



Республика Таджикистан

(19) **TJ** (11) **328**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(51) **7 A61K 38/21, 31/745,**
A61P 31/12

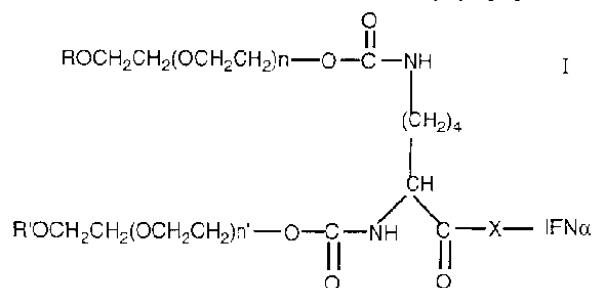
(12) **Описание изобретения**
К ПАТЕНТУ

1

2

(21) 97000465
(22) 30.05.97
(31) 60/018.834
(32) 31.05.96
(33) US
(46) 24.12.2001, Бюл. №4 (24)
(72) Паскаль Себастиан БЕЙЛОН, Алисия Валлейо
ПАЛЛЕРОНИ (US)
(71) (73) Ф.ХОФФМАНН -ЛЯ РОШ АГ (CH)
(56) 1. RU 2006036 CI, 15.01.1994
2. Машковский М.Д., Лекарственные средства,
Москва, Медицина, 1985, ч.2, с.386.
(54) КОНЬЮГАТЫ ИНТЕРФЕРОНА

(57) В изобретении описан физиологически активный конъюгат ПЭГ- α -IFN, имеющий формулу:



Интерферон, в частности, $\alpha 2a$ -интерферон, представляет собой фармацевтически активный протеин, который обладает антивирусной и антипролиферативной активностью. Например, интерферон применяют для лечения лейкомического 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 терапий с использованием протеинов часто ограничена их коротким периодом полураспада в плазме, что препятствует достижению их максимального лечебного действия. В последние годы было подтверждено, что ПЭГ-конъюгированные биологические молекулы обладают полезными лечебными свойствами (Inada и др., *J. Bioact. and Compatible Polimers* 5, 343 (1990); Delgado и др., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9, 249 (1992); Katre, *Advanced Drug Delivery Systems* 10, 91 (1993). Они обладают лучшей физической стабильностью и термостойкостью, защищены (нечувствительны) от ферментативного разложения, имеют повышенную растворимость, более продолжительный период полураспада в кровотоке *in vivo*, пониженный клиренс и повышенную эффективность. Были опубликованы данные о том, что разветвленные ПЭГ-конъюгаты обладают более высоким значением рН и термостойкостью и большей стабильностью по отношению к протеолитическому разложению по сравнению с линейными ПЭГ-конъюгатами (Monfardini и др., *Bioconjugate Chem.* 6, 62 (1995)). 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 было обнаружено, в частности, на G-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов) (Satake- Ishikawa и др., *Cell Structure and Function* 17, 157-160 (1992), на IL-2 (интерлейкин-2) (Katre и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1487 (1987)), на TNF- α (фактор некроза опухоли) (Tsutsumi и др., *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 9 (1994)), на IL-6 (интерлейкин-6) (Inoue и др., *J. Lab. Clin. Med.* 124, 529 (1994)) и на CD4-IgG (антиген Т-лимфоцитов-иммуноглобулин G) (Chamow и др., *Bioconj. Chem.* 5, 133 (1994)) и на других.

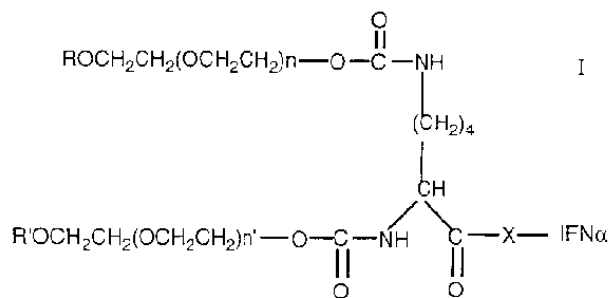
Было обнаружено, что в случае интерферона ПЭГилирование снижает антивирусную активность *in vitro*, но увеличивает антипролиферативную активность в отношении клеток опухоли

