



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- $\alpha$ -IFN

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

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

Интерферон, в частности  $\alpha$ 2a-интерферон, применяют для лечения, например, лейкемического 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 Polymers 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 антигенные, 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 THF- $\alpha$  (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 al., Bioconj. Chem. 5, 133 (1994)) и на других.

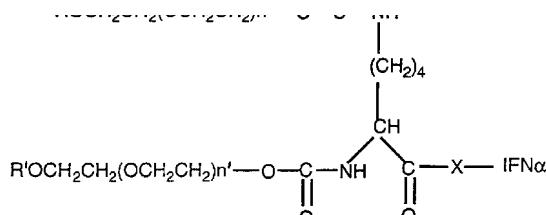
Известны конъюгаты ПЭГ- $\alpha$ -IFN (EP 0593868 B1, кл. C07K 14/56; A61K 47/48; C08G 65/32; C07D 213/64; C07C 69/9, Karasiewicz et al., PEG-interferon conjugates, Bulletin 1998/16; EP 0510356 A1, кл. A61K 47/48 1992, Hakimi J., et al, Polietilene glycol protein conjugates), которые являются линейными конъюгатами. Из опубликованных источников (Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6, 62 (1995)), следует, что разветвленные ПЭГ-конъюгаты обладают более высоким значением pH и теплостойкостью 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  $\alpha$ -интерферона, однако наблюдается аналогичное снижение антивирусной активности. Кроме того, ПЭГ-конъюгаты  $\alpha$ -интерферона по настоящему изобретению не обладают иммуногенностью, в результате чего фактически при их введении не образуются антитела. В противоположность этому другие ПЭГ-конъюгаты  $\alpha$ -интерферона в определенной степени вызывают образование антител.

Задачей изобретения является получение ПЭГ-производных  $\alpha$ -интерферона ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -IFN (т.е.  $\alpha$ -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- $\alpha$ -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- $\alpha$ -IFN по настоящему изобретению имеют формулу I:



(I)

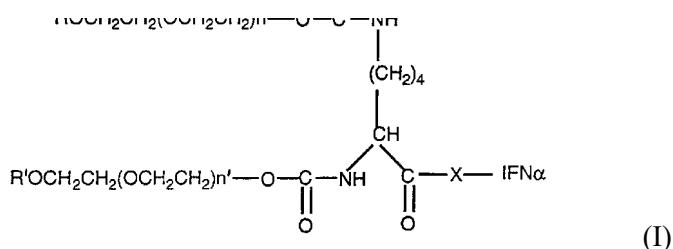
Конъюгаты по настоящему изобретению имеют такие же области применения, что и  $\alpha$ -IFN, например, в качестве антипролиферативного средства. В частности, ПЭГ-конъюгаты  $\alpha$ -интерферона по настоящему изобретению пригодны для лечения иммуномодуляторных нарушений, таких как заболевания, относящиеся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

ческий миелолейкоз (ХМЛ) и саркома Капоши, и инфекционных болезней с помощью такого же способа, который применим для лечения этих болезней  $\alpha$ -интерфероном (в частности,  $\alpha$ 2a-IFN). Однако конъюгаты по настоящему изобретению обладают улучшенными свойствами, включающими лучшую стабильность, более высокую растворимость, увеличенный период полураспада в кровотоке и большее время нахождения в плазме, а также раздельными антивирусными и антитрополиферативными действиями.

Например, если нежелательное побочное воздействие связано с антивирусной активностью, то, устранив эту активность, сохраним при этом антитрополиферативную активность. Настоящее изобретение также включает фармацевтическую композицию на основе соединений формулы I.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, применяемая для лечения или предупреждения заболеваний, включает конъюгаты интерферона общей формулы I и терапевтически инертный нетоксичный и терапевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может быть приготовлена в соответствии с принятой медицинской практикой с учетом подлежащего лечению заболевания, состояния пациента, места доставки конъюгатов протеина, способа введения и других факторов, известных специалистам в данной области техники.

Конъюгаты по настоящему изобретению представляют собой физиологически активные конъюгаты ПЭГ- $\alpha$ -IFN, имеющие формулу I:



где R и R' независимо друг от друга обозначают низший алкил; X обозначает NH или O (X обозначает, по крайней мере, одну из функциональных групп в молекуле  $\alpha$ -IFN, выбранную из NH<sub>2</sub> или OH); n и n' представляют собой целые числа, сумма которых составляет от 600 до 1500; и средняя молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет от приблизительно 26000 до приблизительно 66000 Да. Конъюгаты формулы I имеют разветвленное строение, где два фрагмента ПЭГ присоединены к протеину через простую связь.

