

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) **BG**

(11) **64694 B1**  
7(51) A 61 K 47/48

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 104871  
(22) Заявено на 17.10.2000  
(24) Начало на действие  
на патента от: 28.04.1999

Приоритетни данни

(31) 60/083,339 (32) 28.04.1998 (33) US

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № 7 на 31.07.2001  
(45) Отпечатано на 30.12.2005  
(46) Публикувано в бюлетин № 12  
на 30.12.2005  
(56) Информационни източници:  
(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприитежател(и):  
**APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS  
HOLDING N.V., CURACAO,  
PIETERMAAI 15 (AN)**

(72) Изобретател(и):  
**Nabil El Tayar, Milton, Massachusetts  
Michael J. Roberts, Madison, Alabama  
Milton J. Harris, Huntsville, Alabama  
Wayne Sawlvich, Wilmington, Massachusetts (US)**

(74) Представител по индустриална  
собственост:  
**Георги Цветанов Перев, 1124 София,  
ул. "Леонардо да Винчи" 3**

(86) № и дата на PCT заявка:  
**PCT/US1999/009161, 28.04.1999**

(87) № и дата на PCT публикация:  
**WO1999/055377, 04.11.1999**

**(54) ПОЛИОЛ-ИНТЕРФЕРОН- $\beta$  КОНЮГАТИ**

(57) Изобретението се отнася до получаване на ПЕГ-IFN- $\beta$  конюгати, в които ПЕГ остатъкът е ковалентно свързан с Cys<sup>17</sup> от човешки интерферон- $\beta$  чрез метод на сайтово специфично пегилиране с тиолно реактивоспособни пегилиращи агенти, до фармацевтичен препарат и до метод за лечение на инфекции, тумори и аутоимунни и възпалителни заболявания. Изобретението се отнася и до метод за степенно прикрепване в серии на ПЕГ остатъци към полипептид, по-специално към интерферон- $\beta$ .



15 претенции, 9 фигури

**BG 64694 B1**

**(54) ПОЛИОЛ-ИНТЕРФЕРОН-β КОНЮГАТИ****Област на техниката**

Изобретението се отнася до полиол-IFN-β конюгати, характеризиращи се с това, че полиолната единица е ковалентно свързана с Cys<sup>17</sup>. Други обекти на настоящото изобретение са методи за тяхното сайтово - специфично получаване, както и тяхното използване при терапия, прогнозиране или диагностика на бактериални инфекции, вирусни инфекции, автоимунни заболявания и възпалителни заболявания. Настоящото изобретение освен това се отнася до метод за степенно прикрепване на два или повече ПЕГ остатъка към полипептид.

**Предшестващо състояние на техниката**

Човешкият фибробластен интерферон (IFN-β) притежава антивирусна активност и може освен това да стимулира естествените клетки-убийци срещу новообразуващи се клетки. Той представлява полипептид от около 20 000 Da и се индуцира от вируси и двойно верижни РНКи. От нуклеотидната последователност на гена за фибробластния интерферон, клониран чрез рекомбинантна ДНК технология, Derynk et al. (Nature, 285:542-547, 1980) изведе пълната аминокиселинна последователност на белтъка. Той е с дължина 166 аминокиселини.

Shepard et al. (Nature, 294:563-565, 1981) описва мутация на база 842 (цистеин - тирозин в позиция 141), който унищожава неговата антивирусна активност и вариант на клон с делеция на нуклеотиди 1119-1121.

Mark et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81(18):5662-5666, 1984) въведе изкуствена мутация чрез заместване на база 469 (Т) с (А), предизвиквайки аминокиселинно превключване от Цистеин - Серин в позиция 17. Беше съобщено, че полученият в резултат на това β-интерферон е толкова активен както и "нативния" β-интерферон и стабилен при продължително съхранение (-70°C).

Ковалентното прикрепване на хидрофилен полимер - полиетиленгликол (ПЕГ), още известен като полиетиленов окис (ПЕО) към молекули има важни приложения в биотехнологията и медицината. В повечето си най-често срещани

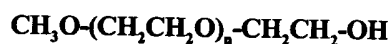
форми ПЕГ е линеен полимер, притежаващ хидроксилни групи в двата си края:



Тази формула може да бъде представена в съкратен вид като HO-ПЕГ-OH, където се има предвид, че - ПЕГ представлява полимерния скелет без крайните групи.

"-ПЕГ-" означава " $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ "

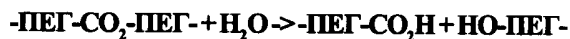
ПЕГ обикновено се използва като метокси-ПЕГ-OH (m-ПЕГ), при който единият от двата края е относително инертна метокси група, докато другият край е хидроксилна група, която е обект на химическо модифициране.



Също така често се използват разклонени полиетилен гликоли. Разклонените ПЕГи могат да бъдат представени чрез  $\text{R}(\text{-ПЕГ-OH})_m$ , при които R представлява централния остатък на сърцевината, като пентаеритритол или глицерол, и m представлява броя на разклонените рамена. Броят на разклонените рамена (m) може да варира от три до сто или повече. Хидроксилните групи са обект на химическа модификация.

Друга разклонена форма, като тази описана в РСТ патентна заявка WO 1996/021469, притежава единичен край, който е обект на химическа модификация. Този тип ПЕГ може да бъде представен като  $(\text{CH}_3\text{O-ПЕГ-})_p\text{R-X}$ , където p е равно на 2 или 3, R представлява централната сърцевина, като лизин или глицерол, и X представлява функционална група като карбоксилна група, която е обект на химическо активиране. Друга разклонена форма, "висящ ПЕГ" притежава реактивоспособни групи като карбоксилна група по продължението на ПЕГ скелета отколкото в края на ПЕГ веригите.

В допълнение на тези форми на ПЕГ, полимерът може да бъде получен със слаби или разградими връзки в скелета. Например, Harris е показал в патентна заявка на САЩ 06/026,716, че ПЕГ може да бъде получен с естерни връзки в полимерния скелет, които могат да бъдат подложени на хидролиза. В резултат на тази хидролиза се получава отцепване на полимера на фрагменти с по-ниски молекулни маси, съгласно следната реакционна схема:



Съгласно настоящото изобретение, с понятието полиетиленгликоол или ПЕГ се има предвид да се обобщят всички гореспоменати производни.

Съполимерите на етиленовия оксид и пропиленовия оксид са тясно свързани с ПЕГ и неговата химия и те могат да бъдат използвани вместо ПЕГ в много от неговите приложения. Те притежават следната химична формула:



където R е H или CH<sub>3</sub>.

ПЕГ е полезен полимер, притежаващ свойството на висока разтворимост във вода, както и висока разтворимост в много органични разтворители. Освен това ПЕГ е нетоксичен и неимуногенен. Когато ПЕГ се прикрепва по химически начин (ПЕГилиране) към водонеразтворимо съединение, полученият в резултат на това конюгат по принцип става водоразтворим, както и разтворим в много органични разтворители.

Понастоящем ПЕГ-белтъчни конюгати се използват при терапии, заместващи белтъци и за други терапевтични цели. Например, ПЕГилирана аденозин деаминаза (Adagen®) се използва за лечение на комбинирано заболяване с липса на имунитет (SCIDS), ПЕГилирана L-аспарагиназа (Onaspar®) се използва при лечение на остра лимфобластна левкемия (ALL), и ПЕГилиран α-интерферон (Intron(R) A) е в трета фаза на опити за лечение на хепатит С.

За общ преглед на ПЕГ-белтъчни конюгати с клинична ефикасност виж N.L. Burnham, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 15: 210-218, 1994.

Разработени са различни методи за ПЕГилиране на белтъци. Прикрепването на ПЕГ към реактивоспособните групи, намиращи се върху белтъка обикновено се осъществява, използвайки електрофилно активирани ПЕГ производни. Прикрепването на ПЕГ към α- и ε-амино групи, установени при лизинови остатъци и N-края, води до образуването на конюгат, състоящ се от смес от продукти.

Най-общо такива конюгати се състоят от популация от различни ПЕГ молекули, прикрепени към белтъчната молекула ("ПЕГмери"), вариращи от нула до голям брой amino групи в белтъка. За белтъчната молекула, която е била

еднократно модифицирана, ПЕГ единицата може да бъде прикрепена на няколко различни amino сайта.

Този вид неспецифично ПЕГилиране води до образуването на няколко конюгата, които обикновено са почти неактивни. Намалването на активността обикновено се причинява от скриване на белтъчния активен свързващ домейн, както е в случая с много цитокини и антители. Например, Katre et al. в патенти на САЩ 4,766,106 и 4,917,888 описва ПЕГилиране на IFN-β и И-2 с голям излишък на метокси-полиетилен гликолил N-сукцинимидил глутарат и метокси-полиетилен гликолил N-сукцинимидил сукцинат. И двата белтъка са получени в микробни клеткогостоприемници, което позволи сайтово-специфична мутация на свободен цистени до серин. Мутацията беше необходима при микробна експресия на IFN-β за подпомагане нагъването на белтъка. По-специално, IFN-β, използван при тези експерименти, е търговски продукт Betaseron®, при който Cys<sup>17</sup> остатък е заменен със серин. Допълнително, липсата на гликозилиране намалява неговата разтворимост във водни разтвори. Неспецифичното ПЕГилиране доведе до повишена разтворимост, но основният проблем беше намаленото ниво на активност и добив.