человека. Однако новый ПЭГ-конъюгат интерферона по настоящему изобретению обладает неожиданными свойствами, заключающимися в том, что антипролиферативная активность ПЭГ-интерферона существенно выше не только такой самой самого интерферона, но и других ПЭГ-конъюгатов интерферона. Хотя антипролиферативная активность конъюгата существенно увеличена по сравнению с активностью других ПЭГ-конъюгатов α -интерферона, однако в этом случае наблюдается аналогичное снижение антивирусной активности. Кроме того, ПЭГ-конъюгат α -интерферона по настоящему изобретению не обладает иммуногенностью, в результате чего фактически при его введении не образуются антитела. В противоположность этому другие ПЭГ-конъюгаты α -интерферона в определенной степени вызывают образование антител.

Следовательно, предметом изобретения является новый класс ПЭГ- производных α -интерферона (α -IFN). Конъюгат по настоящему изобретению, как описано ниже, включает ПЭГ, имеющий разветвленное строение. Разветвленный ПЭГ обладает тем преимуществом, что он 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) конъюгат обладает 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*. Конъюгат по настоящему изобретению по сравнению с другими конъюгатами ПЭГ- α -IFN обладает существенно более высокой антипролиферативной активностью, не связанной пропорциональной зависимостью с усилением или снижением других характеристик, и фактически не обладает иммуногенностью.

Физиологически активные виды конъюгата ПЭГ- α -IFN по настоящему изобретению имеют формулу:



Реагент формулы II может быть конъюгирован с α -IFN традиционными способами. В частности реагент формулы II сначала подвергают взаимодействию с одной или несколькими первичными аминогруппами (например, с N-концевыми группами или с боковыми цепями лизина) α -IFN (например, $\alpha 2a$ -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 конъюгата 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 выбранными молекулярными массами. Условия реакции могут быть выбраны таким образом, чтобы обеспечить получение конъюгата по изобретению с одним присоединенным реагентом. Конъюгат формулы I, к которому 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 принятых способов, например, с помощью масс-спектропии, электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ПААГ-ДСН) или других известных методов, применяемых для разделения молекулярных энантиомеров по молекулярной массе. Затем соответственно определяют фракцию, которая содержит конъюгат формулы I, очищенный 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 конъюгату.

Ниже 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.

Описание чертежей

Фиг. 1: Противоопухолевая активность ПЭГ2- α 2a-IFN, изученная на лишенных шерсти мышах, которым подкожно имплантировали по-

чечные 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 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 5 - недельного периода.

Фиг. 5: Противоопухолевая активность ПЭГ2- α 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- 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. 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

Получение конъюгата формулы I

Материалы

$\alpha 2a$ -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. (Ньютон, МА). Набор для определения эндотоксина в тесте с использованием лизата амёбоцитов (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).

Методика эксперимента

А. Маломасштабное получение конъюгата формулы I

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 с 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 конъюгат 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 ПЭГилирования. Конъюгаты связывались менее сильно по сравнению с немодифицированным IFN. Олигомеры ПЭГ-IFN элюировали с помощью 40 мМ ацетата аммония в то время как конъюгат 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% конъюгата формулы I и был лишен немодифицированного IFN.

Б. Крупномасштабное получение конъюгата формулы I

6240 мг (156 мкмоль) реагента формулы II (средняя молекулярная масса 40000 Да) растворяли при 4°C в 63 мл 1 мМ HCl и быстро добавляли к 125 мл раствору 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 реагентам побочных продуктов реакции и олигомеров ПЭГ-IFN. Конъюгат формулы I элюировали с помощью уравнивающего буфера, содержащего 200 мМ NaCl. Немодифицированный интерферон, еще сохранившийся на колонке, удаляли, промывая 0,75 М NaCl в уравнивающим буфере. Конъюгат формулы I,

который 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 конъюгата формулы I составлял 40-45%.

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

Пример 2

Характеристика конъюгата формулы I

Определение протеина

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

Анализ с использованием ПААГ-ДСН

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-ДСП-гели, содержащие ПЭГ-конъюгаты, окрашивали для определения протеина, используя краситель Fast Stain (фирма Zoion Research, Inc.), в соответствии с инструкциями производителя.

