

(19) **KG** (11) **338** (13) **C2**(51)⁷ **C07K 17/ 08, 14/56; C08G 65/329;
A61K 47/48, 38/21; A61P 35/02**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ **к патенту Кыргызской Республики**

(21) 970073.1
(22) 30.05.1997
(31) 60/018834
(32) 31.05.1996
(33) CH
(46) 03.09.2001, Бюл. №8
(71) (73) Ф. Хоффманн-Ля Рош АГ (CH)
(72) Байлон П.С., Паллерони А.В. (US)
(56) EP 0593868 B1, 1994;
EP 0510356 A1, 1992;
EP 0400472 A2, 1990;
EP 0473084 A2, 1992;
EP 0400486 A3, 1990;
SU 681837 A, 1980

(54) Физиологически активные конъюгаты ПЭГ- α -IFN

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к физиологически активным разветвленным конъюгатам ПЭГ- α -IFN, обладающим более высокой антипролиферативной активностью и меньшей антивирусной активностью по сравнению с α -IFN и другими конъюгатами ПЭГ- α -IFN. 8 з.п. ф-лы, 4 табл., 6 пр., 6 ил.

Изобретение относится к медицине, в частности, к конъюгатам интерферона, обладающим антивирусной и антипролиферативной активностью.

Интерферон, в частности α 2a-интерферон, применяют для лечения, например, лейкоемического ретикулеза и саркомы Капоши, и он также проявляет активность в отношении гепатита. Для улучшения стабильности и растворимости и уменьшения иммуногенности фармацевтически активные протеины, такие как интерферон, могут быть конъюгированы с полимером полиэтиленгликолем (ПЭГ).

Биологическая доступность терапии с использованием протеинов часто ограничена их коротким периодом полураспада в плазме, что препятствует достижению их максимального лечебного действия. В последние годы подтверждено, что ПЭГ-конъюгированные биологические молекулы обладают полезными лечебными свойствами (Inada et al, J. Bioact. And Compatible Polimers 5, 343 (1990); Delgado et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9, 249 (1992); Katre, Advanced Drug Delivery Systems 10, 91 (1993)). Они обладают лучшей стабильностью и теплостойкостью, стойки к ферментному разложению, имеют повышенную растворимость, более длитель-

ный период полураспада в кровотоке *in vivo*, пониженный клиренс и повышенную эффективность. Другими свойствами ПЭГилированных протеинов являются пониженная иммуногенность и антигенность, а также пониженная токсичность. Другим эффектом ПЭГилирования определенных протеинов может быть снижение активности *in vitro*, сопровождаемое увеличением активности *in vivo*. Это обнаружено, в частности, на G-CSF (колониестимулирующем факторе гранулоцитов) (Satake-Ishikawa et al., Cell Structure and Function 17, 157-160 (1992)), на IL-2 (интерлейкин-2) (Katre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1487 (1987)), на TNF- α (фактор некроза опухоли) (Tsutsumi et al., Jpn. J. Cancer Res. 85, 9 (1994)), на IL-6 (интерлейкин-6) (Inoue et al., J. Lab. Clin. Med. 124, 529 (1994)) и на CD4-IgG (антиген Т-лимфоцитов-иммуноглобулин G) (Chamowet et al., Bioconj. Chem. 5, 133 (1994)) и на других.

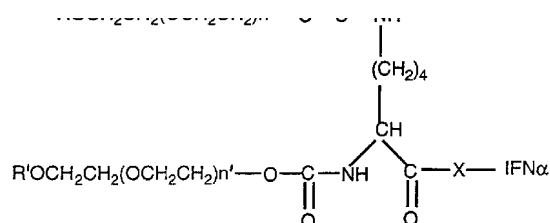
Известны конъюгаты ПЭГ- α -IFN (EP 0593868 B1, кл. C07K 14/56; A61K 47/48; C08G 65/32; C07D 213/64; C07C 69/9, Karasiewicz et al., PEG-interferon conjugates, Bulletin 1998/16; EP 0510356 A1, кл. A61K 47/48 1992, Nakimi J., et al, Polietilene glycol protein conjugates), которые являются линейными конъюгатами. Из опубликованных источников (Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6, 62 (1995)), следует, что разветвленные ПЭГ-конъюгаты обладают более высоким значением pH и термостойкостью и большей стабильностью по отношению к протеолитическому разложению по сравнению с линейными ПЭГ-конъюгатами.

Обнаружено, что в случае интерферона ПЭГилирование снижает антивирусную активность *in vitro*, но увеличивает антипролиферативную активность в отношении клеток опухоли человека. Однако новые ПЭГ-конъюгаты по настоящему изобретению обладают свойствами, заключающимися в том, что антипролиферативная активность существенно увеличена по сравнению с активностью других ПЭГ-конъюгатов α -интерферона, однако наблюдается аналогичное снижение антивирусной активности. Кроме того, ПЭГ-конъюгаты α -интерферона по настоящему изобретению не обладают иммуногенностью, в результате чего фактически при их введении не образуются антитела. В противоположность этому другие ПЭГ-конъюгаты α -интерферона в определенной степени вызывают образование антител.

Задачей изобретения является получение ПЭГ-производных α -интерферона (α -IFN). Конъюгаты по настоящему изобретению, как описано ниже, включают ПЭГ, имеющий разветвленное строение. Разветвленный ПЭГ обладает тем преимуществом, что имеет возможность присоединять две молекулы линейного ПЭГ в одной точке, удваивая, таким образом, массу присоединенного ПЭГ и не увеличивая количества точек ПЭГилирования.

По сравнению с немодифицированным α -IFN (т.е. α -IFN без присоединенного ПЭГ) конъюгаты обладают увеличенным периодом полураспада в кровотоке и временем нахождения в плазме, уменьшенной иммуногенностью, пониженным клиренсом и увеличенной антипролиферативной активностью, что сопровождается пониженной антивирусной активностью *in vitro*. Конъюгаты по настоящему изобретению по сравнению с другими конъюгатами ПЭГ- α -IFN обладают существенно более высокой антипролиферативной активностью, не связанной пропорциональной зависимостью с усилением или снижением других характеристик, и фактически не обладает иммуногенностью.

