



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 20 002 T2 2005.09.22**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 075 281 B1**

(51) Int Cl.7: **A61K 47/48**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 20 002.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/09161**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 920 094.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/055377**

(86) PCT-Anmeldetag: **28.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.11.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.02.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **08.09.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **22.09.2005**

(30) Unionspriorität:

83339 P 28.04.1998 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

**Applied Research Systems ARS Holding N.V.,
Curacao, AN**

(72) Erfinder:

**EL TAYAR, Nabil, Milton, US; ROBERTS, J.,
Michael, Madison, US; HARRIS, Milton, Huntsville,
US; SAWLIVICH, Wayne, Wilmington, US**

(74) Vertreter:

**Adam, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80539
München**

(54) Bezeichnung: **KONJUGATE AUS POLYOLE UND BETA-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

Bereich der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft Polyol-IFN- β -Konjugate, wobei eine Polyoleinheit an Cys¹⁷ kovalent gebunden ist. Weitere Gegenstände der vorliegenden Erfindung sind ein Verfahren für dessen stellenspezifische Herstellung sowie deren Verwendung in der Therapie, Prognose oder Diagnose von bakteriellen Infektionen, viralen Infektionen, Autoimmunkrankheiten und entzündlichen Krankheiten.

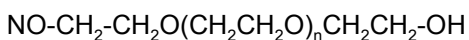
Hintergrund der Erfindung

[0002] Humanes Fibroblasteninterferon (IFN- β) weist antivirale Aktivität auf und kann auch natürliche Killerzellen gegen neoplastische Zellen stimulieren. Es ist ein Polypeptid von ungefähr 20.000 Da, das durch Viren und doppelsträngige RNAs induziert wird. Aus der Nukleotidsequenz des Fibroblasteninterferogens, kloniert durch rekombinante DNA-Technologie, Derynk et al. (Nature, 285:542-547, 1980) wurde die komplette Aminosäuresequenz des Proteins abgeleitet. Es ist 166 Aminosäuren lang.

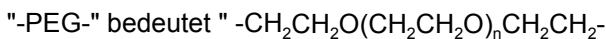
[0003] Shepard et al. Nature, 294:563-565, 1981) beschrieb eine Mutation bei Base 842 (Cys \rightarrow Tyr an Position 141), das seine antivirale Aktivität aufhebt, und einen varianten Klon mit einer Deletion der Nukleotide 1119-1121.

[0004] Mark et al. (Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 81(18):5662-5666, 1984) insertierten eine artifizielle Mutation, durch Ersetzen der Base 469 (T) durch (A), was einen Aminosäurenwechsel von Cys \rightarrow Ser an Position 17 verursacht. Vom resultierenden IFN- β wurde berichtet, dass es genauso aktiv wie das "native" IFN- β und während der Langzeitlagerung (-70°C) stabil sei.

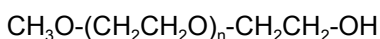
[0005] Das kovalente Anknüpfen des hydrophilen Polymers Polyethylenglykol, (PEG), auch bekannt als Polyethylenoxid, (PEO), an Moleküle hat bedeutende Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin. In seiner häufigsten Form ist PEG ein lineares Polymer, das Hydroxylgruppen an jedem Terminus aufweist:



[0006] Diese Formel kann kurz als HO-PEG-OH dargestellt werden, wobei gemeint ist, dass -PEG- das polymere Rückgrat darstellt, ohne die terminalen Gruppen:



[0007] PEG wird häufig als Methoxy-PEG-OH verwendet, (m-PEG), in welchem ein Terminus die relativ inerte Methoxygruppe ist, während der andere Terminus eine Hydroxylgruppe ist, die Gegenstand chemischer Modifikation ist.



[0008] Verzweigte PEGs werden auch häufig verwendet. Die verzweigten PEGs können als R(-PEG-OH)_m dargestellt werden, in welchen R einen zentralen Kernteil darstellt, wie beispielsweise Pentaerythritol oder Glycerol, und m die Anzahl der Verzweigungsarme darstellt. Die Anzahl der Verzweigungsarme (m) kann von drei bis hundert oder mehr reichen. Die Hydroxylgruppen sind Gegenstand chemischer Modifikation.

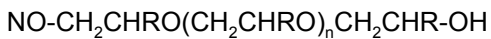
[0009] Eine andere verzweigte Form, wie beispielsweise beschrieben in der PCT-Patentanmeldung WO 96/21469, weist einen Einzelterminus auf, der Gegenstand chemischer Modifikation ist. Dieser Typ PEG kann als (CH₃O-PEG-)_pR-X dargestellt werden, wobei p gleich 2 oder 3 ist, R einen zentralen Kern wie Lysin oder Glycerol und X eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise Carboxyl darstellt, die Gegenstand chemischer Aktivierung ist. Jedoch weist eine andere verzweigte Form, das "Pendant-PEG", reaktive Gruppen, wie beispielsweise Carboxyl, eher entlang des PEG-Rückgrats als am Ende der PEG-Kette auf.

[0010] Zusätzlich zu diesen PEG-Formen, kann das Polymer auch durch schwache oder abbaubare Bindungen im Rückgrat hergestellt werden. Beispielsweise hat Harris in der U.S.-Patentanmeldung 06/026,716 gezeigt, dass PEG mit Esterbindungen im Polymerrückgrat hergestellt werden kann, die Gegenstand einer Hydrolyse sind. Diese Hydrolyse resultiert aus der Spaltung des Polymers in Fragmente mit niederem Molekulargewicht, gemäß dem Reaktionsschema:

-PEG-CO₂-PEG- + H₂O – -PEG-CO₂H + NO-PEG-

[0011] Gemäß der vorliegenden Erfindung ist mit dem Begriff Polyethylenglykol oder PEG gemeint, dass er all die oben beschriebenen Derivate umfasst.

[0012] Die Copolymere von Ethylenoxid und Propylenoxid sind in ihrer Chemie nah mit PEG verwandt und können anstelle von PEG in vielen seiner Anwendungen verwendet werden. Sie weisen die folgende allgemeine Formel auf:



wobei R, H oder CH₃ ist.

[0013] PEG ist ein nützliches Polymer, das die Eigenschaft hoher Wasserlöslichkeit sowie hohe Löslichkeit in vielen organischen Lösungsmitteln aufweist. PEG ist ferner nicht toxisch und nicht immunogen. Wenn PEG chemisch an eine wasserunlösliche Verbindung gebunden wird (PEGylierung), ist das resultierende Konjugat im Allgemeinen wasserlöslich sowie in vielen organischen Lösungsmitteln löslich.

[0014] PEG-Proteinkonjugate werden gegenwärtig in Proteinersatztherapien und für andere therapeutische Zwecke vereendet. Zum Beispiel wird PEGylierte Adenosindeaminase (ADAGEN[®]) zur Behandlung von schwerer kombinierter Immundefekterkrankung (SCIDS) verwendet, PEGylierte L-Asparaginase (ONCAP-SPAR[®]) wird zur Behandlung von akuter lymphoplastischer Leukämie (ALL) verwendet, und PEGyliertes Interferon-α (INTRON(R) A) ist in Phase-III-Studien um Hepatitis C zu behandeln.

[0015] Einen allgemeinen Überblick über PEG-Proteinkonjugate mit klinischer Wirksamkeit gibt N.L. Burnham, Am. J. Hosp. Pharm., 15:210-218, 1994.

[0016] Es wurden eine Vielzahl von Verfahren entwickelt um Proteine zu PEGylieren. Typischerweise wird PEG an reaktive, am Protein vorhandene Gruppen gebunden unter Verwendung von elektrophilisch aktivierten PEG-Derivaten. Das Anknüpfen von PEG an α- und ε-Aminogruppen, die in Lysinresten oder am N-Terminus vorhanden sind, resultiert in einem Konjugat, das aus einem Produktgemisch besteht.

[0017] Im Allgemeinen bestehen solche Konjugate aus einer Menge von unterschiedlichen PEG-Molekülen die pro Proteinmolekül gebunden sind ("PEGmere"), die von Null bis zur Anzahl der Aminogruppen im Protein reichen. Bei einem Proteinmolekül, das einfach modifiziert wurde, kann die PEG-Einheit an einer Anzahl verschiedener Aminstellen gebunden sein.

[0018] Diese Art der nicht-spezifischen PEGylierung resultierte in einer Anzahl von Konjugaten, die nahezu inaktiv waren. Die Aktivitätsreduktion wird typischerweise durch Abschirmung der aktiven Bindungsdomäne des Proteins, wie dies bei vielen Zytokinen und Antikörpern der Fall ist, verursacht. Zum Beispiel beschreiben Katre et al. im US-Patent 4,766,106 und US-Patent 4,917,888 die PEGylierung von IFN-β und IL-2 mit einem großen Überschuss an Methoxypolyethylenglykol-N-Succinimidylglutarat und Methoxypolyethylenglykol-N-Succinimidylsuccinat. Beide Proteine wurden in mikrobiellen Wirtszellen, die eine stellenspezifische Mutation eines freien Cysteins in ein Serin zulassen, hergestellt. Um eine Proteinfaltung zu ermöglichen, war die Mutation von IFN-β in der mikrobiellen Expression notwendig. Insbesondere ist das in diesen Experimenten verwendete IFN-β das kommerzielle Produkt Betaseron[®], in welchem der Cys¹⁷-Rest durch ein Serin ersetzt ist. Zusätzlich wurde seine Löslichkeit in wässriger Lösung durch das Fehlen einer Glykosylierung vermindert. Die nichtspezifische PEGylierung resultierte in erhöhter Löslichkeit, aber der verminderte Grad an Aktivität und Ausbeute war ein Hauptproblem.

[0019] Die europäische Patentanmeldung EP 593 868, betitelt PEG-Interferonkonjugate, beschreibt die Herstellung von PEG-IFN-α-Konjugaten. Jedoch ist die PEGylierungsreaktion nicht stellenspezifisch und deshalb wird eine Mischung aus Positionsisomeren der PEG-IFN-α-Konjugate erhalten (siehe auch Monkarsh et al., ACS Symp. Ser., 680:207-216, 1997).

