



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0804889-4 B1



(22) Data do Depósito: 22/08/2008

(45) Data de Concessão: 25/05/2021

(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE INTERFERON COM ÓXIDOS DE POLIALQUILENOS E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: C07K 14/555; C07K 14/56; A61K 38/21.

(52) CPC: C07K 14/555; C07K 14/56; A61K 38/21.

(73) Titular(es): BLAUSIEGEL INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP.

(72) Inventor(es): MARIA HELENA ANDRADE SANTANA; CARLOS ROQUE DUARTE CORREIA; FABIO CESAR GOZZO; PABLO DAVID GRIGOL MARTINEZ; FERNANDA DE MENDONÇA MACEDO; ELIZA YUKIE SAITO.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE INTERFERON COM ÓXIDOS DE POLIALQUILENOS E SEUS USOS. A presente invenção descreve um processo de produção de conjugados de interferon com óxidos de polialquileno, no qual a composição farmacêutica, ou perfil de conjugação polímero-proteína é advinda de pH levemente básico, (7,2- 8,0). A presente invenção refere-se ainda à aplicação de tais conjugados na área farmacêutica. Tais conjugados de interferon com óxidos de polialquileno são utilizados como medicamentos no tratamento de hepatite B e C, bem como no combate de neoplasias, por exemplo, sarcoma de Kaposi e alguns tipos de leucemia e melanomas malignos.



PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CONJUGADOS DE INTERFERON COM ÓXIDOS
DE POLIALQUILENOS E SEUS USOS.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um processo de produção
5 de conjugados de interferon com óxidos de polialquilenos e
seus usos.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Várias proteínas naturais e recombinantes apresentam
utilidade médica e farmacêutica. Uma vez que tenham sido
10 purificadas e formuladas, elas podem ser administradas de
forma parenteral em relação a varias indicações
terapêuticas. Contudo, as proteínas administradas
parenteralmente poderão ser imunogênicas e possuir uma
curta meia-vida plasmática. Consequentemente, poderão
15 causar reações adversas, e não atingirem níveis sanguíneos
terapeuticamente úteis nos pacientes, devido à degradação
enzimática, metabolização rápida e eliminação. O curto
tempo de meia-vida plasmática requer a administração
frequente das proteínas, causando flutuações nos seus
20 níveis plasmáticos e redução da sua eficiência terapêutica.
Adicionalmente, os picos de concentração plasmática
decorrentes da administração das proteínas podem também
elicitare reações adversas.

Estes problemas poderão ser superados conjugando-se
25 as proteínas com polímeros biocompatíveis.

A conjugação com óxidos de polialquilenos melhora as
propriedades farmacológicas das proteínas por reduzir a sua
imunogenicidade, proteger contra a degradação enzimática e
prolongar o seu tempo de meia-vida na corrente sanguínea.

30 A conjugação com polietilenoglicol (PEG), ou

peguilação, é atualmente um método bem desenvolvido para aumentar a potência terapêutica das proteínas e reduzir a sua frequência de administração, melhorando assim a qualidade de vida dos pacientes. A natureza hidrofílica do polietilenoglicol e a mobilidade das cadeias de PEG conjugadas formam uma barreira que protege as proteínas do ataque de enzimas e outros compostos agressores do meio ao qual estão expostas. Além disso, a peguilação aumenta o tamanho da proteína conjugada, reduzindo a sua taxa de eliminação renal, a qual é inversamente proporcional ao raio de Stokes da molécula de PEG.

Apesar dos efeitos benéficos sobre a meia-vida das proteínas, a peguilação produz mudanças conformacionais nas proteínas e efeitos estéricos, os quais reduzem a afinidade da ligação com os receptores celulares. Portanto, para atingir as propriedades farmacológicas desejadas, o processo de peguilação deve ser otimizado em termos do tamanho da cadeia de PEG, e das condições operacionais que determinam os sítios de conjugação na proteína.

Os interferons, conhecidos pela sigla IFN, são proteínas produzidas pelo organismo humano em resposta a estímulos causados por agentes externos tais como vírus, bactérias e antígenos. Eles atuam através da ligação a receptores específicos na superfície das células, mediando assim a sua atividade biológica. O IFN alfa-2, o mais conhecido dentre os IFNs, é uma proteína de 19kDa, que possui atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora sobre vários tipos de células. O IFN alfa-2 recombinante tem sido usado no tratamento de várias doenças virais, como hepatites e HIV, e câncer como leucemia e

sarcoma de Kaposi. O IFN alfa-2 sintético tem alta toxicidade. Porém, a malignidade dessas doenças faz com que os efeitos colaterais sejam suportados. Os IFNs são produzidos na fase inicial da infecção e constituem a primeira linha de resistência a muitas viroses. Um grupo de interferons (IFNa e IFNb) é produzido por células infectadas por vírus, e um grupo (IFNg) é sintetizado por determinadas células ou linfócitos T ativados.

