



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 21 102 T2 2006.02.02**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 062 230 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 21 102.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US99/04899**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 912 297.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/045026**

(86) PCT-Anmeldetag: **05.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **10.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.10.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.02.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C07K 1/107 (2006.01)**

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

76964 P 05.03.1998 US

(73) Patentinhaber:

Chiron Corp., Emeryville, Calif., US

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**DRUMMOND, J., Robert, Emeryville, US;
ROSENBERG, Steve, Emeryville, US**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR VERBESSERUNG DER SERUM-HALBWERTSZEIT VON BIOLOGISCH AKTIVEN MOLEKÜLEN**

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

TECHNISCHES GEBIET

[0001] Diese Erfindung betrifft im Allgemeinen die chemische Modifikation biologisch aktiver Polypeptide und betrifft insbesondere ein Verfahren zum Modifizieren biologisch aktiver Polypeptide um ihre Serum-Halbwertszeit zu verlängern.

HINTERGRUND UND FACHGEBIET

[0002] Unvorteilhafte Pharmakokinetik, wie z.B. eine kurze Serum-Halbwertszeit, kann die pharmazeutische Entwicklung vieler sonst vielversprechender Arzneimittel-Kandidaten verhindern. Die Serum-Halbwertszeit ist ein empirisches Charakteristikum eines Moleküls und muss für jedes neue potentielle Arzneimittel experimentell bestimmt werden. Beispielsweise können physiologische Clearance-Mechanismen, wie z.B. Nierenfiltration, bei niedrigen molekulargewichtigen Polypeptid-Arzneimitteln die Aufrechterhaltung therapeutischer Level eines Arzneimittels wegen der Kosten oder Häufigkeit der erforderlichen Dosierung unmöglich machen. Umgekehrt ist eine lange Serum-Halbwertszeit, bei der ein Arzneimittel oder dessen Metabolite toxische Nebenwirkungen haben, unerwünscht.

[0003] Eine mögliche Lösung für eine unerwünscht kurze Serum-Halbwertszeit eines pharmazeutischen Wirkstoffs ist, an dem Wirkstoff covalent Moleküle zu befestigen, die die Halbwertszeit verlängern können. Früher ist gezeigt worden, dass das Befestigen von Polymeren an Polypeptiden deren Serum-Halbwertszeit vergrößern kann. Siehe beispielsweise europäische Patentveröffentlichung Nr. 0442 724 A2, die "PEGylierte" Interleukin-6-Derivate (d.h., an Polyethylenglykol oder "PEG" gebundene Interleukin-Derivate), die eine verlängerte Serum-Halbwertszeit aufweisen, beschreibt. Ein Befestigen von Arzneimitteln an Polymeren ist außerdem zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit und Stabilität derselben während Lagerung und zur Reduzierung ihrer Immunogenität beschrieben worden (veröffentlichte Patentanmeldungen Nr. EP 0 539 167 A2 und WO 94/13322). Von Konjugaten von IL-2 oder Muteinen davon mit Polymeren ist außerdem berichtet worden, dass sie reduzierte Immunogenität, erhöhte Löslichkeit und vergrößerte Halbwertszeiten aufweisen (US-Patent Nrn. 5 362 852, 5 089 261, 5 281 698 und veröffentlichte Patentanmeldung Nr. WO 90/07938). Weitere Verfahren zum Herstellen eines Addukts von einem Polymer und einem biologisch aktiven Zielmolekül sind in der veröffentlichten Patentanmeldung Nr. WO 95/06058 offenbart.

[0004] Das Befestigen von Polymeren kann aber zu Abnahmen bei der Arzneimittelaktivität führen. Unvollständiges oder ungleichförmiges Befestigen führt zu einer Mischpopulation von Verbindungen, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Zusätzlich sind die aus derartigen Modifikationen resultierenden Änderungen bei den Halbwertszeiten unvorhersagbar. Beispielsweise erzeugte die Konjugation verschiedener Polyethylenglykole an IL-8, G-CSF und IL-1ra Moleküle, die eine Vielfalt von Aktivitäten und Halbwertszeiten aufwiesen (Gaertner und Offord (1996), Bioconjugate Chem. 7:38-44). Die Konjugation von IL-8 an PEG_{20kD} erzeugte keine Änderung in seiner Halbwertszeit, während die Konjugation von PEG_{20kD} an IL-1ra eine fast siebenfache Vergrößerung der Halbwertszeit ergab. Zusätzlich war das IL-8/PEG_{20kD}-Konjugat 10- bis 20fach weniger effektiv als das native Protein.

[0005] Dementsprechend wäre ein Verfahren, das dazu in der Lage ist, die Serum-Halbwertszeit eines biologisch aktiven Moleküls zu verlängern, ohne die biologische Funktion des Moleküls ernsthaft zu vermindern, hoch erwünscht.

[0006] WO 93/06132 offenbart ein Verfahren zur ortsgerichteten Modifikation von Peptiden und Proteinen, bestehend aus selektiver Oxidation eines 2-Hydroxyethylamin-Anteils um einen Aldehyd zu erzeugen, und Umsetzen der Aldehydgruppe mit einem zweiten Reagens um ein Produkt zu bilden, bei dem die relativen biologischen Eigenschaften des Peptids durch neue und nützliche Eigenschaften, verliehen durch den zweiten Wirkstoff, verstärkt sind.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0007] [Fig. 1](#) ist ein Graph, der die Plasmadisposition von PEG hul-48 in cynomologen Affen ("Cynomologous Monkeys") nach intravenöser (IV) und subkutaner (SC) (10 mg/kg) Dosierung, wie in Beispiel 4 evaluiert, veranschaulicht.

[0008] [Fig. 2](#) ist ein Graph, der den Effekt von 300 µg hul-48SR, 30 µg PEG hul-48 und Vehikel auf die Tu-

morggröße in mit menschlichen Brustkrebs MDA MB231-Zelllinien infizierten Mäusen, wie in Beispiel 6 evaluiert, zeigt.

[0009] [Fig. 3](#) ist ein Graph, der der Behandlung mit 300 µg PEG hul-48 folgenden Reduktion beim Tumorstadium, wie durch das mittlere Prostatagewicht von mit menschlichen Prostatakrebs PCR-mm2-Zellen injizierten Mäusen, gemessen, wie in Beispiel 7 evaluiert, zeigt.

[0010] [Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#) sind Graphen, die das durchschnittliche Milzgewicht bzw. Auftreten von Metastasen bei Nacktmäusen, denen in die Milz menschliche Colorektalkrebs KM12 L4A-Krebszellen injiziert worden waren, und nachfolgend mit PEG hul-48 behandelt worden waren, wie in Beispiel 8 beschrieben, zeigt.

[0011] [Fig. 5A](#) ist ein Graph, der die Anzahl sichtbarer Lebermetastasen in der Leber von Nacktmäusen, denen in die Milz menschliche Colorektalkrebs KM12 L4A-Krebszellen injiziert worden waren und die nachfolgend mit PEG hul-48-behandelt worden waren, wie in Beispiel 9 evaluiert, veranschaulicht. [Fig. 5B](#) veranschaulicht den Effekt von PEG hul-48 auf die Lebertumorlast, auch wie in Beispiel 9 evaluiert.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0012] Daher besteht im Fachgebiet ein Bedürfnis für ein Verfahren zum Modifizieren eines biologisch aktiven Polypeptids, ohne seine biologische Aktivität aufzuheben. Es besteht ein weiteres Bedürfnis im Fachgebiet, ein Verfahren zur Verlängerung der Serum-Halbwertszeit eines solchen Polypeptids bereitzustellen. Es besteht ein noch weiteres Bedürfnis für ein Verfahren zur Verlängerung der Serum-Halbwertszeit eines biologisch aktiven Polypeptids, das eine einzelne Produktart, die einheitliche biologische und pharmakokinetische Eigenschaften aufweist, herstellt.

[0013] Dementsprechend ist eine primäre Aufgabe der Erfindung, die oben beschriebenen Bedürfnisse durch Bereitstellen eines Verfahrens zur Verlängerung der Serum-Halbwertszeit eines biologisch aktiven Polypeptids zu befriedigen.

[0014] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein derartiges Verfahren, das Modifikation von für die innerhalb des Polypeptids anwesende biologische Aktivität notwendigen Stellen vermeidet, bereitzustellen.

[0015] Es ist eine zusätzliche Aufgabe der Erfindung, ein derartiges Verfahren, wobei das Polypeptid "PEGyliert", d.h. an PEG, beispielsweise durch Reaktion eines PEG-Hydrazids mit einem Aldehyd-Anteil, der am Endterminus des Polypeptids vorliegt, gekoppelt ist, bereitzustellen.

[0016] Es ist eine noch andere Aufgabe der Erfindung, ein derartiges Verfahren, wobei die Serum-Halbwertszeit des Polypeptids durch ortsspezifisches Befestigen eines Polymers, wie z.B. Polyethylenglykol, an den Endterminus der Polypeptidkette verlängert wird, bereitzustellen.

[0017] Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein modifiziertes Polypeptid, das eine längere Serum-Halbwertszeit als das native Polypeptid aufweist, bereitzustellen.

[0018] Es ist eine noch andere Aufgabe der Erfindung, eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein Konjugat eines Polymers und eines biologisch aktiven Polypeptids in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipients umfasst, bereitzustellen.

