

## K I V O N A T

7 5 5 3 3

**Javított interferon/polimer konjugátumok**

SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US

A bejelentés napja: 1994.11.10.

Elsőbbsége: 1993.11.10., US 08/150,643

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/13207

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/13090

A találmány tárgya eljárás alfa-interferont tartalmazó, nyújtott hatású, a farmakokinetikai paraméterek tekintetében az eddig ismerteknél lényegesen előnyösebb polimer konjugátumok, valamint ezekből készült gyógyszerkészítmények előállítására és gyógyászati alkalmazására.

A találmány szerint a polimer-interferon konjugátumokat úgy állítják elő, hogy az alfa-interferont valamilyen szurfaktáns jelenlétében érintkezésbe hozzák egy alapvetően nem antigén tulajdonságú polimerrel, olyan körülményeket alkalmazva, amelyek megfelelőek ahhoz, hogy az alfa-interferon és a polimer összekapcsolódása végbemenjen, majd a terméket ioncserélő kromatográfiás eljárással frakcionálják.

jele. 25. 11. 1995  
Gruada

A

**S.B.G. & K.**  
Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.  
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

28479

**62.369/BE**

**1 2 4 7 / 9 6 KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY**

**Javított interferon/polimer konjugátumok**

**SCHERING CORPORATION, KENILWORTH, NJ, US**

Feltalálók

GILBERT Carl W., BASKING RIDGE, NJ, US

CHO Myung-Ok., HIGHLAND PARK, NJ, US

A bejelentés napja: 1994.11.10.

Elsőbbsége: 1993.11.10., US 08/150,643

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US94/13207

A nemzetközi közzététel száma: WO 95/13090

A találmány nyújtott hatású, interferont tartalmazó gyógyszerkészítményekre, ezek előállítására és gyógyászati alkalmazásukra vonatkozik.

Biológiailag aktív fehérjék egy vagy több tulajdonságának — ilyenek például a keringési élettartam, a vízdoldhatóság vagy az in vivo antigén sajátosság — előnyös megváltoztatására felmerült az az elgondolás, hogy célszerű lenne ezeket a fehérjéket polimerekkel konjugálni. Az U.S. 4 179 337 számú szabadalmi iratban, amely csupán hivatkozásként képezi találmányunk részét, például nyilvánosságra hozták azoknak a kezdeti próbálkozásoknak az eredményét, amelyek arra irányultak, hogy peptideket vagy polipeptideket polietilénglikollal (PEG) vagy hasonló vízdoldható polimerekkel kapcsoljanak össze.

Az első konjugált formában előállított hatóanyagok között találjuk az inzulint és a hemoglobint. Ezek a viszonylag nagy molekulájú peptidek tartalmaznak néhány szabad  $\epsilon$ -amino-csoportot, amelyek kapcsolódási helyként szolgálnak. Egyes polimerekkel a biológiai aktivitás jelentős csökkenése nélkül végezhető el az összekapcsolás.

Mindazonáltal az összekapcsolási művelet nem problémamentes. Szabályozatlanul végezve az összekapcsolást, vagy moláris feleslegben reagáltatva a polimereket, bizonyos arány túllépése esetén inaktív konjugátumot kapunk. A nehézségek gyakran abból adódnak, hogy a terápiásan értékes hatásért felelős aktív centrumot — ez alatt a molekulának azt a részét értjük, ahol a biológiai aktivitást eredményező csoportok helyezkednek el — a hozzákapcsolt polimer blokkolja. Ennek elkerülése sokszor nagyon

nehéz feladatot jelenthet, mivel a polimer és a fehérje összekapcsolása tipikusan oldatban kivitelezett reakcióval történik. Lehetőségként szóba kerülhet az aktív centrum előzetes blokkolása — mintegy megvédése — bizonyos anyagokkal, például piridoxál-foszfáttal, a gyakorlatban azonban az eredmény ellentmondásosnak bizonyult. A problémák különösen élesen jelentkeznek kis molekulatömegű fehérjék és peptidek esetében, ezeknél a biológiailag aktív anyagoknál ugyanis nagyon kevés olyan kapcsolódási pont található, amely nem áll valamilyen módon kapcsolatban a biológiai aktivitással.

Az interferonok különösen jó példaként szolgálhatnak arra, hogy milyen eredményeket érhetünk el a konjugáció technikai megoldásának tökéletesítésével. Az U.S. 4 766 106 és U.S. 4 917 888 számú szabadalmi iratban például többek között leírják metoxi-polietilénglikol-N-szukcinimidil-glutaráttal vagy metoxi-polietilénglikol-N-szukcinimidil-szukcináttal konjugált béta-interferonok előállítását. A konjugációs reakciók kivitelezésénél a polimert viszonylag nagy moláris feleslegben (10-szeres, 20-szoros és 50-szeres) veszik.

A 0 236 987 számú európai szabadalmi bejelentésben leírják az alfa- és gamma-interferonok reakcióját nagy moláris feleslegben vett, alkil-imidsav-észter formában aktivált polietilénglikollal. A 0 510 356 számú európai szabadalmi bejelentésben piridil-karbonil- és piridil-tiokarbonil-csoporttal aktivált polietilén-glikolt alkalmazva alfa-interferon konjugálását ismer-tetik. Egyik esetben sem használtak azonban felületaktív anyagot, más néven szurfaktánst, a reakció kivitelezéséhez, és a

konjugált terméket nem frakcionálták, hogy ilyen módon a legkedvezőbb tulajdonságú konjugátumot izolálják.