[0020] Kinstler et al. zeigten in der europäischen Patentanmeldung EP 675 201 die selektive Modifikation des N-terminalen Restes des Megakaryozytenwachstums- und Entwicklungsfaktors (MGDF) mit mPEG-Propionaldehyd. Dies ermöglichte eine reproduzierbare PEGylierung und reproduzierbare Pharmakokinetiken von Charge zu Charge. Gilbert et al. zeigten im US-Patent 5,711,944, dass eine PEGylierung von IFN-α mit einem optimalen Aktivitätsgrad herbeigeführt werden kann. In diesem Fall wurde ein aufwändiger Reinigungsschritt not-

wendig, um das optimale Konjugat zu erhalten.

[0021] Die Mehrheit der Cytokine, ebenso wie andere Proteine, besitzen keine spezifische PEG-Anknüpfungsstelle und abgesehen von den oben genannten Beispielen, ist es sehr wahrscheinlich, dass einige der durch die PEGylierungsreaktion hergestellten Isomere teilweise oder völlig inaktiv sind, was folglich einen Aktivitätsverlust in der Endmischung hervorruft.

[0022] Deshalb ist eine stellenspezifische Mono-PEGylierung in der Herstellung von solchen Proteinkonjugaten ein wünschenswertes Ziel.

[0023] Woghiren et al. synthetisierten in *Bioconjugate Chem.*, 4(5): 314-318, 1993, ein thiolelektives PEG-Derivat für solch eine stellenspezifische PEGylierung. Es wurde gezeigt, dass ein stabiles thiolgeschütztes PEG-Derivat in Form einer Parapyridyldisulfid reaktiven Gruppe sich spezifisch an das freie Cystein im Protein Papain konjugiert. Die neu gebildete Disulfidbrücke zwischen Papain und PEG konnte unter milden reduzierenden Bedingungen gespalten werden, um das native Protein zurückzugewinnen.

[0024] Die Zitierung irgendwelcher Dokumente ist hierbei nicht als Zugeständnis zu werten, dass dieses Dokument einschlägiger Stand der Technik ist oder in Betracht zu ziehendes Material bezüglich der Patentierbarkeit irgendeines Anspruchs der vorliegenden Anmeldung. Irgendwelche Aussagen zum Inhalt oder der Zeitangabe irgendeines Dokuments basiert auf der Information, die dem Anmelder zum Einreichungszeitpunkt verfügbar waren und begründen kein Zugeständnis an die Richtigkeit einer solchen Aussage.

Zusammenfassung der Erfindung

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt Polyol-IFN- β -Konjugate und insbesondere PEG-IFN- β -Konjugate zur Verfügung, worin eine Polyoleinheit kovalent an ein Cys¹⁷ gebunden ist. Die spezifische Konjugation wird dadurch erhalten, dass ein thiolreaktives Polyolagens mit dem Cys¹⁷-Rest in IFN- β zur Reaktion gebracht wird. Von solchen Konjugaten wird erwartet, dass sie eine erhöhte Effektivität in vivo zeigen. Das Ziel ist eine erhöhte Löslichkeit bei neutralem pH, erhöhte Stabilität (verminderte Aggregation), verminderte Immunogenizität, und kein Aktivitätsverlust im Hinblick auf das "native" IFN- β zu erhalten. Das Ergebnis einer solchen Konjugation würde die Anzahl der Arzneimittelgaben für einen beabsichtigten Effekt vermindern, die Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung vereinfachen und stabilisieren, und möglicherweise die Langzeitwirksamkeit erhöhen.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0026] [Fig. 1](#) zeigt eine Kapillarelektrophoresekurve (CE) des PEG-IFN- β -Konjugats vor der Reinigung.

[0027] [Fig. 2A](#) bis [Fig. 2C](#) zeigen die Reinigung des PEG-IFN- β -Konjugats, durchgeführt mit Größenausschlusschromatographie (Superose 12): [Fig. 2A](#) – erster Durchlauf; [Fig. 2B](#) – zweiter Durchlauf; [Fig. 2C](#) – dritter Durchlauf.

[0028] [Fig. 3](#) zeigt die SDS-PAGE-Chromatographie eines gereinigten PEG-IFN- β -Konjugats aus dem dritten Chromatogaphiedurchlauf.

[0029] Bahnen 1 und 4 sind Proteinmolekulargewichtstandards, Bahn 2 ist "natives" IFN- β , und Bahn 3 ist ein PEG-IFN- β -Konjugat.

[0030] [Fig. 4](#) zeigt die Kapillarelektrophoresekurve (CE) eines gereinigten PEG-IFN- β -Konjugats, in welchem IFN- β mit mPEG-OPSS_{5k} PEGyliert ist.

[0031] [Fig. 5](#) zeigt das MALDI-MS-Spektrum eines gereinigten PEG-IFN- β -Konjugats.

[0032] [Fig. 6](#) zeigt einen Vergleich zwischen der antiviralen Aktivität eines "nativen" IFN- β und eines PEG-IFN- β Konjugats. WISH Zellen werden mit angegebenen Konzentrationen von IFN- β Proben für 24 Stunden inkubiert, bevor sie mit cytopathischen Dosen eines vesikulären Stomatitisvirus herausgefordert werden. Der cytopathische Effekt wurde nach weiteren 48 Stunden durch MTT-Konversion bestimmt.

[0033] [Fig. 7](#) zeigt das Bindungsprofil von IFN- β und PEG-IFN in Daudi-Zellen.

[0034] [Fig. 8](#) zeigt das pharmakokinetische Profil von IFN- β und PEG-IFN in Mäusen nach intravenöser Verabreichung. Die gepunkteten Linien geben den Assay LOQ für jede Standardkurve wieder.

[0035] [Fig. 9](#) zeigt das pharmakokinetische Profil von IFN- β und PEG-IFN in Mäusen nach subkutaner Verabreichung. Die gepunkteten Linien geben den Assay LOQ für jede Standardkurve wieder.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0036] Die vorliegende Erfindung ist auf die Entdeckung gestützt, dass die Anknüpfung eines Polyolteils, genauer eines PEG-Teils an den Cys¹⁷-Rest eines humanen IFN- β die biologische IFN- β -Aktivität von nativem humanem Interferon- β unerwartet erhöht (oder wenigstens beibehält und nicht in einer Verminderung resultiert). Folglich weist nicht nur das IFN- β mit dem Polyolteil, gebunden an den Cys¹⁷-Rest dieselbe oder erhöhte biologische IFN- β -Aktivität auf, sondern dieses Polyol-IFN- β -Konjugat stellt auch die gewünschten Eigenschaften zur Verfügung, die durch den Polyolteil verliehen werden, wie beispielsweise erhöhte Löslichkeit.

[0037] "IFN- β ", wie hier verwendet, bedeutet humanes Fibroblasteninterferon, wie es durch Isolation aus biologischen Flüssigkeiten oder durch rekombinante DNA Techniken von prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen erhalten wird, ebenso wie seine Salze, funktionale Derivate, Vorstufen und aktive Fraktionen, vorausgesetzt, dass sie den Cysteinrest, der an Position 17 in seiner natürlich vorkommenden Form auftritt, enthalten.

[0038] Der Polyolteil in dem Polyol-IFN- β -Konjugat kann gemäß der vorliegenden Erfindung jedes wasserlösliche mono- oder bifunktionelle Poly(alkylenoxid) sein, das eine lineare oder verzweigte Kette aufweist. Typischerweise ist das Polyol ein Poly(alkylenglykol), wie beispielsweise Poly(ethylenglykol) (PEG). Dennoch wird der Fachmann erkennen, dass andere Polyole, wie zum Beispiel Poly(propylenglykol) und Copolymere des Polyethylenglykols und Polypropylenglykols entsprechend verwendet werden können.

[0039] Der Begriff "PEG-Teil", wie hierin verwendet, bedeutet, dass er lineares und verzweigtes PEG, Methoxy-PEG, hydrolytisch und enzymatisch abbaubares PEG, Pendant-PEG, Dendrimer-PEG, Copolymere von PEG und ein oder mehrere Polyole und Copolymere von PEG und PLGA (Poly(Milch/Glykolsäure)) beinhaltet, aber nicht darauf beschränkt ist.

[0040] Die Definition "Salze," wie hierin verwendet, bezieht sich sowohl auf Salze der Carboxylgruppen als auch auf Salze der Aminofunktionen der durch bekannte Verfahren erhältlichen Verbindungen. Die Salze der Carboxylgruppen schließen anorganische Salze wie beispielsweise Natrium-, Kalium-, Calciumsalze und Salze mit organischen Basen wie solche, die mit einem Amin wie Triethanolamin, Arginin oder Lysin gebildet werden, ein. Die Salze der Aminogruppen schließen beispielsweise Salze mit anorganischen Säuren, wie Salzsäure, und organischen Säuren wie Essigsäure ein.

[0041] Die Definition "funktionelle Derivate", wie hierin verwendet, bezieht sich auf Derivate, die aus funktionellen Gruppen, wie sie an lateralen Ketten von Aminosäureteilen oder an terminalen N- oder C-Gruppen vorliegen gemäß bekannter Verfahren hergestellt werden können und sind in der vorliegenden Erfindung enthalten, wenn sie pharmazeutisch annehmbar sind, d.h., wenn sie nicht die Proteinaktivität zerstören oder Toxizität in die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die sie enthalten, einbringen. Solche Derivate schließen beispielsweise Ester oder aliphatische Amide der Carboxylgruppen und N-Acylderivate von freien Aminogruppen oder O-Acylderivate von freien Hydroxylgruppen ein und werden mit Acylgruppen wie beispielsweise Alcanoly- oder Aroylgruppen gebildet.

[0042] Die "Vorstufen" sind Verbindungen, die im menschlichen oder tierischen Körper in IFN- β umgewandelt werden.

[0043] Als "aktive Fraktionen" des Proteins, bezieht sich die vorliegende Erfindung auf jegliches Fragment oder Vorstufe der polypeptidischen Kette der Verbindung selbst, alleine oder in Kombination mit verwandten Molekülen oder Resten, die daran gebunden sind, beispielsweise, Reste von Zuckern oder Phosphaten, oder Aggregate von Polypeptidmolekülen, wenn solche Fragmente oder Vorstufen dieselbe Aktivität wie IFN- β als Medikament aufweisen.

