



(12) **PATENT**

(19) **NO**

(11) **329749**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20005337	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1999.04.28 PCT/US1999/09161
(22)	Inng.dag	2000.10.23	(85)	Videreføringsdag	2000.10.23
(24)	Løpedag	1999.04.28	(30)	Prioritet	1998.04.28, US, 83339
(41)	Alm.tilgj	2000.12.28			
(45)	Meddelt	2010.12.13			
(73)	Innehaver	Merck Serono SA, Centre Industriel, CH-1267 COINSINS, VAUD, Sveits Milton J Harris, 3119 Highland Plaza, Huntsville, AL 35081, US-, USA Nabil El Tayar, Milton, MA, US-, USA Michael J Roberts, Madison, AL, US-, USA Wayne Sawlivich, Wilmington, MA, US-, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Polyol-interferon-β-konjugat, fremgangsmåte for fremstilling derav, farmasøytisk blanding derav og anvendelse derav for fremstilling av medikamenter.			
(56)	Anførte publikasjoner	Goodson R. J. et al. Site-directed Pegylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site, Biotechnology april 1990, vol.8, side 343-346, WO 87/00056 A1, US 5206344 A			
(57)	Sammendrag				

PEG-IFN- β -konjugater, hvor en PEG-andel er kovalent bundet til Cys¹⁷ av human IFN- β , er fremstilt ved en fremgangsmåte for setespesifikk PEGylering med et tiolreaktivt PEGyleringsmiddel. En farmasøytisk blanding og en fremgangsmåte for behandling av infeksjoner, tumorer og autoimmune sykdommer og betennelsessykdommer er også tilveiebragt. Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for den trinnvise festingen av PEG-andeler i serie til et polypeptid, og nærmere bestemt til IFN- β .

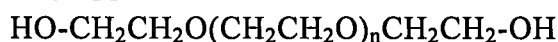
Oppfinnelsen angår polyol-interferon- β -konjugater hvor en polyolenhet er kovalent bundet til Cys¹⁷. Ytterligere hensikter med den foreliggende oppfinnelsen er fremgangsmåte for deres fremstilling, farmasøytisk blanding derav samt deres anvendelse i fremstilling av medikamenter til behandling av infeksjoner, tumorer og autoimmun- og betennelsessykdommer.

Human fibroblast interferon (IFN- β) har antivirussyaktivitet og kan også stimulere naturlige drepeceller mot neoplastiske celler. Det er et polypeptid på ca. 20000 Da induisert av virus og dobbel-strengede RNAer. Fra nukleotidsekvensen til genet for fibroblast interferon, klonet ved rekombinant DNA-teknologi, utledet Derynk et al. (Nature, 285:542-547, 1980) den fullstendige aminosyresekvensen av proteinet. Den er 166 aminosyrer lang.

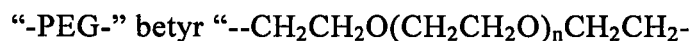
Shepard et al. (Nature, 294:563-565, 1981) beskrev en mutasjon av base 842 (Cys $\rightarrow$ Tyr ved posisjon 141) som opphevet dens antivirussyaktivitet, og en variant kloner ved at nukleotider 1119-1121 er utelatt.

Mark et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(18):5662-5666, 1984) innsatte en kunstig mutasjon ved å erstatte base 469 (T) med (A), noe som førte til at en aminosyre går fra Cys $\rightarrow$ Ser ved posisjon 17. Den resulterende IFN- β ble rapportert å være så aktiv som den "naturlige" IFN- β og stabil under langtidslagring (-70°C).

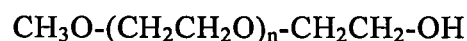
Kovalent festing av den hydrofile polymer-polyetylenglykol (PEG), også kjent som polyetylenoksid, (PEO), til molekyler har viktige applikasjoner i bioteknologi og medisin. I dens mest vanlige form er PEG en lineær polymer som har hydroksylgrupper ved hver ende:



Denne formelen kan kort være representert som HO-PEG-OH, hvor det er ment at -PEG- representerer den polymer ryggkjeden uten endegruppene:



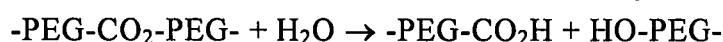
PEG er vanlig anvendt som metoksy-PEG-OH, (m-PEG), hvor én ende er den relativt inerte metoksygruppen, mens den andre enden er en hydroksylgruppe som er utsatt for kjemisk modifisering.



Forgrenede PEGer er også i vanlig bruk. De forgrenede PEGer kan være representert som R(-PEG-OH)_m hvor R representerer en sentral kjerneandel slik som pentaerytritol eller glyserol, og m representerer antallet forgreningsarmer. Antallet forgreningsarmer (m) kan være fra tre til hundre eller flere. Hydroksylgruppene er utsatt for kjemisk modifisering.

En annen forgrenet form, slik som den beskrevet i WO 96/21469, har en enkelt ende som er utsatt for kjemisk modifisering. Denne type PEG kan være representert som $(\text{CH}_3\text{O}-\text{PEG}-)_p\text{R}-\text{X}$, hvor p er lik 2 eller 3, R representerer en sentralkjerne slik som lysin eller glyserol, og X representerer en funksjonell gruppe slik som karboksyl som er utsatt for kjemisk aktivering. Enda en forgrenet form "den pendante PEG", har reaktive grupper, slik som hydroksyl, langs PEG-ryggkjeden istedenfor ved enden av PEG-kjedene.

I tillegg til disse former av PEG kan polymeren også fremstilles med svake eller degraderbare koplinger i ryggkjeden. F.eks. har Harris vist i US patentsøknad 06/026 716 at PEG kan fremstilles med esterkoplinger i polymerryggkjeden som er utsatt for hydrolyse. Denne hydrolysen resulterer i kløyving av polymeren til fragmenter av lavere molekylvekt, i henhold til reaksjonsruten:



Ifølge den foreliggende oppfinnelsen er uttrykket polyetylenglykol eller PEG ment å omfatte alle de ovennevnte derivater.

Kjemien til kopolymerene av etylenoksid og propylenoksid er nært relatert til PEG, og de kan anvendes istedenfor PEG i mange av dens applikasjoner. De har den følgende generelle formelen:



hvor R er H eller CH_3 .

PEG er en nyttig polymer som har egenskapen av høy vannoppløselighet samt høy oppløselighet i mange organiske løsningsmidler. PEG er også ikke-toksisk og ikke-immunogene. Når PEG er kjemisk festet (PEGylering) til en vannuløselig forbindelse, er det resulterende konjugatet generelt vannløselig, samt løselig i mange organiske løsningsmidler.

PEG-proteinkonjugater er for tiden anvendt i proteinfornyelsesterapier og for andre terapeutiske anvendelser. F.eks. er PEGylerte adenosindeaminase (ADAGEN[®]) anvendt for å behandle alvorlig kombinert immunomangelsykdom (SCIDS), PEGylert L-asparaginase (ONCAPSPAR[®]) anvendes for å behandle akutt lymfoblastisk leukemi (ALL), og PEGylert interferon- α (INTRON(R) A) er i fase III-forsøk for behandling av hepatitt C.

For en generell gjennomgåelse av PEG-proteinkonjugater med klinisk virkning vises det til N.L. Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15:210-218, 1994.

En rekke metoder er blitt utviklet for å PEGylere proteiner. Festing av PEG til reaktive grupper funnet på proteinet utføres typisk ved anvendelse av elektrofilisk aktiverte PEG-derivater. Festing av PEG til α - og ϵ -aminogrupper funnet på

lysinrester og N-enden resulterer i et konjugat bestående av en blanding av produkter.

- 5 Generelt består slike konjugater av en populasjon av flere PEG-molekyler festet pr. proteinmolekyl ("PEGmerer") som er i området fra null til antallet av amino-grupper i proteinet. For et proteinmolekyl som er blitt noe modifisert, kan PEG-enheten være festet ved en rekke forskjellige aminsteder.

- 10 Denne type av ikke-spesifikk PEGylering har resultert i en rekke konjugater som blir nesten inaktiv. Reduksjon av aktivitet er typisk bevirket ved skjerming av proteinets aktive bindingsdomene som er tilfelle med mange cytokiner og antistoffer. F.eks. beskriver Katre et al. i US patent 4 766 106 og US patent 4 917 888 PEGyleringen av IFN- β og IL-2 med et stort overskudd av metoksy-polyetylenglykol N-sukkinimidylglutarat og metoksy-polyetylenglykolol N-sukkinimidylsukkinat. Begge proteiner ble produsert i mikrobielle vertsceller, som muliggjorde den arealbegrensede mutasjonen av det fri cysteinet til et serin.
- 15 Mutasjonen var nødvendig i mikrobiell ekspresjon av IFN- β for å lette protein-sammenlegging. Særlig er IFN- β anvendt i disse forsøkene det kommersielle produktet Betaseron[®], hvor Cys¹⁷-rest er erstattet med et serin. I tillegg reduserte fraværet av glykosylering dens løselighet i vandig løsning. Arealbegrense PEGylering resulterte i øket løselighet, men et hovedproblem var det reduserte nivået av aktivitet og utbytte.
- 20

EP 593 868 med tittel PEG-interferonkonjugat, beskriver fremstillingen av PEG-IFN- α -konjugater. Imidlertid er PEGylasjonsreaksjonen ikke arealbegrenset, og derfor oppnås en blanding av posisjonelle isomerer av PEG-IFN- α -konjugater (jfr. også Monkarsh et al., *ACS Symp. Ser.*, 680:207-216, 1997).

