



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI 1101565-9 A2**

(22) Data de Depósito: 01/04/2011
(43) Data da Publicação: 04/12/2012
(RPI 2187)



(51) *Int.Cl.:*

C07K 14/56
C07K 14/555
A61K 38/21
A61P 31/14
A61P 31/12
A61P 37/02
A61P 35/00

(54) **Título:** NOVO CONJUGADO DE POLIETILENO GLICOL ESTÁVEL DE INTERFERON ALFA, REPRESENTADO POR UM ISÔMERO POSICIONAL

(30) **Prioridade Unionista:** 20/07/2010 RU RU2010129824

(73) **Titular(es):** CJSC BIOCAD

(72) **Inventor(es):** CHERNOVSKAYA TATYANA VENIAMINOVNA, DENISOV LEV ALEKSANDROVICH, KLENOVA ANGELINA VSOVOLODOVNA, MOROZOV DMITRIY VALENTINOVICH, RUDENKO ELENA GEORGIEVNA

(57) **Resumo:** NOVO CONJUGADO DE POLIETILENO GLICOL ESTÁVEL DE INTERFERON ALFA, REPRESENTADO POR UM ISÔMERO POSICIONAL; presente invenção refere-se ao campo da indústria farmacêutica e da medicina, particularmente a novos derivados de PEG-interferon e à descoberta de um novo conjugado de interferon funcionalmente ativo, e altamente estável para polietileno glicol com uma atividade de interferon alfa, com imunogenicidade reduzida, com efeitos biológicos prolongados e parâmetros farmacocinéticos melhorados da fórmula geral: $\text{CH}_3 (\text{O CH}_2 \text{CH}_2)_n \text{O} (\text{CH}_2)_m \text{N}^{\text{H}}\text{-IFM}$ onde: n - valores integrais de 227 a 10 000, de forma que o peso molecular de PEG é de aproximadamente 10 000 - 40 000 Da; m- número inteiro ≥ 4 ; IFN- polipeptídeo natural ou recombinante apresentando a atividade de IFN-alfa. A invenção também se refere a fármacos contendo o conjugado mencionado da fórmula (I), composições farmacêuticas contendo conjugado de PEG-IFN e excipientes terapeuticamente aceitáveis adequados para o tratamento de infecções virais e câncer, assim como doenças associadas à imodeficiência primária e secundária. A invenção refere-se também ao uso de conjugado na fórmula (I) em produtos medicinais, que apresentam atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória, a métodos de prevenção e/ou tratamento de doenças associadas à imodeficiência primária ou secundária que incluem a administração de quantidade terapeuticamente efetiva de conjugado da fórmula (1), e ao recipiente com tal composição farmacêutica.

NOVO CONJUGADO DE POLIETILENO GLICOL ESTÁVEL DE INTERFERON ALFA, REPRESENTADO POR UM ISÔMERO POSICIONAL

DESCRIÇÃO

5 A presente invenção refere-se a produtos farmacêuticos, nomeadamente, a conjugados de ação fisiológica de interferon, particularmente, a novos conjugados de interferon com polietileno glicol (PEG), que podem ser usados na medicina, por exemplo, para o
10 tratamento de doenças virais, imunológicas e oncológicas.

Interferons (IFN) são um grupo de proteínas de ação biológica ou glicoprotéicas que são produzidas por várias células em resposta à infecção viral ou como um resultado de impacto de certas substâncias químicas e biológicas nas
15 células (Isaacs & Lindeman, 1957; Pestka et al., 2007). A conjugação de IFN com receptores celulares leva a indução de um número de proteínas intracelulares que mediam efeitos IFN (Pestka et al., 2004; Bekisz, 2004).

Genes de diferentes IFNs humanos são clonados e
20 expressos em células animais e bacterianas, e como resultado muitos IFNs recombinantes foram desenvolvidos (Pestka et al., 2004; Pestka, 2007). Medicamentos contendo IFN recombinante são usados na prática clínica para tratar uma faixa de doenças virais, oncológicas e imunológicas
25 (Pestka et al., 2004; Chevaliez & Pawlotsky, 2009).

Atualmente, medicamentos a base de interferon são usados na prática clínica para tratar uma faixa de doenças virais, oncológicas e imunológicas (Pestka et al., 2004). Medicamentos a base de IFN são os mais usados para o
30 tratamento de hepatite viral (Chevaliez & Pawlotsky, 2009), que é um dos problemas sociais mais sérios. Hoje existem aproximadamente 350 milhões de pacientes infectados cronicamente com o vírus da hepatite B e 170 milhões de pacientes com hepatite C (Marcellin, 2009) em todo o mundo.

A Hepatite C na maioria dos casos assume um curso crônico que leva a conseqüências graves - cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Modi & Liang, 2008). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, desde 1961 a hepatite crônica e a cirrose hepática mudou da 10a para a 5a posição como causa mortis nos EUA e em países da Europa Ocidental (Marcellin, 2009).

O uso de medicamentos contendo IFN é usada para o tratamento de leucemias e tumores sólidos, incluindo melanoma recorrente (Bukowski et al., 2002; Decantris et al., 2002; Quintas-Cardama et al., 2006).

A eficácia de medicamentos contendo IFN nativo é limitada pela rápida absorção através do tecido subcutâneo, pelo grande volume de distribuição, pela estabilidade relativamente baixa, pela meia-vida curta, pela elevada imunogenicidade e toxicidade (Wills, 1990). Como resultado, em poucas horas após a administração, observa-se uma rápida queda da concentração de IFN no plasma sanguíneo, e o interferon não pode ser detectado no plasma já após 24 horas desde a injeção (Chatelut et al., 1999). O declínio rápido da concentração de interferon provoca um recomeço de replicação viral e aumento da concentração de partículas virais (Lam et al., 1997). Por consequência, existe uma necessidade de frequentes injeções de IFN para obter concentrações terapêuticas eficazes no plasma sanguíneo, resultando em efeitos colaterais dose-dependentes, pois esta monoterapia de hepatite C crônica (CHC) com IFN- α 2b durante 12 meses provoca uma resposta virológica continuada em apenas 15 - 20% dos pacientes, enquanto em pacientes com genótipo 1b e elevada carga viral a eficácia do medicamento não foi absolutamente observada (McHutchinson et al., 1998).

A eficácia terapêutica de IFN pode ser aumentada mediante o uso de fármacos de liberação prolongada,

particularmente IFNs PEGuilados (Manns et al, 2001; Hadziyannis et al, 2004; Zeuzem et al., 2001). IFNs PEGuilados resultam da conjugação química de moléculas de interferon com o polímero - por exemplo, monometoxipoli-etileno glicol (MPEG), que consiste em 5 repetir resíduos de óxido de etileno com um grupo metoxi em uma porção terminal e um grupo hidroxila - em outra. Moléculas MPEG podem apresentar peso molecular diferente e a estrutura estereoquímica (linear ou ramificada). Para a 10 reação de PEGuilação grupo hidroxila na extremidade do MPEG é ativado através de vários grupos funcionais reativos. MPEG ativado pode ser covalentemente conjugado com uma proteína em uma ou várias localizações, dependendo da natureza do grupo ativado e das condições de reação 15 (Zalipsky & Hurris, 1997; Roberts et al, 2002).

PEGuilação de IFN leva a uma melhor farmacocinética, a uma meia-vida aumentada, flutuações reduzidas de concentração no sangue, a imunogenicidade e toxicidade 20 reduzidas, a atividade aumentada *in vivo* (com diminuição de atividade *in vitro*); a estabilidade aumentada (Glue et al, 2000; Reddy et al, 2001).

Atividade reduzida no sistema *in vitro* depende do peso molecular PEG. Conjugação de uma molécula PEG pequena com peso molecular ≤ 5000 Da provoca ligeiras alterações 25 na atividade *in vitro* (Grace et al, 2005). Propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas de proteínas PEGuiladas contendo PEG com tal massa e de proteínas não modificadas quase não diferem. Conjugação de PEG com peso molecular maior leva a uma redução significativa de 30 atividade biológica *in vitro* como resultado de conjugação ineficiente com o receptor, mas neste caso, pode-se verificar uma melhora significativa de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de proteínas PEGuiladas (Delgado et al., 1992), resultando em uma

atividade biológica aumentada in vivo (Bailon & Berthold, 1998). A estrutura PEG também afeta a atividade biológica e propriedades farmacocinéticas - conjugado com PEG linear apresenta um volume de distribuição maior do que conjugado com estrutura PEG ramificada (Caliceti et al, 2003).

Atividade antiviral e propriedades biológicas de conjugados PEG-IFN dependem também do uso de diferentes MPEGs ativados, já que seus grupos funcionais variam pela sua capacidade em modificar diferentes resíduos de aminoácido de proteína e pelo tipo de ligações químicas formadas com a proteína (Roberts et al, 2002). Para peguilação de proteína são amplamente empregados MPEGs ativados que são capazes de conjugar com grupos amino livres de proteínas (carbonato de succinimida, succinato de succinimida, trisilato, triazina, ésteres de hidroxisuccinimida, acetal de aldeído etc.).

São conhecidos atualmente os seguintes conjugados de PEG-IFN.

É conhecido um conjugado PEG-IFN- α 2a com PEG linear com peso molecular 1-5 000 Da (Patente US No. 5,382,657, 1995). Para a conjugação MPEG são usados derivados de etanodiol, a reação foi realizada com pH = 10 sob temperatura ambiente durante 0,5-4 horas. Para a reação de peguilação do IFN foi usado três vezes o excesso de PEG. Nas condições empregadas, a ligação de PEG a IFN ocorreu via acessibilidade estérica de grupos amino livres de diferentes lisinas (Lys-31, Lys133, Lys134, Lys23, Lys131, Lys 121, Lys70, Lys83, Lys49 e Lys112) com a formação de ligações carbamida (Monkarsh et al., 1997). Desse modo, PEG-IFN- α 2a consistiu de uma mistura dos isômeros posicionais resultantes de conjugado PEG-IFN- α 2a, sendo que cada isômero continha um PEG simples. Em comparação com IFN não modificado a atividade antiviral específica de isômeros variou de 6% (para Lys112) para 40%

(para Lys133). A atividade específica total do conjugado obtido composto de 11 isômeros foi de 34% de IFN não modificado. A atividade desses conjugados *in vitro* também dependeu do peso molecular de PEG e se estendeu de 45%
5 (para 2500 Da PEG) a 25% (no caso de 10 000 Da PEG). As desvantagens do conjugado resultante foram as seguintes:

1. Uso do MPEG etanodiol-ativado com baixo peso molecular (≤ 5000 Da). Como resultado parâmetros farmacocinéticos do conjugado de PEG-IFN e IFN não
10 modificado apresentaram apenas uma ligeira diferença. Por conseguinte, um conjugado desse tipo não passou por testes clínicos;

2. Formação de um amplo número de isômeros posicionais com atividade específica diferente, devido à
15 conjugação de PEG com uma molécula IFN através de grupos amino livres de diferentes lisinas.