[0044] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können nach jedem beliebigen im Stand der Technik bekannten Verfahren hergestellt werden. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung wird IFN- β mit einem PEGylierungs-Agens in einem geeigneten Lösungsmittel zur Reaktion gebracht und das gewünschte Konjugat

isoliert und gereinigt, beispielsweise durch Anwendung einer oder mehrerer chromatographischer Verfahren.

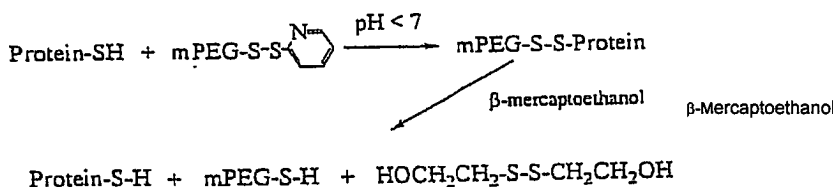
[0045] "Chromatographisches Verfahren" bedeutet jede beliebige Technik die verwendet wird, um Bestandteile einer Mischung zu trennen, indem sie auf ein Trägermaterial aufgebracht wird (stationäre Phase), durch welches ein Lösungsmittel (mobile Phase) fließt. Die Trennungsprinzipien der Chromatographie beruhen auf der unterschiedlichen physikalischen Natur der stationären und mobilen Phase.

[0046] Einige besondere Arten von chromatographischen Verfahren, die in der Literatur wohlbekannt sind, schließen Flüssigkeits-, Hochdruckflüssigkeits-, Ionenaustausch-, Absorptions-, Affinitäts-, Partitions-, hydrophobe, Umkehrphasen-, Gelfiltration-, Ultrafiltration- oder Dünnschicht-Chromatographie ein.

[0047] Das "thiolreaktive PEGylierungsmittel", wie in der vorliegenden Anmeldung verwendet, bedeutet jedes PEG-Derivat, das in der Lage ist mit der Thiolgruppe des Cysteinrestes zu reagieren. Es kann beispielsweise ein PEG sein, das eine funktionelle Gruppe wie Orthopyridyldisulfid, Vinylsulfon, Maleimid, Iodacetimid und andere enthält. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das thiolreaktive PEGylierungsmittel das Orthopyridyldisulfid-(OPSS)-Derivat von PEG.

[0048] Das PEGylierungs-Mittel wird in seiner monomethoxylierten Form verwendet, wo nur ein Terminus zur Konjugation zur Verfügung steht, oder in einer bifunktionellen Form, wo beide Termini zur Konjugation zur Verfügung stehen, wie beispielsweise indem ein Konjugat mit zwei IFN- β gebildet wird, die kovalent an einen einzelnen PEG-Teil gebunden sind. Es weist vorzugsweise ein Molekulargewicht zwischen 500 und 100.000 auf.

[0049] Ein typisches Reaktionsschema zur Herstellung der Konjugate der Erfindung ist unten gezeigt:



[0050] Die zweite Zeile des obigen Schemas zeigt ein Verfahren zur Spaltung der PEG-Proteinbindung. Das mPEG-OPSS-Derivat ist hochselektiv gegenüber freien Sulfhydrylgruppen und reagiert schnell unter sauren pH-Bedingungen, bei denen das IFN- β stabil ist. Die hohe Selektivität kann durch die Reduktion des Konjugats zur nativen IFN- β -Form und PEG gezeigt werden.

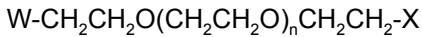
[0051] Es hat sich zeigt, dass die Disulfidbrücke, die zwischen dem Protein und dem PEG-Teil gebildet wurde, im Kreislauf stabil ist, aber beim Eintritt in die Zellumgebung reduziert werden kann. Deshalb wird erwartet, dass dieses Konjugat, das nicht in die Zelle eindringt, im Kreislauf stabil sein wird, bis es beseitigt wird.

[0052] Es sollte beachtet werden, dass die obige Reaktion stellenspezifisch ist, da die anderen beiden Cysteinreste an den Positionen 31 und 141 in der natürlich vorkommenden Form des humanem IFN- β s nicht mit dem thiolreaktiven PEGylierungsmittel reagieren, da sie eine Disulfidbrücke ausbilden.

[0053] Es wird ebenso ein Verfahren zur schrittweisen Anknüpfung von zwei oder mehr PEG-Teilen an ein Polypeptid offenbart. Dieses Verfahren basiert auf der Erkenntnis, dass ein niedermolekulargewichtiges aktiviertes PEG vollständiger mit einer sterisch gehinderten Reaktionsstelle eines Proteins reagiert, als ein hochmolekulargewichtiges aktiviertes PEG. Die PEG-Modifikation von teuren therapeutischen Proteinen muss kosteneffizient sein, damit die Herstellung von PEG-Konjugaten praktikabel ist. Zusätzlich sollte das Konjugat ein wirksames Größenäquivalent zu dem eines Proteins mit einem Molekulargewicht von 70 kDa, aufweisen, um eine Glomerulusfiltration zu vermindern und die pharmakologischen Eigenschaften des PEG-Proteinkonjugats zu optimieren. Das bedeutet, dass für eine stellenspezifische Modifikation, wo ein PEG angeknüpft wird, bevorzugt ein PEG-Derivat mit einem Molekulargewicht von größer als 20 kDa angeknüpft wird. Wenn die Modifikationsstelle sterisch überladen ist, kann die reaktive Gruppe auf dem großen PEG-Teil Schwierigkeiten haben, die Modifikationsstelle zu erreichen und folglich zu geringen Ausbeuten führen. Ein verbessertes Verfahren zur PEGylierung eines Polypeptids erhöht die Ausbeute der stellenspezifischen PEGylierung, indem zuerst ein kleiner hetero- oder homobifunktioneller PEG-Teil angeknüpft wird, der aufgrund seiner relativ geringeren Größe, mit der sterisch überladenen Stelle reagieren kann. Das anschließende Anknüpfen des hochmolekulargewichtigen PEG-Derivats an das kleine PEG führt zu hohen Ausbeuten des gewünschten PEGylierten Proteins. Das Verfahren zur schrittweisen Anknüpfung von zwei oder mehr PEG-Teilen an ein Polypeptid in Folge, schließt zuerst das Anknüpfen eines niedermolekulargewichtigen heterobifunktionellen oder homobifunktionellen

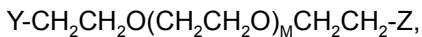
len PEG-Teils an das Polypeptid und dann das Anknüpfen eines monofunktionellen oder bifunktionellen PEG-Teils an den freien Terminus des niedermolekulargewichtigen PEG-Teils, der an das Polypeptid geknüpft ist, ein. Nach schrittweisem Anknüpfen von zwei oder mehr PEG-Teilen an ein Polypeptid in Folge, welches vorzugsweise IFN- β ist und wo Cys¹⁷ in einer sterisch überladenen Stelle lokalisiert ist und die bevorzugte Stelle für die PEG-Anknüpfung ist, kann das PEG-Polypeptidkonjugat unter Verwendung von einer oder mehrerer Reinigungstechniken wie beispielsweise Ionenaustausch-chromatographie, Größenausschlusschromatographie, hydrophobe Interaktions-chromatographie, Affinitätschromatographie, und Umkehrphasenchromatographie gereinigt werden.

[0054] Die niedermolekulargewichtige PEG-Stelle hat die Formel:



wo W und X Gruppen sind, die unabhängig mit einer amin-, sulfhydryl-, carboxyl- oder hydroxyfunktionellen Gruppe reagieren, um die niedermolekulargewichtige PEG-Stelle an das Polypeptid zu binden. W und X sind vorzugsweise unabhängig ausgewählt aus Orthopyridyldisulfid, Maleimiden, Vinylsulfonen, Iodacetamiden, Aminen, Thiolen, Carboxylen, Aktivestern, Benzotriazolcarbonaten, p-Nitrophenolcarbonaten, Isocyanaten und Biotin. Der niedermolekulargewichtige PEG-Teil hat bevorzugt ein Molekulargewicht im Bereich von ungefähr 100 bis 5.000 Dalton.

[0055] Der monofunktionelle oder bifunktionelle PEG-Teil zur Anknüpfung an den freien Terminus eines niedermolekulargewichtigen PEGs, das an das Polypeptid gebunden ist, weist vorzugsweise ein Molekulargewicht im Bereich von ca. 100 Dalton bis 200 kDa auf und ist vorzugsweise ein Methoxy-PEG, verzweigtes PEG, hydrolytisch oder enzymatisch abbaubares PEG, Pendant-PEG, oder Dendrimer-PEG. Das monofunktionelle oder bifunktionelle PEG weist darüber hinaus die Formel:



auf, wobei Y reaktiv zur terminalen Gruppe des freien Terminus des niedermolekulargewichtigen PEG-Teils ist, der an das Polypeptid gebunden ist und Z -OCH₃ ist oder eine dazu reaktive Gruppe, um ein bifunktionelles Konjugat zu bilden.

[0056] Die mit dem obigen Verfahren hergestellten PEG-Polypeptidkonjugate durch schrittweise Anknüpfung von zwei oder mehr PEG-Stellen können zur Herstellung von Medikamenten oder pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Krankheiten oder Funktionsstörungen verwendet werden, bei welchen die Polypeptide als ein aktiver Bestandteil wirksam sind.

[0057] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist es, die Konjugate in im Wesentlichen gereinigter Form zur Verfügung zu stellen, damit sie für die Verwendung als aktive Bestandteile in pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung, Diagnose oder Prognose von bakteriellen und viralen Infektionen sowie Autoimmun-, entzündlichen Krankheiten und Tumoren geeignet sind. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen stellen einen weiteren Gegenstand der vorliegenden Erfindung dar.

[0058] Nicht einschränkende Beispiele der oben genannten Krankheiten schließen septischen Schock, AIDS, rheumatoide Arthritis, Lupus erythematodes und Multiple Sklerose sein.

[0059] Weitere Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung werden in der folgenden Beschreibung offensichtlich.