- 25 Kinstler et al. i EP 675 201 demonstrerte den selektive modifiseringen av den N-enderesten av megakaryocyttevekst og utviklingsfaktor (MGDF) med mPEG-propionaldehyd. Dette førte til den reproducerbare PEGylasjonen og farmakokinetikker fra mengde til mengde. Gilbert et al. i US patent 5 711 944 demonstrerte at PEGylasjon av IFN- α med et optimalt aktivitetsnivå kunne produseres. I dette tilfellet var et omstendelig rensetrinn nødvendig for å oppnå det optimale konjugatet.
- 30

- 35 Størstedelen av cytokiner, samt andre proteiner, innehar ikke en spesifikk PEG-festesete og, bortsett fra eksemplene nevnt ovenfor, er det svært sannsynlig at noen av isomerene produsert ved PEGylasjonsreaksjonen er delvis eller totalt inaktiv, som således fører til et tap med hensyn på aktivitet for sluttblandingen.

Arealbegrenset mono-PEGylasjon er således et ønsket mål ved fremstillingen av slike proteinkonjugater.

Woghiren et al. i Bioconjugate Chem., 4(5):314-318, 1993, syntetiserte et tiol-selektiv PEG-derivat for en slik arealbegrenset PEGylasjon. Et stabilt tiol-beskyttet PEG-derivat i formen av en parapyridyldisulfidreaktiv gruppe ble vist å spesifikt konjugere til det fri cysteinet i proteinet, papain. Den nylig dannede
 5 disulfidbindingen mellom papain og PEG kunne kløyves under milde reduksjonsbetingelser for å regenerere det native proteinet.

Angivelse av ethvert dokument her er ikke ment som en innrømmelse av at slike dokumenter er aktuelle innen teknikkens stand, eller ansett å være materiale vedrørende patenterbarheten til ethvert krav i den foreliggende fremstillingen.
 10 Enhver uttalelse hva angår innhold eller en dato for et hvilket som helst dokument er basert på informasjon tilgjengelig for søkerne ved tiden for innleveringen og er ikke en innrømmelse av hva angår det korrekte med en slik uttalelse.

I den foreliggende oppfinnelsen er polyol-IFN- β -konjugater, og spesielt PEG-IFN- β -konjugater, tilveiebrakt hvor en polyolenhet er kovalent bundet til Cys¹⁷. Den
 15 spesifikke konjugasjonen oppnås ved å la et tiol-reaktivt polyolmiddel reagere med Cys¹⁷-resten i IFN- β . Slike konjugater er forventet å vise økt effektivitet in vivo. Hensikten er å oppnå økt løselighet ved nøytral pH, økt stabilitet (senket aggregasjon), senket immunogenisitet, og ingen tap av aktivitet med hensyn på «nativ» IFN- β . Resultatene av slik konjugasjon vil senke antallet av doser for en
 20 tilsiktet effekt, forenkle og stabilisere formuleringen av en farmasøytisk blanding, og eventuelt øke langtidsvirkningen.

Fig. 1 viser den kapillære elektroforese (CE) kurven av PEG-IFN- β -konjugatet før rensing.

Fig. 2A-2C viser rensingen av PEG-IFN- β -konjugatet utført ved størrelses-
 25 eksklusjonskromatografi (Superose 12): Fig. 2A - første gjennomløp; Fig. 2B - andre gjennomløp; Fig. 2C - tredje gjennomløp.

Fig. 3 viser SDS-PAGE-kromatografien av rensset PEG-IFN- β -konjugat fra det tredje kromatografigjennomløpet. Felter 1 og 4 er proteinmolekylvektbestanddeler, felt 2 er «nativ» IFN- β , og felt 3 er PEG-IFN- β -konjugat.

Fig. 4 rapporterer den kapillære elektroforese (CE) kurven av rensset PEG-IFN- β -konjugat hvor IFN- β er PEGylert med mPEG-OPSS_{5k}.
 30

Fig. 5 rapporterer MALDI MS spektrumet av rensset PEG-IFN- β -konjugat.

Fig. 6 viser en sammenligning mellom antiviralaktiviteten av «nativ» IFN- β og av PEG-IFN- β -konjugat. WISH-celler ble inkubert med indikerte konsentrasjoner av
 35 IFN- β -prøver i 24 timer før de ble utfordret med cytopatisk dose av vesikular

stomatitisvirus. Den cytopatiske effekten ble bestemt etter ytterligere 48 timer ved MTT-konversjon.

Fig. 7 viser bindingsprofilen av IFN- β og PEG-IFN i Daudi-celler.

Fig. 8 viser den farmokinetiske profilen av IFN- β og PEG-IFN i mus etterfølgende intravenøs administrering. De prikkede linjene indikerer assay-LOQ for hver standardkurve.

Fig. 9 viser den farmokinetiske profilen av IFN- β og PEG-IFN i mus etterfølgende subkutan administrering. De prikkede linjene indikerer assay-LOQ for hver standardkurve.

Den foreliggende oppfinnelsen er basert på oppdagelsen at festingen av en polyolandel, nærmere spesifikt en PEG-andel, til Cys¹⁷-resten av human IFN- β uventet økte (eller minst beholdt og resulterte ikke i en senkning) den IFN- β -biologiske aktiviteten fra det for nativ human interferon- β . Således utviser ikke bare IFN- β med en polyolandel festet til Cys¹⁷-resten den samme eller økte IFN- β -biologiske aktiviteten men dette polyol-IFN- β -konjugatet gir også de ønskede egenskapene sammenlignet med polyolandelen, slik som økt løselighet.

«IFN- β », som anvendt her, betyr human fibroblastinterferon, som oppnådd ved isolasjon fra geologiske fluider eller som oppnådd ved DNA-rekombinante teknikker fra prokaryotiske eller eukaryotiske vertsceller samt deres salter, funksjonelle derivater, forløpere med aktive fraksjoner, forutsatt at de inneholder cysteinresten som fremkommer ved posisjon 17 i den naturlig forekommende formen.

Polyolandelen i polyol-IFN- β -konjugatet i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan være ethvert vannløselig mono- eller bifunksjonelt poly(alkylenoksid) som har en lineær eller forgrenet kjede. Typisk er polyolet et poly(alkylenglykol) slik som poly(etylenglykol) (PEG). Imidlertid vil fagfolk erkjenne at andre polyoler, slik som f.eks. poly(propylenglykol) og kopolymerer av polyetylenglykol og polypropylenglykol, kan velegnet til formålet anvendes.

Som anvendt her er uttrykket "PEG-andel" ment å omfatte, men er ikke begrenset til, lineær og forgrenet PEG, metoksy PEG, hydrolytisk eller enzymatisk degraderbar PEG, pendant PEG, dendrimer PEG, kopolymerer av PEG og én eller flere polyoler, og kopolymerer av PEG og PLGA (poly(melkesyre/glykolsyre)).

Definisjonen "salter" som anvendt her refererer både til saltene av karboksylgruppene og til saltene av aminofunksjonene av forbindelsen som er oppnåelig ved kjente metoder. Saltene av karboksylgruppene omfatter uorganiske

salter som f.eks. natrium-, kalium- og kalsiumsalter og salter med organiske baser som de dannet med et amin som trietanolamin, argin eller lysin. Saltene av aminogruppene omfatter f.eks. salter med uorganiske syrer som saltsyre og med organiske syrer som eddiksyre.

- 5 Definisjonen “funksjonelle derivater” som anvendt her refererer til derivater som kan fremstilles fra de funksjonelle gruppene tilstede på de laterale kjedene av aminosyreandelene eller på de terminale N- eller C-gruppene i henhold til kjente metoder og er inkludert i den foreliggende oppfinnelsen når de er farmasøytisk akseptable, dvs. når de ikke kan ødelegge proteinaktiviteten eller ikke gir toksisitet
- 10 til de farmasøytiske blandingene inneholdende dem. Slike derivater omfatter f.eks. estere eller alifatiske amider av karboksylgruppene og N-acylderivater av fri aminogrupper eller O-acylderivater av fri hydroksylgrupper og er dannet med acylgrupper som f.eks. alkanoyl- eller aroylgrupper.

- 15 “Forløperne” er forbindelser som er omdannet til IFN- β i menneske- eller dyrekroppen.

- Som “aktive fraksjoner” av proteinet refererer den foreliggende oppfinnelsen til ethvert fragment eller enhver forløper av polypeptidkjeden i selve forbindelsen, alene eller i kombinasjon med relaterte molekyler og rester bundet i den, f.eks. rester av sukre eller fosfater, eller aggregater av polypeptidmolekylet når slike
- 20 fragmenter eller forløpere viser den samme aktiviteten av IFN- β som medikament.

Konjugatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles ved enhver av metodene kjent på området. Ifølge en utførelse av oppfinnelsen reageres IFN- β med det PEGylerende midlet i et passende løsningsmiddel og det ønskede konjugatet isoleres og renses f.eks. ved å anvende én eller flere kromatografiske metoder.

- 25 “Kromatografisk metode” betyr enhver teknikk som er anvendt for å separere komponentene av en blanding ved deres applikasjon på en bærer (stasjonær fase) hvorigjennom et løsningsmiddel (mobil fase) strømmer. Separasjonsprinsippene i kromatografien er basert på den forskjellige fysikalske beskaffenheten til stasjonær og mobil fase.