[0019] Zusätzliche Aufgaben, Vorteile und neue Eigenschaften der Erfindung werden teilweise in der folgenden Beschreibung dargelegt und teilweise dem Fachmann bei Untersuchung des Folgenden offenkundig werden, oder können durch die Praxis der Erfindung gelernt werden.

[0020] In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven Polypeptids, das eine erhöhte Serum-Halbwertszeit aufweist, umfassend Koppeln des Polypeptids an ein Polymer durch Umsetzen einer Aldehydfunktionalität auf dem Polypeptid mit einer Hydrazid- oder Semicarbazid-Gruppe auf dem Polymer unter Reaktionsbedingungen, die zur Begünstigung einer Bildung eines konjugierten Polypeptids wirksam sind, wobei das Polypeptid über eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an das Polymer gebunden wird.

[0021] Das Verfahren schließt Binden des Polypeptids an ein Polymer, wie z.B. Polyethylenglykol, z.B. durch Umsetzen einer Hydrazid-aktivierten Form von Polyethylenglykol (hierin als "Polyethylenglykolhydrazid" oder

"PEG-Hydrazid" bezeichnet) mit einem auf dem Polypeptid anwesenden Aldehyd-Anteil, ein. Der Aldehyd-Anteil ist am Endterminus eingebracht und kann durch oxidative Spaltung bei angrenzenden Hydroxyl- und Amino-Gruppen, gefunden in N-terminalen Serien oder Trioninresten, erzeugt werden.

[0022] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein modifiziertes Polypeptid, umfassend ein biologisch aktives Polypeptid, das über eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an ein pharmazeutisch annehmbares Polymer konjugiert ist, wobei das modifizierte Polypeptid eine proportionale Zunahme bei der Serum-Halbwertszeit in einem Individuum aufweist, die größer als irgendeine proportionale Abnahme bei seiner biologischen Aktivität ist, aufweist. Vorzugsweise ist das modifizierte Polypeptid ein an Polyethylenglykol konjugiertes Polypeptid. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Polypeptid menschliche Urokinase oder ein Fragment davon, z.B. uPA₁₋₄₈.

[0023] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Verfahren zum Herstellen eines Konjugats der epidermalen Wachstumsfaktor-("EGF-") ähnlichen uPA-Domäne, insbesondere uPA₁₋₄₈, bereitgestellt.

[0024] In einer noch anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein Konjugat von uPA₁₋₄₈ bereitgestellt, das zum Inhibieren der mitogenen Aktivität von uPA in Krebszellen verwendbar ist.

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt außerdem in einer anderen Ausführungsform eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein erfindungsgemäßes modifiziertes Polypeptid in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipients bereit.

[0026] In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung die Verwendung eines Konjugats von uPA₁₋₄₈ und einem pharmazeutisch annehmbaren Polymer bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung einer uPA-vermittelten Krankheit oder einer uPA-Rezeptor-vermittelten Krankheit, wobei das uPA₁₋₄₈ über eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an das Polymer konjugiert ist, bereit. Ein derartiges Konjugat kann insbesondere zur Behandlung von Krebs und Metastasen verwendet werden.

MODI ZUM AUSFÜHREN DER ERFINDUNG

[0027] Überblick und Definitionen:

Bevor die vorliegende Erfindung im Detail beschrieben wird, soll verstanden werden, dass diese Erfindung nicht auf spezifische Zusammensetzungen, Bestandteile oder Verfahrensschritte beschränkt ist, weil dergleichen variieren können. Es soll außerdem verstanden werden, dass die hierin verwendete Terminologie nur zum Zwecke des Beschreibens bestimmter Ausführungsformen ist, und nicht beabsichtigt ist, limitierend zu sein.

[0028] Es muss beachtet werden, dass die Singularformen "ein(e)" und "der/die/das", wie in dieser Beschreibung und den angehängten Ansprüchen verwendet, Pluralreferenzen einschließen, wenn der Kontext nicht klar etwas anderes vorschreibt. Folglich schließt beispielsweise die Bezugnahme auf "ein Molekül" eine Vielzahl von Molekülen und/oder eine Mischung verschiedener Moleküle ein, die Bezugnahme auf "ein Polypeptidkonjugat" schließt eine Vielzahl von Polypeptidkonjugaten und/oder eine Mischung verschiedener solcher Konjugate ein, und dergleichen.

[0029] Beim Beschreiben und Beanspruchen der vorliegenden Erfindung wird die folgende Terminologie gemäß den unten dargelegten Definitionen verwendet werden.

[0030] Die Ausdrücke "uPA" und "huPA" beziehen sich spezifisch auf menschlichen Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ. Urokinase-Plasminogenaktivator ("uPA") ist ein Multidomänen-Protein, das an einen Zelloberflächenrezeptor bindet und Plasminogen in Plasmin spaltet. uPA ist an Blutgerinnselauflösung, Wundheilung, Entzündung, Geweberestrukturierung und Krebs beteiligt. Varianten von uPA, wie z.B. uPA₁₋₄₈, sind früher als zum Behandeln unangebrachter Angiogenese, Entzündungskrankheiten und Krebs verwendbar gefunden worden. u-PA₁₋₄₈ ist ein katalytisch inaktives Protein, das die ersten 48 Aminosäuren von uPA umfasst und noch die Bindungsdomäne für den uPA-Rezeptor beibehält. uPA₁₋₄₈ wirkt folglich durch Konkurrieren mit nativem uPA für dessen Rezeptor und inhibiert so Plasminogenaktivierung. Vor dieser Erfindung war nichts über die Serum-Halbwertszeit von uPA₁₋₄₈ bekannt, und folglich bestand kein Grund, uPA₁₋₄₈ zu modifizieren um seine Serum-Halbwertszeit zu erhöhen.

[0031] Der Ausdruck "uPA₁₋₄₈" bezieht sich auf ein Polypeptid, das eine mit der EGF-ähnlichen Domäne von

uPA (Reste 1-48) identische Sequenz oder einen aktiven Teil davon aufweist. Ein "aktiver Teil" ist einer, dem bis zu 10 Aminosäuren von entweder dem N-terminalen oder C-terminalen Ende oder von beiden Enden des uPA₁₋₄₈-Polypeptids fehlen, und der eine Kd mit uPAR von kleiner als oder gleich zu etwa 5 nM aufweist.

[0032] Der Ausdruck "aktives Analogon" bezieht sich auf ein Polypeptid, das sich von der Sequenz der EGF-artigen Domäne von uPA₁₋₄₈ oder einem aktiven Teil davon durch 1-7 Aminosäuren unterscheidet, aber das noch eine Kd kleiner als oder gleich zu etwa 5 nM mit uPAR aufweist. Die Unterschiede sind vorzugsweise konservative Aminosäuresubstitutionen, bei denen eine Aminosäure mit einer anderen natürlich vorkommenden Aminosäure von ähnlichem Charakter ersetzt wird. Beispielsweise werden die folgenden Substitutionen als "konservativ" angesehen: Gly – Ala; Val – Ile – Leu; Asp – Glu; Lys – Arg; Asn – Gln; und Phe – Trp – Tyr. Nicht-konservative Änderungen sind im Allgemeinen Substitutionen von einer der obenstehenden Aminosäuren mit einer Aminosäure von einer unterschiedlichen Gruppe (z.B. Ersetzen von Asn mit Glu), oder Ersetzen von Cys, Met, His oder Pro mit irgendeiner der obigen Aminosäuren. Die uPA₁₋₄₈-Polypeptide sollten im Wesentlichen frei von Peptiden, abgeleitet von anderen Teilen des uPA-Proteins, sein. Beispielsweise sollte eine uPA₁₋₄₈-Zusammensetzung weniger als etwa 20 Gew.-% uPA-B-Domäne ("uPA-B", Trockengewicht, abwesendes Exzipiens), vorzugsweise weniger als ungefähr 10 Gew.-% uPA-B, bevorzugter weniger als ungefähr 5 Gew.-% uPA-B, und am stärksten bevorzugt keine durch gewöhnliche im Fachgebiet gut bekannte Verfahren nachweisbare Menge enthalten. Außerdem schließen die uPA₁₋₄₈-Polypeptide vorzugsweise die "kringle-Region" von uPA aus.

[0033] Die "EGF-artige Domäne" von uPA ist der Teil des uPA-Moleküls, der für das Vermitteln von uPA-Bindung an seinen Rezeptor ("uPAR") verantwortlich ist. Die EGF-artige Domäne, manchmal Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne ("GFD") genannt, ist innerhalb der ersten 48 Aminosäurereste von uPA lokalisiert. Die für Rezeptorbindungsaktivität essentiellen Reste sind an Positionen 12 bis 32 lokalisiert worden, obwohl ein Peptid, das nur jene Reste enthält, keine Bindungsaffinität aufweist, die hoch genug ist um als verwendbarer Rezeptorantagonist zu dienen.