Заявка за EP 593 868, озаглавена ПЕГ-интерферон конюгати, описва получаването на ПЕГ-IFN-α конюгати. Обаче, реакцията на ПЕГилиране не е сайтово специфична и следователно са получени смес от позиционни изомери на ПЕГ-IFN-α конюгати (виж още Monkars et al., *ACS Symp. Ser.*, 680:207-216, 1997).

Kinstler et al., в заявка на EP 675 201 показват селективно модифициране на остатък на N-края на фактора за мегакариоцитен растеж и фактора за развитие (MGDF) с mПЕГ-пропионалдеhid. Това позволи възпроизводимо ПЕГилиране и фармакокинетика от партида на партида. Gilbert et al. в патент на US 5,711,944 показва, че може да бъде постигнато ПЕГилиране на IFN-α с оптимални нива на активност. В този случай беше необходим етап на трудоемко пречистване за получаване на оптимален конюгат.

Болшинството цитокини, както и други белтъци, не притежават специфичен сайт за прикрепване на ПЕГ, освен примерите споменати по-горе, много е вероятно някои от тези изомери, получени чрез ПЕГилираща реакция да бъдат час-

тично или напълно неактивни, следователно предизвикващи загуба на активност на крайната смес.

Следователно, желаната цел при получаването на такива белтъчни конюгати е сайтово специфично моно-ПЕГилиране.

Woghiren et al. в *Bioconjugate Chem.*, 4(5): 314-318, 1993, синтезира тиол-ПЕГ производни, селективни за такова сайтово специфично ПЕГилиране. Стабилно тиол-защитено ПЕГ производно под формата на пара-пиридил дисулфид реактивоспособна група, беше показано, че специфично конюгира със свободен цистеин в белтъка папаин. Новообразуваната дисулфидна връзка между папаин и ПЕГ може да бъде разцепена при меки редуциращи условия до регериране на нативния белтък.

С цитирането на който и да е документ тук, не се има предвид да се приеме допускането, че такъв документ се отнася към предшестващото ниво на техниката или да се счита материал за подлагач на съмнение патентността, на която и да е патентна претенция на настоящото изобретение. Всяко становище по отношение на съдържанието или дата на документ се основава на информация налична на заявителите по време на регистрацията на заявката и не представлява допускане по отношение коректността на такова становище.

### Обобщение на изобретението

В настоящото изобретение са представени полиол-IFN- $\beta$  конюгати и по-специално ПЕГ-IFN- $\beta$  конюгати, характеризиращи се с това, че полиолната единица е ковалентно свързана с Cys<sup>17</sup>. Специфичното конюгиране се получава чрез позволяване на тиол-реактивоспособните групи да реагират с остатъка Cys<sup>17</sup> в интерферон. Очаква се такива конюгати да показват повишена ефективност *in vivo*. Целта е да се получи повишена разтворимост при неутрално рН, повишена стабилност (понижена агрегация), понижена имуногенност и да няма загуба на активност по отношение на "нативен"  $\beta$ -интерферон. Резултатите от такова конюгиране биха намалили броят на дозите, необходими за постигането на желания ефект, би опростило и стабилизиращо обработката на фармацевтичния препарат и би дало възможност да се увеличи дългос-

рочната ефективност.

Настоящото изобретение освен това осигурява метод за степенно прикрепване в серии на ПЕГ остатъците към полипептида.

### Кратко описание на фигурите

Фигура 1 показва графика на капилярна електрофореза на полиол-IFN- $\beta$  конюгат преди пречистване.

Фигури 2А-2В показват пречистването на полиол-IFN- $\beta$  конюгат, проведено чрез гел проникваща хроматография (Супероза 12): фиг. 2А - първи цикъл; фиг. 2Б - втори цикъл; фиг. 2В - трети цикъл.

Фигура 3 показва SDS - ПААГЕ на пречистен след третия хроматографски цикъл полиол-IFN- $\beta$  конюгат.

Фигура 4 показва графика на капилярна електрофореза на пречистен полиол-IFN- $\beta$  конюгат, при който IFN- $\beta$  е ПЕГилиран с mПЕГ-OPSS<sub>sk</sub>.

Фигура 5 показва MALDI MS спектъра на пречистен полиол-IFN- $\beta$  конюгат.

Фигура 6 показва сравнение между анти-вирусната активност на "нативен" IFN- $\beta$  и ПЕГ-IFN- $\beta$  конюгат. Клетки WISH бяха инкубирани с посочените концентрации на проби от IFN- $\beta$  за 24 h преди обработка с цитопатична доза от вирусен стоматитен вирус. Цитопатичният ефект беше определен след допълнителна 48-часова конверсия с МТТ.

Фигура 7 показва свързващият профил на IFN- $\beta$  и ПЕГ-IFN в клетки Daudi.

Фигура 8 показва фармакокинетичният профил на IFN- $\beta$  и ПЕГ-IFN в мишки след интравенозно прилагане. Линията от точки показва LOQ анализа за всяка стандартна крива.

Фигура 9 показва фармакокинетичният профил на IFN- $\beta$  и ПЕГ-IFN в мишки след подкожно прилагане. Линията от точки показва LOQ анализа за всяка стандартна крива.

### Подробно описание на изобретението

Настоящото изобретение се основава на откритието, че прикрепването на полиолния остатък, по-специално на ПЕГ остатъкът към остатъка Cys<sup>17</sup> на човешки IFN- $\beta$ , неочаквано увеличава (или поне запазва и не води до намаля-

ване) на биологичната активност на IFN- $\beta$ , сравнено с тази на нативен човешки - интерферон. Следователно, не само IFN- $\beta$  с полиолен остатък прикрепен към остатък Cys<sup>17</sup>, показва същата или повишена биологична активност на IFN- $\beta$ , но този полиол-IFN- $\beta$  конюгат освен това осигурява желани характеристики дадени от полиолния остатък, като например повишена разтворимост.

Понятието "IFN- $\beta$ ", както е използвано тук, означава човешки фибробластен интерферон, получен чрез изолиране от биологични течности или чрез ДНК рекомбинантни техники от прокариотни или еукариотни клетки-гостоприемници, както и негови соли, функционални производни, прекурсори и активни фракции, осигуряващи цистеинов остатък, намиращ се в позиция 17 в естествено срещаната се форма.

Полиолният остатък в полиол-IFN- $\beta$  конюгат съгласно настоящото изобретение може да бъде всеки водоразтворим моно- или бифункционален полиалкиленов оксид, притежаващ линейна или разклонена верига. Обикновено, полиола е полиалкилен гликол като например полиетилен гликол (ПЕГ). Обаче, всеки с опит в съществуващото ниво на техниката ще разбере, че други полиоли като например полипропилен гликол и съполимери на полиетилен гликол и полипропилен гликол могат да бъдат подходящо използвани.

Както е използвано тук, с понятието "ПЕГ остатък" се възнамерява да се включват без да се ограничава до, линейни и разклонение ПЕГ, висящи ПЕГ, дендримерни ПЕГ, съполимери на ПЕГ и един или повече полиоли и съполимери на ПЕГ и PLGA (полимлечна гликолова киселина).

Определението "соли" се използва тук по отношение както на соли на карбоксилни групи, така и на соли на аминокиселини на съединения, които се получават по известни методи. Солите на карбоксилните групи включват неорганични соли като например натриеви, калиеви, калциеви соли и соли с органични бази като такива образуващи се с аминокиселините като триетаноламин, аргинин или лизин. Солите на аминокиселините включват например соли с неорганични киселини като например солна киселина и с органични киселини като например оцетна киселина.

Определението "функционални производ-

ни" както е използвано тук се отнася до производни, които могат да бъдат приготвени от функционални групи, присъстващи в странични вериги на аминокиселинни остатъци или на терминални N- и C-групи, съгласно известни методи и са включени в настоящото изобретение, когато те са фармацевтично приемливи, т.е. когато те не разрушават белтъчната активност или не придават токсичност на съдържащия ги фармацевтичен препарат. Такива производни включват например естери или алифатни амиди на карбоксилни групи и N-ацилни производни на свободни аминокиселини или O-ацилни производни на свободни хидроксилни групи и се образуват с ацилни групи като например алканоилни или ароилни групи.

"Прекурсори" са съединения, които се превръщат в IFN- $\beta$  в човешкото или животинско тяло.

Към понятието "активни фракции" на белтък, настоящото изобретение отнася всеки фрагмент или прекурсор на полипептидна верига на самото съединение, самостоятелно или в комбинация със свързани молекули или остатъци, свързани с него, например, остатъци на захари или фосфати, или агрегати на полипептидни молекули, когато такива фрагменти или прекурсори показват същата активност като IFN- $\beta$  като медикамент.

Конюгатите от настоящото изобретение могат да бъдат получени, чрез който и да е метод, известен в съществуващото ниво на техниката. Съгласно един от методите на изобретението, IFN- $\beta$  реагира с ПЕГилиращ агент в подходящ разтворител и желаният конюгат е изолиран и пречистен, например чрез прилагането на един или повече хроматографски методи.

"Хроматографски метод" означава всяка техника, която е използвана за разделяне на компоненти в смес чрез прилагането на тази смес на носител (стационарна фаза), през която преминава разтворител (подвижна фаза). Принципиите на разделяне на хроматографията се основават на различната физическа природа на стационарната и подвижна фаза.