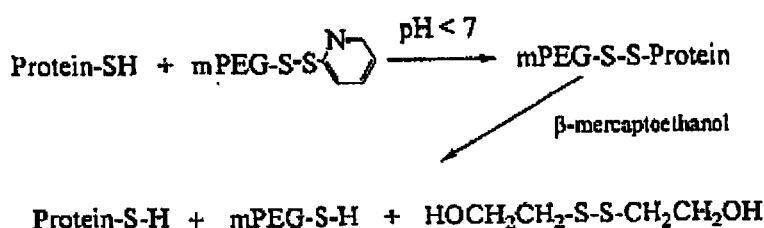
- 30 Noen spesielle typer kromatografiske metoder, som er velkjent innen litteraturen, omfatter: væske, høytrykksvæske, ioneutvekslings, absorpsjons, affinitets, partisjons, hydrofobisk, reversert fase, gelfiltering, ultrafiltrering eller tynnlags-kromatografi.

- 35 “Det tiol-reaktive PEGylerende midlet” som anvendt i den foreliggende fremstillingen, betyr ethvert PEG-derivat som er i stand til å reagere med tiolgruppen av cysteinresten. Det kan f.eks. være PEG inneholdende en funksjonell

gruppe slik som ortopyridyldisulfid, vinylsulfon, maleimid, iodacetimid, og andre. Ifølge en foretrukket utførelse av den foreliggende oppfinnelsen er det tiol-reaktive PEGylerende midlet ortopyridyldisulfid (OPSS) derivatet av PEG.

5 Det PEGylerende midlet er anvendt i dens mono-metoksylerende form hvor bare én ende er tilgjengelig for konjugasjon, eller i en bifunksjonell form hvor begge endene er tilgjengelige for konjugasjon, slik som f.eks. i dannelsen av et konjugat med to IFN- β kovalent festet til en enkelt PEG-andel. Det har fortrinnsvis en molekylvekt på 500-100000.

10 En typisk reaksjonsrute for fremstillingen av konjugatene ifølge oppfinnelsen er presentert under:



15 Den andre linjen av ruten ovenfor rapporterer en metode for kløyving av PEG-proteinkjeden. mPEG-OPSS-derivatet er svært selektivt for fri sulfhydrylgrupper og reagerer raskt under sure pH-betingelser hvor IFN- β er stabilt. Den høye selektiviteten kan demonstreres fra reduksjonen av konjugatet til den native formen av IFN- β og PEG.

20 Disulfidbindingen som produseres mellom proteinene og PEG-andelene er blitt vist å være stabil i sirkulasjonen, men den kan reduseres ved at den går inn i cellemiljøet. Derfor er det forventet at dette konjugatet, som ikke går inn i cellen, vil være stabil i sirkulasjonen inntil den er klarert.

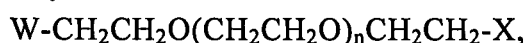
25 Det skal bemerkes at den ovennevnte reaksjonen er arealbegrenset fordi de to andre Cys-restene som fremkommer ved posisjonene 31 og 141 i den naturlige forekommende formen av human IFN- β ikke reagerer med det tiol-reaktive PEGylerende midlet siden de danner en disulfidbro.

30 En fremgangsmåte for den trinnvise festingen av to eller flere PEG-andeler til et polypeptid kan også benyttes. En slik fremgangsmåte er basert på erkjennelsen at en aktivert PEG med lav molekylvekt reagerer mer fullstendig med et sterisk hindret reaksjonssete på et protein enn et aktivert PEG med høy molekylvekt. PEG-modifisering av dyre terapeutiske proteiner må være kostnadseffektive for produksjonen av PEG-konjugatet skal være praktisk. I tillegg, for å redusere glomerular filtrasjon og optimalisere de farmakologiske egenskapene av PEG-

proteinkonjugatet, bør konjugatet ha en effektiv størrelse ekvivalent med det for et protein med en molekylvekt på 70 kDa. Dette betyr at for en arealbegrenset modifisering hvor 1 PEG vil være festet, er et PEG-derivat som har en molekylvekt på større enn 20 kDa fortrinnsvis festet. Hvis stedet for modifisering er sterisk overfylt, kan den reaktive gruppen på den store PEG-andelen ha vanskeligheter med å nå modifiseringsstedet og vil således føre til lavere utbytter. En metode for PEGylering av et polypeptid øker utbyttet av arealbegrenset PEGylering ved først å feste en liten hetero eller homo bifunksjonell PEG-andel at, på grunn av dens relativt mindre størrelse, kan reagere med sterisk overfylte seter. Etterfølgende festing av et PEG-derivat med høy molekylvekt til det lille PEG resulterer i høyt utbytte av det ønskede PEGylerte proteinet.

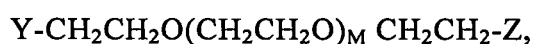
Metoden for trinnvis festing av to eller flere PEG-andeler i serie til et polypeptid omfatter festing av en lavmolekylvekt heterobifunksjonell eller homobifunksjonell PEG-andel først til polypeptidet og deretter festing av en monofunksjonell eller bifunksjonell PEG-andel til den fri enden av lavmolekylvekt PEG-andelen som er festet til polypeptidet. Etterfølgende den trinnvise festing av to eller flere PEG-andeler i serie til et polypeptid, hvis polypeptid er fortrinnsvis IFN- β og hvor Cys¹⁷, lokalisert i et sterisk overfylt sete, er det foretrukne setet for PEG-festing, kan PEG-polypeptidkonjugatet renses ved anvendelse av én eller flere av renseteknikkene slik som ioneutbyttekromatografi, størrelseseksklusjonskromatografi, hydrofobisk interaksjonskromatografi, affinitetskromatografi, og reversibel fasekromatografi.

Lavmolekylvekt PEG-andelen har formelen:



hvor W og X er grupper som uavhengig reagerer med et amin, sulfhydryl, karboksyl eller hydroksylfunksjonell gruppe for å feste lavmolekylvekt PEG-andelen til polypeptidet. W og X er fortrinnsvis uavhengig valgt fra ortopyridyldisulfid, maleimider, vinylsulfoner, iodacetamider, aminer, tioler, karboksyler, aktive estere, benzotriazolkarbonater, p-nitrofenolkarbonater, isocyanater og biotin. Lavmolekylvekt PEG-andelen har fortrinnsvis en molekylvekt i området på 100-5000 dalton.

Den monofunksjonelle eller bifunksjonelle PEG-andelen for festing til den fri enden av et lavmolekylvekt PEG som er festet til polypeptidet har fortrinnsvis en molekylvekt i området på 100-200 kDa og er fortrinnsvis en metoksy PEG, forgrenet PEG, hydrolytisk eller enzymatisk degraderbar PEG, pendant PEG, eller dendrimer PEG. Det monofunksjonelle eller bifunksjonelle PEG har videre formelen:



hvor Y er reaktiv til en terminal gruppe på den fri enden av lavmolekylvekt PEG-

andelen som er festet til polypeptidet og Z er $-OCH_3$ eller en gruppe reaktiv med for dannelse av et bifunksjonelt konjugat.

- 5 PEG-polypeptidkonjugatet produsert ved den ovennevnte metoden for trinnvis festing av to eller flere PEG-andeler kan anvendes for å produsere et medikament eller farmasøytisk blanding for behandling av sykdommer eller forstyrrelser hvor polypeptidene er effektive som en aktiv bestanddel.

- 10 En annen hensikt med den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe konjugatene i stort sett rensert form for at de skal være egnet til bruk i farmasøytiske blandinger, som aktiv bestanddel for behandlingen, diagnose eller prognose av bakterielle infeksjoner og virusinfeksjoner samt autoimmune sykdommer, betennelses-sykdommer og tumorer. Slike farmasøytiske blandinger representerer en ytterligere hensikt med den foreliggende oppfinnelsen.

Ikke-begrensende eksempler på de ovennevnte sykdommene omfatter: septisk sjokk, AIDS, reumatoid artritt, lupus erytematøs og multippel sklerose.

- 15 Ytterligere utførelser og fordeler med oppfinnelsen vil fremkomme i den følgende beskrivelsen.

Administreringen av en farmakologisk aktiv mengde av konjugatene ifølge oppfinnelsen til subjekter med risiko for å utvikle én av sykdommene rapportert ovenfor eller til subjekter som allerede viser slike patologier kan utføres.

- 20 Enhver administreringsrute som er kompatibel med det aktive prinsippet kan anvendes. Parenteral administrasjon, slik som subkutan, intramuskulær eller intravenøs injeksjon er foretrukket. Dosen av den aktive bestanddelen som administreres avhenger av basisen av de medisinske reseptene ifølge alder, vekt og enkeltvis respons for pasienten.

- 25 Dosen kan være mellom 10 μg og 1 mg daglig for en gjennomsnittlig kroppsvekt på 75 kg og den foretrukne daglige dosen er mellom 20 μg og 200 μg .

- 30 Den farmasøytiske blandingen for parenteral administrering kan fremstilles i en injiserbar form omfattende det aktive prinsippet og en egnet bærer. Bærere for den parenterale administreringen er velkjent på området og omfatter, f.eks. vann, saltholdig løsning, Ringer-løsning og/eller dekstrose. Bæreren kan inneholde små mengder av tilsetninger for å opprettholde stabiliteten og isotonisiteten av den farmasøytiske fremstillingen. Fremstillingen av løsningene kan utføres i henhold til de ordinære modalitetene.

