



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3927/89

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/96

(22) Indleveringsdag: 10 aug 1989

(24) Løbedag: 29 jul 1988

(41) Alm. tilgængelig: 10 aug 1989

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: PCT/US88/02530

(86) International indleveringsdag: 29 jul 1988

(85) Videreførelsesdag: 10 aug 1989

(30) Prioritet: 03 aug 1987 US 081009

(71) Ansøger: *DDI Pharmaceuticals, Inc.; 518 Logue Avenue; Mountain View; CA, 94043, US

(72) Opfinder: Mark *Saifer; US, Ralph *Somack; US, David L. *Williams; US

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Vandopløselige konjugater af superoxiddismutase, samt farmaceutisk præparat indeholdende konjugatet

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g.skrift nr. 200467

(57) Sammendrag:

3927-89

vandopløseligt, i det væsentlige ikke immunogent konjugat af peroxiddismutase fremstilles ved kobling til en polyalkylenglykol, nemlig polyethylenglykol eller polyethylen, polypropylenglycol copolymer, idet denne glycol har en middelmolekylvægt på 40 000-1 000 000 og er terminalt ikke-substitueret eller substitueret med C₁-C₄ alkylgrupper.

Opfindelsen angår et hidtil ukendt vandopløseligt, i det væsentlige ikke-immunogent konjugat af en superoxiddismutase koblet med et koblingsmiddel til en polyalkylenglycol.

5 Man har tidligere benyttet PEG eller methoxy-PEG med lav molekylvægt, typisk ca. 5000 eller mindre, bundet til superoxiddismutase (SOD) og andre proteiner til opnåelse af addukter, der udviste forskellige grader af

10

- (a) forøget serumpersistens, og
- (b) reduceret immunogenitet.

Imidlertid førte den grad af modificering af
15 proteingrupper, der var nødvendig med lavmolekylær PEG eller methoxy PEG til opnåelse af, at begge mål (a) og (b) blev opfyldt, ofte til væsentlige tab i enzymaktivitet eller biologisk aktivitet. Se Boccu, Z. Naturforsch. bind 38 (1983), s. 94-99; Pyatak, Research Communications in Pathology and Pharmacology, bind 29, nr. 1 (juli 1980), s. 113-127, og Beauchamp, Anal. Biochem., bind 131 (1983), s. 25-33.

Superoxiddismutase (SOD) er et intracellulært enzym, der er ansvarligt for at katalysere omdannelsen
25 af peroxidradikaler til oxygen og hydrogenperoxid. Det er et mål med opfindelsen at tilvejebringe et produkt, der har længere levetid end det native SOD-protein in vivo og at forhindre dets inaktivering af nyrerne. Det er især vigtigt, at produktet opretholder enzymatisk
30 aktivitet i en længere tidsperiode, idet det samtidig har et lavt niveau af immunogenitet.

Det er endvidere et specielt mål med opfindelsen at tilvejebringe et konjugat med anti-inflammatorisk aktivitet som vist f.eks. ved sædvanlige carrageenanin-
35 ducerede poteødemforsøg. Denne aktivitet gør produktet særlig lovende til behandling af rheumatoide tilstande.

Disse mål opfyldes af konjugatet mellem en superoxid-dismutase og en polyalkylenglycol ifølge opfindelsen. Konjugatet er ejendommeligt ved, at polyalkylenglycolen er en polyethylenglycol eller et polyethylen-polypropylenglycol copolymerisat, hvori denne glycol har en middel-
5 delmolekylvægt målt ved HPLC med PEG som standard på ca. 40 000 - 200 000 Dalton og er terminalt usubstitueret eller substitueret med C₁-C₄ alkylgrupper. Foretrukne udførelsesformer for konjugatet ifølge opfindelsen
10 sen beskrives i kravene 2-6. Den ifølge opfindelsen anvendte PAG kan være lineær eller forgrenet.

Anvendelse af polymere med molekylvægte højere end 200 000 er ganske vist mulig, men sådanne er ubekvemme på grund af deres højere viskositet og risiko for
15 spaltning ved forskydningspåvirkninger.

PAG-SOD addukterne ifølge opfindelsen har molekylvægte (i forhold til PEG standarder med kendt molekylvægt), der ligger fra ca. 85 000 til ca. 2 000 000 Dalton, fortrukket fra ca. 90 000 til
20 1 000 000 Dalton. Derudover opretholder PAG-SOD addukterne og andre PAG addukter ifølge opfindelsen sædvanligvis hovedparten af den enzymatiske aktivitet hos det native protein. (Man bør bemærke, at molekylvægte i denne forbindelse er baseret på PEG standarder med
25 kendt molekylvægt. Ved HPLC kalibrering synes proteinækvivalentmolekylvægtene, dvs. molekylvægte baseret på proteinstandarder med kendt molekylvægt, at være ca. 5-8 gange større).

Konjugaterne ifølge opfindelsen er en forbedring
30 i forhold til tidligere produkter, idet man ved at tilbinde færre PAG strenge kan klare sig med en mindre kemisk modifikation af det aktive udgangsmolekyle (SOD), hvorfor man bevarer mere af dettes oprindelige karakter. Idet man ifølge opfindelsen benytter færre strenge
35 af højmolekylær PAG, vil adduktet opretholde hovedparten af udgangsmolekylets aktivitet og samtidig have fo-

røget levetid i blodkredsløbet. En anden fordel ved addukterne ifølge opfindelsen er, at man ved at benytte højmolekylær PAG kan fremstille større addukter med samme grad af modifikation som ved kendt teknik. Yder-

5 mere er større PAG addukter i visse tilfælde klart en fordel. For eksempel havde PEG-SOD addukter ifølge opfindelsen, der blev fremstillet under anvendelse af PEG-streng med molekulvægte på 40 000 - 130 000 Dalton, halveringstider i museserum på ca. 36 timer og me-

10 re, hvorimod man ved PEG-SOD addukter, ifølge kendt teknik (Boccu, se ovf.) højst har fundet en halveringstid på 25 timer.