Existem conjugados PEG-IFN- α 2b conhecidos, obtidos por conjugação de IFN- α 2b nativo com derivados de MPEG lineares (patente RU 2311930, 2004) ou ramificados
20 (patente RU 2382048, 2008) com peso molecular de 13 000 - 17 000 Da. A reação foi conduzida com pH 9,5 por 60 horas (para o MPEG linear) ou com pH 7,5 por 12 horas (para o MPEG ramificado), utilizando excesso molar de 50-100 vezes de PEG ativado. Foram assim obtidos conjugados de PEG-IFN,
25 sendo que a atividade antiviral total destes variou de 29 a 38% da atividade de IFN não modificado. Não foram apresentados dados sobre estabilidade de conjugado, o número de isômeros posicionais e sua atividade antiviral específica. As desvantagens desses conjugados são as
30 seguintes:

1. Uso de derivados de tresilato - de MPEG ativado com um período de meia-vida em soluções inferior a 20 minutos. Foi mostrado anteriormente que na interação de derivados de PEG com proteínas, formaram-se também

ligações sulfamato instáveis, além das ligações amida estáveis, através de grupos amino (Gais & Ruppert, 1995);

2. A ligação de PEG tresilato-ativado com proteínas é feita através de todos os grupos amino livres de lisina, estericamente acessíveis (Roberts et al., 2002), que leva à formação de diversos isômeros posicionais;

3. Ao conduzir a reação de PEGuilação de IFN com valores elevados de pH (pH = 10) por um longo período (60 horas) a estrutura IFN pode mudar;

4. Um excesso significativo de PEG ativado durante a reação de PEGuilação de IFN (razão molar de PEG / proteína foi de 50-100/1) provoca o custo elevado do produto obtido;

Existe um conjugado PEG-IFN- α 2b conhecido obtido por conjugação de IFN- α 2b native com derivados de MPEG de triazina ramificados com peso molecular de 7500 - 35 000 Da (Patente RU 2298560, 2004), a atividade antiviral total foi de 6,4% da atividade de IFN não modificado. Não constam dados sobre estabilidade de conjugação, o número de isômeros posicionais e sua atividade antiviral específica.

As desvantagens do conjugado obtido são as seguintes:

1. O uso de derivados de triazina-cloreto de MPEG ativado, que são capazes de conjugar com grupos funcionais de outros aminoácidos - serina, tirosina, treonina, e histidina, adicionalmente a grupos amino livres, que leva a emergência de muitos isômeros, alguns dos quais são caracterizados por uma ligação instável. Além disso, derivados de triazina não são comumente usados devido à sua elevada toxicidade (Veronese & Pasut, 2005);

2. Baixa atividade específica do conjugado PEG-IFN.

Existe um conjugado de PEG-IFN- α 2a, obtido por conjugação de IFN- α 2a com PEG ramificado com peso molecular 40 kDa (patente RU 2180595, 1997). Para a

conjugação foi usado um derivado de ester de N-hidroxisuccinimida de MPEG, que interage seletivamente com os grupos amino livres disponíveis de proteína para formar ligação amida estável. A reação foi conduzida com pH 9,4°C
5 durante 2 horas na razão de 3:1 de MPEG / proteína. A reação foi paralisada e conjugado obtido foi purificado pelo sorbente Fractogel EMD CM 650 (M). O rendimento do conjugado purificado foi de 40-45%. Neste caso, IFN-PEG consistiu de seis isômeros posicionais, cada qual
10 conjugado com uma molécula PEG por uma ligação estável através de grupos amino livres de lisinas - Lys31, Lys121, Lys 131, Lys 134, Lys 70 e Lys 83 (Vailon et al, 2001; Foser et al, 2003). Isômeros conjugados com PEG através de lisinas nas posições 31, 121, 131 e 134 formaram 94% do
15 conjugado total. A atividade do conjugado total que consiste de 6 isômeros posicionais foi de 1-7% do IFN- α 2a nativo (Bailon et al, 2001; Boulestin et al, 2006). Apesar da baixa atividade antiviral in vitro, este conjugado melhorou propriedades farmacocinéticas em comparação com
20 IFN não modificado (Silva et al., 2006, Boulestin et al, 2006) e está disponível no mercado sob o nome comercial "Pegasys" (produzido pela "Hoffmann-La Roche").

As desvantagens do conjugado obtido são as seguintes:

1. O uso de PEG ester de N-hidroxisuccinimida-
25 ativado leva à conjugação com todos os grupos amino estericamente acessíveis, fazendo com que o conjugado obtido seja uma mistura de 6 isômeros, somers, diferindo na atividade específica.

2. Baixa atividade viral do conjugado obtido in
30 vitro.

O objeto desta invenção é o conjugado PEG-IFN- α 2b descrito na patente US 5,951,974, 1999. Para a reação de PEGuilação foi usado um MPEG ativado por grupo carbonato de succinimida (SC-MPEG) com peso molecular de 5 000 a 12

000 Da. De acordo com o método descrito obteve-se um conjugado IFN com PEG com massa molecular de 12 kDa, que se encontra normalmente no mercado para o tratamento de hepatite viral sob o nome comercial de "PegIntron" ("Schering-Plough", USA).

Verificou-se que este conjugado PEG-IFN- α 2b (medicamento "PegIntron") consiste de 13 isômeros posicionais, cada qual contendo uma molécula PEG conjugada com várias partes da molécula de proteína (Wang et al. 2000; Grace et al., 2001; Youngster et al, 2002). Mostrou-se que a molécula de PEG foi conjugada com interferon não apenas através de amino lisinas livres (Lys31, Lys 49, Lys 83, Lys 121, Lys 131, Lys 133, Lys 134 e Lys 164) e (Cys1), mas também através de anel imidazol de histidina (His7, His34), grupo OH tirosina (Tyr129) e serina (Ser163). O teor de isômeros individuais variou de 0,8 (Tyr129) a 47 % (His34). Atividade antiviral de PegIntron que consiste de 13 isômeros posicionais é 28 % da proteína nativa. A atividade específica de isômeros individuais variou de 11 a 37 % do IFN- α 2b nativo (Youngster et al, 2002). O principal isômero conjugado com PEG através de His34 apresenta a atividade específica mais elevada (37 % da proteína nativa). O grupo amino livre de IFN foi conjugado com PEG através de uma ligação estável, enquanto no isômero principal, que compreende aproximadamente 47%, o PEG foi conjugado com o anel imidazol de histidina (His34) através da ligação carbamato instável (em soluções aquosas) (Roberts et al., 2002).

Parâmetros farmacocinéticos do conjugado eram melhores do que de IFN não modificado (Silva et al., 2006).

As desvantagens do conjugado obtido são as seguintes:

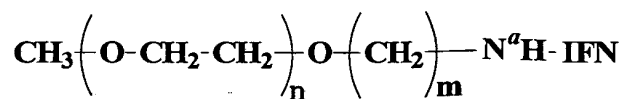
1. O uso de PEG carbonato de succinimida ativado que conjuga não apenas os grupos amino livres de IFN, mas

também os grupos funcionais dos outros aminoácidos. Conseqüentemente, o conjugado obtido consistia de uma mistura de 13 isômeros posicionais, diferindo na atividade específica antiviral;

5 2. Formação de uma ligação imidazol-carbonato instável (carbamato) no isomer principal (His-34) do conjugado PEG-IFN faz com que após administração de "Pegintron" o conjugado seja hidrolizado com liberação do IFN nativo, que exerce seu efeito biológico. Desse modo, o
10 fármaco "PegIntron" é melhor concebido como um pró-fármaco que após a injeção é hidrolizado com a formação de interferon ativo (Foster, 2004). Devido à instabilidade do conjugado PEG-IFN em solução a forma de dosagem do "PegIntron" é armazenada apenas na forma de pó
15 hidrolizado.

O objeto da presente invenção é obter um novo IFN PEGuilado estável com a atividade de IFN- α , consistindo de um isômero posicional, com estabilidade melhorada, com imunogenicidade reduzida, parâmetros
20 farmacocinéticos melhorados, com a combinação ideal de peso molecular PEG e atividade antiviral do conjugado, adequado para uso médico assim como composições farmacêuticas com base nesse conjugado PEG-IFN.

O problema é solucionado pela criação de um novo
25 conjugado de PEG-IFN funcionalmente ativo com atividade interferon- α , no qual a molécula linear de PEG com massa molecular de 10 000 to 40 000 Da é ligada à molécula IFN- α através de uma ligação estável estritamente através de um grupo amino alfa de cisteína N-terminal resultando
30 em um composto com a seguinte fórmula (I):



(I)

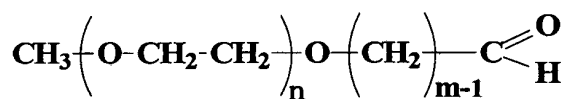
onde: n - valores integrais de 227 a 10 000;

m - número inteiro ≥ 4 ;

IFN - polipeptídeo natural ou recombinante que apresenta a atividade de IFN-alfa.

5... No conjugado obtido PEG linear com o peso molecular 10 000 - 40 000 Da é ligado ao grupo amino alfa do aminoácido N-terminal de IFNa.

Seletividade de modificação IFN estritamente via
10 grupo alfa-amino de aminoácido N-terminal foi atingida pelo uso de MPEGs aldeído-ativados da fórmula geral (II) através da reação de PEGuilação com $\text{pH} \leq 6$:



(II)

15

onde: n - valores integrais de 227 a 10 000, de forma que a massa molecular de PEG é aproximadamente de 10 000 - 40 000 Da;

m - numero inteiro ≥ 4 ;

20

A razão ideal de peso molecular de PEG e atividade antiviral é obtida pelo uso de MPEG (II) ativado com valor de $m \geq 4$.

25

Redução de imunogenicidade e toxicidade assim como parâmetros farmacocinéticos melhorados são obtidos mediante o aumento de peso molecular do PEG conjugado.

Novas características em comparação com o protótipo são:

Em comparação com o estado da técnica a novidade é a seguinte:

30

1. Derivados de aldeído de mPEGs ativados foram usados para a produção de conjugado de PEG-IFN;

2. Fórmula estrutural de conjugado PEG-IFN consiste em uma novidade;

3. Conjugado PEG-IFN produzido é respectivamente representado por um isômero posicional apenas;

5 4. Uma ligação entre molécula PEG e molécula IFN é estável;

5. Massa molecular de conjugado PEG-IFN é aumentada devido ao tamanho da ligação PEG;

6. Parâmetros farmacocinéticos são melhorados.

10

Para a produção de conjugado PEG-IFN reivindicado foram utilizados um IFN- α 2b humano recombinante (produzido pelo ZAO "Biocad") e derivados de butir- ou pentaldeído de mPEG correspondente à fórmula (II) com massa molecular de
15 20 000 Da.