Физиологически активные конъюгаты ПЭГ- α -IFN по настоящему изобретению имеют формулу I:



(I)

Конъюгаты по настоящему изобретению имеют такие же области применения, что и α -IFN, например, в качестве антипролиферативного средства. В частности, ПЭГ-конъюгаты α -интерферона по настоящему изобретению пригодны для лечения иммуномодуляторных нарушений, таких как заболевания, относящиеся к опухоли, например, лейкомический ретикулез, хрони-

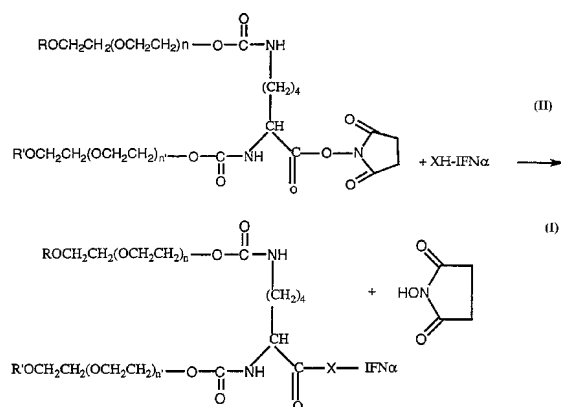
группа также включает разветвленные алкилы. Предпочтительным алкилом является метил. В двух группах ПЭГ формулы I R и R' могут быть одинаковыми или различными.

Под α -IFN (α -интерферон) и его разновидностями $\alpha 2a$ -IFN понимают природный или рекомбинантный протеин, предпочтительно человеческий, получаемый из любого обычного источника, такого как ткани, путем химического синтеза протеина из культуры клеток с использованием нативных и рекомбинантных клеток. Под объем настоящего изобретения подпадает любой протеин, обладающий активностью α -IFN, в том числе мутеины или модифицированные каким-либо другим образом протеины. Методика получения и выделения α -IFN из природных или рекомбинантных источников хорошо известна (Pestka, Arch. Biochem. Biophys. 221, 1 (1983)). Предпочтительным α -IFN, как указано выше, является $\alpha 2a$ -IFN, получаемый известными способами (Pestka, Sci. Am. 249, 36 (1983); EP 43980)).

Физиологически активные конъюгаты формулы I обладают активностью α -IFN, под которой понимают любую частичную или усиленную известную активность α -IFN, определяемую различными способами, известными в данной области техники. В частности, конъюгаты по настоящему изобретению обладают активностью α -IFN, а именно, как установлено, антипролиферативным действием в отношении клеток опухоли и антивирусной активностью в отношении клеток, зараженных вирусом. Такая активность конъюгатов может быть определена способами, хорошо известными в данной области техники, например, описанными ниже способами (см. также у Rubinstein и др., J. Virol. 37, 755 (1981); Borden и др., Canc. Res. 42, 4948 (1982)).

Конъюгаты формулы I получают путем ковалентного связывания α -IFN с ПЭГ, который может быть активирован замещением гидроксильной группы ПЭГ на связывающую группу с образованием реагента, представляющего собой производное ПЭГ в виде N-гидрокси-сукцинимидного эфира (в частности монометокси-ПЭГ) формулы II. Реагент может быть получен традиционными методами (Monfardini и др., см. выше). Связывание происходит через амидную или эфирную связь. В изобретении связывание происходит через амидную связь (X обозначает NH).

X обозначает место присоединения на α -IFN, посредством которого ПЭГ-реагент формулы II ковалентно связывается с α -IFN. Реагенты присоединяются к первичным аминогруппам ($XH = NH_2$), например, лизина, или к N-концам α -IFN. Реагенты также могут быть присоединены к гидроксилу ($XH = OH$), например, серина.



Реагент формулы II (ПЭГ2-NHS), в котором в целом две цепи монометокси-ПЭГ (м-ПЭГ) связаны с лизином, каждая с α - и ϵ -аминогруппами, через карбаматные (уретановые) связи и который содержит карбоксильную группу лизина, активированную до сукцинимидилового эфира, может быть получен обычными методами в соответствии с известными способами (Monfardini и др., см. выше), применимыми к реагенту, в котором R обозначает низший алкил и с требуемым значением n. Такой реагент поставляется, например, фирмой Shearwater Polymers, Inc. (Хантсвилл, шт. Алабама). Предпочтительная средняя молекулярная масса получаемого ПЭГ составляет приблизительно 20000 Да, что обеспечивает общую массу ПЭГ в ПЭГ 2-NHS приблизительно 40000 Да (полимеры с другими молекулярными массами могут быть получены традиционными методами путем изменения значения n в исходных материалах для реагента формулы II, представляющих собой спиртовой ПЭГ).

Реагент формулы II может быть конъюгирован с α -IFN традиционными способами. В частности, реагент формулы II подвергают взаимодействию с одной или несколькими первичными аминогруппами (например, с N-концевыми группами или с боковыми цепями лизина) α -IFN (например, α 2a-IFN) для образования амидной связи между α -IFN и полимерной основой ПЭГ. Реакция ПЭГилирования также может происходить между ПЭГ2-NHS и свободными (если они присутствуют) гидроксильными группами (например, серина) α -IFN с образованием сложноэфирной связи. Механизм реакции приведен выше. Условия реакции являются обычными для специалистов в данной области техники и более подробно приведены ниже. ПЭГ-реагент объединяют с α -IFN в среднещелочных условиях при низкой температуре и в условиях, пригодных для нуклеофильного замещения, что приводит к получению конъюгатов формулы I. Это также показано выше на схеме реакции.

Присоединение реагентов к α -IFN может быть осуществлено традиционными методами. Могут быть использованы ПЭГ по настоящему изобретению с любыми wybranными молекулярными массами. Условия реакции могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить получение конъюгатов по изобретению с одним присоединенным реагентом. Конъюгаты формулы I, к которым присоединен один реагент формулы II, отделяют от немодифицированного α -IFN и от конъюгатов, имеющих более одной присоединенной молекулы реагента, традиционными способами.

Для разделения конъюгатов на основе различия в зарядах могут применяться методы очистки, такие как катионообменная хроматография, которая позволяет эффективно разделять конъюгаты на основе их различных молекулярных масс. Содержание фракций, получаемых в результате катионообменной хроматографии, может быть определено по молекулярной массе с использованием известных способов, например, с помощью масспектроскопии, электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) или других, применяемых для разделения молекулярных энантиомеров по молекулярной массе. Затем соответственно определяют фракцию, которая содержит конъюгаты формулы I, очищенные от немодифицированного α -IFN и от конъюгатов, имеющих более одного присоединенного реагента. Кроме того, реагенты формулы II при кислотном гидролизе высвобождают по одной молекуле лизина на молекулу реагента, так что количество молекул лизина при гидролизе показывает количество групп ПЭГ, присоединенных к протеину, и таким образом может быть подтверждено количество молекул реагента, присоединенных к конъюгатам.