Определение уровней эндотоксина

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

Пример 3

Биологические активности in vitro конъюгата формулы I

Антивирусная активность в бычьих почечных клетках

Антивирусную активность in vitro $\alpha 2a$ -IFN и конъюгата формулы I, полученного по описанной в примере 1.А методике, определяли с помощью биологического анализа культуры клеток, используя бычьи 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

15

активностями в процентах по отношению к исходному IFN.

Таблица 1

Показатели антивирусных активностей

Образцы	Тип ПЭГ	Общая масса	№ модифи-	Удельная	Остаточная
---------	---------	-------------	-----------	----------	------------

		ПЭГ (кДа)	фиц. Lys	активность (ед/мг)	активность (%)
$\alpha 2a$ -IFN	-	-	-	$2,00 \times 10^8$	100
Конъюгат формулы I	разветвленный	40	1	$1,40 \times 10^7$	7

Антипролиферативная активность in vitro на клетках опухоли человека

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 конъюгата формулы I, полученного по описанной в примере 1.А методике, 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, 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 (IC₅₀) IFN и конъюгата формулы I приведены в таблице 2. Данные показывают, что существует 28 - кратное увеличение антипролиферативной активности конъюгата формулы I по сравнению с таковой у IFN.

Таблица 2

16

328

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

Образец	Антипролиферативная активность	
	IC ₅₀ (нг/мл)	Увеличение
$\alpha 2a$ -IFN	0,56	1x

Конъюгат формулы I	0,02	28х
--------------------	------	-----

Пример 4

Фармакокинетика

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 3ФР. На следующий день после введения в канюли 0,15-0,2 мл 3ФР крысам инъецировали 2×10^6 единиц α -IFN в 0,2-0,4 мл 3ФР, а затем вновь инъецировали 0,15-0,2 мл 3ФР, чтобы гарантированно обеспечить поступление всего количества лекарства в организм животного. Таким образом, каждое животное получало дозу 8×10^6 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 конъюгата 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 описано ранее. Из графика зависимости активности от времени определяли окончательный период полураспада конъюгата формулы I и α -IFN, эти данные приведены в таблице 3, в которой также указано время его 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)
α 2a-IFN	2,1	1,0
Конъюгат формулы I	15,0	20,0

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

Пример 5

Иммуногенность

Нормальным мышам линии BDF-I (десять особей в группе) внутривенно инъецировали один раз в день пять раз в неделю различные препараты интерферона, содержащие 300000 единиц антивирусной активности. Некоторым мышам также инъецировали составную форму α 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 α 2a-IFN, вырабатывали нейтрализующие антитела, и эта реакция была сильно увеличена у мышей, которым инъецировали составные формы интерферона. У большинства животных, которым инъецировали конъюгат по настоящему изобретению, не было обнаружено антител.

Таблица 4

Иммуногенность

Обработка	Антитело (ИНЕ/мл)*	
	Среднее значение	Диапазон
α 2a-IFN	2400	217-8533
Составные формы α 2a-IFN	42667	8000-768000
Конъюгат формулы I	0	0-1133

* Интерферон-нейтрализующие единицы/мл

Пример 6

Противоопухолевая активность in vivo

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

Методика: 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- α 2a-IFN или немодифицированного α 2a-IFN, составляющие 30, 60, 120 или 300 мкг. В случае ПЭГ2- α 2a-IFN мышам обрабатывали один раз в неделю (в понедельник), используя по 30, 60, 120 или 300 мкг ПЭГ2- α 2a-IFN на обработку. В случае немодифицированного α 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.

Результаты: 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 день, 14 день, 21 день и 28 день 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 г, 0,62 г и 1,60 г соответственно у каждой из трех мышей. Масса опухоли, вызванной

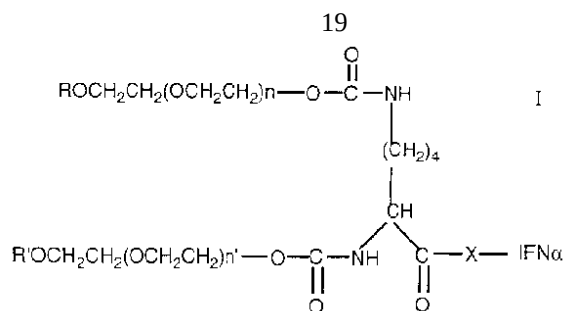
клетками A498, составила 2,32 г, 2,37 г и 1,94 г у каждой из трех мышей в контроле. На 80 день после окончания четырехнедельного периода обработки наличие опухоли определяли пальпацией семи мышей. При пальпации у всех семи мышей не обнаружили наличия опухолевой ткани.