A reação de conjugação foi realizada com pH abaixo de 6,0 com um agente redutor a uma temperatura a ou inferior a 20 °C. A razão molar de PEG / proteína foi de 2,5-5 : 1. O controle de formação do conjugado de PEG-IFN
20 foi feito mediante o uso de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) em condições de redução e cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa (RP-HPLC). A purificação de monoPEG-IFN de produtos de reação que
25 incluiu IFN não modificado e formas indesejadas de PEG-IFN, contendo duas ou mais moléculas PEG por molécula de proteína, foi realizada por cromatografia em sorbentes de troca catiônica. A eluição de MonoPEG-IFN foi feita por gradiente de concentração de cloreto de sódio de 0,05 a
30 0,2 M em solução tampão com um pH inferior a 6. O produto monoPEG-IFN purificado foi dializado contra 10-50 mM de solução tampão com pH 4-5, sal de adição, ou polisacarídeos, ou alcoóis, ou polivinilpirrolidona, ou monosacarídeos, e amino açúcares, ou proteínas ou

aminoácidos e detergentes não iônicos e armazenado em frascos plásticos ou de vidro com superfície siliconizada na temperatura de 4 ± 2 °C.

Para caracterizar o produto obtido conjugado de monoPEG-IFN- α 2b foram realizados estudos sobre sua pureza, 5 homogeneidade, características físico-químicas, biológicas e farmacocinéticas em comparação com IFN não modificado.

A invenção proposta foi ilustrada pelas seguintes figuras:

10 A Fig. 1. Cinética de formação de conjugado de PEG-IFN- α 2b durante a reação com derivado de butiraldeído MPEG.

A Fig. 2. Análise por HPLC em fase reversa de conjugado de PEG-IFN- α 2b purificado em coluna "Simetria 15 C18" (4,6 x 150 mm).

A Fig. 3. Análise SDS-PAGE do conjugado PEG-IFN- α 2b purificado comparado a IFN- α 2b não modificado.

A Fig. 4. Análise MALDI-MS de IFN- α 2b não modificado e conjugado de PEG-IFN- α 2b.

20 A Fig. 5. Localização de sítio de ligação PEG no conjugado de PEG-IFN- α 2b. Comparação de espectros de massa de peptídeos tripticos de IFN- α 2b (A) não modificado e conjugado de PEG-IFN- α 2b (B) na faixa m / z 1200-1400.

A Fig. 6. Estabilidade térmica do conjugado PEG-IFN- 25 α 2b e IFN- α 2b não modificado.

A Fig. 7. Estabilidade proteolítica do conjugado PEG-IFN- α 2b e IFN- α 2b não modificado.

A Fig. 8. A imunogenicidade do conjugado de PEG-IFN- α 2b comparada com IFN- α 2b não modificado.

30 A Fig. 9. Farmacocinética do conjugado PEG-IFN- α 2b comparado com IFN- α 2b não modificado.

Exemplos de métodos de produção de PEG-IFN- α 2b específicos e resultados do estudo de suas propriedades seguem abaixo.

Os conjugados de PEG-IFN- α 2 da fórmula (I), que são
-5 objeto da presente invenção podem ser usados para produzir remédios para prevenir e/ou tratar doenças virais, pois além de elevada estabilidade e imunogenicidade reduzida, eles apresentam elevada atividade antiviral. Também, composições farmacêuticas contendo como substância ativa
10 uma quantidade efetiva de conjugado da formula (I) produzido por métodos farmacêuticos bem conhecidos, podem ser separadamente usadas ou em conjunção com outros agentes terapêuticos (p.ex., ribavirina) para a prevenção e/ou tratamento de infecções virais (p.ex. hepatite ativa
15 crônica (particularmente hepatite B e C) (Jay et al, 2006; McHutchison et al, 2009). O objeto da presente invenção também é uma via para prevenir e/ou tratar doenças virais tais como hepatite C e hepatite B, incluindo a introdução de uma quantidade terapêuticamente eficaz do conjugado
20 reivindicado da fórmula (I).

É conhecido o fato de IFN- α e interferon- α PEGuilado poderem ser usados como agentes imunomoduladores para o tratamento de câncer, particularmente, reticuloendoteliose leucêmica papilomatose laríngea,
25 melanoma, carcinoma celular renal, leucemia mielóide, sarcoma de Kaposi (Decatris et al, 2002; Bukowski et al. , 2002; Quintas-Cardama et al., 2006; Loquai et al., 2008; Kaehler et al, 2010). Com base na patogênese bem conhecida dessas doenças e na experiência de IFN- α assim como no uso
30 de conjugados para o tratamento dessas doenças, os objetos da presente invenção também são remédios e composições farmacêuticas contendo o conjugado declarado PEG-IFN- α em uma quantidade eficaz, com efeitos antiproliferativos e imunomodulatórios, que podem ser usados para prevenir e/ou

tratar câncer e doenças associadas à imunodeficiência primária ou secundária, assim como o objeto da presente invenção é um método para prevenção e/ou tratamento de câncer e doenças associadas à imunodeficiência primária e secundária, incluindo a introdução de quantidade terapêuticamente eficaz de conjugado de PEG-IFN- α da fórmula (I).

Conjugado da fórmula (I) com uma carga opcionalmente farmacologicamente aceitável, diluentes e/ou excipientes farmacologicamente aceitáveis é administrado por via intravenosa, subcutânea, intramuscular ou por qualquer outra via adequada, por exemplo, na forma de cápsulas, xaropes, sprays, gotas, injeções e supositórios. A via de administração varia, por exemplo, em função de sintomas e da faixa etária. A frequência de administração e o intervalo entre as injeções variam em função da doença e de sua gravidade ou do objetivo de administração (uso terapêutico ou profilático). Uma quantidade eficaz de PEG-IFN α é selecionada de acordo com os fatores acima referidos.

Excipientes farmacologicamente aceitáveis podem ser incluídos em uma composição farmacêutica com PEG-IFN- α : sais tampão (p.ex. tampões acetato, citrato, hidrogenocarbonato, fosfato), estabilizadores (p.ex., polisorbato, EDTA, polivinil pirrolidona, dextranos, albumina de soro humano, éteres, ácido paraoxibenzóico, alcoóis (p.ex. álcool benzílico), fenóis, ácido sórbico), componentes antissépticos (p.ex., álcool benzílico), um regulador de pressão osmótica (por exemplo, cloreto de sódio, cloreto de potássio, polióis, por exemplo glicerina, arabitol, sorbitol, manitol, lactose, dextrano), surfactantes (p.ex., HSA, polivinilpirrolidona, lecitina, polisorbato 80, copolímero de polioxietileno-polioxipropileno, caseína), substâncias superfície-ativas

(p.ex, copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno, e óxido de etileno, monolaurato de sorbitan, Ester de sorbitol, Ester de poliglicerol de ácido graxo, lauril sulfato de cocamida DEA, alcanolamida, estearil polioxietileno propileno glicol, éter láurico de polioxietileno, polioxietileno cetil eter, polisorbato, monoestearato de glicerina, distearato de glicerina, monopalmitato de sorbitol, polioxietileno monooleato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, monoestearato de polioxietileno e propileno glicol), antioxidantes (p.ex, Trilon B, L-cisteína, sulfito de sódio, ascorbato de sódio, glutathione, 2-mercaptoetanol, ditioneitol, hidrocloreto de cisteína, monohidrato, ácido ascórbico) e diluentes (p.ex, água).

15

Exemplo 1

Produção de conjugado de PEG-IFN- α 2b utilizando-se derivado de butiraldeído MPEG

16 ml de solução de cianoborohidreto de sódio 1M foram adicionados a 785 ml de solução tampão (100 mM de acetato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, pH 5,0), contendo IFN- α 2 recombinante com a concentração de 1,7 mg por ml, em seguida foi adicionada a solução foi agitada e 5 g de derivado de butiraldeído PEG seco com peso molecular de 20 000 Dalton. A mistura foi bem agitada e incubada por 22 horas sob a temperatura de 17 \pm 3 °C. 50 μ l de alíquotas foram retiradas como amostra da mistura após diferentes intervalos de tempo, e a cinética de produção do conjugado de PEG-IFN- α 2 analisada utilizando-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato. Para tanto, foi adicionado tampão com pH 6,8 na quantidade de 1/3 do volume total, contendo 125 mM de Tris-HCl, 20% de glicerina, 3% de dodecilsulfato, 0,005% de azul de bromfenol à mistura e

aquecido por 3 minutos em um banho Maria fervente. Amostras de 5 µl foram colocadas em cavidades de placas de gel de poliacrilamida a 12,5% preparadas, em seguida a eletroforese foi feita na presença de dodecilsulfato. Após
5 completar a eletroforese, o gel foi pigmentado com Coomassie R-250. A cinética de produção do conjugado de PEG-IFN-α2 está representada na Fig. 1. No ponto em que o teor de PEG-IFN foi superior a 70%, a mistura de reação foi diluída 10 vezes com 5 mM de tampão acetato de sódio,
10 pH 5,0.

Exemplo 2

Produção de conjugado de PEG-IFN-α2b com uso de derivado de pentaldeído MPEG

15 2,05 ml de solução de cianoborohidreto de sódio 1M foram adicionados a 100 ml de solução tampão (100 mM acetato de sódio, 150 mM de cloreto de sódio, pH 5,5), contendo IFN-α2b recombinante com a concentração de 2,2 mg por ml, sendo em seguida agitado; foi adicionado 0,9 g de
20 derivado de pentaldeído PEG seco com peso molecular de 20 000 Dalton. A mistura foi bem agitada e incubada por 24 horas na temperatura de 6±2 °C. 50 µl de alíquotas foram retiradas como amostra da mistura após diferentes intervalos de tempo, e a cinética de produção do conjugado
25 de PEG-IFN foi analisada mediante o uso do método de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no exemplo 1. No ponto em que o teor de PEG-IFN foi superior a 70%, a mistura de reação foi diluída 10 vezes com 5 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0.

30

Exemplo 3

Purificação do conjugado monoPEG-IFN-α2b por cromatografia de troca iônica em um adsorvente de troca catiônica

A solução diluída produzida no exemplo 1 foi colocada

em uma coluna com um adsorvente de troca catiônica (CM sefarose, 300 ml), equilibrada com 5 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0, (tampão A) na taxa de 5 ml por minuto. A coluna de adsorvente foi lavada com tampão A, sendo que o
5 tampão A contém gradiente de concentração de NaCl de 0,05 a 0,2 M. Alíquotas foram retiradas como amostra de cada fração para fins de análise de amostra utilizando-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no exemplo 1. As frações que continham o conjugado
10 PEG-IFN- α 2 monoPEGuilado foram combinadas, dializadas com 10 volumes de 20 mM de tampão acetato de sódio, contendo 150 mM de cloreto de sódio, em seguida foi feita filtração estéril e a solução resultante foi armazenada sob 4 ± 2 °C.