[0060] Eine Ausführungsform der Erfindung ist die Verabreichung von pharmakologisch aktiven Mengen eines erfindungsgemäßen Konjugats an Subjekte mit dem Risiko, eine der oben genannten Krankheiten zu entwickeln oder an Subjekte, die bereits solche Pathologien zeigen.

[0061] Es kann jede Verabreichungsart verwendet werden, die mit dem aktiven Bestandteil vereinbar ist. Eine parenterale Verabreichung, wie beispielsweise subkutane, intramuskuläre oder intravenöse Injektion ist bevorzugt. Die Dosis des zu verabreichenden aktiven Bestandteils hängt von der medizinische Verschreibung gemäß des Alters, Gewicht und des individuellen Ansprechens des Patienten ab. Die Dosierung kann zwischen 10 μ g und 1 mg täglich für ein Durchschnittskörpergewicht von 75 kg betragen, und die bevorzugte Tagesdosis beträgt zwischen 20 μ g und 200 μ g.

[0062] Die pharmazeutische Zusammensetzung zur parenteralen Verabreichung kann als injizierbare Form hergestellt werden, umfassend den aktiven Bestandteil und ein geeignetes Vehikel. Vehikel zur parenteralen Verabreichung sind im Stand der Technik wohlbekannt und schließen beispielsweise Wasser, Salzlösung, Ringerlösung und/oder Dextrose ein. Das Vehikel kann kleine Mengen an Arzneistoffträger enthalten, um die Stabilität und Isotonizität der pharmazeutischen Zubereitung aufrecht zu erhalten. Die Herstellung der Lösungen kann nach herkömmlicher Art und Weise durchgeführt werden.

[0063] Die Erfindung wird nun mittels folgender Beispiele beschrieben.

BEISPIEL 1: Herstellung von PEG-IFN- β Konjugat

Modifikation von IFN- β mit mPEG_{5k}-OPSS

[0064] Rekombinantes humanes IFN- β , stabil bei einer Konzentration von 0,37 mg/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 3,6, wurde zur Herstellung von PEG-IFN- β -Konjugat verwendet. Es wurde etwa 1,0 ml 6 M Harnstoff zu 2 ml IFN- β mit einer Konzentration von 0,37 mg/ml (0,74 mg, $3,7 \times 10^{-8}$ Mol) gegeben. mPEG_{5k}-OPSS wurde in einem molaren Überschuss von 50 Mol zu einem Mol IFN- β zugefügt und die beiden wurden in einem Polypropylenvial entweder für 2 Stunden bei 37°C oder 1 Stunde bei 50°C zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer Kapillarelektrophoresekurve analysiert, um das Ausmaß der PEG-IFN- β -Konjugatbildung durch die PEGylierungsreaktion vor irgendeiner Reinigung zu bestimmen ([Fig. 1](#)). Eine typische Ausbeute für diese Reaktion ist 50 % PEG-IFN- β . Die Reaktionsprodukte wurden vom Reaktionsgemisch mit einem 0,22 mm Syringe-Filter abfiltriert und die filtrierte Lösung dann auf eine Größenausschlussäule geladen (entweder Superose 12 oder Superdex 75, Pharmacia) und mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,0 eluiert. [Fig. 2A](#) zeigt das Elutionsprofil der Aufreinigung des PEG-IFN- β -Konjugats auf einer Superose 12 Größenausschlusschromatographiesäule. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE ([Fig. 3](#)) analysiert. Die PEG-IFN- β -konjugathaltigen Fraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und dann dieselbe Größenausschlussäule wieder beladen, um das PEG-IFN- β -Konjugat wegen der engen Nähe des "nativen" IFN- β -Peaks weiter aufzureinigen ([Fig. 2B](#)). Diese Prozedur wurde wiederholt (drei Durchläufe), um die Reinheit zu gewährleisten ([Fig. 2C](#)). [Fig. 4](#) und [Fig. 5](#) zeigen die Kapillarelektrophoresekurve und das entsprechende MALDI-MS-Spektrum der gereinigten PEG-IFN- β -Konjugate.

Modifikation von IFN- β mit mPEG_{30k}-OPSS

[0065] Das zur Verfügung gestellte rekombinante humane IFN- β ist stabil in Lösung von 0,36 mg/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 3,6. Es wurden etwa 36 mg mPEG_{30k}-OPSS in 3 ml deionisiertem H₂O zu 3 ml IFN- β mit 0,36 mg/ml (1,08 mg, $4,9 \times 10^{-8}$ Mol) gegeben und die zwei wurden in einem Polypropylenvial für 2 Stunden bei 50°C zur Reaktion gebracht. Das Reaktionsgemisch wurde mit Kapillarelektrophorese auf das Ausmaß an Modifikation hin analysiert. Typische Ausbeuten für diese Reaktion sind < 30 %. Die Lösung wurde dann auf eine Größenausschlussäule geladen (Superose 12, Pharmacia) und mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,0 eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE auf ihren Gehalt hin analysiert.

BEISPIEL 2: Biologische Aktivität des PEG-IFN- β -Konjugats

[0066] Um die Auswirkung der PEGylierung auf die antivirale Aktivität von humanem rekombinanten IFN- β zu beurteilen, wurden humane amniotische WISH-Zellen entweder mit frisch zubereitetem IFN- β (dasselbe Lot wie zur PEGylierung verwendet wurde) oder mit PEG-IFN- β -Konjugat vorinkubiert. Die IFN- β vermittelte antivirale Aktivität, wurde mittels cytopathischem WISH-VSV-Assay gemessen und wurde nach einem antiviralen WISH-Bioassay bestimmt, der basierend auf dem Protokoll von Novick et al., J. Immunol., 129:2244-2247 (1982) entwickelt wurde. Die Materialien, die in diesem WISH-Assay verwendet wurden, sind folgende:

WISH-Zellen (ATCC CCL 25)

Veskulare Stomatitis Virusstämme (ATCC V-520-001-522), gelagert bei -70°C IFN- β , human, rekombinant, InterPharm Laboratories LTD (32.075-Typ, Batch # 205035), 82×10^6 IU/ml, spezifische Aktivität: 222×10^6 IU/mg

PEG-IFN- β -Konjugat wie in Beispiel 1 hergestellt und in PBS pH 7,4 gehalten.

WISH-Wachstumsmedium (MEM Hochglukose mit Earl-Salzen + 10 % FBS + 1,0 % L-Glutamin + Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 μ g/ml)

WISH-Assaymedium (MEM Hochglukose mit Earl-Salzen + 5 % FBS + 1,0 % L-Glutamin + Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 μ g/ml)

MTT mit 5 mg/ml in PBS, gelagert bei -70°C.

[0067] Das Protokoll für den WISH-Assay ist folgendermaßen:

Verdünne die IFN- β -Proben auf zweimal der Startkonzentration in WISH-Assaymedium.

Stelle Dreifachverdünnungen der IFN- β -Proben in WISH-Assaymedium in flachbödigen 96-Well Platten her, so dass jedes Well 50 μ l der verdünnten IFN- β -Probe enthält (einige Kontrollwells erhalten nur 50 μ l des WISH-Assaymediums).

Geerntete WISH-Zellen in logarithmischer Wachstumsphase mit Trypsin/EDTA Lösung, in WISH-Assaymedium waschen und auf eine Endkonzentration von $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml bringen.

50 μ l WISH-Zellsuspension (4×10^4 Zellen pro Well) zu jedem Well hinzufügen. Endkonzentration von IFN- β , denen die Zellen ausgesetzt sind, ist jetzt 1X.

[0068] Nach 24stündiger Inkubation in einem 5 % CO₂ befeuchtetem Inkubator wird zu allen Wells mit Ausnahme der Nicht-Virus-Kontrollwells (diese erhalten nur dasselbe Volumen des Assaymediums), 50 μ l einer 1:10 Verdünnung (in WISH-Assaymedium) des VSV-Stamm (eine Dosis die voreingestellt ist, 100 Prozent WISH Zellen innerhalb 48 Stunden zu lysieren) hinzugefügt.

[0069] Nach weiteren 48 Stunden wird 25 μ l MTT-Lösung zu den Wells hinzugegeben, und die Platten danach weitere 2 Stunden im Inkubator inkubiert.

[0070] Der Inhalt der Wells wurde durch Herumdrehen der Platten entfernt und 200 μ l 100 % Ethanol zu den Wells hinzugegeben.

[0071] Nach 1 Stunde wurden die Platten bei 595 nm unter Verwendung des Soft max Pro-Softwarepakets und einem Spectramax Spektrophotometersystems (Molecular Devices) gemessen.

Tabelle 1. Antivirale Aktivität der PEGylierten und Mock-PEGylierten IFN-beta Proben

IFN-beta Probe*	EC ₅₀ **
PEG-IFN- β -Konjugat	3,9 +/- 0,7 pg/ml
IFN- β	16,4 +/- 1,0 pg/ml

* Stammkonzentrationen von IFN- β in Proben, bestimmt durch Aminosäureanalyse.

** EC₅₀ (+/- S.D.) wurde bestimmt mit dem Softwareprogramm Microcal Origin 4.1

[0072] Wie in [Fig. 6](#) und Tabelle 1 oben gezeigt, hielt das PEG-IFN- β -Konjugat ein Ausmaß an antiviraler Aktivität bei, das dem von frisch zubereitetem IFN- β eines parenteralen Lots überlegen ist.

[0073] Die Beobachtung, dass das PEG-IFN- β -Konjugat eine etwa 4-fach höhere Bioaktivität als frisch hergestelltes IFN- β aufweist, kann auch eine Konsequenz der erhöhten Stabilität des PEG-IFN- β -Konjugates im Hinblick auf das "native" IFN- β nach Zugabe des WISH-Zellassaymediums sein.

BEISPIEL 3: In vitro-Assays der relativen Aktivität von PEG-IFN-Proben

[0074] Die relative Bioaktivität von PEG[30 kD]-IFN- β und PEG[2 \times 20 kD]-IFN- β wurde mittels WISH-Assay unter Verwendung des Standardprotokolls wie in Beispiel 2 beschrieben bestimmt (Tabelle 2). Drei unabhängige Assays wurden mittels drei verschiedenen Individuen bei verschiedenen Zeiten durchgeführt.

