sCR1-Präparats, oder vorzugsweise eines pharmazeutischen Präparats wie oben, das ein thrombolytisches Agens enthält.

[0020] Bei obigen Verfahren ist der Patient vorzugsweise ein Mensch.

[0021] Die vorliegende Erfindung richtet sich auch auf ein Verfahren zur Zubereitung eines sCR1-Glycoproteins oder sCR1-Präparats, wie oben, welches folgendes umfasst:

(a) das Exprimieren eines DNA-Moleküls, welches das Proteinrückgrat des sCR1 in einer Säugetierwirtszelle in Kultur unter Bedingungen codiert, bei denen das Zellwachstum nicht durch Nährstoffzufuhr begrenzt ist und bei denen die Wirtszelle in der Lage ist, oligosaccharide Ketten zu sialysieren; und

(b) das Isolieren des sCR1-Glycoproteins aus der Kultur.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren außerdem den folgenden Schritt:

(c) das Isolieren von Sialinsäure-enthaltenden Molekülen aus dem in Schritt (b) erhaltenen Material.

[0022] Bei obigen Verfahren umfassen die bevorzugten Kulturbedingungen einen Fließbett-Bioreaktor, Hohlfaser-Bioreaktor, eine Rollflaschenkultur oder ein Rührtank-Bioreaktorsystem, wobei letztere beiden Systeme mit oder ohne Zell-Mikroträgern ausgestattet sein können.

[0023] Das sCR1-Glycoprotein-Produkt aus der obigen Zellkultur kann durch Affinitäts-, Größenausschluss-, Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktions-Chromatographie gereinigt werden. Die Anreicherung mit Sialinsäure-enthaltenden Molekülen wird vorzugsweise durch Ionenaustausch-Weichgelchromatographie oder HPLC unter Verwendung von Kationen- oder Anionenaustauscherharzen unter Auffang der saureren Fraktion erreicht. Die Sialinsäure-enthaltenden Moleküle können auch durch Chromatofokussierung oder Lectin-Affinitätschromatographie isoliert werden.

[0024] Vorzugsweise ist die Säugetierwirtszelle in der Lage, Sialyltransferasen in einer ausreichenden Menge zu exprimieren, um eine wesentliche Sialylierung der Oligosaccharide im exprimierten sCR1-Glycoprotein zu gewährleisten. Zu geeigneten Wirtszellen zählen CHO-Linien, vorzugsweise die DUX B11-Zelllinie.

ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

APSAC = anisoylierter Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex
pI = isoelektrischer Punkt
HPLC = Hochleistungs-Flüssigchromatographie
IH 50% = Konzentration, die eine 50% Hemmung der Hämolyse ergibt
SRBC = rote Schafs-Blutkörperchen
EIA = Enzymimmunoassay

Gew/Vol = Verhältnis von Gewicht zu Volumen
Vol/Vol = Verhältnis von Volumen zu Volumen
kDa = Kilodalton
ELISA = enzyme linked immunosorbent assay
gu = Glucose-Einheiten
SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Glycoformen = Spezies eines Glycoproteins, wie etwa das lösliche CR1-Glycoprotein der vorliegenden Erfindung, die durch ihren Kohlenhydratgehalt, ihr chromatographisches Verhalten und/oder ihre Ladung gekennzeichnet sind
TP10HD = ein bestimmtes lösliches CR1-Konstrukt, das LHR-A-, LHR-B-, LHR-C-, LHR-D-, SCR29-, SCR30-Regionen bis zu und einschließlich dem ersten Alaninrückstand des Transmembranenbereichs enthält; TP10HD entspricht den CR1-codierenden Sequenzen im Plasmid pBSCR1c (Fearon et al., Internationale Patentveröffentlichung Nr. WO 89/09220 (5. Oktober 1989)
TP10HD-CC = durch Zellen erzeugtes TP10HD, die in einem Fließbett-Perfusionsbioreaktor gezüchtet und durch Kombinationschromatographie gereinigt wurden, wie hierin beschrieben
TP10HD-CCW = die schwach kationische Form von TP10HD-CC, wie durch präparative HPLC-Kationenaustausch-Chromatographie isoliert
TP10HD-CCS = die stark kationische Form von TP10HD-CC, wie durch präparative HPLC-Kationenaustausch-Chromatographie isoliert
TP10HD-CX = durch Zellen erzeugtes TP10HD, die in einem Hohlfaser-Bioreaktor gezüchtet und durch HPLC-Kationenaustausch-Chromatographie gereinigt wurden (Fearon et al., supra)
TP10HD-CXD = TP10HD-CX, mit n-Glycanase enzymatisch deglycosyliert.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0025] In **Fig.** 1 ist eine Serie von Extinktionsspuren bei 280 nm dargestellt, die die Ergebnisse der analytischen HPLC von in unterschiedlicher Weise gereinigten TP10HD-Präparaten zeigen. Eine Modifikation der Hydropore-SCX-HPLC-Reinigungsmethode wurde zum Nachweis des Vorhandenseins der TP10HD-Glycoformen angewendet.
[0026] Feld A: durch Affinitätschromatographie gereinigtes TP10HD-Material, enthielt vielfache Glycoformen, wobei die dominierenden Glycoformen stark kationisch waren (d. h. bei etwa 125 mM NaCl eluierten).
[0027] Feld B: durch Kombinationschromatographie gereinigtes TP10HD-Material, enthielt vielfache Glycoformen; die Konzentrationsverhältnisse von schwach kationischen zu stark kationischen Glycoformen lagen im Bereich von 70 : 30 bis 80 : 20.
[0028] Feld C: durch HPLC-Kationenaustausch-Chromatographie gereinigtes TP10HD, enthielt lediglich die stark kationische Glycoform.
[0029] In **Fig.** 2 ist ein Elutionsprofil von TP10HD aus einer S-Sepharose-Säule mit einem 50 –250 mM NaCl-Gradienten gezeigt. Die Peaks entsprechend Pool 1 und Pool 2 sind gezeigt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 2 ml/min. Die Geschwindigkeit des Graphen betrug 0,25 cm/min. Die Empfindlichkeit betrug 0,2 Extinktionseinheiten bei 280 nm Vollausschlag.
[0030] In **Fig.** 3 ist ein SDS-PAGE-Gelmuster des aus der S-Sepharose-Säule von **Fig.** 2 eluierten Materials gezeigt. Bahn 1: Standards mit hohem Molekulargewicht; Bahnen 5 und 8: S-Sepharose Pool 1 (jeweils 2,4 µg); Bahnen 6 und 9: S-Sepharose Pool 2 (5,0 bzw. 6,7 µg).
[0031] In **Fig.** 4 sind vier Radioelektrophoretogramme von Oligosaccharidketten von TP10HD-CCW (rechte Felder) und TP10HD-CCS (linke Felder) gezeigt. Die unteren beiden Felder zeigen die Muster nach Neuraminidasenbehandlung.
[0032] In **Fig.** 5 sind zwei Chromatogramme dargestellt, die die Größen und relativen Proportionen der Oligosaccharidketten von TP10HD-CCS (A) und TP10HD-CCW (B) zeigen.
[0033] In **Fig.** 6 ist eine Spur aus einer Chromatofokussier-Säule für TP10HD-CC (oben) und TP10HD-CX (unten) gezeigt.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0034] Die vorliegende Erfindung betrifft neuartige Glycoformen von löslichem Komplementrezeptor-1-Protein (sCR1), als auch deren Anwendungen in der Diagnose oder Therapie von die Komplementaktivität und verschiedene entzündliche und immunologische Erkrankungen betreffenden Störungen.
[0035] Löslicher Komplementrezeptor 1 (sCR1) ist hierin als eine lösliche Form von humanem CR1 definiert, das alle 30 extrazellulären SCR-Domänen enthält.
[0036] sCR1 und Verfahren, mittels derer er erhalten werden kann, sind beschrieben in den Internationalen Patentveröffentlichungen WO 89/09220 (5. Oktober 1989) und WO 91/05047 (18. April 1991). Vorzugsweise

wird das sCR1-Material durch Züchten rekombinanter Chinesischer Hamster-Ovar-(CHO)-DUX B11-Zellen in einem Fließbett-Perfusionsbioreaktor präpariert (siehe WO 91/05047, supra). Bei einem bevorzugten Aspekt kann CHO-Zelllinie-DUX B11, beherbergend Plasmid pBSCR1c/pTCSgpt, ATCC-Zugriffsnummer CRL 10052, verwendet werden.

[0037] Die sCR1-Glycoformen der vorliegenden Erfindung sind durch ihren Kohlenhydratgehalt, ihr chromatographisches Verhalten und/oder die Ladung gekennzeichnet. Demgemäß wird mit der vorliegenden Erfindung bereitgestellt:

(1) sCR1, umfassend ein komplexes Oligosaccharid, das durch ein oder mehrere Sialinsäure-Reste beendet ist;

(2) sCR1 mit einem isoelektrischen Punkt, pI ≤ 5,1, wie mittels Chromatofokussierung gemessen, wobei der pI nach Neuraminidasenbehandlung steigt;

(3) sCR1-Präparate, bei denen mindestens 40% der Oligosaccharide ein komplexes Oligosaccharid umfassen, beendet durch ein oder mehrere Reste einer Sialinsäure;

(4) sCR1-Präparate, die vorzugsweise Oligosaccharidstrukturen umfassen, wobei mindestens 70% der Strukturen Sialinsäure-terminale Moleküle sind;

(5) sCR1-Präparate, in denen das Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose ≥ 0,25 beträgt; und

(6) bevorzugte sCR1-Glycoformen und Präparate mit mindestens 25% der funktionellen Anti-Komplementaktivität von nicht-glycosyliertem sCR1.

[0038] Die bevorzugten Glycoproteine sind solche, die Oligosaccharide ähnlich oder identisch mit den Oligosacchariden enthalten, die in menschlichen Glycoproteinen natürlich vorkommen. Zu den Vorteilen eines sCR1-Präparats mit solchen Oligosacchariden zählen ein geringeres Risiko einer Immunogenität bei Verabreichung an einen Menschen.

[0039] Die sCR1-Glycoformen und -Präparate der vorliegenden Erfindung sind auch durch ihre funktionelle Aktivität gekennzeichnet. So zeigen sie vorzugsweise eine oder mehrere der mit sCR1-Molekülen verbundenen Aktivitäten, einschließlich, doch nicht beschränkt auf:

(1) Bindung an monomere und/oder polymere C3b und/oder C4b oder C4ma;

(2) Verhinderung der C3a- oder C5a-Produktion in Komplement-aktiviertem Serum;

(3) Faktor I-Cofaktoraktivität;

(4) Hemmung des Komplement-induzierten oxidativen Burst von Neutrophilen; und

(5) Hemmung der Komplement-vermittelten Hämolyse.

ZÜCHTUNG, REINIGUNG UND ANREICHERUNG DER sCR1-GLYCOFORMEN

[0040] Die sCR1-Glycoformen und Präparate der vorliegenden Erfindung können durch Züchten von Zellen hergestellt werden, die rekombinante sCR1-codierende DNA unter vielfältigen Zellkultur-Bedingungen exprimieren, einschließlich, doch nicht beschränkt auf einen Fließbett-Bioreaktor, einen Hohlfaser-Bioreaktor, eine Rollflaschenkultur oder ein Rührtank-Bioreaktorsystem, wobei letztere beiden Systemen mit oder ohne Zell-Mikroträger ausgestattet sein können.

[0041] Die sCR1-Glycoformen der vorliegenden Erfindung können durch Exprimieren von DANN, die sCR1 oder Fragmente von sCR1 codiert, in einer Säugetierwirtszelle erhalten werden. Vorzugsweise ist die Säugetierwirtszelle zum Exprimieren einer funktionellen Sialyltransferase in der Lage, was zur Erzeugung einer sCR1-Glycoform führt, die Oligosaccharidketten mit vorzugsweise ein oder mehreren terminalen Sialinsäure-Resten enthält. Zu geeigneten Wirtszellen gemäß der vorliegenden Erfindung zählen CHO-Linien, vorzugsweise die DUX B11-Zelllinie.

[0042] Die Zellkulturbedingungen werden so ausgewählt, dass der gewünschte Grad an Sialylierung erreicht wird. Zu den Prozess-Parametern, die den Grad der Sialylierung beeinflussen, zählen die Sauerstoffmenge und die Glucosemenge. Zelldichte, Zeit und Lagerbedingungen, wie z. B. Temperatur, beeinflussen die Sialylierung ebenfalls.

[0043] sCR1-Glycoformen, die zwei oder mehr Sialinsäure-Reste pro komplexer Oligosaccharidstruktur enthalten, weisen längere in vivo-Abgaberaten auf. Die Abgaberate des Präparats kann daher innerhalb breiter Grenzen anhand des Gesamtgrads der Sialylierung des Präparats manipuliert werden. Die Wirkung des Kohlenhydratgehalts auf die Serum- (oder Plasma)-Abgabe korreliert schwach mit der funktionellen Aktivität; die Deglycosylierung führt zu einer schnellen Plasmaabgabe, doch minimalen Anstiegen der in vitro-funktionellen Aktivität.

[0044] Die in diesen Kulturen erzeugten exprimierten sCR1-Glycoformen können in herkömmlicher Weise zum Beispiel durch Affinitäts-, Größenausschluss-, Ionenaustausch- und/oder hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) gereinigt werden. Mehrere CR1-spezifische Antikörper stehen zur Verwendung in der Affinitätschromatographie zur Verfügung (Changelian et al., 1985, J. Immunol. 134:1851).

[0045] Eine Reihe von Matrizes kann bei der Präparierung der HIC-Säulen verwendet werden, wobei am um-

fangreichsten Agarose eingesetzt wird. Kieselgel und organische Polymerharze können verwendet werden. Zu nützlichen hydrophoben Liganden zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Alkylgruppen mit etwa 2 bis etwa 10 Kohlenstoffatomen, wie etwa ein Butyl, Propyl oder Octyl; oder Arylgruppen, z. B. Phenyl. Herkömmliche HIC-Produkte für Gele und Säulen können kommerziell unter den Produktbezeichnungen Butyl-SEPHAROSE®, Phenyl-SEPHAROSE®CL-4B, Octyl-SEPHAROSE®FF und Phenyl-SEPHAROSE®FF (Pharmacia LKB AB, Uppsala, Schweden); TOYOPEARL Butyl 650M (Fractogel TSK Butyl-650) oder TSK-GEL Phenyl-5PW (Tosoh Corporation, Tokio, Japan); Alkylagarose, worin die Alkylgruppe 2– 10 Kohlenstoffatome enthält (Miles-Yeda, Rehovot, Israel); und Bakerbond WP-HI-Propyl (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) bezogen werden.

[0046] Die Präparierung der gewünschten HIC-Säule ist auch unter Anwendung einer herkömmlichen Chemie möglich. Siehe z. B. Er-el, Z. et al. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49:383 (1972); Ulbrich V. et al. Coll. Czech. Chem. Commum. 9:1466 (1964)). Die Wahl eines bestimmten Gels kann durch einen Fachmann des Gebiets bei üblicher Sachkenntnis vorgenommen werden. Allgemein nimmt die Stärke der Wechselwirkung des Proteins mit dem HIC-Liganden mit der Kettenlänge der Alkyl-Liganden zu, doch sind Liganden mit etwa 4 bis etwa 8 Kohlenstoffatomen für die meisten Auftrennungen geeignet. Die Adsorptian der Proteine an eine HIC-Säule wird durch hohe Salzkonzentrationen begünstigt, doch können die tatsächlichen Konzentrationen über einen breiten Bereich in Abhängigkeit von der Natur des Proteins und dem speziell gewählten HIC-Liganden variieren. Generell sind Salzkonzentrationen von etwa 0,75 bis etwa 2 M Ammoniumsulfat oder etwa 1 bis 4 M NaCl nützlich.

[0047] Die Elution, ob nun stufenweise oder in Form eines Gradienten, kann in vielfältiger Weise erreicht werden: (a) durch Verändern des Satzkonzentration, (b) durch Verändern der Polarität des Lösungsmittels oder (c) durch Zusetzen von Detergenzien. HIC ist besonders nützlich, wenn es in Kombination mit anderen Protein-Reinigungsmethoden angewendet wird.