[0034] Die Ausdrücke "uPA-vermittelte Krankheit" und "uPA-Rezeptor-vermittelte Krankheit" beziehen sich auf einen Krankheitszustand oder eine Krankheit, die durch eine biologische Aktivität von uPA verursacht oder verschärft wird. Die primär aufgewiesene biologische Aktivität ist Plasminogenaktivierung; andere Aktivitäten werden Zellwanderung und Invasivität zugeordnet. Durch Plasminogenaktivierung-vermittelte Krankheiten schließen, ohne Limitierung, unangebrachte Angiogenese (z.B. diabetische Retinopathie, Corneaangiogenese, Kaposi-Sarkom und dergleichen), Metastasenbildung und Invasion durch Tumorzellen und chronische Entzündung (rheumatoide Arthritis, Emphysem und dergleichen) ein. Fucosylierte uPA ist außerdem für manche Tumorzellen (z.B. SaOS-2-Osteosarkomzellen), die sich manchmal in einem autokrinen Mechanismus selbst aktivieren. Folglich ist uPA₁₋₄₈ wirksam beim Inhibieren der Proliferation uPA-aktivierter Tumorzellen.

[0035] Der Ausdruck "wirksame Menge" bezieht sich auf eine Menge eines biologisch aktiven Polypeptids oder Konjugats davon, die ausreichend ist um einen nachweisbaren therapeutischen Effekt aufzuweisen. Der therapeutische Effekt kann beispielsweise, ohne Limitierung, Inhibieren des Wachstums unerwünschten Gewebes oder bösartiger Zellen, Inhibieren unangebrachter Angiogenese, Limitieren durch chronische Entzündung verursachten Gewebeschadens und dergleichen, einschließen. Die für ein Subjekt wirksame Menge wird von der Größe und dem Gesundheitszustand des Subjekts, der Art und dem Schweregrad der zu behandelnden Beschwerden und dergleichen, abhängen. Folglich ist es nicht möglich, eine genaue wirksame Menge im Vorhinein zu spezifizieren, jedoch kann die für eine gegebene Situation effektive Menge von einem Fachmann unter Verwendung von Routineexperimentieren, basierend auf der hierin bereitgestellten Information, bestimmt werden.

[0036] Der Ausdruck "pharmazeutisch annehmbar" bezieht sich auf Verbindungen und Zusammensetzungen, die an Säuger ohne übermäßige Toxizität verabreicht werden können. Beispielhafte pharmazeutisch annehmbare Salze schließen Mineralsäuresalze, wie z.B. Hydrochloride, Hydrobromide, Phosphate, Sulfate und dergleichen, und die Salze organischer Säuren, wie z.B. Acetate, Propionate, Malonate, Benzoate und dergleichen, ein.

[0037] Mit "Polypeptid" ist ein Molekül gemeint, das eine Reihe von Aminosäuren, verbunden über Amidbindungen entlang dem alpha-Kohlenstoffrückgrat, umfasst. Modifikationen der Peptidseitenketten können zusammen mit Glykosylierungen, Hydroxylierungen und dergleichen, vorliegen. Zusätzlich können andere Nicht-Peptidmoleküle, einschließlich Lipide und kleine Molekülgentien, an dem Polypeptid befestigt sein.

[0038] Wie hierin verwendet, soll der Ausdruck "Aminosäure" nicht nur die L-, D- und nichtchiralen Formen

natürlich vorkommender Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin, Valin), sondern auch modifizierte Aminosäuren, Aminosäure-Analoga und andere chemische Verbindungen, die bei konventioneller Oligopeptidsynthese eingebaut werden können, z.B. 4-Nitrophenylalanin, Isoglutaminsäure, Isoglutamin, ϵ -Nicotinoyl-Lysin, Isonipecotinsäure, Tetrahydroisochinolinsäure, α -Aminoisobuttersäure, Sarcosin, Citrullin, Cysteinsäure, t-Butylglycin, t-Butylalanin, Phenylglycin, Cyclohexylalanin, β -Alanin, 4-Aminobuttersäure und dergleichen, einschließen.

[0039] Mit "biologisch aktiv" ist die Fähigkeit gemeint, das physiologische System eines Organismus zu modifizieren. Ein Molekül kann durch seine eigenen Funktionalitäten biologisch aktiv sein, oder kann, basierend auf seiner Fähigkeit, Moleküle, die ihre eigene biologische Aktivität aufweisen, zu aktivieren oder inhibieren, biologisch aktiv sein. "Biologisch aktive Polypeptide" schließen Peptid-Nachahmungen ("peptide mimetics"), einschließlich Peptide, Proteine und Derivate davon, wie z.B. Peptide, die organische Nicht-Peptid-Anteile enthalten, synthetische Peptide, die Aminosäuren und/oder Peptid-Bindungen enthalten können oder nicht enthalten können, aber die strukturellen und funktionalen Eigenschaften eines Peptid-Liganden behalten, und Peptide und Oligopeptide, die Moleküle sind, die N-substituiertes Glycin umfassen, wie z.B. jene, beschrieben von Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367 (1992), und Antikörper, einschließlich Anti-Idiotyp-Antikörpern, ein.

[0040] Ein "Peptoid" ist ein Polymer, das wenigstens teilweise aus Monomereinheiten von "Aminosäure-Ersatzstoffen", die beliebige Moleküle außer einer Aminosäure sind, aber die in dem Peptoidpolymer dazu dienen, eine Aminosäure nachzuahmen, zusammengesetzt ist. Besonders bevorzugte Monomereinheiten sind N-alkylierte Derivate von Glycin. Peptide werden durch Verknüpfen der "Aminosäure-Ersatzstoffe" in eine lineare Kette oder cyclische Struktur mit Aminosäuren und/oder anderen Aminosäure-Ersatzstoffen hergestellt. Die Verknüpfungen können Peptidbindungen, Ester, Ether, Amine, Phosphate, Sulfate, Thioether, Thioester, aliphatische Bindungen, Carbamate und dergleichen, einschließen. Beispiele von Aminosäure-Ersatzstoffen schließen N-substituiertes Glycin, N-alkylierte Glycine, N-substituiertes Alanin, N-substituiertes D-Alanin, Urethane, substituierte Hydroxysäuren, wie z.B. Hydroxyessigsäure, 2-Hydroxypropansäure, 3-Hydroxypropansäure, 3-Phenyl-2-hydroxypropansäure und dergleichen, ein. Ein Peptoid kann Aminosäure-Ersatzstoffe umfassen, die mehr als eine Art von Verknüpfung verwenden, vorausgesetzt, die Chemie für die Reaktionsschemata ist kompatibel und im Allgemeinen durch die hierin beschriebenen Reaktionen umfasst. Andere Beispiele von Aminosäure-Ersatzstoffen und Peptoiden sind in Bartlett et al., PCT-Veröffentlichung Nr. W091/19735, und Zuckermann et al., PCT-Veröffentlichung Nr. W094/06451, beschrieben.

[0041] Die Ausdrücke "konventionell" und "natürlich vorkommend", wie auf die Peptide hierin angewandt, beziehen sich auf Polypeptide, auch bezeichnet als Proteine, die nur aus den natürlich vorkommenden Aminosäuren: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp und Tyr, aufgebaut sind.

[0042] Mit "konjugiert" ist die kovalente Bindung von wenigstens zwei Molekülen gemeint. Wie hierin beschrieben, wird ein biologisch aktives Polypeptid an ein pharmazeutisch annehmbares Polymer konjugiert um seine Serum-Halbwertszeit zu verlängern. Das Polymer kann seine eigene biologische Aktivität aufweisen oder nicht. Geeignete Polymere schließen beispielsweise Polyethylenglykol (PEG), Polyvinylpyrrolidon, Polyvinylalkohol, Polyaminosäuren, Divinylether, Maleinsäureanhydrid, N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamid, Dextran, Dextran-Derivate, einschließlich Dextransulfat, Polypropylenglykol, polyoxyethyliertes Polyol, Heparin, Heparinfragmente, Polysaccharide, Cellulose und Cellulose-Derivate, einschließlich Methylcellulose und Carboxymethylcellulose, Stärke und Stärke-Derivate, Polyalkylenglykol und Derivate davon, Copolymere von Polyalkylenglykolen und Derivaten davon, Polyvinylethylether und α , β -Poly-[(2-hydroxyethyl)-DL-aspartamid] und dergleichen, oder Gemische davon, ein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer PEG.

[0043] Mit "PEGyliert" ist das kovalente Befestigen von wenigstens einem Molekül Polyethylenglykol an einem biologisch aktiven Polypeptid gemeint. Das durchschnittliche Molekulargewicht des Reaktanten PEG ist vorzugsweise zwischen etwa 5.000 und etwa 50.000 Dalton, bevorzugter zwischen etwa 10.000 und etwa 40.000 Dalton, und am stärksten bevorzugt zwischen etwa 15.000 und etwa 30.000 Dalton. Besonders bevorzugt sind PEGs, die nominale Durchschnittsgrößen von etwa 20.000 und etwa 25.000 Dalton aufweisen. Das Befestigungsverfahren ist nicht entscheidend, aber es verändert vorzugsweise die Aktivität des biologisch aktiven Polypeptids nicht oder nur minimal. Vorzugsweise ist die Zunahme der Halbwertszeit größer als irgendeine Abnahme der biologischen Aktivität. Eine bevorzugte Befestigungsmethode ist via endterminaler Bindung an ein Polypeptid. PEGyliertes uPA₁₋₄₈ wird hierin manchmal als PEG hul-48 bezeichnet.