Tabelle 2. Relative antivirale Aktivität der PEG-IFN- β

Probe	Relative Interferon Aktivität* (von drei Studien)			
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Durchschnitt (S.D.)
PEG[30 kD]-IFN- β	3,2 x höher	3,1 x höher	1,8 x höher	3,0 x (0,78) höher
PEG[2 x 20 kD]-IFN- β	4,2 x höher	1,3 x höher	0,85 x höher	2,1 x (1,8) höher

* EC₅₀ Dosen verglichen mit Standard-IFN- β das in jedem Assay enthalten ist.

** Vergleich basierend auf einer INF- β -Konzentration mit 330 ug/ml. Stammkonzentrationen mit PEG[30 kD]-IFN- β (5,41 ug/ml) und PEG[2 x 20 kD]-IFN- β (6,86 ug/ml) wurde mittels AAA bestimmt.

[0075] Die Bindung von PEG-IFN- β an seinem Rezeptor auf den Zellen wurde in Gegenwart einer bestimmten Menge an ¹²⁵I-IFN- α 2a evaluiert. IFN- α 2a wurde radiomarkiert mit ¹²⁵I unter Verwendung der ChloraminT-Methode. Das ¹²⁵I-gebundene IFN- α 2a wurde von freiem Iod entfernt, indem man die Reaktanden durch eine Sephadex G25-Säule laufen läßt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt (Pharmacia). ¹²⁵I-IFN- α 2a wurde mittels einem IFN- α 2a ELISA-Assay quantifiziert (Biosource, USA) und die spezifische Aktivität bestimmt. Daudi-Zellen, gewachsen in der exponentiellen Wachstumsphase, wurden geerntet und 2×10^6 Zellen mit 0,5 nM ¹²⁵I-IFN- α 2a für 3 Stunden bei Raumtemperatur in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an PEG-IFN- β oder IFN- α 2a, verdünnt im Assaypuffer, der RPMI 1640 ist, enthaltend 2 % fötales Rinderserum und 0,1 % Natriumazid inkubiert. Die Zellen wurden am Ende der Inkubation durch eine Lage Phthalatöl gedreht und die an diese Zellen gebundene Radioaktivität in einem Gammacounter gezählt. Darüber hinaus war die Bindung von PEG[30kD]-IFN- β und PEG[2 x 20 kD]-IFN- β am Rezeptor sehr ähnlich oder nahe der Bindungsaktivität von IFN- β wie in [Fig. 7](#) gezeigt.

[0076] Die relative Aktivität wurde zusätzlich in einem Daudi-Zellen-Antiproliferationsassay (humane Lymphoma B Zellen) bestimmt (Tabelle 3). Alle IFNs wurden bei einer $2 \times$ Konzentration von 200 ng/ml gemacht. Die Proben wurden die Länge der Platte hinunter dreifach auf ein Endvolumen von 100 ul verdünnt. 1×10^5 Zellen/Well (100 μ ls) wurde zu jedem Well hinzugefügt und für insgesamt 72 Stunden bei 37°C im CO₂ befeuchteten Inkubator inkubiert. Nach 48 Stunden wurde tritiiertes (³H) Thymidin auf 1 μ Ci/Well in 20 ul hinzugefügt. Am Ende der 72-Stunden-Inkubation wurden die Platten mit einem Tomtek Plate Harvester geerntet. Die in Tabelle 3 gezeigten Ergebnisse zeigen, dass durch die PEGylierung kein detektierbarer Verlust an IFN-Aktivität beobachtet wurde.

[0077] Tatsächlich wurde gefunden, dass die Aktivität etwas höher ist als von freiem IFN- β . Dies kann auf die Bildung von inaktiven Aggregaten im freien IFN oder auf Unterschiede in den Quantifizierungsmethoden zurückzuführen sein (Aminosäureanalyse für PEG-IFN-Proben und RP-HPLC für IFN- β).

Tabelle 3. Daudi-Antiproliferationsassay

	IC ₅₀ Dosis*	-facher Anstieg gegen IFN
IFN- β (Platte 1)	1153,1	--
PEG[30kD]-IFN (71 A)	695,6	1,6 x
IFN- β (Platte 2)	1005,8	--
PEG[40kD]-IFN (71 B)	629,4	1,7 x

* pg/ml

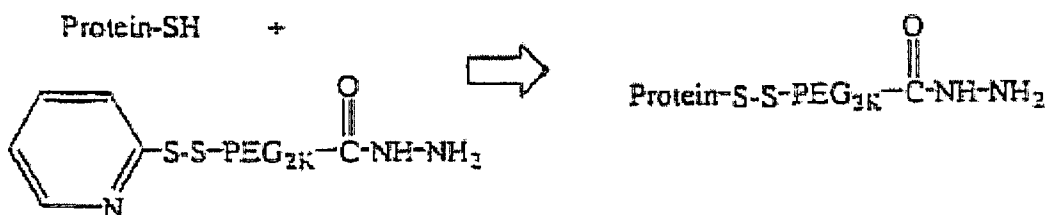
BEISPIEL 4: Pharmakokinetische Studien in Mäusen Intravenöse Verabreichung

[0078] Mäuse wurden mit 100 ng IFN- β injiziert, PEG[30kD]-IFN- β oder PEG[2 \times 20 kD]-IFN- β und Blut wurden nach angegebenen Zeiten entfernt. Die Serumkonzentrationen von IFN- β wurden mittels IFN- β -spezifischen ELISAS (Toray Industries) bestimmt und die Ergebnisse sind in [Fig. 8](#) gezeigt. Achtundzwanzig weibliche B6D2F1-Stamm Mäuse (6–8 Wochen) (etwa 20 g jede) wurden in vier Gruppen wie folgt aufgeteilt: Gruppe 1 enthielt neun Mäuse, die mit 200 μ l einfachem Bolus von 500 ng/ml humanem IFN- β (Endkonzentration von 100 ng/Maus) injiziert wurden; Gruppe 2 (neun Mäuse) erhielt 200 μ l einer äquivalenten Masse an PEG30kD-IFN- β ; Gruppe 3 erhielt 200 μ l einer äquivalenten Masse von PEG(2 \times 20 kD)-IFN- β ; und Gruppe 4 ist eine Gruppe von drei nicht-injizierten Mäusen, die als Negativkontrolle dienten. Die Blutproben (etwa 200 μ l/Probe) wurden zu neun angegebenen Zeitpunkten durch Unterbrechung des retroorbitalen Venengeflechts mit einem Kapillarrohr gesammelt. Die Blutproben ließ man 1 Stunde bei Raumtemperatur gerinnen, dann wurden sie abdekantiert und mikrozentrifugiert. Davon abgetrennte Seren wurden bei -70°C gelagert bis alle Proben gesammelt waren. Die Seren wurden auf Anwesenheit des bioaktiven humanen IFN- β s hin unter Verwendung des Toray Assays untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Fläche unter der Kurve (AUC) in den PEG-IFN-Proben sichtbar verstärkt ist gegenüber freiem IFN-beta, und dass PEG-IFN-Proben gegenüber freiem IFN- β , und dass PEG[2 \times 20 kD]-IFN- β gegenüber PEG[30 kD]-IFN- β überlegen ist.

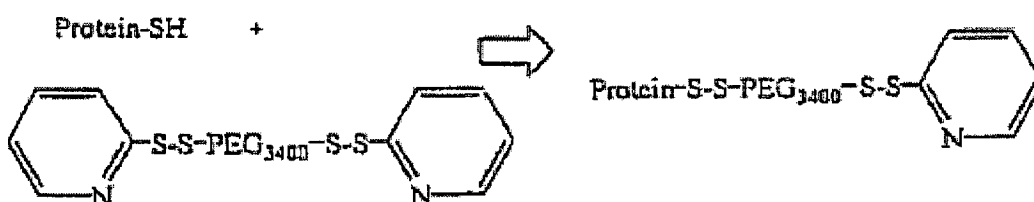
Subkutane Verabreichung

[0079] Mäusen wurde subkutan IFN- β und PEG-IFN (100 ng/Maus) injiziert. [Fig. 9](#) zeigt, dass die Gesamtfläche unter der Kurve (AUC) für die PEG-IFN-Proben im Vergleich zu freiem IFN- β dramatisch erhöht ist. Die pharmakokinetischen Studien stehen im Einklang mit den PEG-IFN Proben, die eine längere Halbwertszeit und eine erhöhte AUC aufweisen.

Beispiel 5: Anknüpfung von niedermolekulargewichtigen PEG-Teil an ein Polypeptid

Versehen von Interferon-beta mit OPSS-PEG_{2k}-Hydrazid

[0080] Rekombinantes humanes Interferon- β wurde in Lösung mit 0,33 mg/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 3,8 bereitgestellt. Etwa 3,6 mg (40 Molüberschuss zu den Proteinmolen) des heterobifunktionellen PEG-Reagenzes, OPSS-PEG_{2k}-Hydrazid in 2 ml deionisiertem Wasser wurde zu 3 ml IFN- β mit 0,33 mg/ml (0,99 mg) hinzugefügt und die beiden wurden in einem Polypropylenvial für 1 Stunde bei 45°C reagieren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde dann mittels Kapillarelektrophorese analysiert, um das Ausmaß der Modifikation zu bestimmen. Typische Ausbeuten reichten von 90 bis 97 %, und waren von der Reinheit des Interferon- β und des PEG-Reagenzes abhängig. Die Lösung wurde anschließend auf eine Größenausschlussssäule geladen (Superdex 75, Pharmacia) und mit 5 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,0 eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE analysiert. Die monoPEGylierten Interferon- β -Fraktionen wurden vereinigt und in einem weiteren Modifikationsschritt mit hochmolekulargewichtigem PEG verwendet.

