(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 35 823 T2** 2007.08.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 003 546 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 35 823.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/14622**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 933 344.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/008702**
(86) PCT-Anmeldetag: **15.07.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **25.02.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.05.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **06.09.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.08.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***A61K 38/21*** (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
911893 **15.08.1997** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Amgen Inc., Thousand Oaks, Calif., US

(72) Erfinder:
MARTIN, David, Camarillo, CA 93012, US;
FISCHER, L., Norman, Lyons, CO 80540, US

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG VON PATIENTEN DIE UNTER MULTIPLER SKLEROSE LEIDEN MIT KONSENSUS-INTERFERON**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Verhinderung und Behandlung, unter Verwendung von Konsensus-Interferon (IFN-con), von Patienten, die an multipler Sklerose (MS) leiden.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche demyelinierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die klinisch durch Rezidive und Remissionen, die oft zu einer progressiven körperlichen Behinderung führen, gekennzeichnet ist. MS ist die häufigste zur Invalidität führende neurologische Störung, die junge weiße Erwachsene befällt. Mindestens 350.000 Amerikaner leiden an MS, wobei Frauen zweimal so häufig betroffen sind wie Männer. MS beginnt in der Regel mit dem Alter von 15 und 50 Jahren, das Durchschnittsalter des Ausbruchs beträgt 30. Das Risiko von MS schwankt für verschiedene geographische Regionen und erhöht sich für jemanden, der weiter nördlich oder südlich des Äquators lebt.

[0003] Die genaue Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind immer noch unbekannt; allerdings wurden pathologische, genetische und immunologische Merkmale identifiziert, die nahelegen, dass die Erkrankung eine autoimmune Grundlage besitzt. Siehe z.B. Waksman, et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 175:282–294 (1984) und Hafler et al., Immunol. Reu, 100:307–332 (1987). MS folgt einem schwankenden, oft unvorhersagbaren Verlauf, jedoch wird sie typischerweise in 4 weithin anerkannte Formen eingeteilt: rezidiv-remittierend (ca. 25 % der Fälle); rezidiv-progressiv (ca. 40 % der Fälle); chronisch-progressiv (ca. 15 % der Fälle); und gutartig (ca. 20 % der Fälle). Fast alle MS-Patienten leiden zu irgendeinem Zeitpunkt während des Verlaufs ihrer Erkrankung an solchen Symptomen, wie Müdigkeit, Spastizität, Tremor, herabgesetzte Beweglichkeit, Depression, Schmerzen, urologische Komplikationen und kognitive Behinderung.

[0004] MS ist derzeit unheilbar, jedoch ist es weitgehend behandelbar. Die meisten Behandlungen sind symptomatisch; d.h. sie lindern oder verhindern ein Symptom, ohne in der Lage zu sein, den zu Grunde liegenden Demyelinierungsdefekt zu reparieren, obwohl Kortikostereoide und Breitband-Immunsuppressiva vorübergehende krankheitsverändernde gesundheitsfördernde Wirkungen zeigen. Kortikostereoide können die Dauer der Krankheits-Flare-ups reduzieren, während einige Immunsuppressiva, z.B. Imuran® von Burroughs-Wellcome den Ruf haben, die Anzahl von solchen Flare-ups, die die MS-Patienten erfahren, zu verringern.

[0005] Interferone sind eine Unterklasse von Cytokinen, die sowohl antivirale als auch antiproliferative Aktivität zeigen. Auf der Grundlage der biochemischen und immunologischen Eigenschaften werden die natürlich vorkommenden Humaninterferone in drei Klassen eingeteilt: Interferon-Alpha (Leukozyten-IFN), Interferon-Beta (Fibroblasten-IFN) und Interferon-Gamma (Immun-Interferon). Alpha-Interferon ist derzeit in den Vereinigten Staaten und anderen Ländern zur Behandlung von Haarzellenleukämie, Condyloma acuminatum, Kaposi-Sarkom (ein Krebs, der im allgemeinen Patienten befällt, die an dem Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) leiden) und chronischer Nicht-A-, Nicht-B-Hepatitis zugelassen. Zwei Varianten von Alpha-Interferon haben die Zulassung zur therapeutischen Anwendung erhalten:
Interferon-Alpha-2a, unter dem Warenzeichen Roferon®-A auf dem Markt, und Interferon-Alpha-2b, unter dem Warenzeichen INTRON®-A auf dem Markt. Die Aminosäuresequenzen von Roferon®-A und INTRON®-A unterscheiden sich an einer einzigen Stelle, allerdings sind sie ansonsten mit der Aminosäuresequenz von Alpha-Interferon, Subtyp 2 (Subtyp A), identisch.

[0006] Zusätzlich zu den benannten Indikationen wird Alpha-Interferon allein oder in Verbindung mit chemotherapeutischen Mitteln bei einer Vielzahl von anderen Zellproliferationsstörungen, einschließlich von chronischer myelogener Leukämie, multiplem Myelom, oberflächlichem Blasenkrebs, Hautkrebs (Basalzellenkarzinom und malignes Melanom), Nierenzellenkarzinom, Eierstockkrebs, langsam wachsendem lymphozytärem und kutanem T-Zellenlymphom und Gliom, verwendet oder bewertet. Alpha-Interferon kann in Kombination mit anderen chemotherapeutischen Agentien zur Behandlung von festen Tumoren wirksam sein, die aus Lungen-, Kolorektal- und Brustkrebs herrühren (siehe Rosenberg et al., "Principles and Applications of Biologic Therapy" in Cancer: Principles and Practices of Oncology, 3. Ausg., Devita et al., Hrsg., Ss. 301–547 (1989), Balmer DICP, Ann Pharmacother 24, 761–768 (1990)).

[0007] Typ-1-Interferone (z.B. Interferon-Alpha und Interferon-Beta) beeinträchtigen sowohl in normalen als auch anormalen Zellen bekanntlich eine Vielzahl von Zellfunktionen, einschließlich DNA-Replikation und RNA- und Proteinsynthese. Somit sind cytotoxische Wirkungen von Interferon nicht auf Tumor- oder Virus-infizierte Zellen begrenzt, sondern werden auch in normalen gesunden Zellen manifest. Als Ergebnis treten während der Interferontherapie unerwünschte Nebenwirkungen auf, insbesondere wenn hohe Dosen erforderlich sind. Die Verabreichung von Interferon kann zu Myelosuppression führen, was zur Verminderung der roten Blutzellen-, weißen Blutzellen- und Plättchenspiegel führt. Höhere Dosen von Interferon lassen im allgemeinen grippeartige Symptome (z.B. Fieber, Müdigkeit, Kopfschmerzen und

Schüttelfrostanfälle), gastrointestinale Störungen (z.B. Anorexie, Übelkeit und Diarrhoe), Benommenheit und Husten entstehen. Es wäre nützlich, die unerwünschten Nebenwirkungen der Interferontherapie herabzusetzen oder auszuschalten, ohne die therapeutischen Vorteile einer solchen Therapie zu schmälern.

[0008] Betaseron® (rekombinantes Interferon-Beta-1b von Schering Corp.) war das erste Arzneimittel, das speziell zur Behandlung von MS indiziert war. Bei einer großen klinischen Studie wurde festgestellt, daß Betaseron® bei der Reduzierung der Anzahl und Schwere von Exazerbationen oder Rezidiven, an denen MS-Patienten leiden, sowie bei der Herabsetzung der durch Magnetresonanzbildgebung (MRI) nachgewiesenen MS-Aktivität im Gehirn wirksam ist. Wichtig ist, dass sich die Ergebnisse des Versuchs nur auf die rezidiv-remittierende Patientengruppe erstreckten, da andere Formen von MS nicht in dem Versuch vertreten waren. Ferner zeigte der Versuch während der 2 oder 3 Jahre der Studie keine gesundheitsförderliche Wirkung des Arzneimittels auf die letztendliche Invalidität von MS, und die Wirksamkeit des Arzneimittels wird durch seine Nebenwirkungen wesentlich beeinträchtigt.