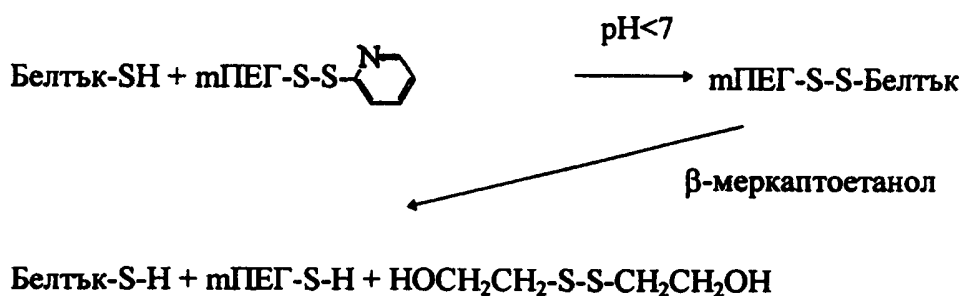
Някои по-специални видове хроматографски методи, които са добре известни в литературата включват: течна, течна при високо налягане, йонообменна, абсорбционна, афинитетна, разделителна, хидрофобна, обратно фазова,

гелпроникваща, ултрафилтрационна или тънко-лойна хроматография.

“Понятието “тиол-реактивоспособен ПЕГилиращ агент”, както е използвано в настоящата заявка, означава всяко ПЕГ производно, което притежава способност да реагира с тиолната група на цистеиновия остатък. То може да бъде например ПЕГ, съдържащ функционална група като ортопиридил дисулфид, винилсулфон, малеимид, йодоацетамид и други. Съгласно предпочитан метод на настоящото изобретение, тиол-реактивоспособен ПЕГилиращ агент е ортопиридил дисулфидно (OPSS) производно на ПЕГ.

ПЕГилиращият агент се използва в неговата моно-метоксилирана форма, където само единият край е наличен за конюгация или в бифункционална форма, където и двата края са налични за конюгация, като например при образуването на конюгат с два ковалентно прикрепени IFN-β към един ПЕГ остатък. Той притежава специално молекулна маса между 500 и 100 000.

Типична схема на реакция за получаване на конюгатите от изобретението е представена по-долу:



Вторият ред на гореспоменатата схема показва метод за разцепване на връзката ПЕГ-белтък. Производното mПЕГ-OPSS е високо селективно към свободни сулфхидрилни групи и реагира бързо при кисели условия на pH, където IFN-β е стабилен. Високата селективност може да бъде показана чрез редуцията на конюгата до активната форма на IFN-β и ПЕГ.

Беше показано, че дисулфидната връзка, която се получава между белтъка и ПЕГ остатъка, е стабилна при циркулиране в телесните течности, но тя може да бъде редуцирана при навлизане в околната среда на клетката. Следователно се очаква, че този конюгат, който не навлиза в клетката ще бъде стабилен при циркулиране в телесните течности, докато не бъде изхвърлен.

Трябва да се отбележи, че горната реакция е сайтово-специфична, т.к. останалите два цистеинови остатъци, намиращи се в позиция 31 и 141 на естествено срещащата се форма на IFN-β не реагират с тиол-реактивоспособен ПЕГилиращ агент т.к. те образуват дисулфидни мостове.

Освен това, настоящото изобретение е насочено към метод за постепенно прикрепване на

два или повече ПЕГ остатъка към полипептид. Този метод се основава на разбирането, че активираният ПЕГ с ниска молекулна маса реагира по-пълно със стереохимично скрит реакционен сайт на белтък, отколкото активираният ПЕГ с висока молекулна маса. ПЕГ-модифицирането на скъпи терапевтични белтъци трябва да бъде ефективно по отношение на цената, за да е практически възможно получаването на ПЕГ конюгати. В допълнение, за да се намали свиващото филтруване и да се оптимизират фармакологичните свойства на ПЕГ-белтъчен конюгат, конюгатът трябва да притежава ефективен размер, еквивалентен на този на белтък с молекулна маса от 70 kDa. Това означава, че за сайтово специфично модифициране, където ще бъде прикрепен един ПЕГ, за предпочитане се прикачва ПЕГ производно, притежаващо молекулна маса по-висока от 20 kDa. Ако сайта на модифициране е стереохимично претрупан, реактивоспособната група на голям ПЕГ остатък може трудно да достигне сайта на модифициране и това би довело до ниски добиви. Предпочитан метод на ПЕГилиране на полипептид, съгласно настоящото изобретение, увеличава добива на сайтово-специфичното ПЕГилиране чрез първоначално прик-

репване на малък хетеро- или хомополимерен ПЕГ остатък, който благодарение на своя относително малък размер може да реагира с стереохимично претрупани сайтове. Последващото прикрепване на ПЕГ производно с висока молекулна маса към малък ПЕГ води до висок добив на желанния ПЕГилиран белтък.

Метод за степенно прикрепване на два или повече ПЕГ остатъка в серии към полипептид, съгласно настоящото изобретение включва прикрепването на хетеробифункционален или хомобифункционален ПЕГ остатък с ниска молекулна маса първо към полипептид и след това прикрепването на монофункционален или бифункционален ПЕГ остатък към свободния край на ПЕГ остатък с ниска молекулна маса, който вече е прикрепен към полипептида. Следвайки степенното прикрепване в серии на два или повече ПЕГ остатъка към полипептид, който полипептид е поспециално IFN- $\beta$  и където Cys<sup>17</sup> локализиран в стереохимично претоварен сайт е предпочитания сайт на ПЕГ прикрепване, ПЕГ-полипептидният конюгат може да бъде пречистен, използвайки една или повече от техниките за пречистване като например йонообменна хроматография, гел-проникваща хроматография, хроматография с хидрофобно взаимодействие, афинитетна хроматография и обратно фазова хроматография.

ПЕГ остатъка с ниска молекулна маса притежава формулата



където W и X са групи, които независимо реагират с аминокиселинна, сулфхидрилна, карбоксилна или хидроксилна функционална група, за да прикрепят ПЕГ остатъка с ниска молекулна маса към полипептид. W и X са поспециално независимо избрани от ортопиридил дисулфид, малеимици, винил сулфони, йодоацетамиди, амини, тиоли, карбоксилни, активни естери, бензотриазолни карбонати, р-нитрофенолни карбонати, изоцианати и биотин. ПЕГ остатъка с ниска молекулна маса, поспециално притежава молекулна маса в диапазона от около 100 до 5 000 Da.

Монофункционален или бифункционален ПЕГ остатък за прикрепване към свободния край на ПЕГ с ниска молекулна маса, който е прикрепен към полипептид, поспециално притежава молекулна маса в диапазона от около 100 до 200 kDa, и поспециално е метокси ПЕГ, разклонен

ПЕГ, хидролитично или ензимно разградим ПЕГ, висящ ПЕГ или дендримерен ПЕГ. Освен това, монофункционалният или бифункционален ПЕГ притежава формулата



където Y е реактивоспособен към терминалната група на свободния край на ПЕГ остатък с ниска молекулна маса, който е прикрепен към полипептид и Z е -OCH<sub>3</sub> или група, реактивоспособна за образуване на бифункционален конюгат.

ПЕГ-полипептидният конюгат, получен по гореспоменатия метод за степенно прикрепване на два или повече ПЕГ остатъци, може да бъде използван за получаването на лекарствен препарат или фармацевтичен препарат за третиране на заболявания или нарушения, при които полипептидът е ефективен като активна съставка.

Друг обект на настоящото изобретение е осигуряването на конюгати във фактически чиста форма с цел те да са подходящи за използване като фармацевтични препарати като активна съставка за лечение, диагностика или прогнозиране на бактериални или вирусни инфекции, както и на автоимунни, възпалителни заболявания или тумори. Такъв фармацевтичен препарат представлява друг обект на настоящото изобретение.

Неограничаващи примери на гореспоменатите заболявания включват: септичен шок, СПИН, ревматоиден артрит, лупус, еритроматоза и множествена склероза.

Други методи и преимущества на изобретението са очевидни от следното описание.

Метод на изобретението е прилагането на фармакологично активно количество от конюгатите от изобретението на обекти изложени на риск от развиването на някое от гореспоменатите заболявания или на обекти вече показали такава патология.

Може да бъде използван всеки начин на прилагане на препарата, съвместим с активния принцип. Предпочитано е парентерално прилагане като подкожно, интрамускулно или венозно инжектиране. Дозата на активната съставка, която трябва да бъде приложена, зависи от основата на медицинското предписание в съответствие с възраст, тегло и индивидуален отговор на пациента.

Дозата може да бъде между 10  $\mu$ g и 1 mg

дневно за средно телесно тегло от 75 kg, и предпочитаната дневна доза е между 20 µg и 200 µg.

Фармацевтичният препарат за парентерално прилагане може да бъде приготвен в инжекционна форма, включвайки активна съставка и подходящ носител. Носителите за парентерално прилагане са добре известни в съществуващото ниво на техниката и включват например вода, физиологичен разтвор, разтвор Рингер, и/или глюкоза. Носителят може да съдържа малки количества ексципиенти с цел поддържане стабилността и изотоничността на фармацевтичния препарат. Приготвянето на разтворите може да бъде направено съгласно традиционните начини.

Настоящото изобретение беше описано с цитати към специфични методи, но съдържанието на описанието включва всички модификации и замествания, които могат да бъдат проведени от всеки с опит в съществуващото ниво на техниката, без да се разпростира извън значението и целите на патентните претенции.

