



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

(21) PI 0721984-9 A2



(22) Data de Depósito: 04/09/2007
(43) Data da Publicação: 18/03/2014
(RPI 2254)

(51) Int.Cl.:
C07K 17/08
A61K 47/48
A61P 31/12
A61P 35/00
A61P 29/00
A61P 19/02
A61P 11/06
C07K 14/56
A61K 38/21

(54) Título: INTERFERON ALFA 2B MODIFICADO POR POLIETILENO GLICOL, PREPARAÇÃO E USO DO MESMO **(57) Resumo:**

(73) Titular(es): Biosteed Gene Expression Tech. CO., LTD.

(72) Inventor(es): Fenghong Yin, Li Sun, Lu Zhuang, Min Liu, Qingjiang Xiao, Shihong Luo, Tianle Xu, Tiebing Wang, Weidong Zhou, Yong Zhang

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT CN2007002644 de 04/09/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2009/030066de 12/03/2009

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**INTERFERON ALFA 2B MODIFICADO POR POLIETILENO GLICOL, PREPARAÇÃO E USO DO MESMO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se ao interferon- α 2b modificado com polietileno glicol de ramificação em forma de Y (PEG) em um único resíduo de aminoácido e a preparação do mesmo, bem como o uso do IFN- α 2b PEGuilado preparado em um único resíduo de aminoácido no campo farmacêutico.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Interferons (IFNs) são uma família de proteínas ou glicoproteínas de molécula pequena produzida por células eucarióticas em resposta a infecção viral e outros estímulos antigênicos, que exibe efeitos antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores de amplo espectro. IFNs foram amplamente aplicados no tratamento de várias condições e doenças, tal como infecções virais, por exemplo, hepatite B, hepatite C e HIV; distúrbios e doenças inflamatórias, por exemplo, esclerose múltipla, artrites, asma, fibrose cística e pulmonar intersticial doença; e tumores, por exemplo, mielomas, linfomas, câncer do fígado, câncer do pulmão, leucemia de célula pilosa, e assim por diante (Kenji Oritani, Paul W Kincade e outros. Type I interferon and limitin: a comparison of structures, receptors, and functions. Cytokine and Growth Factor Reviews, 12, 337-348, 2001; Yu-Sen Wang, Stephen Youngster, e outros Structural and biological characterization of PEGylated recombinant interferon alfa-2b and its therapeutic implications. Advance Drug Delivery Reviews, 54, 547-570, 2002).

IFNs são classificados em quatro tipos de acordo com suas diferenças em propriedades químicas, imunológicas e biológicas: interferon- α , β , γ e ϵ . Interferon- α (IFN- α) é secretado por leucócitos. IFNs- α humanos são codificados por uma família de multigene que consiste em cerca de 20 genes, as proteínas codificadas compartilhando até cerca de cerca de 90% de homologia de sequência de aminoácido (Henco K., Brosius F.J., e outros. J. Mol. Biol., 185, 227-260, 1985). IFN- α 2b humano é um dos subtipos da

subfamília $\alpha 2$ da família de IFN- α humana, e é uma proteína de cadeia única com várias atividades biológicas. A proteína de cadeia única consiste em 165 resíduos de aminoácidos com 4 Cys, em que duas ligações de dissulfeto de intracadeia são formadas entre Cys1-Cys98 e Cys29-Cys138 respectivamente e o aminoácido de terminal N é Cys com um grupo α -NH₂ livre. Os resíduos nas posições 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134 e 164 da sequência de aminoácido são Lys, cada dos quais contém um grupo ϵ -NH₂ livre. Esta proteína não é glicosilada e sensível a muitas proteases. A sequência de aminoácido de interferon- $\alpha 2b$ humano é mostrada em SEQ ID No: 1.

IFNs são geralmente administrados parenteralmente em tratamentos clínicos. A meia-vida *in vivo* curta (2-4h) e imunogenicidade forte de IFNs resultam em um intervalo de dosagem mais curto e uma frequência de dosagem maior. Como os anticorpos gerados significativamente diminuem a eficácia terapêutica, é difícil obter uma eficácia clínica ideal. A tecnologia de modificação de polietileno glicol (PEG) desenvolvida nos últimos anos forneceu uma possível solução para os problemas acima.

PEG é um polímero orgânico inerte, não-tóxico e biodegradável, e é importante nos campos tanto de biotecnologia quanto de farmacêuticos. A técnica de modificação de PEG é ligar PEG a uma proteína ativa através de ligação covalente. Após a glicolação de polietileno (PEGuilação), as propriedades da proteína podem ser significativamente melhoradas, por exemplo, o prolongamento da meia vida metabólica do fármaco, a redução da imunogenicidade, o aumento da segurança, a melhora da eficácia terapêutica, a diminuição da frequência de dosagem, o aumento de solubilidade de fármaco/solubilidade em água, o aumento de resistência contra proteólise, a facilitação de liberação controlada de fármaco e assim por diante. Para detalhes adicionais, favor referir-se a Inada e outros J. Bioact. and Compatible Polymers, 5, 343, 1990, Delgado e outros Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 9, 249, 1992, Katre. Advanced Drug Delivery Systems, 10, 91, 1993, e Publicação de Patente U.S. UP 4179337.

É descrita na Patente U.S. No. 4179337, que após a ligação de

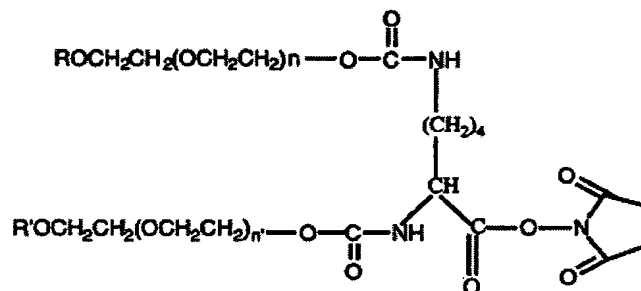
PEG a uma enzima ou insulina, a imunogenicidade da proteína foi reduzida, ao mesmo tempo em que simultaneamente as atividades da proteína foram reduzidas também. Isto foi também encontrado em G-CSF (Satake-Ishikawa e outros Cell Structure and Function, 17, 157-160, 1992), IL-2 (Katre e outros Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1487, 1987), TNF- α (Tsutsumi e outros Jpn. J. Cancer Res., 85, 9, 1994), IL-6 (Inoue e outros J. Lab. Clin. Med., 124, 529, 1994) e CD4-IgG (Chamow e outros Bioconj. Chem., 5, 133, 1994).

Foi reportado que a proteína modificada por PEG ramificado exibiu melhor tolerância ao pH, termoestabilidade e resistência contra proteólise do que proteínas modificadas por PEG de cadeia linear (Monfardini e outros Bioconjugate Chem., 6, 62, 1995). Geralmente, uma molécula PEG modifica uma proteína por ligação da própria ao grupo α -amino de terminal N ou grupos ϵ -amino de um resíduo Lys na molécula de proteína. Existem normalmente três tipos de PEGs para modificação de proteína: um PEG de cadeia linear (EP 0593868), um PEG de ramificação em forma de U (EP 0809996) e um PEG de ramificação em forma de Y (CN1243779C).

Atualmente muitos tipos de proteínas PEGuiladas têm sido aplicadas clinicamente. Em 1990, a adenosina deaminase PEGuilada-bovina (Adagen) produzida por ENZON Inc. foi fornecida por FDA, e usada para tratar doença da imunodeficiência combinada severa (pegfamg013102LB, <http://www.fda.gov>). Em 1994, outra proteína modificada por PEG para tratar leucemia linfoblástica aguda, a asparaginase PEGuilada (pegaspargase, Oncaspar), foi também comercializada em US (103411s50521b1, <http://www.fda.gov>). O interferon- α 2b modificado por PEG (PEG IFN- α 2b, PEG-Intron) desenvolvido por Schering-Plough foi aprovado pelo FDA para o comércio em 2000 e o interferon- α PEGuilado (PEG IFN- α 2a, Pegasys) produzido por Hoffman-la Roche Ltd. foi também aprovado para comercialização em 2002, ambos os quais são usados para tratar hepatite (103964s50371b1, pegsche011901LB, <http://www.fda.gov>). Em 2002, o fator de estimulação de colônia de granulócito humano modificado por PEG produzido por Amgen Inc. (PEG-filgrastim, Neulasta) foi também aprovado

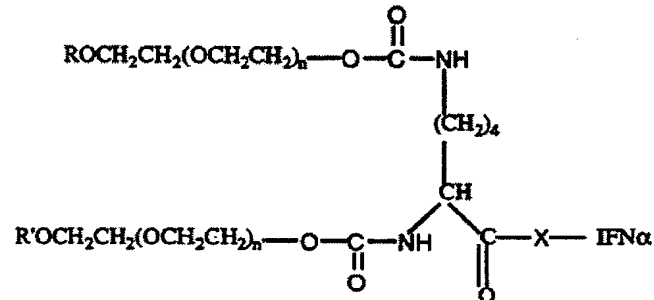
pelo FDA, que é usado para tratar câncer de mama metastático (peg-famg013102LB, <http://www.fda.gov>). O FDA também aceitou a aplicação para antagonista de fator de crescimento humano PEGuilado desenvolvido por Pharmacia. O fragmento de anticorpo de TNF- α combinado de PEG de Celltech e o receptor de PEG-TNF de Amgen são testados nas experiências clínicas avançadas. O primeiro conjugado de PEG-molécula orgânica, campotecina PEGuilada, também entrou na fase II de experiência clínica. Em 2004, o oligonucleotídeo modificado por PEG (Pegaptanib, Macugen[®]) foi aprovado pelo FDA. O metabolismo *in vivo* do PEG no fármaco (ou próprio PEG) já foi claramente entendido, e PEG provou ser um modificador de fármaco bom e seguro sem qualquer efeito adverso.