[0009] Die US-Patentschriften Nr. 4,695,623, 4,897,471 und 5,541,293 offenbaren neue Humaninterferon-Polypeptide mit Aminosäuresequenzen, die die gängigen oder überwiegenden Aminosäuren einschließen, die an jeder Position unter natürlich vorkommenden Alpha-Interferon-Subtyp-Polypeptiden gefunden und als Konsensus-Interferone (IFN-con) bezeichnet werden. Die IFN-con-Aminosäuresequenzen, die offenbart sind, werden als IFN-con$_1$, IFN-con$_2$, und IFN-con$_3$ bezeichnet. Die Herstellung von synthetisch hergestellten Genen, die für IFN-con codieren, und die Expression der Gene in E. coli sind ebenfalls offenbart. In-vitro-Studien, die die relativen antiviralen, antiproliferativen und natürlichen Killerzell-Aktivitäten von rekombinantem IFN-con mit entweder Leukozyten- oder anderen rekombinanten Typ-1-Interferonen vergleichen, zeigen, dass IFN-con, massebezogen, eine vergleichsweise höhere Aktivität aufweist; Ozes et al., J Interferon Research, 12:55–59, 1992.

[0010] Die US-Patentschrift Nr. 5,372,808 offenbart Verfahren zur Behandlung von Krankheiten unter Verwendung von Konsensus-Interferon. Es wird gezeigt, dass IFN-con bei Verwendung bei der Behandlung von Krankheiten, die der Behandlung durch Alpha-Interferone zugänglich sind, bei Patienten nicht den gleichen Grad an Nebenwirkungen hervorrufen, wie es für Alpha-Interferone der Fall ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass 3–5 Mal höhere Dosen von IFN-con verwendet werden können, die zu einem verstärkten therapeutischen Vorteil führen, im Wesentlichen ohne eine entsprechende Zunahme in der Häufigkeit oder Schwere von unerwünschten Nebenwirkungen.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Die vorliegende Erfindung offenbart Verfahren zur Behandlung von multipler Sklerose durch Verabreichung einer therapeutisch wirksamen Menge an IFN-con an Patienten, die dies benötigen. Die Erfindung beruht auf der Entdeckung, dass IFN-con$_1$ in der Lage war, die klinische Schwere von experimenteller allergener Encephalomyelitis (EAE) nach Immunisierung mit CNS (Meerschweinchen)-Homogenat dosisabhängig deutlich zu dämpfen. Ferner ist die Kombination von IFN-con$_1$ mit anderen Therapeutika, z.B. IL-1a bei der Dämpfung der klinischen Anzeichen von experimenteller allergener Encephalomyelitis (EAE) noch wirksamer.

[0012] Erfindungsgemäß wird die Verwendung von Konsensus-Interferon (IFN-con) in Kombination mit einem weiteren aktiven Agens, ausgewählt aus Peptiden, kleinen Molekülen oder Proteinen, bei der Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung oder Behandlung von multipler Sklerose bereitgestellt. Erfindungsgemäß wird auch die Verwendung von Konsensus-Interferon (IFN-con) bei der Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung oder Behandlung von Multipler Sklerose durch Verabreichung mit einem weiteren aktiven Mittel, ausgewählt aus Peptiden, kleinen Molekülen oder Proteinen, bereitgestellt. Erfindungsgemäß wird weiterhin eine Kombination von Konsensus-Interferon (IFN-con) und Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) zur Verwendung bei der Prävention oder Behandlung Multipler Sklerose und eine pharmazeutische Zusammensetzung, die Konsensus-Interferon (IFN-con) und Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) umfasst, bereitgestellt.

[0013] IFN-con ist ein nicht natürlich vorkommendes Polypeptid mit antiproliferativer und antiviraler Aktivität. Vorzugsweise ist IFN-con ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz von IFN-con$_1$, IFN-con$_2$ oder IFN-con$_3$. Besonders bevorzugt weist IFN-con die Aminosäuresequenz von IFN-con$_1$ auf.

[0014] Es sollte klar sein, daß die vorhergehende allgemeine Beschreibung und die folgende ausführliche Beschreibung beispielhaft und nur erläuternd und für die Erfindung, wie beansprucht, nicht einschränkend sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0015] Fig. 1 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer täglichen Dosierung von IFN-con, beginnend am Tag 0 nach der Immunisierung, auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. 0,3, 0,1, 0,03 und 0,01 mg/kg IFN-con, s.c. einmal täglich verabreicht,

werden nach 14-tägiger Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0016] Fig. 2 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer Dosierung von IFN-con alle 2 Tage, beginnend am Tag 0 nach der Immunisierung, auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. 0,3, 0,1, 0,03 und 0,01 mg/kg IFN-con, s.c. einmal täglich verabreicht, werden nach 14-tägiger Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0017] Fig. 3 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer täglichen Dosierung von IFN-con, beginnend am Tag 4 nach der Immunisierung, auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. 0,3 und 0,1 mg/kg IFN-con, s.c. einmal täglich verabreicht, werden nach 14-tägiger Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0018] Fig. 4 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer Dosierung am Tag 0, am Tag 4, am Tag 7 und am Tag 11 von 1,0 mg/kg IFN-con vs. tägliche Dosierung von 0,03 mg/kg IFN-con auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. Die IFN-con-Proben wurden s.c. einmal täglich verabreicht und werden nach 14-tägiger Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0019] Fig. 5 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer täglichen Dosierung von 0,03 mg/kg IFN-con vs. tägliche Dosierung von 100 mg/kg IL-1ra vs. tägliche Dosierung von 10 mg/kg IL-1ra auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. Die Dosierung begann am Tag 0 nach der Immunisierung. IFN-con wurde s.c. einmal täglich verabreicht, und IL-1ra s.c. dreimal täglich verabreicht. Die IFN-con- und IL-1ra-Proben werden nach 14 Tagen Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0020] Fig. 6 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung einer IFN-con + IL-1ra-Kombinationstherapie auf die klinische Schwere in GP EAE zeigt. IFN-con wurde s.c. einmal täglich verabreicht, und das IL-1ra s.c. dreimal täglich verabreicht. Eine Kombination, umfassend 0,03 mg/kg IFN-con + 100 mg/kg IL-1ra, und eine Kombination, umfassend 0,03 mg/kg IFN-con + 10 mg/kg IL-1ra werden mit 0,03 mg/kg IFN-con alleine und nach 14 Tagen Behandlung mit Vehikel verglichen.

[0021] Fig. 7 ist ein Balkendiagramm, das die Wirkung von IFN-con, Il-1ra, IFN-con + IL-1ra und Vehikel auf die Gewichtszunahme in GP EAE zeigt. IFN-con (0,03 und 1,0 mg/kg) wurde s.c. einmal täglich verabreicht und IL-1ra (10 und 100 m/kg) s.c. dreimal täglich verabreicht. Eine Kombination, umfassend 0,03 mg/kg IFN-con + 100 mg/kg IL-1ra, und eine Kombination, umfassend 0,03 mg/kg IFN-con + 10 mg/kg IL-1ra wurde ferner untersucht und alle Untersuchungsproben nach 14 Tagen Behandlung mit der Gewichtzunahme in einem normalen Meerschweinchen verglichen.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0022] Wie oben erwähnt, offenbart die vorliegende Erfindung Verfahren zur Verhinderung und Behandlung Multipler Sklerose in Patienten, die daran leiden. Das Verfahren umfasst die Verabreichung einer therapeutisch effektiven Menge von Konsensus-Interferon an einen Patienten, der an MS leidet. Zusätzlich offenbart die vorliegende Erfindung Verfahren zur Verhinderung oder Behandlung von MS, die die Verabreichung von Konsensus-Interferon in Kombination mit einem anderen aktiven Agens, beispielsweise IL-1ra, umfasst.

[0023] Wie hierin verwendet, bedeutet humanes Konsensus-Interferon (IFN-con) ein nicht-natürlich vorkommendes Polypeptid, das vorherrschend die Aminosäurereste einschließt, die für eine Untermenge der IFN-α's, stellvertretend für die Mehrheit der natürlich-vorkommenden humanen Interferonleukozytenuntergruppensequenzen, üblich sind und die an einer oder mehrere dieser Positionen, an denen es keine Aminosäure gibt, die für alle Untergruppen üblich ist, eine Aminosäure einschließt, die vorherrschend an dieser Position vorkommt und die in keinem Fall irgendeinen Aminosäurerest einschließt, der nicht an dieser Position in wenigstens einem natürlich-vorkommenden Untertyp vorkommt. IFN-con umfaßt, ist aber nicht auf die Aminosäuresequenzen beschränkt, die als IFN-con$_1$, IFN-con$_2$, und IFN-con$_3$ bezeichnet werden, die in U.S. Patenten 4,695,623; 4,897,471 und 5,541,293 offenbart sind. DNA-Sequenzen, die für IFN-con kodieren, können, wie in den oben erwähnten Patenten oder mit anderen Standardverfahren beschrieben, synthetisiert werden.