A conjugação do IFN alfa a polialquilenos tais como dextrana, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, PVA e polissacarídeos, aumenta o seu tempo de meia-vida, reduz a taxa de excreção renal, porém a camada hidrofílica protetora reduz as interações com os receptores celulares. A pegulação do IFN é bem conhecida, e utiliza PEGs com massa molar desde 5kDa até 40kDa, com cadeias lineares ou ramificadas, com diferentes grupos ativados mediadores da conjugação e com uma ou múltiplas conjugações por molécula de IFN.

A reação de conjugação do PEG ao IFN é dramaticamente dependente do pH do meio e da acessibilidade do solvente. A importância dessa dependência não se restringe simplesmente ao rendimento da conjugação, mas atinge principalmente a composição farmacêutica ou perfil de conjugação PEG-IFN, definido em termos de isômeros posicionais. O racional em termos da reação de conjugação é que ela não se processa em qualquer pH. Meios reacionais acentuadamente ácidos (pH 3,0 a 5,0) ou acentuadamente básicos (pH 9,0 a 10,0) não levam à formação apreciável do produto conjugado. Quando o pH da reação encontra-se acima de 6,5, a pegulação nos sítios de lisina predomina em relação aos sítios de histidina e

cisteína. Esse comportamento é decorrente dos valores de pK, os quais são (6-7) para a histidina, (7-8) para os alfa-amino grupos da cisteína e (9-10) para as lisinas. Portanto, aumentando o pH reacional aumenta a quantidade da
5 forma nucleofílica desprotonada da lisina, tornando-a o sítio ativo predominante, enquanto que baixando o pH de 6,5 para 4,5, o sítio ativo predominante é o das histidinas.

A presente invenção tem como finalidade descrever um processo simples, reprodutível e escalonável, de produção
10 da proteína interferon alfa conjugada com óxido de polialquileno, onde o conjugado obtido contém majoritariamente uma cadeia de óxido de polialquileno linear conjugada à proteína, e a composição farmacêutica gerada é advinda de pH na faixa levemente básica, em torno
15 de 7,3.

A presente invenção engloba também a aplicação desses conjugados de interferon na área farmacêutica uma vez que a proteína conjugada tem a mesma função da proteína nativa. Esses conjugados serão utilizados como medicamento
20 apresentando menor imunogenicidade, menor suscetibilidade à degradação enzimática, maior tempo de meia vida plasmática e menor depuração renal, ou seja, uma maior potência terapêutica se comparada à proteína livre de PEG.

Os medicamentos comerciais contendo IFN são
25 empregados no tratamento de hepatite B e C, bem como no combate de neoplasias, por exemplo, sarcoma de Karposis e alguns tipos de leucemia e melanomas malignos.

ESTADO DA TÉCNICA

Processos de produção de conjugados de interferon com
30 óxidos de polialquileno já são conhecidos do estado da

técnica, mas, entretanto, todos os processos existentes que foram identificados possuem significativas diferenças em relação ao processo que é objeto principal deste documento.

A patente concedida US 6,042,822 cuja patente
5 européia correspondente é a EP 1039922 intitulada
"Interferon polymer conjugates" reivindica o produto, IFN α -2b conjugado com vários polímeros. Os sítios de peguilação consistem em pelo menos 8 resíduos de aminoácidos (Cis1, Lys31, His34, Lys49, Lys83, Lys121, Lys131, Lys134) sendo
10 que o isômero majoritário é aquele em que a peguilação ocorre na His34. O óxido de polialquileno utilizado é, preferencialmente, o monometóxi polietileno glicol linear com tamanho de cadeia entre 0,2 e 35kDa. Porém, são também reivindicados outros polímeros não-antigênicos dos grupos
15 polipropileno glicol, dextrana, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, PVA e polissacarídeos). O pH da reação varia de 4,5 a 6,8. Entretanto, na presente invenção a proteína utilizada é o IFN α -2a e o pH fisiológico durante a reação é levemente básico estando na faixa de 7,2 a 8,0.
20 Além disso, na etapa de purificação, a purificação é feita em coluna catiônica e pH na faixa ácida enquanto que a purificação no referido documento é realizada em coluna aniônica e pH na faixa básica.

A patente concedida EP 0809996, intitulada,
25 "INTERFERON CONJUGATES" é referente a um processo de síntese do IFN α -2a conjugado a um polímero de metoxipolietilenoglicol ramificado tendo como espaçador entre as ramificações o aminoácido lisina. A massa molecular da cadeia polimérica varia entre 26kDa e 66kDa. A
30 presente invenção também utiliza o polímero de

metoxipoli(etil)enoglicol, só que linear e com um tamanho de cadeia diferente, isto é, de 2kDa a 20kDa.