Изобретение проиллюстрировано на примерах, которые не ограничивают его объем. В этих примерах использован α 2a-IFN. Другие виды α -IFN также могут быть конъюгированы с ПЭГ способами, приведенными в примерах.

Фиг. 1. Противоопухолевая активность ПЭГ2- α 2a-IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии A498. Всем животным за 33 дня до начала эксперимента (день-33) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии A498. Обработку с помощью ПЭГ2- α 2a-IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (30, 60, 120 или 300 мкг) ПЭГ2- α 2a-IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 1 раз в неделю в течение 4-недельного периода.

Фиг. 2. Противоопухолевая активность α 2a-IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии A498. Всем животным за 33 дня до начала эксперимента (день-33) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии A498. Обработку с помощью α 2a-IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (10, 20, 40 или 100 мкг) α 2a-IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 3 раза в неделю в течение 4-недельного периода.

Фиг. 3. Противоопухолевая активность ПЭГ2- α 2a-IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии ACHN. Всем животным за 25 дней до начала эксперимента (день-25) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии ACHN. Обработку с помощью ПЭГ2- α 2a-IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (30, 60, 120 или 300 мкг) ПЭГ2- α 2a-IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 1 раз в неделю в течение 5-недельного периода.

Фиг. 4. Противоопухолевая активность α 2a-IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии ACHN. Всем животным за

25 дней до начала эксперимента (день-25) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии ACHN. Обработку с помощью $\alpha 2a$ -IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (10, 20, 40 или 100 мкг) $\alpha 2a$ -IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 3 раза в неделю в течение 5-недельного периода.

Фиг. 5. Противоопухолевая активность ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии G402. Всем животным за 45 дней до начала эксперимента (день-45) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии G402. Обработку с помощью ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (30, 60, 120 или 300 мкг) ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 1 раз в неделю в течение 5-недельного периода.

Фиг. 6. Противоопухолевая активность $\alpha 2a$ -IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали почечные клетки человека линии G402. Всем животным за 45 дней до начала эксперимента (день-45) подкожно вводили имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии G402. Обработку с помощью $\alpha 2a$ -IFN начинали в день 0 эксперимента. Указанные количества (10, 20, 40 или 100 мкг) $\alpha 2a$ -IFN вводили подкожно в противоположный относительно опухоли бок, 3 раза в неделю в течение 5-недельного периода.

Пример 1

$\alpha 2a$ -интерферон получали известными способами (Pestka, см. выше). Полиэтиленгликолевый (ПЭГ) реагент формулы II был приобретен у фирмы Shearwater Polymers, Inc. (Хантсвилл, шт. Алабама). Смола Fractogel® EMD CM 650(S) с размером частиц 25-40 мкм поставляется фирмой EM Separations (Гиббстаун, МА). Концентрированный (10X) забуференный фосфатом физиологический раствор (ЗФР), pH 7.3, был приобретен у фирмы BioWhittaker (Уолкерсвилл, MD). Наборы гелей для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил-(лаурил)-сульфата натрия (ПААГ-ДСН) и приборы для электрофореза были приобретены у фирмы NOVEX (Сан Диего, шт. Калифорния). Концентрированный краситель Fast Stain для окрашивания протеина ПЭГ-конъюгатов при электрофорезе в ПААГ-ДСН был приобретен у фирмы Zoion Research, Inc. (Нью-тон, МА). Набор для определения эндотоксина в тесте с использованием лизата амебоцитов (LAL-тест) был приобретен у фирмы Associates of Cape Cod, Inc. (Вудс Хол, МА). Все другие применяемые реагенты были наиболее высокого доступного качества. Крысы с канюлями, имплантированными в яремную вену, и мыши линии BDF-1 были приобретены у фирмы Charles River Laboratories (Вилмингтон, МА).

208 мг (5.2 мкмоль) реагента формулы II (средняя молекулярная масса 40000 Да) добавляли к 50 мг (2.6 мкмоль) α -IFN в 10 мл 100 мМ боратного буфера, pH 8.0. Конечное молярное соотношение протеин: реагент составляло 1:2. Реакционную смесь перемешивали при 4°C в течение 2 часов. Реакцию прекращали путем доведения pH до 4.5 с помощью ледяной уксусной кислоты.

Реакционную смесь 50-кратно разбавляли водой, фильтровали через фильтр размером пор 0.2 мкм и вносили в колонку типа Amicon, заполненную 100 мл (3.2x13 см) смолы Fractogel EMD CM 650 (S) при скорости потока 20 мл/мин. Колонку предварительно уравнивали с помощью 10 мМ ацетата аммония, pH 4.5. Выходящий из колонки продукт анализировали с помощью УФ-абсорбции при 280 нм. Затем колонку промывали уравнивающим буфером до тех пор, пока УФ-абсорбция не возвращалась к базовому уровню. Конъюгаты ПЭГ-IFN, имеющие более одного присоединенного реагента формулы II (олигомеры ПЭГ-IFN), элюировали с помощью 40 мМ ацетата аммония, pH 4.5, а конъюгаты формулы I элюировали с помощью 0.12 М NaCl в 40 мМ аммоний-ацетатном буфере. Оставшийся на колонке немодифицированный IFN элюировали с помощью 0.5 М NaCl в таком же буфере. Колонку регенерировали, промывая 1.0 М NaCl, с последующей промывкой уравнивающим буфером. Объединенные фракции конъюгатов формулы I концентрировали с использованием вакуумного фильтра для перемешанных клеток типа Amicon, снабженного мембраной типа YM10, до концентрации приблизительно 1 мг/мл.

Примененная для очистки катионообменная смола Fractogel CM 650(S) эффективно адсорбировала ПЭГ и немодифицированный IFN. Интенсивность адсорбции зависела от степени ПЭГ-лирования. Конъюгаты связывались менее сильно по сравнению с немодифицированным IFN. Олигомеры ПЭГ-IFN элюировали с помощью 40 мМ ацетата аммония, в то время как конъюгаты формулы I элюировали с помощью 0.12 М NaCl. Немодифицированный IFN элюировали с помощью 0.5 М NaCl. Все препараты содержали <5 ЭЕ (эндотоксиновых единиц)/мг эндотоксинов.

Образовавшийся препарат содержал >99 % конъюгатов формулы I и был лишен немодифицированного IFN.