[0044] Mit "Erhöhung bzw. Verlängerung der Serum-Halbwertszeit" ist die positive Änderung der Halbwertszeit im Umlauf eines modifizierten biologisch aktiven Polypeptids relativ zu seiner nicht-modifizierten Form gemeint. Die Serum-Halbwertszeit wird durch das Nehmen von Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verabreichung des biologisch aktiven Polypeptids und das Bestimmen der Konzentration des Polypeptids in jeder Probe gemessen. Die Korrelation der Serumkonzentration mit der Zeit erlaubt die Berechnung der Serum-Halbwertszeit. Die Erhöhung ist wünschenswerterweise wenigstens etwa zweifach, aber eine kleinere Erhöhung kann beispielsweise nützlich sein, wo sie eine zufriedenstellende Dosierungsregelung ermöglicht oder einen toxischen Effekt vermeidet. Vorzugsweise ist die Erhöhung wenigstens etwa dreifach, stärker bevorzugt wenigstens etwa fünffach, noch stärker bevorzugt wenigstens etwa zehnfach, und am stärksten bevorzugt wenigstens etwa fünfzehnfach. Hierin werden Erhöhungen der Serum-Halbwertszeit von bis zu 28,8fach demonstriert.

[0045] Die Erhöhung bzw. Verlängerung der Serum-Halbwertszeit geschieht vorzugsweise durch ein Verfahren, das wenigstens die biologische Aktivität, beispielsweise in einem Bindungsassay gemessen, bewahrt. In manchen Fällen kann das Verfahren die biologische Aktivität sogar erhöhen. Wo das Verfahren jedoch für eine Abnahme der biologischen Aktivität sorgt, ist es bevorzugt, dass die proportionale Zunahme der Serum-Halbwertszeit wenigstens genauso groß wie die proportionale Abnahme der biologischen Aktivität ist. Stärker bevorzugt ist die Zunahme der Serum-Halbwertszeit im Verhältnis größer als die Abnahme der biologischen Aktivität. Dies ist kein absolutes Erfordernis und hängt beispielsweise von der Pharmakokinetik und der Toxizität des spezifischen Derivats ab. Der Prozentsatz der bewahrten biologischen Aktivität ist vorzugsweise etwa 10 bis etwa 100%, stärker bevorzugt etwa 15 bis etwa 100%, und am stärksten bevorzugt etwa 20 bis etwa 100%. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird etwa 25 bis etwa 100% der biologischen Aktivität bewahrt.

[0046] Das biologisch aktive Molekül ist ein Polypeptid. Ein besonders bevorzugtes Polypeptid ist uPA₁₋₄₈. Hierin wird demonstriert, dass uPA₁₋₄₈ eine kurze Serum-Halbwertszeit hat. Das Erhöhen der Serum-Halbwertszeit rasch beseitigter Verbindungen ist insbesondere dort wünschenswert, wo die Verbindungen rekombinante Moleküle, die schwierig und kostspielig herzustellen sind, sind. Eine derartige Erhöhung der Halbwertszeit kann Behandlungskosten reduzieren, die Menge des verabreichten Wirkstoffs verringern, die Dauer der Verabreichung reduzieren und das Ausgesetztsein der Patienten großen Mengen pharmazeutischer Präparate gegenüber vermindern. Hierin ist gezeigt, dass die Konjugation von PEG an uPA₁₋₄₈ dramatisch seine Serum-Halbwertszeit bis zu 28,8fach erhöht.

[0047] Das Polypeptid kann über einen beliebigen geeigneten Weg, wie z.B. Expression in einer rekombinanten Wirtszelle oder durch chemische Synthese, hergestellt werden. Das Polypeptid wird dann durch Standardverfahren gereinigt. Wo das Polypeptid uPA₁₋₄₈ ist, ist Herstellung in einer Hefewirtszelle, wie in veröffentlichter PCT-Patentanmeldung WO 94/28145 beschrieben, geeignet. Beispielsweise wird DNA, die für die Reste 1-48 von reifer menschlicher uPA codiert, in einen Hefeexpressionsvektor als eine Fusion mit dem Hefe- α -Faktor-Leader (α F1), unter transkriptionaler Kontrolle eines ADH2-GAP-Hybridpromotors, kloniert. Das PCR-Fragment des Gens, codierend für huPA-Primer und ein Matrizenplasmid, und der mit alkalischer Phosphatase behandelte pCBB-Subklonierungsvektor, der die Hefe-Expressionskassette enthält, werden mit BglIII verdaut, was von Ligation gefolgt wird. Der so erhaltene Subklon (pCBBuPA α 13) wird einem BamHI-Verdau unterzogen, und die isolierte Expressionskassette wird in den Hefeshuttle-Vektor ligiert. Das Expressionsplasmid wird dann in den Hefewirt transformiert unter Bedingungen, die die Expression des Polypeptids fördern. uPA₁₋₄₈ kann dann, wie hierin beschrieben, oder durch geeignete, im Fachgebiet bekannte Verfahren, wie z.B. Zentrifugation, Säulenchromatographie, Anionenaustauschchromatographie, Kationenaustauschchromatographie oder Kombinationen davon, gereinigt werden. Diafiltration kann verwendet werden um die Polypeptidlösung in eine gewünschte Konzentration zu bringen und/oder die Zusammensetzung der Lösung zu ändern.

[0048] Das biologisch aktive Polypeptid kann mit einem Polymer durch eine beliebige verfügbare Funktionalität unter der Verwendung von gut im Fachgebiet bekannten Standardverfahren verknüpft werden. Es ist bevorzugt, dass das biologisch aktive Polypeptid nur an einer Position verknüpft wird um irgendeine Störung seiner Aktivität zu minimieren und ein pharmakologisch einheitliches Produkt herzustellen. Nicht-limitierende Beispiele funktioneller Gruppen auf entweder dem Polymer oder dem biologisch aktiven Polypeptid, die zum Ausbilden solcher Bindungen verwendet werden können, schließen Amin- und Carboxygruppen, Thiolgruppen, wie z.B. in Cysteinresten, Aldehyde und Ketone, und Hydroxygruppen, wie sie in Serin, Threonin, Thyrosin, Hydroxyprolin und Hydroxylysinresten gefunden werden können, ein.

[0049] Das Polymer kann durch Koppeln einer reaktiven Gruppe, wie z.B. Trichlor-s-triazin (Abuchowski et al., (1977), J. Biol. Chem. 252:3582-3586), Carbonylimidazol (Beauchamp et al., (1983), Anal. Biochem.

131:25-33) oder Succinimidylsuccinat (Abuchowski et al., (1984), *Cancer Biochem. Biophys.* 7:175-186) aktiviert werden um mit einer Aminfunktionalität auf dem biologisch aktiven Molekül zu reagieren. Ein weiteres Kopplungsverfahren schließt die Bildung einer Glyoxylylgruppe auf dem einen Molekül und einer Aminooxy-Hydrazid- oder Semicarbazid-Gruppe auf dem anderen Molekül, das konjugiert werden soll (Fields und Dixon, (1968), *Biochem. J.* 108:883-887; Gaertner et al., (1992), *Bioconjugate Chem.* 3:262-268; Geoghegan und Stroh, (1992), *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; Gaertner et al., (1994), *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230), ein. Andere Verfahren schließen die Bildung eines Aktivesters an einer freien Alkoholgruppe des ersten zu konjugierenden Moleküls unter Verwendung von Chlorformiat oder Disuccinimidylcarbonat, das dann an eine Aminogruppe auf dem anderen zu koppelnden Molekül konjugiert werden kann, ein (Veronese et al., (1985), *Biochem. und Biotech.* 11:141-152; Nitecki et al., USPN 5 089 261; Nitecki, USPN 5 281 698). Andere reaktive Gruppen, die über freie Alkoholgruppen befestigt werden können, sind in Wright, veröffentlichte europäische Patentanmeldung 0 539 167 A2, die außerdem die Verwendung von Imidaten zum Koppeln über freie Aminogruppen beschreibt, dargelegt.

[0050] Eine Aldehydfunktionalität, verwendbar zum Konjugieren des biologisch aktiven Polypeptids, kann aus einer Funktionalität, die benachbarte Amino- und Alkoholgruppen aufweist, erzeugt werden. Da das biologisch aktive Molekül ein Polypeptid ist, kann beispielsweise ein N-terminales Serin, Threonin oder Hydroxylysin verwendet werden um eine Aldehydfunktionalität über oxidative Spaltung unter milden Bedingungen unter der Verwendung von Periodat zu erzeugen. Diese Reste oder ihre Äquivalente können normalerweise anwesend sein, beispielsweise am N-Terminus eines Polypeptids, können durch chemischen oder enzymatischen Abbau exponiert werden oder können über rekombinante oder chemische Verfahren eingeführt werden. Die Reaktionsbedingungen zum Erzeugen des Aldehyds schließen typischerweise die Zugabe von einem molaren Überschuss an Natriummetaperiodat unter milden Bedingungen ein um die Oxidation an anderen Positionen im Protein zu vermeiden. Der pH beträgt vorzugsweise ungefähr 7,0. Eine typische Reaktion schließt die Zugabe eines 1,5fachen molaren Überschusses Natriummetaperiodats, gefolgt von 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, ein.