15 Exemplo 4

Purificação do conjugado de monoPEG-IFN- α 2b por cromatografia de troca iônica em um adsorvente de troca catiônica

A solução diluída produzida no exemplo 2 foi colocada
20 em uma coluna com um adsorvente de troca catiônica (SP sefarose, 50 ml), equilibrada com 5 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0, (tampão A) na taxa de 5 ml por minuto. A coluna de adsorvente foi lavada em seguida com tampão A, sendo que o tampão A contém gradiente de concentração NaCl
25 de 0,03 a 0,3 M. Alíquotas foram retiradas como amostra de cada fração para fins de análise de amostra utilizando-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no exemplo 1. As frações que continham o conjugado
30 PEG-IFN- α 2 monoPEGuilado foram combinadas, dializadas com 10 volumes de 20 mM de tampão acetato de sódio, contendo 150 mM de cloreto de sódio, em seguida foi feita a filtração estéril e a solução resultante foi armazenada sob 4 ± 2 °C.

Exemplo 5**Análise HPLC de fase reversa de conjugado de PEG-IFN**

O conjugado de PEG-IFN- α 2 produzido no exemplo 3 foi diluído com 20 mM de tampão acetate de sódio, pH 5,0, abaixo da concentração de 0,1 mg por ml e 100 μ l desta amostra foram colocados na coluna C18 simetria (4,6x150 mm). O teste foi realizado em 214 nm utilizando-se cromatografia "Breeze" fabricada pela empresa Waters Company. Com base em resultados indicados na figura 2, podemos concluir que de acordo com os resultados de RP-HPLC, a pureza do conjugado PEG-IFN- α 2 reivindicado é superior a 99%.

Exemplo 6**15 Determinação do nível de endotoxina**

A concentração de endotoxinas bacterianas (BE) em amostras do conjugado de PEG-IFN- α 2 produzido de acordo com os exemplos 3 e 4 foi determinada in vitro por meio de um teste LAL (versão do método gel-clot) de acordo com as exigências da European Pharmacopoeia 6.0 artigo 2.6.14. Um kit de diagnóstico fabricado pela Associates of CAPE COD, Inc., reagente LAL com sensibilidade de 0,03 EU por ml, padrão de referência de endotoxina (0,5 μ g em um frasco) e água para o teste LAL foram usados no teste. Com base em resultados indicados na tabela 1, podemos concluir que o teor de BE na amostra de conjugado é inferior a 1,5 de unidades de endotoxina (EU) por mg de proteína, que é muito inferior ao nível de BE permitido para fármacos a base de proteínas recombinantes.

30

Tabela 1. Concentração de endotoxinas bacterianas no conjugado de PEG-IFN- α 2

Preparação de conjugado de PEG-IFN- α 2	Teor de endotoxina (EU por mg de proteína)
PEG-IFN- α 2 produzido de acordo com o exemplo 3	$\leq 1,5$
PEG-IFN- α 2 produzido de acordo com o exemplo 4	$\leq 1,4$

Exemplo 7

Análise eletroforética do conjugado de PEG-IFN- α 2b em comparação ao IFN - α 2b não modificado.

5 Uma amostra do conjugado de PEG-IFN produzido de acordo com o exemplo 3 foi analisado utilizando-se o método de eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito no exemplo 1. A eletroforese foi realizada com carga de 40 μ g de proteína por cavidade sob condições não redutoras. A

10 coloração de proteína no gel foi realizada com tinta R-250. Ao mesmo tempo, foi feita eletroforese de conjugado IFN- α 2 não modificado. O conjugado de PEG-IFN foi representado com uma fita (Fig. 3, trilha 1). Com base em eletroforegramas do conjugado PEG-IFN- α 2 e de IFN- α 2 não modificado,

15 conforme indicado na Fig. 3, podemos observar que o conjugado PEG-IFN- α apresenta um peso molecular superior ao do IFN- α não modificado (Fig. 3, trilhas 1 e 2). Pode-se perceber que é impossível determinar o peso molecular exato de proteínas

20 PEGuiladas utilizando-se o método de eletroforese, quando adição da molécula PEG hidrofílica à proteína aumenta consideravelmente o raio Stokes do composto resultante. Como resultado, o movimento do composto de proteína PEG no gel desacelerou, e seu peso molecular pareceu ser consideravelmente superior à soma de

25 pesos moleculares da proteína e do PEG.

Exemplo 8***Determinação de peso molecular do conjugado de PEG-IFN- α 2b em comparação ao IFN - α 2b não modificado utilizando-se o método de espectrometria de massa***

5 1 μ l de amostra do conjugado de PEG-IFN- α 2b produzido de acordo com o exemplo 3, e 0,3 μ l de solução do ácido 2,5-dihidroxibenzóico (Aldrich, 10 mg \times ml⁻¹ em 20 % de acetonitrila em água com 0,5 % tetrafluoreto de urânio) foram misturados juntos e secados a ar. Uma amostra de
10 IFN- α 2 não modificado foi preparada utilizando-se um método similar.

Os espectros de massa foram obtidos no espectrômetro de massa Ultraflex II BRUKER (Alemanha) MALDI-TOF equipado com um laser UV (Nd). Os espectros de massa foram obtidos
15 no modo de ion positivo linear; os erros de medição de peso médio não excederam a 10-15 Dalton.

Os resultados da análise espectrométrica de massa de rhIFN- α 2 não modificado e do conjugado de PEG-IFN- α 2 na faixa m/z de 10 000 a 50 000 aparecem indicados na Fig.
20 4. Com base em resultados apresentados na Fig. 4A podemos concluir que o espectro de massa de rhIFN- α 2 contém um pico de base correspondente ao [M]⁺ íon monovalente com peso molecular de 19 295 Dalton.

No espectro de massa do conjugado PEG-IFN- α 2 conforme
25 mostrado na Fig. 4B, verifica-se um pico principal difuso correspondente ao [M]⁺ íon monovalente com seu peso molecular de 40 498 Dalton. A difusão do pico é provocada pela heterogeneidade de preparações de monometoxiPEG. O valor m/z medido para o conjugado de PEG-IFN no pico máximo
30 (40 498 Dalton) coincide com a soma calculada de pesos moleculares de IFN- α 2 (19 295 Dalton) e o PEG (20 000 Dalton) adicionado.

Exemplo 9**Localização do sítio de PEGuilação no conjugado de PEG-IFN- α 2b**

5 μ l de solução de tripsina modificada (Promega) em
0,05 M NH_4HCO_3 com concentração de $15 \mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ foram
adicionados a 5μ l da amostra de conjugado de PEG-IFN
produzida de acordo com o exemplo 3. Decomposição
hidrolítica foi feita por 16 hs sob 37°C , em seguida 10μ l
de solução de 0,5 % de tetrafluoreto de urânio em 10 % de
10 solução de acetonitrila em água foram adicionados e
intensamente agitados. Uma amostra de IFN não modificada
IFN foi preparada utilizando-se um método similar.
Soluções resultantes foram usadas para obter espectros de
massa MALDI.

15 A localização do sítio de ligação PEG com a molécula
IFN foi determinada mediante comparação de espectros de
massa do conjugado PEG-IFN- α 2 e IFN- α 2 não modificado após
digestão triptica. Digestão triptica de conjugado de PEG-
IFN- α 2 carece do peptídeo correspondente à parte da
20 proteína, na ocorreu modificação. Na tabela 2 podemos
observar espectros de massa de digestões tripticas
experimentais do IFN- α não modificado e do conjugado PEG-
IFN- α 2. Com base em resultados indicados na tabela podemos
concluir que espectros de massa de digestões tripticas do
25 IFN- α 2b não modificado virtualmente coincidem com
espectros de massa de digestões tripticas do conjugado PEG-
IFN- α 2 (tabela 2), porém a digestão triptica do conjugado
PEG-IFN- α 2 necessita do peptídeo com o peso molecular de
1313.649, que está presente na digestão triptica do IFN- α 2
30 não modificado (vide também Fig. 5). De acordo com a
análise de pesos teóricos da digestão triptica IFN- α 2, o
pico com m/z 1313,649 corresponde a um peptídeo de proteína
N-terminal (tabela 2). Sua ausência na digestão triptica do

conjugado de PEG-IFN- α 2 testifica a modificação do peptídeo N-terminal, que, ao tornar-se mais pesado pelo peso do PEG, cai para fora da área do espectro. A ligação PEG à molécula IFN ocorreu no grupo amino somente livre presente neste peptídeo, o grupo amino cisteína N-terminal.

Tabela 2. Espectros de massa experimentais de digestões tripticas do conjugado PEG-IFN-2 e do IFN-2 não modificado conforme comparação com valores teóricos.

<i>Peptídeos observados experimentalmente $[M+H]^+$</i>		<i>Peptídeos teóricos</i>		
IFN-α2b	Conjugado PEG-	Massa	Peptíde	Sequência
1313,649	--	1313,6266	1-12	CDLPQTHSLGSR
1232,720	1232,673	1232,6966	13-22	RTLMLLAQMR
1076,598	1076,558	1076,5955	14-22	TLMLLAQMR
910,463	910,463	910,5066	24-31	ISLFSCLK
2225,976	2225,928	2225,9999	32-49	DRHDFGFPQEEFGNQ
2459,264	2459,239	2459,3002	50-70	AETIPVLHEMIQQIF
772,447	772,421	772,456	99-106	VIQGVGVT
902,471	902,443	902,4941	113-	EDSILAVR
1030,590	1030,546	1030,5891	113-	EDSILAVRK
741,431	741,424	741,4042	121-	KYFQR
750,492	750,476	750,4760	126-	ITLYLK
1337,695	1337,651	1337,6670	134-	KYSPCAWEVVR
1209,565	1209,539	1209,5721	135-	YSPCAWEVVR
1481,783	1481,735	1481,7594	150-	SFSLSTNLQESLR

10

Exemplo 10

Determinação da atividade antiviral específica do conjugado PEG-IFN- α 2b

As amostras produzidas de acordo com o exemplo 3 e exemplo 4 foram testadas para atividade antiviral específica de acordo com o processo descrito na European Pharmacopoeia utilizando-se uma cultura de células MBDK transferidas sensíveis para interferon tipo - alfa e uma cultura de vírus de estomatite vesicular (VSV). Tabela 3 apresenta os resultados do estudo da atividade antiviral.