Os PEGs que podem ser ligados a um fármaco de proteína normalmente necessitam de derivação, se modo que um ou dois grupos terminais das extremidades de PEGs possam ser quimicamente ativados para possuir um grupo funcional adequado que exiba atividade, e desse modo possa formar uma ligação covalente estável com, pelo menos um grupo funcional do fármaco a ser ligado. Por exemplo, PEGs podem ser ligados a ϵ -NH₂ de resíduo Lys na cadeia de peptídeo de proteína, ou ao α -NH₂ do resíduo de aminoácido de terminal N da cadeia de peptídeo de proteína. Na PEGuilação de IFN- α descrita na patente Europeia EP0809996, PEG-NHS é ligado por meio de substituição nucleofílica ao α -NH₂ do aminoácido de terminal N ou ϵ -NH₂ de Lys em IFN- α . O PEG-NHS mencionado na patente acima é um derivado de PEG de ramificação em forma de U (PEG₂-NHS), a fórmula molecular do mesmo como abaixo:



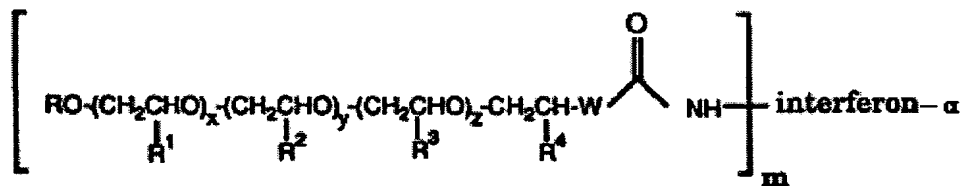
em que, R e R' são independentemente um grupo alquila de peso molecular baixo, n e n' são de 600 a 1500, e o peso molecular médio do PEG é de

26KD a 66KD. A fórmula molecular do IFN- α modificado por PEG₂-NHS é como abaixo:



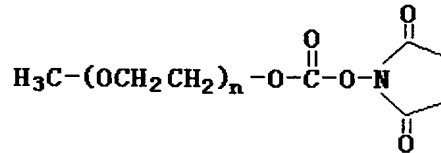
onde uma ou mais moléculas de PEG₂-NHS são ligadas a α -NH₂ do aminoácido de terminal N ou ϵ -NH₂ de Lys em IFN- α , os produtos obtidos são uma mistura de IFNs- α não-PEGuilados, IFNs- α PEGuilados em um único resí-
 5 duído de aminoácido e IFNs- α PEGuilados em múltiplos resíduos de aminoácidos. O IFN- α PEGuilado em um único resíduo de aminoácido pode ser isolado dos produtos obtidos por qualquer meio de purificação apropriado. IFN- α tem um aminoácido de terminal N e mais do que um resíduo de Lys, isto é,
 10 vários sítios reativos para PEG₂-NHS, desse modo os IFNs- α PEGuilado isolados em um único resíduo de aminoácido são uma mistura de isômeros dos IFNs- α PEGuilados em diferentes resíduos de aminoácido únicos.

Na Patente Europeia EP 0593868, PEG de cadeia linear é usado para modificar IFN, a fórmula molecular do produto modificado como a-
 15 baixo:



em que R é um grupo alquila de peso molecular baixo ; R₁, R₂, R₃ e R₄ são H ou grupos alquila de peso molecular baixo ; m é de 1 ao número de possíveis modificações de PEG em IFN; W é O ou NH; x é de 1 a 1000, y e z são de 0 a 1000, x+y+z é de 3 a 1000; e pelo menos um dentre R₁, R₂, R₃ e R₄ é
 20 um grupo alquila de peso molecular baixo. Yu-Sen Wang e outros (Yu-Sen Wang e outros, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 547-570, 2002. Yu-

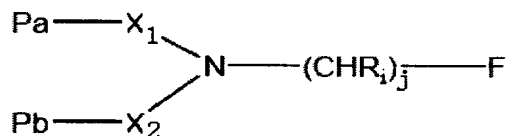
Sen Wang e outros, Biochemistry, 39, 10634-10640, 2000.) reportaram a modificação de rIFN- α 2b com monometóxi-PEG linear de 12KD (Peg-Íntron) e mostraram que os produtos analisados por HPLC-IE são uma mistura de mais do que 14 isômeros modificados por PEG em diferentes resíduos de aminoácidos únicos. A fórmula molecular dos PEGs lineares usados por Yu-Sen Wang e outros é mostrada abaixo:



em que o peso molecular médio do PEG é 12KD.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

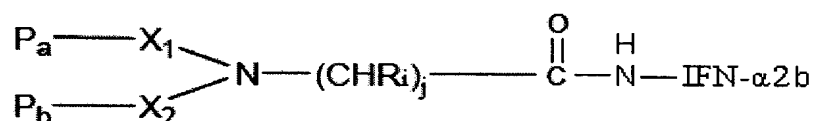
Os derivados de PEG usados na presente invenção são novos derivados de PEG ramificados, de ramificação em forma de Y, e suas estruturas são diferentes daquelas dos PEGs de ramificação em forma de U. A maior diferença entre estes dois tipos de PEGs é que as cadeias de PEG de duas ramificações dos derivados de PEG em forma de Y de acordo com a presente invenção são conectados juntos através de átomo de N, ao mesmo tempo em que as cadeias de PEG de duas ramificações dos derivados de PEG em forma de U em EP0809996 são conectados juntos através de átomo de C. A composição molecular dos derivados de PEG em forma de Y de acordo com a presente invenção é mostrada como abaixo:



em que, P_a e P_b são PEGs iguais ou diferentes; j é um número inteiro de 1 a 12; R_i é H, um grupo C1-C12 alquila substituído ou não-substituído, uma arila substituída, uma aralquila ou uma heteroalquila; X_1 e X_2 são independentemente um grupo de ligação, em que X_1 é $(\text{CH}_2)_n$, e X_2 é selecionado do grupo que consiste em $(\text{CH}_2)_n$, $(\text{CH}_2)_n\text{OCO}$, $(\text{CH}_2)_n\text{NHCO}$ e $(\text{CH}_2)_n\text{CO}$; n é um número inteiro de 1 a 10; e F é um grupo terminal selecionado do grupo que consiste em um grupo hidroxila, um grupo carboxila, um grupo éster, cloreto de acila, hidrazida, maleimida, dissulfeto de piridina, capazes de rea-

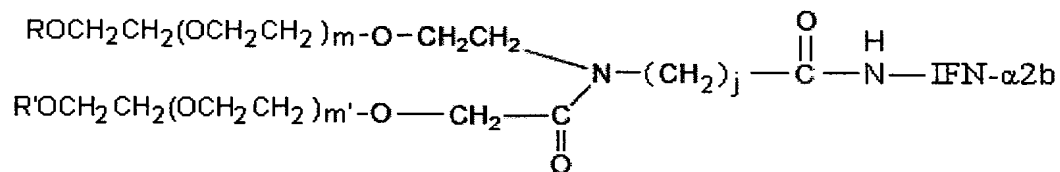
Os presentes inventores usaram derivados de PEG de ramificação em forma de Y (YPEG) para modificar interferon- $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$), e isolaram o YPEG-IFNs- $\alpha 2b$, modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido, por cromatografia de permuta de íon de Q-Sefarose FF. Além disso, os YPEG-IFNs- $\alpha 2b$ isolados, modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido, foram também separados por cromatografia de SP-Sefarose FF para obter YPEG-IFN- $\alpha 2b$ em que o YPEG é principalmente ligado ao ϵ -NH₂ de cadeia lateral de Lys na posição 134 em SEQ ID NO.1, que é chamado de YPEG-IFN- $\alpha 2b(134)$. Após a medição, descobriu-se que a atividade *in vitro* do YPEG-IFN- $\alpha 2b(134)$ é significativamente maior do que aquela do YPEG-IFN- $\alpha 2b$ no qual o YPEG é ligado a outro resíduo de aminoácido, e a meia vida do YPEG-IFN- $\alpha 2b(134)$ no soro é significativamente mais longa do que aquela do IFN- $\alpha 2b$ não-modificado.

Entretanto, a presente invenção fornece IFNs- $\alpha 2b$ PEGuilados em um único resíduo de aminoácido, a estrutura do qual é como abaixo:



em que P_a e P_b são iguais ou diferentes PEGs; j é um número inteiro de 1 a 12; R_i é H, um grupo C1-C12 alquila substituído ou não-substituído, um grupo arila, aralquila, ou heteroalquila substituído; X₁ e X₂ são independentemente um grupo de ligação, em que X₁ é (CH₂)_n, e X₂ é selecionado do grupo que consiste em (CH₂)_n, (CH₂)_nOCO, (CH₂)_nNHCO e (CH₂)_nCO, em que n é um número inteiro de 1 a 10.

Em uma modalidade preferida da presente invenção, os IFNs- $\alpha 2b$ PEGuilados da presente invenção são da fórmula estrutural (II) abaixo:



(II)

em que R e R' são independentemente um grupo C1-C4 alquila, preferivel-

mente metila; j é um número inteiro de 1 a 12; m e m' significam o grau de polimerização e podem ser qualquer número inteiro iguais ou diferentes. Nesta estrutura, a molécula de PEG de ramificação em forma de Y é ligada a uma molécula de IFN- α 2b através de um único resíduo de aminoácido. O

5 peso molecular médio do YPEG-IFN- α 2b na fórmula (II) depende principalmente do grau de polimerização, m e m' . Onde $m+m'$ for preferivelmente de 600 a 1500, o peso molecular médio correspondente do YPEG será de cerca de 26000 a cerca de 66000 Dáltons. Onde $m+m'$ for preferivelmente de 795 a 1030, o peso molecular médio correspondente do YPEG será de cerca de 35000 a cerca de 45000 Dáltons. Onde $m+m'$ for preferivelmente de

10 885 a 1030, o peso molecular médio correspondente do YPEG será de cerca de 39000 a cerca de 45000 Dáltons. Onde $m+m'$ for mais preferivelmente 910, o peso molecular médio correspondente do YPEG será 40000 Dáltons. A relação de m e m' pode estar em uma faixa de 0,5 a 1,5, preferivelmente

15 de 0,8 a 1,2.

Em uma modalidade preferida, no IFN- α 2b PEGuilado da presente invenção, uma molécula PEG é ligada a IFN- α 2b através de uma ligação de amido formada por grupo α -amino do aminoácido de terminal N ou do grupo ϵ -amino de cadeia lateral de resíduo Lys de IFN- α 2b correspondendo a posição 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134 ou 164 como mos-

20 trado em SEQ ID No.1.

Em uma outra modalidade preferida, no IFN- α 2b PEGuilado da presente invenção, uma molécula PEG é ligada a IFN- α 2b através de uma ligação de amido principalmente formada pelo grupo ϵ -amino de cadeia lateral de resíduo Lys de IFN- α 2b correspondendo à posição 134 como mostra-

25 do em SEQ ID No.1.

