

2366/93

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

NFOJ

30 137 / 93

"A"

COFK 14/555

AGIK 37/66

165/1065

67013

INTERFERON KONJUGÁTUMOK ÉS ELJÁRÁS EZEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bâle, Svájc

A bejelentés napja: 1993. 08. 18.

Elsőbbsége: 1992. 08. 26. /935.770/  
Amerikai Egyesült Államok

KIVONAT

A találmány gyógyászatilag aktív új vízoldható interferon/polietilén-glikol konjugátumokra, e konjugátumok előállításánál felhasználható új polietilén-glikol-vegyületekre valamint a fenti új vegyületek előállítására vonatkozik.

A találmányunk szerinti új interferon/polietilén-glikol konjugátumok az (I) általános képletnek felelnek meg

(mely képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;

m értéke  $\geq 1$ -től az interferonban levő hozzáférhető aminocsoportok számáig terjedő egész szám;

W jelentése -O- vagy -NH- ;

x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és

y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám és

x, y és z összege 3-1000;

azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel).

A táblázatban  
jelölés: (I) helyett  
Ind

A bejelentő helyett a  
meghatalmazott:

2366/93

KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

"A"

67013

2017/93

Képviselő: Dr.TÓTH-URBÁN László ügyvéd

Társképviselő: Dr.JALSOVSZKY Györgyné ügyvéd

NK05 207K 14/555  
~~207K 15/26~~  
A 61K 37/06  
38/21

165/1065

INTERFERON KONJUGÁTUMOK ÉS ELJÁRÁS EZEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, Bazel, Svájc

Feltalálók:

KARASIEWICZ Robert

Parsippany, N.J.,

NALIN Carlo

Franklin Lakes, N.J.,

ROSEN Perry

North Caldwell, N.J.,

Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1993. 08. 18.

Elsőbbsége: 1992. 03. 26. /935.770/

Amerikai Egyesült Államok

Többfajta természetes és rekombináns fehérje orvosi és gyógyászati hatással rendelkezik. Ezek a fehérjék tisztítás és gyógyászati kikészítés után parenterálisan különböző gyógyászati indikációkban alkalmazhatók. A parenterálisan beadott fehérjék azonban immunogének és viszonylag vízdoldhatatlanok lehetnek és rövid gyógyászati felezési idővel rendelkezhetnek. Ennek következtében e fehérjékkel gyógyászatiilag hatékony vérszint nehezen biztosítható.

A fenti problémák kiküszöbölése céljából fehérjéket polimerekhez (pl. polietilén-glikol) konjugálnak. Davis és tsai szerint (4 179 337 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) fehérjékhez (pl. enzimek és inzulin) polietilén-glikol (PEG) konjugálható és az ily módon kapott konjugátumban a fehérje kevésbé immunogén, ugyanakkor azonban fiziológiai aktivitásának jelentős részét megtartja. Nakagawa és tsai PEG-et islet-aktiváló fehérjéhez konjugáltak, a fehérje mellékhatásainak és immunogenitásának csökkentése céljából. Veronese és tsai [Biotech. 11, 141-152 /1985/] egy ribonukleáz és szuperoxid-dismutáz<sup>z/</sup> módosítása céljából polietilén-glikolokat klór-hangyasav-fenil-észterrel aktiváltak. Katre és tsai szerint (4 766 106 és 4 917 888 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) fehérjék polimer konjugációval szolubilizálhatók. PEG és más polimerek rekombináns fehérjékkel kombinálva az immunogenitást csökkentik és a felezési időt meghosszabbítják [lásd Nitecki és tsai: 4 902 502 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás; Enzon és tsai: PCT/US90/03133 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés; Nishimura és tsai: 154 316 sz. európai közre-bocsájtási irat; és Tomasi: PCT/US85/02572 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentés].

WO 85/03133  
 WO 85/03133  
 WO 85/03133

A PEG/fehérje konjugátumokra és előállításukra leírt ismert módszerek azonban számos problémát vetnek fel. Így a fehérje-PEG konjugátumok előállítására irányuló egyes eljárások során a fehérje inaktiválódhat és a kapott konjugátum gyenge biológiai aktivitást mutat. Ezenkívül az ilyen PEG-fehérje konjugátumok képzésénél felhasznált bizonyos kapcsolóanyagok (linkerek) in vivo hidrolitikus hasítást szenvedhetnek. A konjugátum beadása után lejátszódó hasítás eredményeként a konjugátum a PEG által biztosított kedvező tulajdonságait elveszíti.

Találmányunk tárgya egyrészt új interferon-PEG konjugátumok, amelyek az interferon /IFN/ aminocsoportjának a PEG-hez történő kapcsolására újszerű linkereket tartalmaznak. Találmányunk tárgya közelebbről (I) általános képletű fiziológiailag aktív interferon konjugátumok

amely képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;

m értéke  $\geq 1$  és az interferonban levő hozzáférhető aminocsoportok száma közötti egész szám;

W jelentése -O- vagy -NH- ;

x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és

y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám

és x, y és z értékének összege 3 és 1000 közötti szám;

azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel.

Nyilvánvaló, hogy az (I) általános képletű vegyületekben levő -NH- csoport

az interferonban jelenlevő egyik hozzáférhető aminocsoportból származtat-  
ható le.

A találmányunk szerinti interferon konjugátumok két típusba tartoznak és  
ezek az (IA) és (IB) általános képletnek felelnek meg (mely képletekben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú  
alkilcsoport;

m értéke az interferonban levő hozzáférhető aminocsoportok számáig  
terjedő szám;

x, y és z értéke bármely olyan szám-kombináció, amelynek az esetében a  
konjugátum a bennelevő fehérje biológiai aktivitásának legalább egy  
részét megtartja;

akkal, a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis  
szénatomszámú alkilcsoportot képvisel.

Az ábrák rövid ismertetése

1. ábra: A 7. példa szerinti vegyülettel elvégzett PEG módosítás időbeli  
lefolyása. Interferont (5 mg/ml) a reagens 10- 20- vagy 40-szerese fölös-  
legével, a feltüntetett ideig, 25 mM tricinben (pH 10), 0,5 M KSCN és 100 mM  
NaCl jelenlétében inkubálunk. Különböző időpontokban aliquot részeket  
távolítunk el, a reakciót glicinnel beállítjuk és a mintákat 15 % SDS-PAGE  
gélben megvizsgáljuk. Az ábrán "I" jelentése interferon.

2. ábra: Az 5. példa szerinti vegyülettel végzett PEG módosítás időbeli  
lefolyása. Interferont a reagens 2-szeres vagy 10-szeres fölöslegével az

1. ábránál megadott ideig inkubálunk. Az aliquot részeket a megadott időpontokban eltávolítjuk, a reakciót glicinnel leállítjuk és a mintákat 15 %-os SDS-PAGE gélen elemezzük. Az ábrán "S" jelentése fehérje molekulatömeg standard és "I" jelentése interferon.

3. ábra: Az 1. példa (bal oldalon) és 3. példa (jobb oldalon) szerinti vegyülettel végzett PEG módosítás összehasonlítása. Interferont a reagensek 3-szoros fölöslegével 0,25, 1,5 vagy 24 órán át inkubálunk. Az aliquot részeket eltávolítjuk, a reakciót glicinnel beállítjuk és a mintákat 15-os SDS-PAGE gélen megelemezzük. Az ábrán "S" jelentése fehérje molekulatömeg standard és "I" jelentése interferon.

Találmányunk szerint az (IA) és (IB) általános képletű fehérje konjugátumokat, IFN konjugátumokat oly módon állítjuk elő, hogy olyan aktivált PEG-et kondenzálunk, amelyben a végállású hidroxil- vagy aminocsoport helyén valamely aktivált linker van jelen. Ezek a reagensek az IFN-ben levő egy vagy több aminocsoporttal reagálhatnak. Találmányunk előnyös kiviteli alakja szerint csak egy aminocsoporttal történő reakcióval monoPEG-ilezett konjugátumokat állítunk elő.

Ennek megfelelően találmányunk tárgya továbbá a (II) és (III) általános képletnek megfelelő új aktivált vegyületek (reagensek), amelyek a találmányunk szerinti új interferon konjugátumok előállítására alkalmazhatók. A (II) általános képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;  
R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;  
W jelentése -NH- vagy -O- ;  
x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és  
y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám;  
és x, y és z összege 3-1000;  
azzal a feltétellel, hogy amennyiben W jelentése -NH- vagy ha W jelentése -O- és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom, úgy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel.

A (III) általános képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;  
R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;  
x értéke 1 és 1000 közötti egész szám; és  
y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám és  
x, y és z összege 3-1000.

A (II) általános képletű vegyületek két csoportba sorolhatók és ezek a (IIA) és (IIB) általános képletnek felelnek meg

(mely képletben

R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> és R<sup>5</sup> jelentése a fent megadott;  
x, y és z értéke olyan szám-kombináció, hogy a fehérjével képezett polimer-konjugátum a konjugálatlan fehérje biológiai aktivitásának legalább egy részét megtartja;  
és a (II) általános képletnél megadott feltétel a (IIA) és (IIB) általános képletű vegyületeknél is érvényes).

Találmányunk értelmében a (IIA), (IIB) vagy (III) általános képletű aktivált PEG reagensek felhasználásával előállított konjugátumok esetében a fehérje (azaz interferon, IFN) szabad aminocsoportja és a PEG között kötés létesül és a képződő konjugátum a fehérje biológiai aktivitásának legalább egy részét megtartja, ugyanakkor azonban immunogenitása kisebb. Ezenkívül, a (IIA), (IIB) vagy (III) általános képletű aktivált polietilén-glikolok alkalmazásával előállított fehérje konjugátumok in vivo hidrolitikus hasításra nem hajlamosak és ezért az irodalomból ismert PEG-fehérje konjugátumok hátrányaitól mentesek.

A találmányunk szerinti új vegyületekben R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> és R<sup>5</sup> bármely kis szénatomszámú alkilcsoportot képviselhet és jelentése előnyösen metilcsoport. A "kis szénatomszámú alkilcsoport" kifejezésen 1-6 szénatomos alkilcsoportok értendők (pl. metil-, etil-, n-propil-, izopropil-csoport stb.). A kis szénatomszámú alkilcsoportok előnyösen 1-4 szénatomot tartalmaznak és különösen előnyös a metilcsoport. R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> és R<sup>5</sup> hidrogénatomot is jelenthet, azonban R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik hidrogénatomtól eltérő jelentésű.

