



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 780 T2** 2007.09.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 964 702 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 47/48** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 780.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/13756**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 936 407.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/005363**

(86) PCT-Anmeldetag: **01.08.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.12.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **04.10.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.09.2007**

(30) Unionspriorität:

23050 P 02.08.1996 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Ortho-McNeil Pharmaceutical, Inc., Raritan, N.J.,
US**

(72) Erfinder:

**WEI, Ziping, Piscataway, NJ 08854, US;
MENON-RUDOLPH, Sunitha, Boonton, NJ 07005,
US; GHOSH-DASTIDAR, Pradip, Gladstone, NJ
07934, US**

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 28209 Bremen

(54) Bezeichnung: **POLYPEPTIDE MIT EINZELNEM KOVALENT GEBUNDENEN N-TERMINALEN WASSERLÖSLICHEN POLYMER**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Polypeptide, an deren N-Termini ein einzelnes wasserlösliches Polymer gebunden ist. Diese Polypeptide haben Eigenschaften, die sie für die Verwendung als Pharmazeutika und Diagnostika vorteilhaft machen. Die Erfindung betrifft außerdem Verfahren zum Herstellen dieser Polypeptide und zugehörige pharmazeutische Zusammensetzungen und Kits.

Allgemeiner Stand der Technik

[0002] Überall in dieser Anmeldung werden verschiedene Veröffentlichungen zitiert. Die Offenbarung dieser Veröffentlichungen ist hiermit durch Bezugnahme in die Anmeldung aufgenommen, um den Stand der Technik vollständiger zu beschreiben, den diese Erfindung betrifft.

[0003] In der jüngsten Vergangenheit wurden nichtantigene wasserlösliche Polymere, wie Polyethylenglykol („PEG“), für die kovalente Modifikation von Polypeptiden von therapeutischer und diagnostischer Bedeutung verwendet. Zum Beispiel wurde von kovalenter Anlagerung von PEG an therapeutische Polypeptide, wie Interleukine (M.J. Knauf et al., J. Biol. Chem. 1988, 263, 15 064; Y. Tsutsumi et al., J. Controlled Release 1995, 33, 447), Interferone (Y. Kita et al., Drug Des. Delivery 1990, 6, 157) Katalase (A. Abuchowski et al., J. Biol. Chem. 1977, 252, 3 582), Superoxiddismutase (C.O. Beauchamp et al., Anal. Biochem. 1983, 131, 25) und Adenosindeaminase (R. Chen et al., Biochim. Biophys. Acta 1981, 660, 293), berichtet, um ihre Halbwertszeiten in vivo zu verlängern und/oder ihre Immunogenität und Antigenität zu reduzieren.

[0004] Solche Verfahren haben jedoch beträchtliche Nachteile. Speziell werden PEG-Moleküle in den meisten Fällen mittels Aminogruppen unter Verwendung von methoxyliertem PEG („mPEG“) mit unterschiedlichen reaktionsfähigen Gruppen an Polypeptiden angelagert. Zu solchen Polymeren zählen mPEG-Succinimidylsuccinat, mPEG-Succinimidylcarbonat, mPEG-Imidat und mPEG-Cyanurchlorid. Die Anlagerung unter Verwendung dieser Polymere war gewöhnlich unspezifisch, d. h. erfolgte auf zufällige Weise an verschiedenen Aminogruppen an den Polypeptiden und nicht ausschließlich an einer bestimmten Aminogruppe. Eine solche unspezifische Anlagerung kann Aminosäurereste an aktiven Orten derart modifizieren, dass die biologische Aktivität der Polypeptide eliminiert wird. Zudem können die resultierenden Konjugate eine heterogene Mischung von modifizierten Polypeptiden enthalten, was für die pharmazeutische Verwendung nicht wünschenswert ist.

[0005] Um diese Probleme zu überwinden, war es wünschenswert, ein Polymer ortsspezifisch an ein Polypeptid anzulagern. Bei dem Polypeptid würde eine solche Vorgehensweise die biologische Aktivität bewahren, die Blutzirkulationszeit verlängern, die Immunogenität reduzieren, die Wasserlöslichkeit erhöhen und die Beständigkeit gegenüber Proteaseverdauung fördern. Ortsspezifische Pegylierung am N-Terminus, an der Seitenkette und am C-Terminus eines potenten Analogons von Somatotropin-releasing-Faktor wurde mittels Festphasensynthese durchgeführt (A.M. Felix et al., Int. J. Peptide Protein Res. 1995, 46, 253). Da die spezifische Pegylierung während der Anordnung des Peptids an einem Harz erzielt wurde, kann das Verfahren nicht auf ein existierendes Peptid angewendet werden.

[0006] Ein weiteres verwendetes Verfahren schloss das Anlagern eines Peptids an Enden von liposomalen, auf die Oberfläche gepfropften PEG-Ketten in einer ortsspezifischen Weise mittels einer reaktionsfähigen Aldehydgruppe am N-Terminus ein, die durch Natriumperiodat-Oxidation von N-terminalem Threonin erzeugt wurde (S. Zalipsky et al., Bioconj. Chem. 1995, 6, 705). Dieses Verfahren ist jedoch auf Polypeptide mit N-terminalen Serin- oder Threoninresten beschränkt.

[0007] Enzymunterstützte Verfahren zum Einführen von aktivierten Gruppen speziell am C-Terminus eines Polypeptids wurden ebenfalls beschrieben (A. Schwarz et al., Methods Enzymol. 1990, 184, 160; K. Rose et al., Bioconjugate Chem. 1991, 2, 154; H.F. Gaertner et al., J. Biol. Chem. 1994, 269, 7 224). In der Regel können diese aktiven Gruppen Hydrazid-, Aldehyd- und aromatische Aminogruppen zur anschließenden Anlagerung von funktionellen Sonden an Polypeptiden sein. Da die Verfahren jedoch auf der Spezifität von Proteasen basieren, bedingen sie äußerste Vorsicht und der Umfang ihrer Anwendung ist begrenzt.

[0008] Ortsspezifische Mutagenese ist ein weiterer Ansatz, der zum Herstellen von Polypeptiden zur ortsspezifischen Anlagerung an Polymeren verwendet wurde. WO 90/12874 beschreibt ortsgerechte Pegylierung von Proteinen, die durch die Insertion von Cysteinresten oder die Substitution von anderen Resten durch Cysteinreste modifiziert wurden. Diese Veröffentlichung beschreibt außerdem die Herstellung von mPEG-Eryth-

ropoetin („mPEG-EPO“) durch Umsetzen eines cysteinspezifischen mPEG-Derivats mit einem rekombinant eingeführten Cysteinrest an EPO. In ähnlicher Weise wurde Interleukin-2 an seinem Glykosylierungsort nach einer ortsgerechten Mutagenese pegyliert (R.J. Goodson et al., Bio/Technology 1990, 8, 343).

[0009] Glykoproteine stellen Kohlenhydrate als zusätzliche Zielorte zur Modifikation bereit. Das Enzym Peroxidase wurde mit PEG-Diamin über seine Kohlenhydratgruppe modifiziert (M. Urrutiagoity et al., Biocatalysis 1989, 2, 145). WO 94/28024 beschreibt die Verfahren zum Herstellen von mPEG-EPO durch periodatoxidiertes Kohlenhydrat. Die involvierte Chemie war Hydrazonbildung durch Umsetzen von mPEG-Hydrazid mit Aldehydgruppen der Kohlenhydratgruppe an EPO. Diese Art von Modifikation erzeugt reaktionsfähige Aldehydgruppen durch einen Oxidationsschritt, die potentiell verschiedene Arten von Zuckerresten in der Kohlenhydratgruppe und einige Aminosäurereste in dem Polypeptid, wie Methionin, oxidieren können. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens rührt von der Heterogenität der Kohlenhydratgruppen von EPO her. Aus Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters exprimiertes EPO weist vier Kohlenhydratketten auf, die drei N-verknüpfte Ketten an den Asparaginen 24, 38 und 83 und eine O-verknüpfte Kette am Serin 126 beinhaltet. Insgesamt 52 unterschiedliche N-verknüpfte und mindestens 6 O-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen wurden identifiziert (R.S. Rush et al., Anal. Chem. 1995, 67, 1 442; K.B. Linsley et al., Anal. Biochem. 1994, 219, 207). Dementsprechend ist es schwierig, die Anzahl oder Anlagerungsorte von Polymermolekülen zu kontrollieren, wenn EPO oder ein anderes Protein über seine Kohlenhydratketten modifiziert wird.

[0010] Kurz gesagt, die Verfahren in der Technik zum Anlagern eines wasserlöslichen Polymers an ein Polypeptid leiden unter beträchtlichen Nachteilen. Diese Nachteile beinhalten die folgenden: (a) ein Mangel an Präzision, sowohl stöchiometrisch als auch bezüglich des Anlagerungssitus; (b) das Erfordernis, schwierige und laborintensive Techniken wie ortsspezifische Mutagenese durchzuführen; (c) das Erfordernis, Festphasenpeptidsynthese gleichzeitig mit Polymeranlagerung anzuwenden, anstatt ein Polymer an einem vorher vorhandenen Polypeptid anzulagern; und (d) das unumstößliche Erfordernis, dass die Identität des N-terminalen Aminosäurerests Threonin oder Serin sein muss.