Opcionalmente, o IFN- α 2b da presente invenção pode ser extraído de fontes naturais ou obtido pela biotecnologia recombinante. Preferivelmente, o IFN- α 2b é IFN- α 2b humano (hIFN- α 2b) tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID No.1, que é extraída de fontes naturais ou obtida pela biotecnologia recombinante. Mais preferivelmente, o IFN- α 2b humano é IFN- α 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b). O rhIFN- α 2b pode ser artificial-

30

mente sintetizado, ou ser expressado de sistemas de expressão procarióticos tais como *E. coli*, ou ser expressado de sistemas de expressão de levedura eucarióticos tais como *Pichia*, ou ser expresso de sistemas de expressão de célula de inseto ou sistemas de expressão de célula de mamífero tais como CHO. Os métodos de preparação do IFN- α 2b natural ou recombinante e os testes de atividade de IFN- α 2b e IFN- α 2b modificado por YPEG são conhecidos na técnica anterior.

Similar a IFN- α 2b, o YPEG-IFN- α 2b da presente invenção pode também ser usado clinicamente para tratar tumores e infecções virais, tal como hepatite, leucemia de célula pilosa, linfólise mediada por célula, sarcoma de Kaposi e assim por diante. Clinicamente, o YPEG-IFN- α 2b da presente invenção é claramente melhorado, quando comparado com IFN- α 2b, em estabilidade, solubilidade, meia-vida em soro e eficácia terapêutica clínica. Quanto ao modo de administração, o YPEG-IFN- α 2b da presente invenção pode ser administrado aos pacientes na forma de uma composição que compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz do YPEG-IFN- α 2b e um veículo ou um excipiente farmacologicamente aceitável. Portanto, a presente invenção, em outro aspecto, também fornece uma composição que compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz do IFN- α 2b PEGuilado da presente invenção e um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável. Preferivelmente, a composição compreende manitol, aminoácidos, cloreto de sódio e acetato de sódio, em que os aminoácidos são preferivelmente selecionados do grupo que consiste em ácido aspártico, asparagina e glicina.

Em outro aspecto, a presente invenção também fornece o uso do IFN- α 2b PEGuilado da invenção ou a composição que compreende o IFN- α 2b PEGuilado da invenção na preparação de um medicamento para tratar uma doença em necessidade de tratamento com IFN- α 2b. Preferivelmente, a doença em necessidade de tratamento com IFN- α 2b é selecionada do grupo que consiste em infecções virais, por exemplo, hepatite B, hepatite C, hepatite D e condiloma acuminado, tumores, por exemplo, leucemia de célula pilosa, leucemia mieloide crônica, leucemia de não-Hodgkin maligno

tos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido podem ser os produtos predominantes ajustando-se à condição da reação.

Subsequentemente, o YPEG-IFN- α 2b, modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido, pode ser isolado da mistura de todos os tipos do IFNs- α 2b modificado por YPEG usando um método tal como cromatografia de permuta de cátion, cromatografia de permuta de ânion, ou cromatografia por exclusão, e em seguida o IFNs- α 2b modificado por PEG em resíduo de aminoácidos únicos diferentes pode ser também resolvido para obter o YPEG-IFN- α 2b no qual o YPEG está ligado em uma posição específica. Os métodos de purificação convencionais incluem cromatografia de permuta de cátion, cromatografia de permuta de ânion, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia por exclusão. A análise característica pode ser realizada por um método conhecido na técnica, por exemplo, a espectroscopia de massa, a eletroforese em gel de poliacrilamida e a cromatografia líquida de alto desempenho por exclusão pode ser usada para analisar o peso molecular dos produtos, a fim de distinguir os produtos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido daqueles modificados por PEG em dois ou múltiplos resíduos de aminoácido e IFN- α 2b não-modificado. Os métodos de purificação mencionados acima podem também ser usados para também resolver os produtos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido para obter isômeros diferentes com a modificação de PEG em posições únicas diferentes. As atividades biológicas *in vitro* de todos os tipos dos produtos modificados por PEG podem ser medidas de acordo com qualquer ensaio conhecido para a atividade de IFN, por exemplo, inibição do efeito citopático. Para IFNs modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido, as frações de PEG nos isômeros diferentes têm efeitos diferentes em manter os domínios ativos de IFNs, resultando nas diferenças maiores nas atividades biológicas de isômeros diferentes. De modo geral, as atividades *in vitro* de IFNs são notavelmente diminuídas após a modificação de PEG. Entretanto, de acordo com a presente invenção, a atividade específica *in vitro* dos isolados de três picos obtidos por cromatografia de permuta de íon foram medidos, e os resultados indicam que o isolado de pico 3 (SP2)

o pico correspondendo ao produto de reação com atividade maior.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: SDS-PAGE de 2 bateladas de IFN- α 2b modificado com YPEG (40KD). A concentração do gel de separação foi 12%, e azul Coomassie brilhante R-250 foi usado como tinta de manchamento. Pode ser visto a partir do resultado de SDS-PAGE da Figura1, sob a condição, a taxa de modificação de PEG de rHuIFN- α 2b foi entre 30-50%, e foi estável. Os produtos modificados primários foram IFN- α 2b modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido (YPEG-IFN- α 2b), e houve também algum IFN- α 2b modificado por PEG em múltiplos resíduos de aminoácido (YPEG_n-IFN- α 2b). A Faixa 1: IFN- α 2b, reação de modificação de NHS-YPEG (40KD) em 0h; Faixa 2: Batelada 060604-1 de IFN- α 2b, reação de modificação de NHS-YPEG (40KD) em 2h; Faixa 3: Batelada 060604-2 de IFN- α 2b, reação de modificação de NHS-YPEG (40KD) em 2h; Faixa 4: marcador (GE Lifescience).

Figura 2: O perfil de resolução de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b por SP-Sefarose FF.

Figura 3: SDS-PAGE manchado de prata (12%) das amostras de YPEG-IFN- α 2b purificadas por SP-Sefarose FF. Faixa 1: marcador de peso molecular (GE Lifescience); Faixa 2: pico de purificação 1 de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN- α 2b; Faixa 3: pico de purificação 2 de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN- α 2b, Faixa 4: pico de purificação 3 de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN- α 2b; Faixa 5: pico de purificação 4 de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN- α 2b.

Figura 4: Peso molecular evidente da amostra de YPEG-rHuIFN- α 2b purificada por SP-Sefarose FF determinado por 7,5% de redução de SDS-PAGE com manchamento prata. Faixa 1: marcador de peso molecular (GE Lifesciences); Faixa 2: YPEG-HuIFN- α 2b SP1, 2 μ g; Faixa 3: YPEG-rHuIFN- α 2b SP2, 2 μ g; Faixa 4: YPEG-rHuIFN- α 2b SP3, 2 μ g.

Figura 5: Os pesos moleculares das amostras de YPEG-IFN- α 2b purificadas por SP-Sefarose FF determinados por MALDI-TOF MS.

Figura 6: O peso molecular de YPEG-NHS (40KD) determinado

por MALDI-TOF MS.

Figura 7: A concentração de fármaco no soro e atividade após uma única injeção s.c. de $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de YPEG-rhIFN- α 2b em Macaco que se alimenta de siri (*Macaca fascicularis*).

5 Figura 8: O controle nulo de Mapeamento de Peptídeo de Tripsinase do YPEG-rHuIFN- α 2b SP2 digerido por tripsina. Dois picos pequenos foram detectados respectivamente em 71,674min e 17,589min; e o pico de tripsina foi detectado entre 2-3 min.

10 Figura 9: A análise de Mapeamento de Peptídeo de Tripsinase da amostra de YPEG-IFN- α 2b SP2 digerido por tripsina (0h) por HPLC-RP C₁₈. O tempo de retenção de YPEG-IFN- α 2b SP2 foi 62,114 min; e o pico de eluição em 71,908min foi a base, 2-3min.

15 Figura 10: A análise de Mapeamento de Peptídeo de Tripsinase da amostra de YPEG-IFN- α 2b SP2 digerida por tripsina (48h) por HPLC-RP C₁₈. Nenhum pico de substrato (62,114min) foi detectado entre 60,5 min-63,2 min, demonstrando que a amostra foi completamente digerida.

20 Figura 11: Perfil de separação de Sephacryl S-100 HR dos peptídeos modificados por YPEG da amostra de YPEG-IFN- α 2b SP2 completamente digerida por tripsina. As amostras foram coletadas de acordo com os picos, S100-1 foi o peptídeo modificado por YPEG, isto é, a amostra-alvo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 A presente invenção será melhor descrita pelos seguintes exemplos, porém qualquer exemplo ou a combinação destes não deveria ser entendido como limitante do escopo ou modalidade da invenção. O escopo da invenção é limitado somente pelas reivindicações anexas. Em combinação com a descrição e técnica anterior, as pessoas versadas na técnica claramente entenderiam o escopo limitado pelas reivindicações.

Exemplo 1

30 Preparação de IFN- α 2b humano recombinante modificado por PEG de ramificação em forma de Y

(1) Preparação em pequena escala de IFN- α 2b humano recombinante modificado por PEG de ramificação em forma de Y

166,1mg de YPEG (fórmula (I), peso molecular médio de 40KD, ramificação uniforme, número do lote RD010P041, Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) foi pesado e dissolvido em 1ml de 2mM de HCl (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.) e 40mg de IFN- α 2b (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) e tampão de ácido bórico-borax a 50mM (pH 9,0, Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) foram adicionados a um volume de reação final de 10ml. Neste sistema de reação, a concentração final de IFN- α 2b foi 4 mg/ml, e a relação molar da reação de IFN- α 2b e YPEG foi 1:2. O sistema de reação foi mantido sob 0-20°C durante 2h com agitação. Os IFNs- α 2b PEGuilados foram em seguida gerados, e a reação foi parada adicionando-se ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) para tornar o pH < 4,0. Uma amostra foi submetida a SDS-PAGE. O sistema de reação foi diluído 50 vezes com água e em seguida 0,2 μ m filtrado antes do armazenamento a 4°C para uso adicional.

A cromatografia de Q-Sefarose FF foi usada para separar o restante de hidrolatos de PEG e PEG, IFNs- α 2b modificado por YPEG em múltiplos resíduos de aminoácidos, IFNs- α 2b modificado por YPEG em um único resíduo de aminoácido e o IFN- α 2b não modificado. A coluna de Q-Sefarose FF (GE Healthcare) (Φ 12mm \times 90mm, 1CV = 10 ml) foi regenerada com 3CV de tampão de ácido bórico/borax a 20 mM de (pH 9,0)-1M de NaCl (BBI), e em seguida equilibrada com 5CV de tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH 9,0). O comprimento de onda de detecção UV foi ajustado a 280nm. A amostra total armazenada a 4°C foi carregada. Após o carregamento, a coluna foi equilibrada com 3CV de tampão de ácido bórico/borax (pH 9,0), e em seguida tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH 9,0)- NaCl a 12 mM foi usado para eluição até que o primeiro pico fosse completamente eluído, cujo pico foi o PEG restante. O tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH 9,0)- NaCl a 60 mM foi então usado para eluição, e a amostra coletada neste pico de eluição foi principalmente o YPEG-IFNs- α 2b, modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido. e em seguida o tampão de ácido bórico/borax a 20mM (pH9,0)- NaCl a 500mM foi usado para eluição e o pico de eluição foi o IFN- α 2b não modificado.