A találmányunk szerinti új vegyületekben x, y és z értéke bármely olyan szám kombináció lehet, hogy a konjugátum a benne levő IFN biológiai aktivitásának legalább egy részét megtartja. Nyilvánvaló, hogy x, y és z értéke a konjugátumban levő IFN biológiai aktivitásával nagyságával fordítva arányos. A képletekben levő x, y és z szimbólum a konjugátum képzésében résztvevő poliglikolban levő glikol-egységek számát jelenti. Az "m" szimbólum az IFN-ben levő és az aktivált PEG-keverékkel reagálni képes szabad vagy hozzáférhető aminocsoportok számát jelenti. Minél nagyobb m és x, y

lehetővé teszi  
a konjugátum  
képzését



és  $z$  értéke, annál nagyobb a konjugátum molekulatömege. A találmányunk szerinti vegyületekben  $x$ ,  $y$  és  $z$  értéke bármely olyan szám lehet, hogy a konjugátum molekulatömege - a fehérje tömege nélkül - kb. 300 és kb. 30,000 dalton közötti érték. Az IFN szempontjából előnyös ha  $m$  értéke 1-3. Találmányunk különösen előnyös kiviteli alakját képezik azok a monoPEGilezett konjugátumok, amelyekben  $m$  értéke 1; ezeket a konjugátumokat olyan körülmények között állítjuk elő, hogy az IFN-nek csak egy szabad aminocsoportja és a (IIA), (IIB) vagy (III) általános képletű PEG reagens reakciójakor a fenti IFN konjugátumok magas kitermeléssel képződnek. A találmányunk szerinti vegyületek előnyös kiviteli alakja esetében  $m$  értéke 1 és  $x$ ,  $y$  és  $z$  értéke bármely olyan szám, hogy a konjugátum képzésében részvevő glikol átlagos molekulatömege kb. 300 és kb. 30,000 dalton közötti érték, előnyösen kb. 1000 és kb. 10,000 dalton közötti érték, különösen előnyösen kb. 1000 és kb. 5000 dalton közötti érték. A glikol átlagos molekulatömege különösen előnyösen kb. 2000 dalton.

Az  $x$ ,  $y$  és  $z$  szimbólumok közül  $x$  értéke 1 és 1000 közötti egész szám, és  $y$  és  $z$  értéke 0 és 1000 közötti egész szám és  $x$ ,  $y$  és  $z$  összege 3-1000.

Az (IA) és (IB) általános képletű konjugátumok egyik előnyös kiviteli alakja szerint  $x$  és  $y$  értéke 500 és  $z$  értéke 0-4. Különösen előnyösen alkalmazhatunk olyan glikol-keverékeket, amelyekben  $x$  értéke 10-100,  $y$  értéke 1-10 és  $z$  értéke 0. Legelőnyösebbek azok az (Ia) általános képletű interferon-konjugátumok, amelyekben  $m$  értéke 1;  $R$ ,  $R^2$  és  $R^4$  jelentése metilcsoport;  $R^1$  jelentése hidrogénatom;  $x$  értéke kb. 19;  $y$  értéke kb. 2 és  $z$  értéke 0. Ezekben a konjugátumokban a PEG átlagos molekulatömege kb. 1000 dalton.

A PEG molekulában levő egységek számával kapcsolatos esetleges félreértések és kétségek elkerülése céljából a polietilén-glikol polimereket előnyösen a molekulatömeggel jellemzik, a PEG polimerben levő önismétlődő egységeket /SRU/ száma (x, y és z) helyett. Ezek az értékek a kiindulási anyagként felhasznált PEG vegyületek potenciális inhomogenitása miatt nehezen határozhatók meg; a kiindulási PEG vegyületeket ugyanis általában nem a jelenlevő önismétlődő egységek számával, hanem az átlagos molekulatömeggel jellemzik. A különböző molekulatömegű PEG-vegyületek az irodalomból ismert eljárásokkal állíthatók elő vagy kereskedelmi forgalomban szerezhetők be.

Amennyiben a molekulatömegeből meghatározott vagy a forgalmazó cég által megadott x, y és z értékek nem egész számok (általában ez a helyzet), ezeket az értékeket a szokásos módon fel- vagy lekerekítjük úgy, hogy a polimer keverék főkomponensét képező polimer molekulának megfelelő egész szám értékeket kapjunk.

Valamely (IIA), (IIB) vagy (III) általános képletű reagens és egynél több szabad aminocsoportot tartalmazó IFN reakciója során a konjugátum az IFN és PEG reagens keverékek különböző reakciótermékeinek keverékéből áll. Ezek a reakciótermékek oly módon képződnek, hogy a PEG-reagens egy vagy több szabad aminocsoporttal reagál. Ezt az (IA) és (IB) általános képletben levő m szimbólum jelzi. Így pl. három szabad aminocsoportot tartalmazó IFN esetében az aktivált PEG reagens egy, két vagy mindhárom szabad aminocsoporttal reakcióba léphet. Ez esetben a keverék a fenti három reakcióterméket tartalmazza. Minthogy a keverékben levő konjugált reakciótermékek molekulatömege m értékétől függően - m értéke 1, 2 vagy 3 -

nagy mértékben különbözik, ezek a reakciótermékek hagyományos módszerekkel (pl. kromatografálás) szétválaszthatók. Annak a meghatározása céljából, hogy az  $m$  és  $x$ ,  $y$  és  $z$  értéket helyesen választottuk-e meg, a szétválasztott konjugált reakciótermékek biológiai aktivitását a konjugálatlan IFN vizsgálatánál alkalmazott módszerekkel screeneljük és megvizsgáljuk, hogy a konjugált reakciótermék az előállításánál felhasznált IFN biológiai aktivitásának legalább egy részét megtartotta-e. A fenti módszerrel  $m$  és  $x$ ,  $y$  és  $z$  értékét a kívánt aktivitás eléréséhez szükséges értékre állíthatjuk be.

Találmányunk előnyös kiviteli alakja esetében  $m$  értéke 1. Az  $m = 1$  értéknek megfelelő konjugátumokat két vagy több szabad aminocsoportot tartalmazó IFN alkalmazása esetében is előállíthatjuk. Az aktivált PEG-reagens először az IFN-ben levő egyik szabad aminocsoporttal lép reakcióba. A reagens (pl. az IFN) koncentrációja és a reakciókörülmények szabályozásával, az amin-kondenzációs reakciók standard módszerei szerint, a fehérjében levő szabad aminocsoportok PEGilezésének mértékét szabályozhatjuk. Ha az egynél több szabad aminocsoportot tartalmazó fehérjékben az egyik szabad aminocsoport a többinél reakcióképesebb, a reakciókörülmények oly módon választhatók meg, hogy a fehérje és az aktivált PEG-vegyület reakciója során  $m = 1$  értéknek megfelelő (IA) vagy (IB) általános képletű vegyület keletkezzék.

A fehérjét alkotó aminosavakban levő más szabad aminocsoportok a PEG-el utólagosan reagáltathatók oly módon, hogy a kondenzációs reakciót hosszabb időn át végezzük vagy erélyesebb reakciókörülményeket alkalmazunk.

A jelen szabadalmi leírásban és az igénypontokban szereplő "interferon" és "IFN" kifejezések valamennyi interferon típust (azaz az összes interferon-aktivitással rendelkező vegyületet) felölelik. Így pl.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - és  $\omega$ -interferon, ezek összes altipusa - pl.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  vagy  $\alpha 2C$  - és a különböző interferon típusok és/vagy altípusok hibridjei és kimerjei lehetnek. Az interferon bármely eredetű lehet, így természetes forrásokból vagy sejtenyészetekből nyerhető vagy rekombináns DNS módszerekkel állítható elő. A természetes vagy rekombináns interferonok előállítására és izolálására szolgáló módszerek az irodalomból jólismertek (lásd pl. 43 980, 211 148 és 140 127 sz. európai közrebecsítési irat; 3 028 919 sz. német közrebecsítési irat és 4 503 035 és 4 414 150 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás).

Az  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  és  $R^4$  helyén legalább egy kis szénatomszámú alkilcsoportot - különösen metilcsoportot - tartalmazó alkil-helyettesített (IIA), (IIB) és (III) általános képletű reagensek előnye a megfelelő helyettesítetlen reagensekkel szemben, hogy a konjugátumok - azaz PEGilezett fehérjék - meglepően magas kitermeléssel állíthatók elő. Alkil-helyettesített reagensek felhasználása esetén azonos reakcióidő mellett legalább kétszer annyi konjugátum képződik, mint a megfelelő helyettesítetlen reagensek felhasználásakor.

A fent ismertetett helyettesített reagensek felhasználásával képezett (IA) és (IB) általános képletű konjugátumokat betegeknek gyógyászati célból beadva a véráramban mért in vivo felezési idő meglepően hosszabb, mint a megfelelő helyettesítetlen reagensekből készített konjugátumok beadagolásakor. Bár az in vivo felezési idő a konjugátum molekulatömegével egyenesen arányos, a találmányunk szerinti helyettesített reagensekből

előállított konjugátum felezési ideje meglepő módon megegyezik egy helyettesítetlen reagensből készített nagyobb molekulatömegű konjugátum felezési idejével. A betegek véráramában mért hosszabb felezési idő nagyobb gyógyászati hatékonyságot eredményez. Ennek megfelelően az alkilhelyettesített reagensekből képezett konjugátumok pl. kisebb gyakorisággal és/vagy kisebb mennyiségben adagolhatók mint a megfelelő helyettesítetlen reagensekből előállított konjugátumok. A polietilénlikollal képezett biológiailag aktív fehérje konjugátumok hatékonyságának fokozása céljából a fehérjekonjugátumok előállításához nagyobb molekulatömegű polietilénlikolokat alkalmaztak. Az aktivált konjugált IFN-ek biológiai aktivitása azonban a molekulatömeg növekedésével csökken. Ezzel szemben a találmányunk szerinti, helyettesített reagensek felhasználásával előállított konjugátumok hatékonysága a megfelelő helyettesítetlen konjugátumokkal összehasonlítva nagyobb, ugyanakkor a molekulatömeget kisebb mértékben kell fokozni.

Találmányunk tárgya továbbá eljárás az új konjugátumok előállítására.

Az (IA) általános képletű konjugátumok előállítását az A-reakciósémán mutatjuk be. A képletekben  $R$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $m$ ,  $x$ ,  $y$  és  $z$  jelentése a korábbiakban megadott azzal a feltétellel, hogy  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  és  $R^4$  közül egy vagy több kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel.

A reakció során egy PEG-amint szénhidrogén vagy klórozott szénhidrogén oldószerben valamely (IV) általános képletű vegyülettel reagáltatunk. A kapott (IIA) általános képletű vegyületet vizes közegben a fehérje egy vagy több szabad aminocsoportjával kondenzáljuk és ily módon az (IA) általános

képletű konjugátumot nyerjük. A reakciót aminok vizes közegben végzett kondenzációjánál szokásos körülmények között hajthatjuk végre. Az (IA) általános képletű konjugátum előállítását általában standard vizes puffer-oldatban (pH 7-10) végezzük el. A reakció során - a fehérjében levő szabad aminocsoportok számától és a reakcióidőtől függően - PEG-fehérje konjugátumok keveréke keletkezhet. A PEG-fehérje konjugátumok keverékét hagyományos módszerekkel (pl. nagy teljesítőképességű folyadék kromatográfia /HPLC/ vagy gélelektroforézis) választhatjuk szét az egyes komponensekre. E célra eltérő molekulatömegű vegyületek szétválasztásán alapuló bármely módszer (HPLC vagy gél elektroforézis) felhasználható. A keverékeknek a termékek eltérő molekulatömegén alapuló szétválasztását a leírás további részében ismertetjük.