20

Padrão de referência internacional foi usado como o nível de referência. Partindo da tabela 3, podemos concluir que apesar da conjugação com a molécula PEG com peso molecular de 20 000 Dalton, a atividade antiviral dos conjugados produzidos foi de 42-45% da atividade do IFN- α 2 não modificado. É necessário notar que os conjugados PEG-IFN descritos no método protótipo, contendo PEG com peso molecular de 12 000 Dalton, apresentou atividade inferior (28-30%).

- 10 **Tabela 3.** Atividade antiviral específica do conjugado PEG-IFN- α 2 conforme comparada com IFN- α 2 não modificado.

Preparação	Atividade antiviral específica	
	(IU por mg)	% da atividade de IFN- α 2b não
IFN- α 2	$2,1 \times 10^8$	100 %
Conjugado PEG-IFN- α 2 produzido de acordo com	$0,7 \times 10^8$	40%
Conjugado PEG-IFN- α 2 produzido de acordo com	$0,9 \times 10^8$	45%

Exemplo 11.

- 15 **Estudo da estabilidade térmica do conjugado PEG-IFN- α 2b**

5 ml da amostra do conjugado PEG-IFN produzida de acordo com o exemplo 3 foram colocados em um banho maria na temperatura de (50 ± 2) °C, e testada ocorrência de turbididade na solução de proteína após diferentes intervalos de tempo, com medição da densidade óptica em 340 nm. Estudo de estabilidade térmica de IFN- α 2 não modificado foi realizado de maneira similar. A criação de compostos de proteína levou a ocorrência de turbididade e ao aumento de densidade óptica em 340 nm. Resultados do estudo são mostrados na Fig. 6. Durante o período de observação (28 horas) o conjugado PEG-IFN- α 2 permaneceu estável, enquanto

IFN- α 2b não modificado precipitou quase que completamente após 28 hs.

Desse modo, as informações obtidas neste estudo permitem concluir a ocorrência de um aumento substancial da estabilidade térmica do conjugado PEG-IFN- α 2 em comparação com a proteína não modificada.

Exemplo 12

Estudo da estabilidade proteolítica do conjugado de PEG-IFN- α 2b quando tratado com tripsina

150 μ l de tampão M Tris-HCl, pH 8,5, 2 μ l de solução 0,5 M CaCl₂ e 15 μ l de tripsina (Promega) com concentração de 20 μ g por ml foram adicionados a 1 ml do conjugado PEG-IFN produzido de acordo com o exemplo 3. As amostras foram incubadas na temperatura de 37°C. 100 μ l de aliquotas foram retiradas para amostra da mistura após diferentes intervalos de tempo, e 150 μ l de solução de ácido trifluoroacético foram adicionados para parar a reação. Amostras contendo IFN- α 2 não modificado foram preparadas utilizando-se um método similar. Por conseguinte, as amostras foram analisadas com HPLC de fase reversa com determinação da área do pico principal. Os resultados do estudo conforme apresentados na figura 7, demonstram que no caso de tratamento com tripsina a estabilidade proteolítica do conjugado PEG-IFN- α 2 é superior àquela do IFN- α 2b não modificado.

Exemplo 13

Determinação da estabilidade do conjugado PEG-IFN- α 2b durante a armazenagem

Aliquotas foram tiradas de amostras produzidas de acordo com o exemplo 3 em tubos de teste Eppendorf estéreis com tampas. A concentração de proteína no conjugado de PEG-

IFN- α 2 foi de 1 mg por ml. As amostras foram colocadas em um refrigerador na temperatura de $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Amostras foram tiradas após intervalos de tempo pré-definidos e analisadas quanto à atividade antiviral específica e homogeneidade da preparação por meio de RP-HPLC e eletroforese (Eph) em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato em condições não redutoras conforme descrito no exemplo 1. Com base em resultados mostrados na tabela 4 podemos concluir durante a armazenagem na temperatura de $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$ o conjugado PEG-IFN- α 2 ficou estável por pelo menos 24 meses.

Tabela 4. Estabilidade do conjugado EG-IFN- α 2 na temperatura de $(6 \pm 2) ^\circ\text{C}$

Parâmetros	Vida útil em armazenamento (meses)						
	0	3	6	9	12	18	24
Atividade (IU por ml)	$0,7 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$	$0,72 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$	$0,75 \times 10^8$
Homogeneidade, % (RP-HPLC)	99,67	99,28	99,61	99,30	99,6	99,21	99,35
Homogeneidade, % (SDS-PAGE)	≥ 98	≥ 98	≥ 98	≥ 98	≥ 98	≥ 98	≥ 98

15 Exemplo 14

Estudo da imunogenicidade do conjugado de PEG-IFN- α 2b

Conjugados de PEG-IFN produzidos de acordo com o exemplo 3 e exemplo 4 foram diluídos até a concentração de 5 mln. IU por ml e injetado via intramuscular na dose de 200 μ l (1 mln IU por um rato) em camundongos ICR com peso corporal de 20-22 g uma vez por semana durante 5 semanas (5 grupos com 5 camundongos em cada grupo). Ao mesmo tempo, amostras de IFN não modificado foram preparadas de modo similar e injetadas em camundongos na dose de 1 mln. IU. No

final da quinta semana foram feitos exames de sangue dos camundongos por meio de paracentese retroorbital. Obteve-se soro sanguíneo utilizando-se o método padrão. Título de anticorpo em soros obtidos após imunização de camundongos com IFN não modificado e conjugados de PEG-IFN foi determinado por meio da técnica ELISA direta. Para tanto, 100 μ l da solução de IFN- α 2 não modificado com concentração de 200 ng por 100 μ l foram colocados em cavidades de microplacas. Os antisoros obtidos de diferentes grupos de animais foram colocados nas cavidades da placa em séries de diluições consecutivas em duplicatas. Para detecção do complexo imune resultante, foram usados anticorpos humanos antianticorpos de camundongos conjugados com peroxidase. Título de anticorpo após administração de IFN não modificado foi de 1/1024. Título de anticorpo após administração d conjugados de PEG-IFN foi de 1/128. Resultados do estudo constam na figura 8.

Desse modo, com base nos resultados obtidos, podemos concluir que a imunogenicidade dos conjugados PEG-IFN- α 2 reivindicados é 8 vezes inferior à do IFN não modificado.

Exemplo 15

Estudo da farmacocinética do conjugado de PEG-IFN- α 2b

Uma amostra do conjugado de PEG-IFN produzido de acordo com o exemplo 3 na quantidade de 1 mln IU foi injetado por via intraperitoneal em camundongos macho. Ao mesmo tempo, IFN- α 2 não modificado foi injetado em outro grupo de camundongos. Amostras de sangue foram tiradas de animais após intervalos de tempo pré-determinados por meio de paracentese etroorbital. Soro sanguíneo foi obtido utilizando-se o método padrão. A presença de interferon no soro foi detectada com base na atividade antiviral. Resultados do estudo farmacocinético são mostrados na Fig. 9. Com base nesses resultados concluímos que o conjugado

PEG-IFN- α 2 possui efeito significativamente prolongado. Após injeção de IFN- α 2 nativo, sua concentração no sangue dos animais atingiu um nível máximo após 1 hora da injeção, e em seguida diminuiu muito rapidamente. Após injeção do
5 conjugado de PEG-IFN a concentração de IFN máxima no sangue dos animais foi observada após 12 horas (Fig. 9), e este nível foi mantido por 50 horas, e somente então se verificou uma redução lenta na concentração de IFN- α 2 por 350 horas.

10 A área sob a curva (AUC) para o conjugado PEG-IFN reivindicado excedeu os respectivos valores para IFN não modificado em mais de 50 vezes. Surpreendentemente, no caso do conjugado de PEG-IFN- α 2b protótipo, acoplado a PEG com peso molecular de 12 000 Dalton, o valor da AUC excedeu o
15 IFN AUC em 3-10 vezes somente.

Com base nos resultados obtidos (Fig. 9) os parâmetros farmacocinéticos primários foram calculados para o conjugado de PEG-IFN- α 2 reivindicado. Os resultados revelaram que a partir do sítio de injeção, o volume de
20 distribuição, a depuração do conjugado de PEG-IFN desaceleraram consideravelmente em comparação com o IFN não modificado, que assegurou circulação prolongada do conjugado PEG-IFN no sangue (por 14 dias).

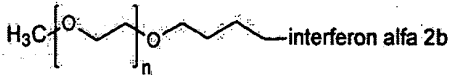
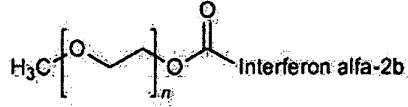
25 **Exemplo 16**

Características comparativas do conjugado de PEG-IFN- α 2b reivindicado em comparação com o conjugado de PEG-IFN- α 2b descrito no método protótipo

Foi realizada comparação da estrutura, parâmetros
30 básicos físicos, químicos e farmacocinéticos do conjugado de PEG-IFN- α 2b reivindicado, em relação ao conjugado PEG-IFN- α 2b descrito no método protótipo (tabela 5). Os dados representados na tabela 5 testificam o aumento

significativo das propriedades do conjugado de PEG-IFN em comparação com o conjugado descrito no método protótipo.

Tabela 5. Parâmetros básicos físicos, químicos e farmacocinéticos do conjugado de PEG-IFN- α 2b em comparação com o conjugado de PEG-IFN- α 2b descrito no método protótipo (patente US 5,951,974).

Parâmetros	Conjugado de PEG-IFN	
	Conjugado de PEG-IFN	Conjugado descrito no método protótipo (patente US 5,951,974)
IFN	IFN- α 2b	IFN- α 2b
Estrutura PEG	Linear	Linear
Peso molecular do PEG (kDalton)	20	12
Fórmula estrutural do conjugado PEG-IFN*		
Atividade específica, % de IFN native	40	28
Número de isômeros posicionais	1	13
Tipo de conexão PEG à proteína	Estável	instável (para o isômero principal ligado a PEG via His34)
Estabilidade em soluções de água	Estável	instável
Parâmetros farmacocinéticos		
Razão AUC	50	3-10
Razão PEG-IFN/IFN		

* - A fórmula estrutural do conjugado de PEG-IFN produzido utilizando-se o método protótipo é indicada sob a referência "WHO Drug Information", 2001, v. 15, N. 3-4, p.206.