[0011] Seit einiger Zeit hat Bedarf an einem allgemeinen Verfahren zum ortsspezifischen Anlagern eines wasserlöslichen Polymers an dem N-terminalen Aminosäurerest eines Polypeptids bestanden, wobei dieses Verfahren nicht unter den oben identifizierten Nachteilen leidet. Ein solches Verfahren gibt es jedoch nicht.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Diese Erfindung stellt zwei Stoffzusammensetzungen bereit. Die erste Stoffzusammensetzung besteht im wesentlichen aus einem Polypeptid und einem wasserlöslichen Polymer, kovalent über eine Hydrazonbindung oder reduzierte Hydrazonbindung an dem N-terminalen α -Kohlenstoffatom des Polypeptids gebunden, unter der Bedingung, dass (a) das Polymer ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat, (b) die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernung seiner N-terminalen α -Aminogruppe nicht eliminiert wird, und (c) der N-terminale Aminosäurerest des Polypeptids nicht Serin oder Threonin ist.

[0013] Diese Erfindung stellt auch vier Verfahren zum kovalenten Binden eines wasserlöslichen Polymers an das N-terminale α -Kohlenstoffatom eines Polypeptids bereit. Das erste Verfahren, das das Polymer über eine Hydrazonbindung an das Kohlenstoffatom bindet, umfasst die Schritte:

(a) In-Kontakt-Bringen des Polypeptids mit (i) einem Glyoxylation oder einem Derivat davon in einer Konzentration von 0,1 M bis 2,0 M, (ii) einem Übergangsmetallion in einer Konzentration von 10 μ M bis 1 M und (iii) einer Lewis-Base in einer Konzentration von 10 mM bis 10 M, bei einem pH von 5,0 bis 7,0 und einer Temperatur von 0°C bis 100°C, um ein transaminiertes Polypeptid mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe zu bilden; und

(b) In-Kontakt-Bringen des transaminierten Polypeptids bei einem pH von 3,0 bis 5,0 mit einem wasserlöslichen Polymer, das eine daran kovalent gebundene Gruppe hat, die mit der N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das Polymer über eine Hydrazonbindung an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird, unter der Bedingung, dass das PEG ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat und die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernen seiner N-terminalen α -Aminogruppe nicht eliminiert wird.

[0014] Diese Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die eine wirksame Menge der vorliegenden ersten Zusammensetzung und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst.

[0015] Schließlich stellt diese Erfindung Kits zur Verwendung beim Herstellen der vorliegenden Zusammensetzungen bereit. Das erste Kit zum Herstellen der ersten vorliegenden Zusammensetzung umfasst folgendes:

- (a) ein Glyoxylation oder Derivat davon;
- (b) ein Übergangsmetallion;
- (c) eine Lewis-Base; und
- (d) ein wasserlösliches Polymer mit einem Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons und mit einer kovalent angebotenen Gruppe, die mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das Polymer an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird.

Kurzbeschreibung der Figuren

[0016] **Fig. 1** zeigt ein Schema zum Herstellen von N-terminalem modifiziertem EPO. Dabei handelt es sich um eine Reaktion mit zwei Schritten: Transaminierung und Pegylierung. Vier mPEG5000-Derivate (d. h. mPEG mit einem MG von 5 000 Daltons) mit funktionellen Hydrazincarboxylat-(HZC), Hydrazid-(HZ), Semicarbazid-(SCZ) und Oxylamingruppen wurden verwendet.

[0017] **Fig. 2** zeigt das Gelfiltrationschromatogramm von mPEG-EPO mit einer Hydrazonbindung, die unter Verwendung einer Hydrazincarboxylatgruppe (HZC-Gruppe) gebildet wurde, nativem EPO und mPEG5000-Hydrazincarboxylat auf einer TSK-G3000SW_{XL}-Säule (7,5 × 30 mm). Die mobile Phase ist 20 mM Natriumcitrat (pH 7,0), das 100 mM NaCl enthält.

[0018] **Fig. 3** zeigt ein matrixunterstütztes Laserdesorptionslaufzeitmassenspektrum von mPEG5000-Hydrazincarboxylat, nativem EPO und mPEG-EPO mit einer Hydrazonbindung, die unter Verwendung einer Hydrazincarboxylatgruppe (HZC-Gruppe) gebildet wurde.

[0019] **Fig. 4** zeigt die Charakterisierung von mPEG-EPO mittels Elektrophoreseverfahren: (1) 4-15%-ige SDS-PAGE, Coomassie-Färbung; (2) Western-Blot; (3) 4-15%-ige SDS-PAGE, Iodfärbung und (4) isoelektrische Fokussierung (IEF, pH 3-7). Spur 1: MG- oder pI-Markierungen; Spur 2: natives EPO; Spur 3: transaminiertes EPO und Spuren 4 und 5: mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die unter Verwendung von Hydrazincarboxylatgruppen (HZC-Gruppen) bzw. Hydrazidgruppen (HZ-Gruppen) gebildet wurden.

[0020] **Fig. 5** zeigt einen Graph von Ergebnissen eines ELISA-Assays für mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die unter Verwendung von Hydrazincarboxylatgruppen (HZC-Gruppen) und Hydrazidgruppen (HZ-Gruppen) gebildet wurden.

[0021] **Fig. 6** zeigt einen Graph der Ergebnisse eines Zellproliferationsassays von nativem EPO, transaminiertem EPO und mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die unter Verwendung von Hydrazincarboxylatgruppen (HZC-Gruppen) und Hydrazidgruppen (HZ-Gruppen) gebildet wurden.

[0022] **Fig. 7** zeigt einen Graph von Ergebnissen eines Bioassays an exhypoxischen Mäusen für mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die unter Verwendung von Hydrazincarboxylatgruppen (HZC-Gruppen), Hydrazidgruppen (HZ-Gruppen) und Semicarbazidgruppen (SCZ-Gruppen) gebildet wurden.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0023] Diese Erfindung stellt zwei Stoffzusammensetzungen bereit. Die erste Stoffzusammensetzung besteht im wesentlichen aus einem Polypeptid und einem wasserlöslichen Polymer, kovalent über eine Hydrazonbindung oder reduzierte Hydrazonbindung an dem N-terminalen α -Kohlenstoffatom des Polypeptids gebunden, unter der Bedingung, dass (a) das Polymer ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat, (b) die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernung seiner N-terminalen α -Aminogruppe nicht eliminiert wird, und (c) der N-terminale Aminosäurerest des Polypeptids nicht Serin oder Threonin ist.

[0024] Wie hierin verwendet, beinhaltet „Polypeptid“ sowohl Peptide als auch Proteine. „Peptid“ steht für ein Polypeptid, das weniger als 10 Aminosäurereste lang ist, und „Protein“ steht für ein Polypeptid, das 10 oder mehr Aminosäurereste lang ist. In dieser Erfindung können die Polypeptide natürlich vorkommen oder rekombinant sein (d. h. mittels rekombinanter DNA-Technologie produziert) und können Mutationen (z. B. Punkt-, Insertions- und Deletionsmutationen) als auch andere kovalente Modifikationen (z. B. Glykosylierung und Markierung [über Biotin, Streptavidin, Fluoracin und Radioisotope wie ¹³¹I]) enthalten. Darüber hinaus kann jede vorliegende Zusammensetzung mehr als ein einzelnes Polypeptid enthalten, d. h. jedes kann ein Monomer (ein an ein Polymer gebundenes Polypeptid) oder ein Multimer (zwei oder mehr an ein Polymer oder aneinander gebundene Polypeptide) sein.

[0025] Zu Polypeptiden zählen beispielsweise monoklonale und polyklonale Antikörper, Cytokine, wie M-CSF und GM-CSF, Lymphokine, IL-2, IL-3, Wachstumsfaktoren, wie PDGF und EGF, Peptidhormone, wie hGH, EPO und Derivate davon, Blutgerinnungsfaktoren, wie Faktor VIII, Immungene, Enzyme, Enzyminhibitoren und andere Liganden. In der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Zusammensetzungen ist das Polypeptid EPO oder ein Derivat davon. Das EPO kann natürlich vorkommen oder rekombinant sein. Derivate von EPO beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, die Polypeptide

GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG,
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG,
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG,
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG,
GGVYACRMGPITWVCSPLGG,
VGNYMAHMGPIWVCRPGG,
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ,
GGLYACHMGPMWVWCQPLRG,
TIAQYICYMGPETWEWRPSPA,
YSCHFGPLTWVCK und
YCHFGPLTWVC

sowie die in Tabelle 1 unten aufgeführten Mutationen.

Tabelle 1

<u>Mutation</u>	<u>Aktivität in Bezug auf den Wt*</u>	<u>Literaturhinweis</u>
L5S	+/-	9
L5S/W51S/M54S/V82S/ W88S/L112A/A124S/A125S	+/-	9
S9A	++++	3
R10A	++++	3
E13A	++++	3
R14L	++++	3
R14A	++	3
L17A	++++	3
E18A	++++	3
K20A	++++	3
E21A	++++	3
N24Q	++	1
N24Q/N83Q	+	1
N24Q/N38Q/N83Q	+++	1
C29Y/C33Y	++++	3
A30S/L35S	+++	9
A30S/A124S/A125S	++	9
C33P/R139C	++++	7
L35S/A124S/A125S	++	9
N38Q	++	1
N38Q/N83Q	++++	1
V41S	+/-	9
K45A	++++	3
F48S	++++	3
Y49S	++++	3
A50S	++++	3
W51S	++++	3
W51S/V144S	+	9
W51S/V82S/W88S	++	9
W51S/V82S/W88S/V144N	++	9

W51S/V82S/W88S/L112A/ I119A/A124S/A125S	+++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ A124S/A125S	++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ L112A/A124S/A125S	+	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ L112A/A124S/A125S/L130A	+++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ I119A/A124S/A125S	+	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ L112A/I119A/A124S/A125S	+++	9
W51S/M54S/V82S/W88S/ A124S/A125S/L130A	+++	9
W51S/V82S/W88S/A125S/ A125S/L130A	+++	9
K52S	++++	3
M54L	++++	10
M54S/V56S	++++	9
W57S/V82S/W88S/L112A/ I119A/A124S/A125S	+++	9
E62A	++++	3
W64A	++++	3
Q65A	++++	3
G66A	++++	3
L69A	++++	3
L69N	++++	4
S71A	+++	3
A73G	++++	3
R76A	++++	3
V82S	+/-	9
V82S/W88S/V144N	++	9
V82S/W88S/A124S/A125S	++++	9
N83Q	++	9
Q92A	++++	3
L93A	++++	3