Изобретението ще бъде сега описано с помощта на следните примери, които по никакъв начин не трябва да се тълкуват ограничаващи настоящото изобретение.

Пример 1. Получаване на ПЕГ-IFN-β конюгат

Модифициране на IFN-β с mПЕГ<sub>5k</sub>-OPSS

За получаването на ПЕГ-IFN-β конюгат беше използван рекомбинантен човешки IFN-β, стабилен при концентрация от 0.37 mg/ml в 50 mM натриево-ацетатен буфер, pH 3.6. Към 2 ml разтвор на IFN-β с концентрация 0.37 mg/ml (0.74 mg,  $3.7 \times 10^{-8}$  mol), беше прибавен 1.0 ml 6 M урея. mПЕГ<sub>5k</sub>-OPSS беше прибавен в моларен излишък от 50 mol към един mol IFN-β и двете вещества бяха оставени да реагират в полипропиленова фиолка както за 2 h при 37°C, така и за 1 h при 50°C. Реакционната смес беше анализирана с капилярна електрофореза (КЕ) за определяне степента на образуване на ПЕГ-IFN-β конюгат чрез ПЕГилираща реакция, преди каквото и да е пречистване (Фиг. 1). Типичен добив за тази реакция е 50 % ПЕГ-IFN-β. Реакционните продукти бяха филтрувани от реакционната смес през 0.22 mm филтър за спринцовка и филтруваният разтвор беше след това нанесен на колона за гел проникваща хроматография (или Супероза 12 или Супердекс 75, Фармация) и елуиран с буфер 50 mM натриев фосфат, 150 mM

NaCl, pH 7.0. Фиг. 2 показва профилът на елуиране от пречистването на ПЕГ-IFN-β конюгат на хроматографска колона за гел проникваща хроматография Супероза 12. Пиковите бяха събрани и анализирани със SDS-ПААГЕ (Фиг. 3). Фракциите, съдържащи ПЕГ-IFN-β конюгат бяха обединени и концентратът беше отново нанесен на същата колона за гел проникваща хроматография за допълнително пречистване на ПЕГ-IFN-β конюгата, поради близкото положение с "нативния" IFN-β пик (Фиг. 2 Б). Тази процедура беше повторена (трети цикъл), с цел да се осигури чистота (Фиг. 2В). Фиг. 4 и фиг. 5 показват съответно графиките от капилярна електрофореза и MALDI-MS спектъра на пречистения ПЕГ-IFN-β конюгат.

Модифициране на IFN-β с mПЕГ<sub>30k</sub>-OPSS

Беше осигурен рекомбинантен човешки IFN-β, стабилен при концентрация от 0.36 mg/ml в 50 mM натриево-ацетатен буфер, pH 3.6. Към 3 ml разтвор на IFN-β с концентрация 0.36 mg/ml (1.08 mg,  $4.9 \times 10^{-8}$  mol) беше прибавен 36 mg mПЕГ<sub>30k</sub>-OPSS в 3 ml дейонизирана вода и двете вещества бяха оставени да реагират в полипропиленова фиолка за 2 h при 50°C. Реакционната смес беше анализирана с капилярна електрофореза (КЕ) за определяне степента на модификация. Типични добиви за тази реакция са < 30 %. След това разтворът беше нанесен на колона за гел проникваща хроматография (Супероза 12, Фармация) и елуиран с буфер 50 mM натриев фосфат, 150 mM NaCl, pH 7.0. Пиковите бяха събрани и анализирани с SDS-ПААГЕ за съдържанието им.

Пример 2. Биологична активност на ПЕГ-IFN-β конюгат

За оценка влиянието на ПЕГилирането върху антивирусната активност на човешки рекомбинантен IFN-β, човешки WISH амниотични клетки бяха предварително инкубирани както с прясно получен IFN-β (същата партида, използвана за ПЕГилиране), така и с ПЕГ-IFN-β конюгат. Опосредстваната от IFN-β антивирусна активност, измерена чрез WISH-VSV цитопатичен анализ, беше определена съгласно антивирусният WISH биоанализ, разработен на основата на протокола на Novick et al., J. Immunol., 129:2244-2247 (1982). Материалите използвани при този WISH анализ са както следва:

Клетки WISH (ATCC CCL 25)



Везикулярен стоматитен вирус (ATCC V-520-001-522), съхраняван при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Човешки рекомбинантен IFN- $\beta$ , Интер-Фарм Лабораторис ООД (тип 32,075, партида #205035),  $82 \times 10^6$  IU/ml, специфична активност  $222 \times 10^6$  IU/mg.

ПЕГ-IFN- $\beta$ -конюгат получен съгласно пример 1 и съхраняван в PBS, pH 7.4

Хранителна среда за култивиране на WISH (MEM с високо съдържание на глюкоза със соли на Earl + 10 % PBS + 1.0 % L-глутамин + пеницилин / Стрептомицин (100 U/ml, 100  $\mu\text{g/ml}$ )

Среда за анализ на WISH (MEM с високо съдържание на глюкоза със соли на Earl + 5 % PBS + 1.0 % L-глутамин + пеницилин / стрептомицин (100 U/ml, 100 g/ml).

MTT с концентрация 5 mg/ml в PBS, съхраняван при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Протоколът за WISH анализа е както следва:

Разредете пробата на IFN- $\beta$  два пъти от началната концентрация с WISH среда за анализ.

Направете трикратни разреждания на пробите на IFN- $\beta$  в среда за анализ WISH в плоска 96-гнездова плака, така че всяко гнездо да съдържа 50  $\mu\text{l}$  от разредената проба на IFN- $\beta$  (в някои контролни гнезда се поставят само 50  $\mu\text{l}$

от WISH среда за анализ).

Отделете WISH клетки в логаритмична фаза на растеж с разтвор на трипсин/EDTA, промийте ги в WISH среда за анализ и ги доведете до крайна концентрация  $0.8 \times 10^6$  клетки/ml.

Добавете 50  $\mu\text{l}$  от WISH клетъчна суспензия ( $4 \times 10^4$  клетки/гнездо) към всяко гнездо. Сега крайната концентрация на IFN- $\beta$ , експозиран на клетките е 1X.

След инкубиране за 24 h в инкубатор, поддържащ влага и 5 %  $\text{CO}_2$ , се добавят 50  $\mu\text{l}$  от 1:10 разреждане (в среда за анализ WISH) от сток разтвор на VSV (доза, предварително определена да лизира 100 % WISH клетките за 48 h) към всички гнезда, освен към гнездата на вирусната контрола (в тях се нанасят само еквивалентен обем WISH среда за анализ).

След допълнителни 48 h, към всички гнезда се добавят 25  $\mu\text{l}$  разтвор на MTT, след което плаките се инкубират още 2 h в инкубатор.

Съдържанието на гнездата се отстранява чрез обръщане на плаката и към гнездата се добавя 200  $\mu\text{l}$  100 % етанол.

След 1 h, плаките се отчитат при 595 nm, използвайки софтуерна програма Soft max Pro и спектрофотометърна система Спектрамакс (Молекулярни апарати).

Таблица 1. Антивирусна Активност на Проби на ПЕГилиран и Моск-ПЕГилиран IFN- $\beta$

Проба IFN- $\beta$ *	EC <sub>50</sub> **
ПЕГ-IFN- $\beta$ -конюгат	3.9 + / - 0.7 pg/ml
IFN- $\beta$	16.4 + / - 1.0 pg/ml

\* Сток концентрацията на IFN- $\beta$  в пробите беше определена чрез аминокиселинен анализ

\*\* EC<sub>50</sub> (+ / - стандартно отклонение) беше определена чрез софтуерна програма Microcal Origin 4.1.

Както е показано на фиг. 6 и таблица 1 погоре, ПЕГ-IFN- $\beta$ -конюгата, поддържа нива на антивирусна активност по-високи от прясно приготвената изходна партида на IFN- $\beta$ . Наблюдението, че ПЕГ-IFN- $\beta$ -конюгата притежава приблизително 4 пъти по-висока биоактивност от

прясно приготвения IFN- $\beta$  може да бъде също така резултат от увеличената стабилност на ПЕГ-IFN- $\beta$ -конюгата по отношение на "нативния" IFN- $\beta$  след добавянето на WISH клетките в средата.

Пример 3. In vitro анализ на относителна-

та активност на проби ПЕГ-IFN- $\beta$

Относителната биоактивност на ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$ -конюгат и ПЕГ[2 x 20 kDa]-IFN- $\beta$ -конюгат беше определена чрез WISH анализ, из-

ползвайки стандартния протокол, описан в пример 2 (таблица 2). Бяха проведени три независими анализа на три различни индивида в различно време.

Таблица 2. Относителна антивирусна активност на ПЕГ-IFN- $\beta$

Проба	Относителна Активност на Интерферон*			
	(от три изследвания)			
	Анализ 1	Анализ 2	Анализ 3	Средно (С.О)
ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$	3.2 X по-високо	3.1 X по-високо	1.8 X по-високо	3.2X(0.78) по-високо
ПЕГ[20 X 20 kDa]-IFN- $\beta$	4.2 X по-високо	1.3 X по-високо	0.85 X по-високо	3.2 X (1.8) по-високо

\* EC<sub>50</sub> дози, сравнени със стандартен IFN- $\beta$ , включен във всеки опит

\*\*Сравнение на основата на концентрация 330  $\mu\text{g/ml}$  IFN- $\beta$ . Сток концентрациите на ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$  (5.41  $\mu\text{g/ml}$ ) и ПЕГ[2 X 20 kDa]-IFN- $\beta$  (6.86  $\mu\text{g/ml}$ ) бяха определени чрез ААА.