A patente US 5,711,944, intitulada "INTERFERON POLYMER CONJUGATES", de 1998 descreve um processo de
5 conjugação de IFN α com um óxido de polialquilenos ativado na presença de um surfactante. As condições operacionais não são especificadas, mas apenas escritas como suficientes para promover a conjugação covalente entre o polímero e o IFN α . A razão molar entre o interferon e o polímero é de
10 1:1 a cerca de 8:1. Preferencialmente, o óxido de polialquilenos empregado é o monometoxipoli(etil)enoglicol, com tamanho de cadeia entre 0,2 e 35kDa. Os grupos ativadores são carbonato de N-succinimidila ou succinato de succinimidila ou hidrazina. O surfactante de preferência é
15 o dodecilsulfato de sódio, mas é feita menção também ao dodecilsulfato de lítio, compostos quaternários de amônio, ácido caprílico, ácido decano sulfônico, polioxietileno sorbitans, éteres de polioxietileno e mistura desses. A concentração do surfactante é de 0,01% a 0,5 %. No processo
20 está incluído a separação e o isolamento dos conjugados contendo de 1 a 4 cadeias de óxido de polialquilenos, do IFN α .

A principal diferença deste processo para a presente invenção é que o presente invento não utiliza um
25 surfactante em seu processo.

A patente US Patent 5,738,846, intitulada, "INTERFERON POLYMER CONJUGATES AND PROCESS FOR PREPARING THE SAME", de 1998 reivindica um processo de conjugação covalente de proteínas do tipo interferon
30 (preferencialmente o IFN α -2b) com polímeros não antigênicos

tais como óxidos de polialquilenos, dextranas, polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, polivinil álcoois e polícarboidratos. Os polímeros são bis-ativados, isto é, com as duas extremidades da cadeia polimérica

5 funcionalizada preferencialmente com grupos carbonato de N-succinimidila ou de p-nitrofenila ou carbonil imidazol. O polímero preferencialmente empregado é o polietilenoglicol. Uma mistura do polímero mono-interferon e polímero bis-interferon conjugado numa proporção que varia de 1:1 a

10 cerca de 1:5 é obtido como produto do processo. A proporção reacional entre o óxido de polialquilenos e a proteína varia entre 0,125:1 a cerca de 1:1. O tamanho da cadeia do polímero está entre 0,6 a 60kDa. É reivindicada, também, a utilização do surfactante dodecilsulfato de sódio na

15 reação, sendo que as condições operacionais não são especificadas, mas apenas escritas como suficientes para promover a conjugação covalente entre o polímero e interferon.

Na presente invenção não é feito uso de surfactante,

20 o polímero não antigênico não é bis ativado e a razão molar entre o óxido de polialquilenos e o interferon varia de 1:1 até 8:1, de modo que o produto obtido apresenta uma relação cadeia de óxido de polialquilenos por proteína maior ou igual a 1.

25 A patente brasileira 9703421-5 depositada em 02/06/1997 e concedida em 25/11/2003 cujo título é "CONJUGADOS DE INTERFERON", em nome de F. Hoffmann-La Roche Ag. (CH), se refere a uma nova classe de derivados PEG de interferon α (IFN α), preferencialmente IFN α 2a. O conjugado

30 desta invenção possui uma estrutura PEG ramificada com

propriedades aperfeiçoadas incluindo estabilidade superior, solubilidade superior, meia vida circulante melhorada e tempo de residência de plasma.

O conjugado é produzido por ligação covalente de IFN α com PEG que foi ativada por substituição de hidroxila de PEG com um grupo de ligação formando um reagente que é um derivado de éster N-hidróxi succinimida de PEG, especialmente, monometóxi PEG (m-PEG).

O processo de purificação utilizado é a cromatografia de troca de cátion, o qual separa conjugados por diferença de carga, o que efetivamente separa os conjugados em seus vários pesos moleculares.

A principal diferença entre este processo e o processo da presente invenção é que na presente invenção o conjugado possui uma estrutura de PEG linear.

A publicação internacional WO 99/32140, de título "ALPHA-INTERFERON-POLYMER-CONJUGATES HAVING ENHANCED BIOLOGICAL ACTIVITY AND METHODS OF PREPARING THE SAME" cuja patente europeia EP 1037657 já é concedida se refere aos métodos para tratar conjugados de polímero de IFN α . O processo inclui as etapas de: (a) formar um conjugado de um IFN α com um polímero ativado em solução; (b) acidificar a solução contendo conjugado de (a) para um nível de pH efetivo para seletivamente quebrar qualquer integração do polímero que reduza a bioatividade do interferon conjugado; e (c) ajustar a solução acidificada de (b) para um pH fisiologicamente aceitável.