Os produtos-alvo foram principalmente o YPEG-IFNs- α 2b modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido, com uma taxa de produção de 20-40%.

2) Preparação em grande escala de IFN- α 2b humano recombinante modificado por PEG de ramificação em forma de Y

4982,4 mg de YPEG (fórmula (I), peso molecular médio 40KD, ramificação uniforme, número do lote RD010P041, Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) foi pesado e dissolvido em 25 ml de HCl a 2mM. E 1200 mg de IFN- α 2b e tampão de ácido bórico/borax a 50mM (pH 9,0) foram adicionados a um volume de reação final de 200 ml. Neste sistema de reação, a concentração de reação final de IFN- α 2b foi 6 mg/ml, e a relação molar da reação de IFN- α 2b e YPEG foi 1:2. O sistema de reação foi mantido sob 0-25°C durante 2h com agitação. A reação foi parada adicionando-se ácido acético glacial para tornar o pH<4,0. Uma amostra foi submetida a SDS-PAGE. O sistema de reação foi diluído 50 vezes com água e em seguida 0,2 μ m filtrado antes de armazenado a 4°C para uso adicional.

A cromatografia de Q-Sefarose FF foi usada para separar os hidrolatos de PEG e PEG restantes, IFNs- α 2b modificado por YPEG em múltiplos resíduos de aminoácido, IFNs- α 2b modificado por YPEG em um único resíduo de aminoácido e o IFN- α 2b não modificado. Coluna de Q-Sefarose FF (GE Healthcare) (Φ 38mm \times 265mm, 1CV = 300ml) foi regenerada com 3 CV de tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH 9,0)- NaCl a 1M, e em seguida equilibrada com 5CV de tampão de ácido bórico/borax a 20mM (pH 9,0). O comprimento de onda de detecção UV foi ajustado a 280 nm. A amostra total armazenada a 4°C foi carregada. Após o carregamento, a coluna foi equilibrada com 3CV de tampão de ácido bórico/borax (pH9,0), e em seguida tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH9,0)- NaCl a 12 mM foi usado para eluição até que o primeiro pico fosse completamente eluído, cujo pico foi o PEG restante. O tampão de ácido bórico/borax a 20 mM (pH9,0)- NaCl a 60 mM foi então usado para eluição, e a amostra coletada neste pico de eluição foi principalmente o YPEG-IFNs- α 2b modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido. E em seguida o tampão de ácido bórico/borax

a 20 mM (pH9,0)- NaCl a 500 mM foi usado para eluição e o pico de eluição foi o IFN- α 2b não-modificado.

Os produtos-alvo foram principalmente o YPEG-IFNs- α 2b modificado por PEG em um único resíduo de aminoácido, com uma taxa de produção de 35-50%.

A figura1 mostra os resultados de SDS-PAGE para 2 bateladas de IFNs- α 2b modificado com YPEG (40KD). Pode ser visto a partir da figura 1 que sob a condição, a taxa de modificação de PEG de rhIFN- α 2b foi entre 35-50% e mantida estável. Os produtos modificados primários foram modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido (YPEG-IFN- α 2b), e houve também alguns produtos modificados por PEG em múltiplos resíduos de aminoácidos (YPEG_n-IFN- α 2b).

Exemplo 2

Resolução de YPEG-IFNs- α 2b por SP-Sefarose FF

A amostra de YPEG-IFNs- α 2b capturada por Q-Sefarose FF foi ajustada ao pH 5,0 com 20% de ácido acético, em seguida diluída 15 vezes com NaAc/HAc a 5 mM (pH 5,0, Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.). A amostra foi carregada a 0,5 mg/ml de capacidade de carregamento para coluna de 100ml de SP-Sefarose FF (GE Healthcare) (Φ 18 mm \times 394 mm). A coluna foi equilibrada com 3CV de NaAc/HAc a 5 mM (pH5,0), e em seguida eluída com 2,5 CV do gradiente de 0%-30% de NaAc/HAc a 5 mM - NaCl a 70 mM (pH5,0), seguindo com 50 CV do gradiente de 30%-100% de NaAc/HAc a 5 mM -NaCl a 70 mM (pH5,0). YPEG-IFN- α 2b foi resolvido como 4 picos de eluição por SP-Sefarose FF a 100 ml. As amostras foram coletadas de acordo com estes picos e em seguida medidas por SDS-PAGE com manchamento de prata respectivamente. De acordo com os resultados de SDS-PAGE, pode ser visto que o pico 1 resolvido por SP-Sefarose FF foi principalmente os produtos modificados por YPEG em múltiplos resíduos de aminoácidos (YPEG_n-IFN- α 2b). O pico 2 por SP-Sefarose FF foi principalmente os produtos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido (YPEG-IFN- α 2b), e também conteve alguns produtos modificados por PEG em múltiplos resíduos de aminoácido. O pico 3 e pico 4 por SP-

Sefarose FF foram ambos os produtos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido. Os picos 2-4 resolvidos por SP-Sefarose FF foram isômeros com modificação de YPEG em posições únicas diferentes, e foram chamados respectivamente como YPEG-IFN- α 2b SP1, YPEG-IFN- α 2b SP2 e YPEG-IFN- α 2b SP3. Os resultados de perfil de resolução e SAD-PAGE manchado de prata foram mostrados na figura 2 e figura 3 respectivamente.

Toda a amostra de YPEG-IFN- α 2b SP1-3 foi suplementada com cloreto de sódio, acetato de sódio, manitol, ácido aspártico e foi esterilizada com 0,22 μ m de filtro antes de armazenada a 4°C para uso adicionado.

10 Exemplo 3

Análise da Característica de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b

(1) Concentração de Proteína

As concentrações de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b foram determinadas pelo método de Kjeldahl.

15 (2) Peso molecular evidente de proteína

Os pesos moleculares evidentes de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b foram determinados por SDS-PAGE. O método foi de acordo com Laemmli e outros (Nature 227: 680, 1970). A concentração do gel foi 7,5%, e o gel foi visualizado por manchamento de prata. Os pesos moleculares evidentes de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b foram quase iguais, cerca de 123KD (figura 4).

(3) Peso molecular determinado por MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS (Autoflex TOF/TOF system, Bruker Daltonics, Alemanha) foi usado para determinar os pesos moleculares de isômeros de modificação de YPEG-rHuIFN- α 2b. Ácido sinapínico (SA, C₁₁H₁₂O₅, M.W. 224.22, número do lote: 2006 236870 002, Bruker Daltonics, Alemanha) foi usado como matriz. O Padrão de Calibração de Proteína II (Part No.207234, Bruker Daltonics, Alemanha) foi usado como padrão de peso molecular de proteína, e o programa para análises de dados foi FlexAnalysis Ver.3.0.54.0.

30 Os pesos moleculares MS de isômeros de modificação de YPEG-IFN- α 2b foram quase iguais, cerca de 59000 Dáltons (figura 5).

(4) Teste de teor de endotoxina

Com base no ensaio de limulus (*Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, 2005, Volume 3, Appendix X C), o teor de endotoxina de cada amostra de YPEG-IFN- α 2b foi menor do que 5,0EU/mg.

(5) Atividade *in vivo* e Farmacocinéticos de YPEG-IFN- α 2b SP2 no animal.

5 Atividade *in vivo* de YPEG-IFN- α 2b SP2 em animal.

O mecanismos de ação de IFN é parcialmente para induzir a produção de 2',5'-AS (2',5'-oligoadenilato sintetase), que sucessivamente exerce seus efeitos antivirais. Usando ^{125}I como um traçador, os parâmetros farmacodinâmicos de IFN são refletidos pela atividade 2',5'-AS *in vivo*. 2',5'-
10 AS catalisa a síntese de 2',5'-A (2',5'-oligoadenilato) de ATP na presença de Poli(I)·Poli(C) ágar (A atividade de 2',5'-AS pode ser representada pela concentração do 2',5'-A sintetizado). Primeiro, 2',5'-AS nas amostras são absorvidos e ativados por Poli(I)·Poli(C) agarose, em seguida catalisa o substrato ATP para gerar 2',5'-A. Uma mistura de 2',5'-A rotulado por ^{125}I , soro anti-
15 2',5'-A e anticorpo secundário é adicionado na amostra que em seguida é incubada e centrifugada para separar a mistura. O sobrenadante é descartado e um Contador Gama foi usado para medir a radioatividade do sedimento. A taxa de ligação do 2',5'-A rotulado por ^{125}I inicialmente adicionado é calculada. A regressão logística de quatro parâmetros é usada para gerar
20 a curva padrão, e em seguida a concentração dos produtos de 2',5'-A induzidos por 2',5'-AS em uma amostra desconhecida pôde ser estimada.

Ao usar o método de 2', 5'-A mencionado acima, os resultados na Tabela 1 e na figura 7 mostraram a concentração de 2', 5'-A de soro após uma única injeção s.c. de $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de YPEG-IFN- α 2b SP2 em Macaco que
25 se alimenta de siri (*Macaca fascicularis*) (18 Macacos que se alimentam de siris, Guangxi Weimei Biotecnologia Co., Ltd., Certificação No. S.CXK GUI 2002-0001, peso corporal 2,5-5,5 kg, 6 fêmeas e 12 machos, elevado em gaiolas separadas, alimentados com comida de macaco, água livremente). Pode ser visto a partir da figura8 que o tempo para o pico médio foi
30 $64\pm 27,71\text{h}$, e a concentração para pico foi $292,30\pm 148,08\text{Pmol}\cdot\text{dL}^{-1}$. Após a administração, a atividade de 2', 5'-AS no soro foi claramente aumentada, e o tempo para pico de 2', 5'-A no soro foi mais lento do que aquele de YPEG-

rhIFN α 2b SP2.