K97A	++++	3
S100A	++++	3
G101A	++++	3
L102A	++++	8
R103A	++	2
S104A	++	3
S104N	+/-	6
L105A	++	8
L105F	+/-	6
T106A	++++	3
T107A	+++	8
L108A	++	3
L109A	+++	8
L112A	+/-	9
L112A/I119S/L130A/I133A	++++	9
P122Q	+/-	6
A124P/A125T	++++	4
A125T	++++	4
A125N/A127S	++++	4
L130A	+/-	9
D136A	++++	3
R139A	++++	3
K140A	++++	3
R143A	++++	3
S146A	++++	3
N147A	++++	3
R150A	+++	3
K152A	++	3
L153A	+++	3
K154A	++++	3
L155A	++++	3
Y156A	++	3
T157A	++++	3
G158A	++++	3
E159A	++++	3

R162K/T163D/G164E/D165L	++	3
R162H/T163H/G164H/ D165H/R166H/(167)H	++++	3
Æ2-5	++	3
Æ13-17	++++	2
Æ32-36	++	3
Æ43-47	++	3
Æ53-57	++	3
Æ78-82	+	3
Æ111-119	+++	3
Æ115-121	+++	2
Æ120-122	++++	5
Æ123-125	++++	5
Æ126-129	+++	5
Æ163-166	++++	3
K116 (Insertion von LISEEDL)	++++	3

[0026] ‡ In Bezug auf den Wildtyp ist wie folgt definiert:

++++ = Wildtyp- oder bessere Aktivität

+++ = ca. 75% der Wildtyp-Aktivität

++ = ca. 50% der Wildtyp-Aktivität

+ = ca. 25% der Wildtyp-Aktivität

+/- = Mutanten-EPO als aktiv angegeben, Daten jedoch nicht vollständig zur Einschätzung der Aktivität in Bezug auf den Wildtyp.

Zitierte Literaturhinweise

- (1) K. Akai, K. Yamaguchi und M. Ueda, Modified forms of human erythropoietin and DNA sequences encoding genes which can express them, EP 0427 189 A1.
- (2) T. Bittorf, R. Jaster und J. Brock (1993), FEBS Letts. 336: 133-136.
- (3) Ergebnisse von H.F. Bunn et al.
- (4) T.E. Byrne und S.G. Elliott, Erythropoietin isoforms, EP 0 668 351 A1.
- (5) Y. Chern, T. Chung und A.J. Sytkowski (1991), Eur. J. Biochem. 202: 225-229.
- (6) A. Funakoshi, H. Muta, T. Baba und S. Shimizu (1993), Biochem. Biophys. Res. Commun. 195: 717-722.
- (7) G. Okasinski, P.J. Devries, B.S. Mellovitz, J.L. Meuth und V.G. Schaefer, Erythropoietin analog compositions and methods, WO 94/25055.
- (8) J. Grodberg, K.L. Davis und A.J. Sytkowski (1993), Eur. J. Biochem. 218: 597-601.
- (9) Ergebnisse von V. Pulito et al.
- (10) C.B. Shoemaker, Erythropoietin composition, U.S. 4,835,260.

[0027] Wie hierin verwendet, steht die „natürliche Funktion“ eines Polypeptids für seine Funktion vor der kovalenten Modifikation seiner N-terminalen α -Aminogruppe. Zu natürlichen Funktionen zählen beispielsweise enzymatische Aktivität, Rezeptorbindung (z. B. Antikörper), Ligandenbindung und Immunogenität.

[0028] Die unten vollständiger beschriebenen vorliegenden Verfahren bewirken den Verlust der N-terminalen α -Aminogruppe des Polypeptids, das kovalent modifiziert wird. Demgemäß muss das Polypeptid eine derartige primäre Struktur aufweisen, dass seine natürliche Funktion nach der kovalenten Modifikation bewahrt wird und nicht eliminiert werden kann. Die natürliche Funktion des Polypeptids wird durch die Entfernung seiner N-terminalen α -Aminogruppe „eliminiert“, wenn eine solche Entfernung die Fähigkeit des Polypeptids, seine natür-

liche Funktion auszuüben, um mehr als 99% reduziert. In einer Ausführungsform reduziert die Entfernung die Fähigkeit des Polypeptids, seine natürliche Funktion auszuüben, nicht um mehr als 90%. In der bevorzugten Ausführungsform reduziert die Entfernung die Fähigkeit des Polypeptids, seine natürliche Funktion auszuüben, nicht um mehr als 50%.

[0029] Wie hierin verwendet, ist eine „Hydrazonbindung“ eine Bindung, die die kovalente Struktur NH-N=C umfasst, und eine „reduzierte Hydrazonbindung“ ist eine Bindung, die die kovalente Struktur NH-NH-C umfasst. Hierin sind Verbindungen, die reduzierte Hydrazonbindungen umfassen, bereitgestellt, da diese Bindungen über eine größere chemische Beständigkeit verfügen.

[0030] Wie oben erörtert, sind in der Technik Verfahren zum Binden von wasserlöslichen Polymeren an das N-terminale α -Kohlenstoffatom eines Polypeptids über eine Hydrazonbindung bekannt, solange der N-terminale Aminosäurerest Serin oder Threonin ist. Diese bekannten Verfahren werden nicht mit Polypeptiden mit einem beliebigen anderen N-terminalen Rest funktionieren. Obgleich sich diese bekannten Verfahren grundlegend von den vorliegenden Verfahren unterscheiden, resultieren sie in N-terminalen Serin- und Threonin-Polypeptiden mit einem Polymer, das über eine Hydrazonbindung an das N-terminale α -Kohlenstoffatom gebunden ist. Aus diesem Grund umfasst die vorliegende erste Zusammensetzung nicht ein Polypeptid, das über eine Hydrazonbindung an ein Polymer gebunden ist, wobei der N-terminale Aminosäurerest des Polypeptids Serin oder Threonin ist.

[0031] Zu den in der vorliegenden Erfindung verwendeten wasserlöslichen Polymeren zählen Polyalkylenglykol und Derivate davon, einschließlich PEG, mPEG, PEG-Homopolymere, Polypropylenglykol-Homopolymere, Copolymere von Ethylenglykol mit Propylenglykol, wobei die Homopolymere und Copolymere unsubstituiert oder an einem Ende mit einer Alkylgruppe substituiert sind. Diese Polymere können linear, verzweigt oder sternförmig mit einer großen Auswahl von Molekulargewichten sein. In der bevorzugten Ausführungsform ist das Polymer mPEG.

[0032] Wenn die vorliegenden Zusammensetzungen als Pharmazeutika verwendet werden sollen, ist das Polymer nichttoxisch. Des Weiteren, wenn von einem Polymer gesagt wird, dass es ein gegebenes Molekulargewicht hat, kann dieses Molekulargewicht nur ungefähr sein, wobei es das durchschnittliche Molekulargewicht eines Bestands von Polymermolekülen widerspiegelt, die sich in Bezug auf einander hinsichtlich der Anzahl der in jedem Molekül vorhandenen Untereinheiten unterscheiden.

[0033] In der bevorzugten Ausführungsform hat das PEG oder Derivat davon ein Molekulargewicht von etwa 5 000 Daltons. Außerdem ist das Polypeptid in der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Zusammensetzungen EPO und das Polymer ist mPEG mit einem Molekulargewicht von etwa 5 000 Daltons.

[0034] Diese Erfindung stellt auch vier Verfahren zum kovalenten Binden eines wasserlöslichen Polymers an das N-terminale α -Kohlenstoffatom eines Polypeptids bereit. Das erste Verfahren, das das Polymer über eine Hydrazonbindung an das Kohlenstoffatom bindet, umfasst die Schritte:

- a) In-Kontakt-Bringen des Polypeptids mit (i) einem Glyoxylation oder einem Derivat davon in einer Konzentration von 0,1 M bis 2,0 M, (ii) einem Übergangsmetallion in einer Konzentration von 10 μM bis 1 M und (iii) einer Lewis-Base in einer Konzentration von 10 mM bis 10 M, bei einem pH von 5,0 bis 7,0 und einer Temperatur von 0°C bis 100°C, um ein transaminiertes Polypeptid mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe zu bilden; und
- b) In-Kontakt-Bringen des transaminierten Polypeptids bei einem pH von 3,0 bis 5,0 mit einem wasserlöslichen Polymer, das eine daran kovalent gebundene Gruppe hat, die mit der N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das Polymer über eine Hydrazonbindung an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird, unter der Bedingung, dass das PEG ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat und die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernen seiner N-terminalen α -Aminogruppe nicht eliminiert wird.

[0035] Das dritte Verfahren umfasst die Schritte des ersten Verfahrens als auch einen weiteren Schritt des Reduzierens der in Schritt (b) gebildeten Hydrazonbindung. Der Reduzierungsschritt kann gemäß bekannten Verfahren unter Verwendung von beispielsweise Natriumtetrahydridoborat (NaBH_4) und Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) durchgeführt werden.

[0036] Glyoxylationsderivate beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Glyoxylamid- und Phenylglyoxylionen. Übergangsmetallionen beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Kupfer(II)-, Nickel(II)-, Cobalt(II)- und Zink(II)-Ionen. Lewis-Basen beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Acetat und Pyridin.