Exemplo 17**Exemplos de composições farmacêuticas com base no conjugado de PEG-IFN- α 2b reivindicado**

5 A)

PEG-IFN- α 2b em de acordo com o exemplo 3	10-500 μ g
acetato de sódio trihidrato	1 - 5 mg
Ácido acetic glacial	até pH 5,0
Cloreto de sódio	8 -9 mg
Polisorbato 80	0,01-0,1 mg
Etilenodiamina tetraacetato sal dissódico	0,01- 0,1 mg
Água para injeção	1,0 ml

(B)

PEG-IFN- α 2b em de acordo com o exemplo 4	10-500 μ g
Acetato de sódio	0,4 - 2,0 mg
Ácido acetic	up to pH 5,5
Manitol	50 mg
Dextrano	15-30 mg
Polisorbato 80	0,01-0,1 mg
Etilenodiamina tetraacetato sal dissódico	0,01- 0,1
Água para injeção	1,0 ml

(C)

PEG-IFN- α 2b em de acordo com o exemplo 4	10-500 μ g
Acetato de sódio	0,4 - 2,0 mg
Ácido acetic	até pH 5,5
Manitol	50 mg

Albumina de soro humano	10-12,5 mg
Polisorbato 80	0,01-0,1 mg
Etilenodiamina tetraacetato	0,01- 0,1
sal dissódico	
Água para injeção	1,0 ml

Exemplo 18**Containerização de um agente medicinal contendo PEG-IFN- α 2b**

5 Um agente medicinal contendo uma quantidade eficaz do conjugado PEG-IFN- α 2b reivindicado (exemplo 17) a ser inserido em condições estéreis em seringas de vidro neutro da 1ª classe hidrolítica com agulhas soldadas revestidas com capas elásticas ou protetoras rígidas, lacradas com bicos em êmbolos de borracha butílica com um fluorpolímero com o volume de 0,5, 0,8, 1,0 e 1,2 ml (para 100 μ g por ml dosagem), 0,5, 0,6, 0,75 e 0,9 ml (para 200 μ g por ml dosagem), 0,5, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 ml (para 300 μ g por ml dosagem).

15

Exemplo 19**Containerização de um agente medicinal contendo PEG-IFN- α 2b**

20 Um agente medicinal contendo uma quantidade eficaz de PEG- interferon alfa-2b (Exemplo 17) a ser inserido em condições estéreis em frascos de vidro neutro da classe 1ª classe hidrolítica vedados com borracha fluórica ou lacrados com bicos em tampas de borracha butílica com revestimento em teflon fechados com tampas em alumínio com o volume de 0,5, 0,8, 1,0 e 1,2 ml (para 100 μ g por ml dosagem), 0,5, 0,6, 0,75 e 0,9 ml (para 200 μ g por ml dosagem), 0,5, 0,6, 0,8, 1,0 e 1,2 ml (para 300 μ g por ml dosagem).

25

Exemplo 20**Um kit incluindo um agente medicinal containerizado contendo PEG-IFN- α 2b**

O kit contém 1 ou 4 seringas junto com êmbolos (1 ou 4 correspondentemente) /ou frascos em um blister feito de filme polimérico junto com a informação de prescrição, colocado em uma embalagem de papelão.

BIBLIOGRAFIA

- 10 Patent RU 2311930, 2004;
- Patent RU 2382048, 2008;
- Patent RU 2298560, 2004;
- 15 Patent RU2180595, 2005;
- Patent US 5,951,974, 1999;
- 20 Bailon P., Berthold W., (1998), "Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins", *Pharm., Sci. Technol. Today*, 1, 352-356.
- Bailon P., Palleroni A., Schaffer C.A., et al., (2001).
- 25 "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40-kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C". *Bioconjug. Chem.*;12:195-202.
- 30 Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N.D., Zoon K.C., (2004), "Human Interferons Alpha, Beta and Omega". *Growth Factors*, Vol. 22 (4), pp. 243-251

Boulestin A., Kamar N., Sandres-saune K, et al (2006)
 ".Pegylation of IFN- α and Antiviral Activity",
J. Interferon & Cytokine Res. 26:849-853

5 Bukowski R., Ernstoff M.S., Gore M.E., Nemunaitis J.J.,
 Amato R., Gupta S.K., Tendler C.L. (2002) ".Pegylated
 interferon alfa-2b treatment for patients with solid
 tumors: a phase I/II study", *Clin. Oncol.*,
 2002;20(18):3841-3849.

10 Caliceti P., Veronese F.M (2003), ".Pharmacokinetic and
 biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein
 conjugates", *Adv. Drug. Deliv. Rev.*;55(10):1261-77.

Chatelut E., Rostaing L., Gregoire N., Payen J.L., Pujol
 15 A., Izopet J., Houin G., Canal P.A. (1999) "Pharmacokinetic
 model for alpha interferon administered subcutaneously".
Br. J. Clin. Pharmacol.;47: 365-371.

Chevaliez S., Pawlotsky J.M., 2009, "Interferons and their
 20 use in persistent viral infections".
Handb. Exp. Pharmacol.; (189):203-41.

Decatris M., Santhanam S., O'Byrne K (2002). "Potential of
 interferon-alpha in solid tumours: part 1", *BioDrugs*.
 25 2002;16(4):261-81.

Delgado C., Francis D., Fisher G.E (1992) " The uses and
 properties of PEG-linked proteins", *Crit. Rev. Ther. Drug
 Carrier Syst*, 9 (1992) 249-304.

30

Foser S, Schacher A, Weyer KA, Brugger D, Dietel E, Marti
 S, Schreitmüller T. (2003), "Isolation, structural
 characterization, and antiviral activity of positional

isomers of monopegylated interferon alpha-2a (PEGASYS)."
Protein Expr. Purif., 30(1):78-87.

Foster G. R. (2004) "Pegylated interferons: chemical and
5 clinical differences". *Aliment Pharmacol. Ther.*; 20: 825-
830.

Gais H.J., S. Ruppert S. (1995), "Modification and
immobilization of proteins with polyethylene glycol
10 tresylates and polysaccharide tresylates: evidence
suggesting a revision of the coupling mechanism and the
structure of the polymer-polpolymer linkage". *Tetrahedron
Lett.* 36 , 3837-3838.

15 Glue P., Fang J.W., Rouzier-Panis R., et al. (2000)
"Pegylated interferon-alpha2b:
pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary
efficacy data". *Clin. Pharmacol. Ther.*; 68: 556-67.

20 Grace M., Youngster S., Gitlin G., et al. (2001)
"Structural and biologic characterization of pegylated
recombinant IFN-alpha2b". *J. Interferon Cytokine Res.*, 21:
1103-1115.

Grace, M. J., Lee, S., Bradshaw, S., Chapman, J., et al,
25 (2005) "Site of PEGylation and polyethylene glycol molecule
size attenuate interferon- α antiviral and antiproliferative
activities through the JAK/STAT signaling pathway", *J.
Biol. Chem.*, 280 6327-6336.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957), "Virus interference:
30 the interferon", *Proc. R. Soc. Med.*, 147: 258-267.

Jay H. et al., (2006) "Peginterferon and Ribavirin for
Chronic Hepatitis C", *The New England J. of medicine*, TOM
356, стр. 1269-1271, 2006;

- Kaehler K.C., Sondak V.K., Schadendorf D., Hauschild A. (2010), "Pegylated interferons: prospects for the use in the adjuvant and palliative therapy of metastatic melanoma", *Eur. J. Cancer*. 2010,46(1):41-6..
- 5 Lam N.P., Pitrak D., Speralakis R., Lau A.H, Wiley T.E., Layden T.J. (1997), "Effect of obesity on pharmacokinetics and biologic effect of interferon-alpha in hepatitis C", *Dig. Dis. Sci.*; 42(1):178-85.
- 10 Manns M.P., McHutchison J.G., Gordon S.C., et al. (2001) "Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial". *Lancet*, 358: 958-65.
- 15 Marcellin P. (2009) "Hepatitis B and hepatitis C in 2009", *Liver International*, 29(s1): 1-8
- 20 Monkarsh S.P., Ma Y., Aglione A., Bailon P., et al., (2007), "Positional Isomers of Monopegylated Interferon α -2a: Isolation, Characterization, and Biological Activity," *Analytical Biochemistry*, 247:434-440.
- 25 McHutchinson J., Gordon S.C., Schiff E.R. et al, (1998), "Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C" *N. Engl. J. Med.* Vol. 339, 21,1485-1492.
- 30 McHutchison J. et al., (2009) «Peginterferon Alfa-2b or Alfa-2a with Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Infection», *The New England J. of medicine*, том 361, стр. 580-593, 2009

Modi A.A., Liang T.J. (2008), "Hepatitis C: a clinical review", *Oral. Dis.*, v. 14(1):10-4

5 Pestka, S., Krause, C.D., Walter M.R (2004), "Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors", *Immunological Reviews*, 202: 8-32.

Pestka, S.(2007). "The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn", *J. Biol. Chem.*, 13;282(28):20047-51.

10

Pestka, S.(2007). "Purification and cloning of interferon alpha", *Curr Top Microbiol Immunol.*;316:23-37.

15 Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Giles F., Verstovsek S. (2006), "Pegylated interferon therapy for patients with Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative disorders". *Semin Thromb Hemost.*, 2006;32(4 Pt 2):409-16.

20 Reddy K.R., Wright T.L., Pockros P.J., Shiffman M., Everson G. et al, 2001, "Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon a-2a compared with interferon a-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C", *Hepatology*, 33, 433-438.

25 Roberts M.J., Bentley M.D., Harris J.M. (2002)" Chemistry for peptide and protein PEGylation". *Adv Drug Deliv Rev.*, 54(4):459-76

30 Silva M., Poo J., Wagner F. et al. (2006) "A randomised trial to compare pharmacokinetic, pharmacodynamic, and antiviral effects peginterferon alfa-2b and peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C (COMPARE)", *Journal Hepatology*, 45: 204-213.

Wang, Y.-S., Youngster S., Bausch J., Zhang R., McNemar C, Wyss D.F. (2000), "Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b" *Biochemistry*, 2000, 39(35):10634-10640.

5 Wills R.J. "Clinical Pharmacology of interferons". *Clin Pharmacokin.* 1990; 19:390-399.

Youngster S., Wang Y.S., Grace M., Bausch J., Bordens R., Wyss D.F. (2002). " Structure, biology, and therapeutic implications of pegylated interferon alpha-2b" *Curr Pharm*
10 *Des.*;8(24):2139-2157.

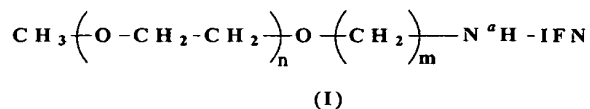
Zalipsky S (1995). "Functionalized poly(ethylene glycol) for preparation of biologically relevant conjugates"; *Bioconj. Chem.* 6, 150-165.