Tabela 1. As concentrações de 2',5'-A no soro com o passar do tempo, após uma única injeção s.c. de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de YPEG-rhIFN- α 2b SP2 em Macaco que se alimenta de siri (Pmol·dL $^{-1}$)

tempo(h)	No. de Macaco que se alimenta de siri			Média	SD
	1	2	3		
0	19,32	13,63	20,74	17,90	± 3,76
1	40,17	218,67	--	129,42	± 126,22
2	45,74	14,30	80,23	46,76	± 32,98
4	14,89	69,41	138,23	74,18	± 61,81
8	49,12	243,43	141,66	144,74	± 97,19
10	119,51	274,99	109,89	168,13	± 92,67
12	72,75	152,81	112,87	112,81	± 40,03
24	10,05	321,23	159,12	163,47	± 155,63
48	45,60	622,42	164,49	277,50	± 304,56
96	400,67	352,65	123,58	292,30	± 148,08
168	10,87	286,38	4,17	100,47	± 161,03
240	2,74	323,83	10,48	112,35	± 183,19
312	20,65	238,65	1,54	86,94	± 131,72

5 2 Farmacocinéticos de YPEG-IFNs- α 2b e rhIFN- α 2b em Macaco que se alimenta de siri

10 Uma única injeção s.c. de 10, 30 ou 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de YPEG-IFN- α 2b foi dada ao Macaco que se alimenta de siri. Para o grupo de administração, 1ml de sangue venoso foi tomado do membro traseiro oposto ao lado injetado na hora anterior, 1h, 2h, 4h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h, 240h, e 312h após a administração. Para o grupo com uma única injeção de s.c. de IFN- α 2b (30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 1 ml de sangue foi tomado na hora anterior, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h e 24h após a administração. Após serem mantidas a 4°C durante 30 min, as amostras de sangue foram centrifugadas em 2000 rpm durante 10 min sob baixa temperatura, em seguida o soro foi separado imediatamente e armazenado a -20°C para outra análise.

15 O imunoenensaio intercalado duplo quantitativo foi usado. Um anticorpo monoclonal específico para IFN- α humano recombinante foi pré-

revestido em placa de microtítulo. O padrão e as amostras foram pipetadas nas cavidades de microtítulo, em que o IFN- α 2b ou YPEG-IFN- α 2b SP2 se ligaria ao anticorpo imobilizado. A placa foi lavada para remover as substâncias soltas, e em seguida IgG de IFN- α anti-humano (anticorpo secundário) foi adicionado nas cavidades. Após a reação ter sido concluída, a placa foi lavada e a peroxidase de rábano-silvestre (HRP) foi adicionada nas cavidades. Após a lavagem longe da enzima solta e reagentes, a cor gerada adicionando-se solução de substrato de HRP em cada cavidade foi proporcional à quantidade do IFN- α 2b ou YPEG-rhIFN- α 2b SP2 ligado na primeira etapa. A reação foi parada e a intensidade de cor foi medida. Quanto maior o valor de OD de absorbância, maior a concentração de IFN- α 2b ou YPEG-IFN- α 2b SP2 na amostra. As curvas-padrão foram plotadas para IFN- α 2b e YPEG-IFN- α 2b SP2, respectivamente, para medir a concentração de fármaco no soro nas amostras de sangue.

De acordo com o protocolo na descrição do kit (American Biomedical Co., número do lote 3271), 100 μ l de amostra de sangue ou padrão foram adicionados em cada cavidade, e misturados com misturador de placa gentilmente. De acordo com a concentração antecipada de uma amostra desconhecida, a amostra foi diluída com a solução diluída para as faixas de concentração da curva-padrão. A curva-padrão de IFN- α 2b ou YPEG-IFN- α 2b SP2 para cada placa foi plotada para calcular a concentração da amostra desconhecida naquela placa. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 1h, e lavada uma vez com solução de lavagem de placa. 100 μ l de anticorpo secundário foram adicionados a cada cavidade, e mantidos em temperatura ambiente durante 1h. A placa foi lavada 3 vezes, e 100 μ l de conjugado de HRP foram adicionados a cada cavidade. A placa foi incubada em temperatura ambiente durante 1h e lavada 4 vezes. 100 μ l de substrato de TMB foram adicionados em cada cavidade, e mantido em temperatura ambiente no escuro durante 15 min. 100 μ l de solução de interrupção foram adicionados a cada cavidade, e misturados suavemente para parar a reação. O valor de OD de absorbância em 450nm foi medido com um leitor de microplaca em 5 minutos para determinar a concentração de cada amostra.

Após uma única injeção subcutânea de dose baixa, dose média, ou dose elevada (10, 30 e 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente) de YPEG-IFN- α 2b em Macaco que se alimenta de siri, as meia-vidas foram $48,87\pm 11,67$, $51,94\pm 3,52$ e $49,60\pm 2,97$ h, respectivamente. Após uma única injeção subcutânea de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de IFN- α 2b em Macaco que se alimenta de siri, a meia-vida foi $3,22 \pm 0,10$ h. A meia-vida de IFN- α 2b foi prolongada pelo menos dez vezes após a modificação de YPEG.

(6) A atividade biológica *in vitro* de cada isômero de modificação YPEG-IFN- α 2b foi estimada usando ensaio de inibição de efeito citopático. De acordo com o método descrito em *Determination Method of Interferon Activity (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005, Volume 3, Appendix X C)*, interferon protege as células amnióticas humanas (WISH) do dano causado pelo vírus de estomatite vesicular (VSV). A violeta cristal foi usada para manchar as células de WISH sobreviventes, e o valor de OD de absorvância foi medido em 570 nm. A curva de efeito de proteção de interferon foi plotada para as células WISH, para determinar a atividade biológica *in vitro* dos interferons. Os resultados da atividade biológica *in vitro* de cada amostra são mostrados na Tabela 2, e 3 testes paralelos foram realizados para cada amostra. Após a modificação de YPEG, em todos os isômeros de modificação dos produtos modificados por PEG em um único resíduo de aminoácido, a amostra de SP2 mostrou a atividade específica *in vitro* mais elevada, que foi 1-2 vezes maior do que SP1, SP3 e PEGASYS (fabricado por Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland; embalado separadamente por Shanghai Roche Pharmaceuticals Ltd., número do lote do produto B1016, número do lote da embalagem SH0020), e foi também 1-2 vezes maior do que a amostra não resolvida.

Tabela 2. Resultados da atividade biológica *in vitro* para cada isômero de modificação de YPEG-IFN- α 2b (3 testes paralelos)

Amostra	Tipo de PEG	PEG M.W. (KD)	No. de Posições da Modificação	Atividade Específica Média ($\times 106\text{IU}/\text{mg}$)
YPEG-IFN- α 2b SP1	ramificaçãoY	40	1	$1,07\pm 0,172$

Amostra	Tipo de PEG	PEG M.W. (KD)	No. de Posições da Modificação	Atividade Específica Média ($\times 106IU/mg$)
YPEG-IFN- $\alpha 2b$ SP2	ramificação Y	40	1	2,65 \pm 0,185
YPEG-IFN- $\alpha 2b$ SP3	ramificação Y	40	1	1,13 \pm 0,215
YPEG-IFN- $\alpha 2b$ amostra não-resolvida	ramificação Y	40	1	1,68 \pm 0,217
PEGASYS	ramificação U	40	1	0,934 \pm 0,042

Observação: a amostra não-resolvida refere-se a amostra antes de resolver YPEG-rhIFN- $\alpha 2b$ por SP-Sefarose FF

(7) A resolução da posição de modificação em YPEG-IFN- $\alpha 2b$ SP2

O sistema de solvente de YPEG-IFN- $\alpha 2b$ SP2 foi mudado para 50mM de NH_4HCO_3 (pH8,0) por ultrafiltração com ultrafiltro 5K (Millipore, material de polietersulfona), e a concentração de proteína foi determinada ser 3,82 mg/ml usando espectroscopia UV. A tripsina de TPCK (Promega) foi dissolvida (0,5 $\mu g/\mu l$) na solução fornecida pelo fabricante. As amostras foram adicionadas de acordo com a Tabela 3:

10 **Tabela 3.** Composição de reação de digestão de tripsina de YPEG-IFN- $\alpha 2b$ SP2

Composição de Reação	Volume
50mM de NH_4HCO_3 , pH8,0	7,08ml
PEG-IFN- $\alpha 2b$ SP2 (3,82 mg/ml)	1,32ml
Tripsina (0,5 $\mu g/\mu l$)	0,2ml
Volume de reação total	8,6ml

O sistema de reação foi mantido em um banho de água a 37°C durante 48h, em seguida 1,52ml de 20% de ácido acético foi adicionado para parar a reação. Uma quantidade pequena da amostra foi tomada para mapeamento de peptídeo de HPLC-RP C18. O instrumento para análise foi o sistema de HPLC Waters, com um controlador do tipo 600, detector de comprimento de onda dupla 2487, e o software para processamento de dados foi Empower 2. A coluna analítica de HPLC foi Jupiter C18 (diâmetro de partícula 5 μm , diâmetro de poro 300Å, $\Phi 4,6 \times 150mm$, produzido por Phenomenex, USA). A Fase Móvel A foi 0,1% de TFA/ H_2O , Fase Móvel B foi 0,1%

de TFA/90% de ACN/H₂O, a taxa de fluxo foi 1 ml/min, e o comprimento de onda de detecção foi ajustado em 214nm. Favor referir-se a Tabela 4 para os gradientes de eluição, e os resultados foram mostrados nas figuras 8-10.

Tabela 4. Os gradientes de eluição para mapeamento de peptídeo de HPLC-RP C18 do YPEG-IFN- α 2b SP 2 digerido por tripsina

	Tempo (min)	% de A	% de B	% de ACN
1	0	100	0	0
2	8	100	0	0
3	68	40	60	54
4	72	40	60	54
5	75	100	0	0
6	80	100	0	0

Com base no resultado de detecção, pode ser determinado que a amostra foi quase completamente digerida. Os produtos foram tratados com redução de DTT após a reação ter sido parada. A coluna de Sephacryl S-100HR (Φ 18x255 mm, 1CV=64 ml; GE Healthcare) foi pré-equilibrada com 3CV de PBNa a 20 mM -NaCl a 400 mM (pH7,0), e 3% de CV da amostra de YPEG-IFN- α 2b SP2 por TPCK digerida por tripsina completamente foi carregado por pressão hidrostática. PBNa a 20 mM -NaCl a 400 mM (pH7,0) foi usado para eluição, e o comprimento de onda de detecção foi ajustado em 280 nm. A amostra do primeiro pico de eluição foi coletada (número da amostra: YPEG-IFN- α 2b S100-1, figura11), e o sistema de solvente foi mudado para PBNa a 5mM (pH 7,0) com ultrafiltro 5K. Liofilização a vácuo foi feita. Os aminoácidos de terminal N da amostra liofilizada foram determinados usando degradação de Edman, e a sequência dos 7 aminoácidos no terminal N da amostra foi XYSPXAW (Tabela 5), em que X significa cisteína de α -aminoácido (Cys), um não α -aminoácido ou outro aminoácido modificado que não possa ser detectado usando a degradação de Edman. De acordo com a sequência mostrada na SEQ ID NO: 1, pode ser determinado que YPEG-IFN- α 2b SP2 foi principalmente os produtos modificados com YPEG em Lys134.