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 день, 21 день, 28 день и 35 день (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 день, 21 день, 28 день и 35 день (фиг. 5 и 6).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Физиологически активный конъюгат ПЭГ- α -IFN, имеющий 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; и средняя молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля в этом конъюгате составляет от 26000 Да до 66000 Да.

2. Конъюгат по п.1, в котором молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет от 35000 до 45000 Да.

3. Конъюгат по п.2, в котором молекулярная масса звеньев полиэтиленгликоля составляет 40000 Да.

4. Конъюгат по п.1, в котором R и R' обозначают метил.

5. Конъюгат по п.1, в котором X обозначает NH.

6. Конъюгат по п.1, в котором α -IFN представляет собой $\alpha 2a$ -IFN.

7. Конъюгат по п.1, в котором средняя сумма n и n' составляет от 850 до 1000.

8. Конъюгат по п.1, в котором R и R' обозначают метил; X обозначает NH; α -IFN представляет собой $\alpha 2a$ -IFN; и один или оба n и n' равны 420.

9. Конъюгат по п.1, в котором R и R' обозначают метил, X обозначает NH; α -IFN представля-

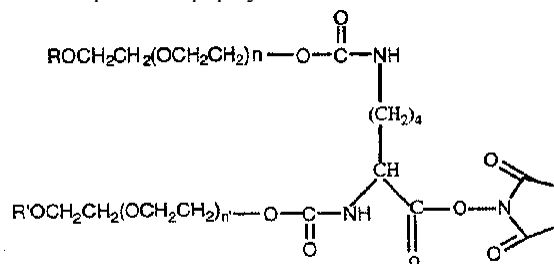
328

20

ет собой $\alpha 2a$ -IFN, и один или оба n и n' равны 520.

10. Конъюгат по п.1, обладающий антипролиферативной активностью, превосходящую таковую у α -IFN и сниженной антивирусной активностью в сравнении с α -IFN.

11. Способ получения конъюгата ПЭГ- α -IFN, обладающего антипролиферативной активностью, превосходящую таковую у α -IFN и сниженной антивирусной активностью в сравнении с α -IFN, заключающийся в том, что ковалентно связывают реагент формулы II



с α -IFN с получением конъюгата ПЭГ- α -IFN.

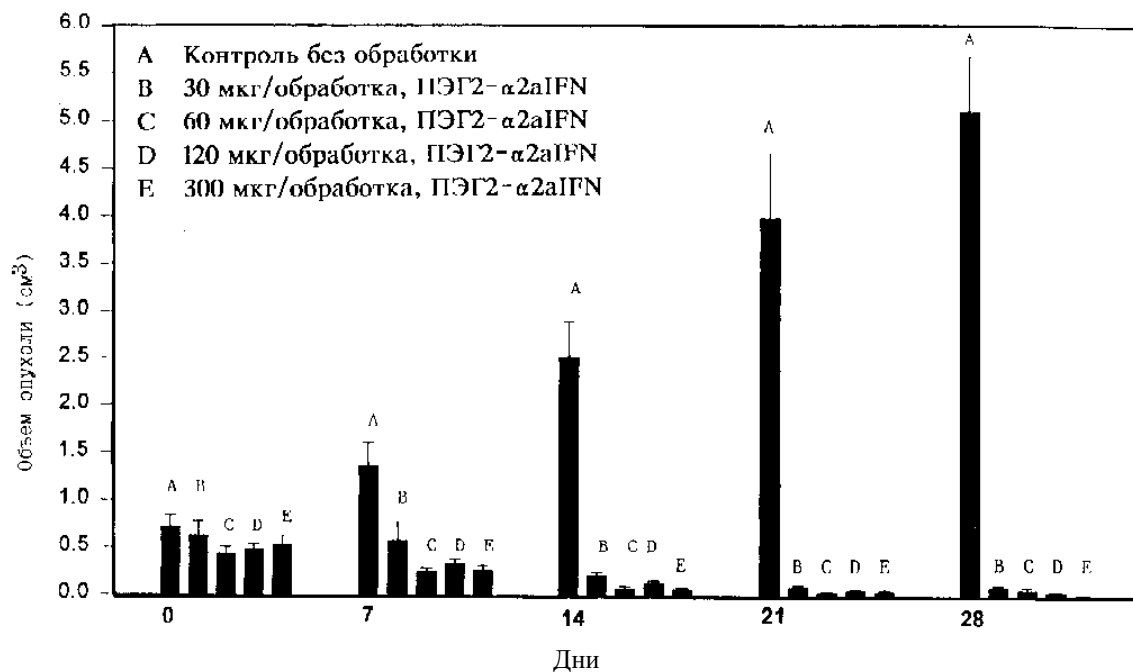
12. Фармацевтическая композиция, обладающая антипролиферативной и антивирусной активностью, содержащая конъюгат ПЭГ- α -IFN