PAG-SOD addukterne ifølge opfindelsen indeholder fortrinsvis 1-10 kæder tilbundet pr. SOD-molekyle, mere

15 foretrukket 2-8 og især 2-6 kæder PAG pr. SOD-molekyle. Antallet af kæder, der er nødvendig til at opnå en tilfredsstillende levetid i serum, falder, når man benytter længere kæder.

SOD-præparater, der anvendes i konjugater ifølge

20 opfindelsen er typisk pattedyrs kobber- og zinkholdige superoxiddismutaseformer af enzymet fra kvæg eller fra andre dyr, (f.eks. fra får, heste, grise, hunde, kani-

ner eller kyllinger) eller fra menneskelige celler. SOD-præparater, der indeholder andre metalioner, såsom

25 jern eller mangan, er også tilgængelige (se fx. Keele, B.B. jr. et al., J. Biol. Chem. 245 (1970), s. 6176-6181). Endvidere kan SOD-præparater fremstilles ved rekombinant DNA-teknik i mikrobekulturer (se Halle-

well, R.A. et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), s.

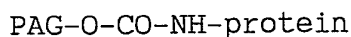
30 2017-2034). Sådanne præparater kan som følge af en ukorrekt translatering i disse mikrobekulturer være ikke fuldstændig identiske med det naturligt forekommende protein, men kan anvendes i konjugatet ifølge opfindelsen på grund af dets lavere antigenitet.

35 Man har også fundet, at hvis SOD-præparatet indeholder spor af ikke-SOD proteiner, der ellers ville gøre sådanne præparater immunologisk usikre for gent-

gen parenteral indgivelse, kan kobling af sådanne SOD til PAG ifølge opfindelsen gøre produktet nogenlunde nyttigt, da urenhedsproteinerne gøres betydeligt mindre immunogene.

5 Ved koblingsprocessen kan man benytte en række reaktioner ifølge kendt teknik.

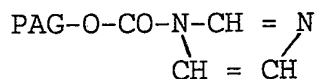
En foretrukket reaktion foregår via dannelsen af en reaktiv carbonathalvester, PAG-O-CO-X, hvori X er en god fraspaltelig gruppe, idet man benytter reagenser, såsom carbonyldiimidazol, p-nitrophenylchlorformiat eller bis-N-succinimidylcarbonat. Man lader derefter det aktiverede PAG, PAG-O-CO-X, reagere med proteinet under betingelser, der ikke ødelægger dets enzymatiske aktivitet, hvorved man fortrinsvis opnår urethan-
bindinger



tilbundet via proteinaminogruupper, såsom ϵ -NH₂-gruppen i lysin.

20 Man kan f.eks. lade carbonyldiimidazol reagere
med de terminale hydroxygrupper på PAG. Man standser
reaktionen i reaktionsblandingen pludseligt i vandig
opløsning ved neutral pH og isolerer det aktiverede PAG
(polyalkylenglycol-carbonylimidazol) ved dialyse og/el-
25 ler størrelsesseksklusionskromatografi.

Reaktionen af



30

med SOD udføres i opløsning med et overskud af aktive-
ret PAG.

Ved en variant af denne reaktion frysetørres man en opløsning af SOD og aktiveret PAG. Man isolerer 35 konventionelt de kobledede produkter ved størrelsesseksklusionskromatografi. Man kan endvidere anvende andre

rensningsfremgangsmåder, deriblandt ionbytterkromatografi.

Ved en anden sammenkoblende reaktion opløser man polyalkylenglycol i et inert opløsningsmiddel, gør reaktionsblandingen svagt alkalisk og lader den reagere med cyanursyrechlorid.

Man fjerner ikke-reageret cyanursyrechlorid ved udfældelse af PAG med petroleumsether. Resten af opløsningsmidlet bortfordampes til opnåelse af en 2-PAG-6-chlor-1,3,5-triazin. De opnåede aktiverede polymere bringes derefter til reaktion med SOD i en passende puffer, f.eks. i en boratopløsning. Man fjerner ikke-reageret aktiveret PAG og isolerer produktet ved kromatografi. Man opnår på denne måde en 4-hydroxy-1,3,5-triazin, til hvilken der i 2-stillingen er fæstet polyalkylenglycolgruppen PAG-O-, hvorimod den i 6-stillingen er fæstet til ϵ -aminogruppen af en reaktiv lysingruppe i SOD.

Man kan endvidere omdanne en eller flere hydroxygrupper på PAG-OH til carboxylgrupper, f.eks. ved reaktion med ravsyreanhydrid eller med ethylbromacetat og alkali, eller ved reaktion af den terminale gruppe $-OCH_2CH_2OH$ med alkalisk permanganat til dannelse af PAG eddikesyreethere, PAG-O- CH_2 -COOH. Derefter aktiverer man carboxylgrupperne ved kendt teknik for proteinmodifikation, f.eks. ved dannelse af N-hydroxysuccinimidesteren ved reaktion med et carbodiimid og N-hydroxysuccinimid, eller ved dannelse af acylazidet ved nitrosering af acylhydrazidet. Det aktiverede PAG bringes derefter til reaktion med proteinet under betingelser, der ikke ødelægger den enzymatiske aktivitet af proteinet, hvilket hovedsagelig fører til amidbindinger (PAG-C(=O)NH-protein) via protein aminogru-
pper (såsom aminoterminal NH₂ og lysin ϵ -aminogru-
pper).

En terminal PAG hydroxygruppe kan endvidere omdannes til en aminogruppe, f.eks. ved reaktion først

med thionylbromid til dannelse af PAG-Br, fulgt af aminolyse med overskud af ammoniak til dannelse af PAG-NH₂. Dette amino-PAG kan derefter direkte med amidbindinger bindes til proteincarboxygrupper ved anvendelse af reagenser, såsom et vandopløseligt carbodiamid eller Woodward's Reagens K. Alternativt kan man omdanne aminofunktionen til en carboxylsyrefunktion, f.eks. ved reaktion med ravsyreanhydrid, der derefter aktiveres og bringes til reaktion med proteinet som

5
10 beskrevet ovenfor.