[0051] Die Aldehydfunktionalität kann dann an ein aktiviertes Polymer, das eine Hydrazid- oder Semicarbazid-Funktionalität enthält, gekoppelt werden um eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung auszubilden. Hydrazid-enhaltende Polymere sind kommerziell erhältlich und können, falls nötig, unter Verwendung von Standardverfahren synthetisiert werden. PEG-Hydrazide, bevorzugt für die Erfindung, können von Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Road, Huntsville, AL 35801, erhalten werden. Der Aldehyd wird dann an das Polymer durch Vermischen der Lösung der beiden Komponenten und Erwärmen auf ungefähr 37°C, bis die Reaktion im Wesentlichen vollständig ist, gekoppelt. Typischerweise wird ein Überschuss des Polymerhydrazids verwendet um die Menge des erhaltenen Konjugats zu erhöhen. Eine typische Reaktionszeit beträgt 26 Stunden. Abhängig von der thermischen Stabilität der Reaktanten können die Reaktionstemperatur und -zeit verändert werden um für geeignete Ergebnisse zu sorgen. Die detaillierte Bestimmung der Reaktionsbedingungen, sowohl für Oxidation als auch Kopplung, ist in Referenz Geoghegan und Stroh, (1992), *Bioconjugate Chem.* 3:138-146, und in Geoghegan, USPN 5 362 852, dargelegt.

[0052] Ein derartiges, zwischen uPA₁₋₄₈ und einem Polymer gebildetes Konjugat kann therapeutisch verwendet werden um uPA-vermittelte und uPA-Rezeptor-vermittelte Krankheiten zu behandeln. Eine pharmazeutisch annehmbare Lösung, die das Konjugat enthält, wird präpariert, und eine therapeutisch wirksame Dosis des Konjugats einem Individuum, das eine uPA-vermittelte oder eine uPA-Rezeptor-vermittelte Krankheit hat, verabreicht. Das Konjugat wird vorzugsweise durch Injektion, entweder intravenös oder stärker bevorzugt subkutan, verabreicht. Die Verabreichung wird, wie notwendig, wiederholt um therapeutisch wirksame Level des Konjugats aufrecht zu erhalten.

[0053] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein Konjugat eines biologisch aktiven Polypeptids und eines Polymers umfassen, können durch Vermischen des Konjugats mit irgendeinem pharmazeutisch annehmbaren Bestandteil, wie beispielsweise einem Carrier, einem medizinischen Wirkstoff, einem Adjuvans, einem Verdünnungsmittel und dergleichen, sowie Kombinationen von beliebigen zweien oder mehreren davon hergestellt werden. Geeignete pharmazeutische Carrier, medizinische Wirkstoffe, Adjuvantien und Verdünnungsmittel sind in "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18. Auflage, von E.W. Martin (Mack Publ. Co., Easton, PA) beschrieben.

[0054] Die Zusammensetzung kann in einer Vielfalt von Wegen, einschließlich beispielsweise oral, parenteral (z.B. intravenös), durch intramuskuläre Injektion, durch intraperitoneale Injektion, als Suppositorien, etc., verabreicht werden. Die genaue Menge des verabreichten aktiven Konjugats wird natürlich von dem behandelten Subjekt, dem Gewicht des Subjekts, der Art und Weise der Verabreichung und dem Urteil des behandelnden

Arztes abhängig sein. Informationen, betreffend Dosierungen verschiedener pharmakologischer Wirkstoffe, können in pharmazeutischen Standard-Nachschlagewerken, z.B. "Remington's Pharmaceutical Sciences", supra, gefunden werden. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können in festen, halbfesten oder flüssigen Dosierungsformen, wie z.B. Tabletten, Pillen, Kapseln, Pudern, Flüssigkeiten, Suspensionen und dergleichen, sein.

[0055] Es ist selbstverständlich, dass, während die Erfindung in Verbindung mit ihren bevorzugten spezifischen Ausführungsformen beschrieben worden ist, die vorangehende Beschreibung sowie die Beispiele, die folgen, zum Veranschaulichen und nicht zum Limitieren des Bereichs der Erfindung bestimmt sind. Andere Aspekte, Vorteile und Modifikationen innerhalb des Bereichs der Erfindung werden dem Fachmann, den die Erfindung betrifft, offensichtlich sein.

BEISPIEL 1

BESTIMMUNG DER HALBWERTSZEIT VON UPA₁₋₄₈

[0056] uPA₁₋₄₈ wurde in Hefe hergestellt, gereinigt und in PBS konzentriert. Wenn in Hefe hergestellt, fehlt uPA₁₋₄₈ eine Fucosylierung, die vorhanden ist, wenn das Protein in Säugerzellen exprimiert wird. Das gereinigte Protein wurde intravenös Mäusen injiziert. Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, und die in jeder Probe vorhandene Menge von uPA₁₋₄₈ wurde bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Serum-Halbwertszeit uPA₁₋₄₈ in Mäusen ungefähr 10 Minuten beträgt.

BEISPIEL 2

ERZEUGEN EINES POLYPEPTIDS MIT EINEM N-TERMINALEN ALDEHYD

[0057] Ein halber Liter uPA₁₋₄₈-Lösung mit 10-13 mg/ml in 50 mM Natriumphosphat, pH 6,8, wurde hergestellt. Die molare Konzentration der Lösung wurde über spektrometrische Verfahren bestimmt. Ein 1,5-molarer Überschuss frisch hergestellten Natriummetaperiodats (MG=214 µg/µmol) wurde zugegeben, und es wurde gemischt, und die resultierende Lösung wurde im Dunkeln 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Produkt wurde von überschüssigem Periodat abgetrennt und unter Verwendung von tangentialer Diafiltration mit 30 mM Natriumacetat, pH 4,5, isoliert.

BEISPIEL 3

KOPPELN VON PEG-HYDRAZID AN UPA₁₋₄₈-ALDEHYD

[0058] PEG-Hydrazide wurden käuflich erworben (Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Road, Huntsville, AL 35801). PEG-Hydrazide mit nominalen durchschnittlichen Molekulargewichten von 3,4 kD, 5 kD, 20 kD und 25 kD und mit einer einzelnen Hydrazidgruppe an einem Ende des Polymers wurden verwendet. Zusätzlich wurde ein PEG-Hydrazid mit durchschnittlichem Molekulargewicht von 50 kD, das eine Hydrazidgruppe an jedem Ende des Polymers aufwies, so dass zwei UPA₁₋₄₈-Moleküle konjugiert werden konnten, verwendet. Die Konzentration der N-terminalen Aldehydlösung wurde bestimmt, und ein zweifacher molarer Überschuss jedes PEG-Hydrazids in getrennten Reaktionen zu dem UPA₁₋₄₈-N-terminalen Aldehyd, hergestellt in Beispiel 2, gegeben. Die Reaktionsgemische wurden 26 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Reaktionen waren ungefähr 60% der UPA₁₋₄₈-Moleküle an PEG konjugiert. Die Konjugate wurden über Säulenchromatographie gereinigt. Die Konjugate wurden dann diafiltriert und in PBS auf ungefähr 8-10 mg/ml konzentriert. Die Produkte wurden dann bis zur Verwendung bei -70°C eingefroren.

BEISPIEL 4

BESTIMMEN DER HALBWERTSZEIT DER PEG-KONJUGATE

[0059] Pharmazeutische Präparationen, umfassend die Konjugate von uPA₁₋₄₈ und PEG, wurden intravenös Mäusen injiziert. Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, und die Menge des im Blut anwesenden Konjugats für jeden Zeitpunkt bestimmt. Es wurde gefunden, dass die Halbwertszeit des uPA₁₋₄₈/PEG_{25kD}-Konjugats 277 Minuten war. Es wurde gefunden, dass die Halbwertszeit des Dimeren uPA₁₋₄₈/PEG_{50kD}-Konjugats (d.h., es weist ein uPA₁₋₄₈-Molekül, konjugiert an jedes Ende von PEG_{50kD}, wie im Beispiel 3 beschrieben, auf) 288 Minuten ist. Es wurde gefunden, dass die Halbwertszeit des uPA₁₋₄₈/PEG_{20kD}-Konjugats 130 Minuten ist. Es wurde gefunden, dass die Halbwertszeit des

uPA₁₋₄₈/PEG_{20kD}-Konjugats 44 Minuten ist. Es wurde gefunden, dass die Halbwertszeit des uPA₁₋₄₈/PEG_{20kD}-Konjugats 12 Minuten ist.

[0060] Pharmazeutische Zusammensetzungen, umfassend die Konjugate von uPA₁₋₄₈ und PEG_{20kD} in einer Dosis von 10 mg/kg, wurden als ein einzelner IV-Bolus oder über subkutane Verabreichung cynomologen Affen injiziert. Wie oberhalb, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben gesammelt und die Menge des im Blut anwesenden Konjugats für jeden Zeitpunkt bestimmt. Das Verfahren misst die Rezeptorbindungsaktivität anstelle von nur dem anwesenden Gesamtprotein; folglich repräsentiert die als eine Funktion der Zeit gemessene Proteinmenge das aktive Protein und repräsentiert die gemessene Halbwertszeit, die funktionale Halbwertszeit. Die Daten sind in Tabelle 1 gezeigt, und ein Graph, der die Plasmadisposition von PEG hul-48 über die Zeit veranschaulicht ist in [Fig. 1](#) eingeschlossen.