6240 мг (156 мкмоль) реагента формулы II (средняя молекулярная масса 40000 Да) растворяли при 4°C в 63 мл 1 М HCl и быстро добавляли к 125 мл раствора, содержащего 1000 мг (52 мкмоль) интерферона в 50 мМ боратном буфере, pH 9.0. Конечное отношение протеин/реагент составляло 1:3, а конечная концентрация протеина в реакционной смеси была равна 5.3 мг/мл. Реакционную смесь перемешивали при 4°C в течение 2 часов. Реакцию прекращали путем доведения pH до 4.5 с помощью ледяной уксусной кислоты.

Реакционную смесь 10-кратно разбавляли водой и наносили на колонку, заполненную 600 мл смолы Fractogel EMD CM 650(M) и предварительно уравновешенную 20 мМ натрий-ацетатным буфером, pH 4.5, при линейной скорости 1.3 см/мин. Колонку промывали уравнивающим буфером, а затем 10 мМ NaCl для удаления избытка реагента, побочных продуктов реакции и олигомеров ПЭГ-IFN. Конъюгаты формулы I элюировали с помощью уравнивающего буфера, содержащего 200 мМ NaCl. Немодифицированный интерферон, еще сохранившийся на колонке, удаляли, промывая 0.75 М NaCl в уравнивающем буфере. Конъюгаты формулы I элюировали при концентрации 0.3-0.5 мг/мл, затем концентрировали и для окончательного приготовления лекарственного средства фильтровали путем диализа в 20 мМ натрийацетатном буфере, pH 5.0, содержащем 150 мМ NaCl. Общий выход конъюгатов формулы I составлял 40-45 %.

Очищенный ПЭГ-IFN из препарата при крупномасштабном способе получения состоит более чем на 99 % из конъюгатов формулы I. Средняя молекулярная масса конъюгатов формулы I составляет 62000 Да, включая молекулярную массу $\alpha 2a$ -IFN, которая равна 19241 Да, и среднюю молекулярную массу реагента, которая находится в интервале между 40000 и 45000 Да, составляя приблизительно 43000 Да.

Пример 2.

Концентрации протеина определяли, используя значение A_{280} , равное 1, для раствора с концентрацией $\alpha 2a$ -IFN 1 мг/мл.

Конъюгат анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (8-16 %) в присутствии додецил-(лаурил)-сульфата натрия в восстановительных условиях в соответствии с методами Laemmli (Nature 227, 680 (1970)). ПААГ-ДСН-гели, содержащие ПЭГ-конъюгаты, окрашивали для определения протеина, используя краситель Fast Stain (фирма Zoon Research, Inc.), в соответствии с инструкциями производителя.

Уровни эндотоксина определяли, используя LAL-тест в соответствии с инструкциями производителя. Все препараты содержали < 5 ЭЕ/мг эндотоксинов.

Пример 3

Антивирусную активность *in vitro* $\alpha 2a$ -IFN и конъюгаты формулы I, полученные в примере 1, определяли с помощью биологического анализа культуры клеток, используя бычьи почечные клетки линии Madin-Darby (MDBK), зараженные вирусом ветряной оспы (Rubinstein и др., см. выше). Показатели антивирусных активностей приведены в таблице 1 наряду с соответствующими остаточными активностями в процентах по отношению к исходному IFN.

Таблица 1

Показатели антивирусных активностей

Образцы	Тип ПЭГ	Общая масса ПЭГ (кДа)	№ модифиц. Lys	Удельная активность (ед/мг)	Остаточная активность (%)
$\alpha 2a$ -IFN	-	-	-	2.00×10^8	100
Конъюгаты формулы 1	разветвленный	40	1	1.40×10^7	7

Антипролиферативную активность *in vitro* определяли на человеческих клетках линии Daudi (лимфома Беркитта), как описано у Borden и др. Человеческие клетки линии Daudi поддерживали в виде стационарных суспензионных культур в среде RPMI 1540, дополненной 10 %-ной фетальной бычьей сывороткой и 2 мМ глутамином (Grand Island Biologicals, Гранд Исланд, шт. Нью-Йорк). Клетки подвергали скринингу, и было обнаружено, что они лишены микоплазмы. Клетки (2×10^4) добавляли в лунки планшетов для микротитрования (Costar, MA) с 100 мкл среды.

Различные концентрации IFN и конъюгатов формулы I, полученные в примере 1, добавляли в лунки объемом 100 мкл. Планшеты инкубировали при 37°C в 5 % CO₂ в течение 72 часов. За 16 часов до сбора клеток их обрабатывали ³H-тимидином (New England Nuclear, Бостон, МА) в дозе 0.25 мКи/лунку. Клетки собирали на стеклянные фильтры и измеряли радиоактивность с использованием жидкостного сцинтилляционного счетчика. Результаты выражали в виде % ингибирования, вычисляемого по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = [(A-B)/A] \times 100,$$

где А обозначает количество импульсов в минуту в контрольной культуре (клетки, инкубированные в чистой среде); В обозначает количество импульсов в минуту в экспериментальной культуре.

Опыты проводили в четырех повторностях, а стандартное отклонение во всех случаях составляло менее 20 % от среднего значения. Эксперименты повторяли, по крайней мере, дважды, получая сопоставимые результаты.

Антипролиферативные активности (IC₅₀) IFN и конъюгаты формулы I приведены в таблице 2. Данные показывают, что существует 28-кратное увеличение антипролиферативной активности конъюгатов формулы I по сравнению с таковой у IFN.

Таблица 2

Антипролиферативная активность *in vitro* в отношении клеток
линии Daudi человека (лимфомы Беркитта)

Образец	Антипролиферативная активность	
	IC ₅₀ (нг/мл)	Увеличение
α2а-IFN	0.56	1х
Конъюгаты формулы 1	0.02	28х

Пример 4.

Самок крыс линии Sprague Dawley со средней массой тела 240-260 г, которым хирургическим путем имплантировали канюли в яремные вены, размещали каждую по отдельности, обеспечивая свободный доступ к пище и воде, и содержали при 12-часовом свето-темновом цикле. Через 4-6 часов после введения канюли, находящиеся в яремных венах, заливали ЗФР. На следующий день после введения в канюли 0.15-0.2 мл ЗФР крысам инъецировали 2х10⁶ единиц α-IFN в 0.2-0.4 мл ЗФР, а затем вновь инъецировали 0.15-0.2 мл ЗФР, чтобы гарантированно обеспечить поступление всего количества лекарства в организм животного. Таким образом, каждое животное получало дозу 8х10⁶ единиц α-IFN/кг массы тела.