Свързването на ПЕГ-IFN- $\beta$  с неговия рецептор върху клетките беше оценено в присъствието на фиксирани количества от <sup>125</sup>I-IFN- $\alpha$ 2a. <sup>125</sup>I-IFN- $\alpha$ 2a беше радиографски белязан, използвайки хлорамин Т метод. Свързаният <sup>125</sup>I с IFN- $\alpha$ 2a беше отстранен от свободния йод чрез елиране на реагентите през колона със Сефадек G25 и събиране на белтъка, съдържащ фракции (Фармация). <sup>125</sup>I-IFN- $\alpha$ 2a беше количествено определен чрез IFN- $\alpha$ 2a ELISA анализ (Биосорс, САЩ) и беше определена специфичната активност. Клетки Daudi, култивирани в експоненциална фаза бяха центрофугирани и 2 x 10<sup>6</sup> клетки бяха инкубирани с 0.5 nM <sup>125</sup>I-IFN- $\alpha$ 2a за 3 h на стайна температура в присъствието на различни концентрации от ПЕГ-IFN- $\beta$  или IFN- $\alpha$ 2a, разредени в буфер за анализ, който е RPMI 1640, съдържащ 2 % зародишен говежди серум и 0.1 % натриев азид. В края на инкубирането, клетките бяха центрофугирани през слой от фталатно масло и клетките свързани радиоактивно, отчетени с гама брояч. Нещо повече, свързването на

ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$  и ПЕГ[2 x 20 kDa]-IFN- $\beta$  към рецептора беше много подобно или близко на свързващата активност на IFN- $\beta$ , както е показано на фиг. 7.

В допълнение, относителната активност беше определена в Daudi клетки (човешка В клетъчна лимфома) чрез антипролифериращ анализ (таблица 3). Всички интерферони бяха доведени до 2 x концентрация от 200 ng/ml. Пробите бяха разредени трикратно по дължината на плаката с краен обем от 100  $\mu\text{l}$ , бяха добавени 1 x 10<sup>5</sup> клетки/гнездо (100  $\mu\text{l}$ ) във всяко гнездо и инкубирани за общо 72 h при 37°C в инкубатор, поддържащ влага и CO<sub>2</sub>. След 48-ия час, беше добавен белязан с тритий (<sup>3</sup>H) тимидин в концентрация 1 Ci/гнездо в 20  $\mu\text{l}$ . След края на 72-часовото култивиране, плаката беше сепарирана чрез Томтек сепаратор за плаки. Резултатите посочени в таблица 3 показват, че не беше наблюдавана детектуема загуба на активност на интерферон от ПЕГилирането. Всъщност, беше установено, че активността е по-висока от активността на сво-

бодния IFN- $\beta$ . Това може би се дължи на образуването на неактивни агрегати в свободния интерферон или в разлики в методите на количест-

вен анализ (аминокиселинен анализ за ПЕГ-IFN пробите и RP-HPLC за IFN- $\beta$ ).

Таблица 3. Daudi Анти - Пролифериращ Анализ

	IC <sub>50</sub> доза*	Пъти увеличение спрямо IFN
IFN- $\beta$ (Плака 1)	1153.1	-
ПЕГ[30 kDa]-IFN (71 А)	695.6	1.6 X
IFN- $\beta$ (Плака 2)	1005.8	-
ПЕГ[40 kDa]-IFN (71 Б)	629.4	1.7 X

\*pg/ml

Пример 4. Фармакокинетични изследвания в мишки

Интравенозно прилагане

Мишките бяха инжектирани със 100 ng от IFN- $\beta$ , ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$  и ПЕГ[2 x 20 kDa]-IFN- $\beta$  и след това през определени интервали бяха взети кръвни проби. Серумните концентрации на IFN- $\beta$  бяха определени чрез специфичен за IFN- $\beta$  ELISA анализ (Торей Индъстриз) и резултатите бяха показани на фиг. 8. Двадесет и осем женски мишки вид B6D2F1 (на възраст 6-8 седмици) (приблизително 20 g всяка) бяха разделени в четири групи както следва: Група 1 се състоеше от девет мишки инжектирани с 200  $\mu$ l еднократна болус доза от 500 ng/ml човешки IFN- $\beta$  (крайна доза от 100 ng/мишка); Група 2 (девет мишки) получиха 200 l еквивалентно количество по маса ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$ ; Група 3 получиха 200  $\mu$ l еквивалентно количество по маса ПЕГ[2 x 20 kDa]-IFN- $\beta$ ; и Група 4 е група от три неинжектирани мишки, използвана като негативна контрола. Бяха вземани кръвни проби (приблизително 200  $\mu$ l/проба) в девет определени времена чрез разрушаване на ретро-орбиталната вена плексус с капилярна тръбичка. Кръв-

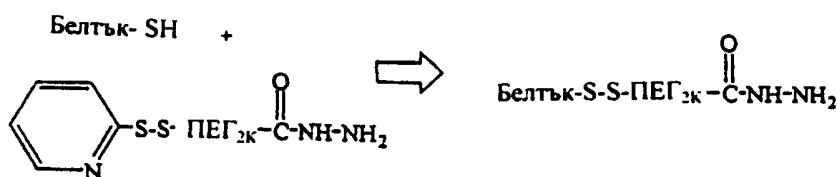
ните проби бяха оставени да се съсирят за около един час на стайна температура и микроцентрифугирани. Отделеният серум беше съхраняван при -70°C до тогава, докато бяха събрани всички проби. Серумите бяха анализирани за присъствие на биоактивен човешки IFN- $\beta$ , използвайки Торей анализа. Резултатите показаха, че зоната под кривата (AUC) е значително усилена в пробите ПЕГ-IFN сравнени със свободен IFN- $\beta$  и, ПЕГ-IFN пробите срещу свободен IFN- $\beta$  и, че ПЕГ[2 x 20 kDa]-IFN- $\beta$  е по-добър от ПЕГ[30 kDa]-IFN- $\beta$ .

Подкожно прилагане

Мишки бяха подкожно инжектирани с IFN- $\beta$  и ПЕГ-IFN (100 ng/мишка). Фигура 9 показва, че общата площ под кривата (AUC) е драматично увеличена за пробите ПЕГ-IFN, сравнени със свободен IFN- $\beta$ . Фармакокинетичните данни бяха в съответствие с ПЕГ-IFN проби, притежаващи по-дълго време на полуживот и увеличен AUC.

Пример 5. Прикрепване на ПЕГ остатък с ниска молекулна маса към полипептид.

Прикачване на  $\beta$ -интерферон към OPSS-ПЕГ<sub>2k</sub>-хидразид

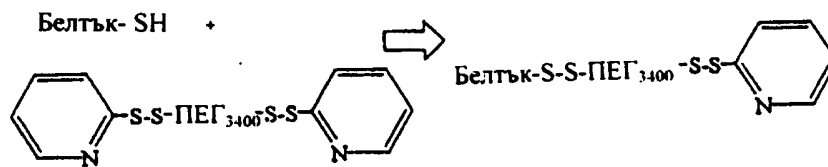


Беше осигурен рекомбинантен човешки  $\beta$ -интерферон в разтвор при концентрация 0.33 mg/ml в 50 mM натриево-ацетатен буфер, pH 3.8.

Приблизително 3.6 mg (40 mol излишък към mol белтък) от хетеробифункционален ПЕГ реагент, OPSS-ПЕГ<sub>2k</sub>-хидразид в 2 ml дейонизирана вода беше добавен към 3 ml от IFN- $\beta$  с концентрация 0.33 mg/ml (0.99 mg) и двете съединения бяха оставени да реагират в полипропиленова фиолка за 1 h при температура 45°C. След това, реакционната смес беше анализирана с капилярна електрофореза за определяне степента на модификация. Типичните добиви вари-

раха от 90-97 %, което зависеше от чистотата на IFN- $\beta$  и ПЕГ реактива. След това разтворът беше нанесен на колона за гел проникваща хроматография (Супердекс 75, Фармация) и елуиран с буфер 5 mM натриев фосфат, 150 mM NaCl, pH 7.0. Пиковите бяха събрани и анализирани с SDS-ПААГЕ. Фракциите на моноПЕГилиран  $\beta$ -интерферон бяха обединени и използвани в следващия етап на модифициране с ПЕГ с висока молекулна маса.