Foreliggende oppfinnelse gjelder således polyol-interferon- β -konjugat som er kjennetegnet ved at den har en polyolandel som er kovalent bundet til Cys¹⁷ av human interferon- β .

Oppfinnelsen gjelder også en fremgangsmåte for fremstilling av polyol-interferon- β -konjugatet ifølge oppfinnelsen, der fremgangsmåten er kjennetegnet ved at den innbefatter trinnene:

- 5 reagere interferon- β med et tiol-reaktivt polyolmiddel for setespesifikt og -kovalent å feste en polyolandel til Cys¹⁷ av human interferon- β for å fremstille et polyol-interferon- β -konjugat; og
- 10 utvinne det produserte polyol-interferon- β -konjugatet.

Foreliggende oppfinnelse er også rettet på farmasøytiske blandinger som innbefatter et polyol-interferon- β -konjugat ifølge oppfinnelsen, som er kjennetegnet ved at den er en aktiv bestanddel, og en farmasøytisk akseptabel bærer, et tilsetningsstoff eller et hjelpemiddel.

- 15 I tillegg gjelder foreliggende oppfinnelse anvendelse av et polyol-interferon- β -konjugat ifølge oppfinnelsen, for fremstilling av et medikament til behandling av infeksjoner, tumorer og autoimmun- og betennelsessykdommer.

Den foreliggende oppfinnelsen er blitt beskrevet under henvisning til de spesifikke utførelsesformene, men innholdet i beskrivelsen omfatter alle modifiseringer og substitusjoner som kan gjøres av en fagmann på området uten å gå utover meningen og hensikten med det som er angitt i kravene.

Oppfinnelsen vil nå beskrives ved hjelp av følgende eksempler, som ikke skal anses for å være begrensende på noen som helst måte.

EKSEMPEL 1: Fremstilling av PEG-IFN- β -konjugat

25 Modifisering av IFN- β med mPEG_{5k}-OPSS

Rekombinant human IFN- β , stabil ved en konsentrasjon på 0,37 mg/ml i 50 mM natriumacetatbuffer, pH 3,6, ble anvendt for fremstillingen av et PEG-IFN- β -konjugat. Omtrent 1,0 ml 6 M urea ble tilsatt 2 ml av IFN- β ved en konsentrasjon på 0,37 mg/ml (0,74 mg, $3,7 \times 10^{-8}$ mol). mPEG_{5k}-OPSS ble tilsatt i molart
 30 overskudd av 50 mol til 1 mol av IFN- β og de to ble reagert i en polypropylen-ampulle for enten 2 timer ved 37°C eller 1 time ved 50°C. Reaksjonsblandingen ble analysert med kapillær elektroforese (CE) kurve for å bestemme graden av PEG-IFN- β -konjugatdannelse ved PEGylasjonsreaksjonen før noen rensing (fig. 1). Et typisk utbytte for denne reaksjonen er 50 % PEG-IFN- β . Reaksjonsproduktene ble
 35 filtrert fra reaksjonsblandingen med et 0,22 mm sprøytefilter og den filtrerte løsningen ble så ført oppå en størrelseseksklusjonskolonne (enten Superose 12 eller

Superdex 75, Pharmacia) og vasket ut med 50 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7,0 buffer. Fig. 2A viser elusjonsprofilen fra rensingen av PEG-IFN- β -konjugatet og en Superose 12 størrelseseksklusjonskromatografikolonne. Toppene ble samlet og analysert med SDS-PAGE (fig. 3). Fraksjonene inneholdende PEG-IFN- β -konjugatet ble slått sammen og konsentrat ble så på nytt ført til den samme størrelseseksklusjonskolonnen for ytterligere å rense PEG-IFN- β -konjugatet på grunn av nærheten av "den native" IFN- β -toppen (fig. 2B). Denne prosedyren ble gjentatt (tredje gjennomløp) for å forsikre seg om renhet (fig. 2C). Fig. 4 og fig. 5 viser den kapillære elektroforesekurven og MALDI MS-spektrumet, henholdsvis, for det rensede PEG-IFN- β -konjugatet.

Modifisering av IFN- β med mPEG_{30k}-OPSS

Rekombinant human IFN- β ble tilveiebragt i løsning ved 0,36 mg/ml i 50 mM natriumacetatbuffer, pH 3,6. Omtrent 36 mg mPEG_{30k}-OPSS i 3 ml avionisert H₂O ble tilsatt 3 ml IFN- β ved 0,36 mg/ml (1,08 mg, $4,9 \times 10^{-8}$ mol) og de to ble reagert i en polypropylenampulle i 2 timer ved 50°C. Reaksjonsblandingen ble analysert med kapillær elektroforese for modifisering. Typiske utbytter for denne reaksjonen er < 30 %. Løsningen ble så ført oppå en størrelseseksklusjonskolonne (Superose 12, Pharmacia) og vasket ut med 50 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7,0 buffer. Toppene ble samlet og analysert med SDS-PAGE med hensyn på deres innhold.

EKSEMPEL 2: Biologisk aktivitet av PEG-IFN- β -konjugatet

For å fastslå effektene av PEGylering på anti-virusaktiviteten av human rekombinant IFN- β , ble humane WISH amniotiske celler preinkubert med enten nylig fremstilt IFN- β (samme mengde som anvendt for PEGylering) eller PEG-IFN- β -konjugat. Den IFN- β formidlede anti-virusaktiviteten, som målt ved WISH-VSV cytopatisitetsassay, ble bestemt ifølge et anti-virus WISH bioforsøk utviklet basert på protokollen til Novick et al., *J. Immunol.*, 129:2244-2247 (1982). De anvendte materialene i dette WISH-assayet er som følger:

- WISH-celler (ATCC CCL 25)
- Vesikulære Stomatitisvirus-beholdninger (ATCC C-520-001-522), lagret ved -70°C
- IFN- β -human rekombinant, InterPharm Laboratories LTD (32, 075-type, Batch # 205035), 82×10^6 IU/ml, spesifikk aktivitet: 222×10^6 IU/mg
- PET-IFN- β -konjugat som fremtilt i eksempel 1 og opprettholdt i PBS, pH 7,4
- WISH vekstmedium (MEM høy glykose med Earls salter + 10 % FBS + 1,0 % L-glutamin + penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 μ g/ml)

WISH-assaymedium (MEM høy glykose med Earls salter + 5 % FBS + 1,0 % L-glutamin + penicillin/streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)

MTT ved 5 mg/ml i PBS, lagret ved -70°C. Protokollen for WISH-assayet er som følger:

- 5 - Fortynn IFN-β-prøvene til 2X startkonsentrasjonen i WISH-assaymediumet.
- Lag trippelfortynnede løsninger av IFN-β-prøver i WISH-assaymedium i flatbunnet 96-brønnplate slik at hver brønn inneholder 50 µl av fortynnet IFN-β-prøve (noen kontrollbrønner mottar 50 µl av bare WISH-assaymedium).
- Høst loggvekstfase WISH-celler med trypsin/EDTA-løsning, vask i WISH-assaymedium, og bring det til en sluttkonsentrasjon på $0,8 \times 10^6$ celler/ml.
- 10 - Tilsett 50 µl av WISH-cellesuspensjon (4×10^4 celler pr. brønn) til hver brønn. Sluttkonsentrasjon av IFN-β eksponert for cellene er nå 1X.
- Etter inkubering i 24 timer i en 5 % CO₂-humidifisert inkubator, tilsettes 50 µl av en 1:10 fortynning (i WISH-assaymedium) av VSV-beholdning (en dose forhåndsbestemt til «lyse» 100 % av WISH-celler i løpet av 48 timer) til alle brønner unntatt for ikke-viruskontrollbrønnene (disse mottar samme volum av bare assaymedium).
- 15 - Etter ytterligere 48 timer tilsettes 25 µl av MTT-løsning til alle brønner, hvoretter plater inkuberes i ytterligere 2 timer i en inkubator.
- 20 - Innholdene av brønnene fjernes ved plateinversjon, og 200 µl av 100 % etanol tilsettes brønnene.
- Etter 1 time avleses platene ved 595 nm ved anvendelse av Soft max Pro programpakke og Spectramax spektrofotometersystem (Molecular Devices).

Tabell 1 Antivirusaktivitet av PEGylert og etterlignede-PEGylerte IFN-β-prøver

IFN-β-prøve*	EC ₅₀ **
PEG-IFN-β-konjugat	3,9 +/- 0,7 pg/ml
IFN-β	16,4 +/- 1,0 pg/ml

25 * Beholdningskonsentrasjoner av IFN-β i prøver bestemt ved aminosyreanalyser.

** EC₅₀ (+/- S.D.) ble bestemt av programpakke Microcal Origin 4.1.

Som vist i fig. 6 og tabell 1 holdt PEG-IFN-β-konjugatet et nivå av anti-virus aktivitet som er overlegen det for den nylig fremstilte parentale mengden av IFN-β. Observasjonen at PEG-IFN-β-konjugatet har omtrent fire ganger høyere

bioaktivitet enn det for nylig fremstilt IFN- β kan også være en konsekvens av den økte stabiliteten av PEG-IFN- β -konjugatet med hensyn på det "native" IFN- β etter tilsetning av WISH-celleassaymedium.