Den terminale -CH₂OH gruppe i PAG kan også omdannes til en aldehydgruppe, -CH(=O) f.eks. ved oxidation med MnO₂. Derefter kan man reaktivt alkylere aldehydgruppen på proteinet via det sidstnævntes frie

15 aminogrupper, f.eks. ved hjælp af cyanoborhydrid, til opnåelse af bindinger, fortrinsvis via sekundære aminogrupper, under dannelse af en PAG-OCH₂CH₂NH-proteinbro.

Ud over proteinaminogrupper kan proteincarboxy- og sulfhydrylgrupper også benyttes til kobling til PAG.

20

Som nævnt ovenfor vil man ved udvælgelse af sammenkoblingsreaktioner foretrække sådanne, der kun lader broen, der binder PAG til proteinet, bestå af ikke-aromatiske grupper, opbygget af carbon, oxygen, svovl, nitrogen og hydrogen.

25

Det konjugerede SOD kan isoleres fra reaktionsopløsningen, foretrukket efter dialyse til fjernelse af overskud af ioner, ved sædvanlig frysetørring. Hvis det er ønsket eller nødvendigt, kan man yderligere rense konjugatet ved ionbytterkromatografi, elektroforese og/eller gelfiltrering.

30

Filtrering gennem et mikroporefilter ved kendt teknik i sterile småglas, eventuelt efter tilpasning af ionstyrken, f.eks. med natriumchlorid og/eller natriumphosphat til opnåelse af en isotonisk opløsning, giver en steril opløsning, der er egnet til indgivelse ved injektion.

35

Opfindelsen angår endvidere farmaceutiske præparater, hvilke præparater er ejendommelige ved det i krav 7's kendetegnende del angivne, idet foretrukne udførelsesformer for de omhandlede præparater ses i underkravene 8-10.

De farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen omfatter PAG-SOD konjugater ifølge opfindelsen, eventuelt sammen med en farmaceutisk acceptabel bærer.

Sådanne farmaceutiske præparater er foretrukket i form af sterile injektionspræparater, f.eks. en steril vandig opløsning. Opløsningen kan formuleres ifølge kendt teknik under anvendelse af de ovenfor nævnte farmaceutisk acceptable bærere. Det sterile injicerbare præparat kan også være en opløsning eller suspension i et ugiftigt parenteralt acceptabelt fortyndingsmiddel eller opløsningsmiddel.

Præparaterne ifølge opfindelsen kombinerer en effektiv enhedsdosismængde af SOD-konjugat ved en koncentration, der er effektiv til at fremkalde den ønskede respons, når man indgiver en enhedsdosis af præparaterne via en indgivelsesvej, der svarer til den anvendte farmaceutiske bærer. For eksempel indeholder væskeformige præparater sædvanligvis 0,5-40 mg konjugatprotein pr. 0,25-10 ml, foretrukket ca. 0,5-5 ml, undtagen ved i.v. infusionsopløsninger, der kan være mere fortyndede, f.eks. 0,5-200 mg SOD-konjugatprotein pr. 50-1000 ml, foretrukket 100-500 ml, af infusionsopløsningen. Tabletter, kapsler og stikpiller indeholder sædvanligvis 0,1-2,5 mg, foretrukket 1-10 mg af konjugatprotein pr. dosisenhed.

Præparatet ifølge opfindelsen er ligesom det kendte produkt orgotein effektive til behandling af en lang række inflammatoriske tilstande, deriblandt sådanne hvor syntetiske antiinflammatoriske midler har begrænset anvendelighed, f.eks. på grund af toksiske bivirkninger ved langtidsanvendelse, idet det omhandle-

de præparat har en meget ringe immunogenitet og antigenitet.

Især er præparatet effektivt til at mildne oxygentoksicitet, reperfusionsbeskadigelser og inflammatoriske tilstande og til at formindske virkningerne deraf, f.eks. sådanne i urinkanalen og i leddene hos forskellige pattedyr. Det er nyttigt til at mildne symptomerne for, og de strukturelle deformiteter, der står i forbindelse med posttraumatiske arthritis og
10 rheumatoide sygdomme, såsom bursitis, tendinitis og osteoarthritis.

Opfindelsen illustreres yderligere ved følgende eksempler.

15

Eksempel 1

Man opløste 50 g PEG (et Union Carbide produkt, mærket Polyox[®] eller polyethylenoxid 100,000, bestående af isopropoxyleret PEG med en mærket molekylvægt på
20 100 000 Dalton, som bestemt ved grænseviskositetsmålinger, for hvilke HPLC målinger gav en middelmolekylvægt på ca. 50 000 Dalton) i 1 l vandfri pyridin og tilsatte 22 g ravsyreanhydrid. Man holdt blandingen under omrøring i 38 timer ved 60°C, fjernede opløsningsmidlet under
25 der vakuum ved mindre end 60°C og genopløste remanensen i 500 ml vand. Man vaskede opløsningen med hexan og ekstraherede derefter produktet med 1000 ml chloroform. Man fjernede chloroformen under vakuum ved 40°C og opløste produktet i benzen. Det succinylerede PEG blev
30 udfældet to gange fra benzen ved hjælp af petroleums-ether.