Az (IB) általános képletű IFN-konjugátumok előállítását a B-reakciósémán tüntetjük fel. A képletekben R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, m, x, y és z és a feltételek jelentése a korábbiakban megadott.

A (IV) általános képletű vegyületeket oly módon állítjuk elő, hogy foszgent 2-hidroxi-piridinnel (vagy helyettesített hidroxipiridinnel, ha R<sup>5</sup> jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport) kondenzálunk. A reakciót savhalogenidek és alkoholok kondenzációjára ismert bármely szokásos módszerrel elvégezhetjük.

A PEG-alkoholt a (IV) általános képletű vegyülettel kondenzálva (IIB) általános képletű vegyületet kapunk. A reakciót alkoholok és karbonátok kondenzációjára ismert bármely hagyományos módszerrel elvégezhetjük. A kapott (IIB) általános képletű vegyületet a fehérje egy vagy több szabad

aminocsoportjával reagáltatva (IB) általános képletű vegyületet kapunk. A reakciót a (IIA) általános képletű vegyületeknek (IA) általános képletű vegyületekhez vezető kondenzációjával analóg módon hajthatjuk végre. A (IIB) általános képletű vegyülettel reakcióba lépő fehérjében levő szabad aminocsoportok számától függően az (IB) általános képletű konjugátum különböző molekulatömegű konjugátumok keveréke alakjában keletkezhet. A konjugátumok keverékét a korábbiakban leírt módon választhatjuk szét az egyes komponensekre.

Az (IB) általános képletű vegyületeket a C-reakciósémán feltüntetett eljárással is előállíthatjuk. A képletekben R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, m, x és y és z jelentése a korábbiakban megadott.

A reakció során a PEG-alkoholt valamely (IV) általános képletű vegyülettel kondenzáljuk és így módon egy (III) általános képletű vegyületet kapunk. A reakció során közbenső termékként egy (IIB) általános képletű vegyület keletkezik, amely egy második mól PEG-alkohollal reagálva a (III) általános képletű vegyületet képezi. A reakcióban 1 mól (IV) általános képletű vegyületre vonatkoztatva legalább 2 mól PEG-alkoholt alkalmazunk.

A reakciót az alkoholok és karbonátok kondenzációjára ismert bármely szokásos módszerrel elvégezhetjük. A (III) általános képletű vegyület és az interferon reakciója valamely (IB) általános képletű konjugátumot szolgáltat. A reakciót a (IIA) általános képletű vegyületeknek (IA) általános képletű vegyületekké történő átalakításával analóg módon hajthatjuk végre. A fehérjében levő szabad aminocsoportok számától függően a (III) általános

képletű vegyület és a fehérje kondenzációjakor konjugátumok keverékét kapjuk, amelyet az (IA) általános képletű konjugátumok szétválasztása kapcsán ismertetett módszerekkel választhatunk szét az egyes komponensekre.

Találmányunk értelmében azt találtuk, hogy a találmányunk szerinti interferon-konjugátumok ugyanolyan hatásokkal rendelkeznek mint a konjugátumot képező fehérjék. A találmányunk szerinti konjugátumok a gyógyászatban ugyanúgy alkalmazhatók mint a felépítésükben résztvevő fehérjék, ugyanakkor azonban a fehérjék önmagukban történő felhasználásakor fellépő nemkívánatos immunreakcióktól mentesek.

Találmányunk tárgya továbbá valamely (I) általános képletű interferon konjugátumot vagy sóját tartalmazó gyógyászati készítmények és eljárás ezek előállítására.

A találmányunk szerinti, betegségek kezelésére vagy megelőzésére felhasználható gyógyászati készítmények valamely (I) általános képletű interferon-konjugátumot és inert nem-toxikus gyógyászatilag alkalmas hordozóanyagot tartalmaznak. A gyógyászati készítményeket a GMP (good medical practice) előírásainak megfelelően állítjuk elő és a dozírozás a kezelendő rendellenesség, a beteg állapota, az adagolás helye és módja valamint más tényezők figyelembevételével történik.

Találmányunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük anélkül, hogy az oltalmi kört a példákra korlátoznánk.



A példákban alkalmazott "Jeffamine M 2070" propilénből és etilén-oxidból leszármaztatható, 2070 átlagos molekulatömegű monometoxi-polioxiálkilén-propilamin polimer, amely polietilén-glikol alapvázból áll és átlagosan 30 % beépült propilén-oxid csoportot tartalmaz, véletlenszerű eloszlásban.

A "Jeffamine M-1000" propilén- és etilén-oxidból leszármaztatható, 1000 átlagos molekulatömegű monometoxi-polialkilén-propilamin polimer, amely polietilén-glikol alapvázból áll és 14 % specifikusan beépült propilén-oxid-csoportot tartalmaz, amelyben x értéke átlagosan 18,6; y értéke átlagosan 1,6 és z értéke 0 (x, y és z a korábbiakban megadott értelmezésű).

A példákban használt reagenseket felhasználásig borostyánüvegben 4 °C-on szárítva tároljuk. Minden módosításhoz friss aliquot részeket alkalmazunk.

1. példa

alfa,alfa-oxo-metilén-bisz[omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/] SRU 111

előállítása

1,5 g MPEG (metoxi-polietylénglikol, molekulatömeg 5000) 80 ml vízmentes toluollal képezett szuszpenziójából 50 ml oldószert ledesztillálunk. Az oldatot lehütjük és 30,5 mg di-2-piridil-karbonátot adunk hozzá. A képződő elegyet 24 órán át visszafolyató hűtő alkalmazása mellett forraljuk. Az oldatot lehütjük, a kiváló csapadékot szűrjük és előbb kevés toluollal majd dietil-éterrel mossuk. A szilárd anyagot magas vákuumban szárítjuk. Fehér por alakjában 0,6 g alfa,alfa'-oxo-metilén-bisz[omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/] SRU 111-et kapunk. A PEG-módosított interferont az alábbi 1. módszer szerint állítjuk elő.

PEG-módosított alfa-interferon előállítása1. módszer

Rekombináns alfa-interferont [5 mg/ml] 5 mM nátrium-acetátot és 120 mM nátrium-kloridot tartalmazó pufferrel /pH 5,0/ szemben dializálunk. Kálium-tiocianátot adunk hozzá (végkoncentráció 0,5 M) és a pH-t egytized térfogatú 1 M triclin-nátriumhidroxid /pH 11,9/ puffer hozzáadásával 10,0 vég-ső értékre állítjuk be. A fehérjéhez 3:1 molarányban szilárd vagy dimetil-szulfoxidban oldott (a dimetil-szulfoxid térfogata az össztérfogat 10 %-ánál kisebb) PEG-reagenst adunk. A módosítást szobahőmérsékleten 30 perc és 4 óra közötti időn át végezzük, majd a további módosítás leállítására céljából 1 M glicint /pH 6,3/ adunk hozzá, 20 mM vég-ső koncentrációban.

A PEG-módosított fehérjét 3,5 M ammónium-szulfátot és 50 mM nátrium-foszfátot tartalmazó puffer /pH 7,0/ hozzáadásával kicsapjuk; a végső ammónium-szulfát koncentráció 1,1 M (1,0 M ammónium-szulfát PEG-10000-re). A csapadékot centrifugálással összegyűjtjük, mossuk és 25 mM ammónium-acetátban /pH 5,0/ újraoldjuk. A PEG-módosított fehérjéket hidrofób oszlopon (pl. 7,5 x 7,5 mm; pl. BioRad TSK fenil-5-PW vagy Toyopearl fenil-650 M) 50 mM nátrium-foszfátban /pH 7,0/ csökkenő ammónium-szulfát gradiens szerint végzett kromatográfiával tisztítjuk. Más módszer szerint a PEG-IFN-t 25 mM nátrium-acetátot és 200 mM nátrium-kloridot tartalmazó pufferrel /pH 5,0/ egyensúlyba hozott Sephacryl S-200 oszlopon (pl. 90 cm x 3,2 cm nagyságú oszlop) végzett gélszűréssel tisztítjuk. A PEG-módosított fehérjét SDS-PAGE segítségével azonosítjuk. Az egy /PEG<sub>1</sub>-IFN/ vagy két /PEG<sub>2</sub>-IFN/ között PEG-t tartalmazó, az oszlopról eluált fehérjéket összegyűjtjük, az eluátumokat bepároljuk és a fehérjét 280 nm mellett mutatott abszorpció vagy kolorimetrikus módszer /Pierce/ segítségével meghatározzuk. A PEG-IFN-t 50 mM nátrium-foszfátot és 0,3 M ammónium-szulfátot tartalmazó pufferben /pH 7,0/ 4 °C tároljuk.

## 2. módszer

Interferon alfa2a-t [fehérjekoncentráció kb. 6 mg/ml] 5 mM nátrium-acetátot és 0,12 M nátrium-kloridot tartalmazó pufferrel /pH 5,0/ szemben dializálunk. A fehérjekoncentrációt oly módon határozzuk meg, hogy az abszorpciót 280 nm mellett mérjük; az extinkció koefficiens 1,0 mg<sup>-1</sup>ml. A fehérjeoldatot a módosító reagenssel 1:3 molarányban [fehérje/reagens] keverjük össze. A módosító reakciót oly módon indítjuk be, hogy a pH-t egytized térfogat 0,1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>-NaOH /pH 10,7/ hozzáadásával 10,0 értékre állítjuk be. Az inkubálást szobahőmérsékleten egy órán át végezzük,

majd a reakciót egyhuszad térfogat 1 M glicin /pH 7,5/ hozzáadásával leállítjuk. A pH-t 3-5 perc múlva egyhuszad térfogat 1 M nátrium-acetát /pH 4,0/ hozzáadásával 5,0-6,0 értékre állítjuk be.

A PEG-interferont, a reakciót leállító reagenst és módosítatlan interferont tartalmazó oldatot 40 mM ammónium-acetáttal /pH 4,5/ négyszeres térfogatra hígítjuk és CM-cellulóz oszlopra /Whatman CM-52/ visszük fel (kb. 0,5 ml gyanta per mg fehérje). Az oszlopot 5 térfogat 40 mM ammónium-acetáttal /pH 4,5/ mossuk, majd a PEG-interferont és a módosítatlan interferont lineáris gradiens szerint különböző nátrium-klorid-tartalmú /0,5 M/ 40 mM ammónium-acetáttal /pH 4,5/ eluáljuk. A fehérjetartalmú frakciókat 280 nm mellett végzett abszorpcióval azonosítjuk és a PEG-interferont tartalmazó frakciókat SDS-PAGE segítségével azonosítjuk.