EKSEMPEL 3: In vitro forsøk av den relative aktiviteten av PEG-IFN-prøver

- 5 Relativ bioaktivitet av PEG[30 kD]-IFN- β og PEG[2 x 20 kD]-IFN- β ble bestemt ved WISH-forsøk ved anvendelse av standardprotokollen beskrevet i eksempel 2 (tabell 2). Tre uavhengige forsøk ble utført av tre forskjellige personer ved forskjellige tider.

Tabell 2. Relativ anti-virus aktivitet av PEG-IFN- β

10

	Relativ interferon aktivitet* (fra tre studier)			
Prøve	Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 3	Gjennomsnitt (S.D.)
PEG[30 kD]-IFN- β	3,2 X høyere	3,1 X høyere	1,8 X høyere	3,0 X (0,78) høyere
PEG[2 x 20 kD]-IFN- β	4,2 X høyere	1,3 X høyere	0,85 høyere	2,1 X (1,8) høyere

* EC50 doser sammenlignet standard IFN- β inkludert i hvert forsøk.

** Sammenligning basert på IFN- β -konsentrasjon av 330 $\mu\text{g/ml}$. Beholdningskonsentrasjoner av PEG[30 kD]-IFN- β (5,41 $\mu\text{g/mm}$) og PEG[2 x 20 kD]-IFN- β (6,86 $\mu\text{g/ml}$) ble bestemt ved AAA.

- 15 Bindingen av PEG-IFN- β til dens reseptor på celler ble evaluert i nærværet av en bestemt mengde av ^{125}I -IFN- $\alpha 2a$. IFN- $\alpha 2a$ ble radiomerket med ^{125}I ved anvendelse av kloramin-T-metoden. ^{125}I -bundet-IFN $\alpha 2a$ ble fjernet fra fritt iod ved å føre reaktantene gjennom en Sephadex G25 kolonne og sammenslåing av de proteininnholdende fraksjonene (Pharmacia). ^{125}I -IFN- $\alpha 2a$ ble kvantifisert ved et
- 20 IFN- $\alpha 2a$ ELISA-forsøk (Biosource, USA) og den spesifikke aktiviteten ble bestemt. Daudi-celler dyrket i den eksponensielle vekstfasen ble høstet og 2×10^6 celler ble inkubert med 0,5 nM ^{125}I -IFN- $\alpha 2a$ i 3 timer ved romtemperatur i nærværet av forskjellige konsentrasjoner av PEG-IFN- β eller IFN- $\alpha 2a$ fortynnet i en forsøksbuffer som er RPMI 1640 inneholdende 2 % fosterbovinserum og 0,1 %
- 25 natriumazid. Ved slutten av inkubasjonen ble cellene spunnet gjennom et lag av ftalatolje og den cellebundne radioaktiviteten ble talt på gamma-telleren. Videre var bindingen av PEG[30 kD]-IFN- β og PEG[2 x 20 kD]-IFN- β til reseptoren svært lik eller nær bindingsaktiviteten av IFN- β som vist i fig. 7.

- I tillegg ble relativ aktivitet bestemt i en Daudi-celle (human B cellelymfoma) anti-proliferasjonsforsøk (tabell 3). Alle IFNer ble laget ved en 2x konsentrasjon av 200 ng/ml. Prøver ble trippelfortynnet ned platens lengde ved et sluttvolum på 100 μl . 1

- x 10⁵ celler/brønn (100 µl) ble tilsatt til hver brønn og inkubert i totalt 72 timer ved 37°C i CO₂-humidifisert inkubator. Etter 48 timer ble tritatisert (³H) tymidin tilsatt ved 1 µCi/brønn i 20 µl. Ved slutten av 72 timers inkubering ble platen høstet med Tomtek Plate Harvester. Resultatene vist i tabell 3 viser at ikke noe detekterbart tap av IFN-aktivitet ble observert fra PEGylering. Faktisk ble aktiviteten funnet å være noe høyere enn fri IFN-β. Dette kan skyldes dannelsen av inaktive aggregater i det fri IFN eller til forskjellene i kvantiseringsmetoder (aminosyreanalyse for PEG-IFN-prøver og RP-HPLC for IFN-β).

Tabell 3. Daudi anti-proliferasjonsforsøk

	IC ₅₀ dose*	Ganger økning i forhold til IFN
IFN-β (plate 1)	1153,1	--
PEG[30 kD]-IFN (71 A)	695,6	1,6X
IFN-β (plate 2)	1005,8	--
PEG[40 kD]-IFN (71 B)	629,4	1,7X

* pg/ml

EKSEMPEL 4: Farmakokinetikkstudier i mus

Intravenøs administrering

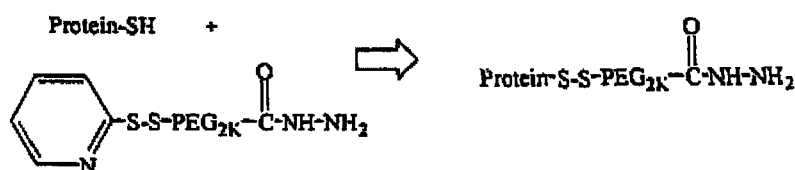
- Mus ble injisert med 100 ng av IFN-β, PEG[30 kD]-IFN-β eller PEG[2 X 20 kD]-IFN-β og blod ble fjernet ved angitte tider deretter. Serumkonsentrasjoner av IFN-β ble bestemt ved IFN-β-spesifikk ELIAS (Toray Industries) og resultatene er vist i fig. 8. 28 hunndyr B6D2F1 stammemus (6-8 uker) (omtrent 20 g hver) ble separert i fire grupper som følger: gruppe 1 inneholdt ni mus injisert med en 200 µl enkel pille på 500 ng/ml human IFN-β (sluttdose på 100 ng/mus); gruppe 2 (ni mus) mottok 200 µl av en ekvivalent masse av PEG30kD-IFN-β; gruppe 3 mottok 200 µl av en ekvivalent masse av PEG (2 x 20 kD)-IFN-β; og gruppe 4 er en gruppe av tre uninjiserde mus som fungerer som en negativ kontroll. Blodprøver (omtrent 200 µl/prøve) ble oppsamlet ved ni angitte tider ved avbrytelse av den retro-orbitale venøse pleksus med et kapillært rør. Blodprøver ble satt til å klumpe i 1 time ved romtemperatur, kantet og mikrosentrifugert. Sera fjernet derfra ble lagret ved -70°C inntil alle prøver var oppsamlet. Sera ble undersøkt for nærværet av bioaktiv human IFN-β ved anvendelse av Toray-inspeksjonen. Resultatene indikerte at området under kurven (AUC) er økt i betydelig grad i PEG-IFN-prøvene i forhold til fri IFN-β og at PEG-IFN-prøvene i forhold til fri IFN-β og at PEG[2 x 20 kD]-IFN-β er mye bedre enn PEG[30 kD]-IFN-β.

Subkutan administrering

Mus ble injisert subkutan med IFN- β og PEG-IFN (100 ng/mus). Fig. 9 viser at det totale området under kurven (AUC) økes dramatisk for PEG-IFN-prøvene sammenlignet med fri IFN- β . De farmakokinetiske studiene er sammenfallende med PEG-IFN-prøvene som har en lengre halveringstid og økt AUC.

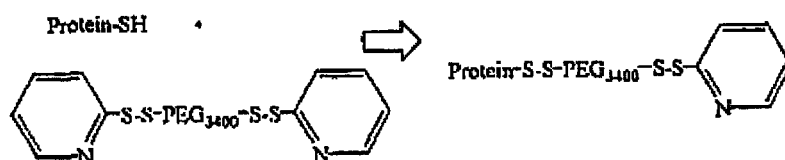
EKSEMPEL 5: Festing av lavmolekylvekt PEG-andel til polypeptid

Merking av interferon-beta med OPSS-PEG_{2k}-hydrazid



- 10 Rekombinant human interferon- β ble ført i løsning ved 0,33 mg/ml i 50 mM natriumacetatbuffer (pH 3,8). Omtrent 3,6 mg (40 mol overskudd til mol protein) av den heterobifunksjonelle PEG-reagensen, OPSS-PEG_{2k}-hydrazid, i 2 ml avionisert vann ble tilsatt til 3 ml av IFN- β med 0,33 mg/ml (0,99 mg) og de to ble reagert i en polypropylenampulle i 1 time ved 45°C. Reaksjonsblandingen ble
- 15 deretter analysert med kapillær elektroforese for å bestemme modifiseringsgraden. Typiske utbytter var i området på 90-97 % som var avhengig av renheten av interferon- β og PEG-reagensen. Løsningen ble deretter ført oppå en størrelses-
- 20 SDS-PAGE. De monoPEGylerte interferon- β -fraksjonene ble slått sammen og deretter anvendt i et ytterligere modifiseringstrinn med høymolekylvekt PEG.