по любому из пп.1-10 и терапевтически инертный носитель.

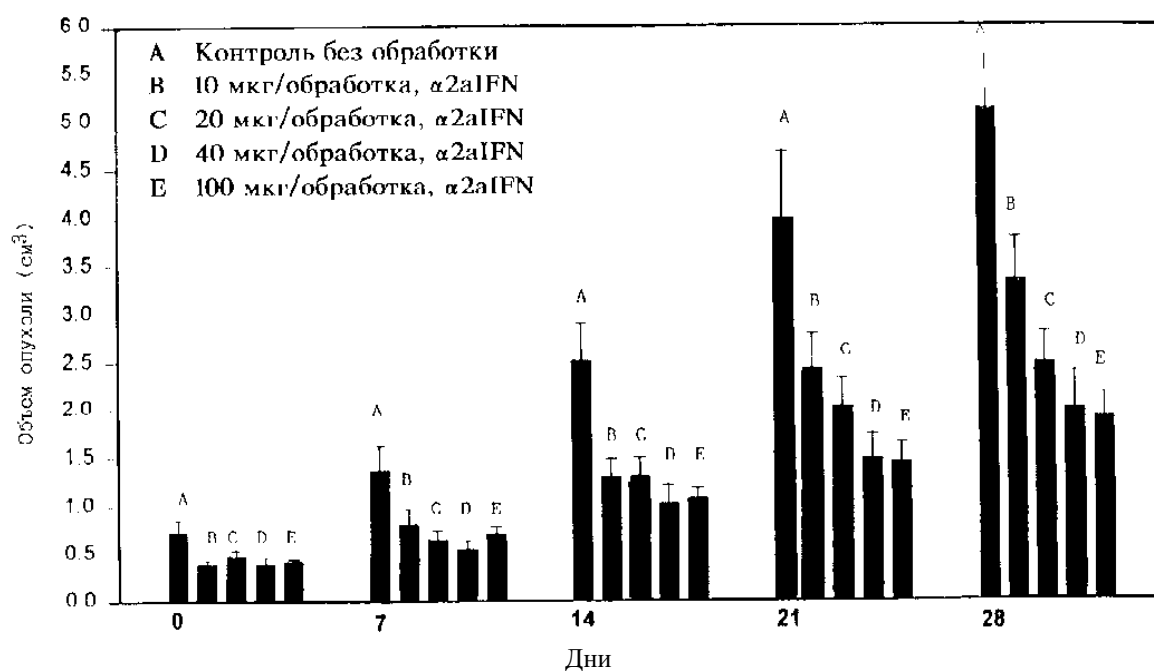
13. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики иммуномодуляторных нарушений, таких, как заболевания, относящиеся к опухоли, и инфекционных болезней, содержа-

щая конъюгат ПЭГ- α -IFN по любому из пп. 1-10 и терапевтически инертный носитель.