Tabelle 1: Pharmakokinetische Parameter von PEG hul-48 nach individuellem IV-Bolus ("single IV bolus") oder SC-Dosis mit 10 mg/kg, bestimmt durch das Nicht-Compartment-Modell ("Non Compartment Model")

Affe	F67-344F		F7238F		F7281F	
	IV	SC	IV	SC	IV	SC
Route	IV	SC	IV	SC	IV	SC
Dosis (mg/kg)	10	10	10	10	8,8	10
AUC (min*nM)	3297918	3803604	3002085	3057502	1987996	2337888
Cl (ml/min/kg)	0,6	NA	0,6	NA	0,8	NA
C _{max} (nM)	19143	2596	30564	2155	19199	1126
T _{max} (h)	0	8	0	4	0	8
V _{ss} (l/kg)	0,252	NA	0,249	NA	0,255	NA
t _{1/2} (h)	6,9	23	7,6	26	6,4	14
MRT (h)	7,4	31	6,6	28	5,1	31
F (%)	100	115	100	101	100	103

NA = nicht verfügbar

BEISPIEL 5

VERGLEICH DER AKTIVITÄT VON UPA₁₋₄₈ UND SEINEN PEG-KONJUGATEN

[0061] Die uPAR-Rezeptorbindungsaktivität von uPA₁₋₄₈ und den PEG-Konjugaten davon wurden durch das Verfahren von Goodson et al. (1994) PNAS 91:7129-7133, bestimmt. Es wurde gefunden, dass uPA₁₋₄₈ einen IC₅₀ von 250 pM aufweist. Es wurde gefunden, dass das PEG_{20kG}-Konjugat einen IC₅₀ von 1 nM aufweist. Das PEG_{20kG}-Konjugat wies folglich eine 13fache Zunahme der Serum-Halbwertszeit mit einer lediglich vierfachen Abnahme der biologischen Aktivität auf.

BEISPIEL 6

EFFEKT AUF BRUSTKREBS-KARZINOM

[0062] Dreißig NOD/Ltz-Mäusen wurde subkutan 2×10^6 MDA MB231-Zellen (menschlicher Brustkrebs) am Tag 0 injiziert. Die Mäuse wurden in drei Gruppen von je 10 Mäusen aufgeteilt, und die Behandlung der drei Gruppen an Mäusen begann am Tag 1. Jede Woche zweimal wurde Gruppe 1 subkutan 30 µg PEG hul-48(20kD PEG) injiziert, wurde Gruppe 2 subkutan 300 µg PEG hul-48(20kD PEG) injiziert und wurde Gruppe 3 subkutan das Vehikel (PBS) injiziert. Die Behandlung wurde 9 Wochen lang fortgesetzt. Das Primärtumorvolumen (mm³) wurde dreimal wöchentlich 12 Wochen lang gemessen, und das Experiment wurde beendet, wenn das mittlere Tumolvolumen in der Vehikel-Kontrollgruppe 2000 mm³ übertraf. Die Daten, veranschaulicht in [Fig. 2](#), zeigen, dass das Tumorwachstum in der Behandlungsgruppe, die 30 µg PEG hul-48 empfing, zu 77% reduziert war, und in der Gruppe, die 300 µg PEG hul-48 empfing, zu 98% reduziert war, wenn Vergleiche mit der Gruppe, die die Vehikelkontrolle empfing, bei 9 Wochen (p=0,05) angestellt wurden. Die 300 µg-Behandlungsgruppe wurde für zusätzliche 3 Wochen nach Stoppen der Behandlung (Tag 63) beobachtet. In dieser

Gruppe wurden Tumoren von Tag 84 an offenkundig, was anzeigt, dass Verabreichung von PEG hul-48 einen cytostatischen Effekt aufwies.

BEISPIEL 7

EFFEKT AUF MENSCHLICHES PROSTATA-KARZIOM

[0063] Den Prostatas von 18 Nacktmäusen wurde am Tag 0 1×10^5 PC-3mm2-Zellen (menschliches Prostata-Karzinom) injiziert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen von je 9 Mäusen aufgeteilt, und die Behandlung wurde am Tag 3 begonnen und 3 Wochen lang fortgesetzt. Zweimal pro Woche empfangen die Mäuse von Gruppe 1 300 μ g PEG hul-48(20kD PEG) durch subkutane Verabreichung, und die Mäuse von Gruppe 2 empfangen nur das Vehikel durch subkutane Verabreichung. Drei Wochen nach der Implantation der menschlichen Prostata-Karzinomzellen wurden die Prostatas der Mäuse operativ entfernt und gewogen um die Effekte der Behandlung auf das primäre Tumorwachstum zu bestimmen. Die Daten, gesammelt in [Fig. 3](#), zeigten eine etwa 57%ige Reduktion des primären Tumorwachstums in mit PEG hul-48 behandelten Mäusen, wenn Vergleiche mit den Mäusen der Kontrollgruppe angestellt wurden. Folglich indizieren die Daten, dass PEG hul-48 Primärtumoren signifikant reduziert.

BEISPIEL 8

EFFEKT AUF COLONKREBS-TUMORWACHSTUM UND LEBERMETASTASEN

[0064] Zwanzig 10 Wochen alte, männliche „Nacktmäuse“ wurden am Tag 0 innerhalb der Milz 1×10^6 KM12 L4A-Zellen (menschliches colorektales Adeno-Karzinom) injiziert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen eingeteilt, und die Behandlung wurde am Tag 1 nach der Implantation begonnen und vier Wochen lang fortgesetzt. Gruppe 1, die aus 10 Mäusen bestand, wurde subkutan fünfmal pro Woche PEG hul(20kD PEG) und 250 μ g BID injiziert, während die Mäuse von Gruppe 2 als Kontrolle fungierten und ihnen nur das Vehikel injiziert wurde. Die Tiere wurden beim 5-Wochen-Zeitpunkt getötet, und die Milz der Tiere von jeder Gruppe gewogen um Primärtumorlast zu bestimmen ([Fig. 4A](#)). Die Leber wurden gewogen um metastatische Tumorlast zu bestimmen und wurden durch histologische Untersuchung auf die Inzidens von Metastasen ausgezählt ([Fig. 4B](#)). Alle zehn Tiere in der Kontrollgruppe, die nur mit dem Vehikel behandelt waren, hatten sichtbare Primärtumore in der Milz und wiesen ein durchschnittliches Milzgewicht von $641 \text{ mg} \pm 307$ auf, während nur 7 Mäuse, die mit PEG hul-48 behandelt waren, sichtbare Tumore in der Milz, mit einem durchschnittlichen Milzgewicht von $269 \text{ mg} \pm 113$, aufwiesen ([Fig. 4A](#)). Für Vergleichszwecke: das durchschnittliche Milzgewicht für Mäuse in dieser Altersgruppe ist etwa 240 mg. Darüber hinaus hatten 6 Mäuse in der Kontrollgruppe Inzidens von Lebermetastasen, verglichen zu keinen beobachteten Metastasen in den Lebern der mit PEG hul-48-behandelten Gruppe ([Fig. 4B](#)). Die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen an Mäusen bei sowohl Primärtumorlast als auch Inzidens von Metastasen, ist statistisch signifikant ($p < 0,005$), und deutet darauf hin, dass PEG hul-48 eine Wirksamkeit beim Reduzieren von Tumorwachstum und Metastasierung aufweist.

BEISPIEL 9

EFFEKT AUF INZIDENS VON LEBERMETASTASEN IM POST-RESEKTIONS-COLOREKTAL-KARZINOM-MODELL

[0065] Dreißig männlichen Nu/Nu-Mäusen wurden innerhalb der Milz $0,5 \times 10^6$ KM12 L4A-Zellen (menschlicher Colorektalcarcinom-Krebs mit hohem metastatischem Potential) injiziert, und die Milz aller Mäuse wurde 3 Tage nach Implantation der KM12 L4A-Zellen entfernt. Die Mäuse wurden in zwei Behandlungsgruppen eingeteilt, und die Behandlung begann 6 Tage nach Implantation. Die erste Gruppe von 15 Mäusen empfing subkutane Verabreichungen von 1000 μ g PEG hul-48(20kD PEG) zweimal pro Woche, und die zweite Gruppe von 15 Mäusen empfing nur Salzlösungvehikel und diente als die Kontrollgruppe. Das Experiment wurde 27 Tage nach Implantation der KM12 L4A-Zellen beendet, und das Gewicht der Leber wurde bestimmt und histologisch auf Metastasenherde ausgezählt. Die Mäuse der ersten Gruppe, die mit PEG hul-48 behandelt worden waren, zeigten signifikant reduzierte Metastasen in der Leber (p -Wert ($< 0,05$), wenn verglichen mit den Mäusen der Kontrollgruppe, die nur Vehikel empfing [Fig. 5A](#)), selbst wenn die Behandlung 5 Tage nach Tumorimplantation begonnen wurde. Ebenso wurde eine Tendenz hin zu einer Reduktion der Gesamt-Lebertumorlast beobachtet ([Fig. 5B](#)).

BEHANDLUNG EINER UPA-VERMITTELTEN KRANKHEIT IN MENSCHEN

[0066] Eine pharmazeutisch annehmbare Lösung, die das PEG_{20kD}-Konjugat von uPA₁₋₄₈ mit 5-10 mg/ml in einem pharmazeutisch annehmbaren Carrier umfasst, wird subkutan zu einer Dosis von 1-10 mg/kg an einen menschlichen Patienten mit einer uPA-vermittelten Krankheit verabreicht. Die Verabreichung wird zu Intervallen wiederholt, die ausreichend sind um therapeutisch wirksame Serumlevel des Konjugats im Patienten aufrecht zu erhalten.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven Polypeptids, das eine erhöhte Serum-Halbwertszeit hat, umfassend Koppeln des Polypeptids an ein Polymer durch Umsetzen einer Aldehydfunktionalität am Molekül mit einer Hydrazid- oder Semicarbazid-Gruppe an dem Polymer unter Reaktionsbedingungen, die zur Begünstigung einer Bildung eines konjugierten Polypeptids wirksam sind, wobei das Polypeptid durch eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an das Polymer gebunden ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von weniger als etwa 50.000 hat.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von weniger als etwa 30.000 hat.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von weniger als etwa 10.000 hat.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Polypeptid uPA₁₋₄₈ oder ein aktiver Teil davon ist.