[0024] IFN-con Polypeptide sind bevorzugt Expressionsprodukte von hergestellten DNA-Sequenzen, die in Bakterienwirte transformiert oder transfiziert wurden, insbesondere E. coli. Das heißt, IFN-con ist rekombinantes IFN-con. IFN-con wird bevorzugt in E. coli hergestellt und wird mit Verfahren aufgereinigt, die dem Fachmann bekannt und allgemein in Klein et al., J. Chromatog. 454:205–215 (1988) beschrieben sind. IFN-con$_1$, das auf diese Art und Weise gereinigt worden ist, hat nach Berichten eine spezifische Aktivität von 3×10^9 Einheiten/mg Protein, wie in dem zytopathischen-Effekt-Inhibitions-Assay unter Verwendung der T98G Humanzellinie, Fish et al. J. Interferon Res. 9, 97–114 (1989) gemessen.

[0025] IFN-con kann alleine oder in Kombination mit anderen aktiven Agentien für die Behandlung von MS verwendet werden. Zur Verwendung beabsichtigte aktive Agentien sind synthetische oder natürliche Verbindungen, die einen biologischen Effekt zeigen, wenn sie in ein lebendiges Wesen eingeführt werden, und schließen Peptide, kleine Moleküle, Kohlenhyd-

rate, Nukleinsäuren, Lipide und Proteine ein. Zur Verwendung beabsichtigte Proteine schließen wirksame Cytokine ein, einschließlich verschiedener Hämatopoetischer Faktoren, wie Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Keratinozyten-Wachstumfaktor (KGF), Stammzellen-Faktor (SCF), Megakaryozyten-Wachstumsdifferenzierungsfaktor (MGDF), Granulozytenmakrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), die Interferone (Alpha, Beta und Gamma), die Interleukine (2–12), Erythropoetin (EPO), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Stammzellen-Faktor (SCF), Nervenwachstums-Faktor (NGF), aus dem Gehirn stammender neurotropher Faktor (BDNF), Neurotropher Faktor-3(NT3), aus Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor (PDGF), Tumor-Wachstumsfaktor (Alpha, Beta), Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra), Osteoprotegerin (OPG), aus Glia-Zelllinie-stammender Neurotropher Faktor (GDNF), p38-Inhibitoren und Adipositasprotein (OB Protein). In einer bevorzugten Ausführungsform wird IFN-con in Verbindung mit einer therapeutisch wirksamen Menge von IL-1ra verwendet.

[0026] Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ist ein humanes Protein, das als ein natürlicher Inhibitor von Interleukin-1 wirkt. Bevorzugte Rezeptor-Antagonisten, ebenso wie Verfahren zur Herstellung und Verwendung davon, werden in U.S. Patentschriften Nr. 5,075,222 (hierin als '222 Patent bezeichnet); WO 91/08285; WO 91/17184; AU 9173636; WO 92/16221, WO 93/21946; U.S. Provisional Patentanmeldung Nr. 60/011,419, angemeldet am 9. Februar 1996 von Collins, mit dem Titel des Begleitschreibens der Provisional Patentanmeldung „COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES", U.S. Provisional Patentanmeldung Nr. 60/032,789, angemeldet am 6. Dezember 1996 von Collins und Bevilacqua mit dem Titel des Begleitschreibens der Provisional Patentanmeldung als "COMPOSITION AND METHOD FOR TREATING INFLAMMATORY DISEASES"; WO 94/06457; WO 94/21275; FR 2706772; WO 94/21235; DE 4219626; WO 94/20517 und WO 96/22793 beschrieben. Die Proteine enthalten glykosylierte sowie nicht-glykolysierte IL-1 Rezeptor-Antagonisten.

[0027] Speziell sind drei nützliche Formen von IL-1ra und Varianten davon in dem '222 Patent offenbart und beschrieben. Die erste davon, IL-1raα, ist als ein 22–23 kD Molekül in der SDS-PAGE mit einem ungefähren isoelektrischen Punkt von 4,8 charakterisiert, das von einer Mono Q FPLC Säule bei ungefähr 52 mM NaCl im Tris-Puffer pH 7,6 eluiert. Die zweite, IL-1raβ, ist als ein 22–23 kD Protein charakterisiert, das von einer Mono Q Säule bei 48 mM NaCl eluiert. Beide IL-1raα und IL-1raβ sind glykosyliert. Die dritte, IL-1rax ist als ein 20 kD Protein charakterisiert, das von einer Mono Q Säule bei 48 mM NaCl eluiert und ist nicht-glykolysiert. Sämtliche drei Inhibitoren verfügen über ähnliche funktionelle und immunologische Aktivitäten.

[0028] Verfahren zur Herstellung von IL-1ra sind auch in dem '222 Patent offenbart. Ein offenbartes Verfahren besteht aus dem Isolieren von IL-1ra aus humanen Monocyten, wo sie natürlich hergestellt werden. Ein zweites offenbartes Verfahren beinhaltet das Isolieren, des für das Kodieren von IL-1ra verantwortlichen Gens, das Klonieren des Gens in geeignete Vektoren und Zelltypen, das Exprimieren des Gens zur Herstellung der Inhibitoren und das Ernten der Inhibitoren. Das letzte Verfahren, das beispielhaft für rekombinante DNA Verfahren im allgemeinen ist, ist ein bevorzugtes Verfahren. Rekombinante DNA Verfahren werden zum Teil bevorzugt, weil sie zur Gewinnung vergleichsweise größerer Mengen von Protein in größerer Reinheit geeignet sind. Somit umfasst die Erfindung auch IL-1ra, die eine N-terminale Methionylgruppe als Folge der Expression in prokaryotischen Zellen, wie E. coli, enthalten.

[0029] Im allgemeinen werden von der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen umfaßt, die wirksame Mengen von Protein oder Derivat-Produkten der Erfindung zusammen mit pharmazeutisch akzeptabeln Verdünnungsmittel, Stabilisatoren, Konservierungsmitteln, Lösungsvermittlern, Emulgatoren, Adjuvantien und/oder Trägern umfassen, siehe z.B. Remington's Pharmaceutical Science, 18. Auflage (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) Seite 1435–1712. Eine wirksame Menge des aktiven Inhaltsstoffes ist eine therapeutisch, prophylaktisch oder diagnostisch wirksame Menge, die ohne weiteres von einem Fachmann durch Berücksichtigen von solchen Faktoren bestimmt wird, wie Körpergewicht, Alter, therapeutisches oder prophylaktisches oder diagnostisches Ziel und erwünschte Freisetzungsrate.

[0030] Besonders geeignete Arten der Verabreichung der Formulierungen, enthaltend IFN-con, zur systemischen Abgabe sind subkutan, intramuskulär, intravenös und intranasal. Ferner werden intraventrikulare und intrathekale Abgabe von IFN-con in Erwägung gezogen. Ungeachtet der Art und Weise der Verabreichung wird die spezifische Dosis entsprechend dem ungefähren Körpergewicht des Patienten berechnet. Eine weitere Verfeinerung der Berechnungen, die zur Bestimmung der geeigneten Dosis zur Behandlung notwendig sind, wird routinemäßig von einem Fachmann ausgeführt und liegt innerhalb der Grenzen der Aufgaben, die von ihm routinemäßig ohne übermäßiges Experimentieren ausgeführt werden, insbesondere im Lichte der Dosierungsinformation und Assays, die hierin offenbart sind. Besonders nützliche Dosen von IFN-con für die Behandlung von z.B. MS werden in einem Bereich von 6–15 µg subkutan dreimal wöchentlich verabreicht.