A PEG-interferont Sephacryl S-200 gyantát (Pharmacia LKB) tartalmazó oszlopon végzett méretkizárásos gélszűréssel továbbtisztítjuk. Az oszlopról eluált frakciókat SDS-PAGE segítségével elemezzük és a PEG-interferont-tartalmú csúcsanyagot összegyűjtjük.

## 2. példa

alfa,alfa-oxo-metilén-bisz[omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/] SRU 28,3 előállítása

Az 1. példában leírt eljárás szerint MPEG-et (molekulatömeg 1300) alfa,alfa-oxo-metilén-bisz[omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/] SRU 28,3-á alakítunk és e reagens felhasználásával az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG-módosított interferont állítunk elő.

3. példaalfa-metil-omega-[2-[[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-oxi]-etoxi]-poli-/oxi-1,2-etándiil/ SRU 111,7 előállítása

1 g MPEG (molekulatömeg 5000) és 30 ml vízmentes metilén-klorid oldatából 10 ml oldószert ledesztillálunk. Az oldatot szobahőmérsékletre hűtjük és 132 mg /0,6 mM/ di-2-piridil-karbonátot és 4 mg DMAP-t adunk hozzá. A kapott oldatot 14 órán át keverjük és az oldószert vákuumban eltávolítjuk. A maradékot dietil-éterrel eldörzsöljük és a kiváló csapadékot szűrjük. A terméket 7 ml vízmentes diglimben oldjuk, melegítjük, a képződő oldatot szobahőmérsékletre hűtjük és néhány órán át állni hagyjuk. A kiváló csapadékot szűrjük és 2x5 ml vízmentes diglimmel mossuk. A szilárd anyagot vákuumkemencében nitrogénáramban szárítjuk. 0,7 g alfa-[2-piridinil-oxi/-karbonil]-omega-metoxi-poli-/oxi-1,2-etándiil/ SRU 111,7-t kapunk.

Analízis:  $C_9H_{11}NO_4 /CH_2 CH_2O/_{111,7}$  képletre

számított: C% = 54,57; H% = 9,02; N% = 0,28;

talált: C% = 54,51; H% = 9,19; N% = 0,28.

A fenti reagens felhasználásával, az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG-módosított interferont állítunk elő.

4. példaalfa-[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 225 előállítása

A 3. példa szerinti eljárással MPEG-t (molekulatömeg 10 000) alfa-[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-omega-metoxi-poli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 225-é alakítunk.

Analízis:  $C_9H_{11}NO_4 / CH_2 CH_2O / 225$  képletre

számított: C% = 54,54; H% = 9,08; N% = 0,14;

talált: C% = 54,54; H% = 9,12; N% = 0,11.

A fenti reagens felhasználásával az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG-módosított interferont állítunk elő.

#### 5. példa

alfa-metil-omega-[2-[2-[[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-oxi]-propoxi]-propoxi]-  
-poli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 64,7 előállítása

0,5 g alfa-2-[2-/hidroxipropoxi/-propil]-omega-metoxipoli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 64,7 és 40 ml vízmentes metilén-klorid oldatából 15 ml oldószert le-desztillálunk. Az oldathoz 108 mg di-2-piridil-karbonátot, 4 mg DMAP-t és néhány gömböcske 4A molekulaszitát adunk. Az elegyet egy éjjelen át keverjük, majd szűrjük és az oldószert vákuumban eltávolítjuk. A maradékot méretkizárásos kromatográfiával tisztítjuk.

A kapott reagens a /IIB-1/ képletnek felel meg (ahol n értéke kb. 64).

A polimer molekulatömege kb. 3000 dalton.

A fenti reagens felhasználásával az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG-módosított interferont állítunk elő.

#### 6. példa

alfa-metil-omega-[2-[2-[[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-oxi]-propoxi]-propoxi]-  
-poli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 110 előállítása

Az 5. példában ismertetett eljárással analóg módon alfa-[2-/hidroxipropoxi/-propil]-omega-metoxipoli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 110-t alfa-metil-

-propoxi/-propil]-omega-metoxipoli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 110-t alfa-metil-

-omega-[2-[2-[[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-oxi]-propoxi]-propoxi]-poli/oxi-1,2-etándiil/ SRU 110-é alakítunk.

A felhasznált (IIB-2) képletű reagens az 5. példa szerinti (IIB-1) képletűnek felel meg azzal a változtatással, hogy  $n$  értéke kb. 110 és a molekulatömeg kb. 5000 dalton.

A fenti reagensből az 1. példa 1. módszerével analóg módon PEG-módosított interferont állítunk elő.

### 7. példa

Metil-oxirán, oxirán polimer [2-[[/2-piridinil-oxi/-karbonil]-amino]-propil]-metil-éter [MO/O = 10/32] előállítása

1 g Jeffamine M 2070 (Texaco Chemical Co.) és 40 ml vízmentes metilén-klorid oldatából 15 ml oldószert ledesztillálunk. Az oldatot 0 °C-ra hűtjük és 215 mg di-2-piridil-karbonátot adunk hozzá. A kapott oldatot további 4 órán át 0 °C-on keverjük, majd az oldószert vákuumban eltávolítjuk. A maradékot két egymásután kapcsolt fenomenex méret kizárásos oszlopon (500 Å és 1000 Å) végzett elválasztással tisztítjuk. A termék UV szerint 232 nm és 310 nm mellett két sávot mutat.

A reagens a (IIA-1) általános képletnek felel meg (ahol  $R^5$  jelentése hidrogénatom;  $R^2$  jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport és - átlagos eloszlásban -  $n$  értéke 32 ha  $R^2$  jelentése hidrogénatom és  $n$  értéke 10 ha  $R^2$  jelentése metilcsoport).

A fenti reagens felhasználásával az 1. példa 2. módszere szerinti eljárással PEG módosított interferont állítunk elő.

### 8. példa

Metil-oxirán, oxirán polimer, [2/[[3-metil-2-piridinil-oxi/-karbonil]-amino]-propil]-metil-éter [MO/O = 10/32] előállítása

7,1 g Jeffamine M 2070-t a 7. példa szerint bisz/3-metil-2-piridil/-karbonáttal reagáltatva metiloxiránt, oxirán polimert, azaz [2/[[3-metil-2-piridinil-oxi/-karbonil]-amino]-propil]-metil-étert [MO/O = 10/32] állítunk elő.

A kapott (IIA-2) képletű reagens a 7. példa szerinti (IIA-1) általános képletnek felel meg, azonban R<sup>5</sup> jelentése metilcsoport.

A fenti reagens felhasználásával az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG módosított interferont állítunk elő.

### 9. példa

Metil-oxirán, oxirán polimer, [2-[2-piridinil-oxi/-karbonil]-amino]-propil]-metil-éter, tömbpolimer, [MO/O = 1,6/18,6] előállítása

0,6 g Jeffamine M-1000-t (Texaco Chemical Co.) a 7. példa szerinti eljárással 155,6 mg di-2-piridil-karbonáttal reagáltatva metil-oxiránt, oxirán polimert, azaz [2-[2-piridinil-oxi/-karbonil]-amino]-propil]-metil-éter, tömbpolimert, [MO/O = 1,6/18,6] állítunk elő.

A kapott vegyület a (IIA-3) képletnek felel meg, amelyben a polimer termékben az egységek átlagos eloszlása a fent megadott.

A fenti reagensből az 1. példa 1. módszere szerinti eljárással PEG-módosított interferont állítunk elő.



### Interferon vírusellenes hatása

Az interferon és PEG-módosított interferon vírusellenes hatását meghatározzuk [Rubinstein és tsai: J. Virol. 37, 755-758 /1981/; Familetti és tsai: Methods Enzymol. 78, 387-394 /1981/]. Az összes assay-t a kontrollhoz viszonyítva standardizáljuk. Az assay során felhasznált interferon standard fajlagos aktivitása  $2 \times 10^8$  egység/mg fehérje.

Az interferon módosításánál felhasznált körülmények a korábbiakban ismertetett optimalizált módszereken alapulnak. A PEG-módosítást SDS-PAGE analízissel mérjük és az interferonnak monoPEG-interferonná történő különböző inkubációs időn át végzett <sup>- (adain) szintézisre való felkészítés -</sup> kémiai reakcióképesség<sup>ek</sup> átalakítását és a különböző PEG-interferon-konjugátum <sup>ok</sup> ~~speciessék~~ eloszlását (hely szelektivitás) meghatározzuk. Az SDS-PAGE-ben a PEG-módosított <sup>ok</sup> ~~speciessék~~ a gélen lassabban vándorló sávok alakjában jelentkeznek.

A monoPEG-és diPEG-interferon egyaránt elegendő mennyiségben keletkezik és így módon ezeket a speciesséket a reakcióelegyből hidrofób kromatográfia segítségével izolálhatjuk és tisztíthatjuk. A tisztított PEG-interferonok vírusellenes aktivitását meghatározzuk és a módosítatlan interferon alfa2A hatásával összehasonlítjuk. A felhasznált polimerek molekulatömegét és néhány PEGilezett származék vírusellenes aktivitását az 1. táblázatban tüntetjük fel.

előleg: (ed) ...  
szintézisre való felkészítés  
PST

fridiba le!

## 1. táblázat

PEG reagensek fizikai tulajdonságai és fehérjékkel képezett konjugátumaikbiológiai aktivitása

Vegyület, példa sorszáma	Polimer, molekulatömeg	Vírusellenes aktivitás (%-os gátlás)	
		monoPEG	diPEG
4	1000	25	2
3	5000	40	4
1	5000	40	NH
6	5000	40	NH
5	3000	60	NH
7	2070	45	NH
2	1300	70	NH
9	1000	100	40

NH = nem határoztuk meg.

*az a sorban, ahol a gátlás nem határozott meg, az a konjugátum.*

## Szabadalmi igénypontok

1.

1. Eljárás (I) általános képletű interferon-konjugátumok előállítására

amely képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;m értéke  $\geq 1$ -től az interferonban levő hozzáférhető aminocsoportok számáig terjedő egész szám;

W jelentése -O- vagy -NH- ;

x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és

y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám és

x, y és z összege 3-1000;

azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel

a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely (II) általános képletű vegyületet vagy - amennyiben az interferon konjugátumban W jelentése -O- - valamely

(III) általános képletű vegyületet (mely képletekben R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, W, x, y és z jelentése a fent megadott és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom vagy kisszénatomszámú alkilcsoport, azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel) inter-

feronnal vagy sójával reagáltatunk és az interferon-konjugátumokat a reakcióelegyből izoláljuk.

2.