Os conjugados IFN α são preferencialmente formados por reagir um polímero não-antigênico ativado-carbamato com IFN α em uma razão molar de 1:8 a 8:1 (moles de polímero

por moles de IFN). O polímero é, preferencialmente, um óxido de polialquileno, tal como polietileno glicol tendo um peso molecular de 0,6 a 60kDa.

5 Porém, as diferenças são claras em relação ao presente pedido, tendo em vista que o processo da presente invenção não possui as etapas b e c.

A patente norte americana US 5,951,974 intitulada "INTERFERON POLYMER CONJUGATES" de 1999 reivindica o produto e processo. O produto compreende uma composição
10 farmacêutica contendo uma mistura de cerca de 8 isômeros posicionais de interferon alfa conjugado covalentemente a um polímero não antigênico mono ativado. O isômero majoritário é aquele cujo polímero está conjugado ao resíduo da histidina 34 da proteína. O interferon é o
15 interferon alfa-2b. O polímero é um óxido de polialquileno com um grupo alquil terminal (preferencialmente o monometóxi polietileno glicol) com tamanho de cadeia entre 0,2 e 35kDa. É feita menção a polímeros não antigênicos como óxidos de polialquileno, dextran,
20 polivinilpirrolidonas, poliacrilamidas, polivinil álcoois e policarboidratos. O grupo ativado do polímero para promover a conjugação é o carbonato de succinimidila. As condições operacionais incluem um pH menor que 7 (preferencialmente entre 4,5 e 6,8) com um excesso molar do óxido de
25 polialquileno entre 1 e 8 vezes em relação ao interferon alfa.

A principal diferença da patente descrita acima para o presente invento é o pH reacional que na invenção é fisiológico e levemente básico (7,2-8,0). A proteína
30 utilizada é o interferon alfa 2a. As variações no pH

durante a etapa de reação alteram a composição farmacêutica em termos dos isômeros posicionais no que se refere às ligações nos sítios de Lisina e Histidina. Sendo assim, a composição farmacêutica oriunda da presente invenção é
5 advinda de pH na faixa levemente básica enquanto que na patente US 5.951.974 a composição farmacêutica é advinda de pH na faixa levemente ácida. Além disso, na etapa de purificação, a purificação é feita em coluna catiônica e pH na faixa ácida enquanto que a purificação no referido
10 documento é realizada em coluna aniônica e pH na faixa básica.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção tem como principal objetivo descrever um processo de produção de conjugados de
15 interferon com óxidos de polialquilenos, que produz um novo perfil de polímero-proteína, gerando uma nova composição farmacêutica.

Um segundo objetivo da presente invenção refere-se à aplicação de tais conjugados na área farmacêutica. Os
20 conjugados de interferon com óxidos de polialquilenos da presente invenção são utilizados como medicamentos no tratamento de hepatite B e C, bem como no combate de neoplasias, por exemplo, sarcoma de Kaposi e alguns tipos de leucemia e melanomas malignos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

25 A figura 1 é um fluxograma do processo de produção de conjugados de interferon com óxidos de polialquilenos da presente invenção.

A figura 2 representa um gel de poliacrilamida da
30 eletroforese dos produtos obtidos da conjugação de

interferon com o óxido de polialquileno monometoxipoli(etileno)glicol (mPEG) através do processo da presente invenção.

5 A figura 3 representa um perfil de eluição com gradiente linear, do processo de purificação em resina aniônica dos produtos obtidos da conjugação de interferon com óxido de polialquileno monometoxipoli(etileno)glicol (mPEG) através do processo da presente invenção

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção descreve um processo de conjugação da proteína interferon com um polímero biocompatível. Os polímeros utilizados são óxidos de polialquileno monofuncionais tendo como sítios de ligação quaisquer átomos ou fragmentos potencialmente nucleofílicos
15 como, por exemplo: grupos aminos, hidroxilas, histinas e cisteínas. Todavia, como exemplo, podemos citar o metoxipoli(etileno)glicol e metoxipropil(en)oglicol de cadeia linear com massa molecular entre 2kDa e 20kDa.

O óxido de polialquileno ativado é escolhido de
20 acordo com a função que se deseja para o conjugado polímero-proteína ou dos custos comercial destes. Na presente invenção utilizou-se como grupo reativo um carbonato misto de óxido de polialquileno e N-succinimidila. O processo consiste das seguintes etapas:

- 25 i) Reação para a obtenção da proteína conjugada,
ii) Separação da proteína conjugada e da proteína nativa que não reagiu dos sais e do solvente orgânico (DMF) contidos no meio reacional, e
iii) Purificação para a obtenção do produto final.

30 DETALHAMENTO DAS ETAPAS DO PROCESSO

i) A etapa de reação é conduzida em condições brandas, isto é: temperatura ambiente (25°C), meio aquoso, pH fisiológico levemente básico na faixa de 7,2 a 8 e tampão de fosfato.