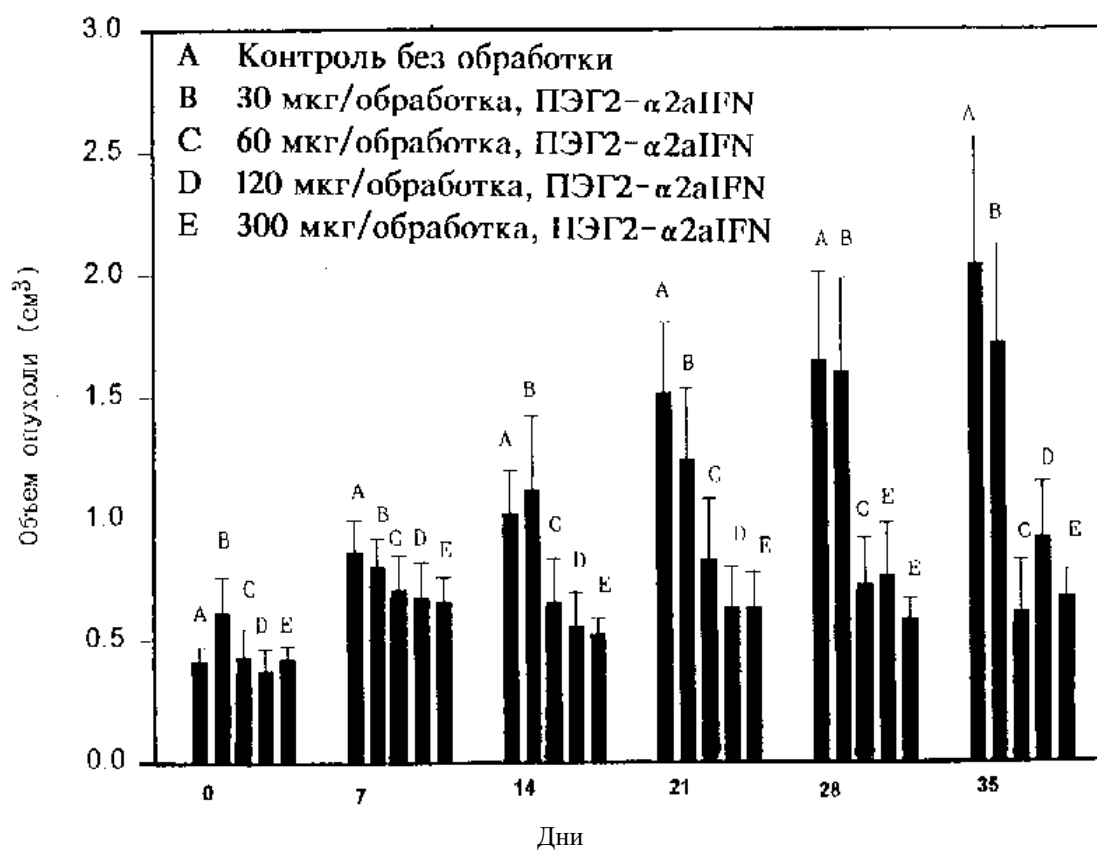
14. Способ лечения или профилактики иммуномодуляторных заболеваний включающий введение конъюгата ПЭГ- α -IFN по любому из пп. 1-10.