Tabela 5. Resultado de sequenciamento para os aminoácidos de terminal N

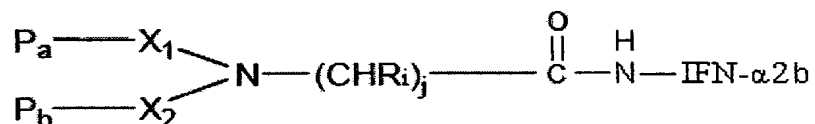
de YPEG-IFN- α 2b S100-1

Amostra	Sequência de terminal N detectada	A posição de modificação de PEG correspondente.
YPEG-IFN- α 2b S100-1	XYSPXAW	Lys134

Nota: X significa cisteína de α -aminoácido, um não α -aminoácido ou outro aminoácido modificado que não possa ser detectado usando a degradação de Edman.

REIVINDICAÇÕES

1. Interferon- α 2b PEGuilado (IFN- α 2b) da estrutura como abaixo, obtido por ligação de IFN- α 2b com um polietileno glicol de ramificação em forma de Y (YPEG):



5 em que,

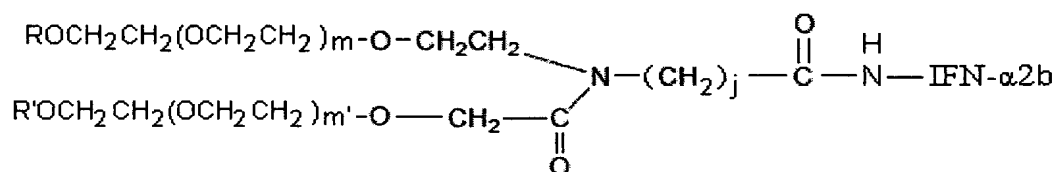
P_a e P_b são polietileno glicol igual ou diferente (PEG);

j é um número inteiro entre 1-12;

R_i é H, grupo C1-C12 alquila substituído ou não-substituído, arila, aralquila, ou heteroalquila substituída; e

10 X_1 e X_2 são independentemente um grupo de ligação, em que X_1 é $(CH_2)_n$, e X_2 é selecionado do grupo que consiste em $(CH_2)_n$, $(CH_2)_n\text{OCO}$, $(CH_2)_n\text{NHCO}$ e $(CH_2)_n\text{CO}$, em que n é um número inteiro entre 1-10.

2. IFN- α 2b PEGuilado, de acordo com a reivindicação 1, com a estrutura como abaixo



15 em que R e R' são independentemente um grupo C1-C4 alquila, preferivelmente metila;

j é um número inteiro entre 1-12;

m e m' significam o grau de polimerização e pode ser qualquer número inteiro; $m+m'$ é preferivelmente de 600 a 1500, e

20 o peso molecular total médio do YPEG é preferivelmente de cerca de 10000 a cerca de 60000 Dáltons, mais preferivelmente cerca de 40000 Dáltons.

25 3. IFN- α 2b PEGuilado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que o YPEG é ligado ao IFN- α 2b através de uma ligação de amido formada por grupo α -amino do aminoácido de terminal N de IFN- α 2b ou o gru-

po ϵ -amino de cadeia lateral de um resíduo Lys em IFN- α 2b correspondendo à posição 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134, ou 164 em SEQ ID No.1, preferivelmente posição 134 em SEQ ID No.1.

5 4. IFN- α 2b PEGuilado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que o IFN- α 2b é extraído de uma fonte natural ou obtido através de biotecnologia recombinante, preferivelmente é IFN- α 2b humano tendo a sequência de aminoácido como mostrado em SEQ ID No.1, mais preferivelmente é um IFN- α 2b humano recombinante.

10 5. IFN- α 2b PEGuilado, de acordo com a reivindicação 4, em que o IFN- α 2b humano recombinante é artificialmente sintetizado ou expresso em um sistema de expressão selecionado do grupo que consiste em um sistema de expressão procariótico tal como *E. coli*, um sistema de expressão de levedura eucariótico tal como *Pichia*, um sistema de expressão de célula de inseto ou um sistema de expressão de célula de mamífero tal como CHO.

6. IFN- α 2a PEGuilado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, em que o YPEG é um YPEG de ramificação uniforme do peso molecular de 40000 Dáltons.

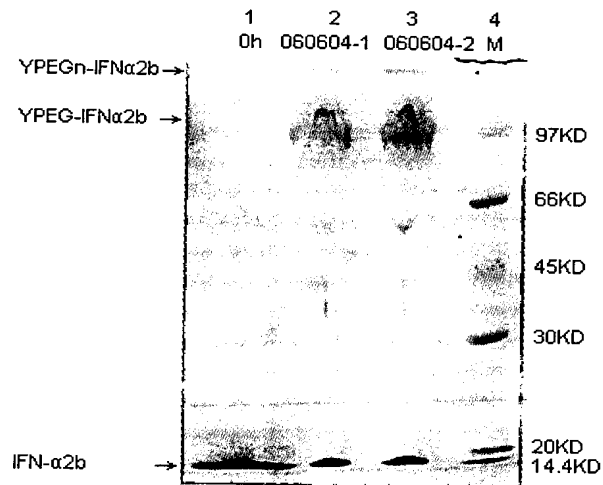
20 7. Composição, que compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz do IFN- α 2b PEGuilado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo ou excipiente farmacologicamente aceitável.

25 8. Composição, de acordo com a reivindicação 7, que adicionalmente compreende manitol, um aminoácido, cloreto de sódio e acetato de sódio, em que o aminoácido é preferivelmente selecionado do grupo que consiste em ácido aspártico, asparagina e glicina.

30 9. Uso do IFN- α 2b PEGuilado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a composição de acordo com a reivindicação 7 ou 8, na preparação de um medicamento para o tratamento de uma doença em necessidade de tratamento com IFN- α 2b, em que a doença é preferivelmente selecionada do grupo que consiste em infecções virais, por exemplo, hepatite B, hepatite C, hepatite D, e condiloma acuminado, tumores, por exem-

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o YPEG tem um peso molecular de 40KG, e preferivelmente é um Y-PEG de ramificação uniforme, e mais preferivelmente a relação molar da reação de IFN- α 2b e YPEG é 1:2.

- 5 12. Método de tratamento de um paciente que sofre de uma doença em necessidade de tratamento com IFN- α 2b, que compreende administrar uma quantidade terapeuticamente eficaz do IFN- α 2b PEGuilado, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou a composição
- 10 que a doença em necessidade de tratamento com IFN- α 2b é preferivelmente selecionada do grupo que consiste em infecções virais, por exemplo, hepatite B, hepatite C, hepatite D e condiloma acuminado, tumores, por exemplo, leucemia de célula pilosa, leucemia mieloide crônica, leucemia de não-Hodgkin maligno de grau baixo, linfólise mediada por célula, Sarcoma de
- 15 Kaposi, mieloma múltiplo, melanoma maligno, linfoma de célula T cutâneo, papiloma laríngeo, carcinoma de célula renal recorrente ou metastático e doenças mieloproliferativas relacionadas com trombocitemia, distúrbios e doenças inflamatórias, por exemplo, esclerose múltipla, artrites, asma, fibrose cística e doença pulmonar intersticial.



SDS-PAGE para 2 bateladas de IFN-2b modificado com YPEG (40 KD)

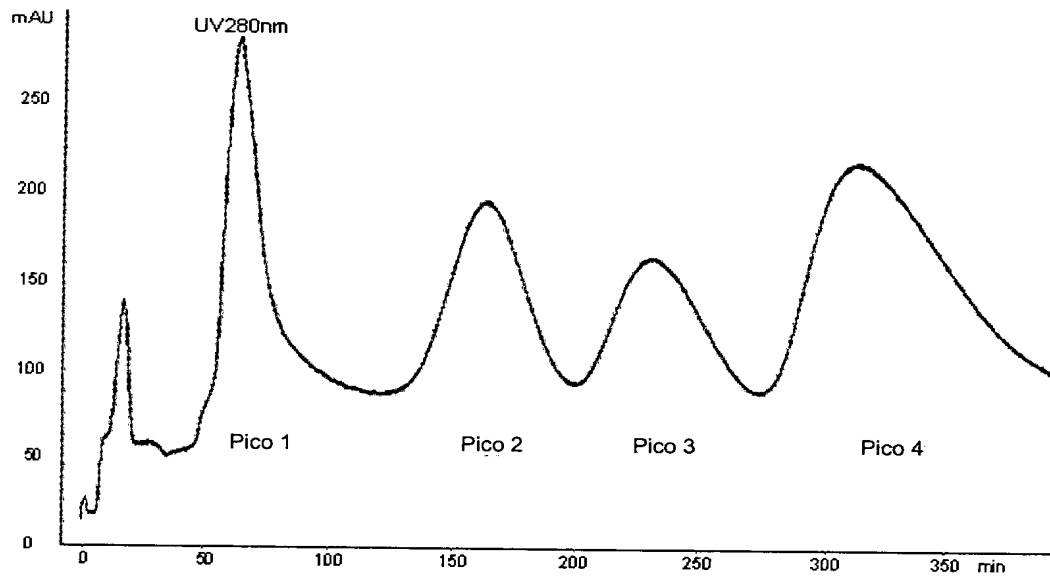
Coluna 1: IFN-2b, NHS-YPEG (40KD) modificado a 0h;

Coluna 2: Batelada 060604-1 de IFN-2b, NHS-YPEG (40KD) modificado durante 2 horas;

Coluna 3: Batelada 060604-2 de IFN-2b, NHS-YPEG (40KD) modificado durante 2 horas;

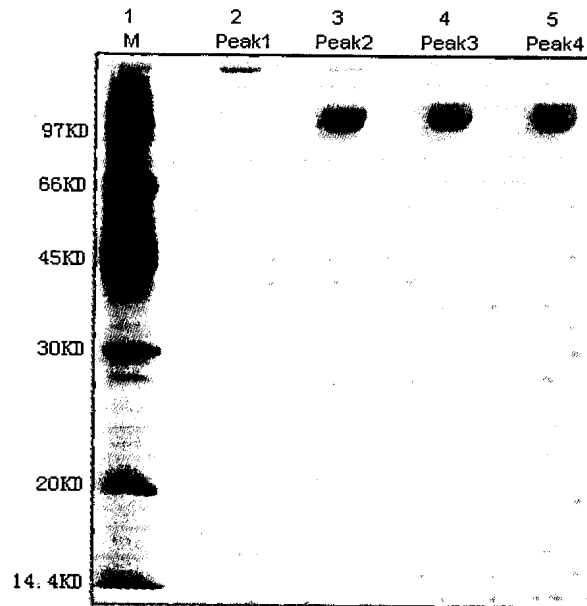
Coluna 4: marcador (GE Lifescience)