[0037] Gruppen, die mit der N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagieren, um eine Hydrazonbindung zu bilden, beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Hydrazincarboxylat, Hydrazin, Semicarbazid, Hydrazid, Thiosemicarbazid, Kohlendäuredihydrazid, Carbazid, Thiocarbazid und Arylhydrazid. Wasserlösliche Polymere mit diesen Gruppen, die kovalent daran gebunden sind, sind im Handel erhältlich. Darüber hinaus beinhalten Gruppen, die mit der N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagieren, um eine Oximbindung zu bilden, Oxylamin, sind aber nicht darauf beschränkt. Wasserlösliche Polymere mit Oxylamin (sowie andere oximbildende Gruppen), die kovalent daran gebunden sind, sind im Handel erhältlich.

[0038] In der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Verfahren ist das Protein EPO oder ein Derivat davon.

[0039] In der bevorzugten Ausführungsform hat das PEG oder das Derivat davon ein Molekulargewicht von etwa 5 000 Daltons.

[0040] In einer Ausführungsform des ersten Verfahrens ist die Gruppe, die an das Polymer gebunden ist, das mit dem transaminierten Polypeptid umgesetzt wird, Hydrazincarboxylat. In der bevorzugten Ausführungsform ist das Polypeptid EPO, das Polymer ist mPEG mit einem Molekulargewicht von etwa 5 000 Daltons und die Gruppe, die kovalent an das Polymer gebunden ist, ist Hydrazincarboxylat.

[0041] In jedem der vorliegenden Verfahren ist die bevorzugte Kontaktzeit für Schritt (a) von 20 Minuten bis 2 Stunden und ist die bevorzugte Kontaktzeit und die bevorzugte Temperatur für Schritt (b) von 10 bis 50 Stunden bzw. von 4°C bis Raumtemperatur.

[0042] Bei bestimmten Polypeptiden ist der N-Terminus eines Polypeptids „vergraben“, d. h. nicht Lösemitteln oder Reagenzien darin ausgesetzt, wenn das Polypeptid in seiner nativen Konformation ist. Reagenzien, wie Tetramethylharnstoff oder Harnstoff, können dazu verwendet werden, ein solches Polypeptid zu entfalten, um seinem N-terminalen Rest zu ermöglichen, die erforderlichen Reaktionen der vorliegenden Verfahren einzugehen.

[0043] Diese Erfindung stellt auch eine pharmazeutische Zusammensetzung bereit, die eine wirksame Menge der vorliegenden ersten oder zweiten Zusammensetzung und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfasst. Die vorliegende pharmazeutische Zusammensetzung kann beispielsweise eine Menge des vorliegenden mPEG-EPO umfassen, die zum Behandeln eines Patienten, der unter Anämie leidet, wirksam ist.

[0044] Pharmazeutisch akzeptable Träger sind dem Fachmann wohl bekannt und beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, 0,01-0,1 M und vorzugsweise 0,05 M Phosphatpuffer oder 0,8%-ige Kochsalzlösung. Darüber hinaus können solche pharmazeutisch akzeptablen Träger wässrige oder nichtwässrige Lösungen, Suspensionen und Emulsionen sein. Beispiele von nichtwässrigen Lösemitteln sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle, wie Olivenöl, und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Zu wässrigen Trägern zählen Wasser, alkoholische/wässrige Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen, darunter Kochsalzlösung und gepufferte Medien. Zu parenteral verabreichbaren Vehikeln zählen Natriumchloridlösung, Ringer-Dextrose, Dextrose und Natriumchlorid, Ringer-Laktat oder nichtflüssige Öle. Zu intravenös verabreichbaren Vehikeln zählen Mittel zum Wiederauffüllen der Flüssigkeits- und Nährstoffpegel, Mittel zum Wiederauffüllen des Elektrolytpegels, wie die auf Ringer-Dextrose basierten, und dergleichen. Konservierungsstoffe und andere Zusatzstoffe können ebenfalls vorliegen, wie beispielsweise antimikrobielle Mittel, Antioxidantien, Chelatbildner, Inertgase und dergleichen.

[0045] Schließlich stellt diese Erfindung Kits zur Verwendung beim Herstellen der vorliegenden Zusammensetzungen bereit. Das erste Kit zum Herstellen der ersten vorliegenden Zusammensetzung umfasst folgendes:

- (a) ein Glyoxylation oder Derivat davon;
- (b) ein Übergangsmetallion;
- (c) eine Lewis-Base; und

(d) ein wasserlösliches Polymer mit einem Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons und mit einer kovalent angebondenen Gruppe, die mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das Polymer an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird.

[0046] Die Reagenzien in diesen Kits können in einer vorherbestimmten Quantität verpackt und in separaten Fächern enthalten sein. Alternativ können bestimmte Reagenzien in ein und demselben Fach enthalten sein,

so es die Einschränkungen des vorliegenden Verfahrens gestatten. Schließlich können die Kits weiterhin reduzierende Reagenzien zum Erzeugen von reduzierten Hydrazonbindungen gemäß den vorliegenden Verfahren sowie geeignete Puffer und Reaktionsgefäße enthalten.

[0047] Diese Erfindung wird durch Bezugnahme auf die folgenden Versuchsbeispiele besser verstanden werden, der Fachmann wird jedoch bereitwillig zu schätzen wissen, dass die detaillierten spezifischen Versuche die Erfindung lediglich veranschaulichen, wie sie in den Ansprüchen vollständiger beschrieben ist, die danach folgen.

Versuchsbeispiele

1. Herstellung von transaminiertem EPO

[0048] 5 mg EPO in 20 mM Natriumcitrat (pH 6,9) und 100 mM NaCl wurden unter Verwendung von Centri-con-10 (Amicon, Beverly, MA, USA) mit 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 7,0) ausgetauscht. Die Endkonzentrationen wurden auf 1 mg/ml EPO, 2 M Natriumacetat, 0,4 M Essigsäure, 0,1 M Glyoxylsäure und 10 mM Kupfer(II)-sulfat (pH 5,5) eingestellt ([Fig. 1](#)). Die Reaktion wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur laufengelassen und wurde durch Zugabe von 100 ml 0,5 M EDTA gestoppt. Transaminiertes EPO wurde mittels einer Sephadex G-25-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) unter Verwendung eines 100 mM Natriumacetatpuffers (pH 4,5) gereinigt.

[0049] Das Ausmaß der Transaminierung wurde mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin geschätzt, wie in der Literatur beschrieben (R. Fields et al., Biochem. J., 1971, 121, 587). Die Extinktion bei 370 nm wurde nach den ersten paar Minuten und nach einer Stunde gemessen. Die Extinktionsdifferenz ist zur Anzahl der an dem EPO-Molekül vorhandenen Carbonylgruppen proportional. Das transaminierte EPO wurde zudem einer Aminosäureanalyse auf einem ABI 420H-System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter Anwendung von Vorsäulen-PITC-Chemie unterzogen. Die Ergebnisse zeigen, dass Lysinreste, d. h. nicht-N-terminale Reste, nicht transaminiert wurden.

2. Herstellung von mPEG-EPO mit mPEG-Hydrazincarboxylat

[0050] Transaminiertes EPO (1 mg) in 100 mM Natriumacetat (pH 4,5) wurde mit 0,5 M Natriumchlorid auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt, zu dem 10 mg mPEG5000-Hydrazincarboxylat (Shearwater Polymers, Huntsville, AL, USA) gegeben wurden. Die Reaktionsmischung wurde 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels einer Sephacryl s-200-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) unter Verwendung eines 20 mM Natriumcitratpuffers (7,0), der 100 mM NaCl enthielt, gereinigt. Darüber hinaus kann 0,1%-iges SDS zu der Reaktionsmischung gegeben werden, um die Vereinigungsausbeute zu erhöhen.

[0051] In einer Gelpermeationschromatographie zeigte das mPEG-EPO-Konjugat ein im Vergleich zu denen von EPO und mPEG5000-Hydrazincarboxylat erheblich erhöhtes Molekulargewicht ([Fig. 2](#)).

[0052] Matrixunterstützte Laserdesorptionsmassenspektrometrie (Finnigan-MAT LaserMAT 2000, lineare Laufzeit) wurde angewendet, um mPEG-EPO mittels Bestimmung des Molekulargewichts zu charakterisieren ([Fig. 3](#)). mPEG5000-Hydrazincarboxylat zeigt ein Ion bei m/z 5 157,4. EPO zeigt ein zweifach geladenes Monomer (m/z 14 604), ein einfach geladenes Monomer (m/z 28 569), ein Dimer (m/z 57 208) und ein Trimer (m/z 85 284). In ähnlicher Weise zeigt mPEG-EPO ein zweifach geladenes Monomer (m/z 17 092), ein einfach geladenes Monomer (m/z 34 279), ein Dimer (m/z 69 071) und ein Trimer (m/z 102 955).

[0053] Ein Zirkulardichroismus-Spektrum (CD-Spektrum) (Jobin-YVON CD6, Dichrograph Spectrometer Instruments, SA, Edison, NJ, USA) von mPEG-EPO zeigte, dass das Protein die in nativem EPO vorliegende α -helikale Bündelstruktur bewahrte (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis bedeutet, dass ein PEG-Molekül an dem N-terminalen Ende von EPO seine sekundäre Struktur nicht stört.

3. Herstellung von mPEG-EPO mit mPEG-Hydrazid

[0054] Transaminiertes EPO (1 mg) in 100 mM Natriumacetat (pH 4,5) wurde mit 0,5 M Natriumchlorid, 0,1%-igem SDS auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt und 10-20 mg mPEG5000-Hydrazid wurden zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 40 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und mittels einer Sephacryl S-200-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) unter Verwendung eines 20 mM Natriumcitratpuffers (7,0), der 100 mM NaCl enthielt, gereinigt.