En vandig opløsning af det succinylerede PEG blev fraktioneret efter størrelse til fjernelse af lavmolekylær PEG ved ultrafiltrering under anvendelse af
35 et Millipore Minitan apparat, udstyret med en 300 000 (proteinstandard) molekylvægt afskæringsmembran. Det

størrelsesfraktionerede produkt blev tørret under vakuum. Analyse ved vandig størrelseseksklusions HPLC tydede på, at middelmolekylvægten af det succinylerede PEG var vokset fra ca. 50 000 Dalton til ca. 80 000 Dalton som et resultat af ultrafiltreringen. Det således opnåede størrelsesfraktionerede succinylerede PEG blev derefter aktiveret ved hjælp af N-hydroxysuccinimid. Man opløste 12 g af succinyleret PEG (molekylvægt 80 000 Dalton, 0,15 mmol) i 120 ml vandfri dimethylformamid og tilsatte 300 mg (2,6 mmol) N-hydroxysuccinimid under omrøring. Efter opløsning tilsatte man 2,4 mmol dicyclohexylcarbodiimid og holdt opløsningen under omrøring ved 40°C i 30 minutter, hvorefter man lod den henstå uden omrøring ved 24°C i fem dage. Blandingen blev derefter filtreret gennem et glasfiberfilter, og filtratet blev inddampet til tørhed under vakuum ved 40°C. Man opløste remanensen under forsigtig omrøring i 200 ml vandfri toluen og udfældede fast N-hydroxysuccinimidyl PEG ved tilsætning af 400 ml petroleums-ether. Man indsamlede produktet under vakuum på et glasfiberfilter og genudfældede det fra toluen under anvendelse af petroleumsether, hvorefter det blev tørret under vakuum. Størrelseseksklusions HPLC viste, at molekylvægten af produktet ikke havde ændret sig som følge af aktiveringen.

Man satte en opløsning med indhold af 80 mg bovin-Cu,Zn-SOD (2,46 µmol, 4400 enheder/mg, fra DDI Pharmaceuticals, Inc.) i 39 ml 0,1 M kaliumphosphatpuffer (pH 8,0) til 4 g vandfri N-hydroxysuccinimidyl PEG derivatet (50 µmol) og foretog opløsning ved 24°C. Størrelseseksklusions HPLC analyse viste, at koblingsreaktionen i det væsentlige var færdig efter 1½ time, hvilket kunne ses af, at en top for ikke-reageret SOD forsvandt, og en top for højmolekylær UV-absorberende addukt viste sig med en molekylvægt på ca. 200 000 Dalton.

Man fjernede frit PEG, der ikke var koblet til SOD, fra PEG-SOD adduktet ved ionbytterkromatografi. Fraktioner med indhold af PEG-SOD blev indsamlet ved voksende ionstyrke af elueringspuffer (pH 9) under anvendelse af NaCl. Man dialyserede PEG-SOD fraktioner mod vand til fjernelse af pufferkomponenter, hvorefter man koncentrerede ved frysetørring eller ved vakuumfordampning.

Som et eksempel beskrives egenskaberne af et typisk produkt, der elueres med 50 mM NaCl. Adduktet indeholdt 24 mg SOD protein og 165 mg proteinbundet PEG. Man bestemte proteinindholdet ved biuretanalyse og PEG indholdet ved HPLC med påvisning med brydningsindeks (RI) og en korrektion for proteinets bidrag til RI. Man bestemte en middelmolekylvægt for det proteinbundne PEG på 72 000 Dalton. Denne molekylvægt for PEG, frigjort fra adduktet ved proteolyse i kombination med data, der viste, at forholdet mellem SOD protein (molekylvægt 32 000 Dalton) og PEG i adduktet var 24 mg til 165 mg, giver et forhold på 3 strenge PEG bundet pr. molekyle SOD. Antallet af PEG strenge pr. SOD molekyle, opnået på denne måde, giver en beregnet molekylvægt for adduktet på 220 000 Dalton ($72\,000 \times 3 + 32\,000/8$), et resultat der er i overensstemmelse med molekylvægten opnået ved HPLC.

Man bestemte SOD aktiviteten af det ovennævnte addukt under anvendelse af cytochrom-C assay ifølge McCord og Fridovich (J. Biol. Chem. 244: 6049-6055; (1969)). Den specifikke aktivitet af PEG-SOD adduktet (ca. 4317 enheder/mg protein) var 98% af aktiviteten af det native enzymudgangsmateriale (4400 enheder/mg). Produktet opretholdt således næsten fuldstændigt den native enzymatiske eller biologiske aktivitet og tilfredsstillede samtidigt opfindelsens øvrige krav.

PEG-SOD derivatet, opnået som beskrevet i dette eksempel, blev sammenlignet med højrenset, ikke modifi-

ceret SOD udgangsmateriale, hvad angår evnen til immunologisk sensitivering (aktivitet, der forårsager en anafylaktisk reaktion) i voksne Swiss Webster mus af hunkøn under anvendelse af en sensitiverings/belastningsprøve).

Man immuniserede ti mus med fire subkutane injektioner i løbet af to uger, hver gang med 0,075 mg protein, hvorefter man med 21 dages intervaller belastede dem intravenøst med samme forbindelse med 0,04 mg protein. I gruppen, der modtog ikke-modificeret SOD, var fem dyr døde efter den fjerde intravenøse belastning, og tre ud af de fem resterende dyr viste tegn på anafylakse, hvorimod ingen af de ti dyr, der modtog den samme dosis PEG-SOD ifølge opfindelsen viste noget tegn på anafylakse.

Ved afprøvning af et kendt PEG-SOD addukt med indhold af ca. 6 strenge af PEG med molekylvægt på 5000 Dalton pr. molekyle SOD, under anvendelse af samme fremgangsmåde, var ved den femte belastning to ud af ti dyr døde, og fire af de resterende dyr viste tegn på anafylakse. Således var PEG-SOD ifølge opfindelsen med indhold af 3 strenge PEG med en molekylvægt på 72 000 Dalton pr. SOD mindre immunogent end et kendt PEG-SOD, der indeholdt dobbelt så mange strenge, men med en molekylvægt på 5000 Dalton.

Detaillerede resultater for afprøvninger beskrevet i dette og senere Eksempler ses efter Eksemplerne.

Eksempel 2

30

Ved fremgangsmåden ifølge Eksempel 1 kobledes man PEG med høj molekylvægt til bovin-Cu,Zn-SOD. Man fandt, at produkter med 5 strenge PEG med en molekylvægt på 100 000 Dalton og 3 strenge PEG med en molekylvægt på 120 000 Dalton var mindre immunogent i mus end nativ SOD eller et kendt produkt med 4 strenge PEG med

en molekylvægt på 35 000 Dalton.