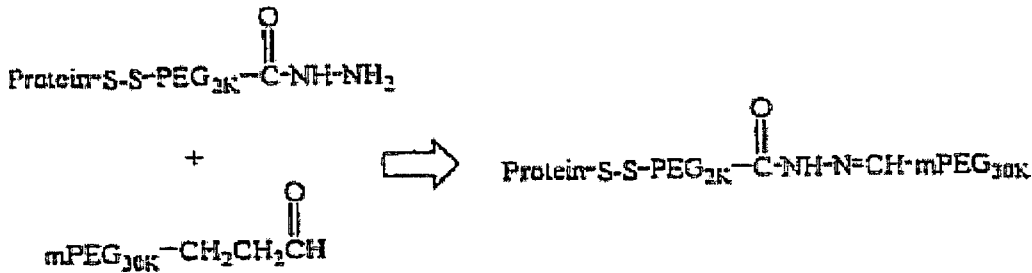
Versehen von Interferon- β mit (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀

[0081] Rekombinantes humanes Interferon- β wurde in Lösung mit 0,33 mg/ml in 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 3,8 bereitgestellt. Etwa 6,1 mg (40 Molüberschuss zu den Proteinmolen) des monobifunktionellen PEG-Reagenzes, (OPSS)₂-PEG₃₄₀₀, in 2 ml deionisiertem Wasser wurde zu 3 ml Interferon- β mit 0,33 mg/ml (0,99 mg) hinzugefügt und die zwei wurden in einem Polypropylenvial für 2 Stunden bei 50°C reagieren gelassen. Die

Reaktion wurde mit nicht-reduzierender SDS-PAGE überwacht und das Endreaktionsgemisch mit Kapillarelektrophorese analysiert, um das Ausmaß der Modifikation zu bestimmen. Typische Modifikationen für die Reaktion mit Interferon- β betragen > 95 %. Die Lösung wurde dann auf eine Größenausschluss säule geladen (Superdex 75, Pharmacia) und mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, 150 mM NaCl, pH 7,0 eluiert. Die Peaks wurden gesammelt und mit SDS-PAGE auf ihrem Gehalt hin analysiert. Die monoPEGylierten Interferon β -Fraktionen wurden vereinigt.

BEISPIEL 6: Anknüpfung des zweiten PEG Teils an niedermolekulargewichtiges PEGyliertes Polypeptid

Modifikation von IFN-S-S-PEG_{2k}-Hydrazid mit mPEG_{30k}-Aldehyd (ALD)



[0082] Zu den vereinigten IFN-S-S-PEG_{2k}-Hydrazidfraktionen in Beispiel 5 wurde mPEG_{30k}-ALD in einem 20 molaren Überschuss zum Protein hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (25°C) für 4 Stunden durchgeführt und die Probe zu einer Größenausschluss säule hinzugefügt (Superose 6, Pharmacia), um die Modifikationsausbeute zu bestimmen. Die Modifikationsausbeute dieser Reaktion war typischerweise > 80 %, abhängig von der Reinheit des PEG-Reagenzes und der Reaktionsbedingungen. Nachdem die Erfindung nun vollständig beschrieben wurde, soll nun gewürdigt werden, dass dasselbe von einem Fachmann in einem weiten Bereich von äquivalenten Parametern, Konzentrationen und Bedingungen durchgeführt werden kann, ohne vom Geist und Umfang der vorliegenden Erfindung abzuweichen und ohne übermäßige Experimente durchführen zu müssen. Während die Erfindung im Zusammenhang mit spezifischen Ausführungsformen beschrieben wurde, soll sie so verstanden werden, dass sie auch weiteren Modifikationen zugänglich ist. Es ist beabsichtigt, dass diese Anmeldung im allgemeinen jegliche Variationen, Verwendungen oder Anpassungen an nachfolgende Erfindungen abdeckt, das Prinzip der Erfindung und solche Ausgangspunkte von der vorliegenden Offenbarung einschließt, welche zur bekannten oder üblichen Praxis innerhalb des Gebiets angehören, zu der die Erfindung gehört und die auf die hierin dargelegten essentiellen Merkmale angewendet werden kann, wie aus dem Umfang der beigefügten Ansprüche folgt.

[0083] Alle hierin zitierten Literaturverweise, einschließlich Zeitschriften, Artikel oder Abstracts, veröffentlichte oder unveröffentlichte US- oder ausländische Patentanmeldungen, eingereichte US- oder ausländische Patente, oder irgendwelche andere Referenzen, sind hierin durch die Literaturverweise vollständig inkorporiert, einschließlich aller Daten, Tabellen, Figuren und Texten, die in den zitierten Literaturverweisen vorliegen. Zusätzlich wird der volle Umfang der zitierten Literaturverweise in den der hierin zitierten Literaturverweisen ebenso vollständig durch Bezugnahme inkorporiert.

[0084] Bezugnahme auf bekannte Verfahrensschritte, konventionelle Verfahrensschritte, bekannte Verfahren oder konventionelle Verfahren ist in keinerlei Weise ein Zugeständnis, dass irgendein Aspekt, Beschreibung oder Ausführungsform der vorliegenden Erfindung in dem relevanten Gebiet offenbart, gelehrt oder vorgeschlagen wird.

[0085] Die vorangehende Beschreibung der spezifischen Ausführungsformen wird die allgemeine Natur der Erfindung so vollständig offenbaren, dass andere durch Anwendung dieser Kenntnis innerhalb des Fachgebietes, (einschließlich des Inhalts der hierin zitierten Literaturverweise), verschiedene Anwendungen dieser spezifischen Ausführungsform ohne übermäßige Experimente einfach modifizieren und/oder adaptieren können, ohne das allgemeine Konzept der vorliegenden Erfindung zu verlassen. Deshalb wird beabsichtigt, dass solche Anpassungen und Modifikationen innerhalb des Bedeutungs- und des Äquivalenzbereichs der offenbarten Ausführungsformen liegen, basierend auf der Lehre und den Anleitungen, die hierin präsentiert wurden. Es soll so verstanden werden, dass die Satzgebung und Terminologie hierbei zum Zweck der Beschreibung und nicht einschränkend ist, wie die Terminologie und Satzgebung der vorliegenden Beschreibung durch einen Fachmann im Lichte der hierin vorliegenden Lehre und Anleitung, ausgelegt werden wird, in Kombination mit dem Fachwissen eines gewöhnlichen Fachmanns.

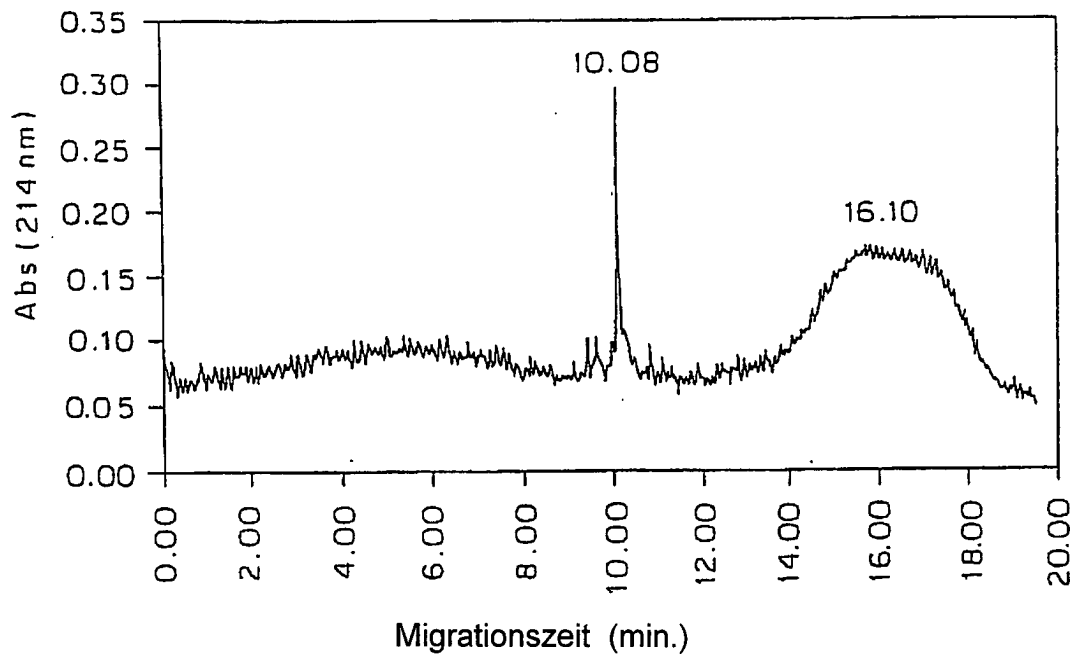
Patentansprüche

1. Polyol-Interferon- β -Konjugat, das einen Polyolteil aufweist, der kovalent an Cys¹⁷ von humanem Interferon- β gebunden ist.
2. Polyol-Interferon- β -Konjugat gemäß Anspruch 1, wobei besagter Polyolteil ein Polyalkylenglykolteil ist.
3. Polyol-Interferon- β -Konjugat gemäß Anspruch 2, wobei besagter Polyalkylenglykolteil ein Polyethylenglykolteil (PEG) ist.
4. Polyol-Interferon- β -Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Polyol-Interferon- β -Konjugat dieselbe oder eine höhere Interferon- β -Aktivität als natives humanes Interferon- β aufweist.
5. Verfahren zur Herstellung des Polyol-Interferon- β -Konjugats gemäß Anspruch 1, umfassend die Schritte:
zur Reaktion bringen von Interferon- β mit einem thiolreaktiven Polyolagens, um einen Polyolteil seitenspezifisch und kovalent an Cys¹⁷ von humanem Interferon- β anzubinden, um auf diese Weise ein Polyol-Interferon- β -Konjugat herzustellen; und
Gewinnen des hergestellten Polyol-Interferon- β -Konjugats.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei das thiolreaktive Polyolagens ein thiolreaktives PEG-ylierungs-Agens ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das thiolreaktive Polyolagens monomethoxyliert ist.
8. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das thiolreaktive Polyolagens bifunktionell ist.
9. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das thiolreaktive Polyolagens ein Polyolderivat ist, das eine funktionelle Gruppe, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Orthopyridyldisulfid, Vinylsulfon, Maleimid, und Iodacetimid aufweist.
10. Verfahren gemäß Anspruch 5 oder 6, wobei das thiolreaktive Polyolagens ein Orthopyridyldisulfidderivat eines monomethoxylierten Polyols ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 5, wobei der Reaktionsschritt bei einem sauren pH durchgeführt wird, bei dem Interferon- β stabil ist.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein Polyol-Interferon- β -Konjugat gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 als aktiven Bestandteil, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger, Arzneistoffträger oder Hilfsstoff.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 12 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung von Infektionen, Tumoren und Autoimmun- und entzündlichen Krankheiten.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1