2) Az 1. igénypont szerinti eljárás/olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban

előállítására), amelyekben x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban

minden amit a  
 jelölésben láthatunk  
 kifejez, hogy amit  
 láthatunk

a z z a l j e l l e m e z v e, hogy valamely (II) általános képletű vegyületet vagy - amennyiben az interferon konjugátumban W jelentése -O- - valamely (III) általános képletű vegyületet (mely képletekben R, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, W, x, y és z jelentése a fent megadott és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport, azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel) inter-feronnal vagy sójával reagáltatunk és az interferon-konjugátumokat a reakcióelegyből izoláljuk.

levő polimer egység molekulatömege kb. 300 és kb. 30000 dalton közötti érték, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás  $m = 1$  értéknek megfelelő (I) általános képletű vegyületek előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

4) Az 1. igénypont szerinti eljárás R helyén metilcsoportot tartalmazó (I) általános képletű vegyületek előállítására, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

5) A 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban levő polimer egység molekulatömege kb. 1000 dalton és kb. 5000 dalton közötti érték, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

6) A 2. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban levő polimer egység molekulatömege kb. 1000-2200 dalton, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

7) Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben x és y értéke 5,0-500,0 és z értéke 0,0-4,0, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

8) Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben  $x$  értéke 10,0-100,0;  $y$  értéke 1,0-10,0 és  $z$  értéke 0, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

9) Az 1. igénypont szerinti eljárás, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy interferonként interferon alfa2A-t alkalmazunk.

10) A 9. igénypont szerinti eljárás olyan (I) általános képletű vegyületek előállítására, amelyekben  $W$  jelentése  $-NH-$ ;  $m$  értéke 1;  $R$ ,  $R^2$  és  $R^4$  jelentése metilcsoport;  $R^1$  jelentése hidrogénatom;  $x$  értéke 18,6;  $y$  értéke 1,6 és  $z$  értéke 0, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy a megfelelő kiindulási anyagokat alkalmazzuk.

11) Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti interferon konjugátumok felhasználása nem-humán egyedeken fellépő betegségek kezelésére vagy megelőzésére.

12) Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti interferon konjugátumok felhasználása betegségek kezelésére vagy megelőzésére felhasználható gyógyászati készítmények előállítására.

13) Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti interferon konjugátumok, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy azokat az 1. igénypont szerinti eljárással vagy annak nyilvánvaló kémiai ekvivalensével állítjuk elő.

14) A jelen találmány ahogyan lényegében a szabadalmi leírás példáiban ismertetésre került.

15) (I) általános képletű interferon konjugátumok

(mely képletben

15-39,  
Kisv. 22

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;

m értéke  $\geq 1$ -től az interferonban levő hozzáférhető aminocsoportok számáig terjedő egész szám;

W jelentése -O- vagy -NH- ;

x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és

y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám és

x, y és z összege 3-1000;

azzal a feltétellel, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel).

16) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban levő polimer egység molekulatömege kb. 300 és kb. 30000 dalton közötti érték.

17) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy m értéke 1.

18) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy R jelentése metilcsoport.

19) A 16. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban levő polimer egység molekulatömege kb. 1000 dalton és kb. 5000 dalton közötti érték.

- 20) A 16. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy x, y és z értéke olyan, hogy a konjugátumban levő polimer egység molekulatömege kb. 1000-2200 dalton.
- 21) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy x és y értéke 5,0-500,0 és z értéke 0,0-4,0.
- 22) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy x értéke 10,0-100,0; y értéke 1,0-10,0 és z értéke 0.
- 23) A 15. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy az interferon interferon alfa2A.
- 24) A 23. igénypont szerinti interferon konjugátum, a z z a l j e l l e - m e z v e, hogy W jelentése -NH- ; m értéke 1; R, R<sup>2</sup> és R<sup>4</sup> jelentése metilcsoport; R<sup>1</sup> jelentése hidrogénatom; x értéke 18,6; y értéke 1,6 és z értéke 0.
- 25) (II) általános képletű vegyületek  
(mely képletben  
R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;  
R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom vagy kis szénatomszámú alkilcsoport;  
W jelentése -NH- vagy -O- ;  
x értéke 1 és 1000 közötti egész szám és  
y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám;  
és x, y és z összege 3-1000;

azzal a feltétellel, hogy amennyiben W jelentése -NH- vagy ha W jelentése -O- és R<sup>5</sup> jelentése hidrogénatom, úgy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel).

26) A 25. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy x, y és z értéke olyan, hogy a (II) általános képletű vegyület molekula-tömege kb. 300 és kb. 30000 dalton közötti érték.

27) A 25. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy R jelentése metilcsoport.

28) A 27. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy x értéke 10,0-100,0; y értéke 1,0-10,0 és z értéke 0,0-4,0.

29) (III) általános képletű vegyületek

(mely képletben

R jelentése kis szénatomszámú alkilcsoport;

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> jelentése hidrogénatom vagy metilcsoport;

x értéke 1 és 1000 közötti egész szám; és

y és z értéke 0 és 1000 közötti egész szám és

x, y és z összege 3-1000.

30) A 29. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy x, y és z értéke olyan, hogy a (III) általános képletű vegyület molekula-tömege kb. 300 dalton és kb. 30 000 dalton közötti érték.

31) A 29. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> és R<sup>4</sup> közül legalább az egyik kis szénatomszámú alkilcsoportot képvisel.



32) A 29. igénypont szerinti vegyületek, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy R jelentése metilcsoport.

33) Gyógyászati készítmény, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy hatóanyagként valamely, a 15-24. igénypontok bármelyike szerinti interferon konjugátumot és gyógyászati algalmas inert hordozóanyagot tartalmaz.

34) Immunomodulációs rendellenességek - pl. neopláziás betegségek vagy fertőzőes betegségek - kezelésére vagy megelőzésére szolgáló gyógyászati készítmények, a z z a l j e l l e m e z v e, hogy hatóanyagként valamely, a 15-24. igénypontok bármelyike szerinti interferon konjugátumot és gyógyászati algalmas inert hordozóanyagot tartalmaz.

pl. immunomodulációs  
betegségek  
megelőzésére  
szolgáló

32 bekezdés  
+ 11 bekezdés  
44 oldal  
jelölés (1) képez  
24

A bejelentő helyett a  
meghatalmazott:

Dr. Tóth-Urbán László  
ügyvéd  
1093 Budapest, Kőraktár u. 24. I. 11/a  
AF szám: 4462036-101  
CQE számlaszám: 218-98055  
14541-8  
14541-8

2366/93

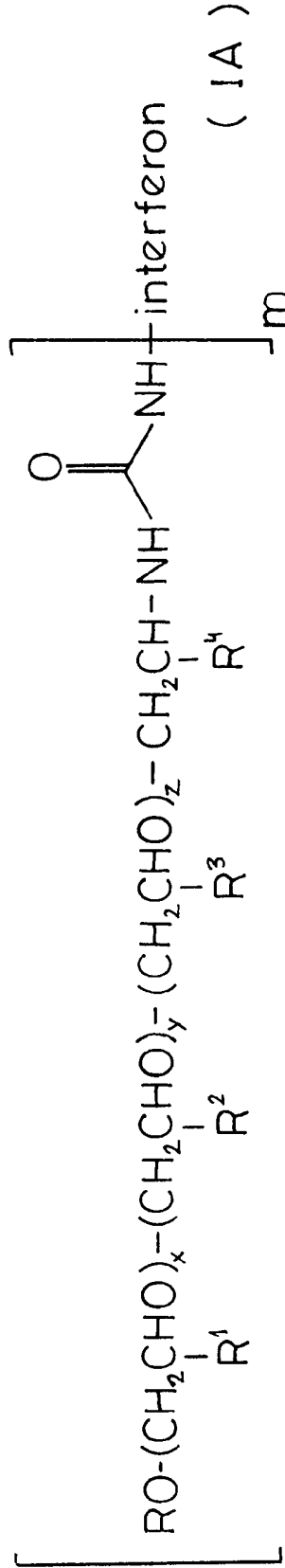
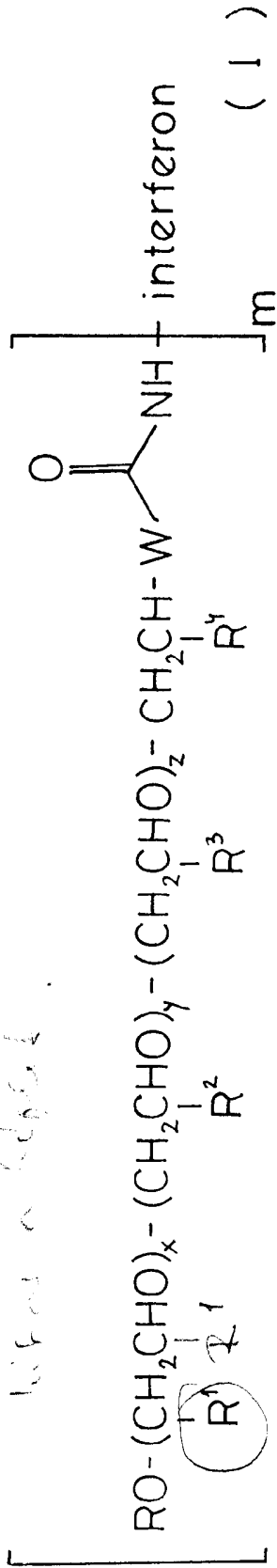
KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY

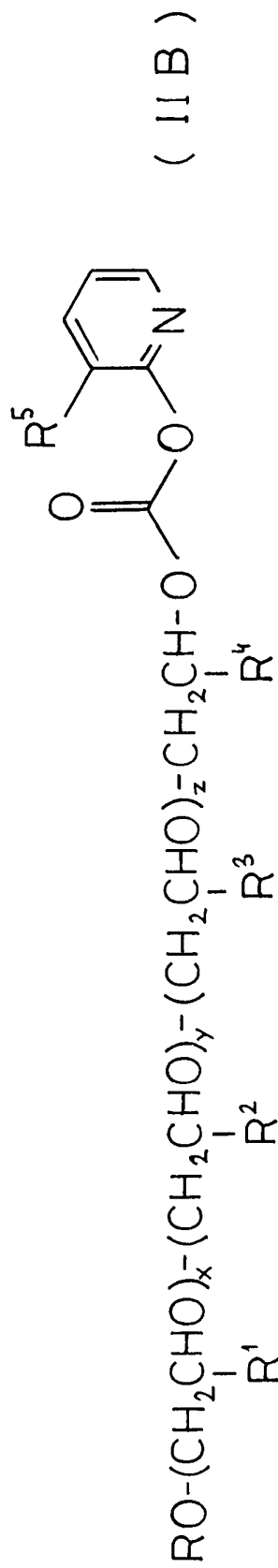
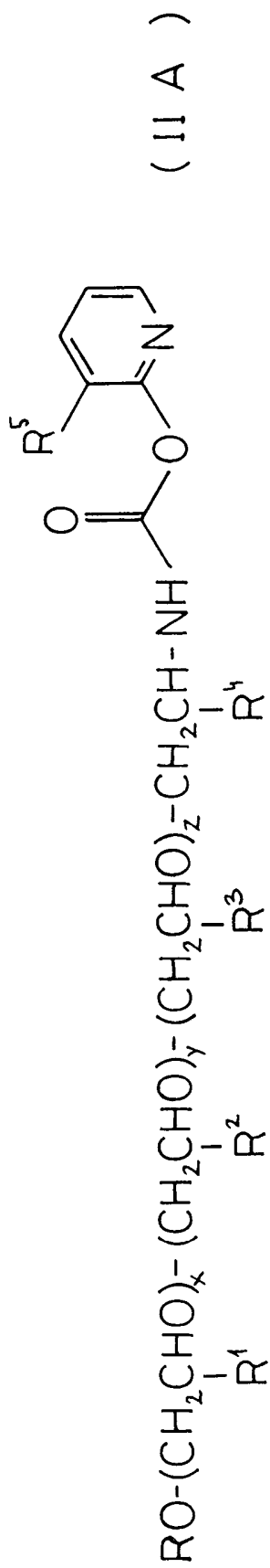
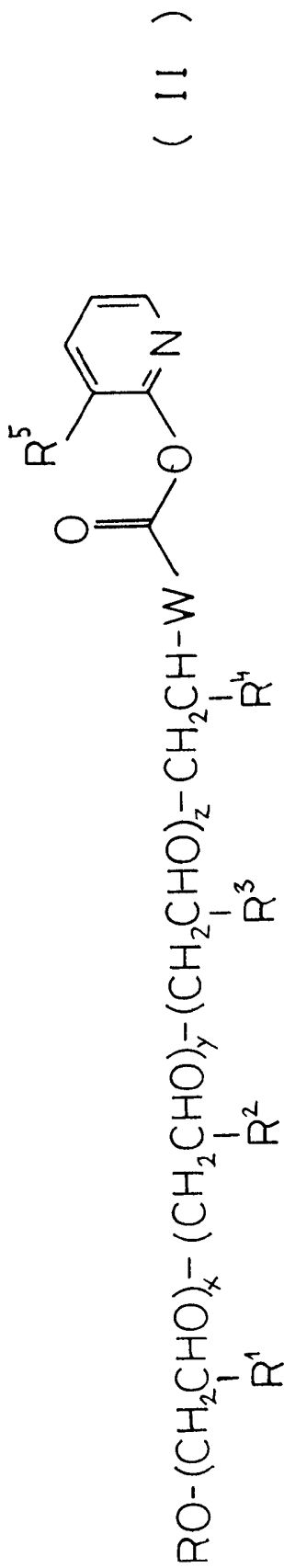
67013

12 / 1

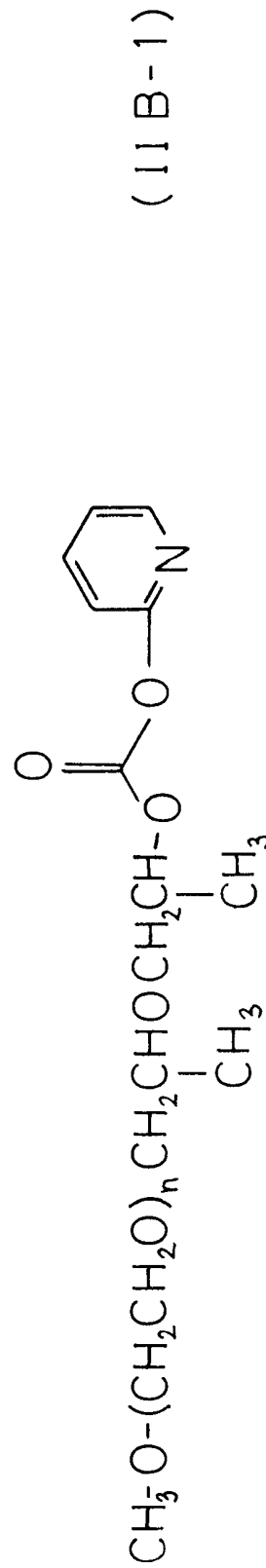
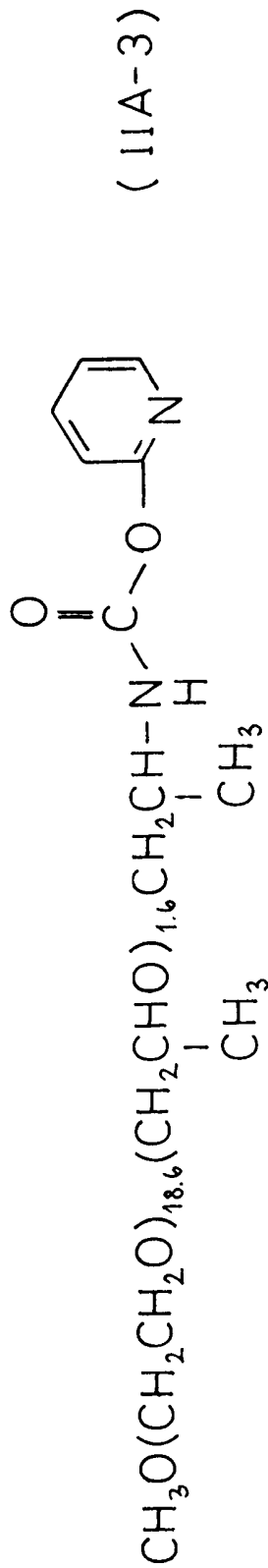
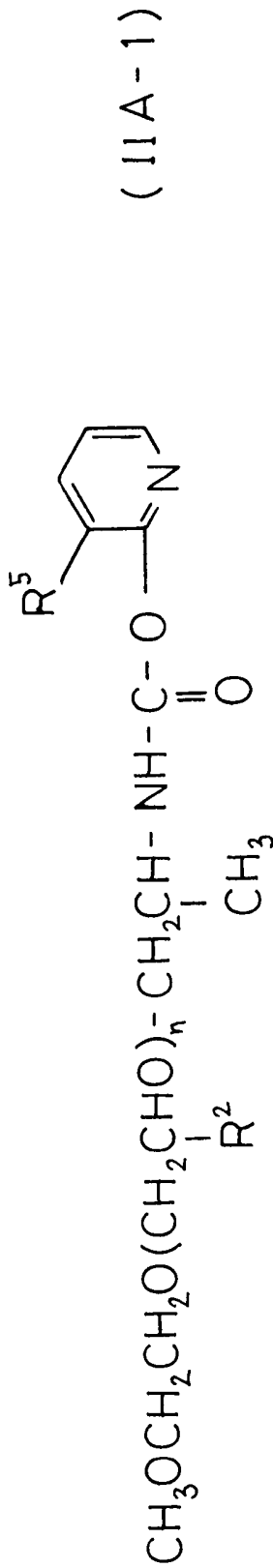
000000 / 93