Eksempel 3

5 Man sammenlignede levetiden i serum af nativt SOD med levetiden af PEG-SOD konjugater ifølge opfindelsen, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge Eksempel 1, under anvendelse af voksne Swiss Webster-mus af hunkøn. Man injicerede 100 µg SOD intravenøst, aftap-
10 pede blod med regelmæssige mellemrum og analyserede plasmaet for specifik PEG-SOD aktivitet ved en elektroforetisk fremgangsmåde, der skiller PEG-SOD fra muse-SOD. Et afprøvet PEG-SOD addukt indeholdt 2 strenge PEG med en molekylvægt på ca. 65 000 Dalton, og et an-
15 det indeholdt 4 strenge PEG med en molekylvægt på ca. 40 000 Dalton. Halveringstiden for nedbrydning af nativ SOD i mus var 5-10 minutter, hvorimod halveringstiden for nedbrydning af begge disse PEG-SOD addukter var mere end 36 timer, og PEG-SOD aktiviteten kunne påvises i
20 blodet hos disse dyr i mindst ni dage. Et andet konjugat ifølge opfindelsen, der indeholdt i middel 2,6 strenge med en molekylvægt på ca. 45 000 Dalton, gav også en halveringstid, der overskred 36 timer.

25

Eksempel 4

Man størrelsesfraktionerede en vandig opløsning af PEG (Union Carbide), der var mærket som 100 000 MW (vægtmiddelmolekylvægt, bestemt ved måling af grænse-
30 viskositetstallet), men med en middelmolekylvægt på ca. 50 000 Dalton målt ved HPLC, ved hjælp af ultrafiltrering under anvendelse af et Millipore Minitan apparat, forsynet med en 300 000 (proteinstandard) molekylvægts-afskæringsmembran og tørrede det størrelsesfraktionere-
35 de produkt under vakuum. Analyse ved hjælp af HPLC viste, at middelmolekylvægten af prøven voksede fra

50 000 Dalton til 100 000 Dalton efter denne ultrafiltrering. Til en opløsning, der indeholdt 3,77 g af sådant størrelsesfraktioneret PEG i 100 ml vandfri acetonitril, satte man 1,39 g cyanursyrechlorid i 2,8 ml vandfri acetonitril. Efter henstand i tre dage ved 24°C blev opløsningen fortyndet med et lige så stort rumfang acetonitril og derefter rensat ved filtrering. Man fjernede opløsningsmidlet ved indampning under vakuum ved 30°C og opløste remanensen i 120 ml vandfri toluen, hvorefter man udfældede produktet ved tilsætning af 360 ml vandfri hexan. Man udfældede igen produktet fra toluen under anvendelse af petroleumsether og tørrede det under vakuum til opnåelse af cyanursyrechlorid aktiveret PEG. Størrelseseksklusion's HPLC demonstrerede, at molekylvægten for PEG ikke ændrede sig som en følge af aktiveringen. Man prøvede varierende mængder aktiveret PEG, opnået som beskrevet ovenfor, for evnen til at koble til bovin-Cu,Zn-SOD, hvis koncentration var konstant og 1 mg/ml. Slutkoncentrationerne af PEG varierede fra 5 til 100 mg/ml. Efter reaktion i 24 timer ved 24°C analyserede man blandingerne ved hjælp af HPLC med UV påvisning for dannelse af PEG-SOD og også for restmængden af SOD.

T A B E L 1

5	PEG:SOD		Procent omdannelse af SOD til PEG-SOD- addukt	PEG-SOD- addukt Top MW*
	(w:w)	(M:M)		
10	5	1,7	25%	-
	10	3,3	29%	90K
	20	6,6	62%	140K
	50	16,7	90%	150K
	75	24,0	95%	200K
	100	33,3	100%	200K

15

* Bestemt ved HPLC på TSK PW kolonner, kalibreret med kommercielle PEG standarder.

Som vist i Tabel 1 kunne ved et 50:1 (w/w), PEG 20 til SOD forhold (16,6:1 molforhold) 90% af SOD omdannes til PEG-SOD med en middelmolekylvægt på 150 000 Dalton. Ved større forhold mellem PEG og SOD voksede både mængden af SOD omdannet til PEG-SOD og molekylvægten af adduktet. De opnåede størrelser af addukterne tydede på, 25 at op til to strenge PEG med en molekylvægt på 100 000 Dalton kan fæstes til SOD under disse betingelser, når man benytter cyanursyre som koblingsmiddel.

Man målte levetiden i museserum for PEG-SOD produkterne i 10:1 (w:w) og 75:1 (w:w) PEG til SOD forhold, der er vist i Tabel 1. De samme fremgangsmåder 30 som i Eksempel 3 ovenfor blev benyttet. Man opnåede halveringstider på i det mindste 36 timer på begge de afprøvede produkter.

Eksempel 5

Man frysetørrede 10 g 100 kD polyethylenglycol (100K PEG, Union Carbide) i 24 timer til fjernelse af
5 enhver form for fugtighed i prøven. De tørrede 100K PEG blev opløst i ca. 45 ml vandfri acetonitril. Derefter tilsatte man 5,12 g 1,1-carbonyldiimidazol og inkuberede reaktionsblandingen ved stuetemperatur i 1½ time, hvorefter man afprøvede reaktionen ved hjælp af
10 ionbyttet vand til destruktion af overskud af carbonyldiimidazol.

pH-værdien blev opretholdt på 7 til forhindring af hydrolyse af det aktiverede PEG, og man dialyserede blandingen i en dag ved 4°C mod 4 l destilleret vand og
15 byttede vand i det mindste ti gange til fjernelse af acetonitril og imidazol. Efter dialysen kromatograferede man det aktiverede PEG på en Sephacryl S-400 kolonne i deioniseret vand for at skille 100K-PEG fra lavmolekylære fragmenter.