[0031] Experimentell allergische Encephalomyelitis

(EAE), ein Mausmodell einer entzündlichen demyelinierenden Autoimmun-Erkrankung des ZNS wurde als ein hervorragendes Model zur Bewertung der Therapie zur Änderung des Verlaufes der Human-MS akzeptiert. EAE entwickelt sich in Tieren, denen Rückenmarksproteine injiziert worden sind, und kann ferner durch einen passiven Transfer von T-Zellklonen induziert werden, die für bestimmte Myelinantigene (z.B. Myelin-basic-Protein) reaktiv gemacht worden sind. Parenterales (IV) natürliches Ratten-Interferon (10^5 Einheiten) kann teilweise akute EAE in männlichen Lewisratten unterdrücken; Abreu et al., Immunol. Commun., 11:1–7 (1982), und passive hyperakute, lokalisierte EAE inhibieren, bei Verabreichung am selben Tag wie die immunogene Beimpfung; Abreu et al., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 72:30–33 (1983). Andere parenteral verabreichte Cytokine, wie TGF-β, können die klinische Erkrankung und die Entzündung im Gehirn und Rückenmark in EAE herabsetzen; Johns et al., J. Immunol., 147:1792–1796 (1991).

[0032] Im unten aufgeführten Beispiel 1 wird gezeigt, dass IFN-con$_1$ wirksam ist, um die klinische Schwere von EAE nach der Immunisierung mit CNS (Meerschweinchen) Homogenat in einer Dosis-abhängigen Art und Weise deutlich zu dämpfen. Beispiel 2 veranschaulicht, dass die Kombination von IFN-con$_1$ mit IL-1ra sogar noch wirksamer ist, um die klinischen Anzeichen von EAE zu dämpfen, wobei die assoziierten Gewichtszunahmeverbesserungen synergistisch zu sein scheinen. Die Beispiele bieten eine ausführliche Erläuterung der Erfindung, sollen aber nicht als Begrenzung des Schutzumfangs davon aus gelegt werden.

BEISPIEL 1

[0033] In diesem Beispiel wird gezeigt, dass IFN-con$_1$ wirksam die klinische Schwere von EAE nach der Immunisierung mit CNS-(Meerschweinchen)-Homogenat in einer Dosisabhängigen Art und Weise deutlich dämpft.

A. Produktbeschreibung

[0034] IFN-con$_1$ wurde in E. coli hergestellt unter Verwendung der Verfahren, die in den U.S. Patentschriften Nr. 4,695,623 und 4,897,471 beschrieben sind. IFN-con$_1$ wurde mit Verfahren aufgereinigt, die allgemein in Klein et al., oben (1988) beschrieben sind. Zur subkutanen Verabreichung in der gegenwärtigen Untersuchung wurde IFN-con$_1$ als eine klare, farblose, sterile Proteinlösung geliefert, die frei von Partikeln und in einer wässrigen Lösung formuliert war, bevor sie einer Steril-Filtration und Auffüllen der Flaschen unterzogen wurde. IFN-con$_1$ ist nicht weniger als 95% rein.

B. Modell

[0035] Meerschweinchen vom weiblichen Stamm 13 („Female Strain 13 guinea pigs") (175–100 Gramm) wurden mit 2% Isofluran + O_2 anästhesiert und am Tag 0 mit 0,5 ml einer Emulsion immunisiert, enthaltend ein CNS-Homogenat von syngenem Gehirn und Rückenmark (12 Gramm) in 24 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung, 24 ml Freundschem Adjuvans, enthaltend 2,5 mg/ml M. Tuberculosis H37Ra (Difco Lab. MI). Die Emulsion wurde intradermal an 4–5 Stellen in die Halsregion der Meerschweinchen eingespritzt.

[0036] Sämtliche Injektionen von IFN-con$_1$ und Vehikel wurden subkutan verabreicht, und es gab mehrere Behandlungsvorschriften, die für IFN-con$_1$: 1) Die Behandlung (0,01–0,3 mg/kg) begann an dem Tag der Immunisierung und wurde täglich bis zum Tag des Tötens (Tag 14) fortgesetzt; 2) die Behandlung (0.01–0,3 mg/kg) begann am Tag der Immunisierung und wurde täglich bis zum Tag des Tötens fortgesetzt, 3) Behandlung (0,3 mg/kg und 0,1 mg/kg) begann am Tag 4 nach der Immunisierung und wurde täglich bis zum Tag des Tötens fortgesetzt, und 4) die Behandlung (1 mg/kg) begann am Tag der Immunisierung und wurde nach der Immunisierung an den Tagen 4, 7 und 11 fortgesetzt.

[0037] Die Beurteilung der klinischen Erkrankung wurde auf das Standard 0–5 Auswertungssystem bezogen und wurde täglich über eine 14 tägige Periode Tagesspanne durchgeführt. Das Spektrum der Bewertung war: 0, normal; 1. Hinterextremitätenschwäche; 2. Parese in zwei Hinterextremitäten oder Lähmung in einer Hinterextremität; 3. Lähmung in beiden Hinterextremitäten; 4. sterbend; und 5. Tod. Meerschweinchen, die überlebten, wurden am Tag 14 getötet und ihr Gehirn und Rückenmark für histologische Untersuchung entfernt. Der integrierte klinische Wert für jedes Meerschweinchen über den vollständigen Krankheitsverlauf wurde als die Fläche unter der Kurve der täglich klinischen Werte gegen die Zeit berechnet (willkürliche Einheiten). Die Werte der behandelten Gruppen wurden, unter Verwendung des Mann-Whitney Tests statistisch mit denen der Vehikelkontrollgruppe verglichen.

C. Ergebnisse

[0038] Das Immunisierungsverfahren erzeugt klinische Anzeichen, die am Tag 8–10 starten. Im Allgemeinen erhöht sich die Schwere der klinischen Anzeichen mit der Zeit. Sämtliche Tiere, denen Vehikel injiziert worden war, starben am Tag 11 nach der Immunisierung.

[0039] Wie in Fig. 1 gezeigt, reduziert IFN-con$_1$ (0,01–0,3 mg/kg s.c.) signifikant ($p < 0,05$; $p < 0,01$) die klinischen Anzeichen in einer Dosis-abhängigen

Art und Weise. Diese Dosis-abhängige Wirkung wurde auch mit dem Dosierungsschema beobachtet, bei dem jeden zweiten Tag eine Verabreichung erfolgte (Fig. 2). IFN-con$_1$(0,3 und 0,1 mg/kg s.c.) täglich dosiert, beginnend am Tag 4 nach der Immunisierung ($p < 0,01$) verminderte signifikant die klinische Schwere um 87% bzw. 75% (Fig. 3). IFN-con$_1$ (1 mg/kg s.c.) an Tag 0, 4, 7 & 11 nach der Immunisierung gegeben, verminderte signifikant ($p < 0,002$) die klinische Schwere um 80% (Fig. 4). Schließlich zeigte die Anfangsuntersuchung der Tiere, die mit IFN-con$_1$ behandelt wurden, daß das Rückenmarksgewebe eine Abnahme in der Anzahl der entzündlichen Zellen innerhalb des CNS im Vergleich mit Vehikelbehandelten Tieren aufwies.

BEISPIEL 2

[0040] In diesem Beispiel wird gezeigt, dass die Kombinationstherapie, die IFN-con$_1$ und IFN-1ra einschließt, wirksam ist, um die klinische Schwere von EAE nach der Immunisierung mit CNS-(Meerschweinchen)-Homogenat deutlich zu dämpfen. Außerdem scheint, daß der Gewichtsverlust, der durch die Behandlung mit IFN-con$_1$ verursacht wird, durch eine gemeinsame Verabreichung mit IL-1ra verbessert werden kann.

A. Produktbeschreibungen

[0041] IFN-con$_1$ wurde, wie oben in Beispiel 1 beschrieben, hergestellt. IL-1ra wurde in E. coli unter Verwendung von Verfahren hergestellt, wie jene, die z.B. in den U.S. Patentschriften Nr. 5,075,222 beschrieben sind. Zur subkutanen Verabreichung in der aktuellen Studie wurde IL-1ra als eine klare, farblose, sterile Proteinlösung geliefert, die frei von Partikeln ist und in einer wässrigen Lösung formuliert ist, bevor sie einer Steril-Filtration und Auffüllen der Flaschen unterzogen wurde. Rekombinantes IL-1ra ist nicht weniger als 95% rein.