Merking av interferon- β med (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀

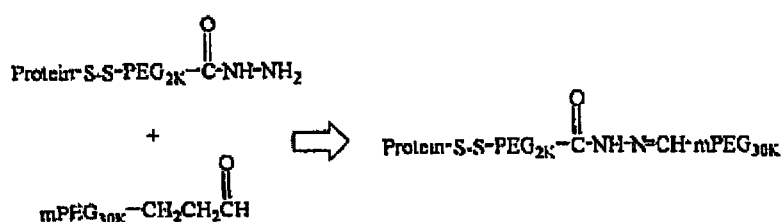


- 25 Rekombinant human interferon- β ble ført i løsning ved 0,33 mg/ml i 50 mM natriumacetatbuffer, pH 3,8. Omtrent 6,1 mg (40 mol overskudd til mol protein) av den homobifunksjonelle PEG-reagensen, (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀, i 2 ml avionisert vann ble tilsatt 3 ml av interferon- β ved 0,33 mg/ml (0,99 mg) og de to ble reagert i en

polypropylenampulle i 2 timer ved 50°C. Reaksjonen ble styrt med ikke-reduserende SDS-PAGE og sluttreaksjonsblandingen ble analysert med kapillær elektroforese for å bestemme graden av modifisering. Typiske modifiseringer for denne reaksjonen med interferon-β var > 95 %. Løsningen ble så ført oppå en størrelseseksklusjonsblander (Superdex 75, Pharmacia) og vasket ut med 50 mM natriumfosfat, 150 mM NaCl, pH 7,0 buffer. Toppene ble oppsamlet og analysert med SDS-PAGE med hensyn på deres innhold. De monoPEGylerte interferon-β-fraksjonene ble kombinert.

EKSEMPEL 6: Festing av andre PEG-andel til lavmolekylvekt PEGylerings-polypeptid

Modifisering av IFN-S-S-PEG_{2k}-hydrazid med mPEG_{30k}-aldehyd (ALD)



- 15 Til de kombinerte fraksjonene av IFN-S-S-PEG_{2k}-hydrazid i eksempel 5 ble tilsatt mPEG_{30k}-ALD i et 20 mol overskudd til protein. Reaksjonen ble utført ved romtemperatur (25°C) i 4 timer og en prøve ble tilsatt til en størrelseseksklusjonskolonne (Superose 6, Pharmacia) for å bestemme modifiseringsutbyttet. Modifiseringsutbyttet for denne reaksjonen var typisk > 80 % avhengig av renheten til PEG-reagensen og reaksjonsbetingelsene.
- 20

Ved at man nå fullstendig har beskrevet oppfinnelsen vil det nå erkjennes at for fagfolk på området kan det samme utføres innenfor et stort område av ekvivalente parametre, konsentrasjoner, og betingelser uten at å avvike fra rammen av oppfinnelsen og uten upassende eksperimentering.

- 25 Mens denne oppfinnelsen er blitt beskrevet i forbindelse med spesifikke utførelser derav, skal det forstås at den kan ytterligere modifiseres. Denne fremstillingen er ment å dekke enhver variasjon, anvendelse, eller tilpasning av oppfinnelsen etterfølgende, generelt, prinsippene for oppfinnelsen og omfattende slike avvik fra den foreliggende fremstillingen som er kjent innenfor vanlig praksis innen området
- 30 som gjelder for oppfinnelsen og som kan gjelde for vesentlige trekk som her er fremsatt i patentkravene.

Alle referanser som her er angitt, omfattende journalartikler eller sammendrag, publisert eller upublisert US eller utenlandske patentsøknader, meddelte US eller utenlandske patenter, eller enhver annen referanse, er fullstendig innarbeidet ved referanse her, omfattende alle data, tabeller, figurer, og tekst presentert i de anførte referansene. Videre er alt innholdet av de anførte referansene innenfor referansene anført her også fullstendig innarbeidet ved referanse.

Referanse til kjente metodetrinn, konvensjonelle metodetrinn, kjente metoder eller konvensjonelle metoder er ikke på noen som helst måte en innrømmelse av at noe aspekt, beskrivelse eller utførelse av den foreliggende oppfinnelsen er beskrevet, undervist eller foreslått i den relevante teknikken.

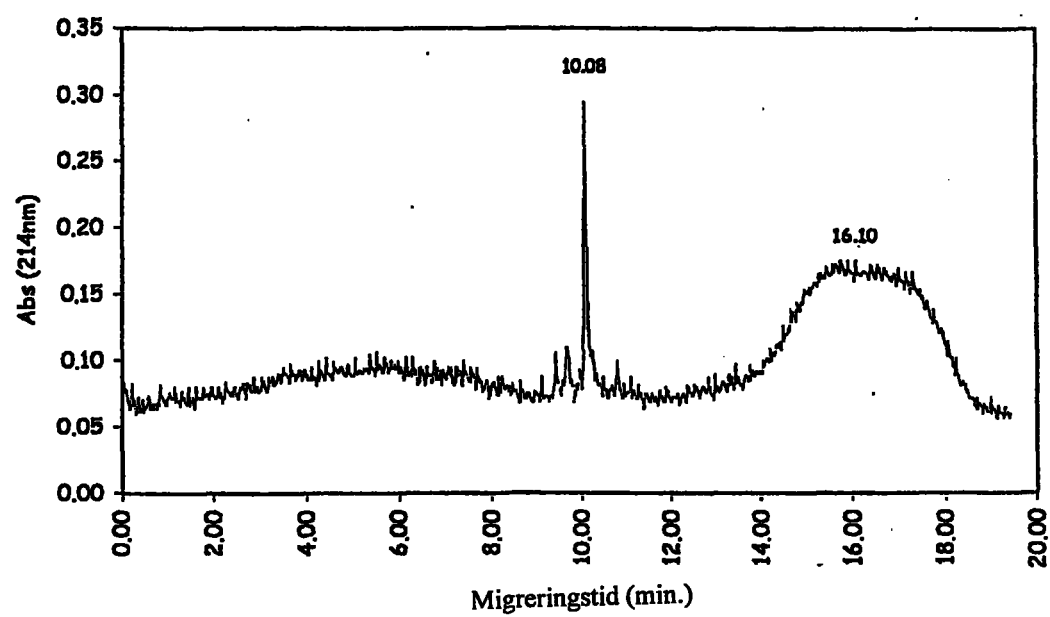
Den foregående beskrivelsen av de spesifikke utførelsene vil så fullstendig åpenbare den generelle beskaffenheten av oppfinnelsen som andre kan, ved å anvende kunnskap innenfor fagområdet (omfattende innholdene av de anførte referansene her), lett modifisere og/eller tilpasse for forskjellige applikasjoner slik som spesifikke utførelser, uten utilbørlig eksperimentering, uten å avvike fra det generelle konseptet for den foreliggende oppfinnelsen. Slike tilpasninger og modifikasjoner er derfor ment å være innenfor rammen av ekvivalentene til de beskrevne utførelsene, basert på den lære og retningslinjen som er presentert her. Det skal også forstås at fraseologien eller terminologien her er for det formål å beskrive og ikke begrense, slik at terminologien eller fraseologien for den foreliggende fremstillingen skal tolkes slik av en fagmann i lys av den lære og retningslinjene presentert her, i kombinasjon med kunnskapen til en fagmann på området.