Через 5.15 и 30 минут, а также через 1, 3, 5, 12 и 24 часа после инъекции IFN и конъюгатов формулы I отбирали образцы крови. После отбрасывания первой порции крови объемом 0.15-0.2 мл через яремную канюлю каждый раз отбирали аликвоту крови объемом 0.5 мл, используя новый шприц. При комнатной температуре образцы помещали в пробирки для отделения сыворотки. Сразу после того, как все образцы в рассматриваемый момент времени были собраны, пробирки центрифугировали при 14000хg в течение 10 минут в центрифуге Эппендорфа с охлаждением. Отделенную сыворотку переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 мл и замораживали при -80°C до проведения биологического анализа. Образцы сыворотки соответствующим образом разбавляли и для каждого момента времени определяли антивирусную активность, как было описано ранее. Из графика зависимости активности от времени определяли окончательный период полураспада конъюгатов формулы 1 и α-IFN, эти данные приведены в таблице 3, в которой также указано время нахождения в плазме.

Таблица 3

Окончательные периоды полураспада (t_{1/2})
и среднее время нахождения в плазме

Образец	t _{1/2} (ч)	Время нахождения в плазме (ч)
α2а-IFN	2.1	1.0
Конъюгаты формулы 1	15.0	20.0

Окончательный период $t_{1/2}$ определяли методом линейной регрессии в логарифмическом масштабе.

Пример 5.

Нормальным мышам линии BDF-1 (десять особей в группе) внутривенно инъецировали один раз в день пять раз в неделю различные препараты интерферона, содержащие 300000 единиц противовирусной активности. Некоторым мышам также инъецировали составную форму $\alpha 2a$ -IFN, которая является более иммуногенной, чем мономерная форма. Образцы крови брали на 19 день после последней инъекции и анализировали сыворотку на наличие нейтрализующих анти-тел.

Как видно из таблицы 4, мыши, которым инъецировали $\alpha 2a$ -IFN, вырабатывали нейтрализующие антитела, и эта реакция была сильно увеличена у мышей, которым инъецировали составные формы интерферона. У большинства животных, которым инъецировали конъюгаты по настоящему изобретению, не было обнаружено антител.

Таблица 4

Иммуногенность

Образец	Антитело (ИНЕ/мл)*	
	Среднее значение	Диапазон
$\alpha 2a$ -IFN	2400	217-8533
Составные формы $\alpha 2a$ -IFN	42667	8000-768000
Конъюгаты формулы 1	0	0-1133

*Интерферон-нейтрализующие единицы/мл

Пример 6.

Противоопухолевую активность *in vivo* конъюгатов формулы I (ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN) и немодифицированного $\alpha 2a$ -IFN оценивали путем определения их способности уменьшать размер различных человеческих клеток опухоли, подкожно имплантированных мышам. Результаты показаны на фиг. 1-6.

Лишенным шерсти мышам (линии Harlan), у которых отсутствовала вилочковая железа, подкожно вводили в заднюю часть левого бока имплантат, содержащий 2×10^6 почечных клеток человека линии A498 (фиг. 1 и 2), почечных клеток человека линии ACNH (фиг. 3 и 4) или почечных клеток человека линии G402 (фиг. 5 и 6). В течение 3-6 недель опухолям давали оформиться, как указано далее. Критерий размера, приемлемого для исследования, составлял от 0.05 до 0.5 см³. Мышам вводили совокупные ежедневные дозы ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN или немодифицированного $\alpha 2a$ -IFN, составляющие 30, 60, 120 или 300 мкг. В случае ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN мышам обрабатывали один раз в неделю (в понедельник), используя по 30, 60, 120 или 300 мкг ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN на обработку. В случае немодифицированного $\alpha 2a$ -IFN мышам обрабатывали три раза в неделю (в понедельник, среду и пятницу), используя по 10, 20, 40 или 100 мкг $\alpha 2a$ -IFN на обработку. Продолжительность обработки составляла 4-5 недель в зависимости от интенсивности роста (агрессивности) опухоли. Объемы опухоли измеряли каждый понедельник до обработок.

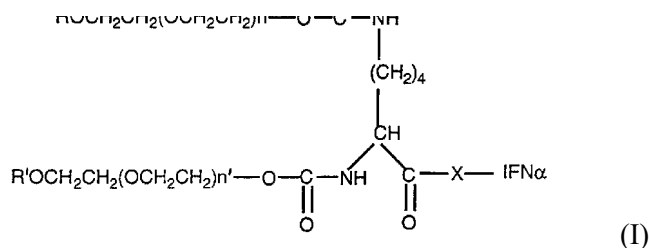
ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN привел к заметному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками A498, по сравнению с немодифицированным $\alpha 2a$ -IFN при всех исследованных уровнях еженедельных доз на 7, 14, 21 и 28 дни после начала обработки (фиг. 1 и 2). Обработку продолжали в течение 4 недель. Через семь дней после прекращения обработки трех мышей в каждой группе умерщвляли. У трех мышей, подвергавшихся обработке ПЭГ2- $\alpha 2a$ -IFN, не обнаружили остатков опухоли. У мышей, подвергавшихся обработке немодифицированным $\alpha 2a$ -IFN, масса опухоли, вызванной клетками A498, составила 1.28, 0.62 и 1.60 г соответственно у каждой из трех мышей. Масса опухоли, вызванной клетками A498, составила 2.32, 2.37 и 1.94 г у каждой из трех мышей в контроле. На 80 день после окончания четырехнедельного периода обработки наличие опухоли определяли пальпацией семи мышей. При пальпации у всех семи мышей не обнаружили наличия опухолевой ткани.

ПЭГ2- α 2a-IFN привел к значительному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками ACNH, по сравнению с немодифицированным α 2a-IFN при уровнях еженедельных доз 60, 120 и 300 мкг на 14, 21, 28 и 35 дни (фиг. 3 и 4).

ПЭГ2- α 2a-IFN привел к значительному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками G402, по сравнению с немодифицированным α 2a-IFN при уровнях еженедельных доз 60 и 120 мкг на 14, 21, 28 и 35 дни (фиг. 5 и 6).

Формула изобретения

1. Физиологически активные конъюгаты ПЭГ- α -IFN, имеющие формулу



где R и R' независимо друг от друга обозначают низший алкил; X обозначает NH или O; n и n' представляют собой целые числа, сумма которых составляет от 600 до 1500; средняя молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля в этом конъюгате составляет от 26000 до 66000 Да.

2. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет от 35000 до 45000 Да.

3. Конъюгаты по п. 2, отличающиеся тем, что молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет 40000 Да.

4. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что R и R' обозначают метил.