[0048] Wie im Fachgebiet wohlbekannt, können für die Ionenaustausch-Chromatographie verschiedene anionische oder kationische Substituenten an Matrizes gebunden werden, um anionische oder kationische Träger herzustellen. Anionenaustauscher-Substituenten umfassen Diethylaminoethyl (DEAE), quaternäres Aminoethyl (QAE) und quaternäre Amin-(Q)-Gruppen. Zu Kationenaustauscher-Substituenten zählen Carboxymethyl (CM), Sulfoethyl (SE), Sulfopropyl (SP), Phosphat (P) und Sulfonat (S). Zu kommerziell verfügbaren Ionenaustauschermaterialien zählen: celluloseartige Ionenaustauscherharze wie DE23, DE32, DE52, CM-23, CM-32 und CM-52 (Whatman Ltd., Maidstone, Kent, UK); auf SEPHADEX®-basierende und vernetzte Ionenaustauscher, zum Beispiel DEAE-, QAE-, CM- und SP-SEPHADEX® und DEAE-, Q-, CM- und S-SEPHAROSE° (Pharmacia AB); DEAE- und CM-derivatisiertes Ethylenglycol-Methacrylat-Copolymer, z. B. TOYOPEARL DEAE-650S und TOYOPEARL CM-650S (Toso Haas Co., Philadelphia, PA).

[0049] Die Größenauschluss- oder Gelfiltrationschromatographie trennt auf der Basis der Molekülgröße. Bevorzugte Matrixmaterialien sind chemisch träge, starr und hochporös. Für großmaßstäbliche Verfahren ist die Starrheit zum Erhalt einer Gesamtfließgeschwindigkeit überaus wichtig. In jüngerer Zeit entwickelte Gele, die eine erhöhte Starrheit aufweisen, sind bevorzugt, zum Beispiel SEPHACRYL®, ULTROGEL®, FRACTOGEL®, SUPEROSE® und TOYOPEARL HW-Serienmatrizes (Toso Haas).

[0050] Die gewünschten sCR1-Glycoformen der vorliegenden Erfindung können zu Sialinsäure-enthaltenden Molekülen durch Ionenaustausch-Weichgelchromatographie oder HPLC unter Verwendung von Kationen- oder Anionenaustauscherharzen angereichert werden, wobei die saurere Fraktion abgesammelt wird. Die bevorzugte Matrix zur Auftrennung der sCR1-Glycoformen ist S-Sepharose. Der S-Sepharose-Chromatographieschritt kann zu einem frühen Zeitpunkt des gesamten Verfahrens der Proteinreinigung angewendet werden. Zu diesem Zeitpunkt kann eine gewünschte sCR1-Glycoform von anderen Glycoformen abgetrennt werden, und können die verbliebenen Reinigungsschritte an jener Glycoform vorgenommen werden. Alternativ kann ein zusätzlicher S-Sepharose-Reinigungsschritt, der zur Trennung der Glycoformen ausgelegt ist, am Ende eines vielstufigen Proteinreinigungsverfahrens vorgenommen werden, wie im untenstehenden Beispiel V veranschaulicht.

[0051] Spezifische sCR1-Glycoformen können auch über die Lectin-Affinitätschromatographie oder Chromatofokussierung ausgewählt werden.

[0052] Der komplexe Kohlenhydratanteil der sCR1-Glycoform kann, sofern erwünscht, mittels herkömmlicher Techniken der Kohlenhydrat-Analyse ohne weiteres analysiert werden. Zum Beispiel ergeben Techniken wie das im Fachgebiet wohlbekannte Lectin-Blotting einen geringen Anteil an terminaler Mannose oder anderen Zuckern wie Galactose. Die Termination von Oligosaccharid mit ein, zwei, drei oder vier Antennen durch Sialinsäuren kann auch durch Freisetzung von Zuckern aus dem Protein unter Verwendung von anhydrischem Hydrazin, oder mittels enzymatischer Methoden und der Fraktionierung der Oligosaccharide durch Ionenaustausch- oder Größenauschluss-Chromatographie oder anderen im Fachgebiet wohlbekannten Methoden bestätigt werden. Bei einem weiteren Test zur Identifizierung der Glycoform wird der pI vor und nach der Neuraminidasenbehandlung zur Entfernung der Sialinsäuren gemessen. Ein Anstieg des pI im Anschluss an die Neuraminidasenbehandlung weist auf das Vorhandensein von Sialinsäuren auf der Glycoform hin.

THERAPEUTISCHE ANWENDUNGEN DER CR1-GLYCOFORMEN

[0053] Die sCR1-Glycoformen und Präparate dieser Erfindung sind in der Behandlung oder Diagnose vieler Komplement-vermittelter oder Komplement-bezogener Erkrankungen und Störungen nützlich, einschließlich, doch nicht beschränkt auf die in Tabelle 1 aufgelisteten.

Tabelle 1

Erkrankungen und Störungen unter Beteiligung von Komplement

Neurologische Störungen

Multiple Sklerose
Herzinfarkt
Guillain Barre-Syndrom
Gehirntrauma
Parkinson-Krankheit

Störungen durch unangemessene oder unenrvünschte Komplementaktivation

Hämodialyse-Komplikationen
hyperakute Allograft-Abstoßung
Xenograft-Abstoßung
Interleukin-2-induzierte Toxizität während IL-2-Therapie

Entzündliche Erkrankungen

Entzündungs- oder Autoimmunkrankheiten
Crohn-Krankheit
Adult Respiratory Distress Syndrom
Wärme/Kälte-Verletzungen einschließlich Verbrennungen oder Erfrierungen

Postischämische Reperfusionszustände

Myocardinfarkt
Ballonangioplastie
systemisches Entzündungsreaktions-Syndrom bei Herz-Lungen-Bypass oder
Nierenhämodialyse
Nierenischärnie

Infektionserkrankungen oder Sepsis

Immunkomplex-Störungen und Autoimmunerkrankungen

rheumatoide Arthritis
systemischer Lupus erythematosus (SLE)
SLE-Nephritis
proliferative Nephritis
Glomerulonephritis
hämolytische Anämie
Myasthenia gravis

[0054] Bei einem Verfahren zur Behandlung einer mit Entzündung oder unangemessener Komplementaktivation verbundenen Krankheit oder Störung wird eine therapeutisch wirksame Menge einer sCR1-Glycoform oder -Arzneimittels einem Patienten verabreicht, der einer Behandlung eines derartigen Zustandes bedarf. Der bevorzugte Patient ist ein Mensch.
[0055] Eine wirksame Menge der sCR1-Glycoform zur Behandlung einer Krankheit oder Störung liegt im Dosierungsbereich von 0,01–100 mg/kg; vorzugsweise 0,1 mg–10 mg/kg.
[0056] Zur Verabreichung sollte die sCR1-Glycoform oder -Arzneimittel zu einem geeigneten pharmazeutischen oder therapeutischen Präparat formuliert werden. Ein solches Präparat enthält typischerweise eine the-

rapeutisch wirksame Menge der sCR1-Glycoform oder -Arzneimittels und ein pharmazeutisch geeignetes Bindemittel oder Träger, wie z. B. Kochsalzlösung, gepufferte Kochsalzlösung, Dextrose oder Wasser. Die Präparate können auch spezifische Stabilisatoren wie Zucker enthalten, einschließlich Mannose und Mannitol, als auch Lokalanästhetika für injizierbare Präparate, einschließlich z. B. Lidocain.

[0057] Um die Komplementaktivation zu hemmen und um zugleich eine thrombolytische Therapie bereitzustellen, werden mit der vorliegenden Erfindung Präparate zur Verfügung gestellt, die außerdem eine therapeutisch wirksame Menge eines thrombolytischen Agens umfassen. Eine wirksame Menge eines thrombolytischen Agens liegt im Dosierungsbereich von 0,01–10 mg/kg; vorzugsweise 0,1–5 mg/kg. Zu bevorzugten thrombolytischen Agenzien zählen, ohne darauf beschränkt zu sein, Streptokinase-, humane gewebeartige Plasminogen-Aktivator- und Urokinase-Moleküle und Derivate, Fragmente oder Konjugate davon. Die thrombolytischen Agenzien können eine oder mehrere Ketten umfassen, die an andere Agenzien kondensiert oder reversibel gebunden werden können, um Hybridmoleküle zu erhalten (EP-A-0297882 und EP 155387), wie zum Beispiel an Plasmin gebundene Urokinase (EP-A-0152736), an ein wasserlösliches Polymer gebundenes fibrinolytisches Enzym (EP-A-0183503). Die thrombolytischen Agenzien können auch Muteine von Plasminogen-Aktivatoren umfassen (EP-A-0207589). Bei einer bevorzugten Ausführungsform kann das thrombolytische Agens ein reversibel blockiertes in vivo-fibrinolytisches Enzym umfassen, wie beschrieben in US-Patent Nr. 4.285.932. Das bevorzugteste Enzym ist ein p-Anisoyl-Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, wie beschrieben in US-Patent Nr. 4.808.405, und vermarktet von SmithKline Beecham Pharmaceuticals unter dem Handelsnamen EMINASE (z. B. generischer Name Anistreplase, auch bezeichnet als APSAC; Monk et al., 1987, Drugs 34: 25–49).

[0058] Ein bevorzugtes therapeutisches Präparat zur Hemmung der Komplementaktivation oder für eine Kombinationstherapie, wie oben, umfasst eine neuartige sCR1-Glycoform oder -Arzneimittel dieser Erfindung, welches eine verlängerte Abgabe aus dem Blut unter Beibehaltung einer signifikanten funktionellen Aktivität zeigt. Diese verlängerte funktionelle Halbwertszeit ermöglicht eine vereinfachte Bolus-Dosisverabreichung und trägt zur in vivo-Wirksamkeit bei. Zu bevorzugten Komplementaktivationshemmern im therapeutischen Präparat zählen die sCR1-Glycoformen und oben beschriebenen Präparate, z. B.:

(1) sCR1-Glycoformen, umfassend ein komplexes Oligosaccharid, die durch ein oder mehrere Reste einer Sialinsäure beendet sind;

(2) Zubereitungen mit einem durch Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt, pI < 5,1, wobei der pI gegenüber einer Neuraminidasenbehandlung empfindlich ist;

(3) Zubereitungen von sCR1, die komplexe Oligosaccharide umfassen, wobei mindestens 40% der komplexen Oligosaccharide durch ein oder mehrere Reste einer Sialinsäure beendet sind; oder

(4) sCR1-Zubereitungen mit einem Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von ≥ 0,25.

[0059] Bevorzugter sollten die therapeutisch wirksamen sCR1-Glycoformen und -Arzneimittel mindestens 70% der Sialinsäure-terminalen Moleküle umfassen und mindestens 25% der Anti-Komplementaktivität des nicht-glycosylierten sCR1 aufweisen. Weiterhin sollten bevorzugte therapeutisch wirksame Komplementaktivationshemmer der therapeutischen Präparate Oligosaccharide umfassen, die den in humanen Glycoproteinen natürlich vorkommenden ähnlich oder mit ihnen identisch sind.

[0060] Zu den Verabreichungswegen für die einzelnen oder kombinierten therapeutischen Präparate der vorliegenden Erfindung zählen standardmäßige Wege, wie z. B. die intravenöse Infusion oder Bolusinjektion. Wirksame Komplement-Blocker und thrombolytische Agenzien können gemeinsam oder nacheinander in beliebiger Reihenfolge verabreicht werden.

[0061] Mit der vorliegenden Erfindung wird auch ein Verfahren zur Behandlung eines thrombotischen Zustandes, insbesondere eines akuten Myocardinfarkts, bei einem Menschen oder nicht-menschlichen Tier bereitgestellt. Dieses Verfahren umfasst die Verabreichung an einen Menschen oder ein Tier, der oder das einer Behandlung dieses Zustandes bedarf, einer wirksamen Menge einer sCR1-Glycoform oder -Arzneimittels gemäß dieser Erfindung und einer wirksamen Menge eines thrombolytischen Agens.

[0062] Außerdem wird die Verwendung einer sCR1-Glycoform oder -Arzneimittels dieser Erfindung und eines thrombolytischen Agens in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines thrombotischen Zustandes bei einem Menschen oder Tier bereitgestellt. Diese Verfahren und Anwendungen können wie früher beschrieben durchgeführt werden (internationale Patentveröffentlichung WO 91/05047).

[0063] Mit dieser Erfindung wird außerdem ein Verfahren zur Behandlung des Adult Respiratory Distress Syndrom (akute respiratorische Insuffizienz – ARDS) bei einem Menschen oder nicht-menschlichen Tier bereitgestellt. Dieses Verfahren umfasst die Verabreichung an den Patienten einer wirksamen Menge eines sCR1-Glycoproteins oder -Arzneimittels gemäß dieser Erfindung.

[0064] Mit der Erfindung wird auch ein Verfahren zur Verzögerung einer hyperakuten Allograft- oder hyperakuten Xenograft-Abstoßung bei einem ein Transplantat empfangenden Menschen oder nicht-menschlichen Tier durch Verabreichen einer wirksamen Menge einer sCR1-Glycoform oder -Arzneimittels gemäß dieser Erfindung bereitgestellt.

[0065] Nachdem nun die Erfindung allgemein beschrieben wurde, wird diese im folgenden unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele leichter verständlich gemacht werden, welche zur Veranschaulichung angegeben und nicht als Einschränkung der vorliegenden Erfindung gedacht sind, sofern nicht anders spezifiziert.

BEISPIEL I

HERSTELLUNG UND REINIGUNG DER TP10HD-PRÄPARATE

[0066] Aus konditioniertem Gewebekulturmedium hergestelltes TP10HD wird mittels Affinitätschromatographie, HPLC-(oder Nicht-HPLC)-Kationenaustausch-Chromatographie, und einer Kombination der Kationenaustausch-, hydrophoben Interaktions- und Größenausschluss-Chromatographien gereinigt.

Quellen des konditionierten Zellkulturmediums

A. Hohlfaser-Bioreaktor

[0067] Rekombinante CHO DUX B11-Zellen, die das sCR1-Genprodukt TP10HD exprimieren (Fearon et al., 1989, 1991, supra) wurden in einem Hohlfaser-Bioreaktor unter Verwendung eines Modells IV-L, 30.000 Dalton Molekulargewichts-Trenngrenzenkapsel (Cell-Pharm Cell Culture System 1, CD Medical, Miami Lakes, FL) in einem geeigneten Kulturmedium, z. B. CHO-1-Komplettmediumsystem (Ventrex Laboratories, Inc. Portland, ME), ergänzt mit Glutamin (GIBCO, Grand Island, NY) und 1–10% fötalem Rinderserum (HyClone Laboratories, Inc. Logan, UT), betrieben gemäß den Anleitungen des Herstellers, beimpft. Das synthetisierte TP10HD wurde in das Kulturmedium sekretiert und aufgrund seines hohen Molekulargewichts von etwa 200 kDa innerhalb des Zell-Kompartiments der Reaktorkapsel zurückgehalten. Das konditionierte Medium aus dem Inneren des Zell-Kompartiments wurde in Intervallen von 1–3 Tagen entfernt, die kontaminierten Zellen und Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt und das geklärte konditionierte Medium in Einweg-Kunststofflaborgefäße verteilt und bis zur Reinigung bei 2–8°C gehalten. Unter diesen Bedingungen enthielt das konditionierte Medium bis zu 500 µg/ml TP10HD.

B. Rollflaschen-Zellkulturen

[0068] Rekombinante CHO DUX B11-Zellen, die TP10HD exprimieren, wurden in Rollflaschen in einem geeigneten Kulturmedium beimpft, z. B. einer Serum-freien Formulierung, hergestellt aus einem Gemisch von Hams F12 und DMEM (JHR Biosciences, Inc., Denver, PA), ergänzt mit Glutamin (GIBCO, Grand Island, NY), Rinderserumalbumin, humanem Transferrin und Rinderinsulin (Pentex-Miles Inc., Kankakee, IL; Intergen, Purchase, NY). Nachdem sich die Kultur nach etwa 3 Tagen etabliert hatte, was durch eine Veränderung der Farbe im Medium von Pink zu Gelb erkennbar war, wurden etwa 10 ml Collagen-Mikroträger (Verax Corporation, Lebanon, NH) zusammen mit frischem Medium zugegeben. In Intervallen von 3 Tagen wurde die Hälfte des Mediums (etwa 150 ml) ersetzt. Zellen und Zelltrümmer wurden aus dem konditionierten Medium durch Filtration entfernt und das geklärte konditionierte Medium in Einweg-Kunststofflaborgefäße verteilt und bei oder unterhalb von –70°C bis zur Reinigung gelagert. Unter diesen Bedingungen enthielt das konditionierte Medium etwa 15 µg/ml TP10HD.