20 Til det opnåede aktiverede PEG satte man 92,8 mg SOD (rumfang af reaktionsopløsning = 108 ml) til opnåelse af et molforhold på 3 mol PEG pr. mol SOD. Blandingen blev frysetørret fire gange for at fremstille det ønskede PEG-O-CO-SOD produkt.

25

Eksempel 6

Til en opløsning af 30 g polyethylenglycol i 1100 ml vandfri dioxan satte man langsomt ved 35°C un-
30 der nitrogen og under omrøring 10 g natriumhydrid. Efter yderligere omrøring ved 25°C i en time tilsatte man 15 ml ethylbromacetat. Opløsningen blev omrørt ved 25°C i 30 minutter og derefter i to timer ved 45°C, hvorefter man afsluttede reaktionen ved at tilsætte 200
35 ml vand. Nu tilsatte man 400 ml petroleumsether under omrøring, bortkastede den organiske fase og vaskede den

viskose vandige fase med petroleumsether. Man fortyn-
dede den vandige fase, der indeholdt PEG ethylesteren
til et rumfang på ca. 1 l og forsåbede, idet man holdt
temperaturen på 60-70°C i fem timer. Endelig omdannede
5 man carboxygrupperne på PEG til frie syrer ved at gøre
opløsningen sur til pH 2. Man fjernede rester af brom-
eddikesyre ved dialyse eller ved gelfiltrering. Den så-
ledes fremstillede PEG ether kan erstatte den succiny-
lerede PEG, der benyttes i Eksempel 1.

10 Således opnåede man ved at anvende 9,4 g aktive-
ret polyethylenglycol med en molekylvægt på 40 000 Dal-
ton og 7,9 mg bovin SOD et addukt, der indeholdt i mid-
del 3,3 strenge PEG pr. molekyle SOD. Molekylvægten af
produktet var målt ved HPLC ca. 140 000 Dalton. Dette
15 addukt havde, som senere beskrevet, stærkt reduceret
immunogenitet i mus.

Under anvendelse af 6,5 g polyethylenglycol med
en molekylvægt på 120 000 Dalton og 87 mg bovin SOD
opnåede man et addukt med en molekylvægt på 245 000
20 Dalton målt ved HPLC.

Eksempel 7 (Sammenligning)

Man fastslog anvendeligheden af fremgangsmåden,
25 når man anvendte human SOD.

Man anbragte 20 mg prøver af aktiveret succiny-
leret PEG i reagensglas og tilsatte 100 µl af en op-
løsning af 3 mg/ml human SOD i 0,2 M pH 8 phosphat-bo-
ratpuffer. Efter blanding fjernede man 2 µl prøver af
30 hver reaktionsblanding og standsede reaktionen i 58 µl
0,01 M 1:1 natriumacetat:eddikesyrepuuffer i et 150 µl
mikroreagensglas. Til kontrol af reaktionens fremad-
skriden foretog man elektroforese af prøver ved pH 8,5,
idet man benyttede 250 V i 15 minutter og derefter far-
35 vede med nitroblå tetrazolium.

Efter 3-3,5 time ved stuetemperatur standsede
man reaktionen i opløsningerne med 45 µl 0,03 M 1:1

acetatpuffer pr. mg PEG. Tilsætning af 0,1 ml pH 8 reaktionspuffer og 0,98 ml 30 mM acetat gav en slutværdi for pH på 6,4. Dette fald i pH og 1:10 fortyndingen standsede yderligere PEG-SOD sammenkobling og hydrolyse. Man fandt, at der ikke foregik nogen synderlig reaktion efter 30-45 minutters forløb.

Dette PEG-SOD med strenge af PEG på 19 000 Dalton kunne, lige som frit SOD, ikke påvises i musserum en dag efter injektionen, men et præparat med 10 strenge på 30 000 Dalton gav en forlænget levetid. Human SOD kan således anvendes i forbindelse med opfindelsen.

Eksempel 8

15

Man benyttede et forsøg med carrageenan-induceret poteødem hos mus til at få et overslag over den antiinflammatoriske aktivitet. Ved dette poteødem forsøg indsprøjtede man 0,03 ml 1,0% carrageenan i saltvand subkutan i trædepuderne på det højre bagben hos Swiss Webster mus af hunkøn, og derefter gav man 30 minutter senere dosis subkutan med 100 µl af prøveforbindelsen, der blev fremstillet ved fortynding i saltvand, fulgt af filtersterilisering. 24 timer efter carrageenaninjektionen aflivede man dyrene, afskar begge fødder på bagbenene og vejede dem. Man beregnede ødemet som vægten af foden med injektionen (højre) minus vægten af foden uden injektion (venstre). Man beregnede middelværdi og standardafvigelse for vægten af ødemeerne for hver behandlingsgruppe, deriblandt en kontrolgruppe, der kun fik saltvand.

Ved en dosis på 30 µg pr. mus var et addukt med 2,6 strenge PEG med en molekylvægt på 45 000 Dalton mere effektiv, hvad angår reduktion af ødemeerne, end et 35 addukt med 3,4 strenge af PEG med en molekylvægt på 21 000 Dalton (43% inhibition, henholdsvis 14% inhibi-

tion). Et addukt fremstillet med tre strenge PEG med en molekylvægt på 120 000 Dalton gav en 41% ødeminhibition med en dosis på 10 µg pr. mus. Nativ, bovin-Cu/Zn-SOD var inaktivt her, selv ved en dosis på 300 µg pr. mus, og et addukt fremstillet med 14 strenge PEG med en molekylvægt på 5000 Dalton var også inaktivt ved en dosis på 100 µg pr. dyr.