15

Zeuzem S., Heathcote J.E., Martin N., Nieforth K., Modi M. (2001), "Peginterferon alfa-2a (40 kDa) monotherapy: a novel agent for chronic hepatitis C therapy", *Expert Opin Investig Drugs*, 10(12):2201-2213.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado interferon alfa estável peguilado,
5 caracterizado pelo fato de ser um isômero posicional
simples, representado na fórmula (I):



onde:

n - números inteiros de 227 a 10 000;

10 m - número inteiro ≥ 4 ;

$\text{N}^\alpha \text{H}-\text{IFN}$ - interferon alfa.

2. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de $m = 4$.

3. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1,
15 caracterizado pelo fato de o interferon alfa ser
interferon alfa-2b natural ou recombinante.

4. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de o peso médio molecular de
polietileno glicol ser de 10 a 40 kDa.

20 5. Conjugado, de acordo com a reivindicação 1,
caracterizado pelo fato de o grupo N-terminal ser
representado por resíduos de cisteína (Cys).

6. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato
de apresentar atividade antiviral, antiproliferativa e
25 imunomodulatória, contendo conjugado da fórmula geral (I)
na quantidade eficaz e excipientes farmacêuticamente
aceitáveis.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a
reivindicação 6, caracterizada pelo fato de ser destinada
30 ao tratamento de doenças virais e oncológicas, e doenças
associadas à imunodeficiência primária e secundária.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a doença viral ser hepatite B ou hepatite C.

5 9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a doença oncológica ser mielóide.

10 10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de a doença oncológica ser melanoma.

11. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de conter conjugado da fórmula (I), que apresenta atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória.

15 12. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de conter tampão, agente isotonzante, agente estabilizante e água.

13. Formulação farmacêutica, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de conter acetato de sódio trihidrato, ácido acético, cloreto de sódio, polisorbato 80, EDTA, água para injeção.

20 14. Aplicação do conjugado da fórmula (I), caracterizada pelo fato de ser destinada à preparação de produto farmacêutico contendo atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória.

25 15. Aplicação, de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de ser destinada à preparação de produto farmacêutico contendo atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória contra hepatite B ou hepatite C.

30 16. Profilaxia e/ou tratamento de doenças virais, caracterizados pelo fato de serem feitos mediante introdução de quantidade terapêuticamente efetiva de conjugado da fórmula (I).

17. Profilaxia e/ou tratamento, de acordo com a reivindicação 16, caracterizados pelo fato de a doença viral ser hepatite B ou hepatite C.

5 18. Profilaxia e/ou tratamento, de acordo com a reivindicação 16, caracterizados pelo fato de serem feitos mediante introdução adicional de quantidade terapêuticamente efetiva de ribavirina.

10 19. Profilaxia e/ou tratamento de doenças associadas a estados de imunodeficiência primária ou secundária, caracterizados pelo fato de serem feitos mediante introdução de quantidade terapêuticamente efetiva de conjugado da fórmula (I).

15 20. Profilaxia e/ou tratamento de doenças oncológicas, caracterizados pelo fato de serem feitos mediante introdução de quantidade terapêuticamente efetiva de conjugado da fórmula (I).

21. Profilaxia e/ou tratamento, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de a doença oncológica ser mielóide.

20 22. Profilaxia e/ou tratamento, de acordo com a reivindicação 20, caracterizados pelo fato de a doença oncológica ser melanoma.

25 23. Recipiente, hermeticamente vedado em ambiente estéril e em armazenagem apropriada antes do uso, caracterizado pelo fato de conter a composição farmacêutica conforme definido na reivindicação 6.

24. Recipiente, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de este ser seringa previamente preenchida, frasco ou autoinjeter.

30 25. Jogo, caracterizado pelo fato de conter um recipiente conforme definido na reivindicação 24 e informação de prescrição.

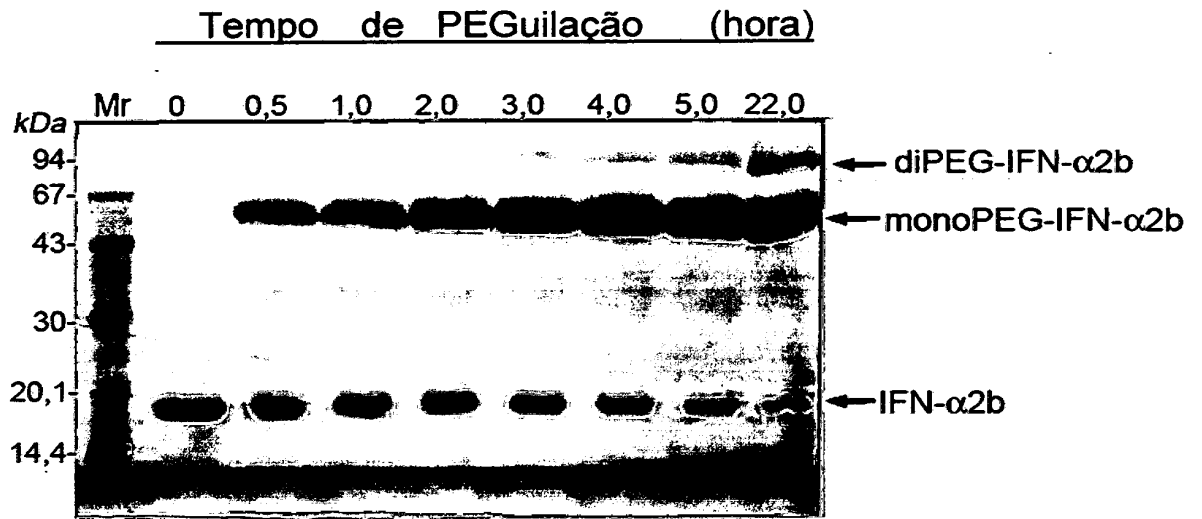
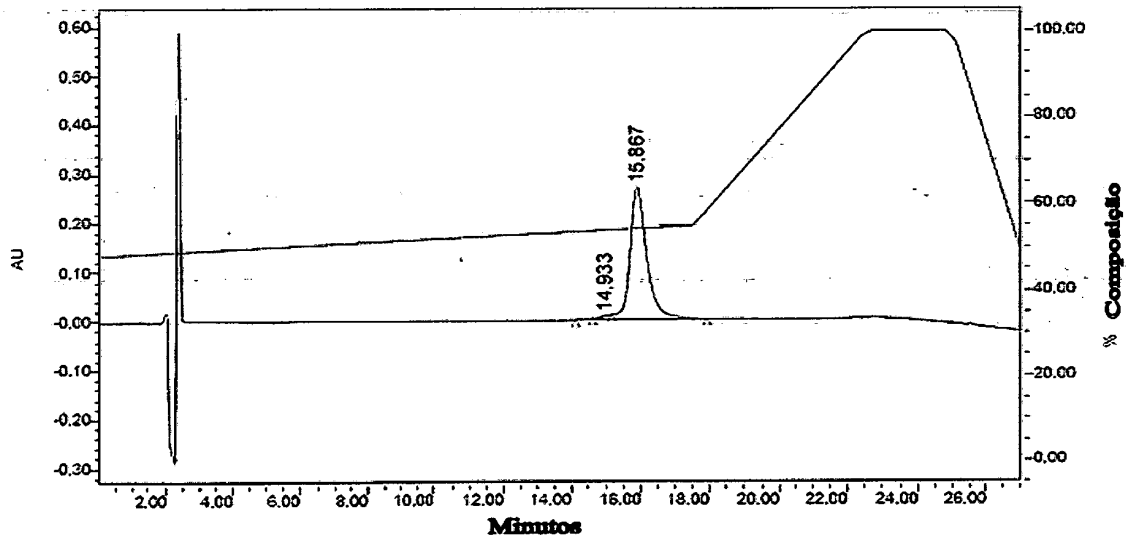


Fig. 1



	RT (min)	Area (V ² sec)	% Area	Peso (V)	% Peso
1	14,933	31174	0,33	1876	0,70
2	15,867	9433441	99,67	267135	99,30

Fig. 2



Fig. 3.

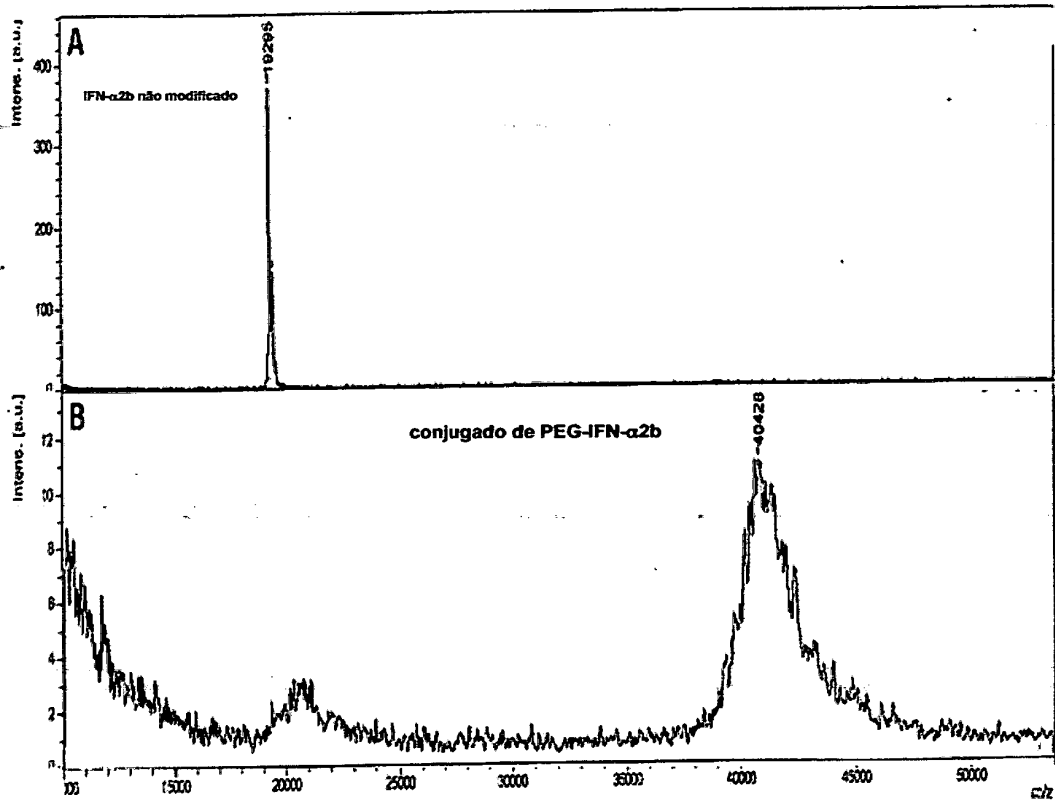


Fig. 4.