Прикачване на  $\beta$ -интерферон към (OPSS)<sub>2</sub>-ПЕГ<sub>3400</sub>

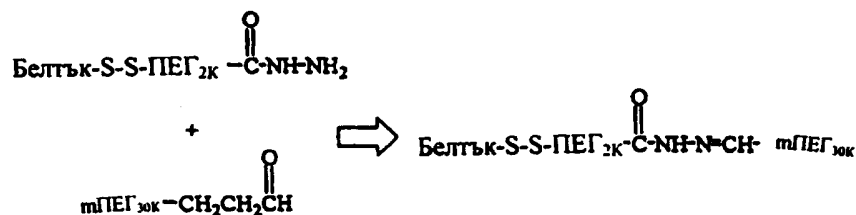


Беше осигурен рекомбинантен човешки  $\beta$ -интерферон в разтвор, при концентрация 0.33 mg/ml в 50 mM натриево-ацетатен буфер, pH 3.8. Приблизително 6.1 mg (40 mol излишък към mol белтък) от хомобифункционален ПЕГ реагент, (OPSS)<sub>2</sub>-ПЕГ<sub>3400</sub> в 2 ml дейонизирана вода беше добавен към 3 ml от IFN- $\beta$  с концентрация 0.33 mg/ml (0.99 mg) и двете съединения бяха оставени да реагират в полипропиленова фиолка за 2 h при температура 50°C. Реакцията беше проследена с нередуцираща SDS-ПААГЕ, и крайната реакционната смес беше анализирана с капилярна електрофореза за определяне степента на модификация. Типичните модификации за тази ре-

акция с  $\beta$ -интерферон бяха > 95. След това разтворът беше нанесен на колона за гел проникваща хроматография (Супердекс 75, Фармация) и елуиран с буфер 5 mM натриев фосфат, 150 mM NaCl, pH 7.0. Пиковите бяха събрани и анализирани с SDS-ПААГЕ за съдържанието им. Фракциите на моноПЕГилиран  $\beta$ -интерферон бяха обединени.

Пример 6. Прикрепване на втори ПЕГ остатък към пегилиран полипептид с ниска молекулна маса

Модифициране на IFN-S-S-ПЕГ<sub>2k</sub>-хидразид с mПЕГ<sub>30k</sub>-алдеhid (АЛД)



Към обединените фракции на IFN-S-S-ПЕГ<sub>2k</sub>-хидразид от пример 5, беше добавен mПЕГ<sub>30k</sub>-АЛД в 20 mol излишък към белтъка. Реакцията беше проведена на стайна температура (25°C) за 4 h и беше нанесена проба на колона за гел проникваща хроматография (Супероза 6, Фармация) за определяне добива на модификацията. Добивът на модифициране на тази ре-

акция беше обикновено повече от 80 %, в зависимост от чистотата на ПЕГ реагента и условията на реакцията.

Сега, след като напълно описахме настоящото изобретение, всеки с познания в съществуващото ниво на техниката, ще оцени, че същото може да бъде проведено с широк диапазон от еквивалентни параметри, концентрации, и усло-

вия, без да се отдалечава от обхвата на изобретението и без необосновано експериментирание.

Докато това изобретение беше описано по отношение на негови специфични методи, може да се разбере, че са възможни следващи модификации. С тази заявка се възнамерява да се покрият всякакви вариации, употреби или адаптирания на изобретението, следвайки най-общо принципите на изобретението и включвайки такива отклонения от настоящото описание, ако те идват от известната или потребителска практика в съществуващото ниво на техниката, към което се отнася изобретението и може да бъде приложено към важни характеристики посочени тук по-горе, поставени както следва в обхвата на приложените патентни претенции.

Всичките литературни източници, цитирани тук, включително публикации в списания или резюмета, публикувани или непубликувани патентни заявки на САЩ или чуждестранни патентни заявки, издадени патенти на САЩ или чуждестранни патенти или всички други литературни източници, са напълно инкорпорирани тук като цитати, включително всички данни, таблици, фигури и текст, представени в цитираните източници. Допълнително, пълното съдържание на цитираните библиографски източници, в цитираната тук литература, са също така включени чрез цитат.

Цитати на известни етапи от методи, традиционни етапи на методи, известни методи или традиционни методи не са по никакъв начин приемане, че всеки аспект, описание или метод от настоящото изобретение са описани, преподавани или предполагагани в съответното съществуващо ниво на техниката.

Горепосоченото описание на специфични методи ще разкрие напълно генералната природа на изобретението, което други могат чрез прилагане на познания в рамките на умения в съществуващото ниво на техниката (включително и съдържанието на цитираната тук литература) лесно да модифицират и/или адаптират за различни приложения като специфични методи, без безсмислено експериментирание, без да се отдалечат от генералната концепция на настоящото изобретение. Следователно такива адаптирания и модификации се възнамерява да се считат в обхвата на еквиваленти на описаните методи, основавайки се на материалът представен тук.

Трябва да се разбере, че фразеологията и терминологията тук е за целите на описанието, а не за ограничаване, по такъв начин, че терминологията или фразеологията от настоящата спецификация да се интерпретира от всеки с познания в съществуващото ниво на техниката в светлината на преподаване и практически ръководства, представени тук в комбинация с познания за всеки с обикновени познания в съществуващото ниво на техниката.

### Патентни претенции

1. Полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, притежаващ полиолен остатък, ковалентно свързан с Cys<sup>17</sup> от човешки  $\beta$ -интерферон.

2. Полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, съгласно патентна претенция 1, характеризиращ се с това, че полиолният остатък е полиалкиленов гликолов остатък.

3. Полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, съгласно патентна претенция 2, характеризиращ се с това, че полиалкиленовият гликолов остатък е полиетиленгликолов (ПЕГ) остатък.

4. Полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, съгласно която и да е от патентните претенции от 1 до 3, характеризиращ се с това, че полиол- $\beta$ -интерферон конюгата притежава същата или по-висока  $\beta$ -интерферон активност както и нативният човешки  $\beta$ -интерферон.

5. Метод за получаване на полиол- $\beta$ -интерферон конюгат съгласно патентна претенция 1, характеризиращ се с етапи на:

реагиране на  $\beta$ -интерферон с тиол-реактивоспособен полиолен агент на специфичен сайт и ковалентно прикрепване на полиолния остатък към Cys<sup>17</sup> от човешки  $\beta$ -интерферон за получаване на полиол- $\beta$ -интерферон конюгат; и  
изолиране на получения полиол- $\beta$ -интерферон конюгат.

6. Метод съгласно патентна претенция 5, характеризиращ се с това, че тиол-реактивоспособният полиолен агент е тиол-реактивоспособен полиетиленгликолиращ агент.

7. Метод съгласно патентните претенции 5 или 6, характеризиращ се с това, че тиол-реактивоспособният полиолен агент е моно-метоксилиран.

8. Метод съгласно патентните претенции 5 или 6, характеризиращ се с това, че тиол-реак-

тивоспособния полиолен агент е бифункционален.

9. Метод съгласно патентните претенции 5 или 6, характеризиращ се с това, че тиол-реактивоспособният полиолен агент е полиолно производно, притежаващо функционална група, избрана от групата, състояща се от ортопиридил дисулфид, винил сулфон, малеимид и йодоацетимид.

10. Метод съгласно патентните претенции 5 или 6, характеризиращ се с това, че тиол-реактивоспособният полиолен агент е ортопиридил дисулфидно производно на моно-метоксилиран полиол.

11. Метод съгласно патентна претенция 5, характеризиращ се с това, че реакционните етапи се провеждат при кисело рН, където  $\beta$ -интерферонът е стабилен.

12. Фармацевтичен препарат, съдържащ като активна съставка полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, съгласно която и да е от патентните претенции от 1 до 3, и фармацевтично приемлив носител, ексципиент или допълнителен агент.

13. Използване на полиол- $\beta$ -интерферон конюгат съгласно претенциите от 1 до 4 за получаване на фармацевтичен състав за лечение на инфекции, тумори и автоимунни и възпалителни заболявания.

14. Използване съгласно претенция 13, където заболяването е избрано от септичен шок, СПИН, ревматоиден артрит, лупус еритроматоза и множествена склероза.

15. Полиол- $\beta$ -интерферон конюгат, съгласно която и да е от патентните претенции от 1 до 4 за използване като лекарство.

**Приложение: 9 фигури**

---

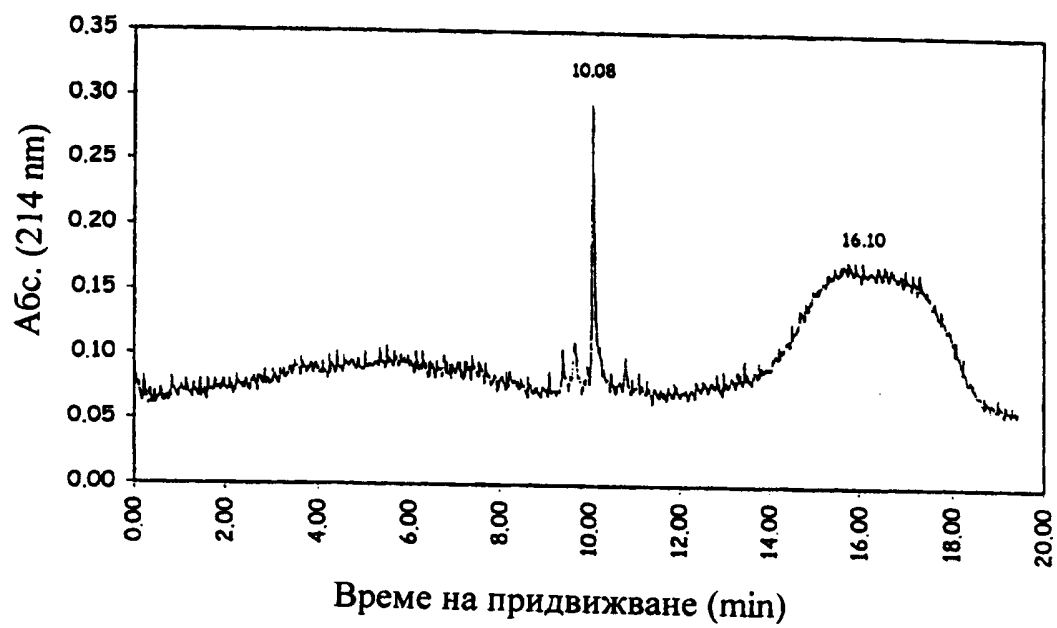
**Издание на Патентното ведомство на Република България  
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б**