Числа n и n' выбирают таким образом, чтобы конъюгаты формулы I обладали физиологической активностью  $\alpha$ -IFN, причем эта активность может быть такой же, более высокой или представлять собой часть соответствующей активности немодифицированного  $\alpha$ -IFN. Числа n и n' (причем n и n' могут быть одинаковыми или разными) обозначают количество звеньев этиленгликоля в ПЭГ. Одно звено ПЭГ, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, имеет молекулярную массу приблизительно 44 Да. Молекулярная масса зависит от чисел n и n'. Сумма n и n' составляет от 600 до 1500, что приводит к получению конъюгатов, имеющих общую среднюю молекулярную массу звеньев ПЭГ от приблизительно 26000 до 66000 Да и предпочтительно от приблизительно 35000 до 45000 Да, в частности, от приблизительно 39000 до 40000 Да, причем особенно предпочтительна молекулярная масса 40000 Да. Предпочтительная сумма n и n' составляет от приблизительно 800 до 1200, причем средняя сумма составляет от приблизительно 850 до 1000, а предпочтительной суммой является приблизительно 910. Каждое из чисел n и n' по отдельности может быть равно 420 или 520, или оба могут быть равны 420 или 520, или оба могут быть равны 455. Предпочтительное отношение n к n' может составлять от приблизительно 0.5 до 1.5, причем наиболее предпочтительное отношение составляет от приблизительно 0.8 до приблизительно 1.2. Понятие "приблизительно" в отношении некоторого значения молекулярной массы означает, что она находится в статистически приемлемой области этого значения, определяемого стандартными аналитическими методами.

Также предпочтительными являются конъюгаты формулы I, в которых  $\alpha$ -IFN представляется собой  $\alpha$ 2a-IFN, R и R' обозначают метил, X обозначает NH, n и n' каждый или оба вместе равны либо 420, либо 520. R и R' могут обозначать любой низший алкил, представляющий собой алкильную группу, имеющую от 1 до 6 атомов углерода, такой как метил, этил, изопропил и т.д. Эта

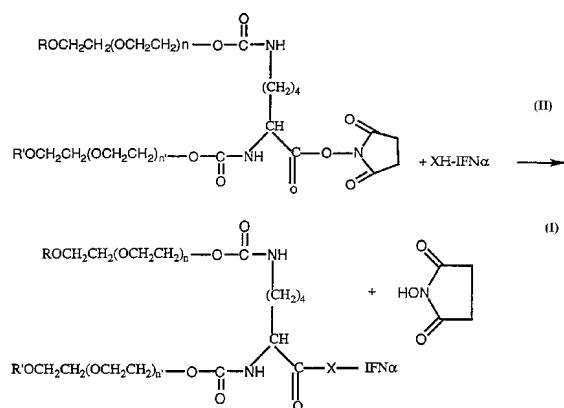
группа также включает разветвленные алкилы. Предпочтительным алкилом является метил. В двух группах ПЭГ формулы  $I$   $R$  и  $R'$  могут быть одинаковыми или различными.

Под  $\alpha$ -IFN ( $\alpha$ -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  $\alpha$ -IFN, в том числе мутеины или модифицированные каким-либо другим образом протеины. Методика получения и выделения  $\alpha$ -IFN из природных или рекомбинантных источников хорошо известна (Pestka, Arch. Biochem. Biophys. 221, 1 (1983)). Предпочтительным  $\alpha$ -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  $\alpha$ -IFN, под которой понимают любую частичную или усиленную известную активность  $\alpha$ -IFN, определяемую различными способами, известными в данной области техники. В частности, конъюгаты по настоящему изобретению обладают активностью  $\alpha$ -IFN, а именно, как установлено, антитрополиферативным 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  $\alpha$ -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-сукцини-мидного 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 (Х обозначает NH).