6. Verfahren zum Konjugieren von uPA₁₋₄₈ an Polyethylenglykol, umfassend:

- (a) Bereitstellen von aktiviertem Polyethylenglykol in Form von Polyethylenglykolhydrazid oder -semicarbazid;
- (b) Bereitstellen von uPA₁₋₄₈, das benachbarte Amino- und Alkoholgruppen am N-Terminus hat;
- (c) oxidatives Spalten zwischen den benachbarten Amino- und Alkohol-Gruppen unter Erhalt einer Aldehydfunktionalität anstelle dieser und
- (d) Umsetzen des Aldehyd-enthaltenden uPA₁₋₄₈, das in Schritt (c) bereitgestellt wird, mit dem Polyethylenglykolhydrazid oder -semicarbazid unter Reaktionsbedingungen, die zur Begünstigung einer Bildung von PEGyliertem Polypeptid wirksam sind, wobei das Polypeptid durch eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an Polyethylenglykol gebunden wird.

7. Modifiziertes Polypeptid, das ein biologisch aktives Polypeptid, das durch eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an ein pharmazeutisch akzeptables Polymer konjugiert ist, umfasst, wobei das modifizierte Polypeptid eine proportionale Zunahme der Serum-Halbwertszeit in einem Individuum aufweist, die größer ist als eine proportionale Abnahme seiner biologischen Aktivität.

8. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 7, wobei die Zunahme der Halbwertszeit mindestens etwa dreifach ist.

9. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 7 oder 8, wobei das biologisch aktive Polypeptid eine Urokinase ist.

10. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 9, wobei die Urokinase uPA₁₋₄₈ oder ein aktiver Teil davon ist.

11. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 10, wobei das Polymer an den N-Terminus von uPA₁₋₄₈ gebunden ist.

12. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 10 oder 11, wobei das Polymer Polyethylenglykol ist.

13. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 12, wobei das Polyethylenglykol ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 5.000 bis etwa 50.000 Dalton hat.

14. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 13, wobei das Polyethylenglykol ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 10.000 bis etwa 40.000 Dalton hat.

15. Modifiziertes Polypeptid nach Anspruch 14, wobei das Polyethylenglykol ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 15.000 bis etwa 30.000 Dalton hat.

16. Pharmazeutische Zusammensetzung, die ein modifiziertes Polypeptid nach einem der Ansprüche 7 bis 15 in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipienz umfasst.

17. Verwendung eines Konjugats aus uPA₁₋₄₈ und einem pharmazeutisch annehmbaren Polymer bei der Herstellung eines Medikaments zur Verwendung in einem Verfahren der Behandlung einer uPA-vermittelten Störung oder einer uPA-Rezeptorvermittelten Störung, wobei das uPA₁₋₄₈ durch eine Hydrazon- oder Semicarbazon-Bindung an das Polymer konjugiert ist.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei die molare Menge des Konjugats, die zu verabreichen ist, kleiner ist als die molare Menge des nicht konjugierten uPA₁₋₄₈, die zur Bereitstellung eines therapeutischen Effekts notwendig ist.

19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, wobei die vermittelte Störung Krebs oder Krebsmetastasenbildung ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

[Mittlere Plasmakonzentration ($\pm SA$)]