[0055] Die mPEG-EPO-Konjugate wurden mittels 4-15%-iger SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit verschiedenen Verfahren analysiert: Coomassie-Färbung (für Proteine spezifisch), Western-Blot (für EPO spezifisch) und Iodfärbung (für PEG spezifisch). Die Migrationsdistanz von mPEG-EPO-Konjugaten mit höherem Molekulargewicht auf SDS-PAGE war geringer als die von nativem EPO. Das isoelektrische Fokussierungsmuster weist darauf hin, dass der isoelektrische Punkt (pI) von EPO bei Modifikation nicht wesentlich verändert wird. Transaminiertes EPO ist jedoch etwas azidischer als natives EPO und mPEG-EPO.

[0056] Da die EPO- und mPEG-EPO-Banden durch SDS-PAGE gut getrennt werden, kann diese Technik zum Überwachen der Effizienz der Konjugationsreaktion verwendet werden. Es wurde beobachtet, dass die Konjugationsreaktion zu > 95% abgeschlossen war, wenn mPEG5000-Hydrazincarboxylat verwendet wurde, wohingegen die Reaktion nur zu etwa 20% abgeschlossen war, wenn mPEG5000-Hydrazid, mPEG5000-Semicarbazid oder mPEG5000-Oxylamin verwendet wurde. Folglich scheint die Hydrazincarboxylatgruppe gegenüber Carbonylgruppen reaktionsfähiger zu sein als die Hydrazid-, Semicarbazid- oder Oxylamingruppe.

4. Reaktivität von mPEG-EPO mit Anti-EPO-Antikörper

[0057] Die Antigenität von mPEG-EPO wurde unter Verwendung eines Quantikine™ IVD™ EPO ELISA-Kits (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) untersucht. Das Assay besteht aus einer Mikrotiterplatte, die mit einem monoklonalen Antikörper zu EPO beschichtet ist. EPO oder mPEG-EPO werden mit der beschichteten Platte wechselwirken gelassen. Nach dem Waschen der Platte wird ein Konjugat von polyklonalem Anti-EPO-Antikörper und Meerrettichperoxidase zugegeben. Nach dem Entfernen des überschüssigen Konjugats wird ein Chromogen in die Näpfe gegeben und mittels der Enzymreaktion oxidiert, um einen Komplex von blauer Farbe zu bilden. Die Extinktion dieses Komplexes wird bei 450 nm gemessen.

[0058] Die Ergebnisse des ELISA-Assays für mPEG-EPO mit einer Hydrazonbindung, die aus Hydrazincarboxylat (HZA) und Hydrazid (HZ) gebildet wurde, sind in [Fig. 5](#) dargestellt. Die Daten zeigen, dass selbst ein PEG-Molekül, das an den N-Terminus von EPO angelagert ist, die Affinität für monoklonale Antikörperbindung an EPO erheblich verringert, möglicherweise aufgrund sterischer Hinderung.

5. In-vitro-Aktivität von mPEG-EPO

[0059] Die biologische Aktivität von mPEG-EPO in vitro wurde mit einem Zellproliferationsassay unter Verwendung von FDC-P1/HER-Zellen, einer hämatopoetischen Mauszelllinie, beurteilt. Die Zelllinie exprimiert den EPO-Rezeptor und ist in Bezug auf Wachstum vom EPO abhängig. Nachdem man die Zellen 24 Stunden in Abwesenheit von EPO hat wachsen lassen, wurde den Zellen EPO oder mPEG-EPO zugesetzt. Die Zellen wurden 42 Stunden inkubiert und dann wurde den Zellen tritiiertes Thymidin zugesetzt. Nach 6 Stunden wurde das Zellwachstum durch Beimischung von Thymidin bestimmt.

[0060] Die Ergebnisse des Zellproliferationsassays für transaminiertes EPO und mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die aus Hydrazincarboxylat (HZA) und Hydrazid (HZ) gebildet wurden, sind in [Fig. 6](#) dargestellt. Transaminiertes EPO zeigt volle biologische Aktivität im Vergleich zu nativem EPO, wie durch seinen ED₅₀-Wert bestimmt. Die mPEG-EPO-Proben mit Hydrazonbindungen, die aus Hydrazincarboxylat (HZA) und Hydrazid (HZ) gebildet wurden, bewahren nur 38,5% bzw. 25% Aktivität, wie durch ihre ED₅₀-Werte bestimmt. Die Daten zeigen, dass ein PEG-Molekül, das an den N-Terminus von EPO angelagert ist, die Affinität von EPO für seinen Rezeptor erheblich verringert, möglicherweise aufgrund sterischer Hinderung.

6. In-vivo-Aktivität von mPEG-EPO

[0061] Die In-vivo-Aktivität von mPEG-EPO wurde mit einem Bioassay an exhypoxischen Mäusen (P.M. Coates et al., Nature, 1961, 191, 1 065) beurteilt. Die Bildung von endogenen Erythrozyten in den Mäusen wurde mittels der Polyzythämie unterdrückt, die durch Einwirkung von vermindertem Druck erzeugt wurde. Das EPO- oder mPEG-EPO-Konjugat wird mit einer Konzentration von 1 Einheit/Maus injiziert. 48 Stunden nach der Injektion von EPO oder mPEG-EPO wurde Eisen-59 verabreicht. Die Eisen-59-Aufnahme, die die Bildung von neuen Erythrozyten anzeigt, wurde 48, 72 und 96 Stunden nach der Verabreichung von EPO oder mPEG-EPO gemessen.

[0062] Die Ergebnisse des Bioassays an exhypoxischen Mäusen für mPEG-EPO mit Hydrazonbindungen, die mit Hydrazincarboxylat (HZA), Hydrazid (HZ) und Semicarbazid (SCZ) gebildet wurden, sind in [Fig. 7](#) dargestellt. Die mPEG-EPO-Proben zeigen eine hohe In-vivo-Aktivität sowie eine längere Aktivitätsdauer im Vergleich zu nativem EPO. Die In-vivo-Ergebnisse zeigen, dass mPEG-EPO-Proben eine längere Zirkulationszeit

in vivo und eine retardierte Abgabe von EPO während der Zirkulation aufweisen.

7. Herstellung von mPEG-Fibrin-17-29-Dimer

[0063] Das Fibrin-17-29-Dimer weist die folgende Struktur auf:

Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys

S

S

Gly-Pro-Arg-Val-Val-Glu-Arg-His-Gln-Ser-Ala-Cys-Lys

[0064] 2 mg Fibrin-17-29-Dimer wurden in 0,5 ml 2 M Natriumacetat, 0,4 M Essigsäure, 0,1 M Glyoxylsäure und 10 mM Kupfer(II)-sulfat (pH 5,5) gelöst. Die Reaktion wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur weiterlaufen gelassen und wurde durch Zugabe von 20 ml 0,5 M EDTA gestoppt. Transaminiertes Fibrin-Dimer wurde mittels einer Sephadex G-10-Säule (Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) unter Verwendung eines 100 mM Natriumacetatpuffers (pH 4,5) gereinigt. Transaminiertes Fibrin-Dimer zeigte in der Aminosäureanalyse erheblich reduziertes Gly, was auf die Transaminierung von N-terminalem Gly hindeutet.

[0065] 1 mg transaminiertes Fibrin-Dimer in 0,5 ml 100 mM Natriumacetat (pH 4,5) wurde 10 mg mPEG5000-Hydrazincarboxylat zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das mPEG-Fibrin-Dimer wurde mittels Anionenaustausch-Chromatographie mit einer HEMA IEC BIO CM-Säule (Alltech) gereinigt. Die mobile Phase A war 20 mM Natriumacetat (pH 5,5). Die mobile Phase B war 0,2 M MOPS, 0,05 M einwertiges Kaliumphosphat und 0,25 M zweiwertiges Kaliumphosphat (pH 7,5). Der Gradient war 100% A für 5 Minuten, dann 0 bis 100% B in 25 Minuten. Ein neuer Peak bei 14,5 Minuten, der vor dem unmodifizierten Fibrin-Dimer (18 Minuten) erschien, wurde zur weiteren Analyse gesammelt. Ein Laser-desorptionsmassenspektrum zeigte das Ion bei m/z 8 070,9, was bewies, dass ein PEG-Molekül an dem Fibrin-Dimer angelagert war (m/z 2 986,6).

Patentansprüche

1. Stoffzusammensetzung, bestehend im wesentlichen aus einem Peptid oder einem Protein und PEG oder einem Derivat davon, kovalent an dem N-terminalen α -Kohlenstoffatom des Polypeptids gebunden, unter der Bedingung, daß (a) das PEG und Polypeptid aneinander über eine Hydrazonbindung oder reduzierte Hydrazonbindung gebunden sind, (b) das PEG ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat, (c) die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernung seiner N-terminalen Aminogruppe nicht eliminiert wird, und (d) der N-terminale Aminosäurerest des Proteins nicht Serin oder Threonin ist.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Protein EPO oder ein Derivat davon ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das PEG oder Derivat davon ein Molekulargewicht von ungefähr 5 000 Daltons hat.

4. Zusammensetzung nach Anspruch 1, wobei das Protein EPO ist und das PEG mPEG mit einem Molekulargewicht von ungefähr 5 000 Daltons ist.