5 A reação inicia-se quando uma solução de interferon alfa-2a (IFN α -2a), obtido de qualquer fonte, é adicionada sobre uma solução de tampão fosfato sob agitação ajustando-se a concentração final do tampão na mistura reacional para que seja 100mM.

10 O óxido de polialquileno (m-PEG) é ativado com carbonato de N-succinimidila para torná-lo capaz de reagir com os sítios nucleofílicos da proteína.

O m-PEG-N-succinimidil carbonato é primeiramente solubilizado em dimetilformamida (DMF) e posteriormente
15 adicionado à mistura reacional de forma lenta e durante todo o período da reação. O óxido de polialquileno ativado escolhido foi o mPEG-N-Succinimidil Carbonato (PEG-Suc) de tamanho de cadeia 10kDa. A relação molar entre o IFN α 2a e o PEG-Suc é de até 1:8, sendo preferível 1:5. Esta adição
20 tem que ser gradativa, preferencialmente em intervalos de 20 minutos, para corrigir as perdas por hidrólise e manter aproximadamente constante a concentração de PEG-Suc no meio. O IFN α 2a reage com o PEG-Suc durante todo o tempo das adições sucessivas. O tempo de reação é de até 2 horas.

25 O controle do pH na etapa de reação é um parâmetro importante uma vez que a reação de conjugação não se processa em qualquer pH. Meios reacionais acentuadamente ácidos (pH 3,0 a 5,0) ou acentuadamente básicos (pH 8,5 a 10,0) não levam à formação apreciável do produto conjugado.
30 Adicionalmente, o pH da reação determina a composição

farmacêutica do produto em termos de isômeros posicionais da ligação do PEG ativado ao IFN α -2a, ou seja em termos dos sítios de peguilação do interferon, os quais são dependentes da forma nucleofílica desprotonada dos aminoácidos do interferon, para ligação com o PEG ativado.

A quantificação do interferon peguilado não é trivial com relação à quantificação do interferon nativo por métodos específicos padronizados. As patentes da literatura não especificam ou detalham os métodos utilizados para a quantificação dos produtos da reação, dificultando a comparação da conversão da reação. Na presente invenção, a conversão da reação foi determinada por método de eletroforese em gel, que foi corado com prata e analisado quantitativamente através de densitometria, mediante curva de calibração construída com o IFN α 2a nativo. A conversão é da ordem de 30 a 35% quando preferencialmente são utilizados o IFN α -2a e m-PEG de tamanho de cadeia 10kDa.

ii) A etapa de separação é realizada após o término da etapa de reação. A mistura reacional pode ser submetida à qualquer processo de separação, preferencialmente aqueles que utilizam membranas. Na presente invenção foi utilizada ultrafiltração, em dispositivo operando com força centrífuga de 1030g, à temperatura de 25°C com membrana de corte de 10kDa.

A proteína conjugada, a proteína nativa e uma fração do polímero (com massa molecular maior que 10kDa) ficam retidas na membrana, enquanto que os sais do tampão, o DMF e as cadeias de polietilenoglicol com massa molecular menor que o diâmetro de corte da membrana são filtrados. Essa etapa de separação também pode ser realizada através de

diálise, com membrana de diâmetro de corte adequado.

O material filtrado é analisado por SDS-PAGE para verificar se contém proteína ou proteína peguilada. Nos experimentos realizados durante a invenção, não foi observado, em nenhum momento, estes componentes. Por isso, o filtrado é descartado, uma vez que contém apenas os sais do tampão, DMF e também parte do polietilenoglicol remanescente da reação, que não têm necessidade de recuperação.

A fase retida na membrana contendo a proteína conjugada, a proteína nativa (PEG-IFN α -2a e IFN α -2a) e uma fração do polímero pode ser submetida à troca do tampão fosfato, conforme as condições da purificação por troca iônica. A troca de tampão é necessária para a proteína adquirir carga oposta à da resina de purificação. Esse processo é realizado por qualquer processo de troca como diálise, eluição em gel, etc., todos já conhecidos pelo estado da técnica. Na presente invenção o tampão fosfato da reação foi trocado pelo tampão acetato de sódio a 25mM e pH=4,3. Nestas condições, a mistura está pronta para ser purificada para a purificação em coluna de resina aniônica.

iii) A etapa de purificação se dá por cromatografia de troca iônica utilizando uma resina aniônica forte do tipo sp (Source 15S 4.6/100PE), e portanto a resina que recheia a coluna é aniônica (capaz de trocar o cátion).

A eluição das proteínas, PEG-IFN α 2a e IFN α 2a, retidas na resina é feita através de gradiente linear de força iônica. Na presente invenção, foram utilizadas duas soluções tampão: Solução tampão A: acetato de sódio 25mM e pH=4,3 e Solução tampão B: acetato de sódio 25mM, NaCl

500mM em pH=4,3.