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



Реагент формулы II (ПЭГ2-NHS), в котором в целом две цепи монометокси-ПЭГ (м-ПЭГ) связаны с лизином, каждая с  $\alpha$ - и  $\epsilon$ -аминогруппами, через карбаматные (уретановые) связи и который содержит карбоксильную группу лизина, активированную до сукцинимидового 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  $\alpha$ -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)  $\alpha$ -IFN (например,  $\alpha$ 2a-IFN) для образования амидной связи между  $\alpha$ -IFN и полимерной основой ПЭГ. Реакция ПЭГилирования также может происходить между ПЭГ2-NHS и свободными (если они присутствуют) гидроксильными группами (например, серина)  $\alpha$ -IFN с образованием сложно-эфирной связи. Механизм реакции приведен выше. Условия реакции являются обычными для специалистов в данной области техники и более подробно приведены ниже. ПЭГ-реагент объединяют с  $\alpha$ -IFN в среднешелочных 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  $\alpha$ -IFN может быть осуществлено традиционными методами. Могут быть использованы ПЭГ по настоящему изобретению с любыми выбранными 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  $\alpha$ -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 массспектроскопии, 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ 2a-IFN. Другие виды  $\alpha$ -IFN также могут быть конъюгированы с ПЭГ способами, приведенными в примерах.

Фиг. 1. Противоопухолевая активность ПЭГ2- $\alpha$ 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  $2 \times 10^6$  почечных клеток человека линии A498. 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 4-недельного периода.

Фиг. 2. Противоопухолевая активность  $\alpha$ 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  $2 \times 10^6$  почечных клеток человека линии A498. 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 4-недельного периода.

Фиг. 3. Противоопухолевая активность ПЭГ2- $\alpha$ 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  $2 \times 10^6$  почечных клеток человека линии ACHN. 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. 4. Противоопухолевая активность  $\alpha$ 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  $2 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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, МД). 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-коньюгатов при электрофорезе в ПААГ-ДСН был приобретен у фирмы Zoin 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 мкмоля) реагента формулы II (средняя молекулярная масса 40000 Да) добавляли к 50 мг (2.6 мкмоля)  $\alpha$ -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 уравновешивали с помощью 10 мМ ацетата аммония, pH 4.5. Выходящий из колонки продукт анализировали с помощью УФ-абсорбции при 280 нм. Затем колонку промывали уравновешивающим буфером до тех пор, пока УФ-абсорбция не возвращалась к базовому уровню. Коньюгаты ПЭГ-IFN, имеющие более одного присоединенного реагента формулы II (олигомеры ПЭГ-IFN), элюировали с помощью 40 мМ ацетата аммония, pH 4.5, а коньюгаты формулы I элюировали с помощью 0.12 M NaCl в 40 мМ аммоний-ацетатном буфере. Оставшийся на колонке немодифицированный IFN элюировали с помощью 0.5M NaCl в таком же буфере. Колонку регенерировали, промывая 1.0 M NaCl, с последующей промывкой уравновешивающим буфером. Объединенные фракции коньюгатов 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. Коньюгаты связывались менее сильно по сравнению с немодифицированным IFN. Олигомеры ПЭГ-IFN элюировали с помощью 40 мМ ацетата аммония, в то время как коньюгаты формулы I элюировали с помощью 0.12 M NaCl. Немодифицированный IFN элюировали с помощью 0.5 M NaCl. Все препараты содержали <5 ЭЕ (эндотоксиковых единиц)/мг эндотоксинов.

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

6240 мг (156 мкмоля) реагента формулы II (средняя молекулярная масса 40000 Да) растворяли при 4°C в 63 мл 1 мМ HCl и быстро добавляли к 125 мл раствора, содержащего 1000 мг (52 мкмоля) 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 уравновешивающим буфером, а затем 10 мМ NaCl для удаления избытка реагента, побочных продуктов реакции и олигомеров ПЭГ-IFN. Конъюгаты формулы I элюировали с помощью уравновешивающего буфера, содержащего 200 мМ NaCl. Немодифицированный интерферон, еще сохранившийся на колонке, удаляли, промывая 0.75 М NaCl в уравновешивающем 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 крупномасшабном 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 Zoion 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 бычий почечные клетки линии Madin-Darby (MDBK), зараженные вирусом везикулярного стоматита (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	-	-	-	$2.00 \times 10^8$	100
Конъюгаты формулы 1	разветвленный	40	1	$1.40 \times 10^7$	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 ( $2 \times 10^4$ ) добавляли в лунки планшетов для микротитрования (Costar, MA) с 100 мкл среды.