Eksempel 9

10

Som et assay for antigenvirkning benyttede man et fastfase enzymimmunassay med kompetitiv binding (ELISA) til at måle krydsaktiviteten af PEG-SOD forbindelser med indhold af bovin-Cu,Zn-SOD med kanin-antistof rettet mod højrenset nativt bovin-Cu,Zn-SOD. Konjugater ifølge opfindelsen krævede færre strenge PEG til at reducere den antigene virkning, end forbindelser fremstillet med kortere strenge, f.eks. PEG med en molekylvægt på 5000 Dalton. For eksempel var et addukt med et gennemsnit på 2,6 strenge PEG med en molekylvægt på 45 000 Dalton og et addukt med 4 strenge PEG med en molekylvægt på 35 000 Dalton henholdsvis en trediedel og en tiendedel så antigen virkende som et addukt med 6 strenge PEG med en molekylvægt på 5000 Dalton. Adduktet med 4 strenge PEG med en molekylvægt på 35 000 Dalton var halvt så antigen, som et addukt med 14 strenge PEG med en molekylvægt på 5000 Dalton. Blandt addukter fremstillet med mindre end 4 PEG strenge, var sådanne med PEG i molekylvægtområdet 100 000-120 000 Dalton mindre antigene, end addukter med det samme antal kortere strenge. Således var et SOD addukt med 2 PEG strenge med en molekylvægt på 120 000 Dalton kun en femtedel så antigen virkende som et addukt med 2 strenge PEG med en molekylvægt på 35 000 Dalton.

Immunologisk sensitivering

Forsøg med immunisering af mus med konjugater ifølge opfindelsen, med konjugater med korte PEG-
5 strenge og med nativ bovin-Cu,Zn-SOD er omtalt ovenfor i Eksemplerne 1, 2 og 6. Nærmere detaljer for disse forsøg gives i det følgende.

Prøveforbindelserne blev indgivet i en 0,9% NaCl injektionsopløsning fremstillet under udelukkelse af
10 pyrogen materiale o.l., der kunne fremkalde en falsk immunresponsreaktion.

For forbindelser fra Eksemplerne 1 og 6 immuniserede man mus ved 4 subcutane injektioner i den løse hud ved halsen, i løbet af to uger med 0,075 mg protein
15 pr. dosis, og foretog derefter et angreb med 0,04 mg protein gennem halevenen med 21 dages mellemrum. For forbindelser fra Eksempel 2 modtog hver mus én subcutan injektion med 5 mg/kg med to ugers mellemrum (sædvanligvis på dagene 0, 14, 28 og 42, i forhold til start
20 af forsøget). Man indgav angrebsdoser af identiske opløsninger gennem halevenen med to ugers mellemrum, begyndende to uger efter indgivelsen af den sidste subcutane dosis.

Efter hvert intravenøst angreb iagttog man muse-
25 ne i op til ½ time efter injektionen, og igen 1 time efter injektionen til registrering af tegn på anafylaktisk reaktion. Herved benyttede man følgende skala:

Mild anafylakse:

- 1 = overdreven slikning, gnidning eller kradning
- 30 2 = strækning af underlivet
- 4 = usædvanlig ro

Alvorlig anafylakse:

- 8 = bedøvelse
- 16 = kramper, og
- 35 32 = død

Resultaterne af forsøg hørende til Eksempel 2 ses i nedenstående Tabel 2.

TABEL 2
IMMUNOGENITET AF PEG-SOD'er
MÅLT VED ET
MUSESENSITIVERINGS/ANGREBSFORSØG

Forbindelse	Mus Nr.	Resultat ved angreb nr.				
		1	2	3	4	5
Nativ SOD (eksempel 2)	1			4	4	4
	2			32---	---	-->
	3	4	2		4	4
	4			1		
	5			32---	---	-->
	6			1		
	7					
	8		2	4	4	4
	9	4	32---	---	---	-->
	10	32---	---	---	---	-->
	11	4	32---	---	---	-->
	12		8	4	4	4
	13		4	4	4	4
	14	4	8	32---	---	-->
	15		32---	---	---	-->
	16		2		4	32
Totalresultat for 4 angreb = 308						
Vægt (g)						
Middel:		31.7	32.1	33.0	33.6	34.8
SEM:		2.9	3.3	3.4	3.9	3.4
4XPEG-35K (eksempel 2)	1	2	1		1	NOT CHALLENGED
	2	2				
	3				1	
	4	2	4	4	2	
	5		2	4	1	
	6					
	7		1	1	1	
	8					
	9	2	1	2	1	
	10	2	2	1		
	11					
	12					
	13			2		
	14					
	15		4	2	1	
	16				1	
Totalresultat for 4 angreb = 50						
Vægt(g)						
Middel:		32.3	33.0	34.1	35.1	35.2
SEM:		2.6	3.2	3.5	3.2	4.0

(fortsættes)

TABEL 2
(fortsat)

Forbindelse	Mus Nr.	Resultat ved angreb nr.				
		1	2	3	4	5
3XPEG-120K (eksempel2)	1					
	2					
	3			1	2	
	4					
	5					
	6				2	1
	7		1	2		
	8					
	9					
	10					
	11				4	
	12					
	13					
	14					
	15				1	
	16					1
	Totalresultat		for 4 angreb = 13			
Vægt(g)						
Middel:		30.8	31.4	31.7	33.4	34.1
SEM:		3.7	3.6	4.0	4.4	4.6
5XPEG-100K (eksempel 2)	1					N O T C H A L L E N G E D
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7				1	
	8					
	9					
	10				1	
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					
	16				2	
	Totalresultat		for 4 angreb = 4			
Vægt(g)						
Middel:		32.0	32.8	33.3	34.1	35.0
SEM:		2.9	3.3	3.6	3.4	3.7

Det ses, at 7 ud af 16 dyr i gruppen, der modtog
nativ SOD, var døde efter det fjerde intravenøse ang-
reb, og at man kunne registrere 22 yderligere tegn på
5 fra mild til alvorlig anafylakse. Modsætningsvis fore-
kom ingen dødsfald i de tre grupper behandlet med PEG-
SOD, og man registrerede henholdsvis 27,7 og 3 tegn på
mild anafylakse hos grupperne behandlet med 4xPEG-35K,
3xPEG-120K og 5xPEG-120K. Totalresultatet for anafylak-
10 tisk reaktion var i disse tre grupper efter fire angreb
henholdsvis 50, 13 og 4.