5. Verfahren zum kovalenten Binden von PEG an das N-terminale α -Kohlenstoffatom eines Polypeptids, das die Schritte umfaßt:

a) In-Kontakt-Bringen des Polypeptids mit (i) einem Glyoxylation oder einem Derivat davon in einer Konzentration von 0,1 M bis 2,0 M, (ii) einem Übergangsmetallion in einer Konzentration von 10 μ M bis 1 M und (iii) einer Lewis-Base in einer Konzentration von 10 mM bis 10 M, bei einem pH von 5,0 bis 7,0 und einer Temperatur von 0°C bis 100°C, um ein transaminiertes Polypeptid mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe zu bilden; und

b) In-Kontakt-Bringen des transaminierten Polypeptids bei einem pH von 3,0 bis 5,0 mit PEG oder einem Derivat davon, das eine daran kovalent gebundene Gruppe hat, die mit der N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das PEG an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird, unter der Bedingung, daß das PEG ein Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons hat und die natürliche Funktion des Polypeptids bei Entfernen seiner N-terminalen α -Aminogruppe nicht eliminiert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Protein EPO oder ein Derivat davon ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das PEG oder Derivat davon ein Molekulargewicht von ungefähr 5 000 Daltons hat.
8. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Gruppe, die kovalent an das PEG gebunden ist, Hydrazincarboxylat ist.
9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Protein EPO ist, das PEG mPEG mit einem Molekulargewicht von ungefähr 5 000 Daltons ist und die an das PEG kovalent gebundene Gruppe Hydrazincarboxylat ist.
10. Verfahren nach Anspruch 5, das weiterhin den Schritt des Reduzierens der in Schritt (b) gebildeten Hydrazonbindung umfaßt, um eine reduzierte Hydrazonbindung zu bilden.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine wirksame Menge der Zusammensetzung nach Anspruch 1 und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.
12. Kit zur Verwendung beim Herstellen der Zusammensetzung nach Anspruch 1, der folgendes umfaßt:
 - (a) ein Glyoxylation oder Derivat davon;
 - (b) ein Übergangsmetallion;
 - (c) eine Lewis-Base; und
 - (d) PEG oder ein Derivat davon mit einem Molekulargewicht von 700 bis 20 000 Daltons und mit einer kovalenten angebondenen Gruppe, die mit einer N-terminalen α -Carbonylgruppe des transaminierten Polypeptids reagiert, um eine Hydrazonbindung zu bilden, wodurch das PEG an das N-terminale α -Kohlenstoffatom des Polypeptids kovalent gebunden wird.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