B. Modelldarstellung

[0042] Meerschweinchen vom weiblichen Stamm 13 („Female Strain 13 guinea pigs") (175–100 Gramm) wurden mit 2% Isofluran + O_2 anästhesiert und am Tag 0 mit 0,5 ml einer Emulsion immunisiert, enthaltend CNS-Homogenat von syngenem Gehirn und Rückenmark (12 Gramm) in 24 ml Phosphat gepufferter Salzlösung, 24 ml Freundschem Adjuvans, enthaltend 2,5 mg/ml M. Tuberculosis H37Ra (Difco Lab. MI), immunisiert. Die Emulsion wurde intradermal an 4–5 Stellen in die Halsregion der Meerschweinchen eingespritzt.

[0043] Sämtliche Injektionen von IFN-con$_1$, Vehikel oder IL-1ra wurden subkutan verabreicht, und es gab drei Behandlungsvorschriften, die verwendet wurden: 1) IL-1ra bei 100 mg/kg oder 10 mg/kg s.c. dreimal täglich, beginnend am Tag 0 vs. IFN-con$_1$ bei 0,03 mg/kg einmal täglich verabreicht; 2) Kombination von IL-1ra (100 mg/kg s.c. dreimal täglich) + IFN-con$_1$ (0,03 mg/kg s.c. einmal täglich) und IL-1ra (10 mg/kg s.c. dreimal täglich) + IFN-con$_1$ (0,03 mg/kg s.c. einmal täglich). Die Behandlung (0,01–0,3 mg/kg) begann an dem Tag der Immunisierung und wurde täglich bis zum Tag der Tötung (Tag 14) fortgesetzt. Die Beurteilung der klinischen Erkrankung wurde wie oben in Beispiel 1 beschrieben, ausgeführt.

C. Ergebnisse

[0044] Wie oben in Beispiel 1 beschrieben, erzeugte das Immunisierungsverfahren, beginnend am Tag 8–10, klinische Anzeichen. Im allgemeinen nahm die Schwere der klinischen Zeichen mit der Zeit zu. Alle Tiere, denen Vehikel injiziert worden war, starben am Tag 11 nach der Immunisierung.

[0045] Wie in Fig. 5 gezeigt, dämpfte IL-1ra bei 100 mg/kg oder 10 mg/kg s.c. dreimal täglich, beginnend am Tag 0, die klinischen Anzeichen um 53% bzw. 49%, im Vergleich mit einer 30% Dämpfung, die bei einer Verabreichung von IFN-con$_1$ (0,03 mg/kg s.c. einmal täglich) beobachtet wurde. Die Kombination von IL-1ra (100 mg/kg s.c. dreimal täglich + IFN-con$_1$ (0,03 mg/kg s.c. einmal täglich) oder IL-1ra (10 mg/kg s.c. dreimal täglich + IFN-con$_1$ (0,03 mg/kg s.c. einmal täglich) dämpfte die klinischen Anzeichen um 73% buw. 84% (Fig. 6). Weiterhin verbesseren die Kombinationen die Gewichtszunahme signifikant in den Tieren, im Vergleich mit dem Vehikel-behandelten Tieren (Fig. 7).

Patentansprüche

1. Verwendung von Konsensus-Interferon (IFN-con) in Kombination mit einem anderen aktiven Agens, ausgewählt aus Peptiden, kleinen Molekülen oder Proteinen, zur Herstellung eines Medikaments zur Verhinderung oder Behandlung von Multipler Sklerose.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Konsensus-Interferon und das aktive Agens zur getrennten Verabreichung vorgesehen sind.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Konsensus-Interferon und das aktive Agens zur Verabreichung in Kombination vorgesehen sind.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das Konsensus-Interferon ausgewählt ist aus IFN-con$_1$, IFN-con$_2$ oder IFN-con$_3$.

5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Konsensus-Interferon IFN-con$_1$ ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–5,

wobei das Konsensus-Interferon ein Produkt prokaryotischer Expression einer exogenen DNA-Sequenz ist.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–6, wobei das aktive Agens ein Protein ist.

8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Protein Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ist.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–8, wobei das Konsensus-Interferon und das aktive Agens zur Verabreichung in einem pharmazeutisch akzeptablen Träger vorgesehen sind.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das Konsensus-Interferon und das aktive Agens zur oralen, intravenösen, intramuskulären, subkutanen, intranasalen, intraventrikulären, intrathekalen oder intraläsionalen Verabreichung vorgesehen sind.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 1–10, wobei das Konsensus-Interferon zur subkutanen Verabreichung in einer Dosis von 6–15 µg drei mal wöchentlich vorgesehen ist.

12. Verwendung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das Konsensus-Interferon IFN-con$_1$ ist und das aktive Agens IL-1ra ist, und wobei das Medikament zur Linderung eines Gewichtsverlustes dient, der durch Behandlung mit IFN-con$_1$ verursacht ist.

13. Kombination von Konsensus-Interferon (IFN-con) und Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) zur Verwendung beim Verhindern oder Behandeln von Multipler Sklerose.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend Konsensus-Interferon (IFN-con) und Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra).

15. Kombination oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14, wobei besagtes Konsensus-Interferon ausgewählt ist aus IFN-con$_1$, IFN-con$_2$ oder IFN-con$_3$.

16. Kombination oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, wobei besagtes Konsensus-Interferon IFN-con$_1$ ist.

17. Kombination oder pharmazeutische Zusammensetzung nach Ansprüchen 13 oder 14, wobei besagtes Konsensus-Interferon ein Produkt prokaryotischer Expression einer exogenen DNA-Sequenz ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