PATENTKRAV

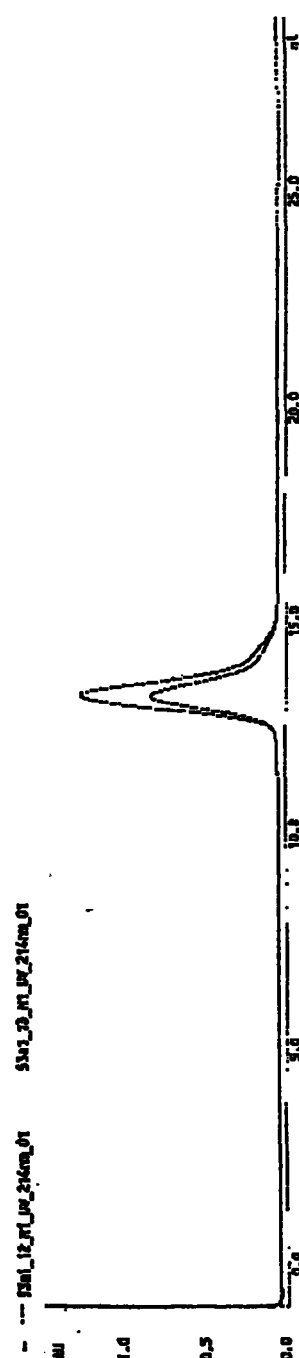
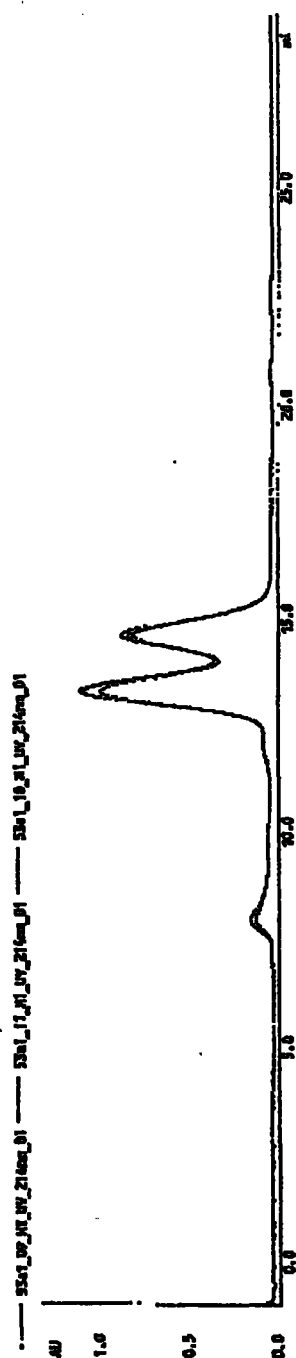
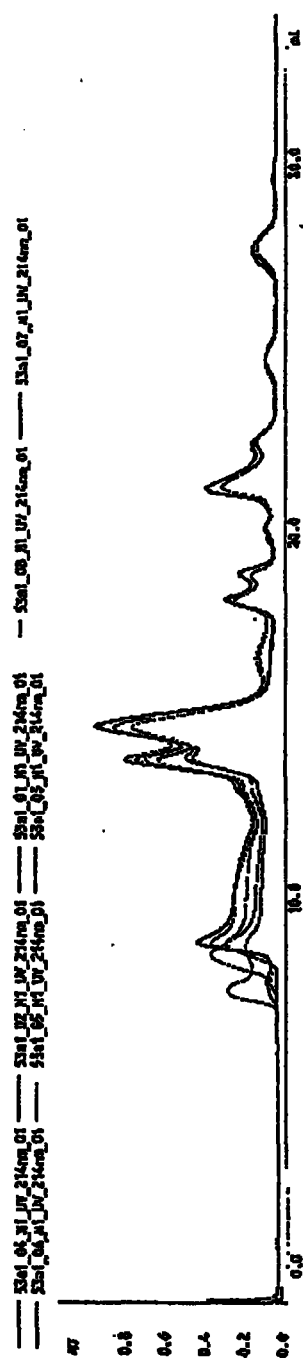
1. Polyol-interferon- β -konjugat,
karakterisert ved at den har en polyolandel som er kovalent bundet til Cys¹⁷ av human interferon- β .
- 5 2. Polyol-interferon- β -konjugat som angitt i krav 1,
karakterisert ved at polyolandelen er en polyalkylenglykolandel.
3. Polyol-interferon- β -konjugat som angitt i krav 2,
karakterisert ved at polyalkylenglykolandelen er en polyetylenglykol (PEG) andel.
- 10 4. Fremgangsmåte for fremstilling av polyol-interferon- β -konjugatet som
angitt i krav 1,
karakterisert ved at den innbefatter trinnene:
reagere interferon- β med et tiol-reaktivt polyolmiddel for setespesifikt og
-kovalent å feste en polyolandel til Cys¹⁷ av human interferon- β for å fremstille et
15 polyol-interferon- β -konjugat; og
utvinne det produserte polyol-interferon- β -konjugatet.
5. Fremgangsmåte som angitt i krav 4,
karakterisert ved at det tiol-reaktive polyolmidlet er et tiol-reaktivt
PEGyleringsmiddel.
- 20 6. Fremgangsmåte som angitt i enten krav 4 eller krav 5,
karakterisert ved at det tiol-reaktive polyolmidlet er mono-metoksyliert.
7. Fremgangsmåte som angitt i enten krav 4 eller 5,
karakterisert ved at det tiol-reaktive polyolmidlet er bifunksjonelt.
8. Fremgangsmåte som angitt i enten krav 4 eller 5,
25 karakterisert ved at det diol-reaktive polyolmidlet er et polyolderivat
som har en funksjonell gruppe valgt fra gruppen bestående av ortopyridyldisulfid,
vinylsulfon, maleimid og iodacetimid.
9. Fremgangsmåte som angitt i enten krav 4 eller 5,
karakterisert ved at det tiol-reaktive polyolmidlet er et
30 ortopyridyldisulfidderivat av et mono-metoksyliert polyol.
10. Fremgangsmåte som angitt i krav 4,
karakterisert ved at reaksjonstrinnet utføres ved en sur pH hvor
interferon- β er stabil.

11. Farmasøytisk blanding som innbefatter et polyol-interferon- β -konjugat som angitt i hvilke som helst av kravene 1-3,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en aktiv bestanddel, og en farmasøytisk akseptabel bærer, et tilsetningsstoff eller et hjelpemiddel.
- 5 12. Anvendelse av et polyol-interferon- β -konjugat som angitt i hvilke som helst av kravene 1-3, for fremstilling av et medikament til behandling av infeksjoner, tumorer og autoimmun- og betennelsessykdommer.