FIG.1



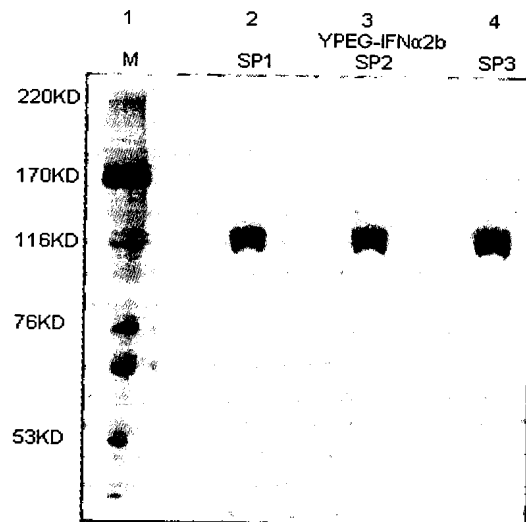
O perfil de resolução de isômeros de modificação YPEG-IFN-2b através de SP-Sefarose

FIG.2



SDS-PAGE manchado de prata (12%) das amostras de YPEG-IFN-2b purificadas com SP-Sefarose FF
Coluna 1: marcador de peso molecular (GE Lifescience)
Coluna 2: pico 1 de purificação de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN-2b;
Coluna 3: pico 2 de purificação de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN-2b;
Coluna 4: pico 3 de purificação de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN-2b;
Coluna 5: pico 4 de purificação de SP-Sefarose FF de YPEG-IFN-2b;

FIG.3



Peso molecular aparente determinado da amostra de YPEG-rHuIFN- α 2b purificada por meio de SP-Sepharose FF determinada por SDS-PAGE redutiva a 7,5% com manchamento de prata.

Coluna 1: marcador de peso molecular (GE Lifesciences);

Coluna 2: YPEG-rHuIFN- α 2b SP1, 2 μ g;

Coluna 3: YPEG-rHuIFN- α 2b SP2, 2 μ g;

Coluna 4: YPEG-rHuIFN- α 2b SP3, 2 μ g;

FIG.4

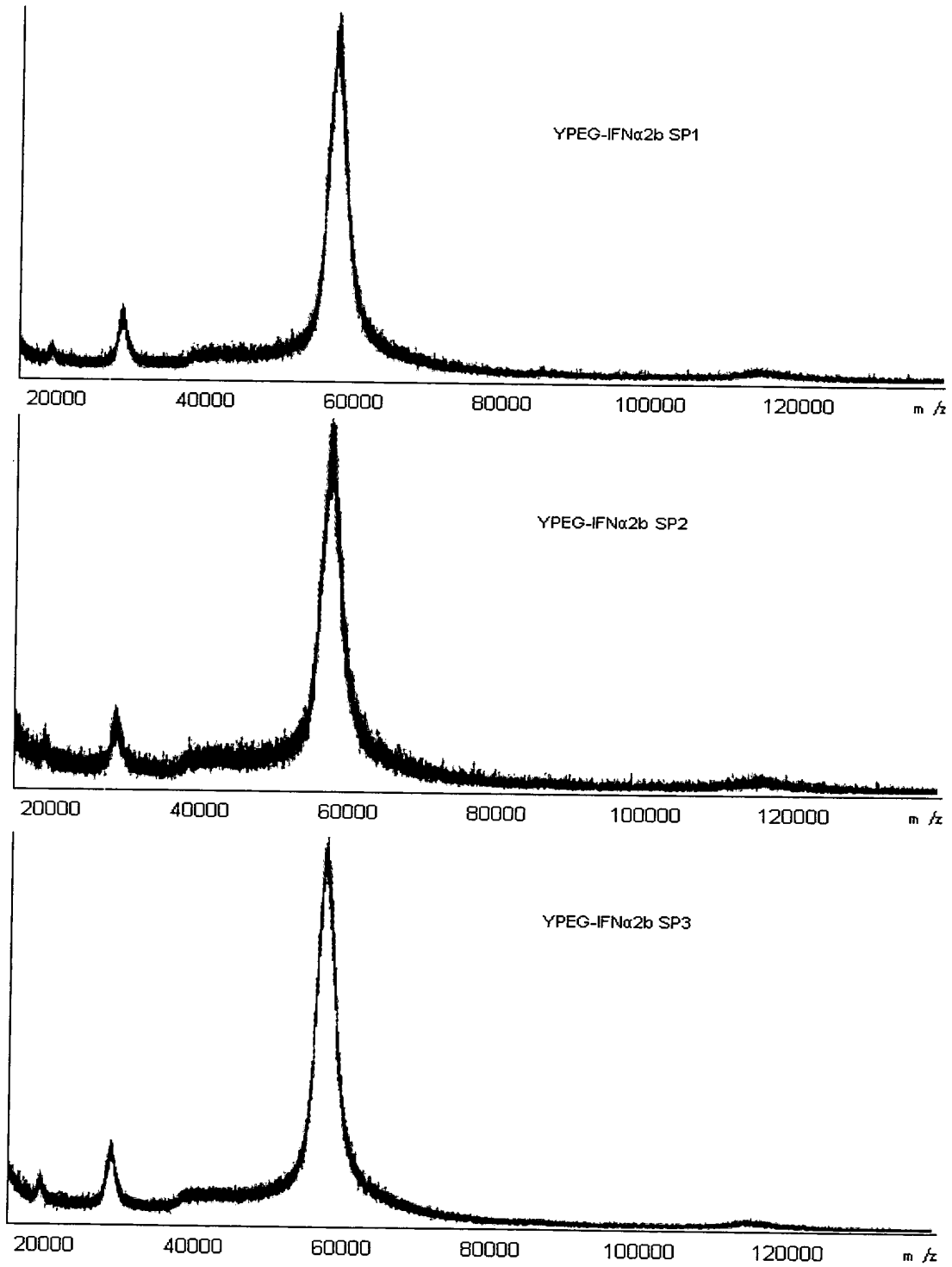


FIG.5

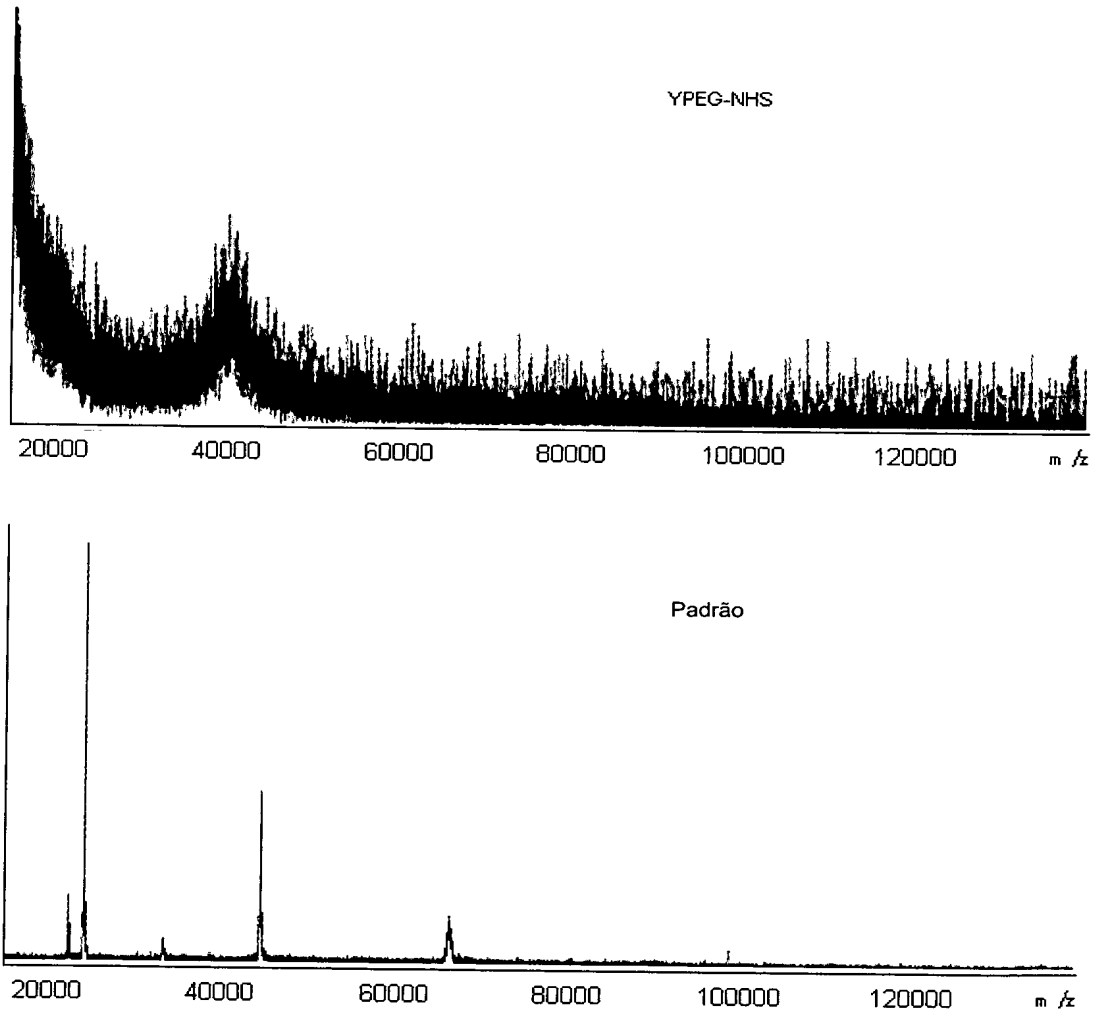
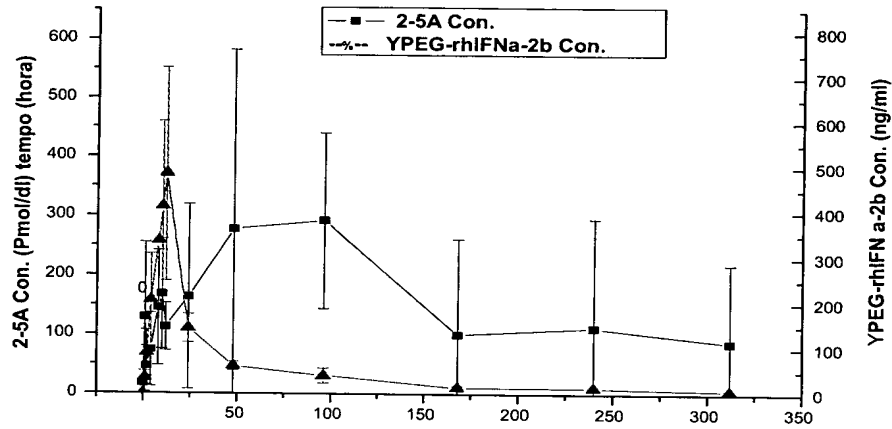
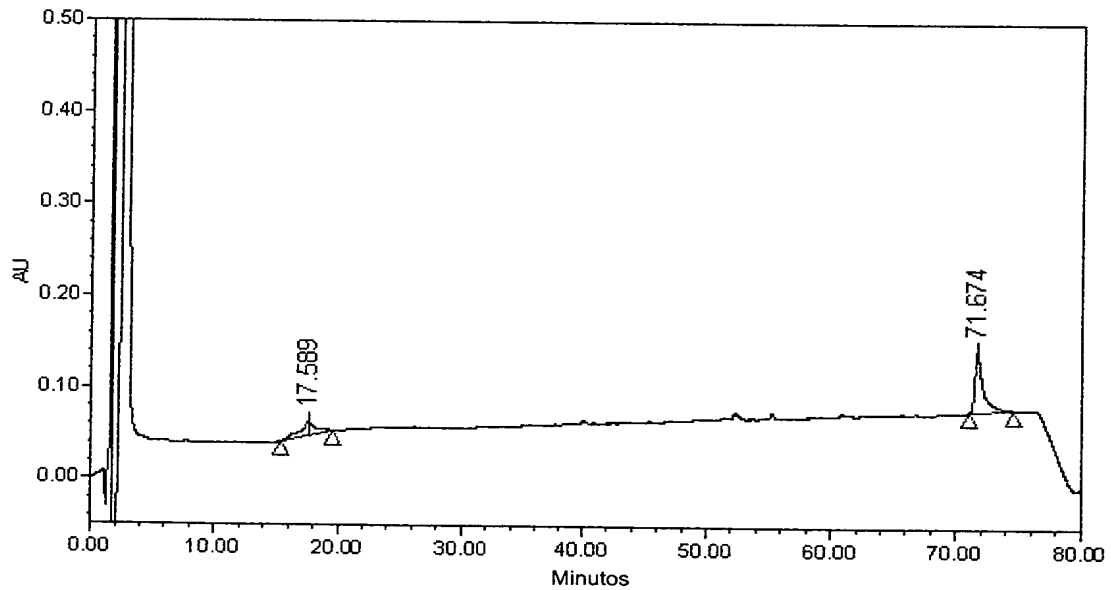