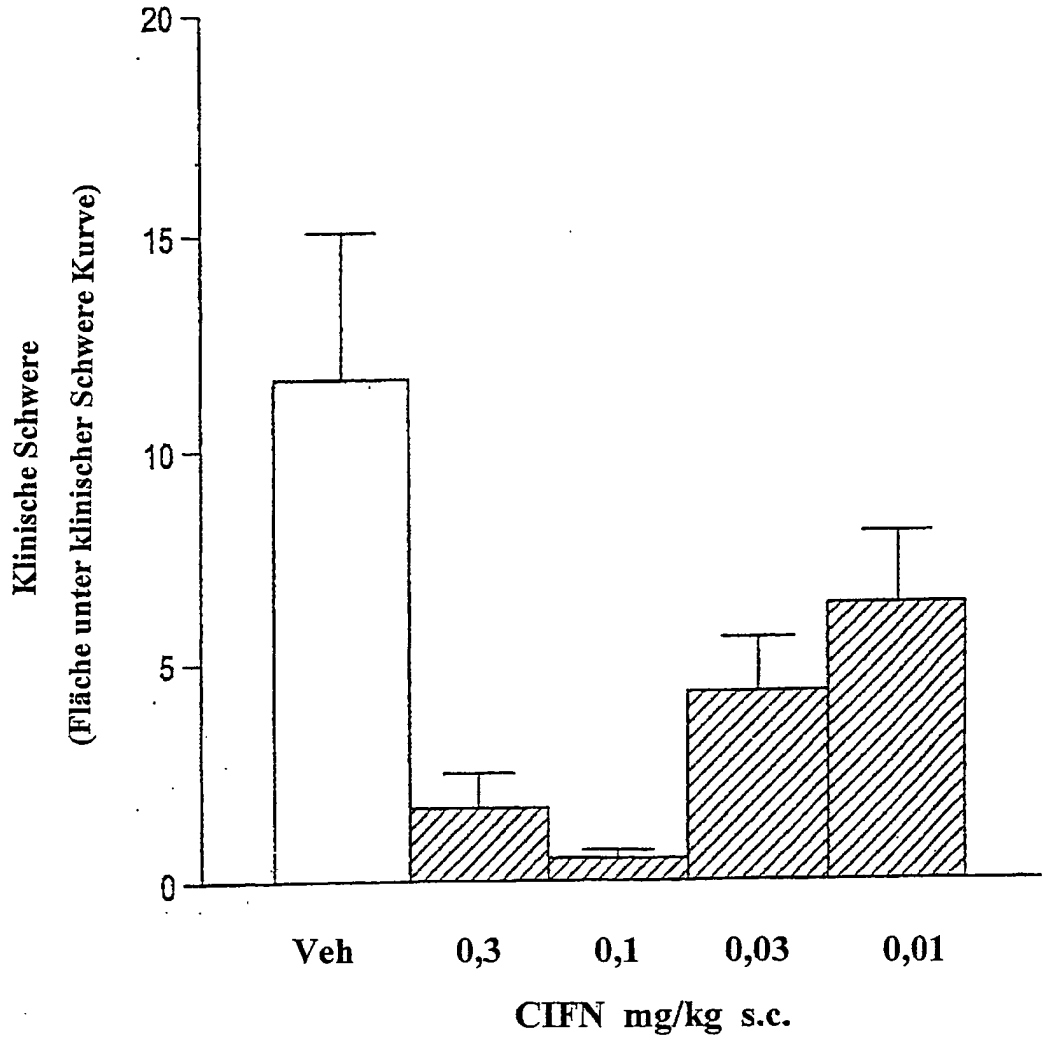


FIG. 2

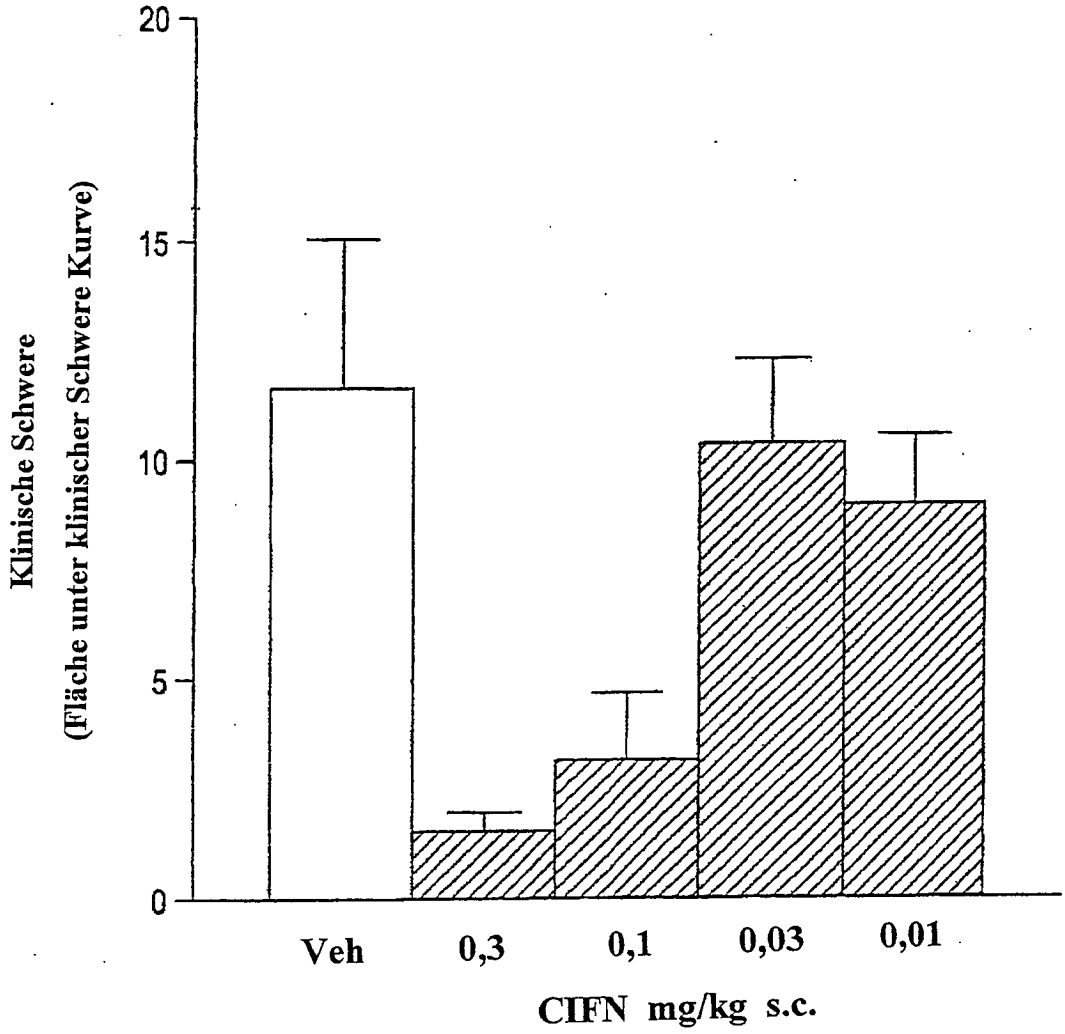

Klinische Schwere
(Fläche unter klinischer Schwere Kurve)
20
15
10
5
0
Veh
0,3
0,1
0,03
0,01
CIFN mg/kg s.c.

FIG. 3

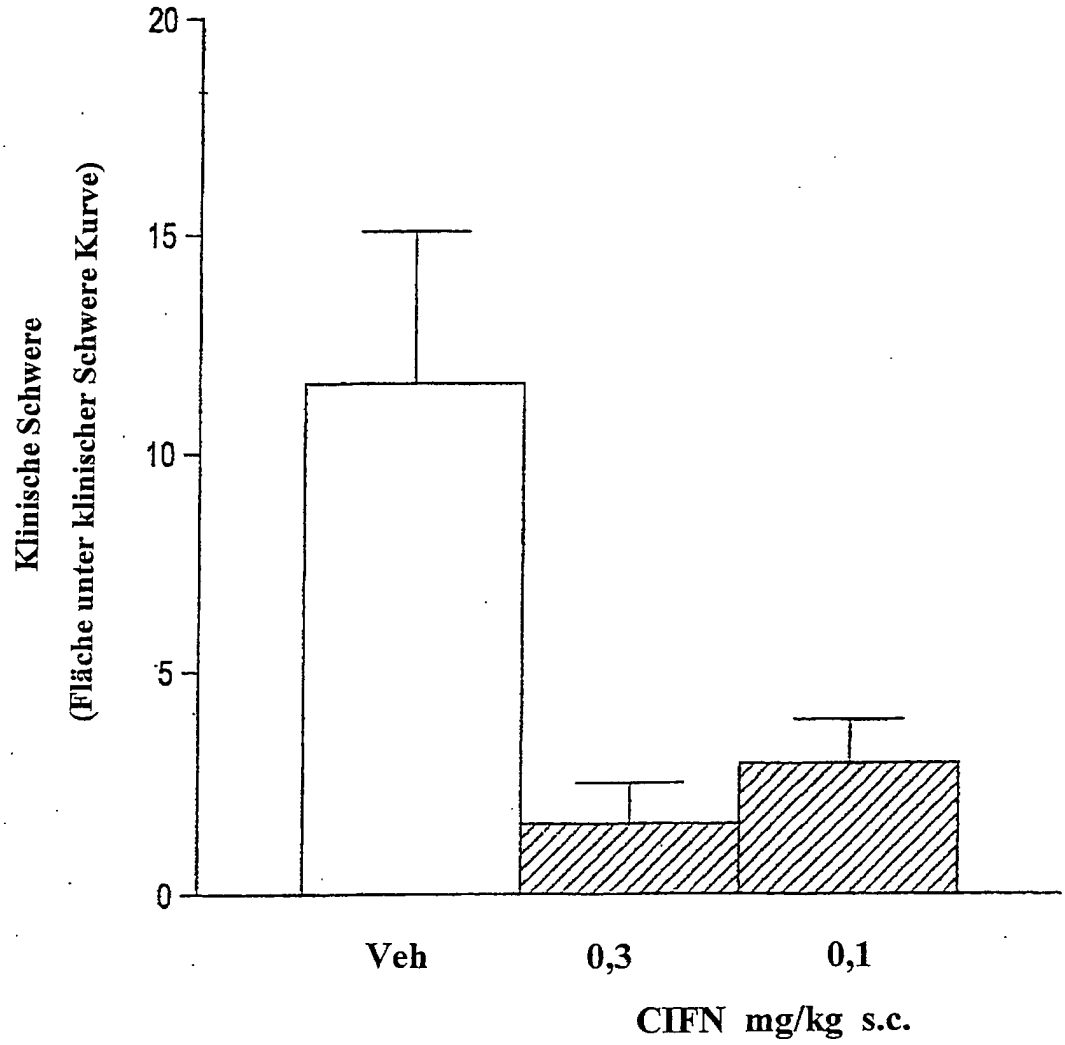

Klinische Schwere
(Fläche unter klinischer Schwere Kurve)
20
15
10
5
0
Veh
0,3
0,1
CIFN mg/kg s.c.