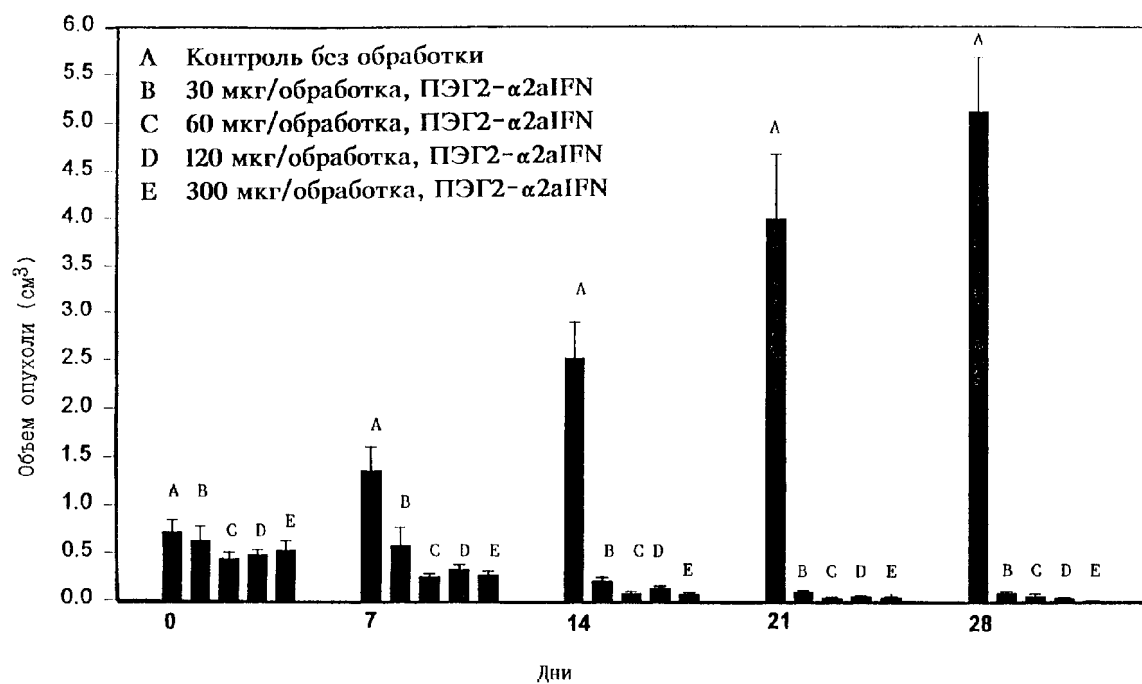
5. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что X обозначает NH.

6. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что α -IFN представляет собой α 2a-IFN.

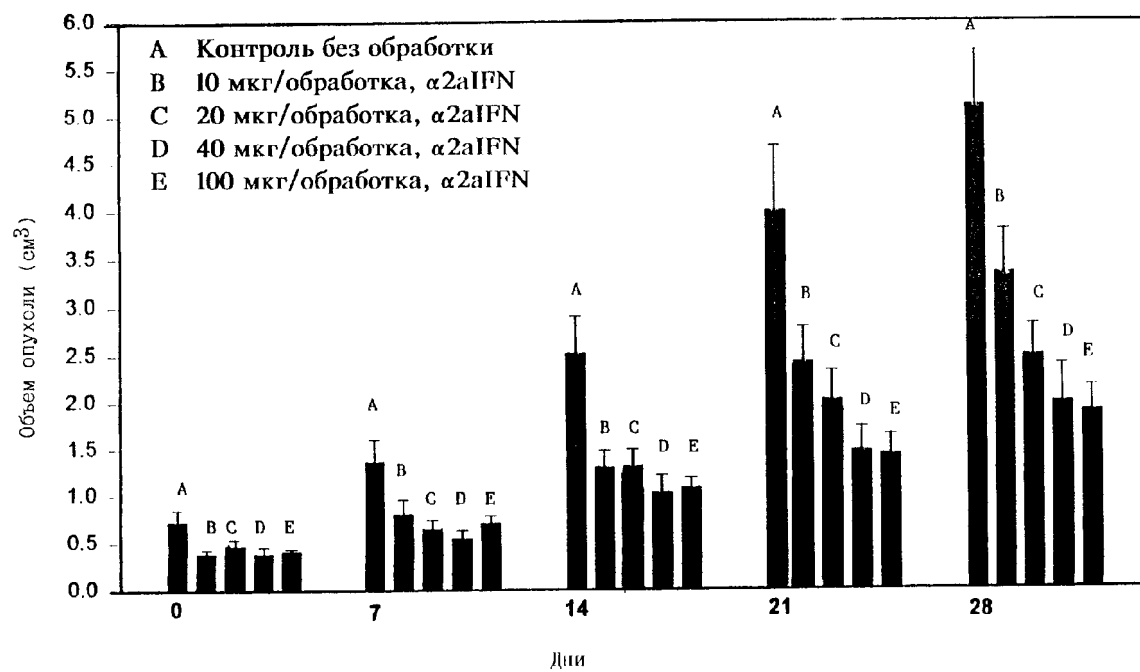
7. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что средняя сумма n и n' составляет от 850 до 1000.

8. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что R и R' обозначают метил; X обозначает NH; α -IFN представляет собой α 2a-IFN; и один или оба n и n' равны 420.