Obtêm-se três frações correspondentes: proteína conjugada ao óxido de polilalquileno, proteína nativa não reagida e uma fração contendo uma mistura de ambas.

5 O pH do meio de purificação influencia na desnaturação da proteína e a coluna utilizada influencia no grau de pureza do produto.

A proteína conjugada ao óxido de polilalquileno obtida pode ser submetida a processos convencionais de secagem tal
10 como liofilização, para sua preservação durante a estocagem.

EXEMPLO E RESULTADOS COMPARATIVOS

Exemplo 1

Sobre uma solução tampão de fosfato 200mM. adicionou-se
15 se 0,612mL de água deionizada e, em seguida, 0,207mL da solução de interferon nativo (IF) na concentração de 2,41mg/mL ($2,60 \cdot 10^{-5}$ mmol, 0,5mg). Em seguida, adicionou-se à temperatura ambiente, uma solução do carbonato misto de N-succinimidila e monometoxipoli(etileno)glicol (mPEG-Suc)
20 70% em dimetilformamida (DMF) na concentração de 65mg/mL. A adição do mPEG-Suc foi gradativa, com 4μL a cada 20 minutos, durante 2 horas. Após 20 min da última adição, a mistura reacional foi transferida para um dispositivo de separação por ultrafiltração, utilizando membrana com massa
25 molecular de corte de 10kDa e centrifugação de 1030g durante 20 minutos. Adicionalmente, foram feitas três lavagens com 1 mL de água deionizada, seguida de centrifugação nas mesmas condições. A solução retida na membrana, composta de mPEG-IF, IF nativo e mPEG, foi
30 estocada a 4°C.

Anterior à etapa de purificação, a solução proveniente da separação por ultrafiltração foi dialisada contra uma solução tampão de acetato de sódio 25mM e pH 4,3, durante 24 horas à temperatura de 4°C. A purificação
5 foi realizada por cromatografia de troca iônica, utilizando coluna de troca catiônica forte (GE Source 15S 4.6/100PE), com duas soluções tampão de acetato de sódio, 25mM, pH 4,3 (Tampão A) e acetato de sódio 25mM pH 4,3 com 500mM de NaCl.

10 A eluição foi feita utilizando um gradiente linear de força iônica, à vazão de 1 mL/min, com os seguintes volumes: 12 mL de solução tampão A (100%), ou 7 volumes de coluna (volume de coluna representa a fração de vazios na
coluna: volume total - volume de recheio); 42,5 mL de
15 solução tampão B (0 a 100%) em um gradiente linear, ou 25 volumes de coluna; 8,5 mL de solução tampão B (100%), ou 5 volumes de coluna.

O tempo total de eluição foi de 60 a 70 min. Obtiveram-se três frações correspondentes à: proteína
20 conjugada ao óxido de polilalquileno, proteína nativa não reagida e uma fração contendo uma mistura de ambas.

A análise dos produtos da reação foi feita por eletroforese em gel de acrilamida 13,5% e voltagem 100V.

A título de ilustração e comparação dos resultados, a
25 reação de conjugação do interferon com óxidos de polialquilenos foi realizada nos pHs 7,3, 6,4 e 5,4.

Em todos os casos, os interferons, nativo e peguillado, foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, corados com prata e quantificados por densitometria.

30 Os resultados são visualizados na Tabela 1 que mostra

o rendimento obtido e a razão densitométrica entre o interferon peguilado e o interferon residual (que não reagiu) em relação ao pH da reação, quando foi utilizada a curva de calibração em relação ao IF nativo.

5 Tabela 1

pH	Conversão (%)	Razão densitométrica monoPEG-IF/IF	Razão densitométrica diPEG-IF/IF
5,4	<15	0,23	0,0
6,4	<15	0,25	0,0
7,3	~30-35	0,90	0,08

O interferon residual não perde a sua atividade original, podendo ser reciclado no processo da presente invenção.

A variação do pH não somente altera a conversão do processo, mas também a composição farmacêutica em termos de isômeros posicionais, ou seja do perfil proteína-polímero. Adicionalmente à nova forma farmacêutica gerada, advinda do pH 7,3 objeto da presente invenção, a reação à pH 7,3 tem a vantagem de produzir maior conversão comparada à reação à pH 5,3 e 6,5, com seletividade em relação ao produto monopeguilado.