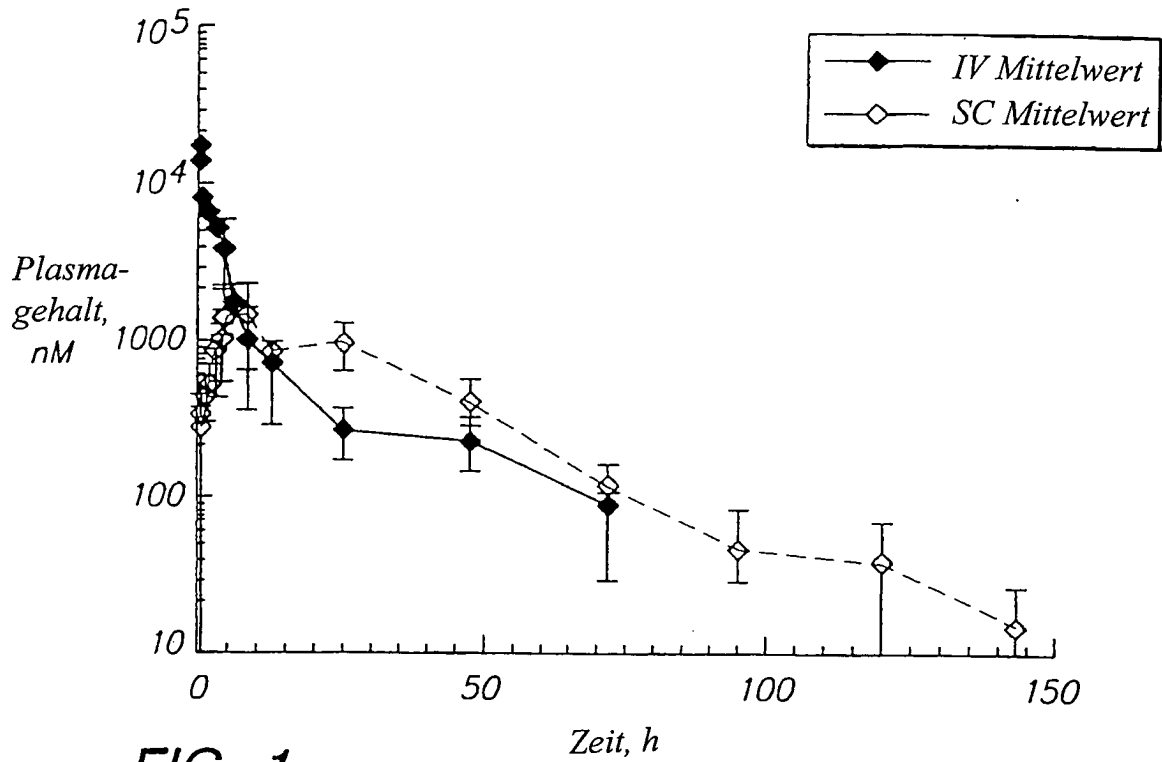


FIG. 1

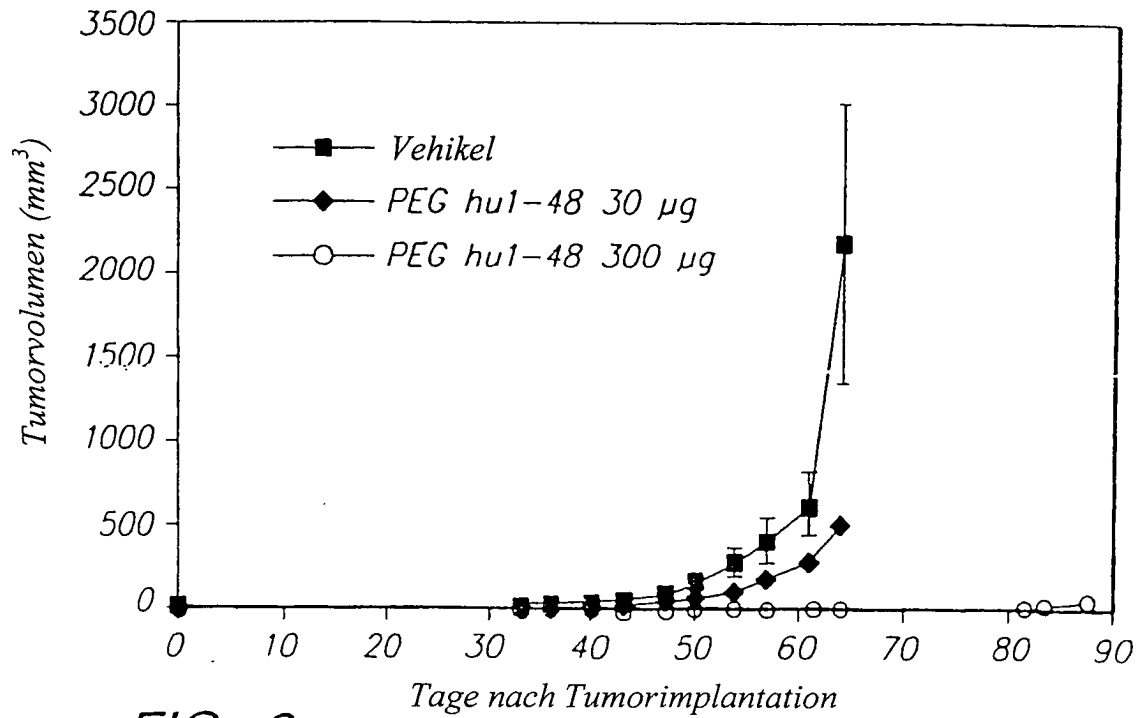


FIG. 2

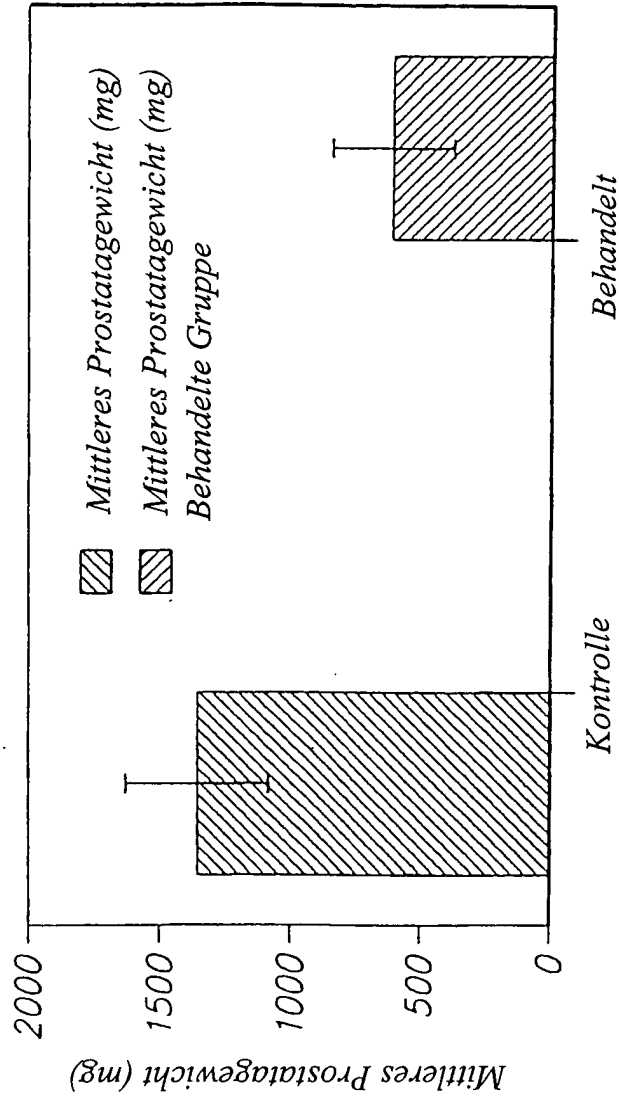


FIG. 3

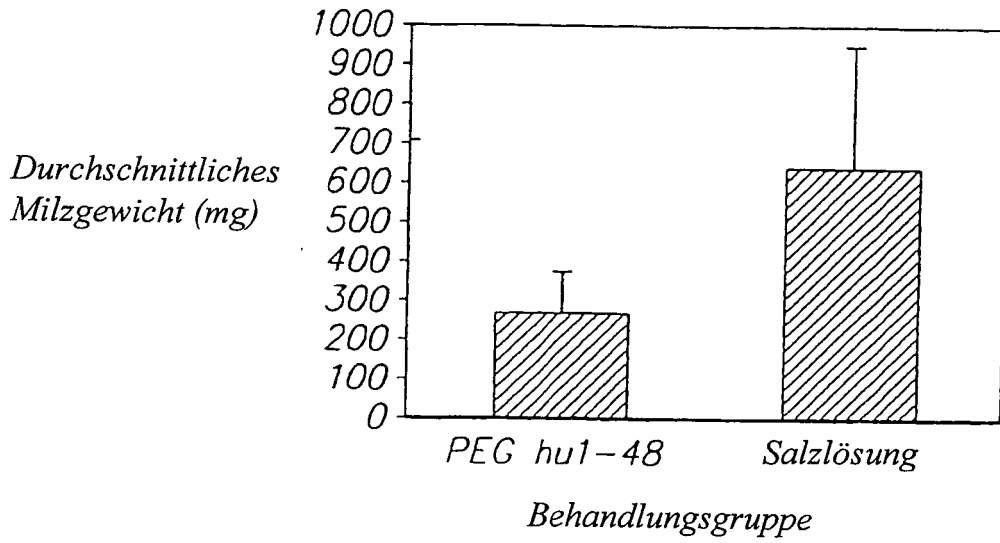


FIG. 4A

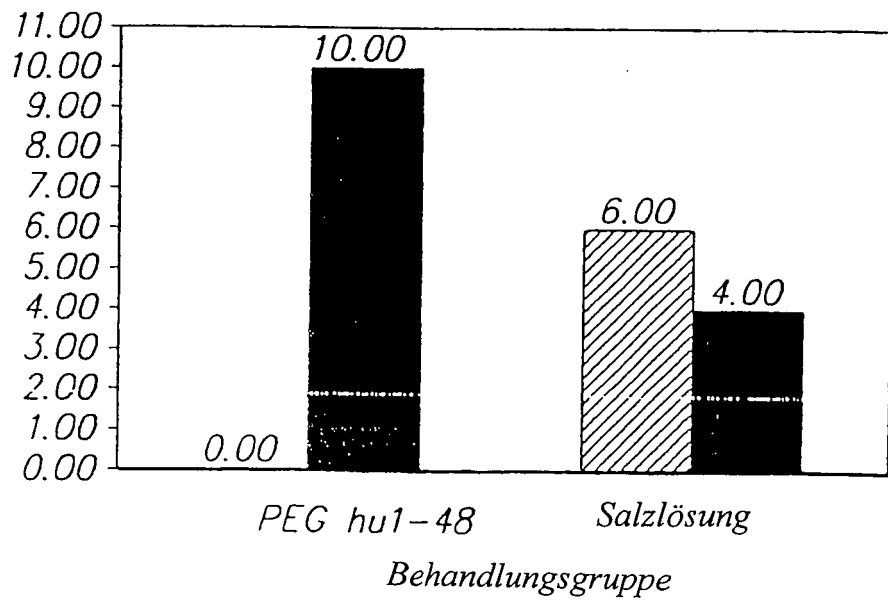
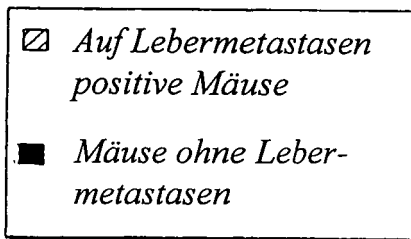


FIG. 4B

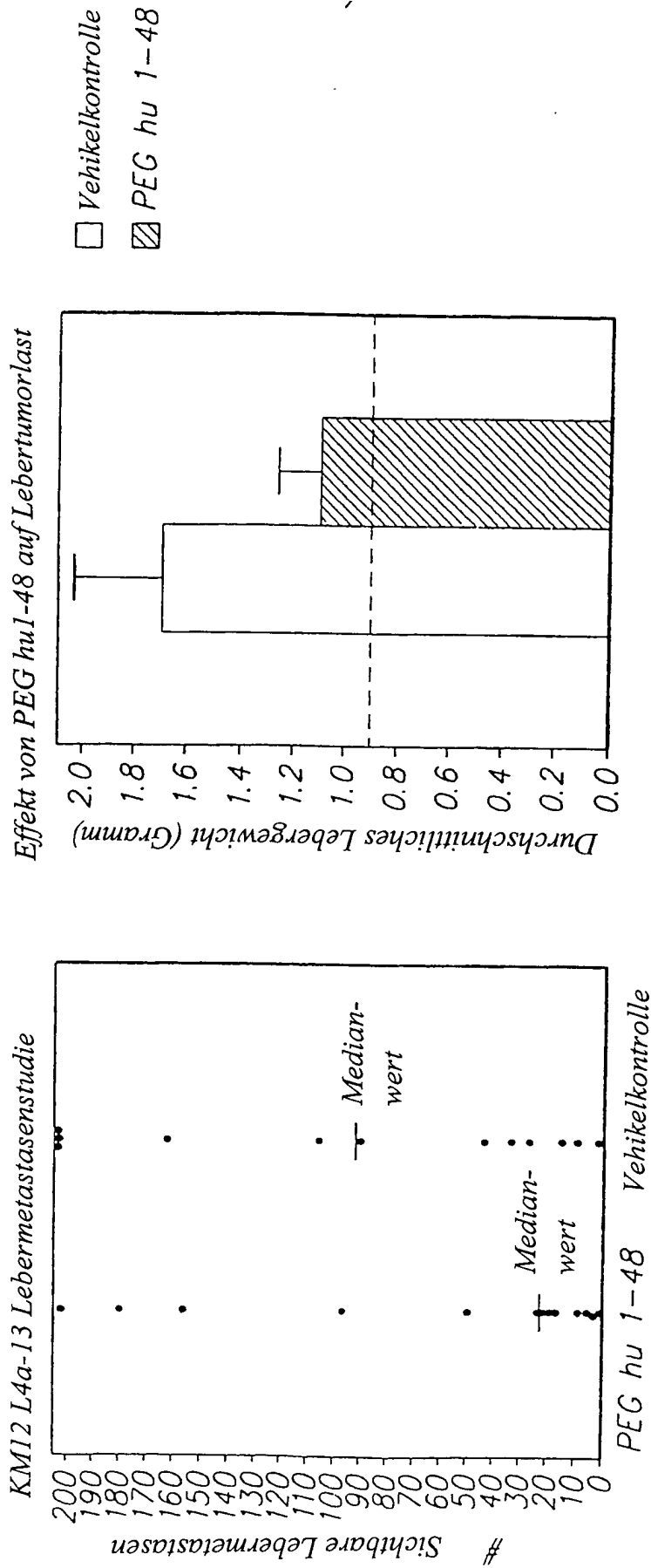


FIG. 5A

FIG. 5B