FIG.6



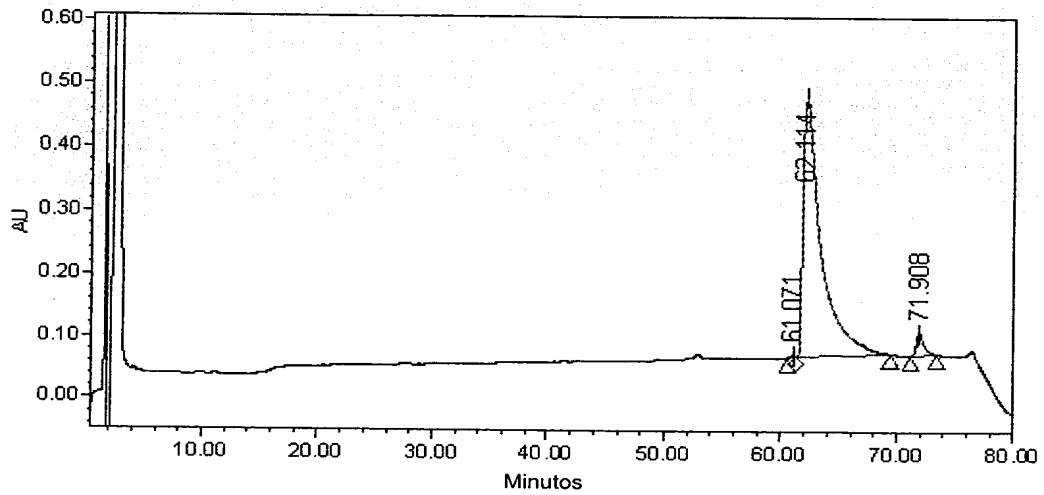
A concentração de fármaco de soro e a atividade após uma única injeção s.c. de $30 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ YPEG-rhIFN- α 2b SP2 em macaco comento Crab.

FIG.7



O controle vazio do Mapeamento de Peptídeo de Tripsinase da tripsina digeriu YPEG-rhIFN- α 2b SP2. Dois picos pequenos são detectados respectivamente a 71.674 minutos e 17.589 minutos; O pico de tripsina é detectado entre 2 a 3 minutos.

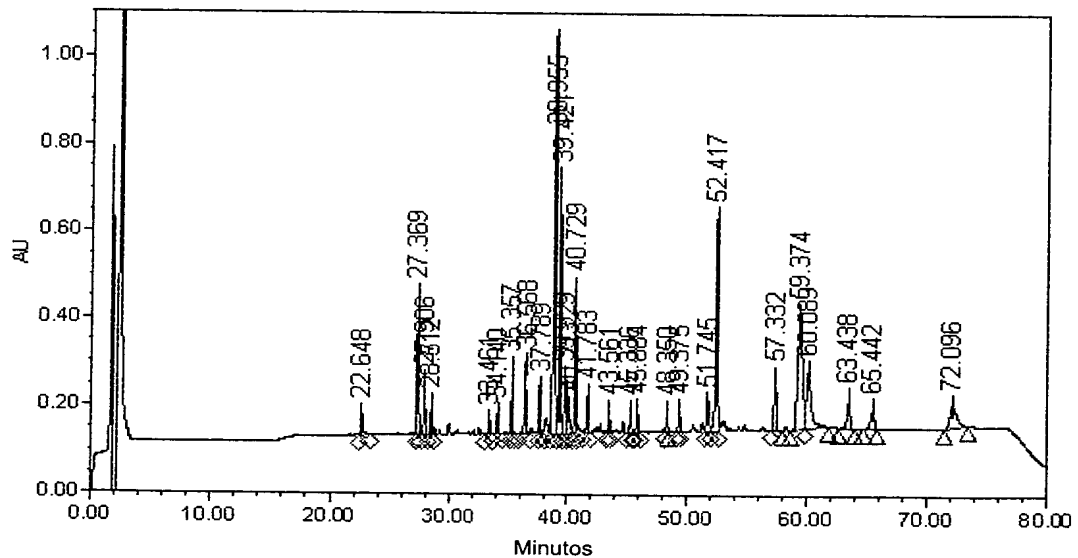
FIG.8



Mapeamento de Peptídeo de Tripsinase da tripsina digeriu (0h) a amostra de YPEG- IFN- α 2b SP2 por HPLC-RP C₁₈.

O tempo de retenção de YPEG-IFN- α 2b SP2 é de 62,114 minutos; o pico de eluição a 71.908 minutos é o pico de base, e os picos a 2-3 são os picos de tripsina.

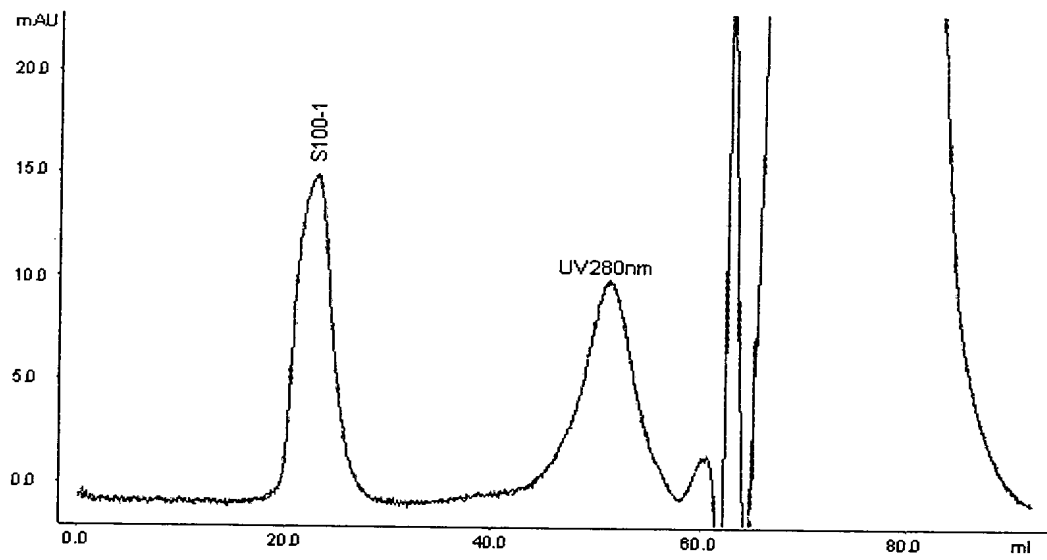
FIG.9



Mapeamento de Peptídeo de tripsinase da tripsina digeriu (48 horas) a amostra de YPEG-IFN- α 2b SP2 por HPLC-RP C₁₈.

Nenhum pico de substrato (62,114 minutos) é detectado entre 60,5 minutos – 63,2 minutos, demonstrando que a amostra é completamente digerida.

FIG.10



Perfil de separação de Sephacryl S-100 HR dos peptídeos modificados por YPEG da tripsina digeriu completamente a amostra de the YPEG modified peptides from the trypsin completely digested YPEG.

Nota: as amostras são coletadas de acordo com os picos, e S100-1 é o peptídeo modificado por YPEG, a sber, a amostra alvo.

FIG.11

RESUMO

Patente da Invenção: **"INTERFERON ALFA 2B MODIFICADO POR POLI-ETILENO GLICOL, PREPARAÇÃO E USO DO MESMO"**.

5 A presente invenção refere-se ao interferon- α 2b modificado com polietileno glicol (PEG) de ramificação em forma de Y em um único resíduo Lys e a preparação do mesmo. O IFN- α 2b PEGuilado pode ser usado para a preparação de um medicamento para tratar uma doença, por exemplo, infecções virais tais como Hepatite C.