C. Fließbett-Perfusionsbioreaktor

[0069] Rekombinante CHO DUX B11-Zellen, die TP10HD exprimieren, wurden in einen Fließbett-Perfusionsbioreaktor (System S200 und System S2000, Verax Corporation, Lebanon, NH) in einem geeigneten Kulturmedium beimpft, z. B. einer Serum-freien Formulierung, hergestellt aus einem Gemisch von Hams F12 und DMEM, ergänzt mit Glutamin (GIBCO, Grand Island, NY), Rinderserumalbumin, humanem Transferrin und Rinderinsulin (Pentex-Miles Inc., Kankakee, IL; Intergen, Purchase, NY), und der Biorekator wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers betrieben. Das gesammelte konditionierte Medium wurde in Intervallen von etwa 2 Tagen aus dem Erntelagertank des Bioreaktors entfernt, die Zellen und Zelltrümmer durch Filtration entfernt und durch Ultrafiltration durch eine 50 kDa- oder 100 kDa-Molekulargewichts-Trenngrenzen-Ultrafiltrationsmembran (Millipore Corp., Bedford, MA) 10- bis 100-fach konzentriert. Das konzentrierte konditionierte Medium wurde in Kunststoffflaschen verteilt und bei oder unterhalb von –70°C bis zur Reinigung gelagert. Unter diesen Bedingungen enthielt das konzentrierte konditionierte Medium > 900 µg/ml TP10HD.

Reinigungsschemen

A. Affinitätschromatographie

[0070] Aus dem Hohlfaser-Bioreaktor erhaltenes konditioniertes Medium wurde einer Reinigung unter Verwendung eines monoklonalen Antikörper-(mAb)-Affinitätsharzes unterzogen. Der monoklonale Anitkörper YZ1 identifiziert ein Epitop auf dem extrazellulären Abschnitt des nativen humanen CR1 (Changelian PS et al., 1985, J. Immunol. 134:1851, Wong, W. et al., 1984, J. Immunol. Methods, 82:303–313). Die Konjugation dieses mAb an Affiges-10 gemäß den Anleitungen des Herstellers (BioRad Corporation, Richmond, CA) ergab eine Affinitätsmatrix, mit der die spezifische Isolation von TP10HD aus konditioniertem Medium, enthaltend Kontaminate von Rinderserum, wie zuvor beschrieben (Yoon et al., supra), möglich war. Kurz gesagt wurde das konditionierte Gewebekulturmedium mit der Affinitätsmatrix bei 4°C über Nacht unter leichtem Vermischen inkubiert. Dieses Gemisch wurde in eine Chromatographie-Säule gegossen und ausführlich mit 10 mM Hepes, 0,1 M NaCl, pH 7-Puffer gewaschen, um alles nicht-spezifisch gebundene Material von der Matrix zu entfernen. Das TP10HD wurde mit 20 mM Natriumphosphat, 0,7 M NaCl, pH 12-Puffer von der Matrix desorbiert und die Säulenfraktionen auf das Vorhandensein von Protein unter Verwendung eines handelsüblichen Assays (Bio-Rad Corporation, Richmond, CA) untersucht. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und bei 4°C gegen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2–7,4, dialysiert. Das Vorhandensein von TP10HD im Präparat wurde mit einem TP10HD-spezifischen Immunoassay bestätigt. Diese Vorgehensweise ergab ein Präparat des TP10HD, das mittels 4–20% linearer Gradienten-SDS-PAGE schätzungszweise zu > 90% rein war.

B. Kornbinationschromatographie

[0071] Konditioniertes Gewebekulturmedium aus Rollflaschen-Kulturen oder Fließbett-Perfusionsbioreaktor-Kulturen wurde durch eine Reihe chromatographischer Schritte verarbeitet. Das konditionierte Medium wurde mit 1 N HCl angesäuert und der pH-Wert auf 5,2 bis 5,5 gesenkt. Während der Ansäuerung wurde das Medium trübe und wurde anschließend durch Filtration durch 0,45- und 0,2-µm-Membranen geklärt. Das angesäuerte, geklärte konditionierte Medium wurde auf eine Kationenaustauscher-Säule, S-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), äquilibriert in Natriumphosphat, 0,02 M, Natriumchlorid, 0,06 M, pH 5,5-Puffer, aufgebracht. Nach Aufbringung der Probe wurde das Waschen der Säule mit dem Ausgangspuffer fortgesetzt, bis die Extinktion zur Grundlinie zurückgekehrt war. Unter diesen Bedingungen banden alle TP10HD-Glycoformen an das Harz, während die Mehrheit der kontaminierenden Proteine aus dem Gewebekulturmedium ungebunden blieb und durch die Säule passierte. TP10HD wurde aus der Säule mit Natriumphosphat, 0,02 M, Natriumchlorid, 0,50 M, pH 8,0-Puffer, eluiert. Die Elution des TP10HD-enthaltenden Pools wurde mittels der Extinktion bei 280 nm überwacht.

[0072] Das S-Sepharose-Eluat wurde mit Ammoniumsulfat zu einer Endkonzentration von 0,8 bis 0,9 M gemischt und auf eine hydrophobe Interaktionssäule (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) aufgebracht, bestehend aus Butyl-Sepharose, äquilibriert mit Natriumphosphat, 0,1 M, Ammoniumsulfat, 0,9 M, pH 7,0-Puffer. Nach Aufbringung der Probe wurde das Waschen der Säule mit dem Ausgangspuffer fortgesetzt, bis die Extinktion zur Grundlinie zurückgekehrt war. Unter diesen Bedingungen banden alle TP10HD-Glycoformen an das Harz, während kontaminierende Proteine ungebunden blieben und durch die Säule passierten. TP10HD wurde aus der Säule mit Natriumphosphat, 0,1 M, pH 7,0-Puffer eluiert; die Entfernung des Ammoniumsulfats aus dem Elutionspuffer bewirkte die Desorption des TP10HD aus dem Harz. Die Elution des TP10HD-enthaltenden Pools wurde mittels der Extinktion bei 280 nm überwacht.

[0073] Das Butyl-Sepharose-Eluat wurde auf eine Größenausschlusssäule (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) aufgebracht, bestehend aus Sephacryl S-300, äquilibriert mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (0,01 M Natriumphosphat, 0,15 M Natriumchlorid), pH 7,2–7,4. Nach Aufbringung der Probe wurde die Elution des TP10HD mittels der Extinktion überwacht. Das Material, das direkt nach dem Ausschlussvolumen der Säule eluierte, wurde gesammelt und die Menge an gereinigtem TP10HD mit einem für TP10HD spezifischen Enzym-Immunoassay bestimmt. Teilmengen wurden bei oder unterhalb von –70°C gefriergelagert. Dieses Protokoll ergab ein Präparat des TP10HD, das mittels 4–20% linearer Gradienten-SDS-PAGE schätzungsweise zu > 90% rein war.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0074] Rekombinante CHO DUX B11-Zellen, die eine modifizierte sCR1-DNA exprimieren und ein sCR1-Protein erzeugen, das als TP10HD bezeichnet wird, können unter Laborbedingungen unter Verwendung z. B. eines Hohlfaser-Bioreaktors oder von Rollflaschen, oder unter großmaßstäblichen Kulturbedingungen, zum Beispiel in einem Fließbett-Perfusionsreaktor, gezüchtet werden, um ein konditioniertes Gewebekulturmedium zu erhalten, das sekretiertes TP10HD enthält. Das sekretierte rekombinante Protein kann mittels verschiedener

Protokolle isoliert werden, spezifisch der Affinitätschromatographie, Kationenaustausch-HPLC, oder einer Kombination der Ionenaustausch-, hydrophoben Interaktions- und Größenausschluss-Chromatographien, um ein gereinigtes Präparat zu erhalten.

BEISPIEL II

IDENTIFIKATION DER FÜR DIE TP10HD-PRÄPARTE CHARAKTERISTISCHEN MOLEKULAREN UNTERSCHIEDE

[0075] Unter verschiedenen Bedingungen erzeugte und mittels multipler Verfahrensweisen gereinigte TP10HD-Präparate umfassen ein Polypeptidrückgrat, das in variierendem Umfang glycosyliert ist.

VERFAHRENSWEISE

[0076] Bei Untersuchung mittels 4–20% SDS-PAGE wurde bei den durch Kationenaustausch-HPLC und durch Kombinationschromatographie, wie in Beispiel I beschrieben, isolierten TP10HD-Präparaten festgestellt, dass sie unterschiedliche apparente Molekulargewichte zeigten. Das mittels Kationenaustausch-HPLC erhaltene Material wies ein geringeres Molekulargewicht von etwa 30 kDa auf als das durch die chromatographischen Methoden hergestellte Material. Wurde jedes Präparat durch n-Glycanase-Verdau deglycosyliert, wie vom Hersteller vorgeschrieben (Genzyme Corporation, Boston, MA; siehe untenstehendes Beispiel VI), so waren die Molekulargewichte auf einen Wert entsprechend dem Beitrag an theoretischem Molekulargewicht der Polypeptidkette zum TP10HD-Molekül von etwa 200 kDa vermindert.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0077] Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die unter verschiedenen Zellkulturbedingungen und mittels multipler Reinigungs-Strategien isolierten TP10HD-Moleküle aus ähnlichen Polypeptidketten zusammensetzten, die in variablen Graden glycosyliert waren, was zu beobachtbaren Unterschieden im Molekulargewicht führte. Dies diente als erster Hinweis darauf, dass verschiedene Glycoformen des TP10HD mit unterschiedlichen Kohlenhydrat-Zusammensetzungen vorlagen.

BEISPIEL III

WEITERER NACHWEIS DER EXISTENZ VON TP10HD-GLYCOFORMEN

[0078] Die HPLC-Analyse ergab, dass sich TP10HD aus einem Gemisch von Glycoformen zusammensetzte, wenn aus konditioniertem Zellkulturmedium unter einer von mehreren verschiedenen Reihen von Bedingungen erzeugt, einschließlich (a) in einem Hohlfaser-Bioreaktor; (b) in Mikroträger enthaltenden Rollflaschen; oder (c) in einem Fließbett-Perfusionsbioreaktor; und wenn entweder durch eine Kombination der Kationenaustausch-, hydrophoben Interaktions- und Größenausschluss-Chromatographien oder durch Aftinitätschromatographie gereinigt.

ANALYTISCHE METHODEN

[0079] Proben des mittels mehrerer verschiedener Schemen gereinigten TP10HDs wurden gegen Natriumphosphat, 20 mM, Natriumchlorid, 30 mM, pH 7,0-Puffer dialysiert und durch eine 0,2 µm-Membran filtriert. Eine Hydropore-SCX-HPLC-Säule, 10 × 100 mm (Rainin Instrument Company, Emeryville, CA) wurde mit demselben Puffer äquilibriert, Proben bei 2 ml/min aufgegeben und das Waschen der Säule mit dem Ausgangspuffer fortgesetzt, bis die Extinktion zur Grundlinie zurückgekehrt war. Die NaCl-Konzentration im Puffer wurde auf 50 mM erhöht, woraufhin die als schwach kationisch definierte TP10HD-Glycoform aus dem Harz eluierte. Nachdem die Extinktion zur Grundlinie zurückgekehrt war, wurde die stark kationische Glycoform mit einem linearen NaCl-Gradienten, 50 × 250 mM, eluiert. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 1 gezeigt.

[0080] Unter diesen Anwendungsbedingungen banden alle Glycoformen von TP10HD an das Harz. Das direkt durch die Säule wandernde unabsorbierte Material wurde als ein Nicht-Protein, Nicht-TP10HD-Kontaminante, und höchstwahrscheinlich als zelluläre DNA, auf der Grundlage der folgenden Kriterien nachgewiesen: (a) es absorbierte Licht im ultravioletten Spektrum; (b) es war in chemischen Assays zum Nachweis von Protein nicht reaktiv; (c) es war mit Protein-spezifischen Anfärbemitteln nicht reaktiv, die zur Sichtbarmachung von Materialien bei SDS-PAGE eingesetzt werden; und (d) es war in einem TP10HD-spezifischen Immunoassay nicht reaktiv.

[0081] Nach der Aufbringung wurde die NaCl-Konzentration im Puffer auf 50 mM erhöht, woraufhin die als

schwach kationischen Glycoformen definierten TP10HD-Moleküle aus dem Harz eluierten. Das gesamte Material, das als die schwach kationischen Glycoformen eluierte, war in einem spezifischen Immunosasay als TP10HD identifizierbar. Schließlich wurden fester gebundene Proteine aus dem Harz eluiert, indem die Konzentration von NaCl in einer linearen Weise erhöht wurde. Bei einer NaCl-Konzentration von ~125 mM wurden die als stark kationische Glycoformen definierten TP10HD-Moleküle eluiert (**Fig.** 1). Das gesamte, als der stark kationischen Glycoform eluierende Material war in einem spezifischen Immunoassay als TP10HD identifizierbar.

MITTELS AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE GEREINIGTES TP10HD

[0082] Durch Affinitätschromatographie gereinigtes TP10HD-Material enthielt bei Analyse mittels des HPLC-Kationenaustausch-Verfahrens vielfache Glycoformen. Die in **Fig.** 1A gezeigte Extinktionspur weist nach, dass die dominierenden Glycoformen stark kationisch waren (d. h. bei etwa 125 mM NaCl eluierten).

MITTELS KOMBINATIONSCHROMATOGRAPHIE GEREINIGTES TP10HD

[0083] Durch Analyse mittels des HPLC-Kationenaustausch-Verfahrens wurde beim aus dem Fließbett-Perfusionsbioreaktor stammenden Material ein Gehalt an multiplen Glycoformen von TP10HD nachgewiesen. Die Konzentrationsverhältnisse von schwach kationischen Glycoformen zu stark kationischen Glycoformen lagen im Bereich von 70 : 30 bis 80 : 20 (**Fig.** 1B). Bei dem aus den Rollflaschenkulturen stammenden Material wurde ebenfalls ein Gehalt an multiplen Glycoformen von TP10HD nachgewiesen, wobei das Verhältnis von schwach kationischen Glycoformen zu stark kationischen Glycoformen 76 : 24 betrug.

MITTELS HPLC-KATIONENAUSTAUSCH-CHROMATOGRAPHIE GEREINIGTES TP10HD

[0084] Von diesem Material wurde gezeigt, dass es lediglich die stark kationische Glycoform von TP10HD enthielt (**Fig.** 1C). Wie zuvor beschrieben (Internationale Patentveröffentlichung WO 89/09220 und WO 91/05047; Weisman HF et al., 1990, Science 249 : 146; Yeh CG et al., 1991, J Immunol 146:250), zeigte das in dieser Weise isolierte Material die funktionellen in vitro- und in vivo-Eigenschaften von humanem sCR1-Protein.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0085] Diese Ergebnisse zeigten, dass vielfache, durch Kationenaustausch-Chromatographie unterscheidbare TP10HD-Glycoformen im konditionierten, aus Fließbett-Perfusionsbioreaktoren, Rollflaschenkulturen und aus Hohlfaser-Bioreaktoren stammendem konditioniertem Medium vorliegen, obschon die Anteile der verschiedenen Glycoformen in den verschiedenen Quellenmedien signfikant variieren können.

BEISPIEL IV

ISOLIERUNG DER GEREINIGTEN PRÄPARATE DER SCHWACH UND STARK KATIONISCHEN GLYCOFORMEN

[0086] Präparate von schwach und stark kationischen Glycoformen können mittels HPLC hergestellt werden.