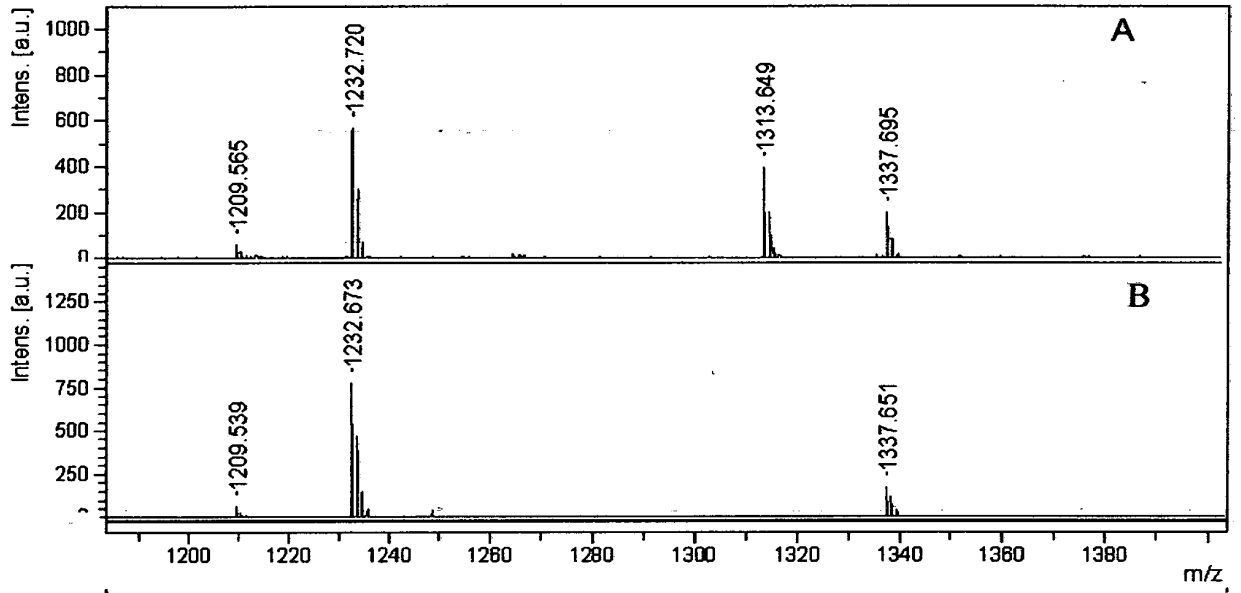


Fig. 5.

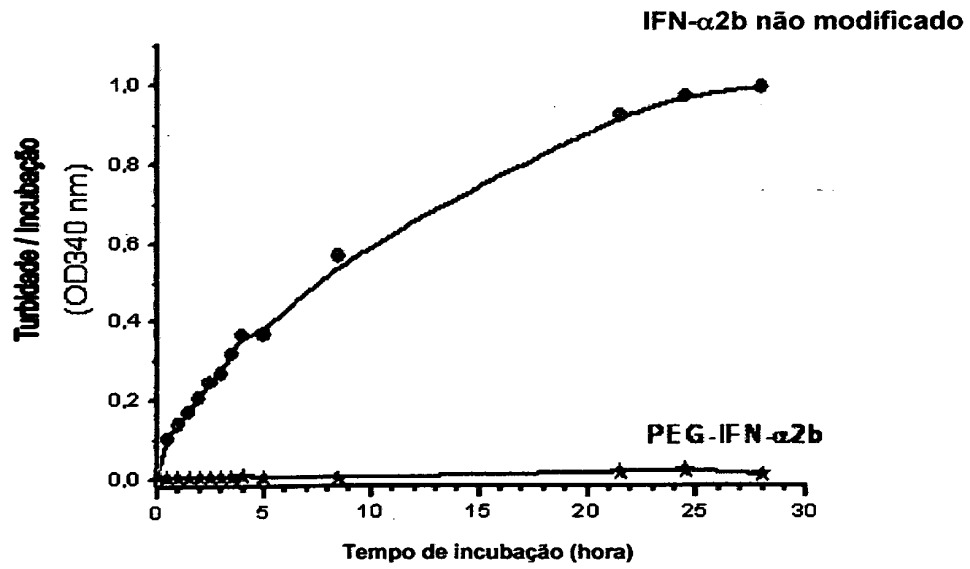


Fig. 6.

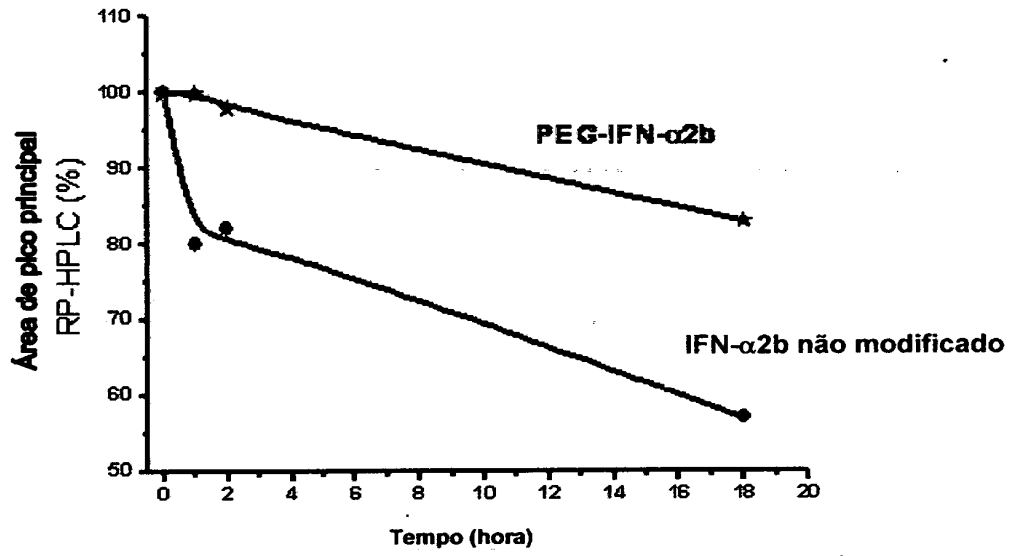


Fig. 7.

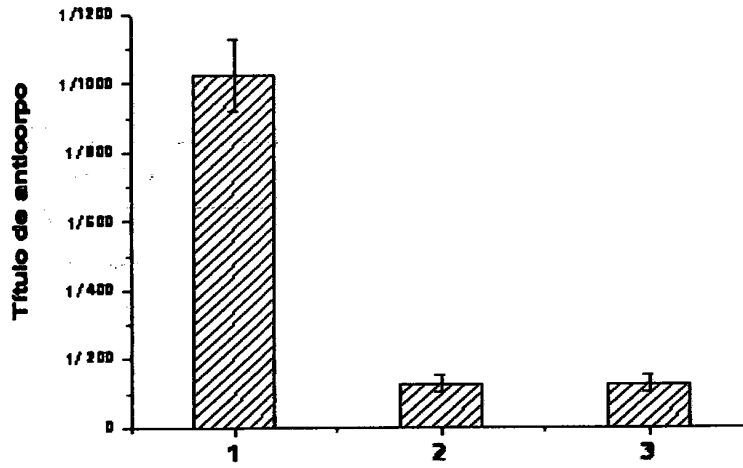


Fig. 8.

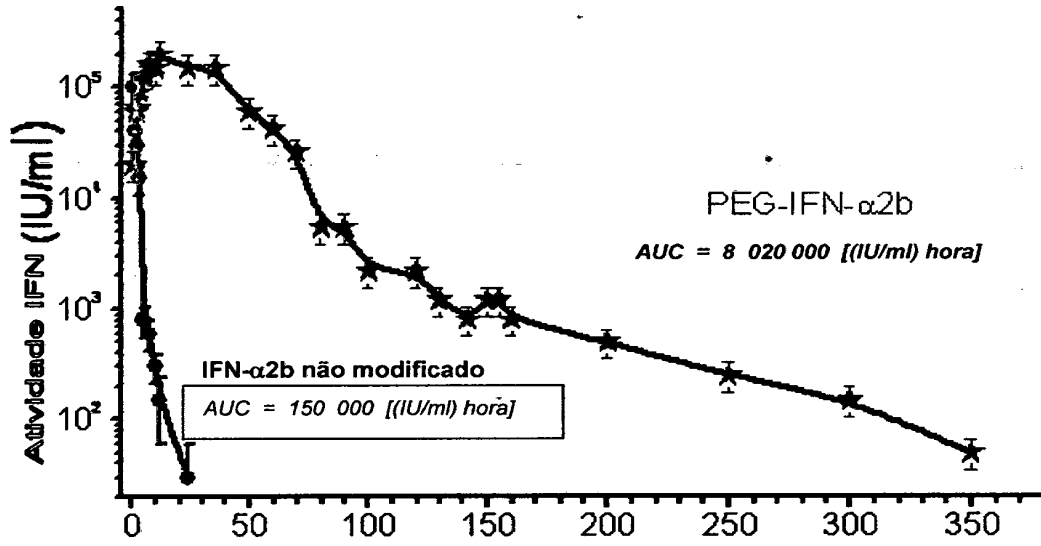
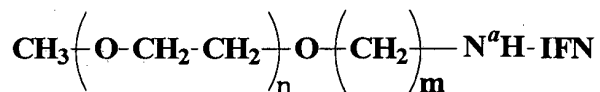


Fig. 9.

RESUMO

NOVO CONJUGADO DE POLIETILENO GLICOL ESTÁVEL DE INTERFERON ALFA, REPRESENTADO POR UM ISÔMERO POSICIONAL; a presente invenção refere-se ao campo da indústria farmacêutica e da medicina, particularmente a novos derivados de PEG-interferon e à descoberta de um novo conjugado de interferon funcionalmente ativo, e altamente estável para polietileno glicol com uma atividade de interferon alfa, com imunogenicidade reduzida, com efeitos biológicos prolongados e parâmetros farmacocinéticos melhorados da fórmula geral:



(I)

onde:

n - valores integrais de 227 a 10 000, de forma que o peso molecular de PEG é de aproximadamente 10 000 - 40 000 Da;

m - número inteiro ≥ 4 ;

IFN- polipeptídeo natural ou recombinante apresentando a atividade de IFN-alfa.

A invenção também se refere a fármacos contendo o conjugado mencionado da fórmula (I), composições farmacêuticas contendo conjugado de PEG-IFN e excipientes terapeuticamente aceitáveis adequados para o tratamento de infecções virais e câncer, assim como doenças associadas à imunodeficiência primária e secundária. A invenção refere-se também ao uso de conjugado da fórmula (I) em produtos medicinais, que apresentam atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória, a métodos de prevenção e/ou tratamento de doenças associadas à imunodeficiência primária ou secundária que incluem a administração de quantidade terapeuticamente efetiva de

conjugado da fórmula (I), e ao recipiente com tal composição farmacêutica.