Ficará claro aos versados na técnica que variações no pH na faixa de 7,2-8,0 podem ser feitas, sem com isso fugir do conceito inventivo e escopo da invenção. Assim, pretende-se que a presente invenção cubra as modificações e variações dessa invenção, contanto que elas se encontrem no escopo das reivindicações apensas e seus equivalentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de produção de conjugados de interferon IFN α -2a com óxidos de polialquileno **caracterizado** por compreender as etapas de:

i) Reação para a obtenção da proteína conjugada, onde:

a) uma solução de interferon IFN α -2a é adicionada sobre uma solução tampão na faixa levemente básica (7,2 a 8,0).

b) o óxido de polialquileno é ativado com carbonato de *N*-succinimidila e posteriormente solubilizado em dimetilformamida (DMF);

c) a mistura resultante do item b) é adicionada, lentamente durante todo o período da reação, à mistura resultante do item a) obtendo-se assim a proteína conjugada;

ii) Separação das proteínas (conjugada e nativa que não reagiu) dos sais e do solvente orgânico (DMF) contidos no meio reacional.

iii) Purificação da mistura final;

2) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do interferon ser o IFN α -2a, obtido de qualquer fonte.

3) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do óxido de polialquileno utilizado ser monometóxi polietilenoglicol de cadeia linear com massa molecular de 2kDa a 20kDa.

4) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da adição do item c) ser gradativa.

5) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato do tempo de reação ser de até 2

horas.

6) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da razão molar entre o IFN $\alpha 2$:PEG-Suc no meio ser de até 1:8.

7) Processo, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato da conversão da reação ser de 30 a 35% quando utilizados o interferon IFN $\alpha 2a$ e m-PEG de tamanho de cadeia 10kDa.

8) Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato da separação poder ser feita por qualquer processo, preferencialmente os que envolvem membranas.

9) Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 8, **caracterizado** pelo fato da etapa de purificação ser realizada por cromatografia de troca iônica utilizando gradiente linear de força iônica na eluição.

10) Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato da cromatografia de troca iônica utilizar preferencialmente uma resina aniônica forte.