VERFAHREN

[0087] Die präparative HPLC wurde auf einer 21,4 mm × 100 mm-Sulfopropyl-substituierten Ionenaustauscherharz-Säule (Hydropore-SCX, Rainin Instrument Company, Inc., Emeryville, CA) durchgeführt. Die Säule wurde in 20 mM Natriumphosphat, 30 mM NaCl, pH 7,0-Puffer, äquilibriert. Eine Probe von durch Kombinationschromatographie gereinigtem TP10HD, wie oben beschrieben, wurde gegen denselben Puffer vor der Verwendung dialysiert. Nach Aufbringung der Probe wurde die Entwicklung der Säule typischerweise für 20 Minuten mit demselben Puffer fortgesetzt, um nicht-spezifisch gebundene Proteine aus dem Harz auszuwaschen. Der Puffer wurde gegen 20 mM Natriumphosphat, 50 mM NaCl, pH 7,0 ausgetauscht und die Entwicklung üblicherweise für weitere 20 Minuten fortgesetzt, bis die Gesamtmenge der schwach kationischen Glycoform aus der Säule eluiert war. Schließlich wurde die Entwicklung der Säule mit einem linearen 50- bis 250 mM-NaCl-Gradienten (20 mM Natriumphosphat, pH 7,0-Puffer) abgeschlossen. Die stark kationische Glycoform eluierte typischerweise aus der Säule bei ~125 mM NaCl:

ERGEBNISSE

[0088] Bei einem typischen Präparat wurde eine 125-ml-Probe, die etwa 100 mg TP10HD enthielt, auf die Säule aufgebracht. Die Fraktionen entsprechend den schwachen (TP10HD-CCW) und starken (TP10HD-CCS) kationischen Glycoformen wurden wie angegeben gepoolt und die Menge an TP10HD mit einem TP10HD-spezifischen Immunoassay bestimmt.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0089] Ausreichende Mengen der vielfachen Glycoformen von TP10HD wurden isoliert, um funktionelle in vitro- und in vivo-Untersuchungen und ausführliche biochemische Analysen zu ermöglichen.

BEISPIEL V

TRENNUNG DER TP10HD-GLYCOFORMEN DURCH KATIONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE MIT S-SEPHAROSE NACH TP10HD-REINIGUNG

[0090] Das oben beschriebene Kationenaustausch-HPLC-Reinigungsprotokoll trennte die Glycoformen von TP10HD in zwei Fraktionen auf (siehe z. B. **Fig.** 1B), nämlich einen Peak, bezeichnet als "Peak 2" (stärker glycosyliertes Material), bei welchem es sich um den zweiten Peak von links handelt, und "Peak 3" (weniger stark glycosyliertes Material), bei welchem es sich um den Peak rechts außen handelt. Das Ausgangsprotokoll wurde unter Verwendung einer HPLC-Kationenaustauscher-Säule, Hydropore-SCX, bezogen von Rainin Instruments, entwickelt. Es wurde beobachtet, dass über einen längeren Zeitraum hinweg die Ergebnisse dieses chromatographischen Schritts variabel wurden. Diese Unstimmigkeit wurde einer beschränkten Nutzdauer dieser HPLC-Säule unter den Bedingungen ihrer Verwendung und Lagerung zugeschrieben.
[0091] Die vorliegenden Erfinder suchten daher nach einer alternativen Reinigungsmethode zur Trennung der sCR1-Glycoformen, die konsistenter über die Zeit reproduzierbar war. Statt die von verschiedenen anderen Zulieferern beziehbaren HPLC-Säulen auszuwerten, wurde ein konventionelles Kationenaustauscherharz, S-Sepharose Fast Flow-Harz (Pharmacia) zum Testen ausgewählt. Dieses Harz wurde in erster Linie deshalb ausgewählt, weil die funktionelle Gruppe an S-Sepharose dieselbe wie die funktionelle Gruppe der oben beschriebenen Hydropore-SCX-Säule ist. Der einzige Unterschied zwischen diesen Harzen besteht in der Trägermatrix: Agarose (S-Sepharose) gegenüber einem Packmaterial auf Kieselgel-Basis, bedeckt mit einer hydrophilen Polymerschicht (SCX).
[0092] Eine 2,5 cm-Kontes-Flex-Säule wurde mit S-Sepharose bei Packgrößen von 2,5 × 1,8 cm und einem In-Line-UA-6-UV-Monitor (Isco) präpariert.
[0093] Das bei dieser Untersuchung getestete TP10HD-Material wurde unter Verwendung des Fließbett-Perfusionsbioreaktors (Verax System S200; siehe oben) hergestellt und wies eine Proteinkonzentration von 5,5 mg/ml auf. Das aus dem konzentrierten konditionierten Zellkulturmedium erhaltene TP10HD-Material wurde vor der vorliegenden Untersuchung einer Reihe von Reinigungsschritten unterzogen (siehe US-Patent Nr. 5.252.216).
[0094] Zunächst wurde das rohe Medium einer Kationenaustausch-Chromatographie auf S-Sepharose unterzogen und mit 20 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, pH 7,0, eluiert. Das eluierte Protein wurde mit Ammoniumsulfat ausgefällt, wieder angelöst und an einen hydrophoben interaktionschromatographischen Träger, eine Butyl-TOYOPEARL-Säule, äquilibriert mit 0,8 M $(NH_4)_2SO_4$ in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,0, adsorbiert. Das gewünschte Material wurde mit 0,7 M $(NH_4)_2SO_4$ in 100 mM Natriumphosphat, pH 7,0, eluiert. Das Eluat wurde an einen Anionenaustausch-Träger, DEAE-TOYOPEARL, adsorbiert, eluiert und einem zweiten Kationenaustausch-chromatographischen Schritt unter Verwendung eines TOYOPEARL CM 650S-Trägers unterzogen. Das Protein wurde mit 5 Säulenvolumina eines linearen Gradienten von 0 bis 250 mM NaCl in 50 mM MES/MES·Na, pH 5,5, eluiert und mit 1/10 Volumen an dibasischem 0,5 M Na-Phosphat neutralisiert. Das TOYOPEARL CM-Produkt wurde dann einer Größenausschluss-Chromatographie auf einer Säule aus TOYOPEARL HW65S unterzogen, die vorab mit 10 mM Natriumphosphat, 0,9% Gew/Vol NaCl, pH 7, äquilibriert worden war. Der gesamte Produktpeak wurde gesammelt und zur Lagerung konzentriert. Das TP10HD-Material war nun zum Testen bei der vorliegenden Untersuchung bereit.
[0095] Die folgenden Puffer wurden für die S-Sepharose-Fraktionierung verwendet:
Äquilibrations- und Waschpuffer – 20 mM Na-Phosphat, 30 mM NaCl, pH 5,2; Waschpuffer 2 und Puffer A – 20 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 7,0; Puffer B – 20 mM Na-Phosphat, 250 mM NaCl, pH 7,0.
[0096] Eine Probe von 1,5 ml gereinigtem TP10HD (8,25 mg Protein) wurde auf die vorab auf pH 5,2 äquilibrierte S-Sepharose-Säule aufgebracht. Die Säule wurde dann gewaschen, bis der Ablauf Grundlinien-Ablesewerte (A_{280}) ergab. Die Säule wurde dann mit 2,5 Bettvolumina an Waschpuffer 2 gewaschen. Ein linearer Gradient (10 Bettvolumina) von Puffer A und Puffer B (50 bis 250 mM NaCl) wurde aufgebracht. Die eluierte

TP10HD-Fraktion wurde als ein einzelner Pool auf der Grundlage der UV-Extinktion gesammelt. Die Protein-Konzentration jeder Fraktion wurde anhand von A_{280} unter Anlegung eines Extinktionskoeffizienten für eine 1% Lösung E (1%/280) gleich 10 cm^{-1} bestimmt.

ERGEBNISSE

[0097] Die Ergebnisse sind in **Fig.** 2 und 3 gezeigt. Der in **Fig.** 2 gezeigte kleinere Peak, bezeichnet als Pool 1, entsprechend dem "Peak 2" in **Fig.** 1B, stellte 2% der aufgebrachten Probe dar. Der größere Peak in **Fig.** 2, bezeichnet als Pool 2 (entsprechend "Peak 3" in **Fig.** 1b) stellte etwa 89% der aufgebrachten Probe dar.
[0098] An den oben genannten beiden Pools wurde eine SDS-PAGE vorgenommen. Die Ergebnisse sind in **Fig.** 3 gezeigt. Das Material in Pool 1 zeigte auf SDS-PAGE hin ein höheres Molekulargewicht als das Material in Pool 2.

SCHLUSSFOLGERUNG

[0099] Ausgehend von den obigen Ergebnissen wurde schlussgefolgert, dass eine Nicht-HPLC-Kationenaustausch-chromatographische Methode unter Verwendung von S-Sepharose ein nützliches Mittel zur reproduzierbaren Auftrennung zweier Haupt-Glycoform-Fraktionen von TP10HD darstellte und gegenüber der oben beschriebenen HPLC-SCX-Säulenmethode bevorzugt war. Dieser Reinigungsschritt konnte, wie hierin, nach einer vielstufigen Reinigung von TP10HD aus konditioniertem Medium vorgenommen werden. Alternativ konnte der anfängliche S-Sepharose-Schritt im vielstufigen Reinigungsverfahren zur Auftrennung der verschiedenen Glycoformen eingesetzt und die weitere Reinigung dieser Glycoformen unabhängig vorgenommen werden.

BEISPIEL VI

PHARMAKOKINETISCHE STUDIEN DER sCR1-GLYCOFORMEN

[0100] Die Plasma-pharmakokinetischen Halbwertszeiten und/oder Abgaberaten der verschiedenen Glycoform-Präparate wurden bestimmt. Die schwach kationische Glycoform zeigte eine erhöhte Plasma-Halbwertszeit und/oder niedrigere Gesamtabgaberaten im Vergleich zur stark kationischen Glycoform, wobei beide Glycoformen signifikant größere Plasma-Halbwertszeiten und/oder niedrigere Gesamtabgaberaten als enzymatisch deglycosylierte Glycoform-Präparate zeigten.

MATERIALIEN UND METHODEN

A. Quellen des Studienmaterials

[0101] Siehe den obigen Abschnitt der Definitionen für eine Definition der verschiedenen TP10HD-Präparate (TP10HD-CX, TP10HD-CC, TP10HD-CCW, TP10HD-CCS und TP10HD-CXD). Das Testmaterial wurde wie in Beispiel 1 beschrieben gereinigt.

B. Pharmakokinetische Studien

[0102] Die neun verschiedenen pharmakokinetischen Studien sind in der unten stehenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2

STUDIE #	MATERIAL	TIER-SPEZIES
1	TP10HD-CX	Ratten
2	TP10HD-CX	Kaninchen
3	TP10HD-CC	Schweine
4	TP10HD-CC	Ratten
5	TP10HD-CCW	Ratten
6	TP10HD-CCW	Kaninchen
7	TP10HD-CCS	Ratten
8	TP10HD-CCS	Kaninchen
9	TP10HD-CXD	Ratten

C. Iodierung des Studienmaterials

[0103] In Studien 1, 2, 4, 5, 7 und 9 wurde eine Iodierung mittels des Chloramin-T-Verfahrens durchgeführt. Natriumphosphat-Puffer, 0,5 M, pH 7,6, 50 µl, wurde 1 mCi an Na-^{125}I (New England Nuclear, Boston, MA), wie geliefert, zugegeben. Die Probe von TP10HD, typischerweise 100 µg in 100 µl (Studie 5 = 69 µg: Studie 7 = 34 µg; Studie 9 = 91 µg) wurde zugegeben, gefolgt von 50 µl einer 15 mg/ml-Lösung von frisch zubereitetem Chloramin-T. Das Reaktionsgemisch wurde 60 Sekunden lang kräftig geschüttelt. Natriummetabisulfit (50 µl, 15 mg/ml) und Natriumiodid (100 µl, 10 mg/ml) wurden nacheinander in die Reaktionsphiole pipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf eine PD10-Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) aufgebracht, die mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung, pH 7,2 bis 7,4, enthaltend 0,1% Rinderserumalbumin (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) voräquilibriert war. Zehn 0,5-ml-Fraktionen wurden abgesammelt und 2-µl-Teilmengen direkt und nach Kombinieren mit 100 µl einer 0,1% Rinderserumalbuminlösung und 1 ml an 20% Trichloressigsäure ausgezählt. Nach Inkubation bei 0°C für 1 Stunde wurde die mit dem Säure-ausfällbaren Protein verbundene Radioaktivität mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 × g gesammelt und mittels Szintillationszählung quantifiziert. Die > 90% der Gesamtradioaktivität im Säurepräzipitat enthaltenden Fraktionen wurden zur weiteren Verwendung gepoolt.
[0104] In Studien 6 und 8 wurde die Iodierung mittels der Iodogen-Methode (Fraker et al., 1978, Biochem Biophys Res Commun 80:849) vorgenommen; das durchschnittliche Maß der ^{125}I-Substitution betrug 0,56 Atome/Molekül des Proteins, was eine spezifische Aktivität von 22,7 kBq/mg bei Studie 6 ergab, und das durchschnittliche Maß der ^{125}I-Substitution für Studie 8 betrug 0,76 Atome/Molekül des Proteins, was eine spezifische Aktivität von 29,5 kBq/mg ergab.

D. Zubereitung der Dosierungslösung

[0105] Studie 1: Radioiodiertes TP10HD-CX wurde mit gereinigtem unmarkiertem TP10HD-CX vermischt, um eine zur Verabreichung einer 1 mg/kg Gesamt-TP10HD-Dosis geeignete Dosierungslösung, die 16 – 25 × 10^6 cpm radiomarkiertes TP10HD-CX enthielt, zu erreichen.
[0106] Studie 2: Radioiodiertes TP10HD-CX, ~5% Gew/Gew wurden mit gereinigtem TP10HD-CX vermischt, was eine Dosierungslösung ergab, die 1 mg/ml TP10HD-CX in 0,1 M Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,4-Puffer enthielt.
[0107] Studie 3: TP10HD-CC wurde wie bezogen bei einer Enddosis von 1 mg/kg verabreicht. Studie 4: Radioiodiertes TP10HD-CC wurde mit gereinigtem unmarkiertem TP10HD-CC vermischt, um eine Dosierungslösung zu erhalten, die zur Verabreichung einer 1 mg/kg oder einer 3 mg/kg Gesamt-TP10HD-Dosis, enthaltend ~20 × 10^6 cpm, geeignet war.
[0108] Studie 5: Radioiodiertes TP10HD-CCW wurde mit gereinigtem unmarkiertem TP10HD-CCW vermischt, was eine Dosierungslösung ergab, die zur Verabreichung einer 1 mg/kg Gesamt-TP10HD-Dosis, enthaltend ~20 × 10^6 cpm, geeignet war.
[0109] Studien 6 und 8: Wie in Studie 2 beschrieben, außer, dass das radioiodierte TP10HD-CCW ~1% Gew/Gew zugegeben wurde.
[0110] Studie 7: Radiomarkierter TP10HD-CCS wurde mit gereinigtem unmarkiertem TP10HD-CCS vermischt, um eine Dosierungslösung zu erhalten, die zur Verabreichung einer 1 mg/kg Gesamt-TP10HD-Dosis, enthaltend ~20 × 10^6 cpm, geeignet war.
[0111] Studie 9: Radioiodiertes TP10HD-CXD wurde mit gereinigtem unmarkiertem TP10HD-CXD vermischt, um eine Dosierungslösung zu erhalten, die zur Verabreichung einer 1 mg/kg Gesamt-TP10HD-Dosis, enthaltend ~20 × 10^6 cpm, geeignet war.

E. Protokolle

[0112] Bei Studien 1, 4, 5, 7 und 9 wurde das Testmaterial intravenös (iv) in vier Spraque-Dawley-Ratten (2 männliche, 2 weibliche) injiziert. Blutproben wurden vom retroorbitalen Plexus 1, 3, 5, 10, 20, 30, 45 und 60 Minuten nach Injektion genommen und die Radioaktivität bestimmt. Zusätzliche Blutproben nach der Infusion wurden 2, 3 und 4 Stunden nach Injektion (Studie 4) und nach 120 Minuten (Studie 5) genommen. Die Plasmafraktion der verbliebenen Blutprobe wurde zur weiteren Analyse rückbehalten.
[0113] Die Plasmaproben wurden auf restliches Testmaterial analysiert, indem folgendes gemessen wurde:
(1) restliche Gesamtradioaktivität;
(2) prozentualer Anteil des mit TCA ausgefällten radiomarkierten Materials;
(3) restliche Säure-ausfällbare Radioaktivität in Gegenwart von SDS; und
(4) in einem Enzymimmunoassay als TP10HD immunologisch identifizierbares Material.

[0114] Die Radioisotopen-Daten wurden als Gesamt-cpm/ml Blut oder Plasma und als dem Prozentsatz ei-

nes theoretischen Nullzeitwerts quantifiziert. Die pharmakokinetische Halbwertszeit wurde aus den radiometrischen Daten errechnet.