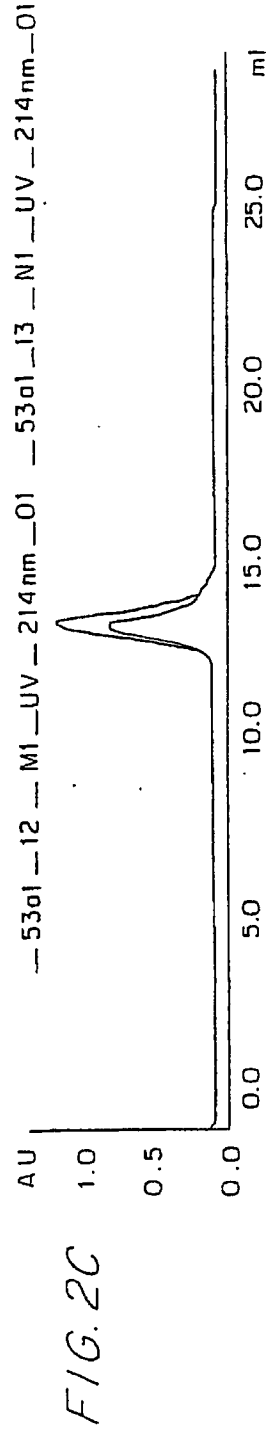
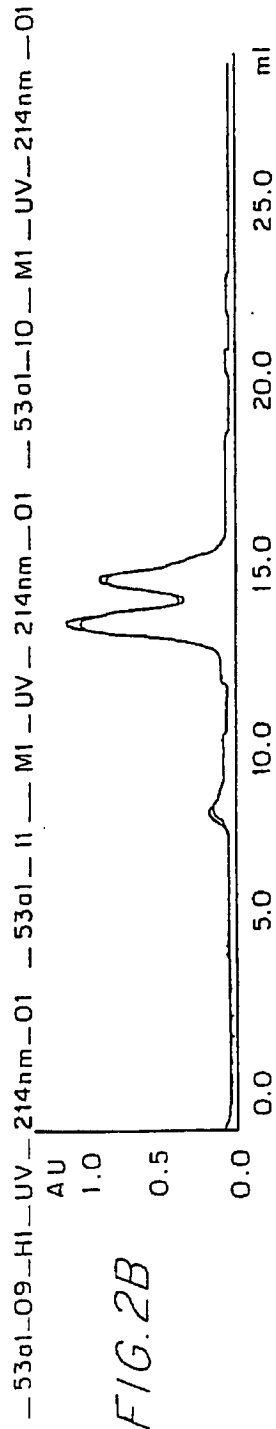
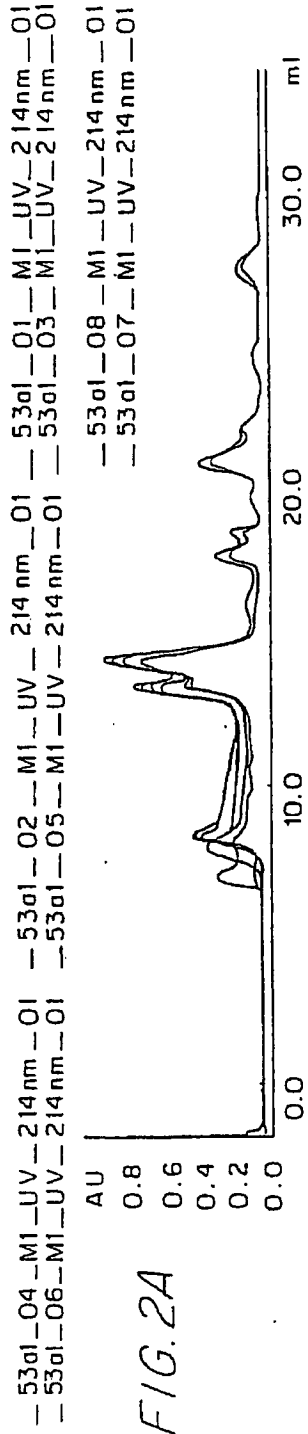


FIG. 3

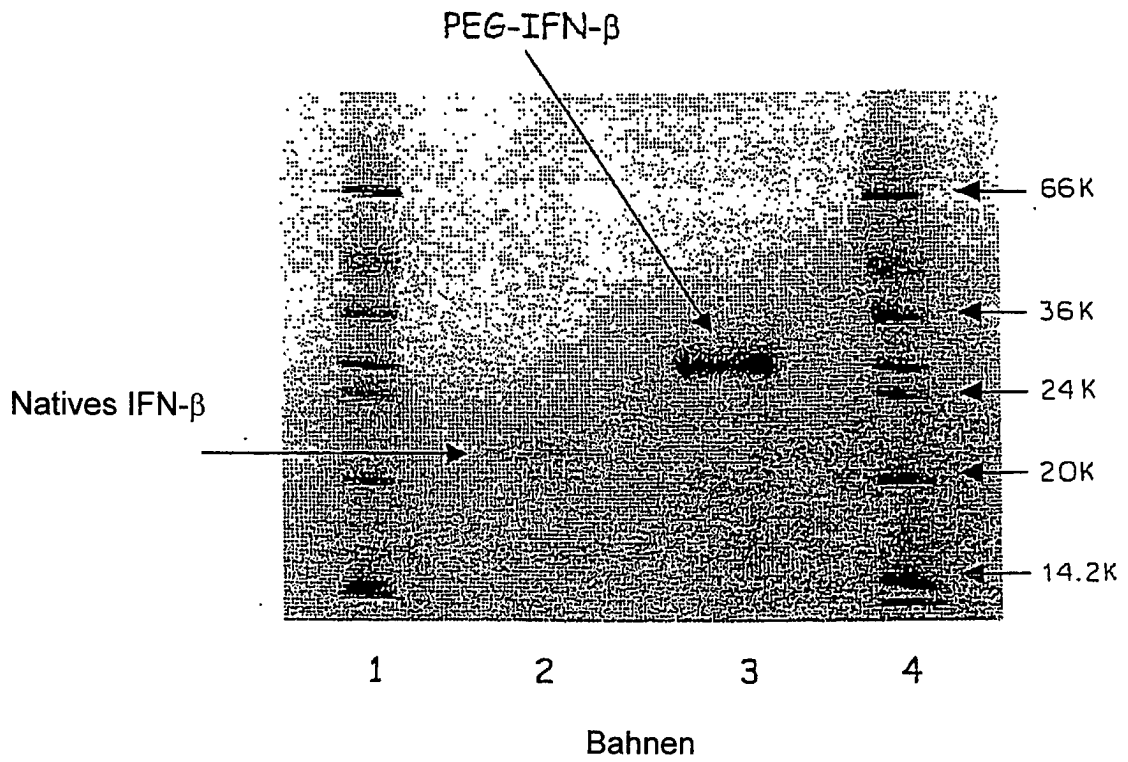
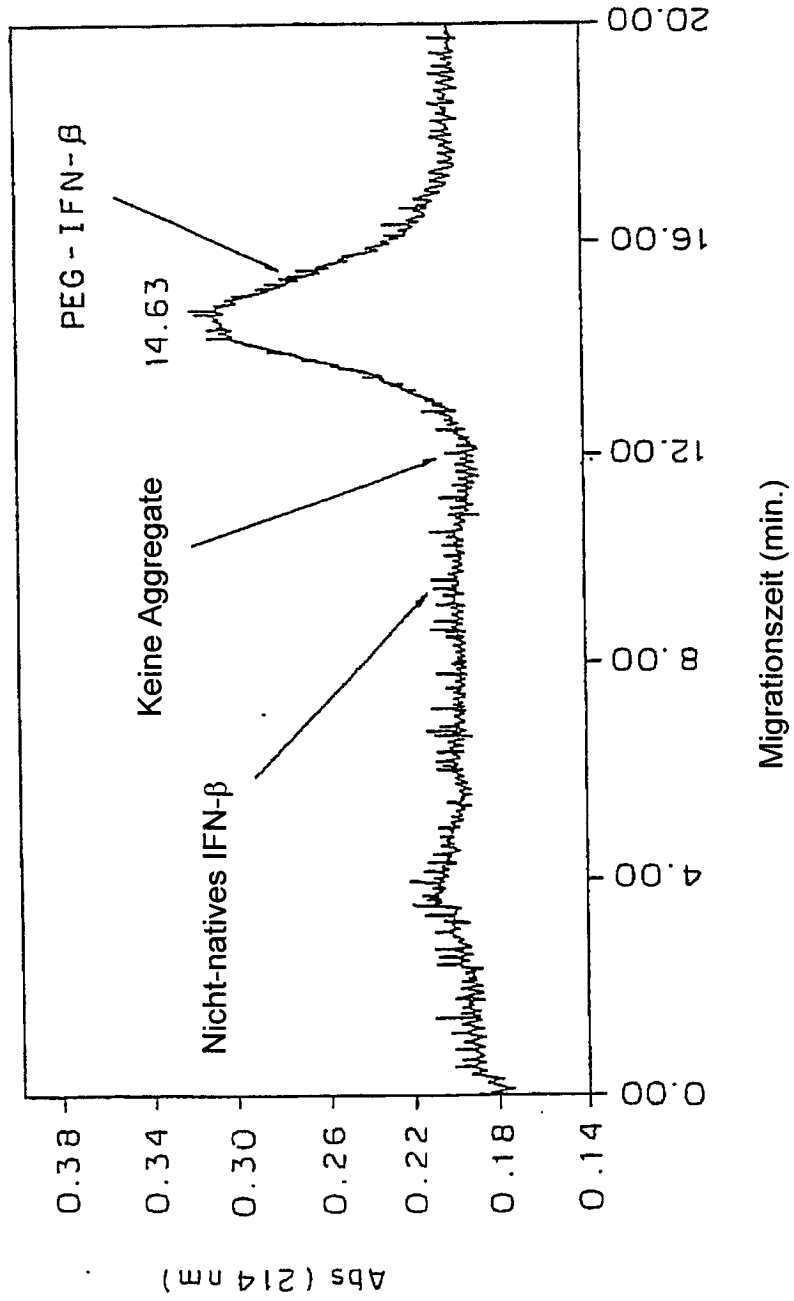