Експерт: Б. Шикаланова

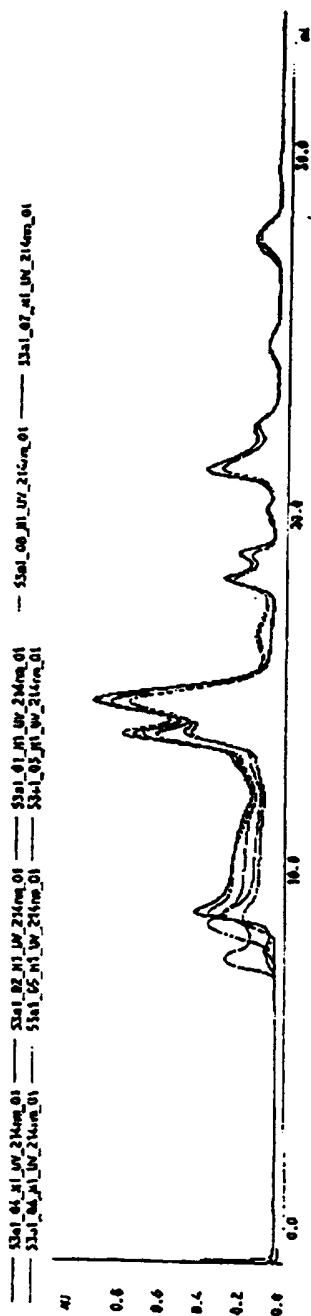
Редактор: В. Алтаванова

Пор. № 43024

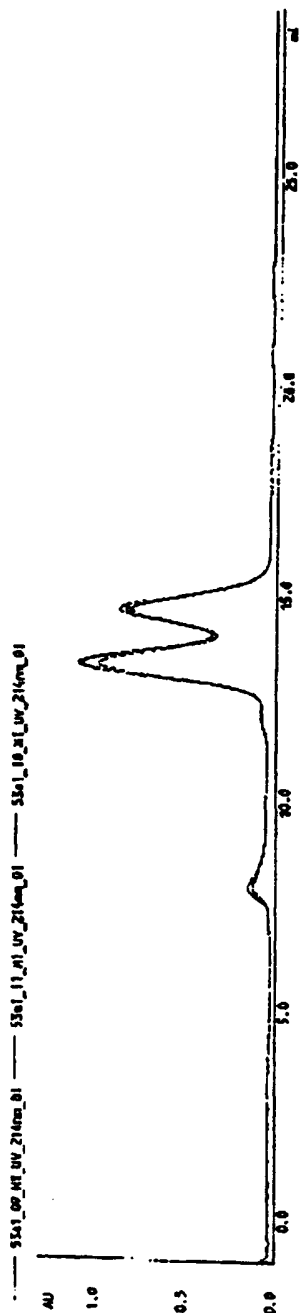
Тираж: 40 ЗС



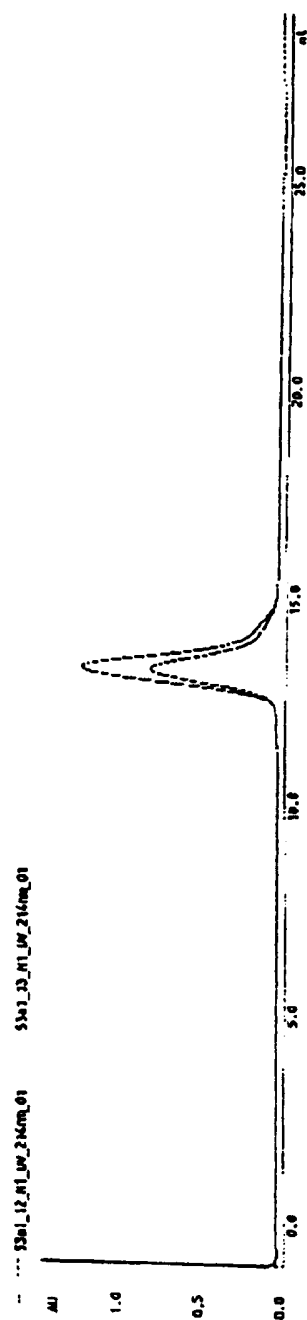
ФИГ. 1



ФИГ. 2А

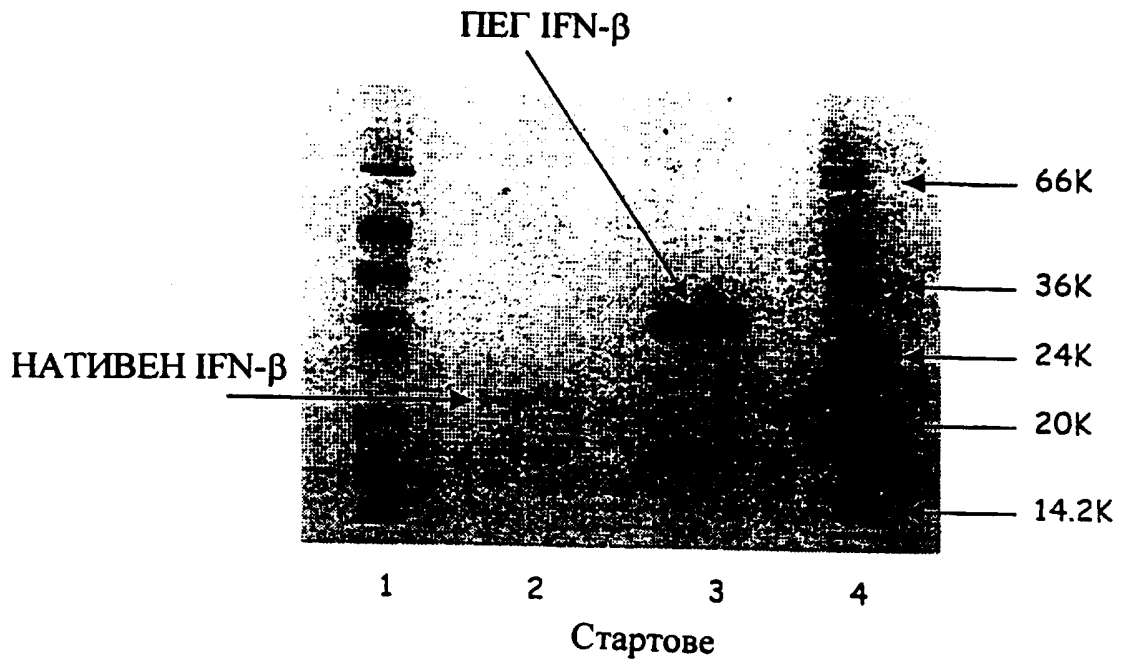


ФИГ. 2Б

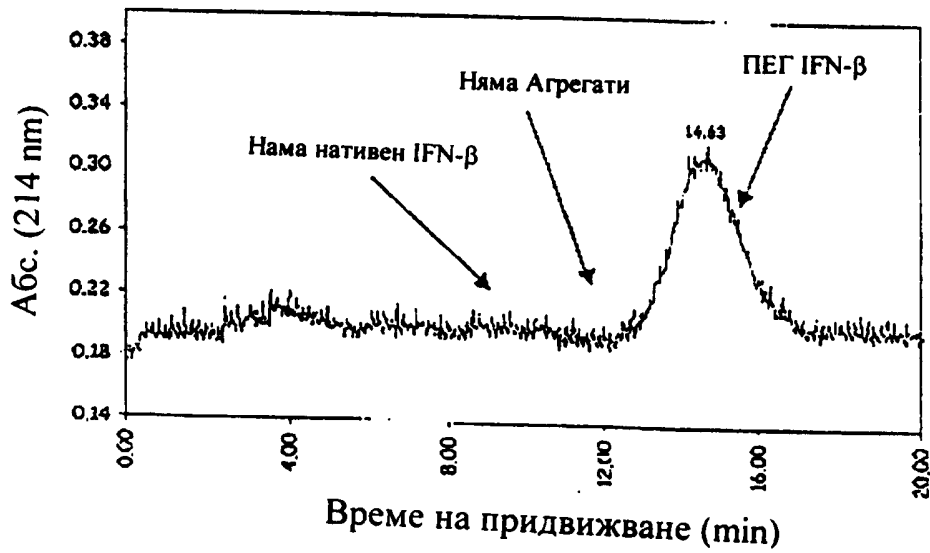


ФИГ. 2В



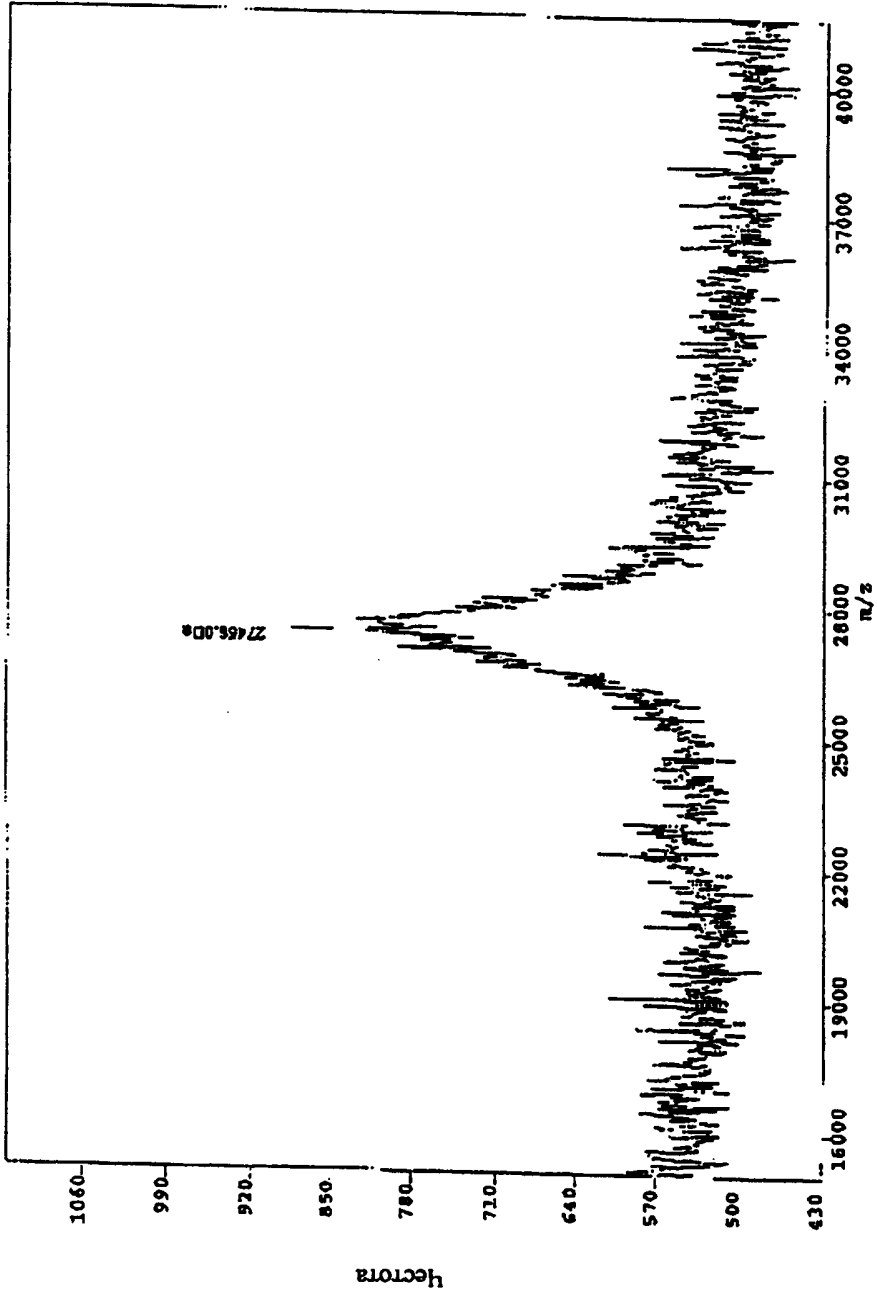


ФИГ. 3



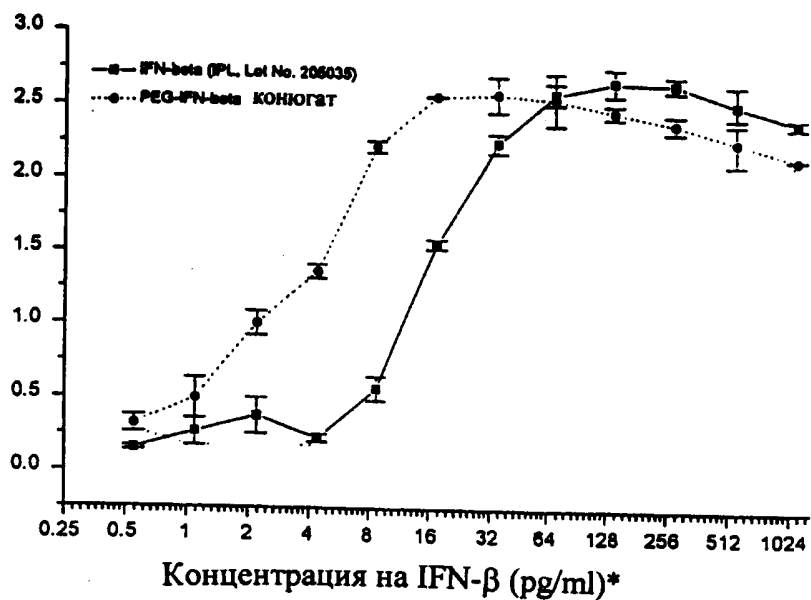
ФИГ. 4