[0115] In Studie 2 wurde das Testmaterial zwei Gruppen von fünf männlichen Dutch-Kaninchen (etwa 1 kg) bei einer Dosis von 1 mg/kg iv injiziert. Blutproben von 2 ml wurden aus einer Ohrarterie unmittelbar vor Dosierung und nach 5, 10, 20, 45, 60, 120 und 180 Minuten entnommen und mit Heparin vermischt (Endkonzentration 25 µg/ml). Die Radioaktivität wurde in einer Teilmenge mittels Szintillationszählung bestimmt, und das durch Zentrifugation bei 2000 × g für 5 Minuten erhaltene Plasma bei –40°C gelagert.

[0116] Die Plasmaproben wurden auf das restliche Testmaterial mittels eines funktionellen in vitro-Assays, der Hemmung der Hämolyse von Antikörper-beschichteten roten Schafsblutzellen (SRBC) durch humanes Komplement analysiert. Die pharmakokinetische Halbwertszeit wurde aus dem Titer der funktionellen Restaktivität errechnet.

[0117] In Studie 3 wurde das Testmaterial Ferkeln in einem Gewichtsbereich von 4,5 bis 6,1 kg durch eine Drosselvenen-Kanüle iv injiziert. Die Blutproben wurden über eine zuvor implantierte Drosselvenen-Kanüle in Spritzen entnommen, die Lithiumheparin bei einer Endkonzentration von 15 Einheiten/ml enthielten. Eine Präinfusionsprobe von 10 ml wurde zum Zeitpunkt Null entnommen, und Postinfusionsproben von 1,0 ml wurden nach 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 300, 360 Minuten und 24 Stunden entnommen. Antikoagulierte Blutproben wurden bei ~3000 UpM, 4°C, 5 Minuten lang zentrifugiert und das Blutplättchen-arme Plasma in Teilmengen aufgeteilt und bei oder unterhalb von –70°C gelagert.

[0118] Die Plasmaproben wurden auf das restliche Testmaterial mittels eines funktionellen in vitro-Assays wie oben unter Verwendung von Schweine- anstelle von humanem Komplement analysiert. Die pharmakokinetische Halbwertszeit wurde aus dem Titer der funktionellen Restaktivität errechnet.

[0119] In Studien 6 und 8 wurde das Testmaterial einer Gruppe von 5 Dutch-Kaninchen (etwa 1 kg) bei einer Dosis von 1 mg/kg iv injiziert. Die Blutproben von 1 ml wurden aus einer Ohrarterie unmitelbar vor der Dosierung und nach 5, 10, 20, 30, 60, 120 und 180 Minuten entnommen, mit Heparin vermischt und die Radioaktivität in einer Teilmenge mittels Szintillationszählung nach Ausfällung mit Trichloressigsäure bestimmt.

[0120] Die Plasmaproben wurden auf das restliche Testmaterial mittels eines für TP10HD spezifischen Enzymimmunoassays (EIA) analysiert. Die pharmakokinetische Halbwertszeit wurde sowohl aus den radiometrischen als auch den Immunoassay-Daten errechnet.

F. N-Glycanasenbehandlung

[0121] In Studie 9 wurde die Entfernung der N-gebundenen Oligosaccharidketten durch n-Glycanase-Verdau gemäß den Anleitungen des Herstellers (Genzyme Corporation, Boston, MA) vorgenommen. Typischerweise wurden 58 µg TP10HD-CX mit 10,5 Einheiten n-Glycanase für 18 Stunden, bei 37°C in 0,2 M Natriumphosphat, pH 8,6-Puffer, inkubiert.

G. Säureausfällung

[0122] Die Ausfällung mit Trichloressigsäure wurde wie folgt vorgenommen: Plasma (20 µl) wurde durch aufeinanderfolgende Zugabe von 450 µl an 0,13 M Tris HCl, 4% SDS, 10 % Glycerol, pH 6,8-Puffer, ausgefällt, gefolgt von 30 µl fötalem Rinderserum und 500 µl an 20% Trichloressigsäure. Nach jeder Zugabe wurden die Röhrchen kräftig vermischt und 72 Stunden lang bei 4°C inkubiert; die Pellets des ausfällbaren Proteins durch Zentrifugation bei 1000 × g für 10 Minuten abgesammelt, die Überstände entfernt und entsorgt und die Restradioaktivität mittels Szintillationszählung gemessen.

N. Enzymimmunoassay

[0123] Es wurde ein handelsüblicher Assay verwendet (Cellfree® CD35, T Cell Diagnostics, Inc. Cambridge, MA). Kurz gesagt wurden die mit polyklonalen Kaninchen-Anti-TP10ND-Antikörpern beschichteten Polystyrol-Kügelchen gleichzeitig mit der verdünnten Testprobe und einem Meerrettichperoxidase-konjugierten polyklonalen Kaninchen-Anti-TP10HD-Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen aus dem Reaktionsgemisch entfernt, das nicht-spezifisch gebundene Material ausgewaschen und anschließend in Gegenwart einer geeigneten Verdünnung des Substrats inkubiert. Die Farbentwicklung wurde durch Zugabe von Schwefelsäure beendet und die Extinktion (optische Dichte) als ein Maß der TP10ND-Konzentration bestimmt.

I. Hämolyse-Assay

[0124] Kaninchen-Plasmaproben wurden bei 56°C für 1 Stunde in Gegenwart von Methylamin (12,5 mM) erhitzt, um die Thioestergruppen zu amidieren und die endogenen Komplement-Komponenten C3 und C4 zu inaktivieren. Diese Vorgesehensweise schaltete die endogene Kaninchen-Komplementaktivität in den Testpro-

ben ohne wesentliche Beeinflussung der Aktivität von TP10HD aus. Die Testproben wurden dann 1 : 50 mit 0,1 Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,4-Puffer verdünnt und untersucht.

[0125] Mit Kaninchen-Anti-SRBC-Antikörper (Diamedix, Miami, FL) vorsensibilisierte SRBC wurden in V-bödigen Mikrotiter-Wells (Costar, Cambridge, MA) bei einer geeigneten Verdünnung des Testplasmas und einer Teilmenge an verdünntem Humanserum als einer Komplementquelle vermischt. Nach der Inkubation bei 37°C für 1 Stunde wurden die unlysierten roten Zellen durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand in entsprechende flachbödige Mikrowells (Costar, Cambridge, MA) übertragen und die Extinktion bei 415 nm gemessen. Die Hemmung der Komplement-vermittelten Lyse der Antikörper-beschichteten SRBC wurde als eine Verminderung der Extinktion in Gegenwart der Testprobe gemessen. Standardkurven mit bekannten Mengen an TP10HD können zur Kalibrierung des Assays herangezogen werden, so dass die Ergebnisse als im Plasma verbliebene mg/ml TP10HD gegenüber der Zeit ausdrückbar sind.

Studie 3. Hämolytischer Assay

[0126] Vor der Infusion mit TP10HD-CC wurde jedem Schwein Plasma zur Verwendung als ein Proben-Verdünnungsmittel und als Komplement-Quelle für den Hämolyse-Assay entnommen. Die Testproben wurden mindestens von 1 : 50 mit 0,1 M Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,4-Puffer, verdünnt. Für eine stärkere Verdünnung wurden die Testproben mit bereits 1 : 50 im gleichen Puffer verdünntem Präinfusions-Plasma verdünnt, wodurch die endgültige Plasmakonzentration bei 1 : 50 gehalten wurde. Bei dieser Verdünnung war der Grad der Hämolyse gleich der Hämolyse mit humanem Komplement, wie oben beschrieben. Die weiteren Manipulationen waren dieselben wie oben beschrieben. Standardkurven mit bekannten Mengen an TP10HD können zur Kalibrierung des Assays verwendet werden, so dass die Ergebnisse als im Plasma verbliebene µg/ml TP10HD gegenüber der Zeit ausdrückbar sind.

ERGEBNISSE

[0127] Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Studien sind in Tabellen 3 bis 7 dargestellt. Bei den Studien 1, 4, 5, 7 und 9 an Ratten wurden die Abgaben aus dem Blut von ^{125}I-TP10HD-CX, ^{125}I-TP10HD-CC, ^{125}I-TP10HD-CCW, ^{125}I-TP10HD-CCS bzw. ^{125}I-TP10HD-CXD bestimmt. Aus dem retroorbitalen Plexus jeder Ratte wurde Vollblut (~300 µl) entnommen. 100 µl-Duplikat-Proben von jedem Zeitpunkt wurden ausgezählt, nach Gruppe gemittelt und zu cpm/ml normalisiert. Die Proben von jedem Zeitpunkt wurden mit TCA in Gegenwart von SDS ausgefällt, gezählt, nach Gruppe gemittelt und zu cpm/ml normalisiert. Die Abgabe wurde anhand der gesamten TCA-ausfällbaren Zählungen von ^{125}I-markiertem Material und mittels EIA bestimmt. Die in Tabelle 3 gezeigten Ergebnisse geben ein zweiphasiges Abgabemuster in jeder Studie mit einer kurzen α-Phasen-Halbwertszeit und einer längeren β-Phasen-Halbwertszeit wieder.

Tabelle 3

Zweiphasige Abgabe-Profile				
STUDIE #	TIERE	MATERIAL	α-PHASE (min)	β-PHASE (min)
1	Ratten	TP10HD-CX	4,3	167
2	Kaninchen	TP10HD-CX	9-11	
3	Schweine	TP10HD-CC	8,3	360
4	Ratten	TP10HD-CC		
		(1 mg/kg)	9,2	181,1
		(3 mg/kg)	9,8	267,1
5	Ratten	TP10HD-CCW	12,21	100
6	Kaninchen	TP10HD-CCW	8	216
7	Ratten	TP10HD-CCS	6,64	133
8	Kaninchen	TP10HD-CCS	6	216
9	Ratten	TP10HD-CXD	<1	6,1

Tabelle 4

Serum-Pharmakokinetik von TP10HD-CX in Kaninchen (STUDIE 2)			
Messung	Einheiten	Gruppe 1	Gruppe 2
Serum-Halbwertszeit	Min	9,1 ± 1,4	11,1 ± 1,2
Verteilungsvolumen	ml/kg	67,0 ± 9,0	44,6 ± 3,7
Peak-(t=0)-Konz.	µg/ml	16,5 ± 2,4	23,7 ± 1,7
Gesamtabgabe	ml/min/kg	5,8 ± 1,2	2,9 ± 0,1

Tabelle 5

Serum-Pharmakokinetik von TP10HD-CC in Schweinen (STUDIE 3)		
Messung	Einheiten	Mittelwert (8 Tiere)
Serum-Halbwertszeit, α-Phase	min	8,3
Serum-Halbwertszeit, β-Phase	min	363
Verteilungsvolumen, α-Phase	ml/kg	36
Verteilungsvolumen, β-Phase	ml/kg	73
Peak-(t=0)-Konzentration	µg/ml	29,3
Gesamtabgabe	Ml/min/kg	0,24

[0128] Die 24 Stunden nach Dosierung gezogenen Plasmaproben ergaben Mengen an TP10HD-CC, die nicht von den Kontrollmengen unterscheidbar waren. Die pharmakokinetischen Parameter für die Abgaberate, das Kompartmentvolumen, die Geschwindigkeitskonstanten und die Halbwertszeit wurden durch Anpassung der Daten für jedes Schwein an Zwei- und Drei-Kompartment-Modelle erhalten. Die statistische Analyse zeigte, dass bei einigen Schweinen ein Drei-Kompartment-Modell eine bessere Passung ergab, wohingegen bei anderen Schweinen ein Zwei-Kompartment-Modell besser geeignet war; um Komplexitätsdaten für all die Schweine zu vermeiden, wurden die Daten unter Verwendung eines Zwei-Kompartment-Modefis verarbeitet. Die mittlere Halbwertszeit wurde mit 8,3 Minuten für die α-Phase und 6 Stunden für die β-Phase befunden. Diese Phasen stellen 69% bzw. 31% der verabreichten Dosis dar, so dass etwa ein Drittel der Dosis langsam abgegeben wurde.

[0129] Diese Studie zeigte, dass das TP10HD-CC-Präparat ein deutlich zweiphasiges Abgabemuster zeigte, bei welchem die β-Phase sehr viel langsamer als die α-Phase war. Diese Ergebnisse stimmen mit der differentiellen Abgabe der Glycoform-Populationen überein, wobei einige sehr langsame Spezies entfernt wurden.

[0130] Die Ergebnisse der Studie 6 sind in der untenstehenden Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6

Serum-Pharmakokinetik von TP10HD-CCW in Kaninchen (Studie 6)			
Messung	Einheiten	radiometrische Daten	Immunoassay-Daten
Serum-Halbwertszeit, α-Phase	min	7,8 ± 0,5	14
% abgegebene Dosis, α-Phase		3,0, ± 1,5	30
Serum-Halbwertszeit, β-Phase	min	216,6 ± 18,8	376
% abgegebene Dosis, β-Phase		69,1 ± 1,9	70
Verteilungsvolumen, α-Phase	ml/kg	56,2 ± 1,0	
Verteilungsvolumen, β-Phase	ml/kg	22,6 ± 1,9	
Peak-(t=0)-Konzentration	µg/ml	17,8 ± 0,3	
Gesamtabgabe	ml/min/kg	0,26 ± 0,02	0,1

[0131] Die pharmkakinetische Halbwertszeit von TP10HD-CCW, wie mittels radiometrischer Analyse bestimmt, betrug etwa 8 Minuten für die α-Phase und 216 Minuten für die β-Phase. Etwa 30% der Gesamtdosis wurden während der schnellen α-Phase abgegeben und 70 der Gesamtdosis während der langsameren β-Phase. Die Gesamtabgaberate für diese Glycoform betrug 0,26 ml/min/kg, und das Kompartmentvolumen für die β-Phase betrug ~23 ml/kg.

[0132] Die Ergebnisse aus Studie 8 sind in der untenstehenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7

Serum-Pharmakokinetik von TP10HD-CCS in Kaninchen (Studie 8)			
Messung	Einheiten	radiometrische Daten	Immunoassay-Daten
Serum-Halbwertszeit, α-Phase	Min	6,0 ± 0,4	10
% abgegebene Dosis, α-Phase		74,5 ± 1,4	73
Serum-Halbwertszeit, β-Phase	Min	216,5 ± 36,8	76
% abgegebene Dosis, β-Phase		25,5 ± 1,5	27
Verteilungsvolumen, α-Phase	ml/kg	69,8 ± 4,8	
Verteilungsvolumen, β-Phase	ml/kg	162,0 ± 13,9	
Peak-(t=0)-Konzentration	µg/ml	14,6 ± 1,0	
Gesamtabgabe	ml/min/kg	0,85 ± 0,12	1,24

[0133] Die mittels radiometrischer Analyse bestimmte pharmakokinetische Halbwertszeit von TP10HD-CCS betrug etwa 6 Minuten für die α-Phase und 216 Minuten für die β-Phase. Etwa 75% der Gesamtdosis wurden während der schnellen α-Phase abgegeben, 25% der Gesamtdosis dagegen während der langsameren β-Phase. Die Gesamtabgaberate für diese Glycoform betrug 0,85 ml/min/kg, und das Kompartmentvolumen für die β-Phase betrug ~162 ml/kg.

[0134] In Studie 9 betrug die mittels radiometrischer Analyse bestimmte pharmakokinetische Halbwertszeit von TP10HD-CXD < 1 Minute für die α-Phase und 6,1 Minuten für die β-Phase.

ZUSAMMENFASSUNG

[0135] Die oben vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass gereinigte Präparate des TP10HD Glycoformen enthalten, die hinsichtlich der Abgaberaten voneinander abweichen. Die Schlussfolgerung, dass diese Unterschiede auf Abweichungen bei der Glycosylierung zurückzuführen sind, stimmt mit den folgenden Ergebnissen überein:

(1) Die Deglycosylierung von gereinigten TH10HD-Präparaten ergibt Moleküle mit einem gemeinsamen Molekulargewicht, was beweist, dass die Polypeptidketten aller TP10HD-Präparate identisch sind;

(2) deglycosyliertes TP10HD wird schnell abgegeben; und

(3) TP10HD-Präparate, die durch höhere Molekulargewichte aufgrund einer erhöhten Glycosylierung gekennzeichnet sind (z. B. die TP10HD-Präparate CC und CCW), ergeben längere Plasma-Halbwertszeiten und/oder niedrigere Gesamtabgaberaten als die Präparate mit niedrigeren Molekulargewichten, was an geringeren Glycosylierungsgraden liegt (zum Beispiel Präparate CX und CCS).