Различные концентрации IFN и коньюгатов формулы I, полученные в примере 1, добавляли в лунки объемом 100 мкл. Планшеты инкубировали при 37°C в 5 % CO<sub>2</sub> в течение 72 часов. За 16 часов до сбора клеток их обрабатывали <sup>3</sup>H-тимидином (New England Nuclear, Бостон, MA) 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 A обозначает количество импульсов в минуту в контрольной культуре (клетки, инкубированные в чистой среде); B 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 (IC<sub>50</sub>) IFN и коньюгаты формулы I приведены в таблице 2. Данные показывают, что существует 28-кратное увеличение антипролиферативной активности коньюгатов 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 <sub>50</sub> (нг/мл)	Увеличение
α2a-IFN	0.56	1x
Коньюгаты формулы I	0.02	28x

#### 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 2x10<sup>6</sup> 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 8x10<sup>6</sup> 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 коньюгатов 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 14000xg 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 коньюгатов формулы I и α-IFN, эти данные приведены в таблице 3, в которой также указано время нахождения в плазме.

Таблица 3  
Окончательные периоды полураспада (t<sub>1/2</sub>)  
и среднее время нахождения в плазме

Образец	t <sub>1/2</sub> (ч)	Время нахождения в плазме (ч)
α2a-IFN	2.1	1.0
Коньюгаты формулы I	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) внутрибрюшинно инъецировали один раз в день пять раз в неделю различные препараты интерферона, содержащие 300000 единиц антивирусной 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 антител.

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  $2 \times 10^6$  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  $\text{cm}^3$ . Мыши 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 мышей 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 мышей 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.

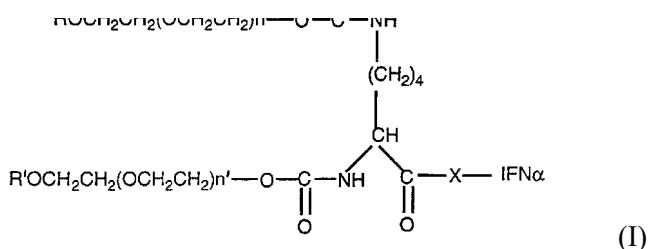
ПЭГ2- $\alpha$ 2a-IFN привел к заметному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками A498, по сравнению с немодифицированным  $\alpha$ 2a-IFN при всех исследованных уровнях еженедельных доз на 7, 14, 21 и 28 дни после начала обработки (фиг. 1 и 2). Обработку продолжали в течение 4 недель. Через семь 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- $\alpha$ 2a-IFN привел к значительному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками ACNH, по сравнению с немодифицированным  $\alpha$ 2a-IFN при уровнях еженедельных доз 60, 120 и 300 мкг на 14, 21, 28 и 35 дни (фиг. 3 и 4).

ПЭГ2- $\alpha$ 2a-IFN привел к значительному уменьшению размера опухоли, вызванной клетками G402, по сравнению с немодифицированным  $\alpha$ 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- $\alpha$ -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. Коньюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет от 35000 до 45000 Да.