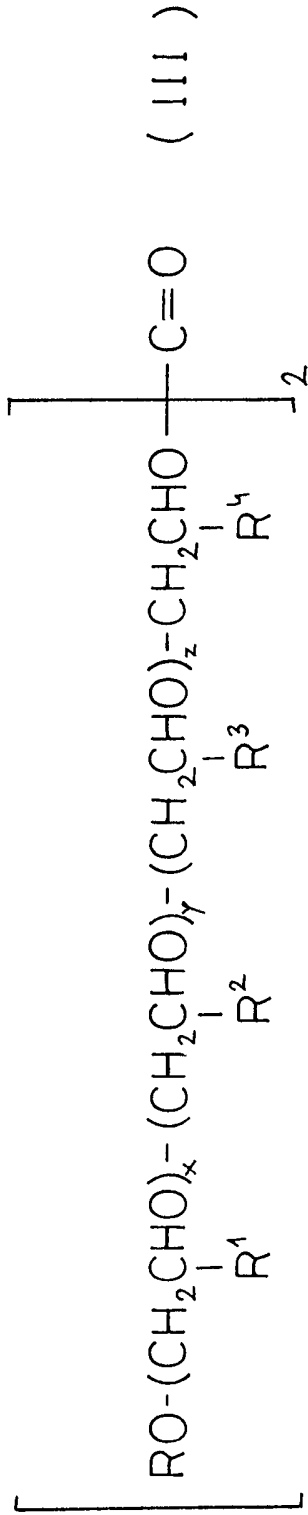
lefedés a védjeggyel



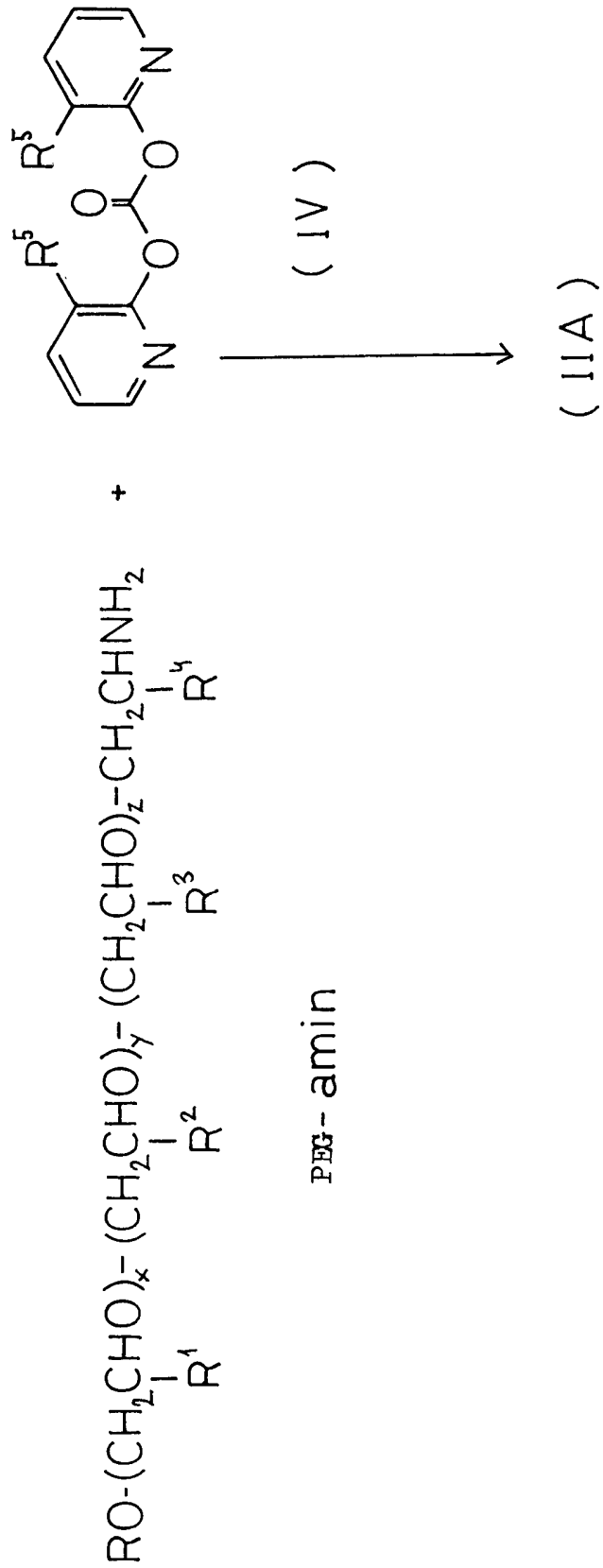


3037

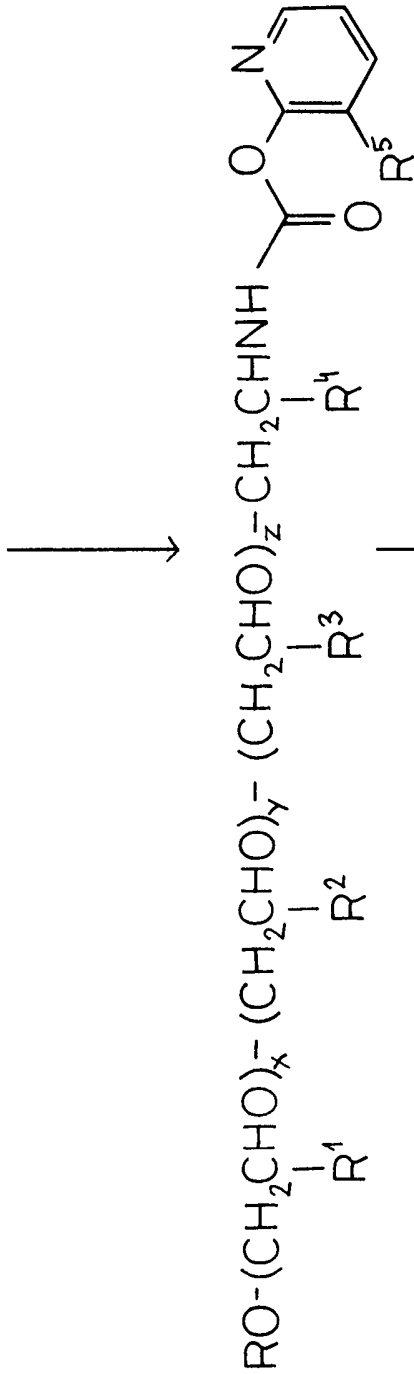




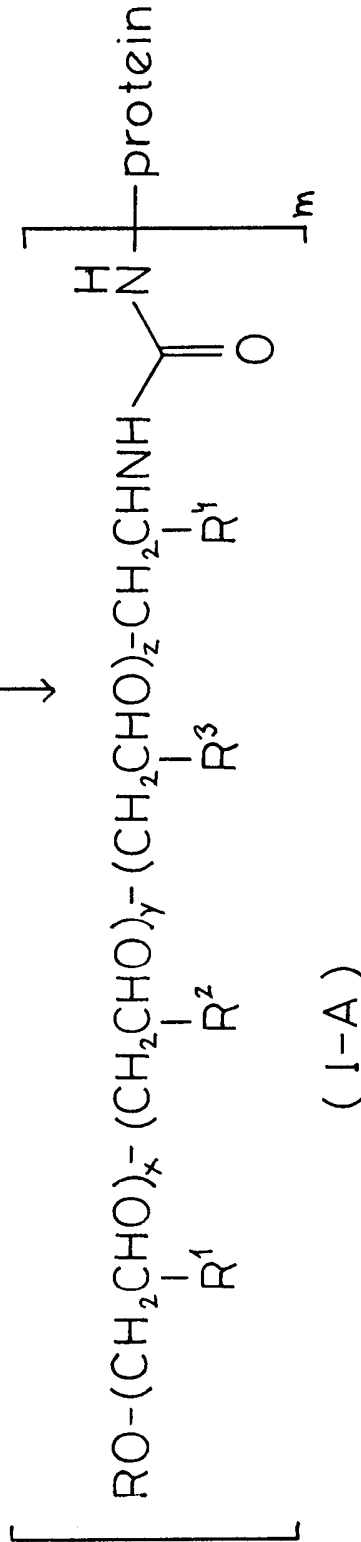
A - reakciósema



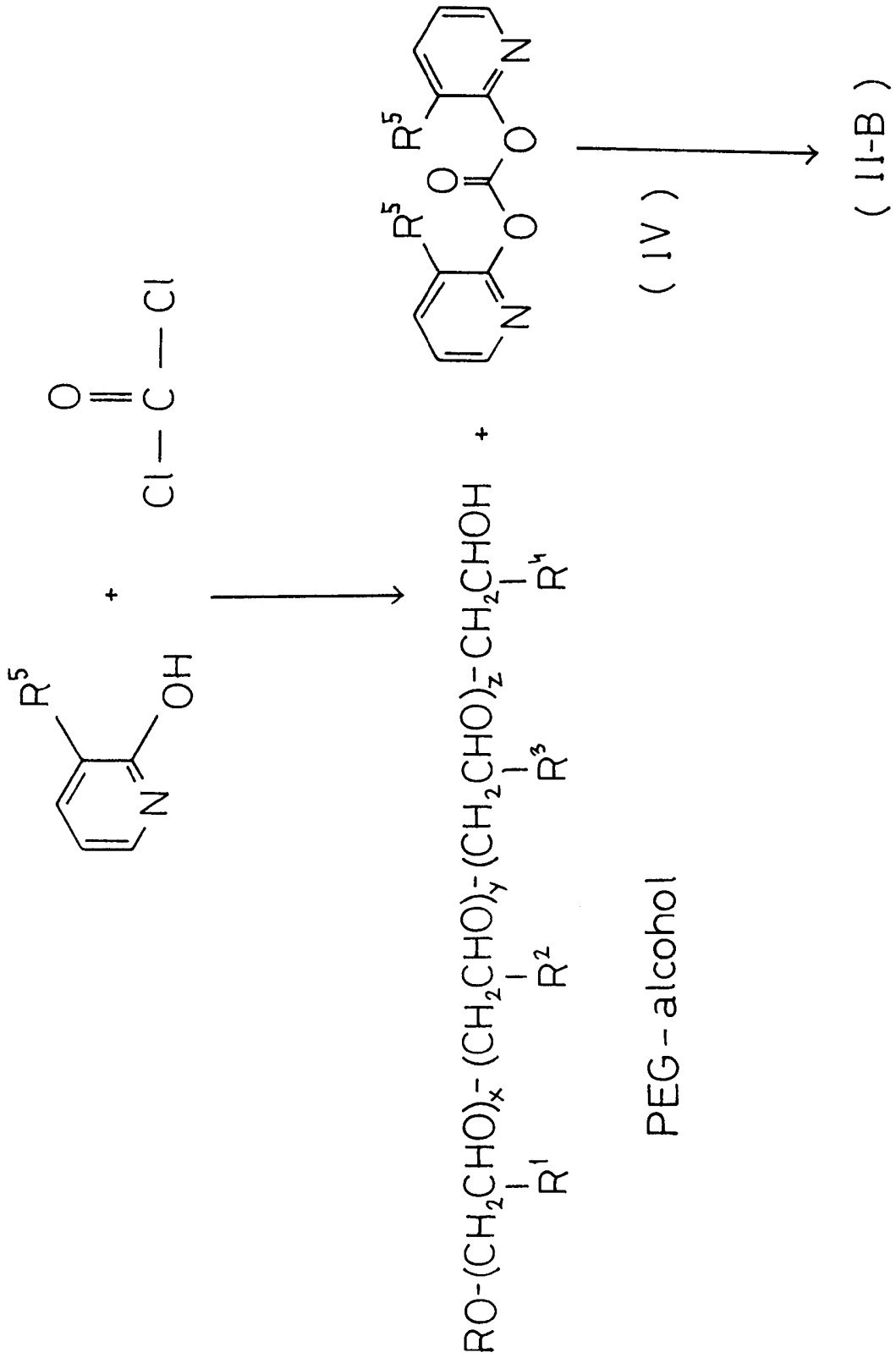
A - reakciósema folytatása  
( IV )



NH<sub>2</sub>-protein



B - reakciósema

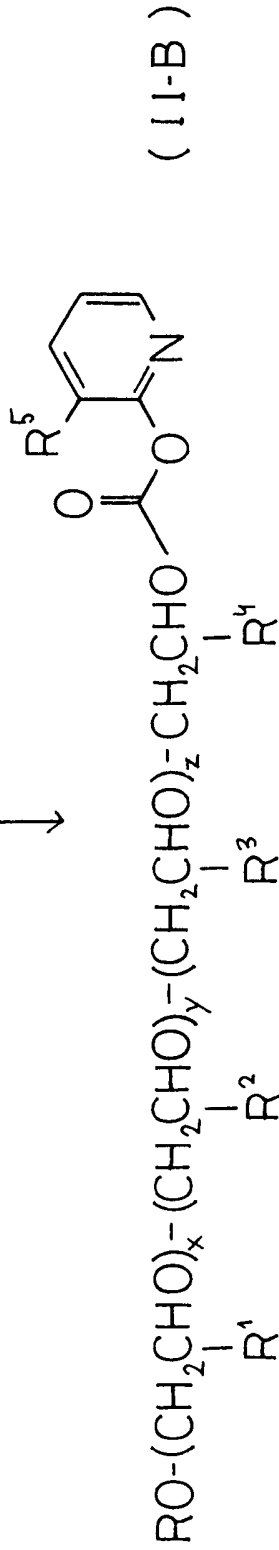


PEG - alcohol

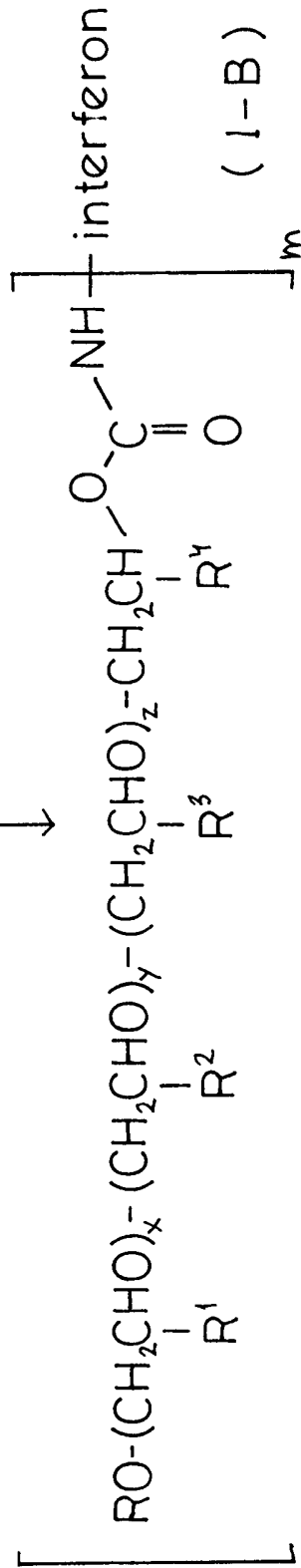
165/ 1065

B-reakciósema folytatása

(IV)