[0136] Ein Vergleich der Ergebnisse aus Studien 6 und 8 zeigt, dass der primäre Unterschied zwischen den Präparaten TP10HD-CCW und TP10HD-CCS nicht in den die zweiphasige Abgabe charakterisierenden Halbwertszeiten liegt, doch im Anteil an Material, das langsam abgegeben wird (ein höherer Anteil bei TP10HD-CCW).

[0137] Wie unten angegeben, verdeutlicht eine detaillierte Kohlenhydrat-Analyse, dass die Unterschiede zwischen den TP10HD-Glycoformen auf den Umfang der Glycosylierung, die Zusammensetzung der Oligosaccharidkette und die Identität der terminalen Oligosaccharid-Kohlenhydrat-Reste zurückzuführen sind.

BEISPIEL VII

BESTIMMUNG DER TERMINALEN OLIGOSACCHARID-RESTE DER MULTIPLEN GLYCOFORMEN VON TP10HD

[0138] Die Bestimmung der terminalen Oligosaccharid-Reste von TP10HD zeigt, dass die schwach kationische Glycoform einen höheren Grad an Sialylierung zeigt.

METHODEN

[0139] Die terminate Kohlenhydratstruktur von TP10HD-Präparaten wurde ausgewertet. Proben jedes Präparats von 1 µg wurden an Nitrocellulose-Membranen unter Verwendung eines handelsüblichen Dot-Blot-Apparates (Bio-Rad, Richmond, CA) immobilisiert. Ein handelsüblicher Glycan-Differenzierungs-Analysesatz, der terminale Oligosaccharid-Reste an Glycoproteinen identifiziert (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indiana-

polis, IN) wurde gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Dieser Kit enthält fünf Digoxigenin-Lectin-Sonden: Galanthus nivalis-Agglutinin (GNA); Sambucus nigra-Agglutinin (SNA); Maackia amurensis-Agglutinin (MAA); Erdnuss-Agglutinin (PNA); und Datura stramonium-Agglutinin (DSA).

[0140] Kurz gesagt wurden Replikat-Sonden jedes TP10HD-Präparats mit einem Digoxigenin-Lectin-Komplex sondiert; durch Austausch des Lectins wird die Spezifität der Sonde verändert, was den Nachweis einer Vielzahl von Kohlenhydrat-Resten ermöglicht. Nach dem Binden wurden die Sonden durch Nachweis von Digoxigenin-Epitopen mit einem Alkalische Phosphatase-konjugierten Schafs-Anti-Digoxigenin-Fab'-Reagens sichtbar gemacht; die Farbentwicklung trat innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe des Substrats ein.

[0141] Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8

Terminale Oligosaccharid-Reste der multiplen Glycoformen von TP10HD					
		Lectin			
	GNA	SNA	DSA	MAA	PNA
Kohlenhydrat Spezifität	terminal Man	NeuAc α(2-6) Gal	Gal β(1-4)GlcNAc	NeuAc α(2-3) Gal	Gal β(1-3) GlcNAc
TP10HD-CX	+	-	-	-	-
TP10HD-CC	-	-	+	+	-
TP10HD-CXD	-	-	-	-	-
TP10HD-CCW	-	-	±	+	-
TP10HD-CCS	+	-	±	±	-
Abkürzungen: Gal, Galaktose; Man, Mannose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; NeuAC, 5-N-Acetylneuraminsäure = Sialinsäure					

[0142] TP10HD-CX war lediglich mit dem GNA-Lectin reaktiv, was darauf hinwies, dass dieses Präparat terminale Mannose-Reste aufwies. TP10HD-CXD war, wie erwartet, mit keiner der Sonden reaktiv, was aufzeigte, dass die N-Glycanasenbehandlung die Oligosaccharidketten entfernt hatte. TP10HD-CCW war stark reaktiv mit MAA und schwach reaktiv mit DSA, was auf terminale Sialinsäure-α(2,3)-galactose- und Galactose-β(1,4)-N-acetylglucosamin-Strukturen hinwies. TP10HD-CCS war mit GNA stark reaktiv, was auf ein Überwiegen der terminalen Mannose-Reste hinwies, und schwach reaktiv mit MAA und DSA, was auf eine Kreuzkontamination mit TP10HD-CCW schließen ließ.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0143] Diese Ergebnisse zeigen, dass die gereinigten TP10HD-Glycoformen unterschiedliche Oligosaccharidstrukturen bei einer schwach kationischen Glycoform, TP10HD-CCW, gekennzeichnet durch die terminalen Sialinsäure-Reste, und einer stark kationischen Glycoform, TP10HD-CX und TP10HD-CCS, gekennzeichnet durch die terminalen Mannose-Reste, aufweisen. Diese Befunde legen nahe, dass das Vorhandensein terminaler Sialinsäure-Resten zu einer langsameren Plasmaabgabe führt oder dass terminale Mannose-Reste zu einem höheren Grad der Bindung des TP10HD an zelluläre Kohlenhydrat-Rezeptoren führt, was eine schnellere Plasmaabgabe ergibt.

BEISPIEL VIII

BESTIMMUNG DER OLIGOSACCHARID-KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG UND -STRUKTUR VON TP10HD

[0144] Die Bestimmung der Oligosaccharid-Kohlenhydratzusammensetzung und -Struktur eines TP10HD, das wie in Beispiel II beschrieben zubereitet war, ergab, dass der Gehalt an Sialinsäure der stärker kationischen TP10HD-Glycoform niedriger als bei der schwach kationischen Glycoform war. Die schnelle Plasmaabgabe in Verbindung mit wenig oder keiner Sialinsäure auf den Oligosaccharidketten und (durch Rückschluss) Zugänglichkeit des Proteins für Mannose- oder Galactose-Rezeptoren. Die langsame Plasmaabgabe war auf ein oder mehrere terminale Sialinsäure-Reste zurückzuführen.

MONOSACCHARIDZUSAMMENSETZUNG DER TP10HD-GLYCOFORMEN

A. Quelle des Testmaterials

[0145] TP10HD wurde wie in obigen Beispielen I und V beschrieben isoliert und in die schwach kationische Glycoform TP10HD-CCW und die stark kationische Glycoform TP10HD-CCS getrennt.

B. Methoden

[0146] Die Analyse wurde unter Anwendung der folgenden Schritte vorgenommen:

1. Dialyse der Probe (etwa 270 – 280 mg) gegen entionisiertes Wasser zur Entfernung aller Puffersalze, gefolgt von Lyophilisierung.
2. Freisetzung der intakten Oligosaccharidketten mit anhydrischem Hydrazin.
3. Behandlung der intakten Oligosaccharidketten mit anhydrischem methanolischem HCl zur Freisetzung einzelner Monosaccharide als O-Methyl-Derivat.
4. N-Acetylierung jeglicher primärer Aminogruppen.
5. Derivatisierung zum Erhalt von Per-O-trimethylsilylmethylglycosiden.
6. Trennung dieser Derivate mittels Kapillar-GLC (Gas-Flüssigchromatographie) auf einer CP-SIL8-Säule.
7. Identifikation einzelner Glycosid-Derivate anhand der Rückhaltezeit aus der GLC und Massenspektroskopie, im Vergleich zu bekannten Standards.
8. Quantifizierung einzelner Derivate mittels FID mit einem internen Standard (13-O-Methyl-D-glucose).

C. Ergebnisse

[0147] Der relative Molgehalt an jedem Monosaccharid in den beiden TP10HD-Glycoformen ist in untenstehender Tabelle 9 gezeigt.

Tabelle 9

Relativer Molgehalt an Monosacchariden in zwei TP10HD-Glycoformen		
Monosaccharid	TP10HD-CCS	TP10HD-CCW
Fucose	1,0*	1,0
Galactose	3,0	3,4
Mannose	5,4	4,1
N-Acetylglucosamin	8,2	7,5
Sialinsäure	0,9	1,3
Glucose	NN	NN
N-Acetylgalactosamin	NN	NN
Xylose	NN	NN

*Werte sind relativ zu Fucose (= 1,0) angegeben. NN = nicht nachgewiesen.

D. Vergleich mit TP10HD-CC

[0148] Um jegliche Unterschiedlichkeiten in der Monosaccharidzusammensetzung zu charakterisieren, die zwischen den in einem Hohlfaser-Bioreaktor, wie zuvor beschrieben (TP10HD-CX), erzeugten TP10HD, nämlich den fraktionierten Glycoformen TP10HD-CCW und TP10HD-CCS, und dem in einem Fließbett-Bioreaktor (TP10HD-CC) erzeugten unfraktionierten Material vorliegen könnten, wurden Chargen dieser Materialien unter Zugrundelegung eines anderen analytischen Ansatzes verglichen.

[0149] Neutrale und Amino-Zucker wurden mittels Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie in Kombination mit gepulstem amperometrischen Nachweis (HPAE-PAD-Carbohydratsystem, Dionex Corp.) bestimmt. Die Zucker wurden durch Hydrolyse in 20% (Vol/Vol) Trifluoressigsäure bei 100°C für 6 Stunden freigesetzt. Die Hydrolysate wurden durch Lyophilisierung oder mit einen Speed-Vac (Savant Instruments) getrocknet. Der Rückstand wurde in 1% Natriumacetattrihydratlösung gelöst und auf einer HPLC-AS6-Säule, wie

beschrieben bei Anumula et al. (Anal. Biochem. 195:269– 280 (1991)), analysiert. Die Proben wurden im Quadruplikat analysiert.

[0150] Die Sialinsäure wurde separat mittels der direkten kolorimetrischen Methode von Yao et al. (Anal Biochem. 179:332–335 (1989)) in Triplikat-Proben bestimmt.

[0151] Die Ergebnisse sind in der untenstehenden Tabelle 10 gezeigt.

Tabelle 10

Relativer Molgehalt an jedem Monosaccharid in TP10HD-Chargen und -Glycoformen								
	TP10HD-CX		TP10HD-CCS	TP10HD-CC				TP10HD-CCW
Charge-Nr.	R	V		G020	K002	H115	H118	
Saccharid								
Fucose	0,7*	0,9	0,5	0,4	0,6	0,7	0,6	0,5
Galactose	0,9	1,3	1,6	1,9	2,1	2,3	2,2	2,1
Mannose	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Glucosamin	3,5	4,1	3,5	3,9	4,3	4,1	4,0	4,0
Sialinsäure	0,2	0,4	0,7	1,7	1,6	1,3	1,1	1,6
Sialin/Mannose Verhältnis	0,08	0,15	0,24	0,56	0,54	0,42	0,38	0,53

*Die Ergebnisse sind relativ zu Mannose (= 3) dargestellt. Der Glucosamin-Gehalt in diesem Assay entspricht dem N-Acetylglucosamin-Gehalt im oben verwendeten Assay.

SCHLUSSFOLGERUNG

[0152] Die Monosaccharidzusammensetzung der Glycoformen TP10HD-CCW und TP10HD-CC sind typisch für Sialinsäure-terminate Komplex-Oligosaccharide mit ein, zwei und drei Antennen, die nahe dem n-gebundenen Proteinsubstitutions-Ort fucosyliert sind und einen Trimannose-Kern enthalten. Es kann gefolgert werden, dass das Glycoform-TP10HD-CCW-Material einen signifikant höheren Anteil an Sialinsäure und/oder einen geringeren Anteil an Mannose als die Glycoform TP10HD-CCS enthält. Die Unterschiede im Galactose- und (N-Acetyl)-Galactosamin-Gehalt sind wahrscheinlich nicht signifikant. Das Sialinsäure/Mannose-Verhältnis von TP10HD-CX zeigt, dass dieses Material (beschrieben von Fearon et al., supra) der Glycoform TP10HD-CCS ähnelt und von TP10HD-CCW und TP10HD-CC verschieden ist. Letztere scheinen hauptsächlich aus den schwach kationischen Glycoformen zu bestehen, was mit anderen, oben angegebenen Daten übereinstimmt.

[0153] Die Ergebnisse zeigen, dass eine langsamere Plasmaabgabe (TP10HD-CCW) mit einem höheren Sialinsäuregehalt oder Sialinsäure/Mannose-Verhältnis (> 0,25) korreliert. Ein relativ geringer Mannosegehalt kann auch einen höheren Grad an Verzweigung (d. h. mehr Strukturen mit zwei und drei Antennen) in diesem Material widerspiegeln.

BEISPIEL IX

LADUNGS- UND GRÖßENVERTEILUNGSANALYSE VON AUS TP10HD-GLYCOFORMEN FREIGESETZTEN OLIGOSACCHARIDEN

[0154] Komplexes Oligosaccharid wurde aus jeder Glycoform-Probe (0,6 mg) mittels Hydrazinolyse freigesetzt. Die Oligosaccharidketten wurden durch reduktive Tritiummarkierung radiomarkiert. Das beladene Oligosaccharid wurde einer Hochspannungs-Papierelektrophorese unter alkalischen Bedingungen unterzogen und die Peaks nachgewiesen und mittels Tritiumradiographie quantifiziert. Die Oligosaccharidketten wurden mit Arthrobacter ureafaciens-Neuraminidase zur Entfernung der Sialinsäure behandelt und die Elektrophorese wiederholt.

[0155] Die radiomarkierten desialylierten (d. h. neutralen) Oligosaccharidketten wurden einer Größenausschluss-Chromatographie auf BioGel P4, 400 Mesh, 2 m × 15 mm (BioRad Corporation, Richmond, CA) wie folgt unterzogen. Die Chromatographie wurde in Wasser bei 55°C bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min vorgenommen. Die Proben wurden mit unmarkiertem partiellem Säure-Hydrolysat von Dextran als einem internen Standard vermischt. Die radiomarkierten Glycoform-Oligosaccharidketten wurden mittels eines In-Line-Flow-Radioisotopen-Monitors nachgewiesen, und die Oligoglucose-Standards wurden mittels eines In-Line-Differentialrefraktometers nachgewiesen. In den Ergebnissen, die später folgen, ist das hydrodynamische Volumen der einzelnen Oligosaccharide als apparente Glucoseeinheiten (gu) ausgedrückt, wobei die Werte durch Cubic Spline Interpolation zwischen Glucoseoligomeren in unmittelbarer Nachbarschaft zum Oli-

gosaccharid Alditol bestimmt wurden.

[0156] In **Fig.** 4 ist ein Vergleich von Radioelektrophoretogramme von TP10HD-CCW und TP10HD-CCS vor und nach der Neuraminidasenbehandlung gezeigt. In beiden Fällen machte die Neuraminidasenbehandlung all die markierten Oligosaccharidketten neutral, was zeigte, dass die negative Ladung gänzlich der Sialinsäure zuschreibbar war.

[0157] Bei der Glycoform TP10HD-CCS waren etwa 64% der Oligosaccharidketten anfänglich neutral, wobei der verbliebene Anteil eine Mobilität entsprechend einer einzelnen Sialinsäure-Einheit aufwies. Für die Oligosaccharidketten aus der Glycoform TP10HD-CCW lag ein wesentlich höherer Anteil von 69% an sauren Oligosacchariden vor, von denen 40 bis 50% Mobiltäten entsprechend zwei oder mehr Sialinsäure-Resten zeigten. Lediglich etwa 31% der Oligosaccharidketten aus der Glycoform TP10HD-CCW waren vor der Neuraminidasebehandlung neutral.

[0158] Die Größen der Oligosaccharidketten der desialylierten Glycoform, wie mittels einer Größenprofil-Analyse nachgewiesen, sind in untenstehender Tabelle 11 gezeigt.

Tabelle 11

Größenprofil-Analyse der Oligosaccharidketten der desialylierten Glycoform	
TP10HD-CCW	TP10HD-CCS
20,1*	20,0
17,3	17,3
15,0	15,0
14,0	14,0
12,8	12,7
11,5	11,6
10,4	10,5
9,3	9,3
3,0	3,0

*Werte sind in Glucose-Einheiten (gu) angegeben

[0159] Folglich waren die von den Glycoformen stammenden Oligosaccharidketten von sehr ähnlicher Größe. Wie jedoch in **Fig.** 5 gezeigt, wichen die relativen Anteile der verschiedenen Größen voneinander ab. TP10HD-CCW enthält einen höheren Anteil der Oligosaccharidketten von größerer Größe, insbesondere dem dominierenden 15 gu-Oligosaccharid, und einen geringeren Anteil der 14 gu-Spezies als TP10HD-CCS.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

[0160] Die Daten für die Ladungsverteilung bestätigen weiter die Korrelation zwischen einem hohen Sialinsäuregehalt und einer langsamen Plasmaabgabe, wie sie TP10HD-CCW zeigt. Die relativen Anteile der sauren und neutralen Oligosaccharidketten sind für die beiden Glycoformen ähnlich den Verhältnissen an Material, das schnell bzw. langsam aus dem Plasma abgegeben wird (siehe Beispiel VI). Dies legt nahe, dass Glycoprotein-Moleküle, bei denen die dominierende N-gebundene Oligosaccharidkette einen oder mehrere Sialinsäure-Reste aufweist, langsam aus dem Plasma abgegeben wird, wohingegen neutrale Oligosaccharidketten mit einer schnellen Plasmaabgabe mittels eines bisher unbekannten Mechanismus verbunden sind.