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

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

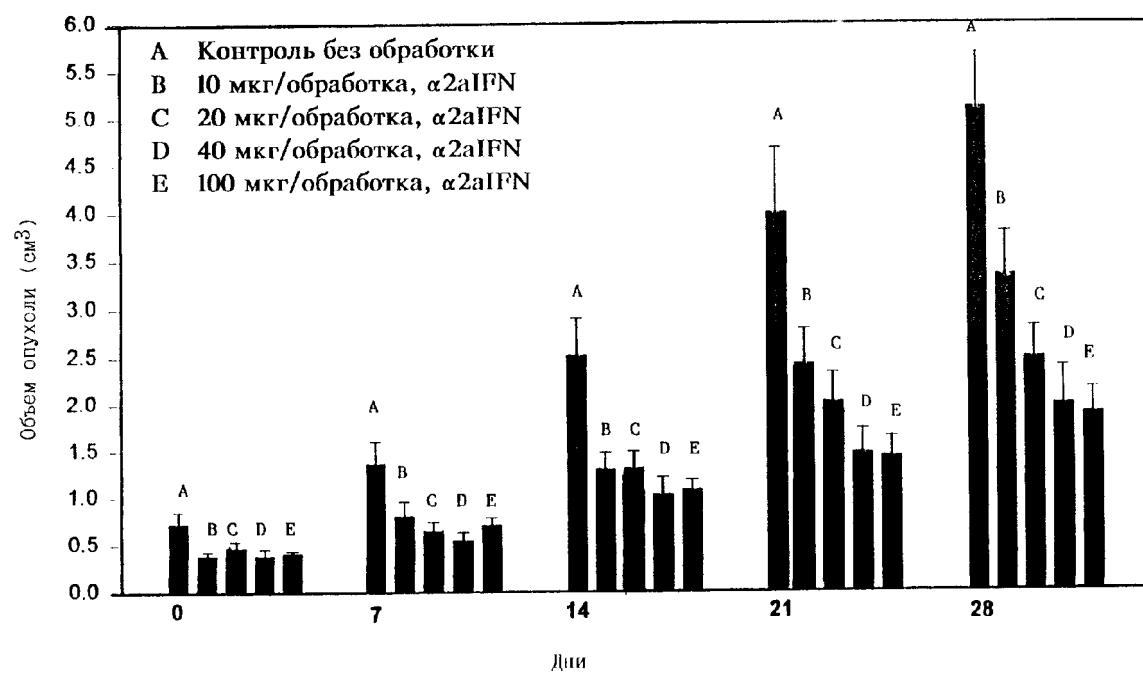
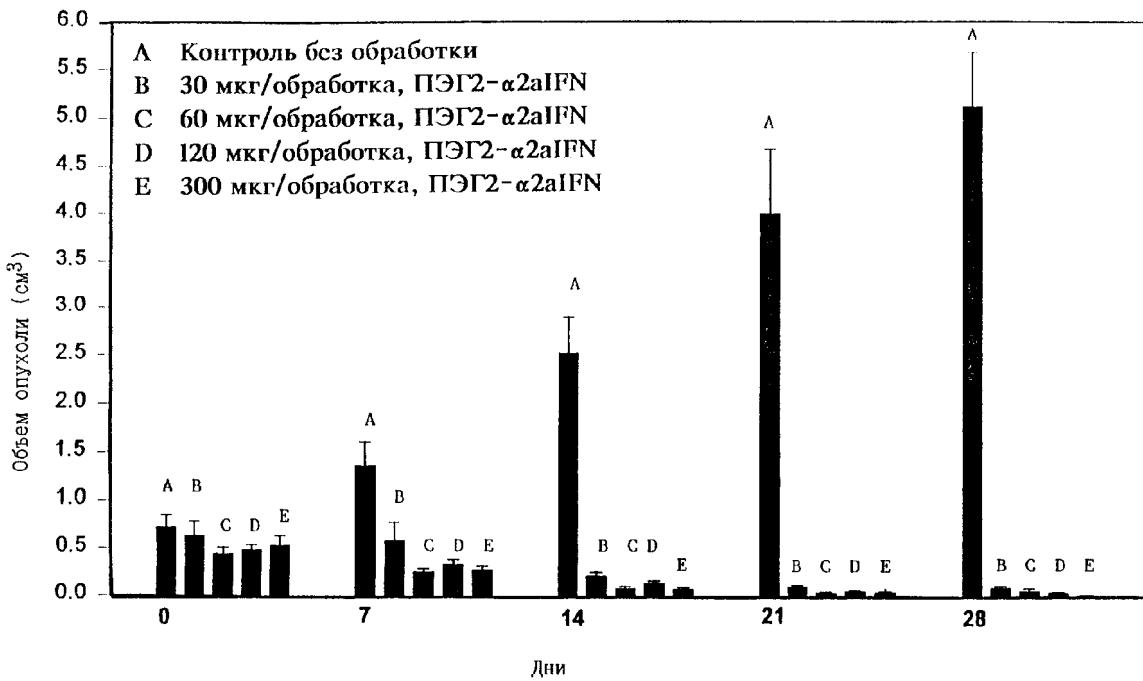
5. Коньюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что X обозначает NH.

6. Коньюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что  $\alpha$ -IFN представляет собой  $\alpha$ 2a-IFN.