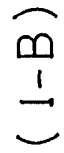
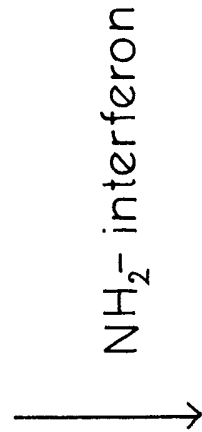
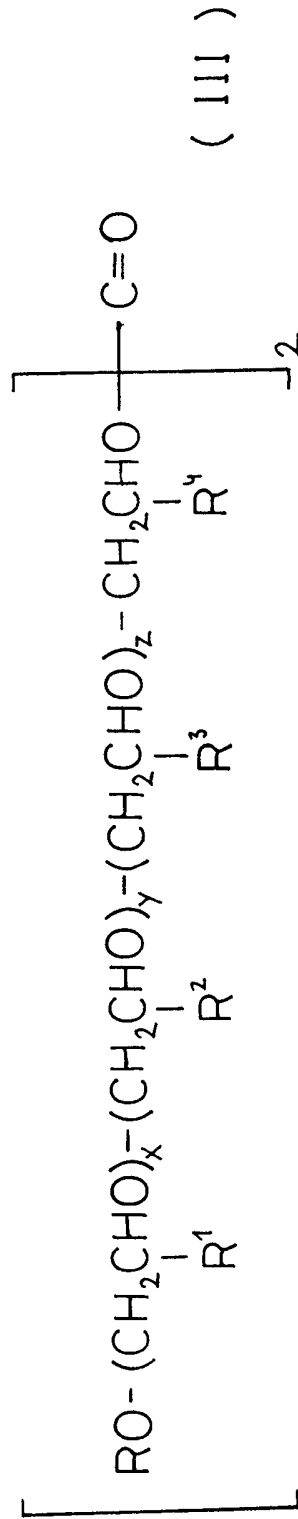
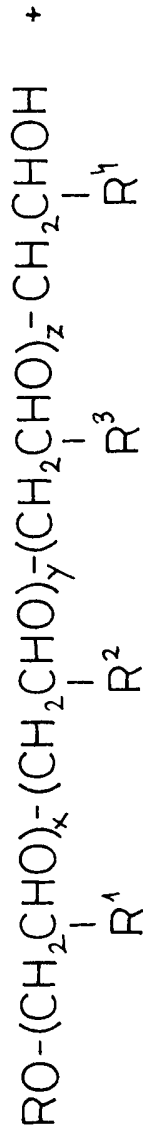
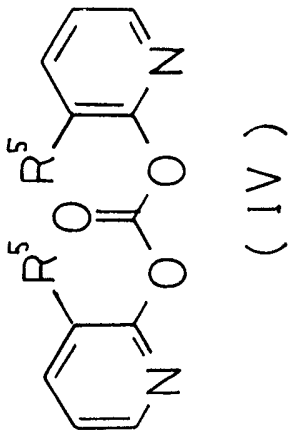


NH<sub>2</sub>-interferon



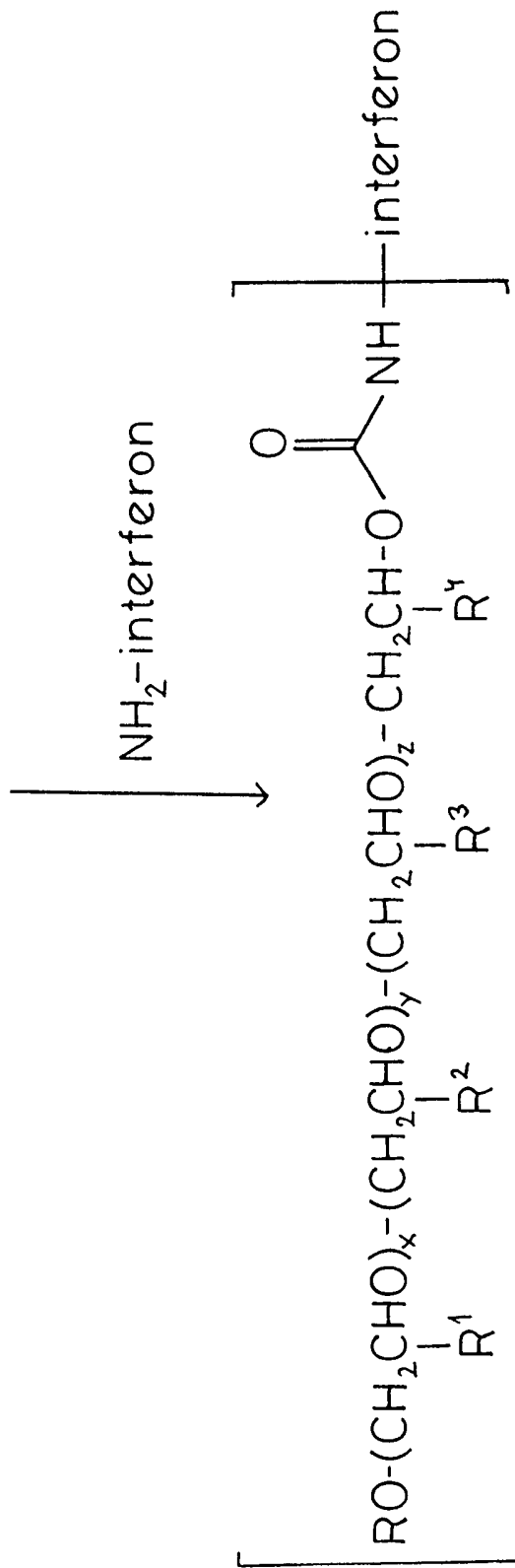


C-reakciósema



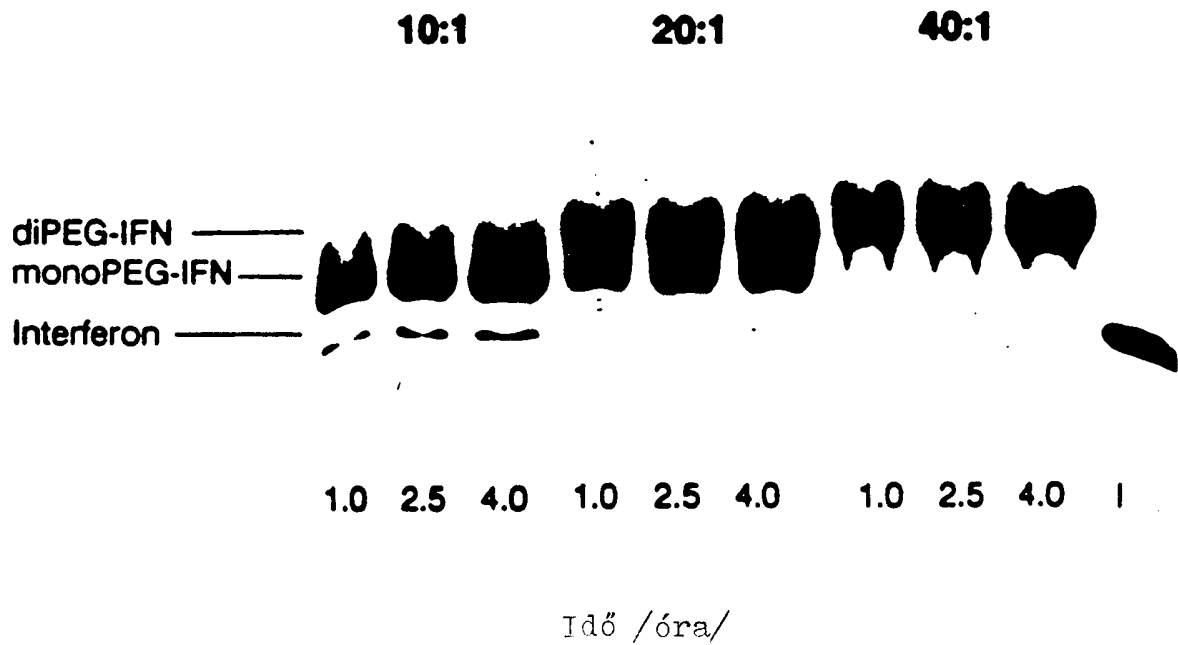
## C - reakciósema folytatása

( III )

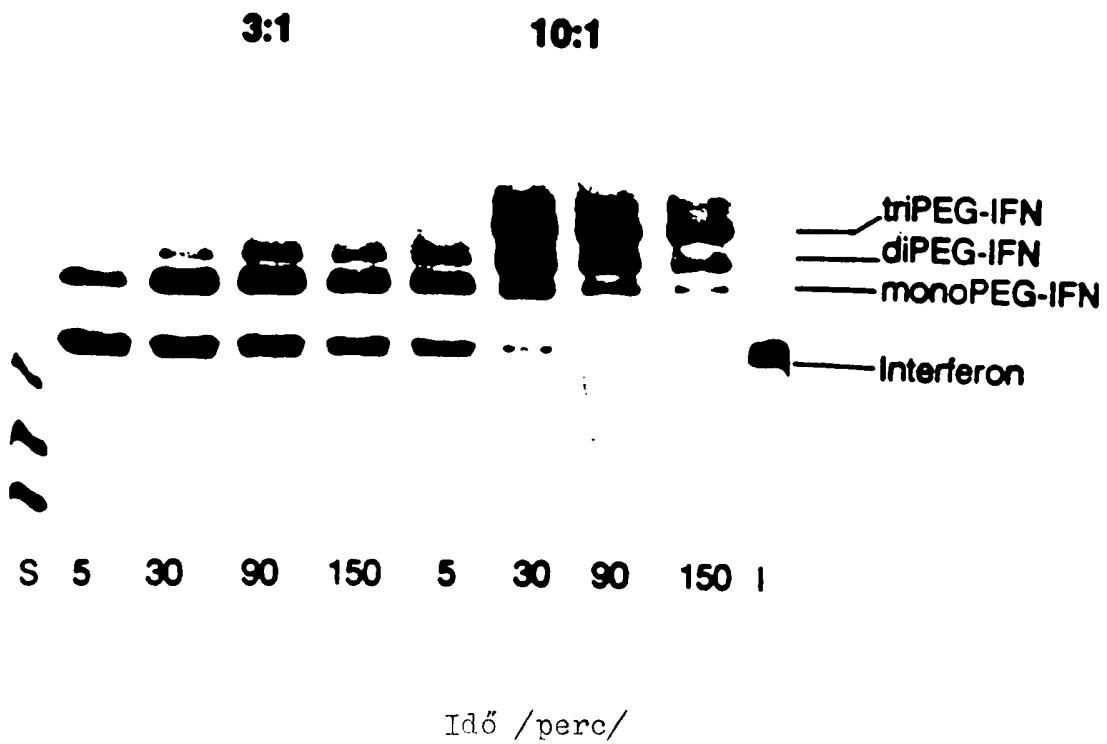


( I-B )

1. ábra



2. ábra



3. ábra