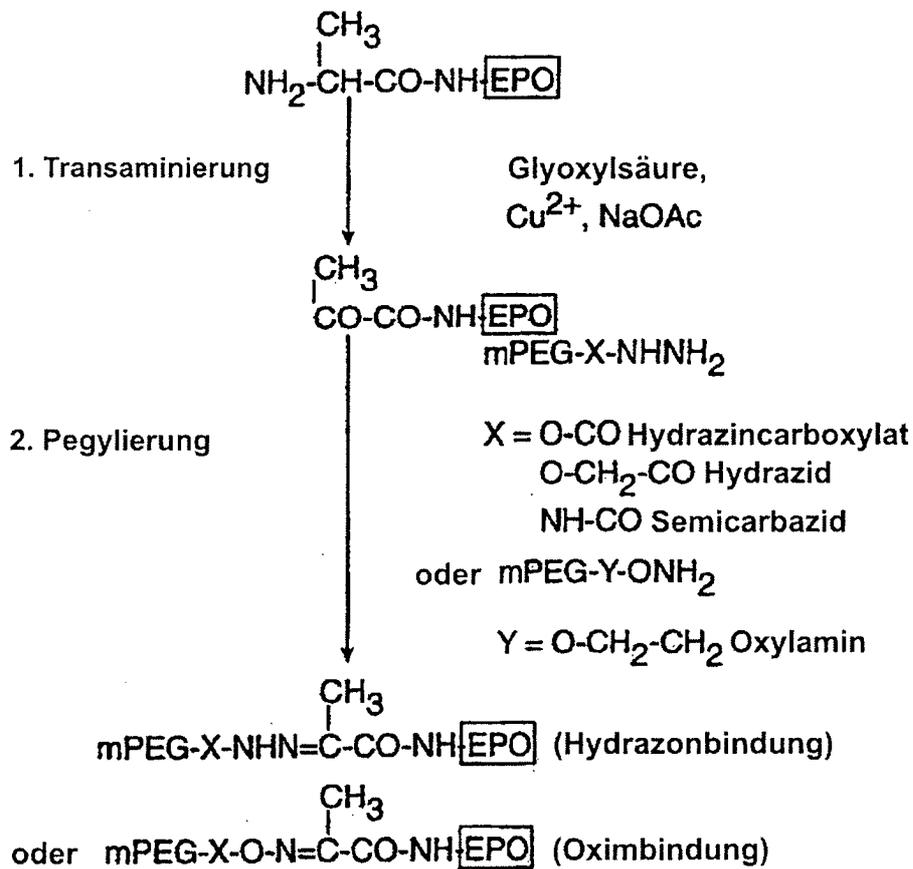
FIG. 1

FIG. 2

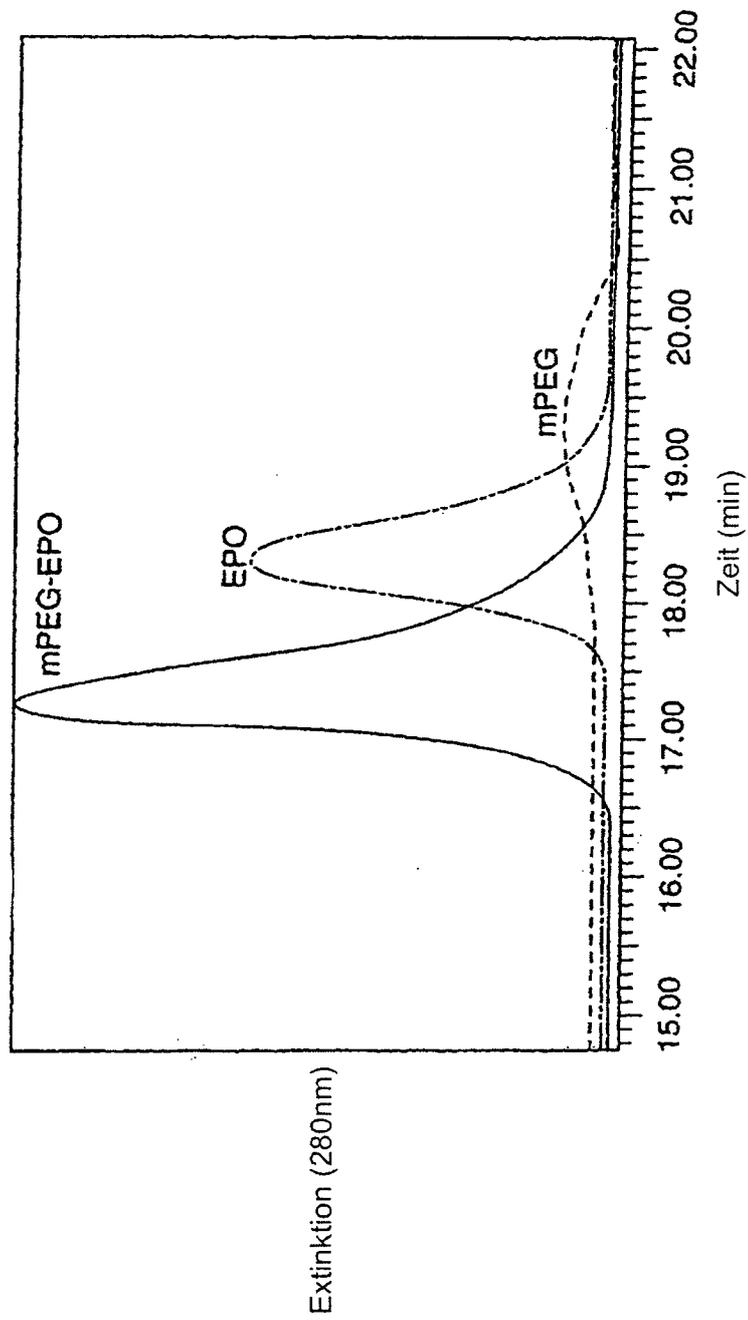


FIG. 3A

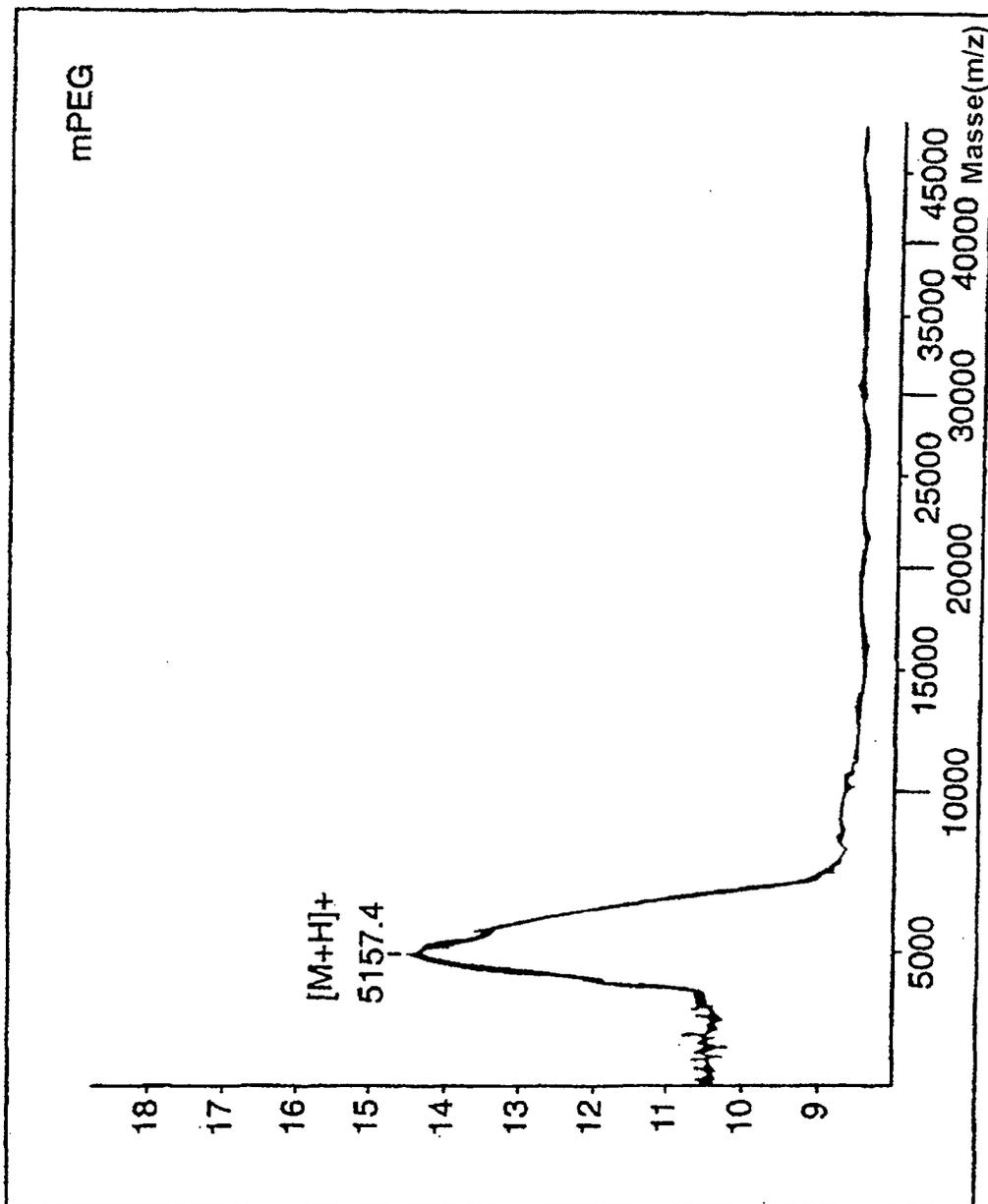
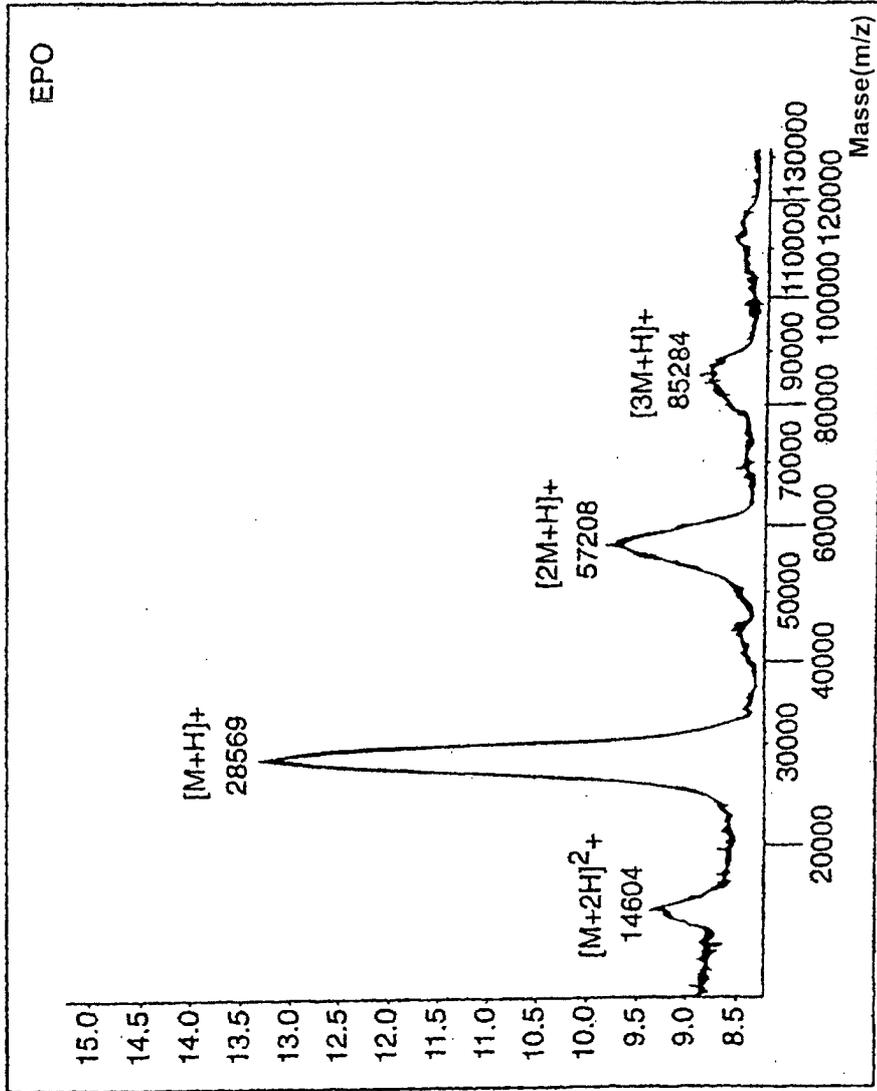