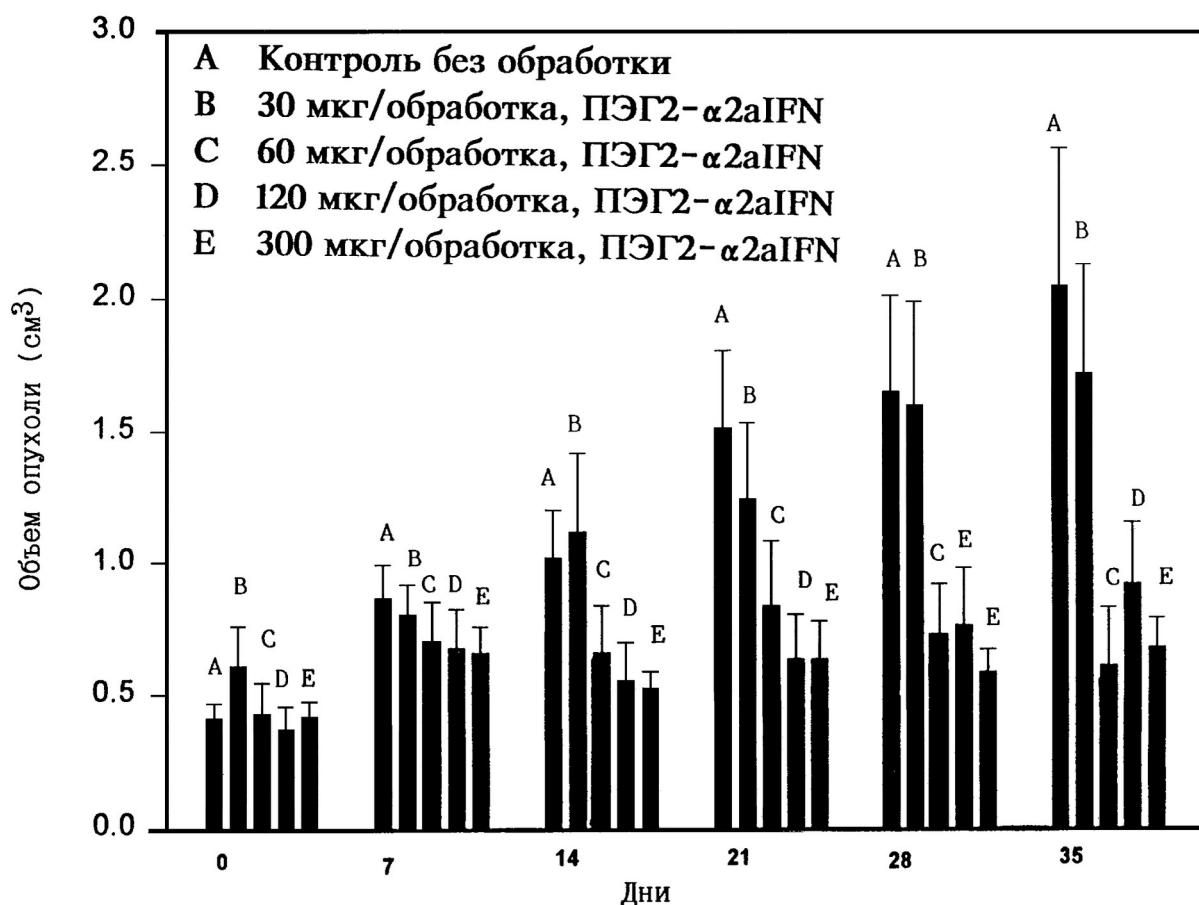
7. Коньюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что средняя сумма  $n$  и  $n'$  составляет от 850 до 1000.

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