[0161] Das Größenprofil der Oligosaccharidkette alleine erlaubt keine eindeutige Identifikation der präzisen Strukturen der komplexen Oligosaccharidketten. Allerdings stimmen die Zusammensetzungs- und Größendaten zusammen genommen mit einer Hauptstruktur überein, die einen Trimannose-Kern (d. h. zwei Antennen) mit variabler Sialylierung der terminalen Galactose und variabler Fucosylierung enthält. Zu zusätzlichen Möglichkeiten zählt eine weitere Verzweigung, die eine Struktur mit drei Antennen und drei Gal-Einheiten ergibt. Es ist klar, dass das Größenprofil selbst auf keinen mit einer langsamen Plasmaabgabe verbundenen Hauptstruktur-Typ schließen lässt.

[0162] Eine langsame Plasmaabgabe korreliert lediglich mit dem Umfang der Sialylierung einer geringen Zahl an Kernstrukturen des obigen Typs.

BEISPIEL X

DER pI DER SCHWACH KATIONISCHEN TP10HD-GLYCOFORM IST NIEDRIGER ALS DER DER STARK KATIONISCHEN GLYCOFORM

[0163] Der pI der stark sialylierten Glycoform ist niedriger als der pI der leicht sialylierten Glycoform.

METHODEN

[0164] Die Chromatofokussierung stellt ein Verfahren zur Trennung von Isoformen der Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt, pI, unter Verwendung einer Ionenaustausch-Säule und eines pH-Gradienten dar, der mit amphoteren Puffern von unterschiedlichen pH-Werten geschaffen wird. In dieser Studie wurde die Analyse der TP10HD-Präparate unter Anwendung eines pH-Gradienten von 7,1 bis 4,0 vorgenommen. Das chromatograpische Harz war Mono P, Hr5/5 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ); der Ausgangspuffer war 0,025 M Bis-Tris, titriert auf pH 7,1 mit gesättigter Iminodiessigsäure; das Elutionsmittel war Polypuffer 7-4 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ), verdünnt 1 : 10 (Vol/Vol) mit Wasser und eingestellt auf pH 4,0 mit HCl; der Reinigungspuffer war 2 M NaCl in Wasser. Die experimentellen Bedingungen waren so gewählt, dass sich ein linearer pH-Gradient von 7,1 bis 4,0 Einheiten ergab.

ERGEBNISSE

[0165] In **Fig.** 6 sind die Ergebnisse dieses Experiments zusammengefasst. Die dominierenden Isoformen in TP10HD-CX weisen pI's von etwa 6,0 und 5,7 auf, bei geringeren Materialmengen von pI 5,0 und darunter. Im TP10HD-CC-Präparat stellte die Isoform mit dem pI 5,7 eine kleinere Komponente dar; die dominierenden Formen wiesen pI's von 5,1 und 4,8 auf. Die Integration der Peaks legt nahe, dass etwa 40% des TP10HD-CC-Präparats einen pI < 4,9 aufwiesen. Da die Menge an Material im TP10HD-CX-Präparat mit pI < 4,9 so gering ist, war keine exakte Beurteilung des Anteils des Materials mit niedrigerem pI in diesem Präparat möglich.

SCHLUSSFOLGERUNG

[0166] Von TP10HD-CX wurde ein höherer mittlerer pI als von TP10HD-CC festgestellt, was mit einem geringeren Gehalt an posttranslational herbeigeführten sauren Gruppen übereinstimmt. Es lag jedoch eine gewisse Überlappung im Isoformenprofil zwischen den beiden TP10HD-Präparaten vor. Der prozentuale Anteil an TP10HD-CC mit einem niedrigen pI (pI < 4,9) korrelierte mit dem prozentualen Anteil an langsam aus dem Plasma von Schweinen abgegebenem Material (siehe Beispiel VI). Diese Ergebnisse stimmen mit den im Beispiel VIII beschriebenen Befunden überein, dass Glycoformen mit den höheren Mengen an terminalen Sialinsäure-Resten einen niedrigeren pI zeigen.

BEISPIEL XI

FUNKTIONELLE AKTIVITÄT DER TP10HD-GLYCOFORMEN: HEMMUNG DER KOMPLEMENT-VERMITTELTEN HÄMOLYSE IN VITRO

[0167] Die verschiedenen TP10HD-Glycoformen weisen eine vergleichbare antihämolytische in vitro-funktionelle Aktivität innerhalb des Konfidenzintervalls des Assays auf, wie anhand der nachfolgend wiedergegebenen Ergebnisse gezeigt.

METHODEN

[0168] Die Hämolysehemmungsprüfung basiert auf der Hemmfähigkeit von TP10HD-Lösungen der Lyse von SRBCs, die mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper in Gegenwart von Humanserum als einer Komplementquelle sensibiliert wurden; diese ist im obenstehenden Beispiel VI beschrieben.
[0169] Die Aktivität ist als die Konzentration von TP10HD ausgedrückt, die eine 50% Hemmung der Hämolyse, IH_{50}, unter den standardmäßigen Assaybedingungen ergibt. Je niedriger die Konzentration des TP10HD oder der TP10HD-Glycoform, die eine 50 % Hemmung ergibt, umso potenter das Präparat. Ein Verdünnungsbereich des TP10HD oder der TP10HD-Glycoform von 7,8 bis 1000 ng/ml wurde für jede Probe untersucht.

ERGEBNISSE

[0170] TP10HD-CX zeigte eine typische IH_{50} von 20 ± 7 ng/ml, wohingegen der Wert für TP10HD-CC höher war, nämlich etwa 50 ± 3 ng/ml, was nahelegte, dass die Potenz des Präparats, das eine signifikante Menge an einer schwach kationischen, stark sialylierten Glycoform enthielt, etwa zweimal geringer war als bei der stark kationischen Glycoform. TP10HD-CCW wies eine typische IH_{50} von 44 ng/ml auf, während TP10HD-CCS IH_{50}-Werte im Bereich von 27 ng/ml zeigte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Werten für die unfraktionierten Präparate TP10HD-CX und TP10HD-CC überein. Die Deglycosylierung erniedrigte die IH_{50} von 80 ng/ml für TP10HD-CX auf 40 ng/ml für TP10HD-CXD.

SCHLUSSFOLGERUNG

[0171] Die Intra-Assay-Variabilität dieses Assays liegt im Bereich von 15 – 20%, so dass die Signifikanz der zweifachen Differenzen bei den IH_{50}-Werten schwer interpretierbar ist, wohingegen vierfache oder größere Differenzen als signifikant erachtet werden. Es liegt daher keine Grundlage für die Schlussfolgerung vor, dass TP10HD-CC, TP10HD-CCW und TP10HD-CCS in diesem Assay hinsichtlich ihrer Potenz abweichen. Eine verstärkte Glycosylierung oder Sialylierung dieser Glycoformen, was die in vivo-Plasma-Halbwertszeit deutlich erhöht, zeigt eindeutig keine größere Auswirkung auf die in vitro-Potenz bezüglich der Hämolysehemmung.

[0172] Die Chinesischer Hamster-Ovar-(CHO)-Zelllinie DUX B11, die Plasmid pBSCR1c/pTCSgpt trägt, wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Marzland, am 23. März 1989 hinterlegt und mit der Zugriffsnummer CRL 10052 bezeichnet.

International Application No: PCT/ /

MICROORGANISMS

Optional Sheet in connection with the microorganism referred to on page 55, lines 27-30 of the description '

A. IDENTIFICATION OF DEPOSIT '

Further deposits are identified on an additional sheet '

Name of depositary institution '

American Type Culture Collection

Address of depositary institution (including postal code and country) '

12301 Parklawn Drive
Rockville, MD 10582
US

Date of deposit ' March 23, 1989 Accession Number ' CRL 10052

B. ADDITIONAL INDICATIONS ' (leave blank if not applicable). This information is continued on a separate attached sheet

C. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE ' (if the indications are not all designated States)

D. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS ' (leave blank if not applicable)

The indications listed below will be submitted to the International Bureau later ' (Specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")

E. ☑ This sheet was received with the International application when filed (to be checked by the receiving Office)

(Authorized Officer)

☐ The date of receipt (from the applicant) by the International Bureau "

was

(Authorized Officer)

Form PCT/RO/134 (January 1981)

Patentansprüche

1. Ein Arzneimittel aus Glycoprotein Molekülen des isolierten und geklärten löslichen Komplement- und Rezeptortyps 1 (sCR1), in welchem
(1) die dominierenden Isoformen der sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Präparat einen durch Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt, pI, von niedriger als oder gleich 5,1 aufweisen, wobei der pI nach einer Neuraminidasenbehandlung steigt,

(2) die sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Arzneimittel eine oder mehrere komplexe oligosaccharide Strukturen enthalten, wobei mindestens 40% der besagten oligosacchariden Strukturen durchschnittlich mindestens einen terminalen Sialinsäure-Rest enthalten, und
(3) die sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Präparat eine Besetzung von sCR1 Glycoprotein Molekülen mir einem Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von mehr als oder gleich 0,25 bilden.

2. Ein Arzneimittel nach Anspruch 1, in welchem die sCR Glycoprotein Moleküle in dem besagten Arzneimittel eine oder mehrere komplexe oligosaccharide Strukturen enthalten, wobei mindestens 70% der besagten oligosacchariden Strukturen durchschnittlich mindestens einen terminalen Sialinsäure-Rest enthalten.

3. Das Arzneimittel nach Anspruch 1, in welchem mindestens 40 der sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Arzneimittel einen durch Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt von niedriger als oder gleich 4,9 aufweisen.

4. Das Arzneimittel nach Anspruch 1, in welchem die Besetzung der sCR1 Glycoprotein Moleküle ein Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von mehr als oder gleich 0,38 aufweist.

5. Das Arzneimittel nach Anspruch 1, in welchem die Besetzung der sCR1 Glycoprotein Moleküle ein Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von mehr als oder gleich 0,42 aufweist.

6. Das Arzneimittel nach Anspruch 1, in welchem die Besetzung der sCR1 Glycoprotein Moleküle ein Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von mehr als oder gleich 0,53 aufweist.

7. Ein Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6 mit mindestens 25% der funktionellen komplementhemmenden Aktivität von entglycolisiertem sCR1, welche durch eine Hemolysehemmugsprüfung bestimmt ist.

8. Ein Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, in welchem die Aminosäurekette der besagten sCR1 Glycoprotein Moleküle LHR-A, LHR-B, LHR-C, LHR-D, SCR29 und SCR30 Bereiche bis zu und einschließlich dem ersten Alaninrückstand des Transmembranenbereiches enthalten.

9. Ein pharmazeutisches Präparat, welches eine therapeutisch wirkungsvolle Menge eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6, so wie ein(en) pharmazeutisch annehmbaren Träger oder annehmbares Bindemittel enthält.

10. Ein pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 9, welches ferner eine therapeutisch wirkungsvolle Menge eines thrombolytischen Agens enthält.

11. Ein pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 10, in welchem das thrombolytische Agens aus der Gruppe gewählt ist, welche aus Folgendem besteht:
(a) einem Plasminogen Aktivator;
(b) anisoylated Plasminogen Streptokinaseaktivator Komplex;
(c) einkettiger Urokinase;
(d) zweikettiger Urokinase;
(e) Streptokinase;
(f) einem fibrinolytisch aktiven Protein, welches eine Kette einer ersten zweikettigen Protease enthält, welche mit einer Kette einer zweiten zweikettigen Protease verbunden ist, wobei mindestens eine der besagten ersten oder zweiten Proteasen eine fibrinolytische Aktivität aufweist, so dass das besagte Mischprotein einen für fibrinolytische Aktivität wesentlichen katalytischen Ort aufweist, welcher fakultativ durch eine entfernbare Blockiergruppe blockiert wird; und
(g) einem reversibel blockierten in vivo fibrinolytischen Enzym, wobei der für die fibrinolytische Aktivität wesentliche Ort in dem besagten Enzym durch eine Gruppe blockiert ist, welche durch Hydrolyse entfernbar ist, bei einer solchen Geschwindigkeit, dass die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung für die Hydrolyse im Bereich von 10^{-7} Sek^{-1} bis 10^{-3} Sek^{-1} in einer isotonischen wässrigen Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 bei 37° liegt.

12. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Patienten, welcher an einer mit Entzündung oder unangemessener Komplementaktivation verbundenen Krankheit oder Störung leidet.

13. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Medikaments

für die Behandlung eines Patienten, welcher an einer thrombotischen Krankheit leidet.

14. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und eines thrombolytischen Agens zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Patienten, welcher an einer thrombolytischen Krankheit leidet, wobei das besagte thrombolytische Agens aus der Gruppe gewählt ist, die aus Folgendem besteht:
(a) einem Plasminogen Aktivator;
(b) anisoylated Plasminogen Streptokinaseaktivator Komplex;
(c) einkettiger Urokinase;
(d) zweikettiger Urokinase;
(e) Streptokinase;
(f) einem fibrinolytisch aktiven Protein, welches eine Kette einer ersten zweikettigen Protease enthält, welche mit einer Kette einer zweiten zweikettigen Protease verbunden ist, wobei mindestens eine der besagten ersten oder zweiten Proteasen eine fibrinolytische Aktivität aufweist, so dass das besagte Mischprotein einen für fibrinolytische Aktivität wesentlichen katalytischen Ort aufweist, welcher fakultativ durch eine entfernbare Blockiergruppe blockiert wird; und
(g) einem reversibel blockierten in vivo fibrinolytischen Enzym, wobei der für die fibrinolytische Aktivität wesentliche Ort in dem besagten Enzym durch eine Gruppe blockiert ist, welche durch Hydrolyse entfernbar ist, bei einer solchen Geschwindigkeit, dass die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung für die Hydrolyse im Bereich von 10^{-1} Sek^{-1} bis 10^{-3} Sek^{-1} in einer isotonischen wässrigen Lösung mit einem pH-Wert von 7,4 bei 37° liegt.

15. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Patienten, welcher an dem adult respiratory distress sydrome (akuter respiratorischen Insuffizienz) leidet.

16. Verwendung eines Arzneimittels nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung oder Verzögerung von Transplantatabstoßung bei einem ein Transplantat empfangenden Patienten.