FIG. 4

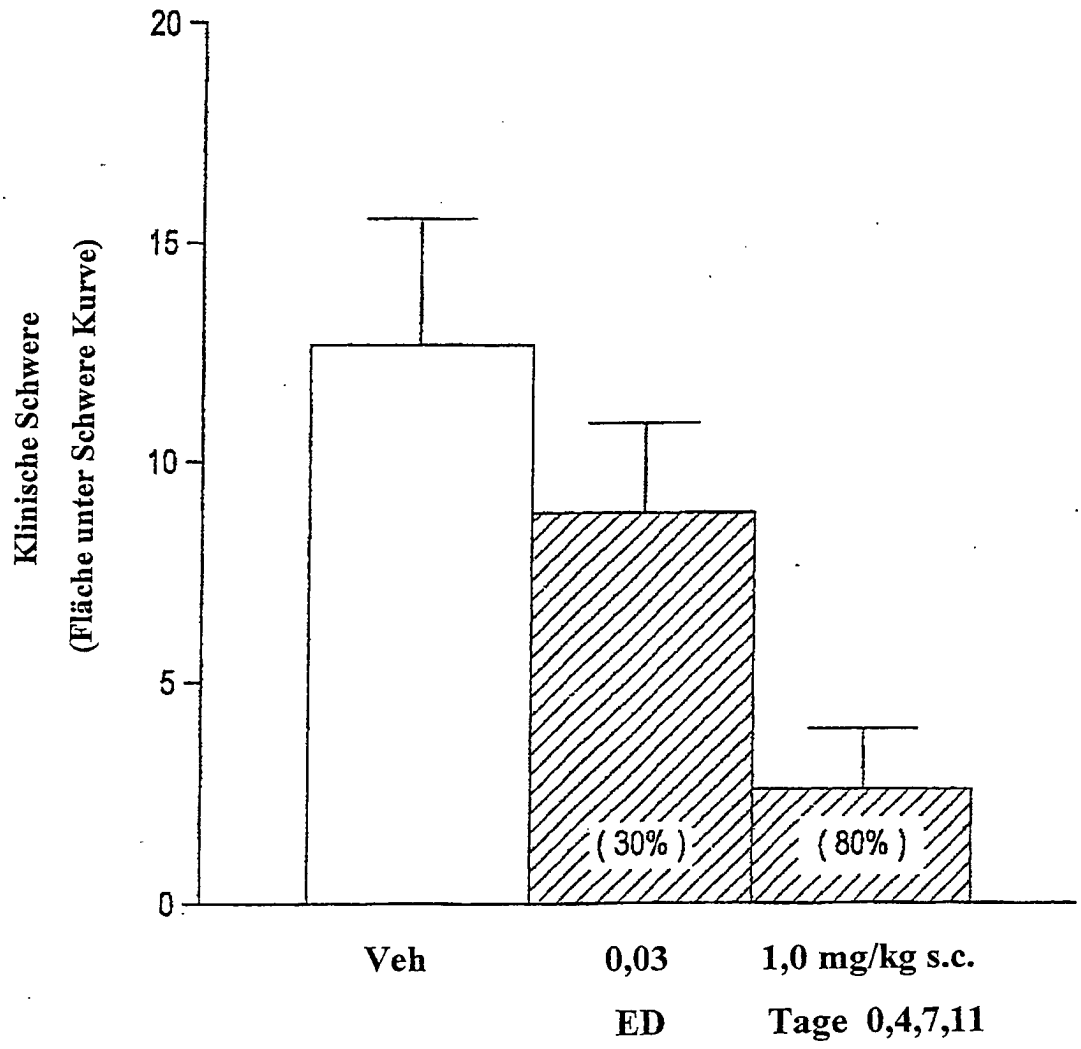

Klinische Schwere
(Fläche unter Schwere Kurve)
20
15
10
5
0
(30%)
(80%)
Veh
0,03
1,0 mg/kg s.c.
ED
Tage 0,4,7,11

FIG. 5

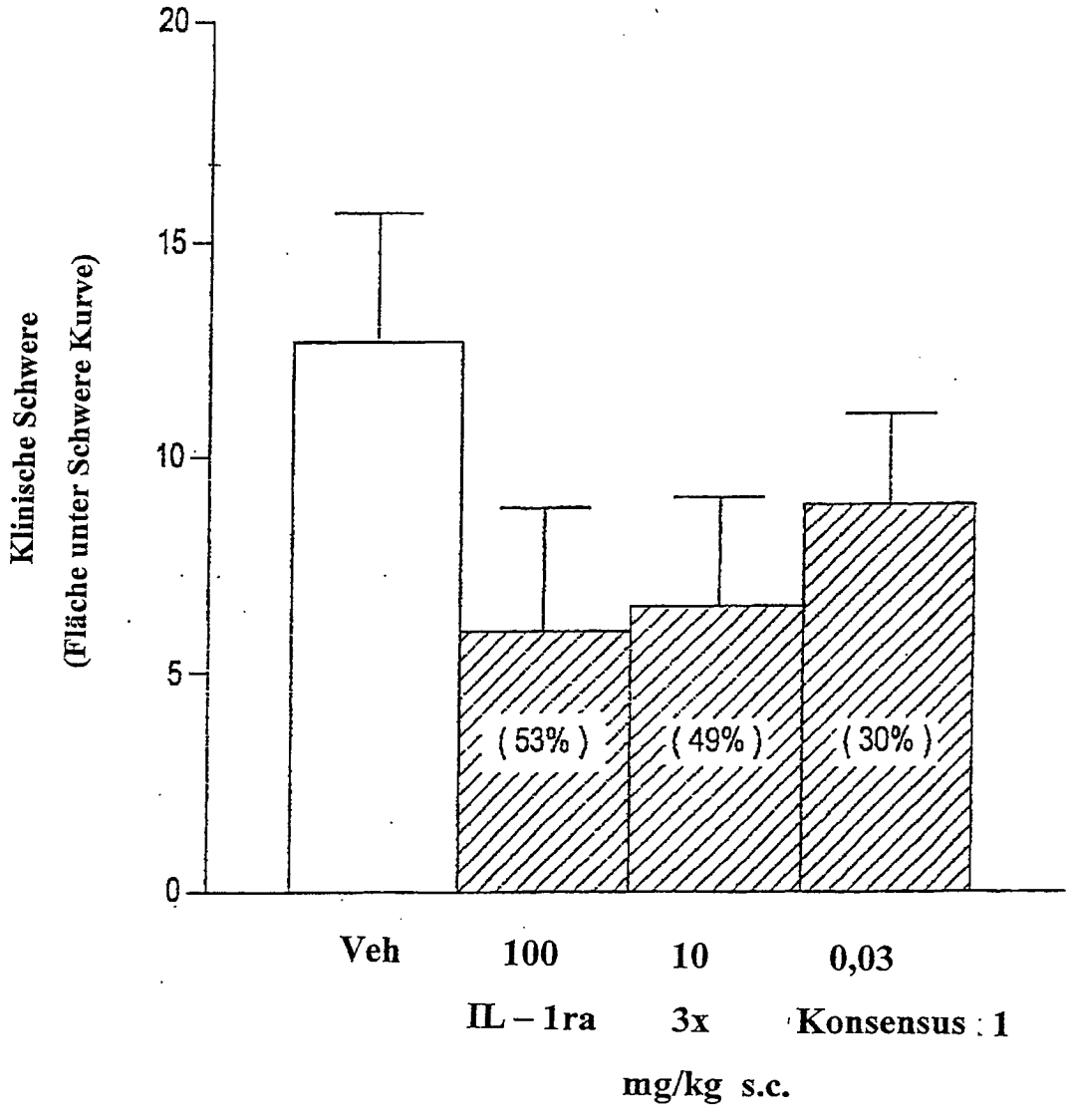

Klinische Schwere
(Fläche unter Schwere Kurve)
20
15
10
5
0
(53%)
(49%)
(30%)
Veh
100
10
0,03
IL – 1ra
3x
Konsensus : 1
mg/kg s.c.