FIG. 3B



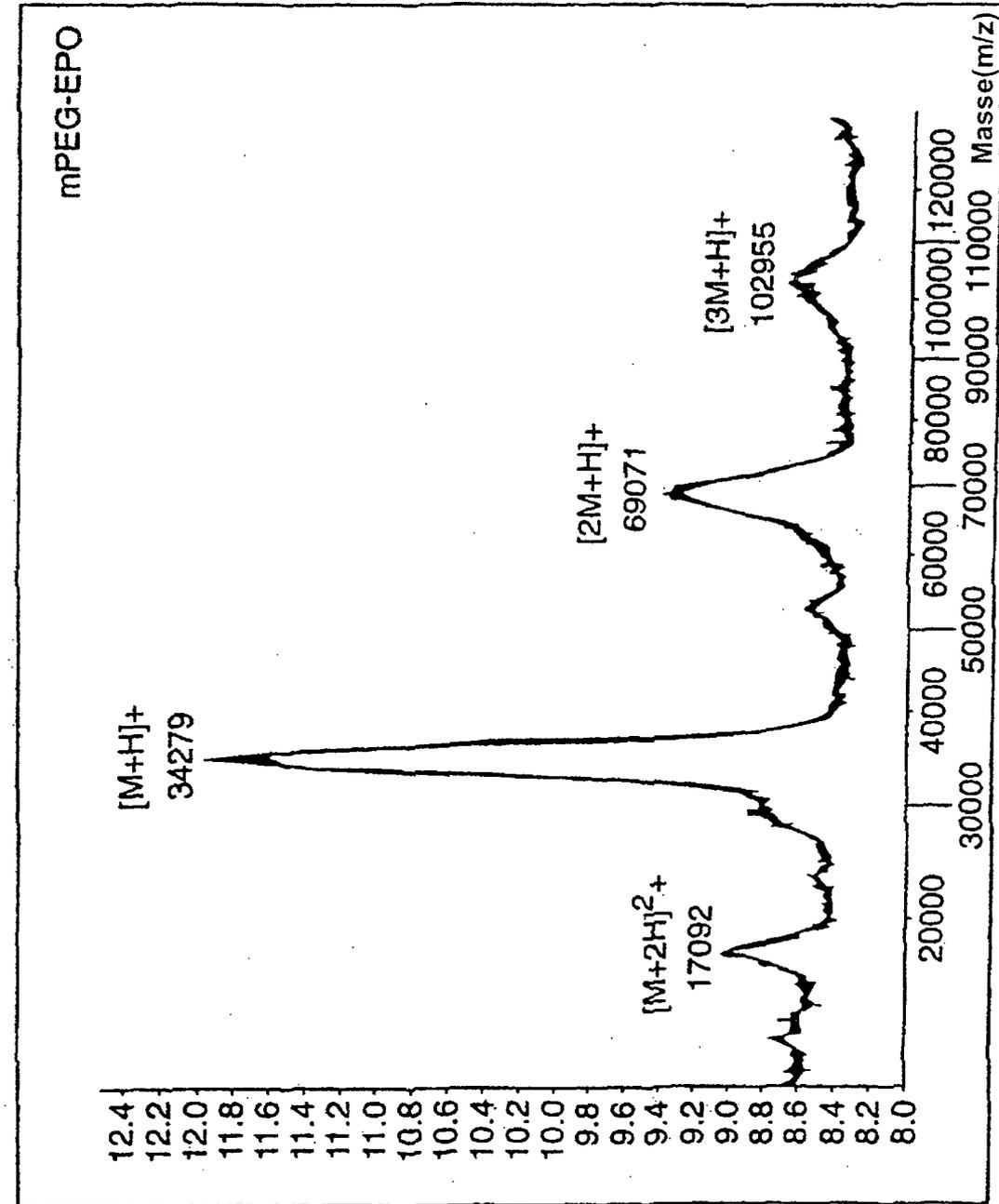


FIG. 3C

FIG. 4A

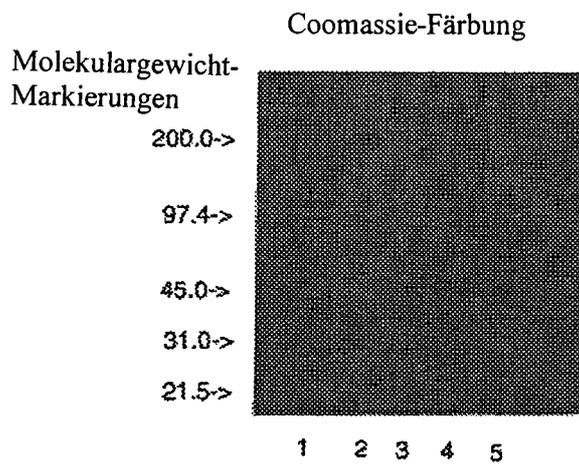


FIG. 4B

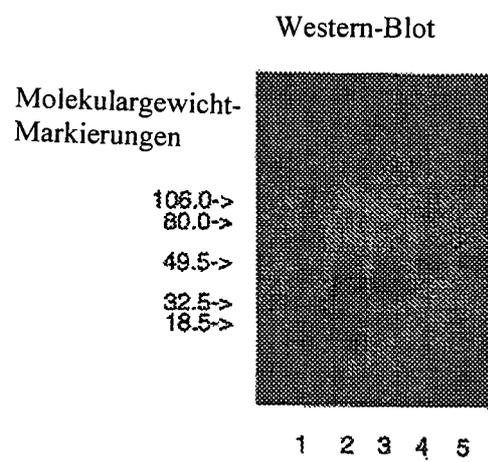


FIG. 4C

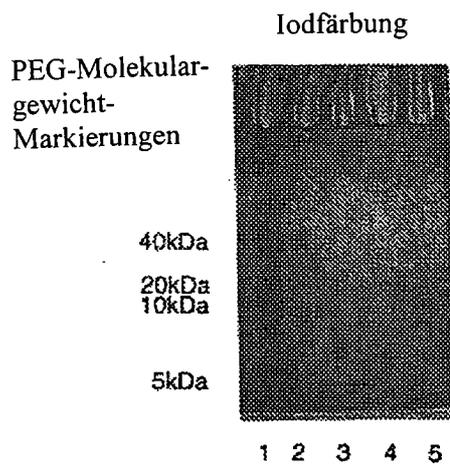


FIG. 4D

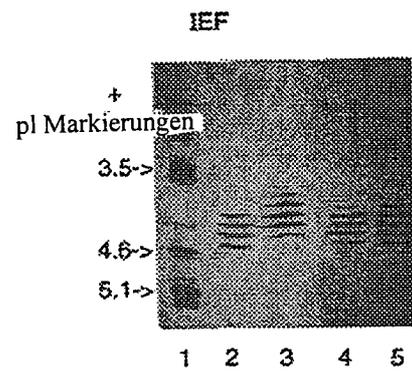


FIG. 5

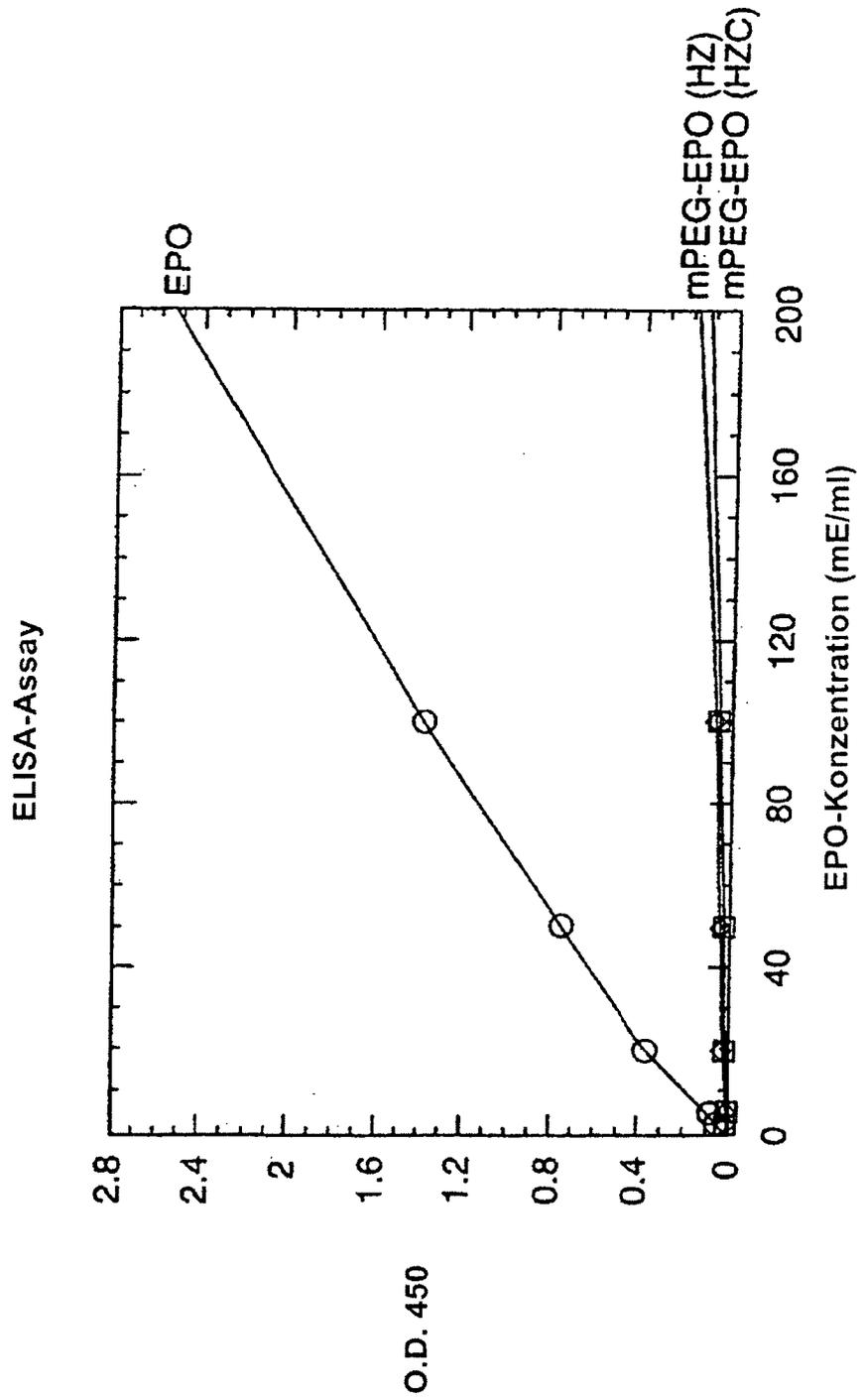


FIG. 6

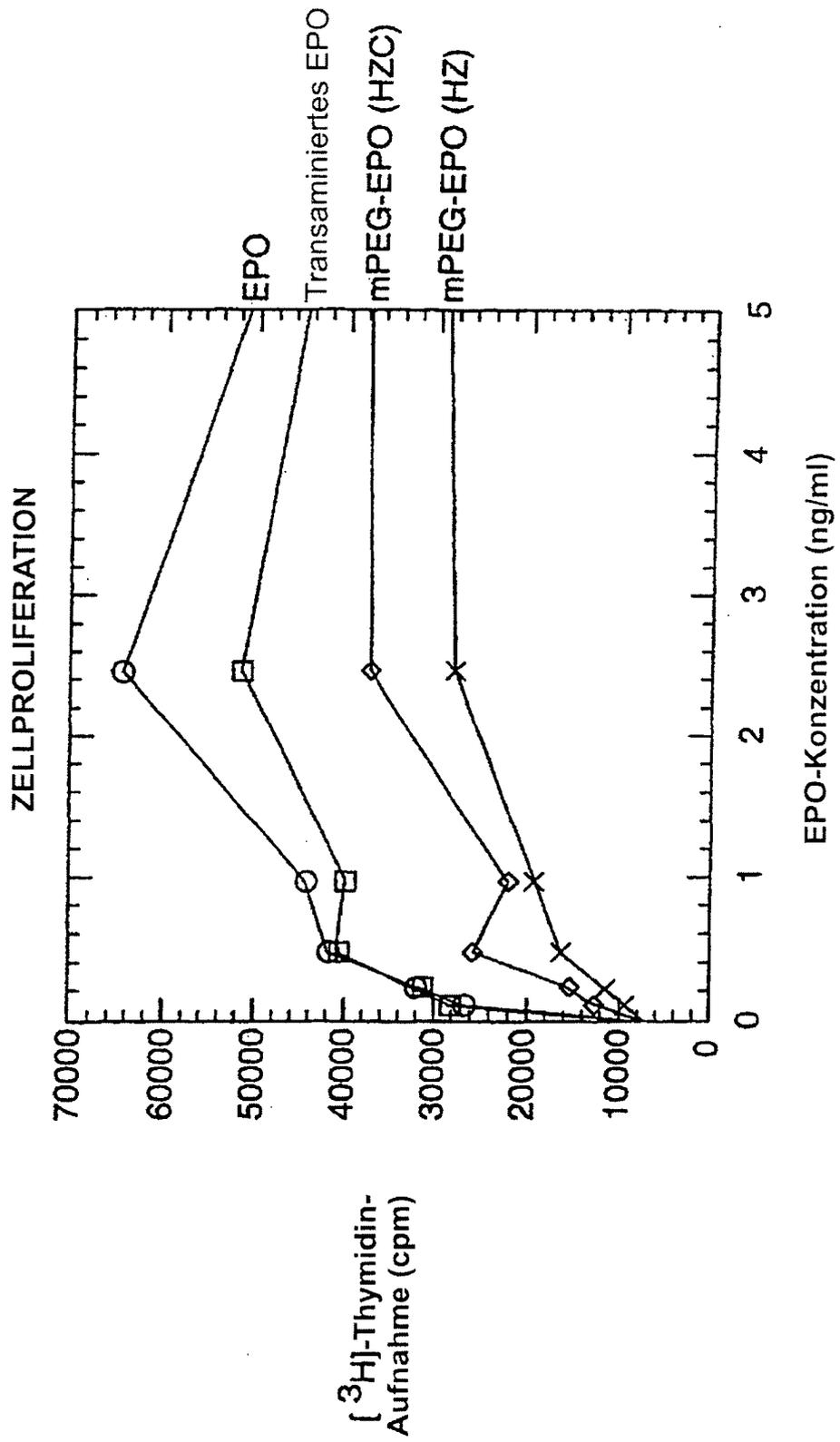


FIG.7