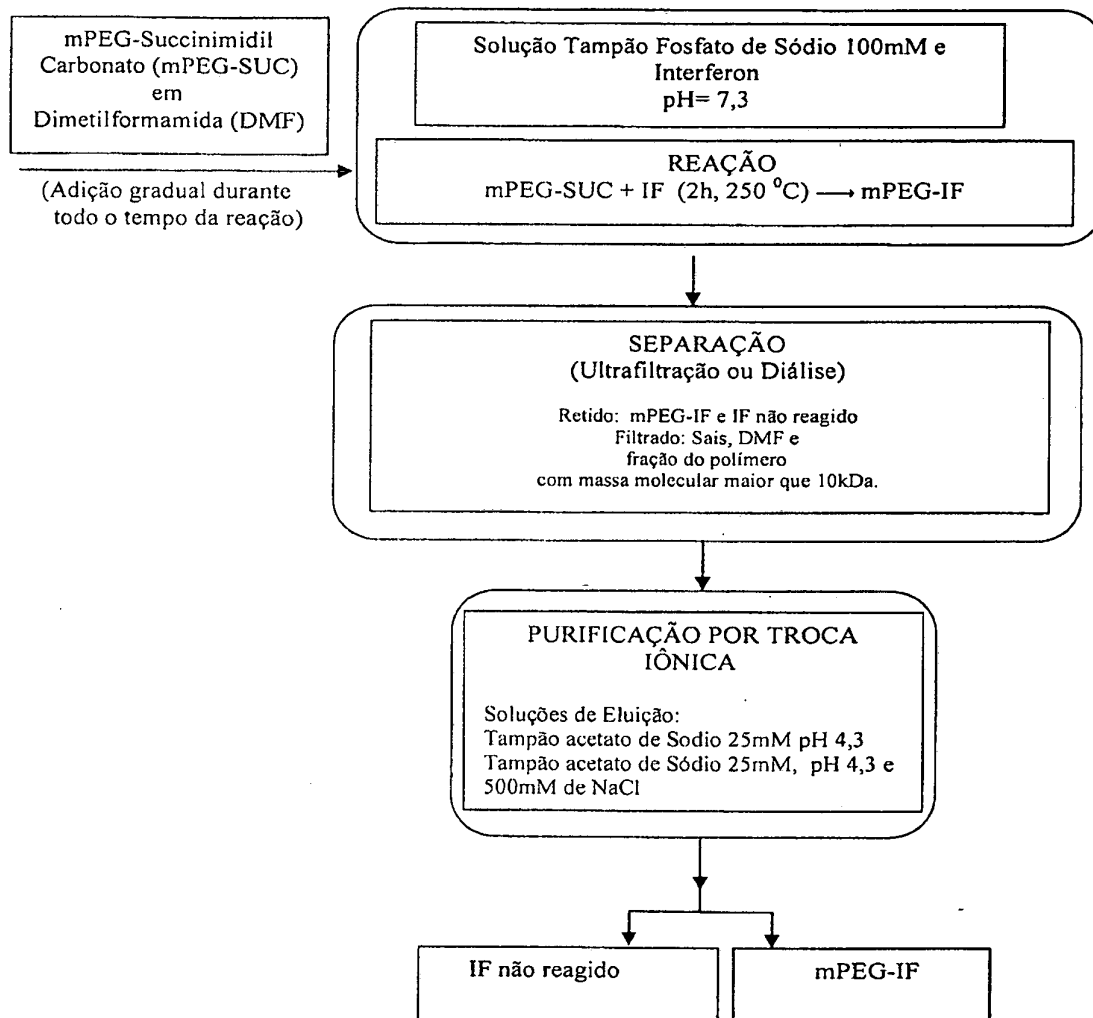


FIGURA 1

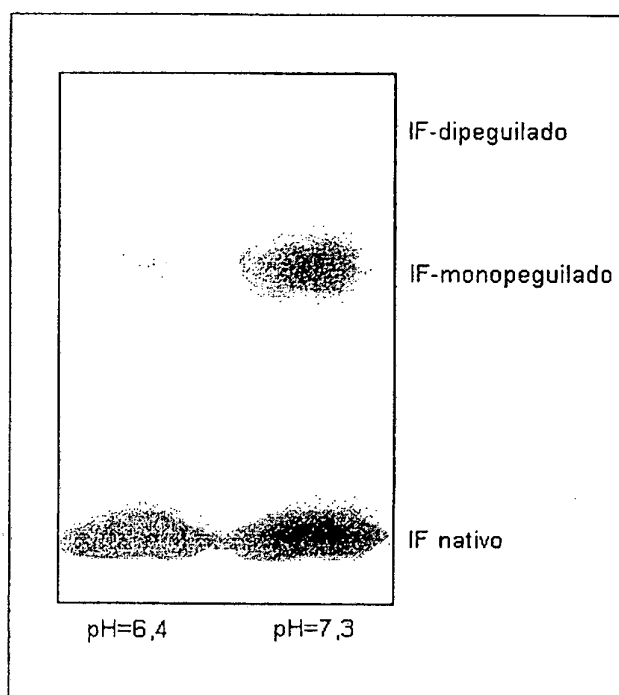


FIGURA 2

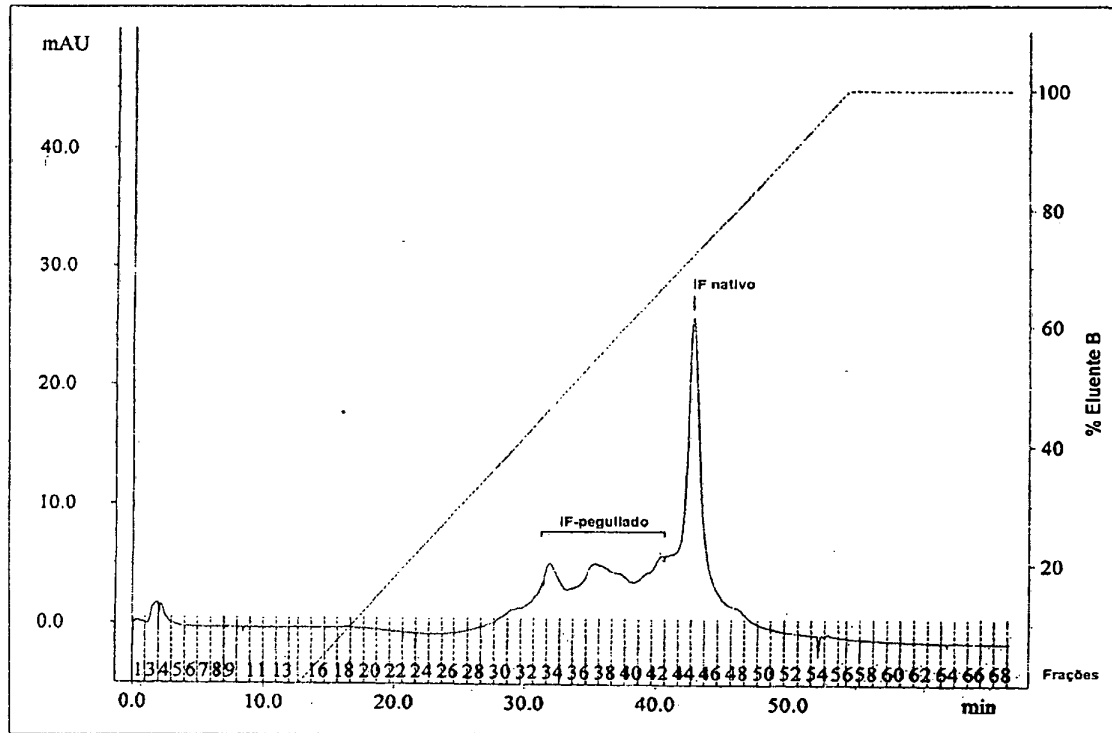


FIGURA 3