FIG. 4



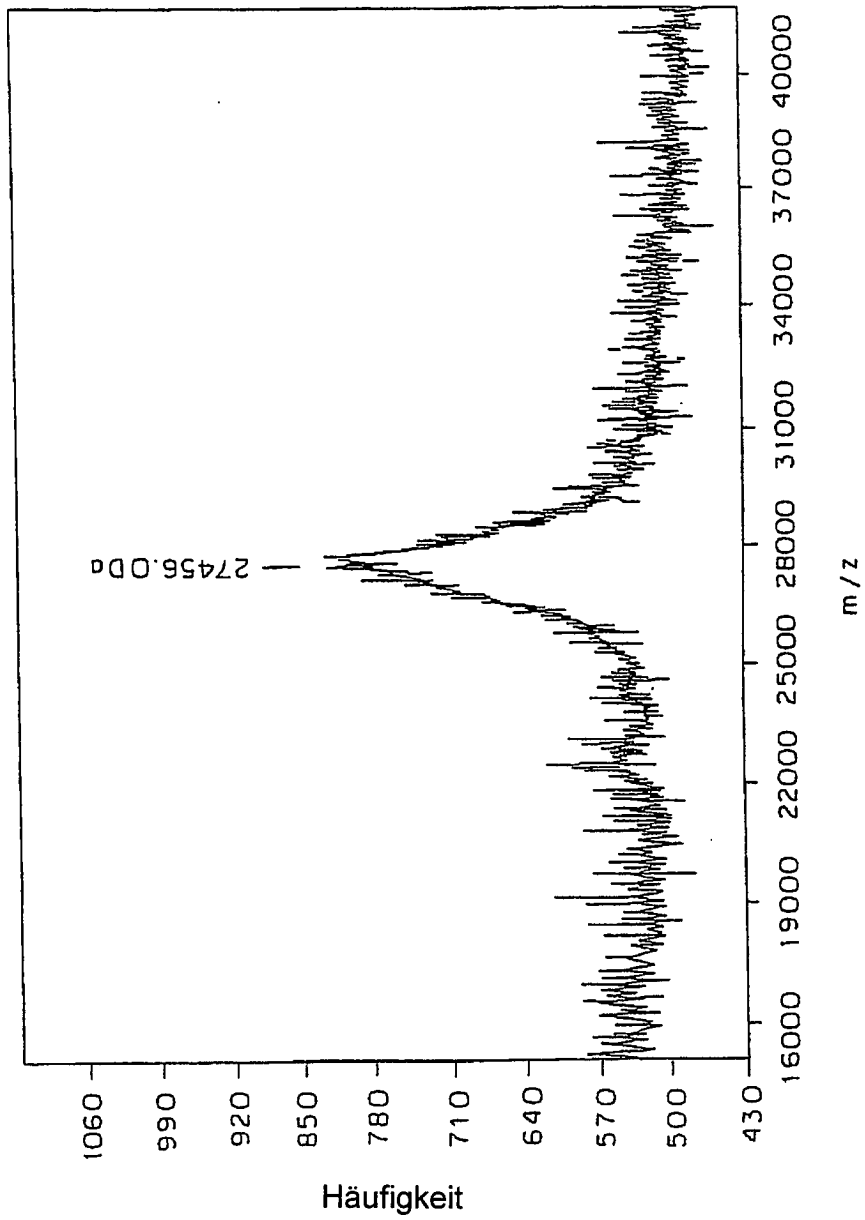


FIG. 5

FIG. 6

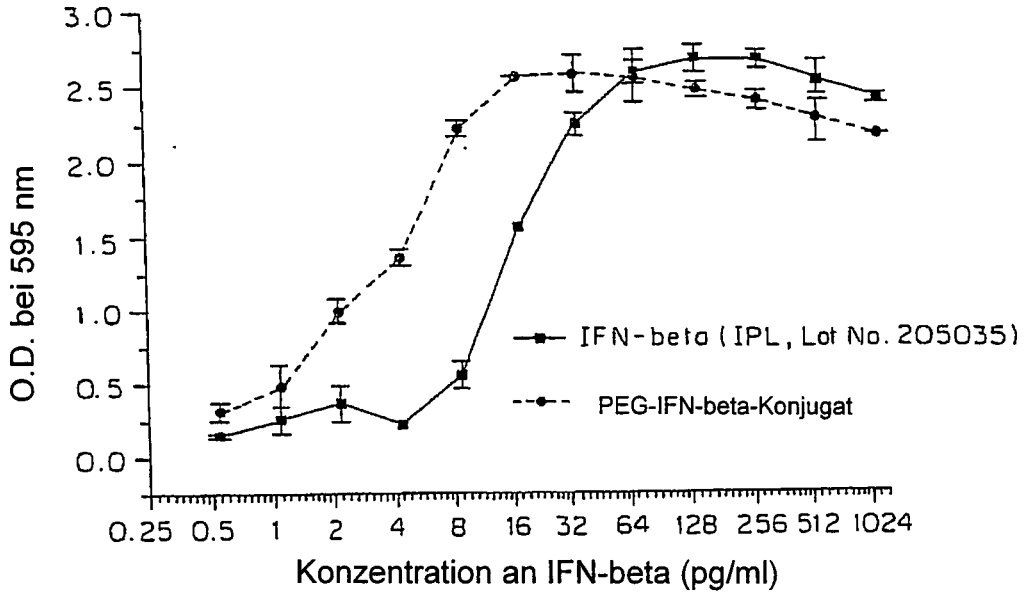


FIG. 7

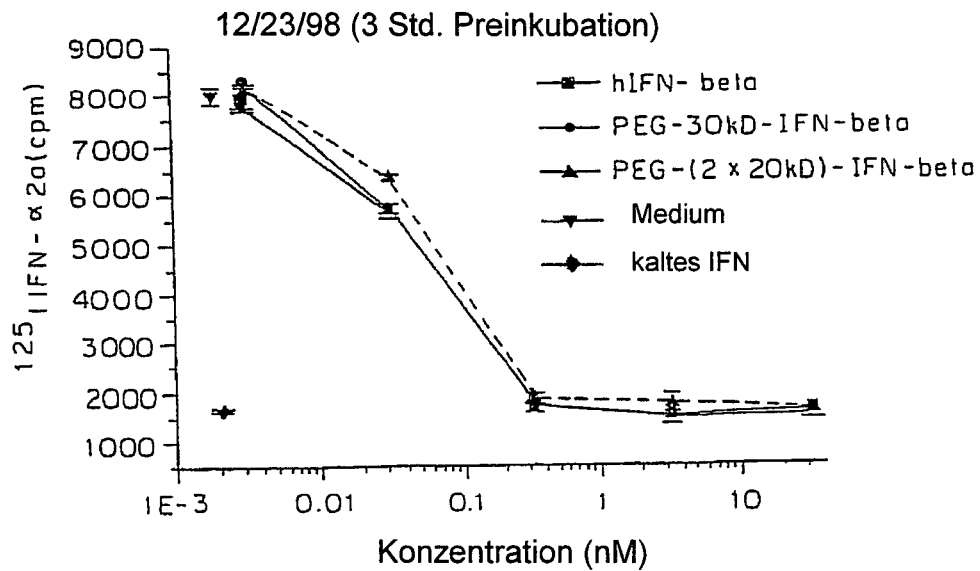


FIG. 8

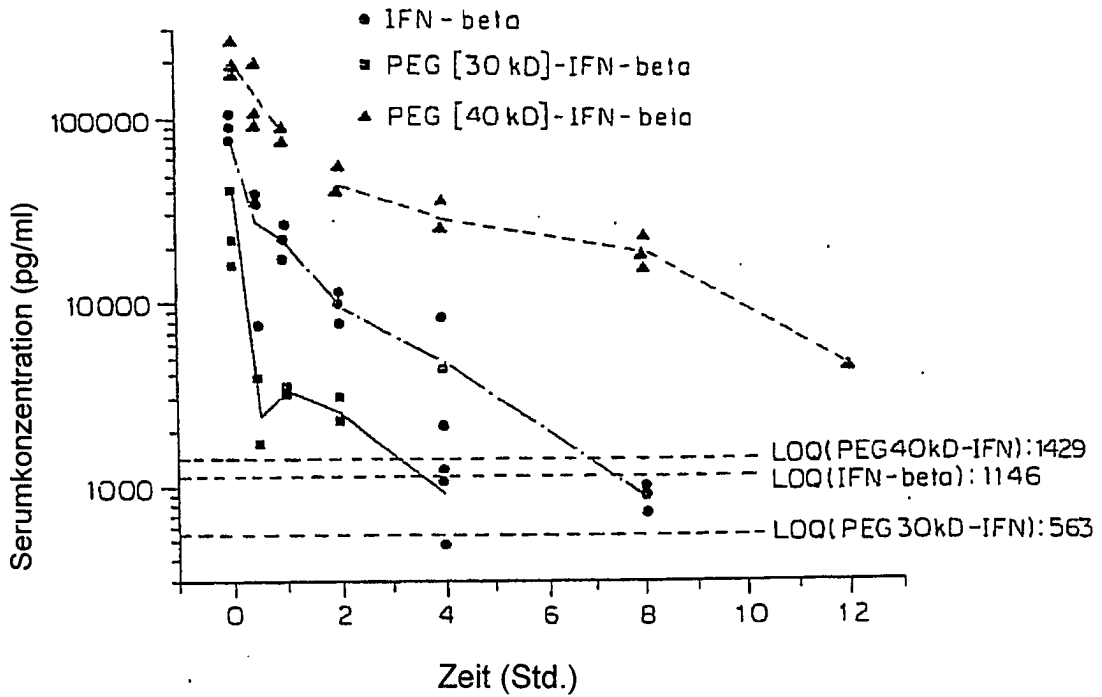


FIG. 9