17. Die Verwendung nach Anspruch 16, in welcher das Transplantat ein Xenograft oder ein Allograft ist.

18. Die Verwendung nach Anspruch 12, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

19. Die Verwendung nach Anspruch 13, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

20. Die Verwendung nach Anspruch 14, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

21. Die Verwendung nach Anspruch 15, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

22. Die Verwendung nach Anspruch 16, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

23. Die Verwendung nach Anspruch 17, wobei der besagte Patient ein Mensch ist.

24. Ein Verfahren zur Zubereitung von sCR1 Glycoprotein Molekülen mit verlängerter in vivo Abgabe, welches Folgendes umfasst:
(a) das Ausdrücken eines DNA Moleküls, welches die Aminosäurekette des besagten sCR1 Glycoproteins in einer Säugetierwirtzelle unter Bedingungen verschlüsselt, in denen die Zellenentwicklung nicht durch Nährstoffzufuhr begrenzt ist und wobei die besagte Wirtzelle in der Lage ist, oligosaccharide Ketten von Glycoprotein zu sialysieren; und
(b) das Isolieren von sCR1 Glycoprotein Molekülen von der besagten Kultur, wobei
(1) die dominierenden Isoformen der sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Präparat einen durch Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt, pI, von niedriger als oder gleich 5,1 aufweisen, wobei der pI nach einer Neuraminidasenbehandlung steigt,
(2) die sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Arzneimittel eine oder mehrere komplexe oligosaccharide Strukturen enthalten, wobei mindestens 40% der besagten oligosaccharіden Strukturen durchschnittlich mindestens einen terminalen Sialinsäure-Rest enthalten, und
(3) die sCR1 Glycoprotein Moleküle in dem besagten Präparat eine Besetzung von sCR1 Glycoprotein Molekülen mit einem Molverhältnis von Sialinsäure zu Mannose von mehr als oder gleich 0,25 bilden.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG-1

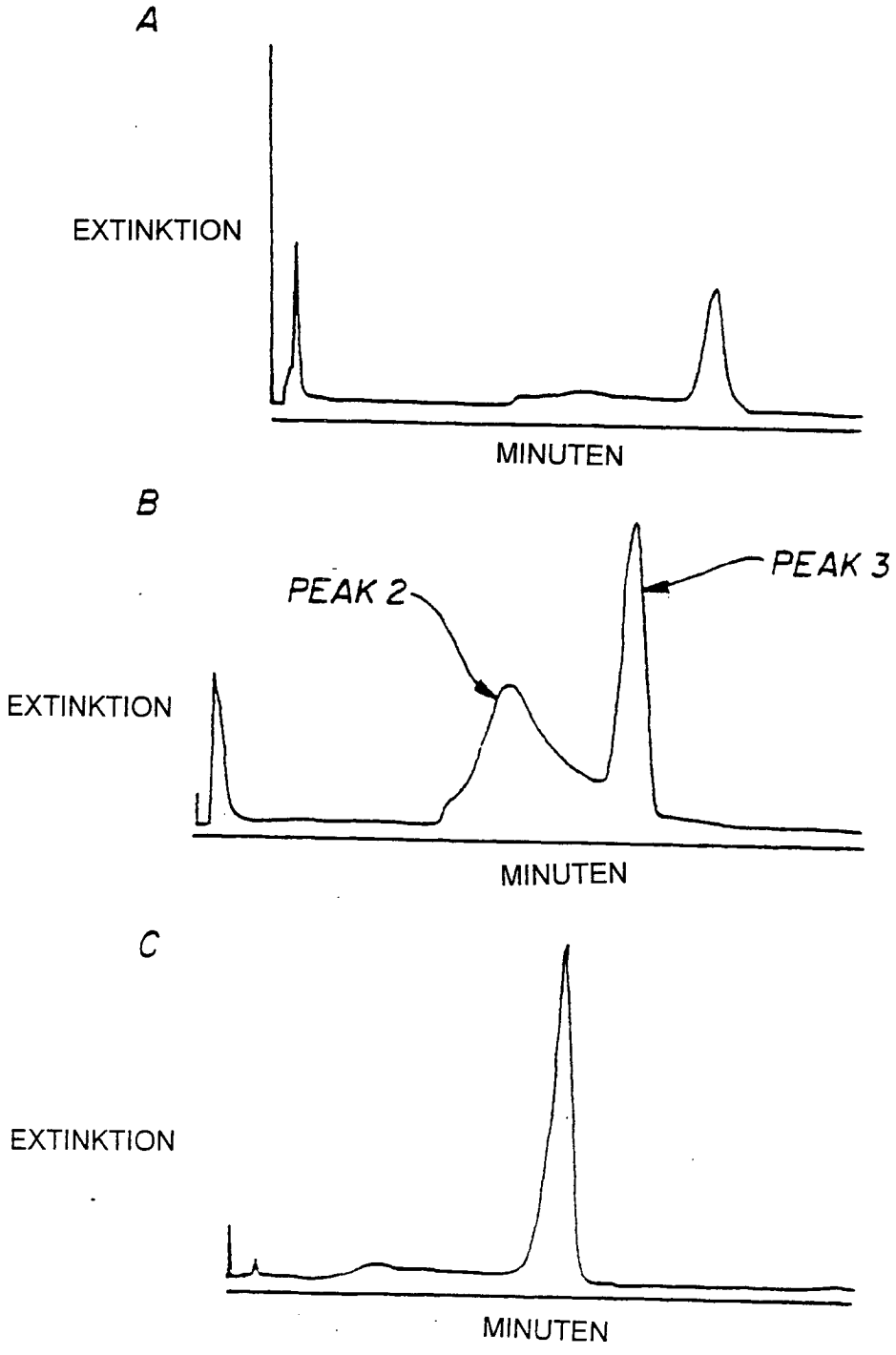


FIG-2

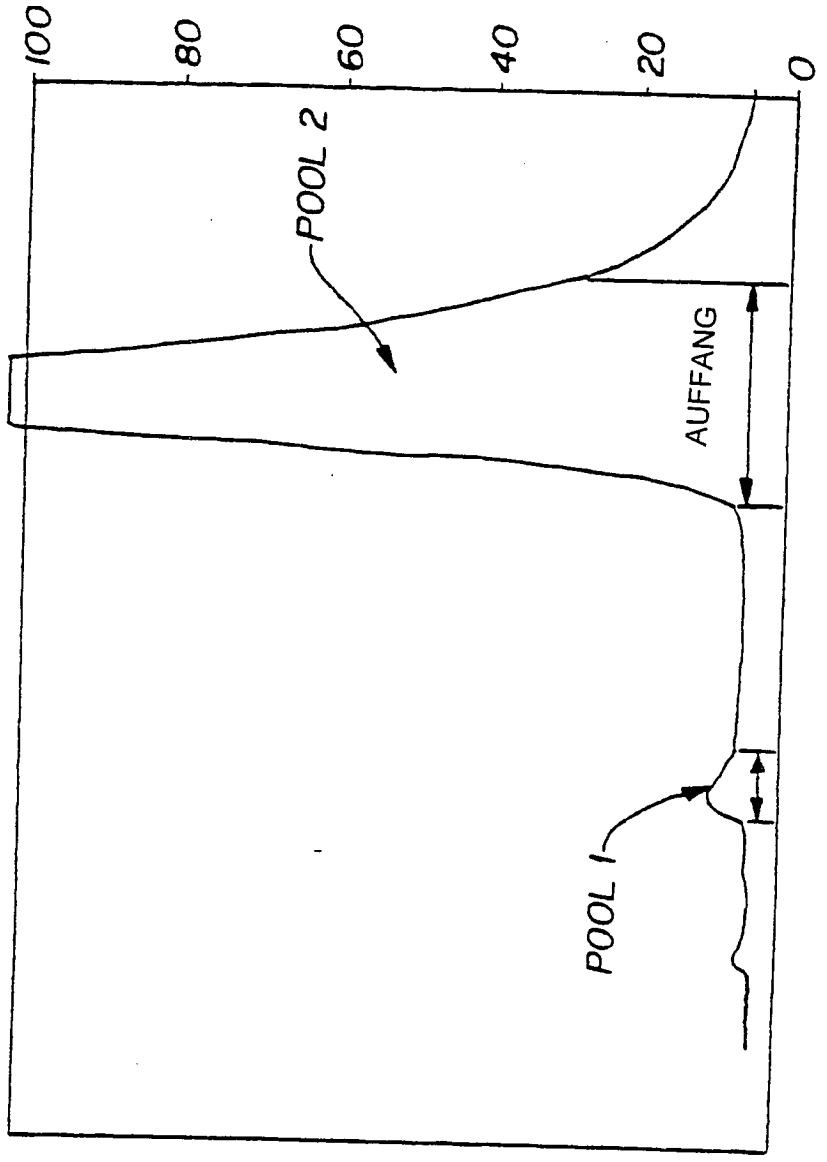


FIG-3

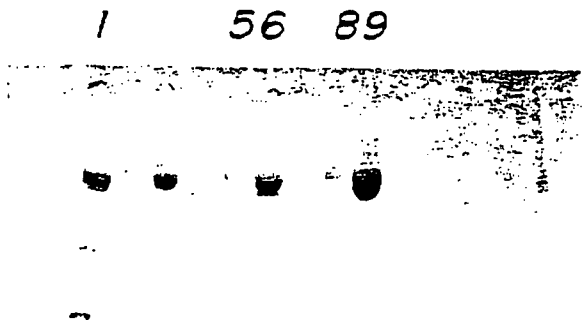


FIG-4

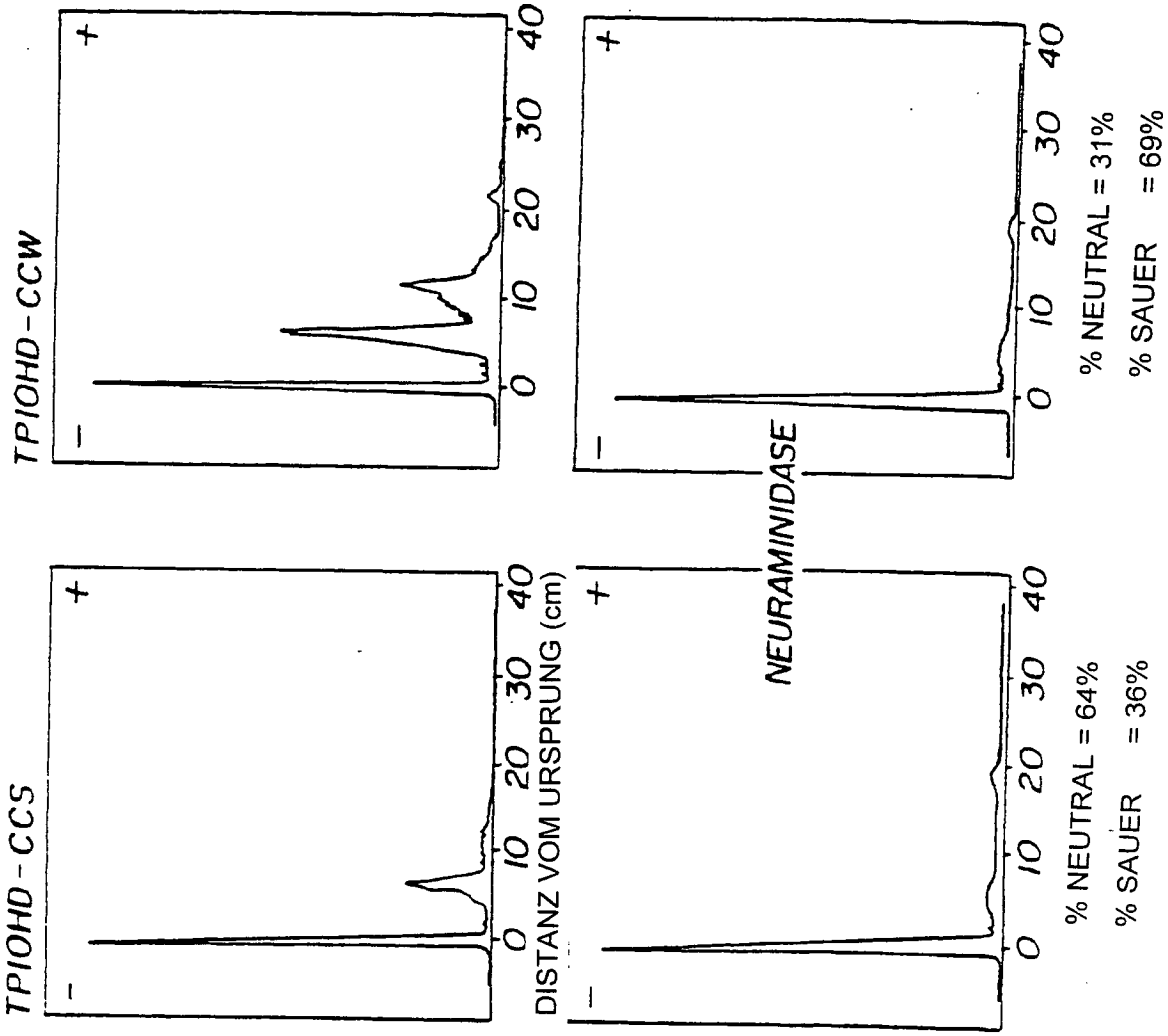
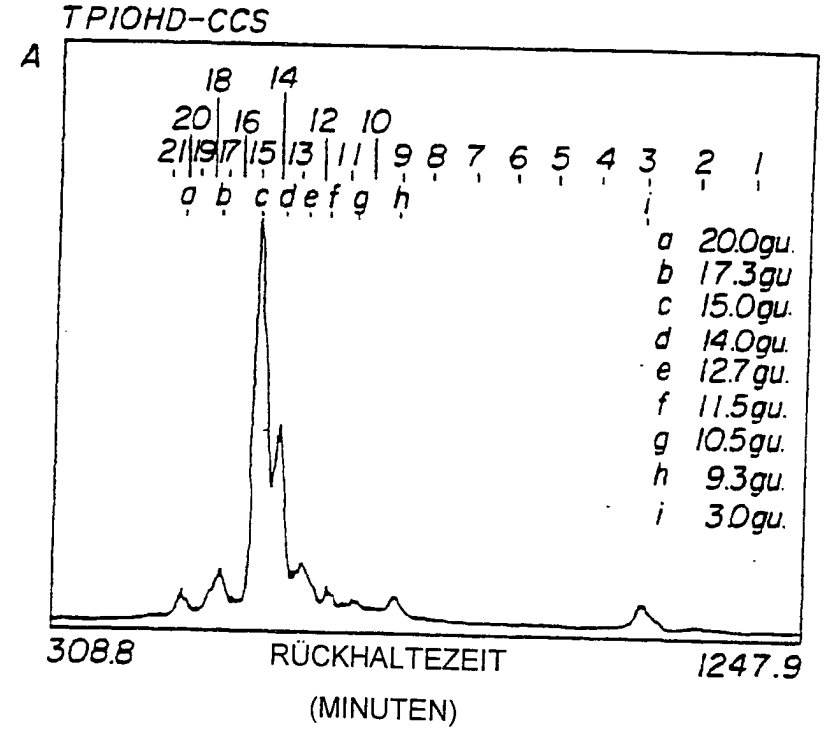

TPIOHD-CCW
TPIOHD-CCS
NEURAMINIDASE
RADIOAKTIVITÄT
DISTANZ VOM URSPRUNG (cm)
0
10
20
30
40
% NEUTRAL = 31%
% SAUER = 69%
% NEUTRAL = 64%
% SAUER = 36%

FIG-5


TPIOHD-CCS
A
18 14
20 16 12 10
21 19 17 15 13 11 9 8 7 6 5 4 3 2 1
a b c d e f g h i
a 20.0gu.
b 17.3gu
c 15.0gu.
d 14.0gu.
e 12.7gu.
f 11.5gu.
g 10.5gu.
h 9.3gu.
i 3.0gu.
308.8
RÜCKHALTEZEIT
(MINUTEN)
1247.9

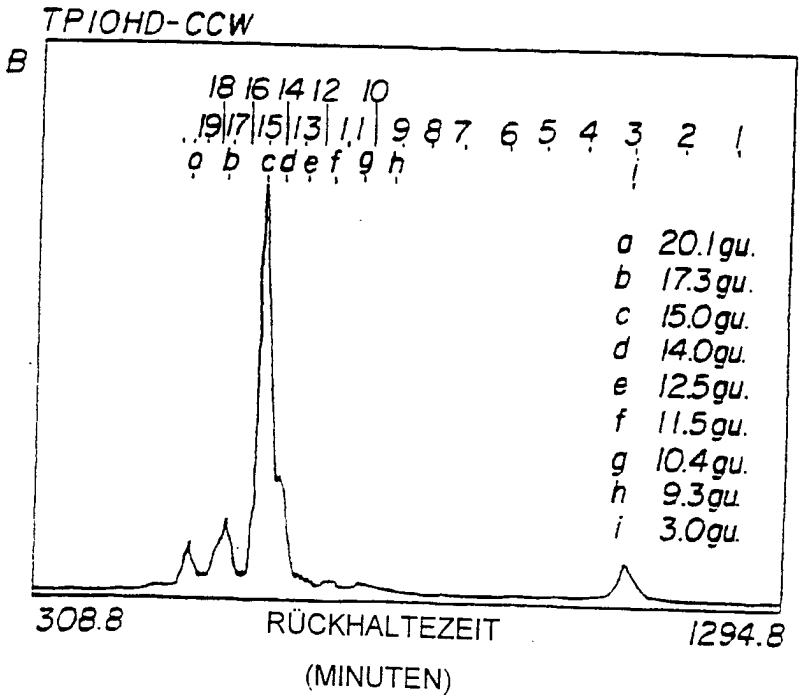

TPIOHD-CCW
B
18 16 14 12 10
19 17 15 13 11 9 8 7 6 5 4 3 2 1
a b c d e f g h i
a 20.1gu.
b 17.3gu.
c 15.0gu.
d 14.0gu.
e 12.5gu.
f 11.5gu.
g 10.4gu.
h 9.3gu.
i 3.0gu.
308.8
RÜCKHALTEZEIT
(MINUTEN)
1294.8

FIG-6