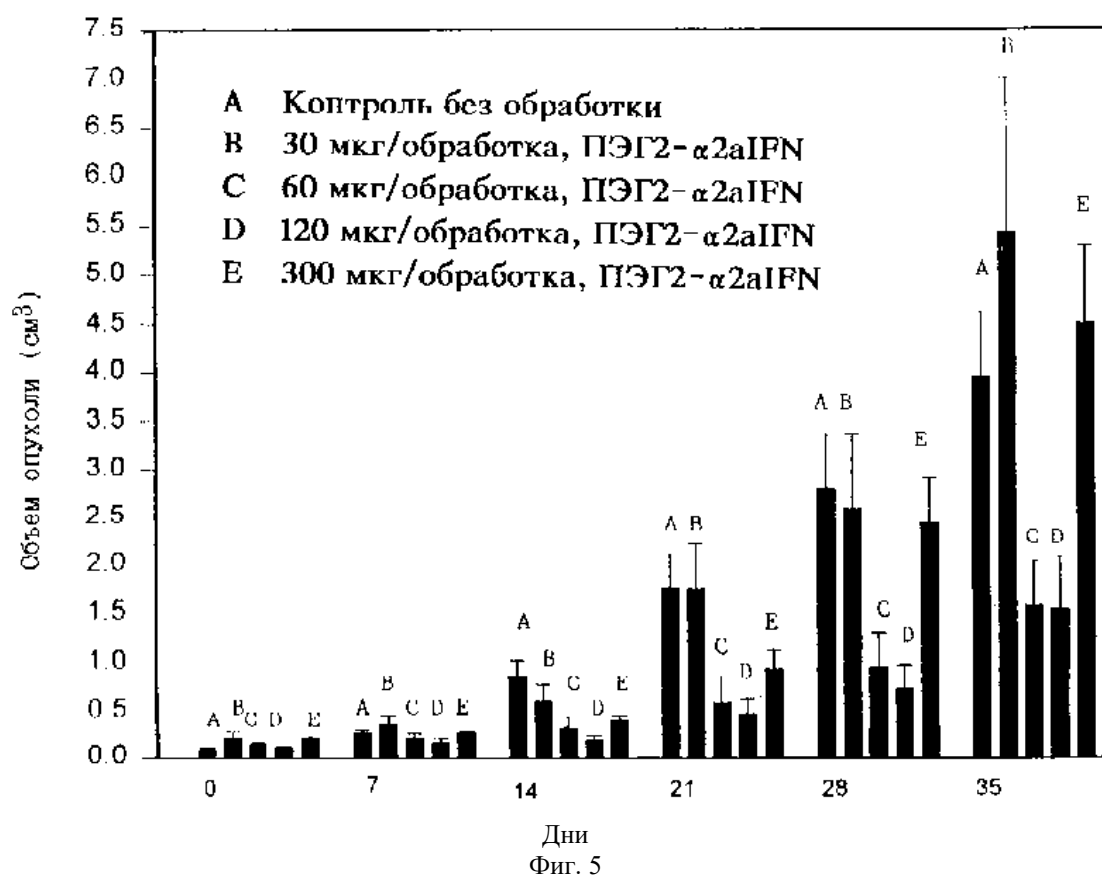
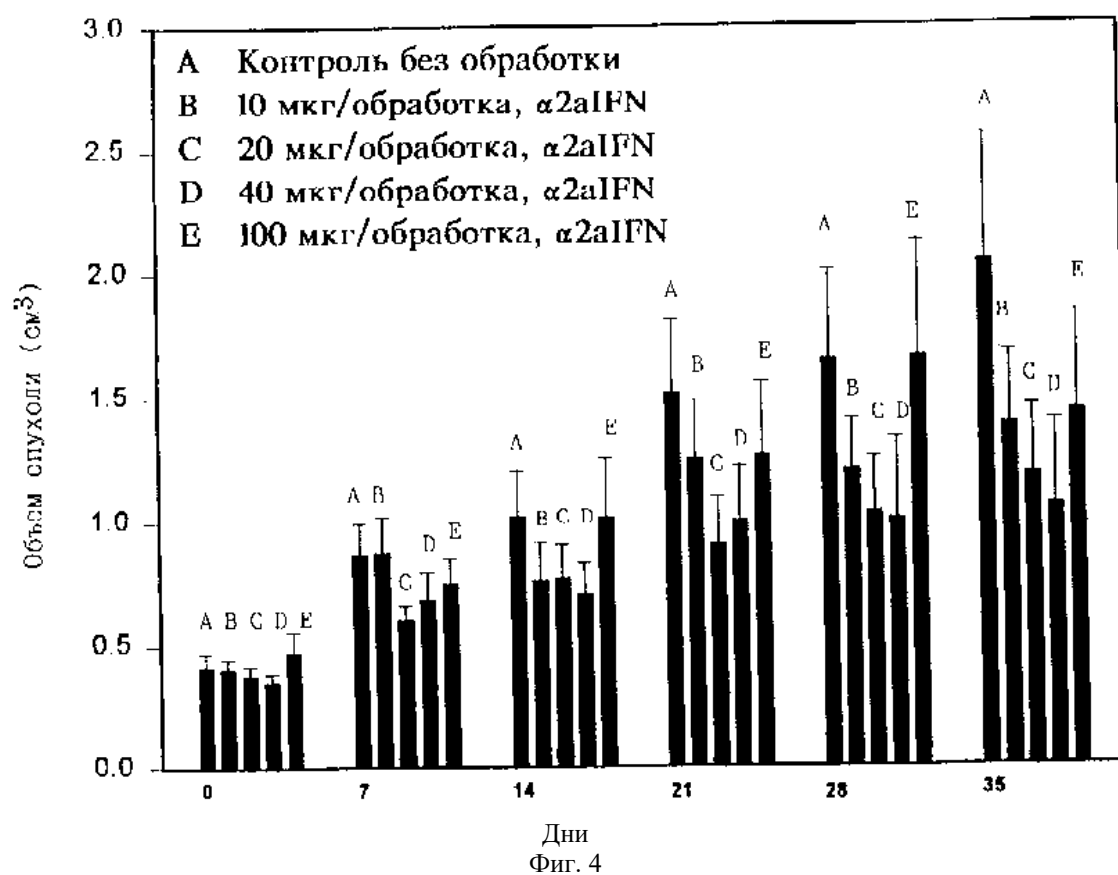
Фиг. 1