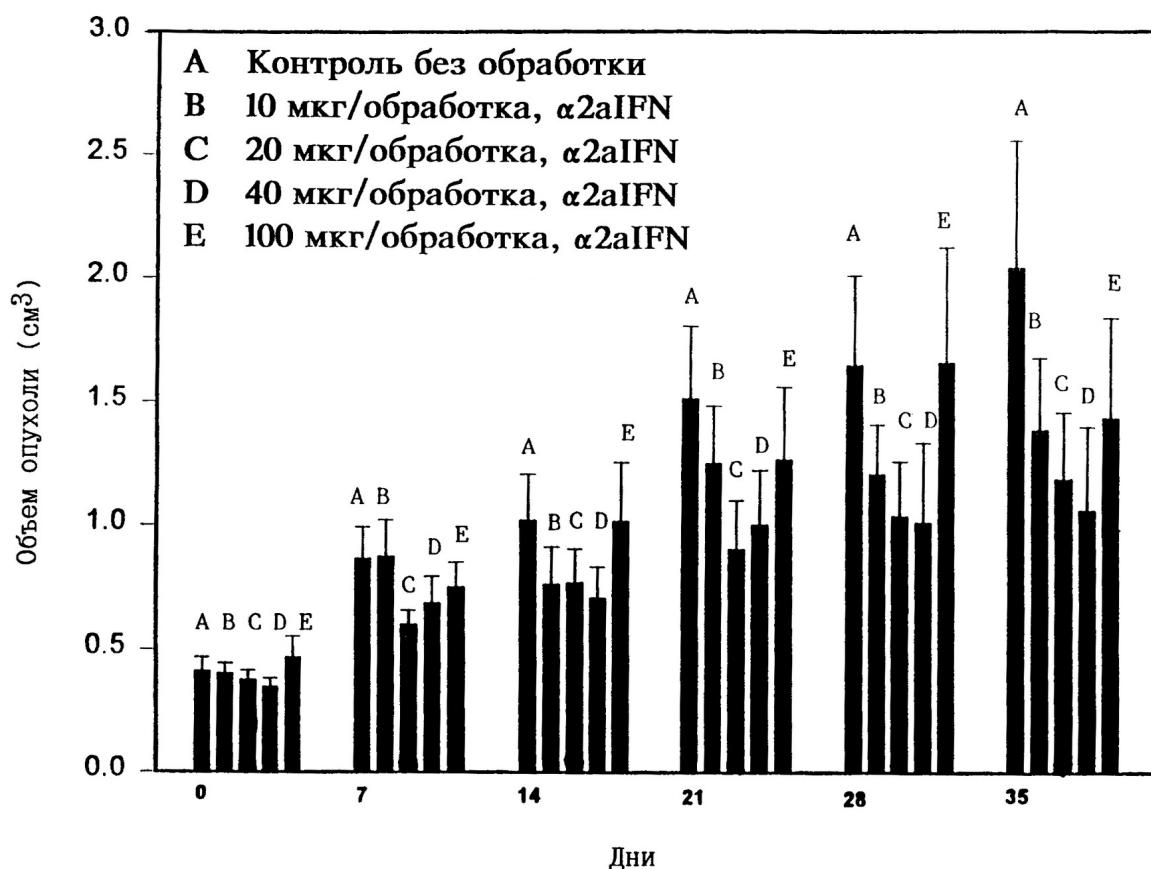
9. Конъюгаты по п. 1, отличающиеся тем, что R и R' обозначают метил, X обозначает NH;  $\alpha$ -IFN представляет собой  $\alpha$ 2a-IFN; и один или оба  $\alpha$  и  $\beta$  равны 520.