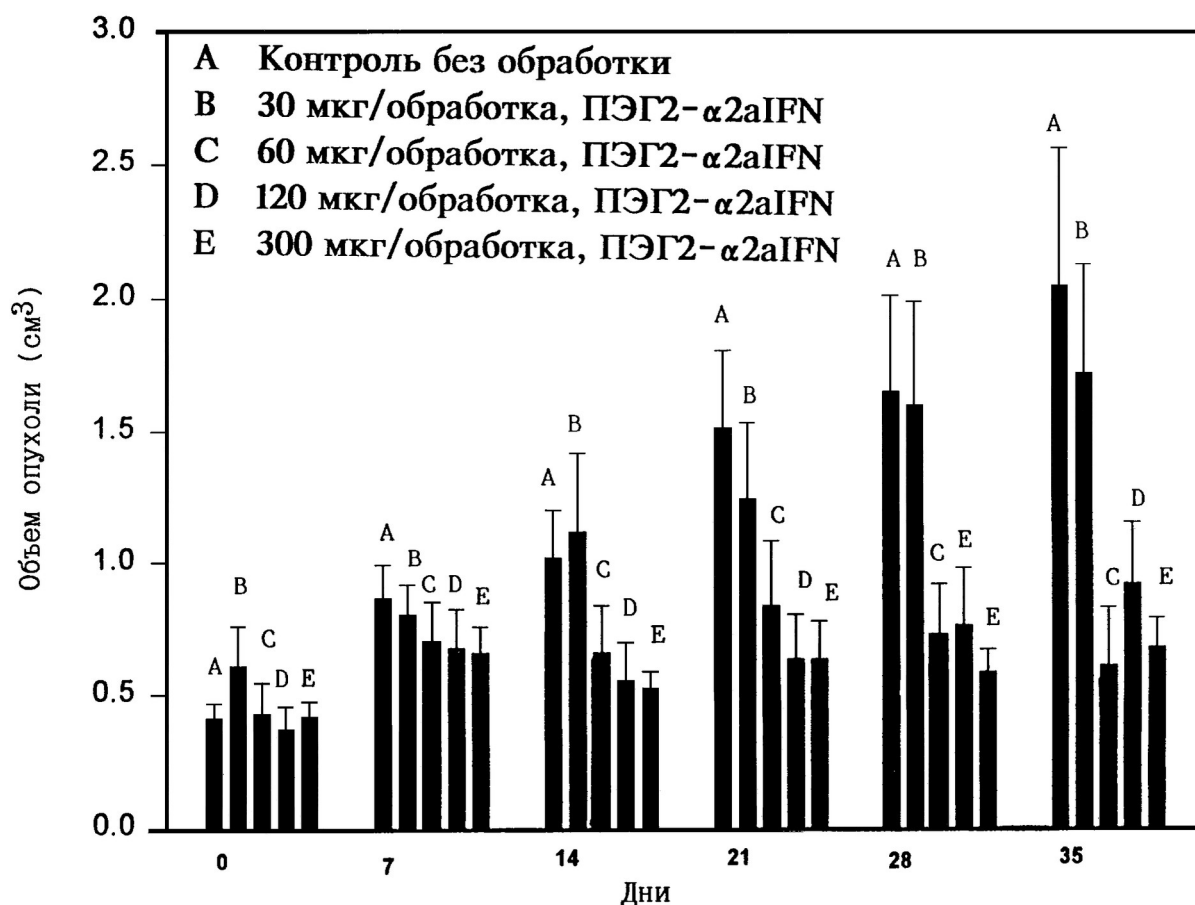
9. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что R и R' обозначают метил, X обозначает NH; α -IFN представляет собой α 2a-IFN; и один или оба n и n' равны 520.