Resultaterne af forsøg hørende til Eksemplerne 1
og 6 ses i nedenstående tabel 3:

TABEL 3
 IMMUNOGENITET AF PEG- SOD's
 MÅLT VED ET
 MUSESENSITIVERINGS/ANGREBSFORSØG

Forbindelse	Mus Nr.	Resultat ved angreb nr.				
		1	2	3	4	5
Nativ SOD (eksempel 1)	1					4
	2			1		1
	3	4	4	8	32--	-->
	4	32--				-->
	5					4
	6	4	4	1	32--	-->
	7					
	8	4	8	8	8	8
	9	8		32--		-->
	10	32--				-->
	Totalresultat	for 5 angreb = 239				
	Totalresultat	for 4 angreb = 222 omregnet til 16 dyr = 355				
	Vægt(g) Middel: SEM:	31.5 2.2	33.7 2.4	35.2 2.9	37.4 3.3	N.D. N.D.
6XPEG-5K (eksempel 1)	1					
	2		4	8	32--	-->
	3				32--	-->
	4			1	4	
	5			1	4	1
	6				4	1
	7				1	
	8					1
	9				4	
	10				1	
	Totalresultat	for 5 angreb = 99				
	Totalresultat	for 4 angreb = 96 omregnet til 16 dyr = 154				
	Vægt(g) Middel: SEM:	29.8 2.3	32.2 2.3	33.0 2.0	34.3 2.3	35.0 2.7

(fortsættes)

JABEL 3
(fortsat)

Forbindelse	Mus Nr.	Resultat ved angreb nr.				
		1	2	3	4	5
3.3XPEG-40K (eksempel 6)	1				2	2
	2					
	3					
	4					
	5					
	6	1			1	
	7					
	8					
	9					
	10					
	11					
	12					
	13					
	14					
	15					
	16					
	Totalresultat	for 4 angreb = 4				
	Vægt(g) Middel: SEM:	31.0 2.4	31.4 2.5	32.3 2.8	32.7 3.2	34.7 3.8
3XPEG-72K (eksempel 1)	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
	6					
	7					
	8					
	9					
	10					
	Totalresultat	for 5 angreb = 0				
	Vægt(g) Middel: SEM:	29.0 1.9	30.3 1.9	32.0 2.2	33.4 2.2	34.9 2.9

Som ovenfor nævnt kan det af tabellen ses, at 5 ud af 10 mus var døde efter det fjerde intravenøse angreb med nativ SOD, og 2 ud af 10 mus var døde efter det 5 fjerde intravenøse angreb med 6xPEG-5K, hvorimod ingen dyr var døde efter fire eller endog fem angreb med 3xPEG-72K eller 3,3xPEG-40K.

Til sammenligning af resultater fra tabellerne 2 og 3 kan man benytte resultater i Tabel 3 for totalresultat (af anafylaktiske pointværdier) efter 4 angreb og multiplicere med 1,6 (16 mus/10 mus).

Herved findes følgende totalresultater:

	Nativ SOD	(Eks. 1)	355
	Nativ SOD	(Eks. 2)	308
15	6xPEG-5K	(Eks. 1)	154
	4xPEG-35K	(Eks. 2)	50
	3,3xPEG-40K	(Eks. 6)	4
	3xPEG-72K	(Eks. 1)	0
	5xPEG-100K	(Eks. 2)	4
20	3xPEG-120K	(Eks. 2)	13

De anafylaktiske totalresultater på 0-13 er næppe signifikant forskellige, men er tydeligt bedre end resultatet 50 for 35K-konjugatet, der ikke er ifølge 25 opfindelsen.

P A T E N T K R A V

1. Vandopløseligt, i det væsentlige ikke-immu-
5 nogent konjugat af en superoxiddismutase koblet med et
koblingsmiddel til en polyalkylenglycol, k e n d e -
t e g n e t ved, at polyalkylenglycolen er en poly-
ethylenglycol eller et polyethylen-polypropylenglycol
copolymerisat, hvori denne glycol har en middelmolekyl-
10 vægt målt ved HPLC med PEG som standard på ca. 40 000 -
200 000 Dalton og er terminalt usubstitueret eller sub-
stitueret med C₁-C₄ alkylgrupper.

2. Konjugat ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at polyalkylenglycolen er en polyethylen-
15 glycol med en middelmolekylvægt på ca. 40 000 - 200 000
Dalton målt ved HPLC.

3. Konjugat ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at polyethylenglycolen er en polyethylen-
glycol med en middelmolekylvægt på ca. 50 000 - 150 000
20 Dalton målt ved HPLC.

4. Konjugat ifølge krav 3, k e n d e t e g -
n e t ved, at der er koblet 2-8, fortrinsvis 2-6, po-
lyethylenglycolgrupper til hvert kobber- og zinkholdigt
superoxiddismutasemolekyle.

25 5. Konjugat ifølge krav 4, k e n d e t e g -
n e t ved, at polyethylenglycolen er en isopropoxy-
ethylenglycol.

6. Konjugat ifølge krav 1, k e n d e t e g -
n e t ved, at den terminale gruppe i en polyethylen-
30 glycol er bundet via et CO-led til terminale aminogrup-
per på lysinrester i superoxiddismutase.

7. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g n e t
ved, at det indeholder en tilstrækkelig mængde af et
konjugat ifølge krav 1 til opnåelse af en terapeutisk
35 superoxiddismutasevirkning.

8. Præparat ifølge krav 7, k e n d e t e g -
n e t ved, at det indeholder en effektiv antiinflamma-
torisk mængde af konjugatet.

9. Præparat ifølge krav 7, k e n d e t e g -
n e t ved, at den terapeutiske superoxiddismutasevirk-
ning er en mildning af oxygentoksicitet.

10. Præparat ifølge krav 7, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at den terapeutiske superoxiddismutasevirk-
ning er en beskyttelse mod reperfusionsskader.