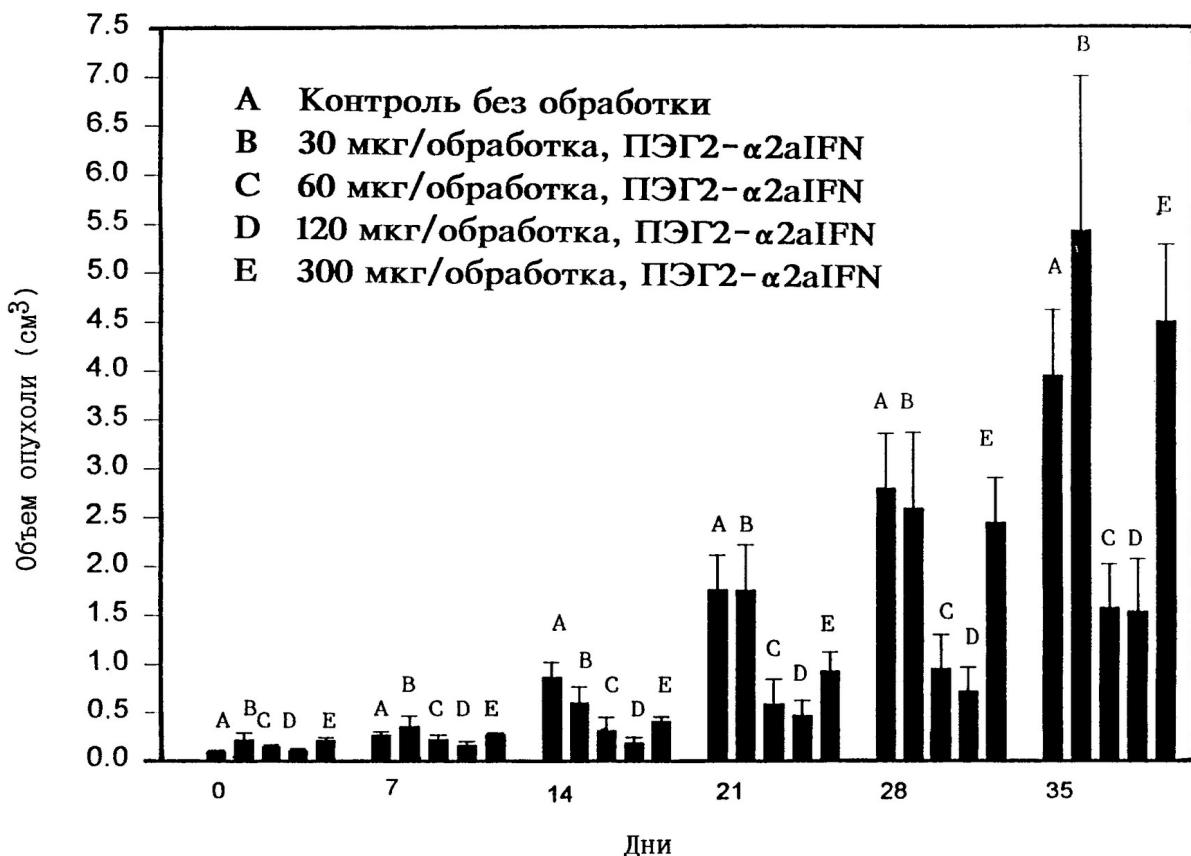
Фиг. 2



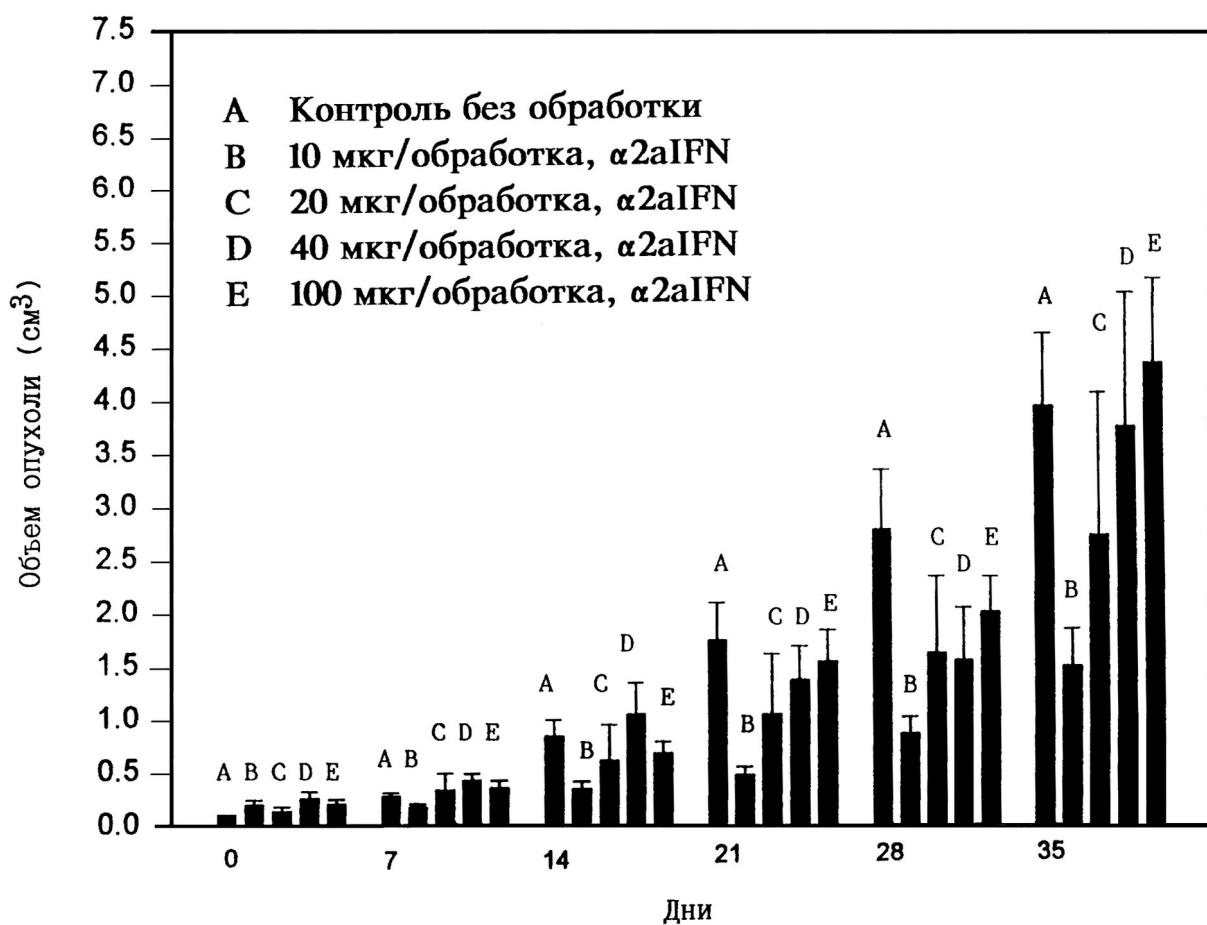
Фиг. 3



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