Лазерна енергия 5.95 (0.06) кJ    Вакуум 1.06e-006тorr    Поляритет Положителен    Носител Синапинова Киселина



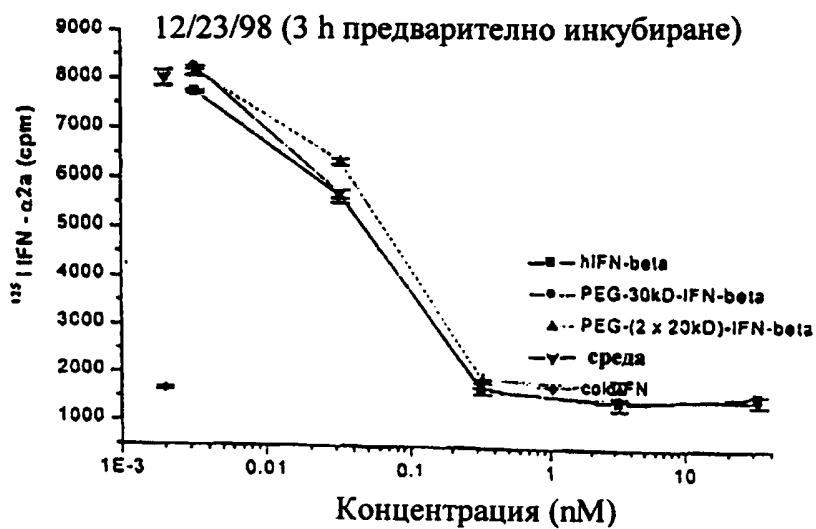
ФИГ. 5

O.D. при 595 nm

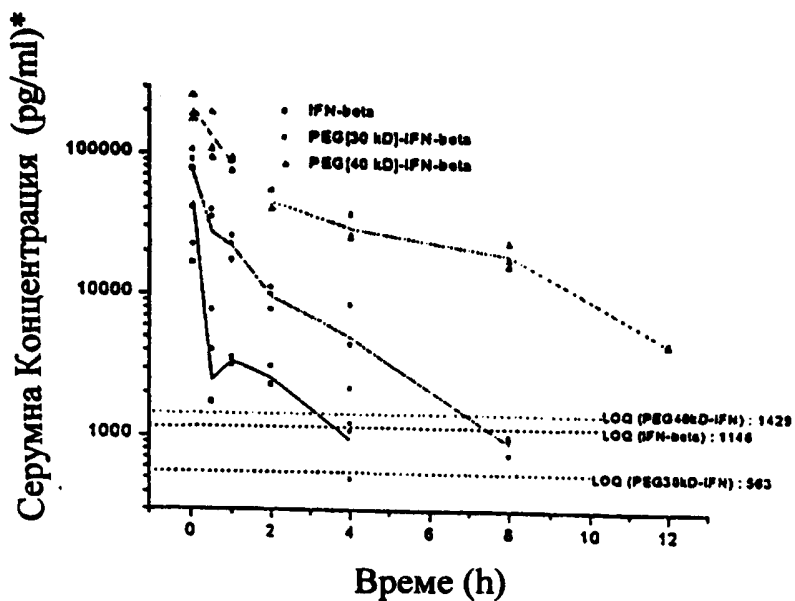


\*Концентрацията е определена чрез аминокиселинен анализ

ФИГ. 6

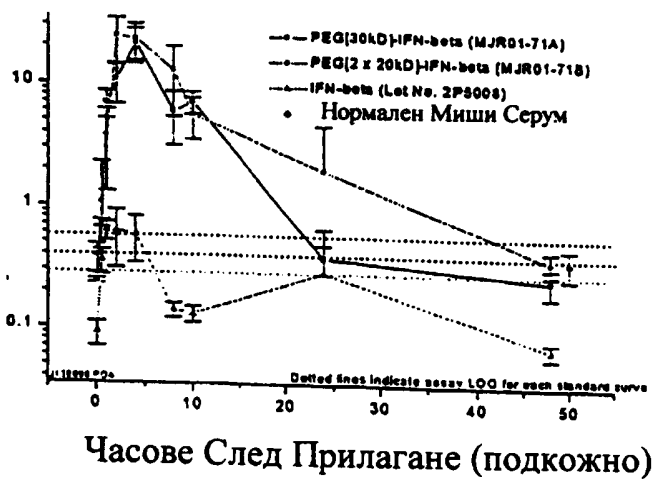


ФИГ. 7



ФИГ. 8

Серумна Концентрация на IFN-β  
(или ПЕГ - IFN-β) в ng/ml,  
определена чрез ELISA (Toya)



ФИГ. 9