1/6

**FIG. 1**

2/6



3/6

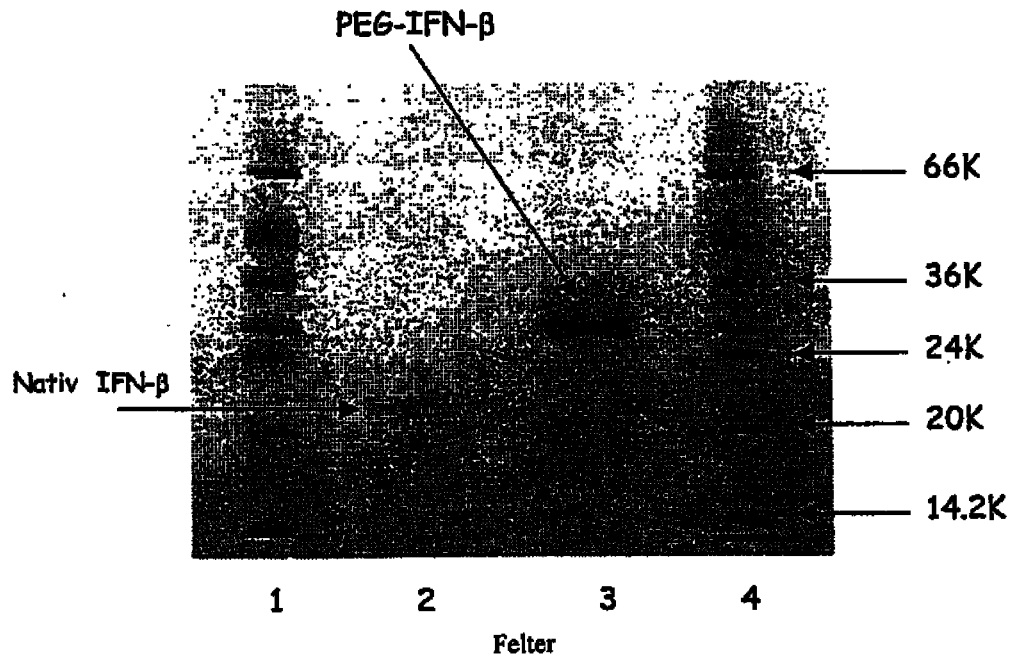


FIG. 3

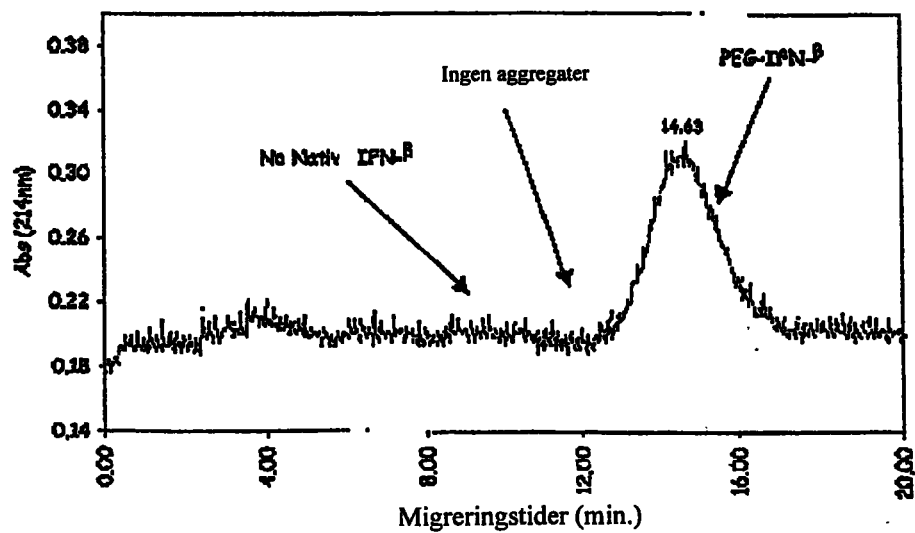


FIG. 4

4/6

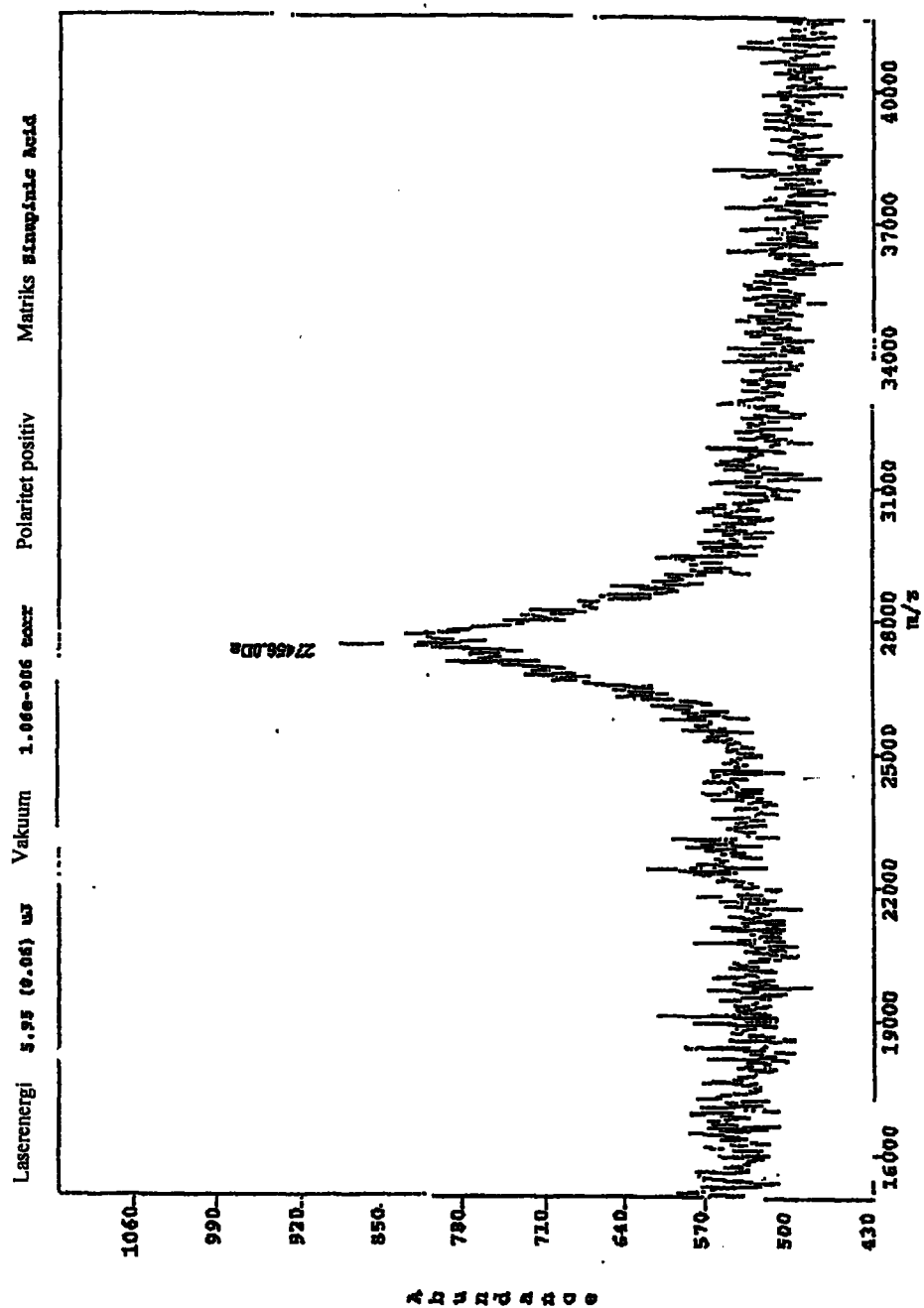


FIG. 5

5/6

O.D. at 595 nm

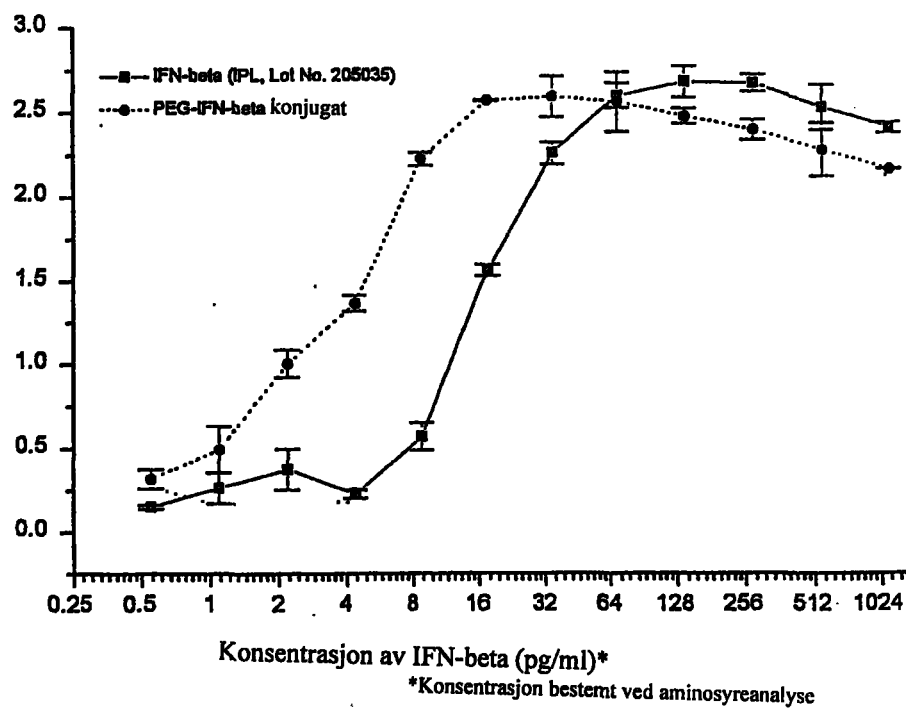


FIG. 6

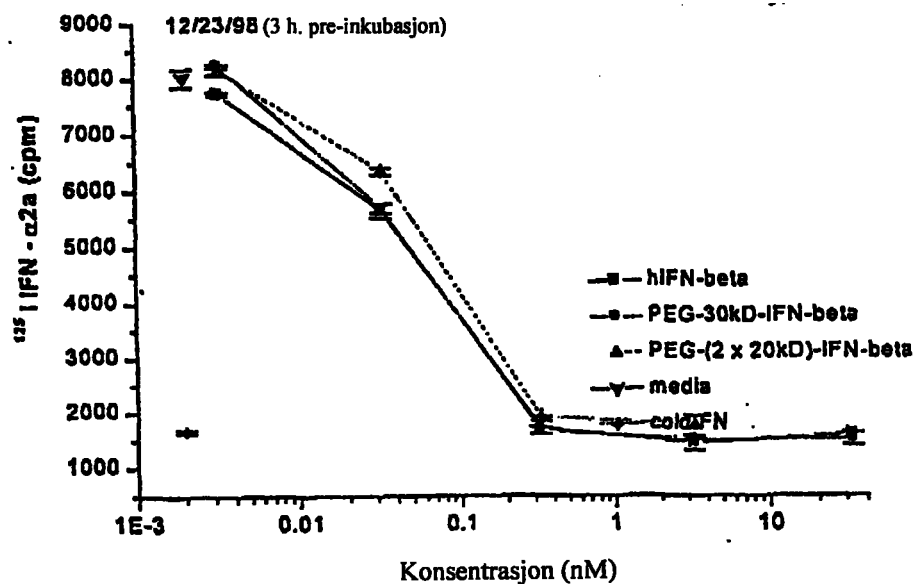


FIG. 7

6/6

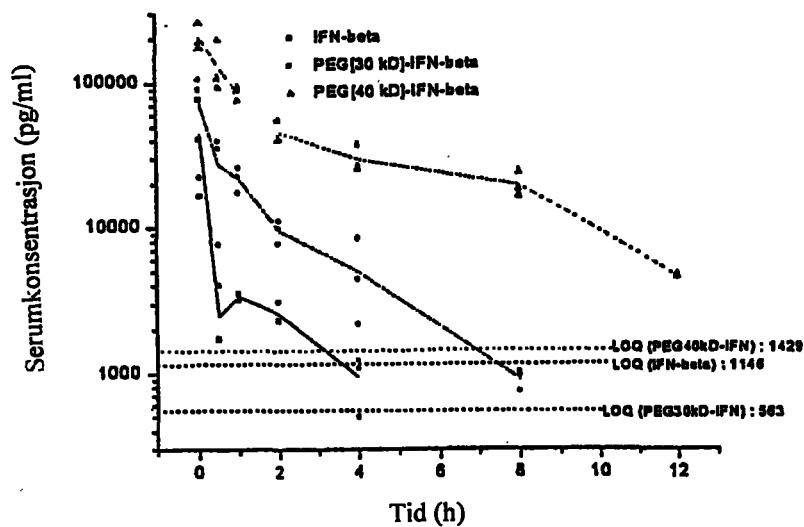


FIG. 8

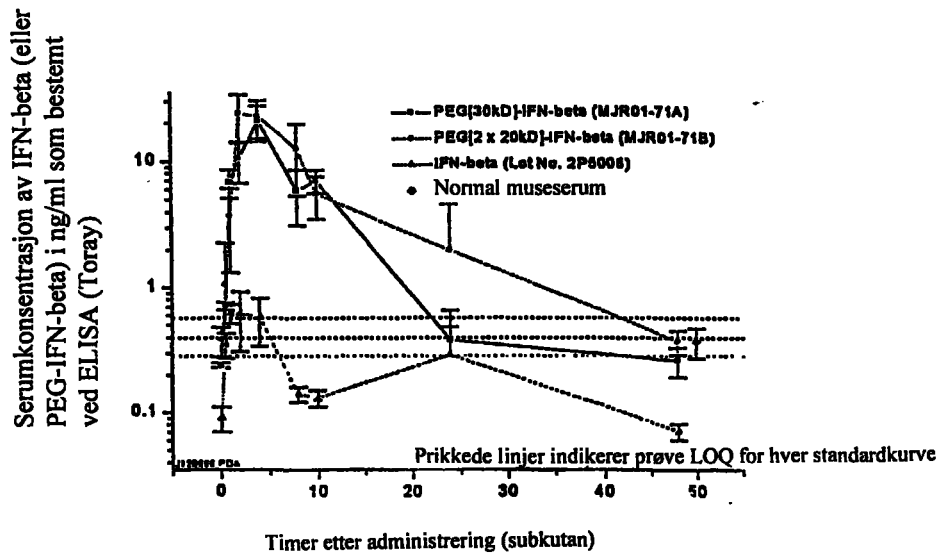


FIG. 9