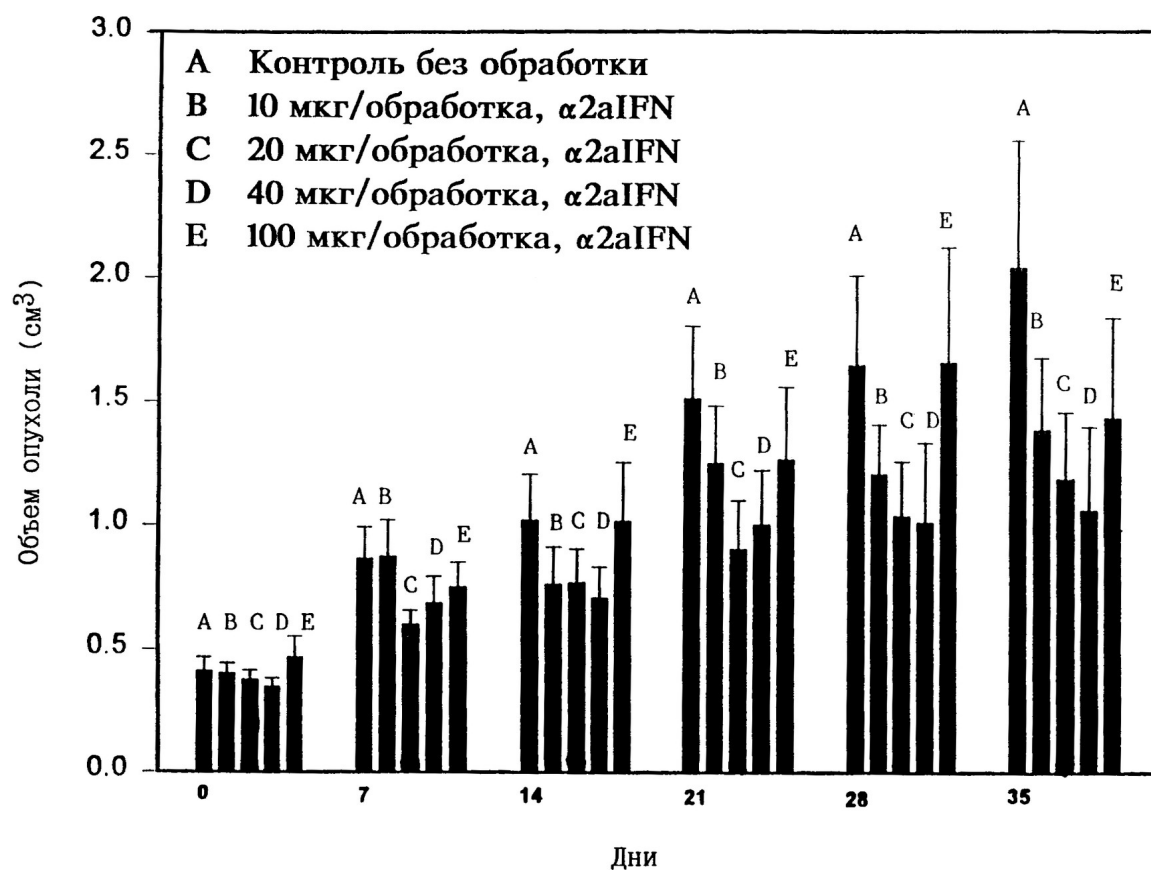
Фиг. 1



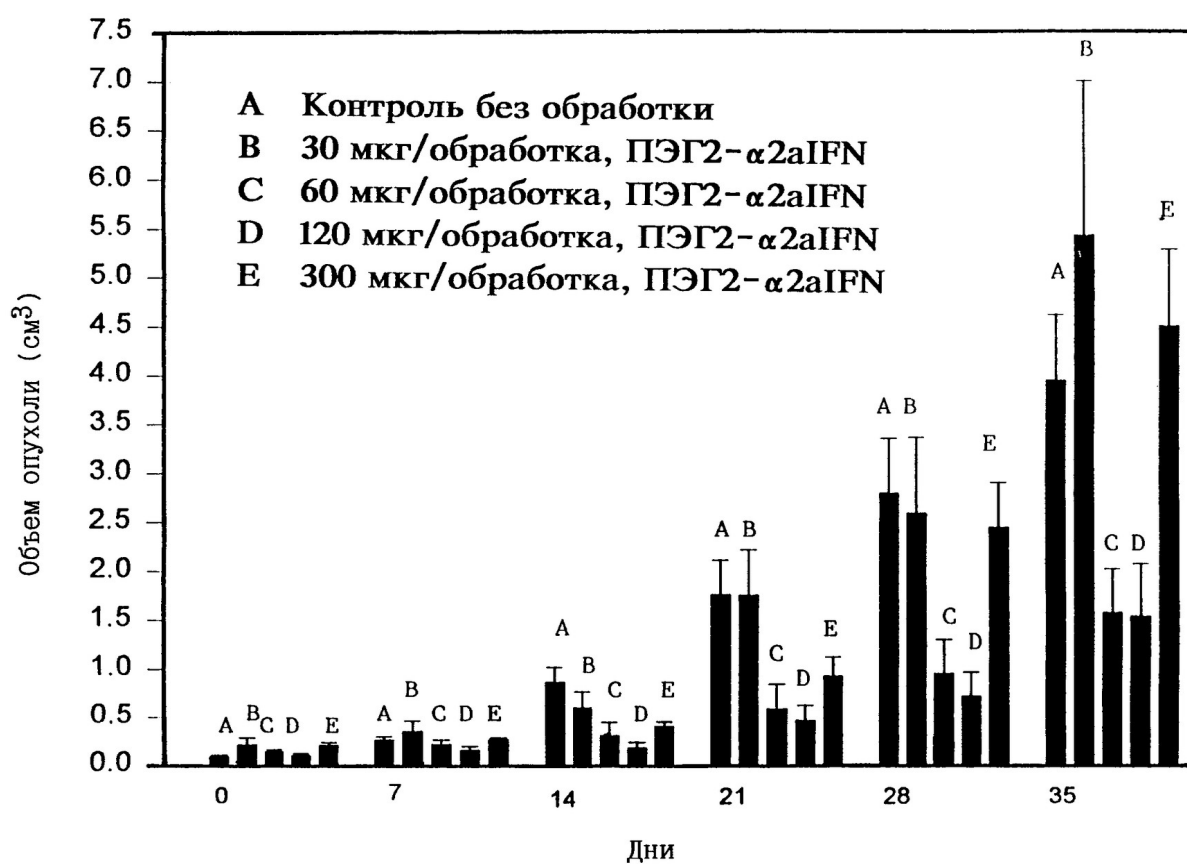
Фиг. 2



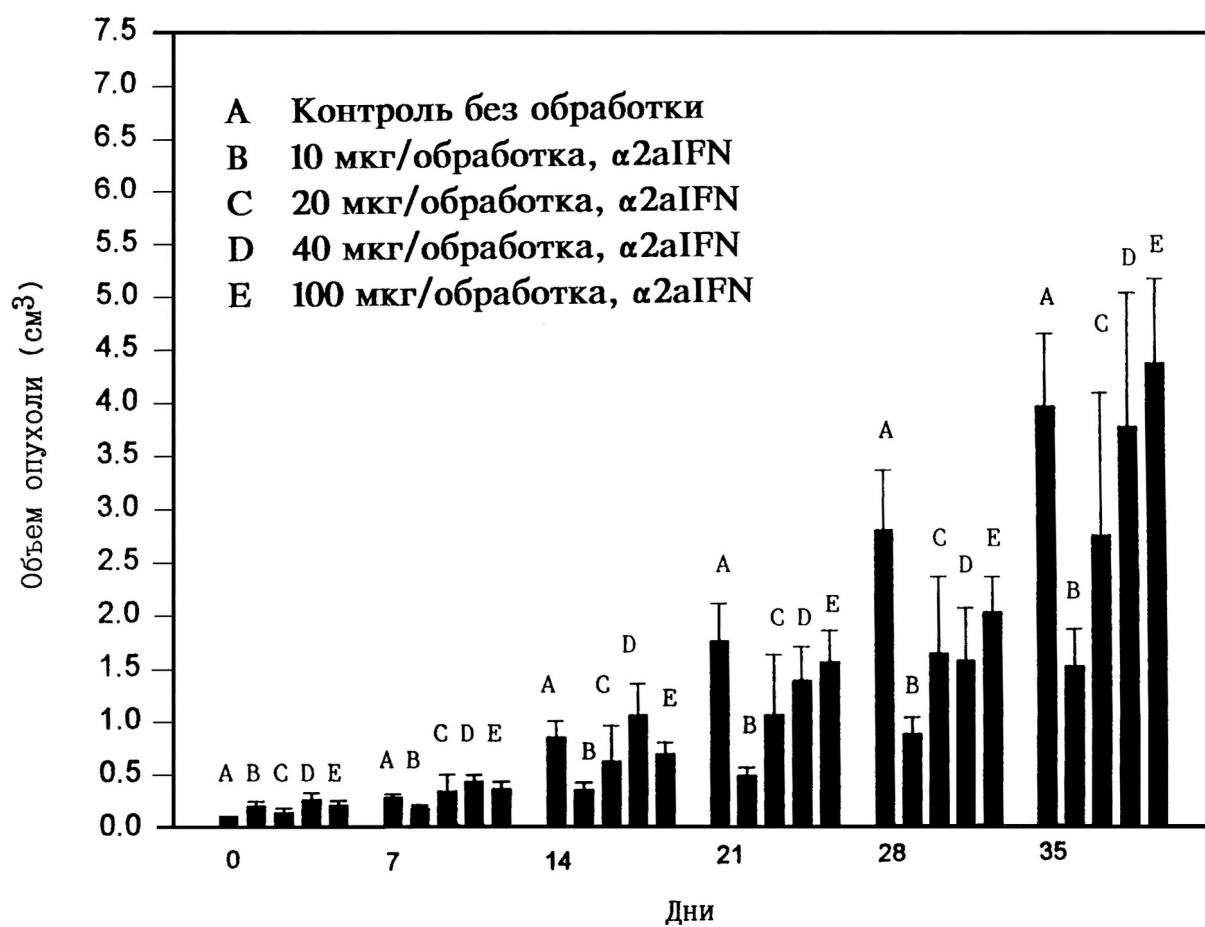
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

Составитель описания
 Ответственный за выпуск

Никифорова М.Д.
 Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел. (312) 68 08 19, 68 16 41, факс (312) 68 17 03