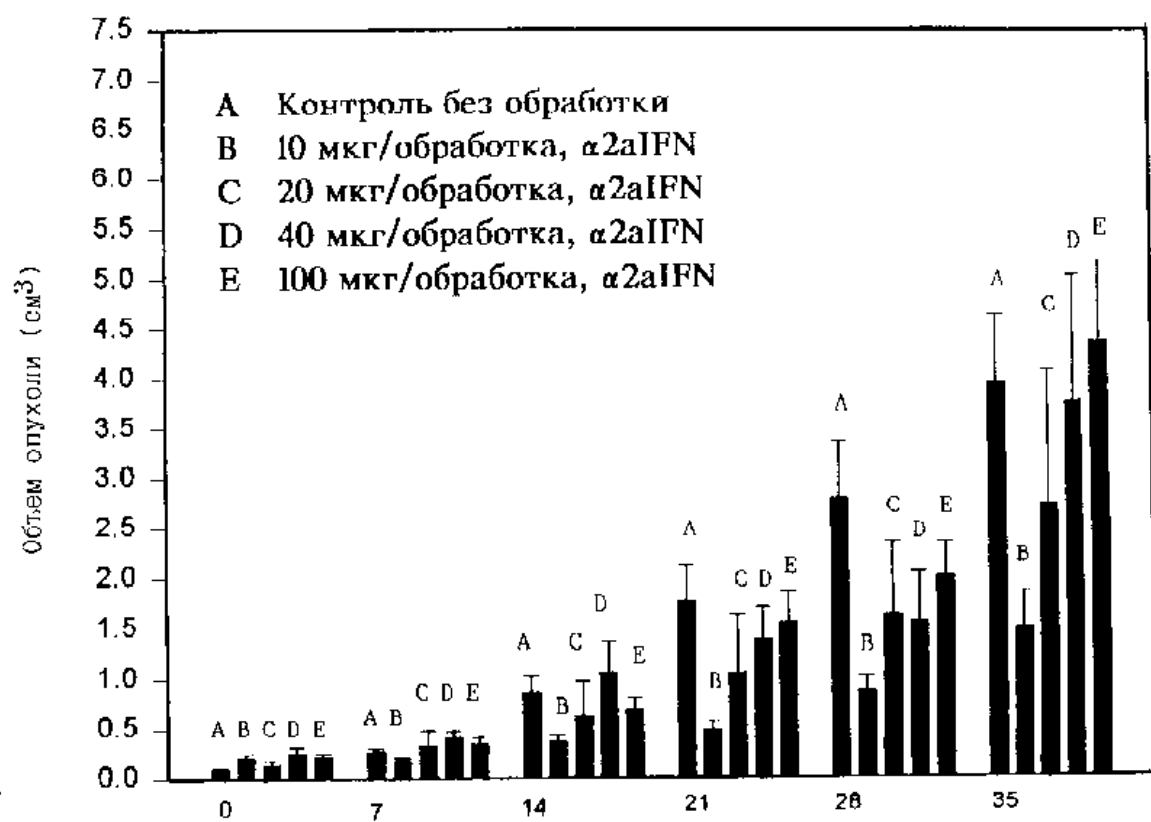


Фиг. 2



Фиг. 3





Дни
Фиг. 6