FIG. 6

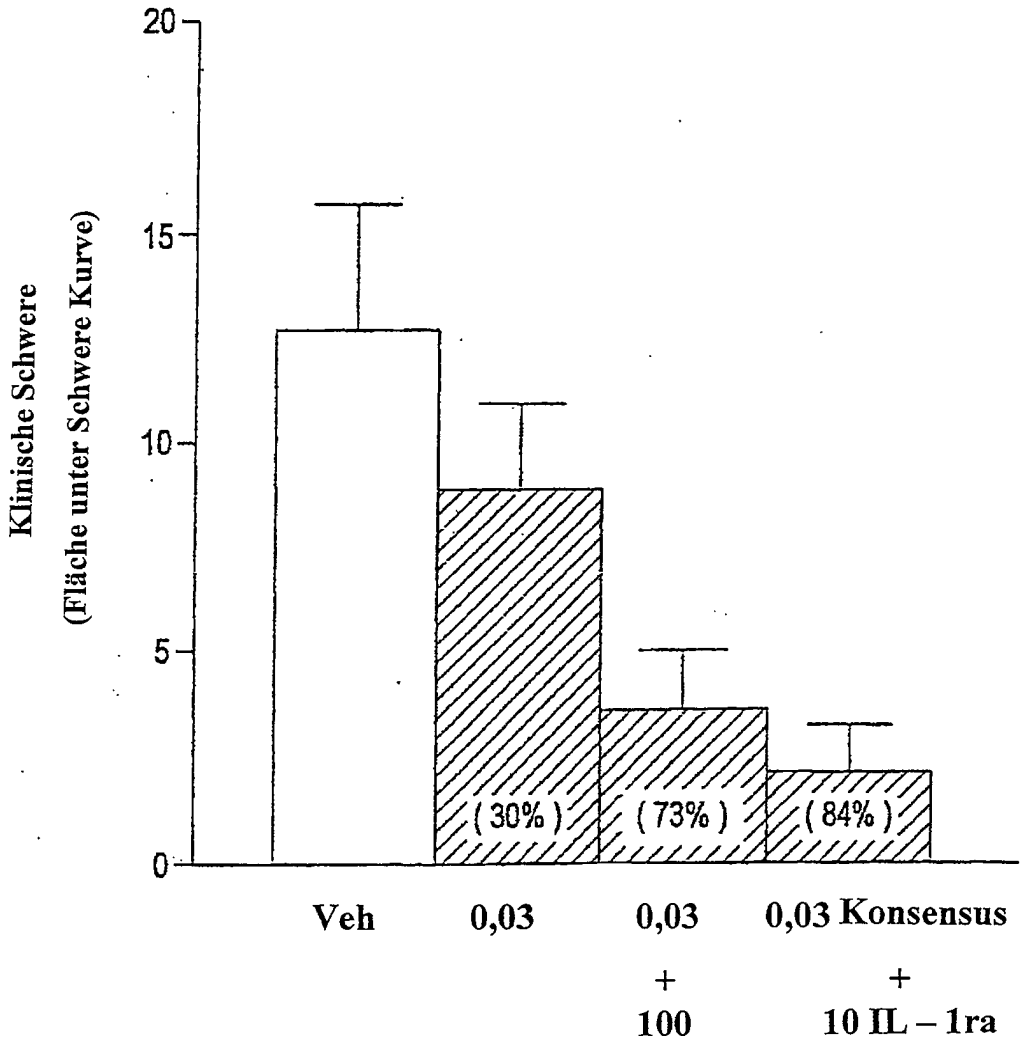
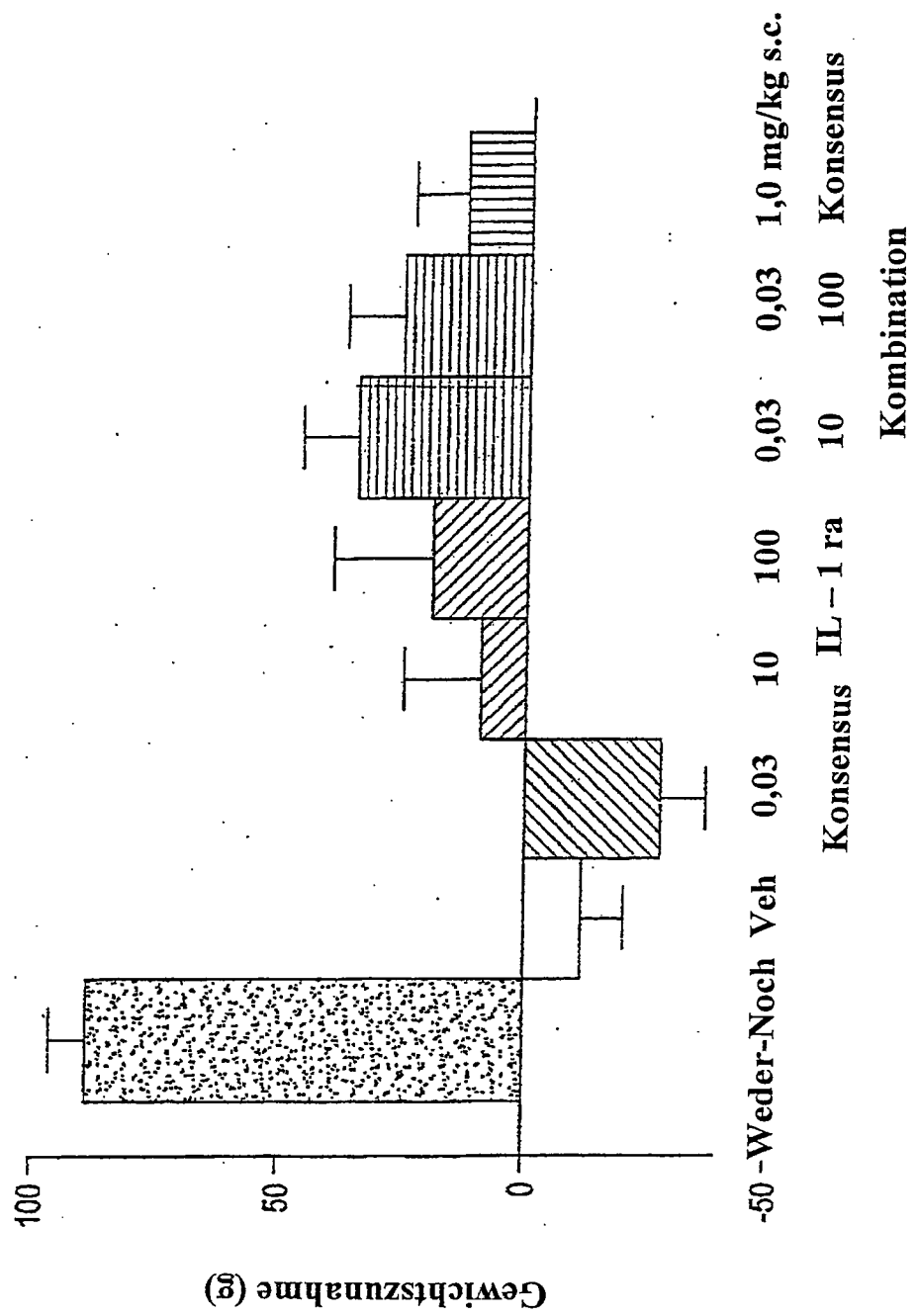

Klinische Schwere
(Fläche unter Schwere Kurve)
20
15
10
5
0
(30%)
(73%)
(84%)
Veh
0,03
0,03 + 100
0,03 Konsensus + 10 IL – 1ra

FIG. 7


Gewichtszunahme (g)
100
50
0
-50
Weder-Noch
Veh
0,03
10
100
0,03
0,03
1,0 mg/kg s.c.
Konsensus
IL – 1 ra
10
100
Konsensus
Kombination