A fent ismertetett szabadalmi hivatkozások ellenére az interferon-polimer konjugátumok nem bizonyultak elfogadhatónak, ugyanis az a legfőbb hibájuk, hogy az interferon ilyen módon elveszíti az aktivitását, a megmaradó aktivitás túlságosan alacsony. Gazdaságossági szempontból szintén nagy maga után némi kívánnivalót az eljárás, ugyanis a konjugáció némelykor nagyon rossz kitermeléssel megy végbe. A találmány célja ezeknek a hátrányoknak a kiküszöbölése.

A fentiek alapján a találmány tárgya tehát mindenekelőtt eljárás nyújtott hatású, alfa-interferont tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, ami abban áll, hogy az alfa-interferont valamilyen szurfaktáns jelenlétében érintkezésbe hozzuk egy alapvetően nem antigén tulajdonságú polimerrel, olyan körülményeket alkalmazva, amelyek megfelelőek ahhoz, hogy a fehérje és a polimer összekapcsolása végbemenjen. Az alfa-interferon lehet rekombináns technikával előállított vagy emlősekből izolált alfa-interferon.

Ami a konjugátum polimer részét illeti, az előnyösen egy poli(alkilén-oxid)(PAO), például egy poli(alkilén-oxid)-monometil-éter, mondjuk polietilén-glikol-monometil-éter (mPEG). A polimer lánc nem alkilezett végét valamilyen reaktív csoporttal, amely alkalmas arra, hogy az alfa-interferonnal, előnyösen egy alkotóelemként jelen levő lizin  $\epsilon$ -amino-csoportján kötést létesítsen, funkcionalizáljuk. A polimer relatív molekulatömege 200 és 35 000 között lehet. Természetesen használhatunk más alapve-

tően nem antigén tulajdonságú polimereket is.

A konjugációt befolyásoló reakciókörülmények között elsőként a molarányt kell említenünk. A polimert az alfa-interferonra vonatkoztatva viszonylag kis feleslegben vesszük, például 1 mól fehérjére rendszerint 1-8 mól, előnyösen 1,5-7 mól, illetve különösen előnyösen 1,75-5 mól polimert számítunk.

A reakciókörülményeket tekintve lényeges továbbá, hogy a reaktánsokat valamilyen szurfaktáns jelenlétében — ennek a mennyisége hozzávetőleg 0,1 és 1 tömegszázalék között lehet — hozzuk egymással érintkezésbe. A különösen előnyös ionos szurfaktánsok egyike például a nátrium-dodecil-szulfát — a nemzetközi szakirodalomban ismert nevén SDS —, de más ionos vagy nemionos szurfaktánsok szintén használhatók.

A keletkezett konjugátumban az alfa-interferon-molekulához mintegy 0-6 polimer lánc kapcsolódhat. A konjugációs lépést követően frakcionálással elválasztjuk a többitől a terméknek azt a részét, amely egy interferonmolekulára számítva 1-4 polimer láncot tartalmaz, bár legelőnyösebb az interferonmolekulánként 2 polimer láncot tartalmazó frakciót elkülöníteni.

A találmány tárgya továbbá eljárás emlősöknél az alfa-interferonnal eredményesen befolyásolható kóros állapotok kezelésére, ami abból áll, hogy egy, a fenti módon előállított konjugátum hatékony mennyiségét adjuk be az ilyen terápiára szoruló emlős egyednek.

A találmányunknak köszönhetően ma már rendelkezünk hosszú hatásidőtartamú, alfa-interferont tartalmazó konjugátumokkal. A találmány szerinti eljárással előnyösen olyan termékeket kapha-

A következőkben a jobb megértés végett a találmányt minden részletre kiterjedően ismertetjük.

A polimer konjugátum alfa-interferon (a következőkben röviden  $\alpha$ IFN) része különféle forrásokból származhat, így például előállíthatjuk rekombináns technikát alkalmazva, amikor is szintetikus géneket *E. coli*-ban expresszálunk [lásd Pestka: „Interferon  $\alpha$ ,” in Human Cytokines, Blackwell Scientific Publications 1-16 (1962)]. Származhat azonfelül az  $\alpha$ IFN emlősekből, így emberből is, vagy kérődzőből, például szarvasmarhából. Különösen előnyös az  $\alpha$ IFN egyik altípusa, az IFN $\alpha_{2b}$ , amelyet rekombináns DNS-technológiával a Schering Corp. (Kenilworth, NJ) állít elő. Az sem jelent különösebb problémát, ha az idegen fajtól származó  $\alpha$ IFN nem teljesen autológ, mivel a polimer láncok ráépítését jelentő módosítás megfelelően csökkenti az antigén tulajdonsággal kapcsolatos immunválaszt. A kulcskérdés sokkal inkább az, hogy a nem autológ  $\alpha$ IFN megfelelő biológiai aktivitással bír-e, azaz az alfa-interferon a kezelendő emlős egyedben képes-e vírusellenes hatást kifejteni.

Más anyagok, beleértve az  $\alpha$ IFN frakciókat vagy a prekursor polipeptideket, szintén alkalmasak lehetnek arra, hogy a találmány szerinti konjugátumok részét képezzék. Itt a leírásban az „ $\alpha$ IFN-hatás emlősökben” kifejezést olyan anyagokkal kapcsolatban használjuk, amelyek in vivo körülmények között az alfa-interferonra jellemző hatást fejtik ki. Ezeknek az anyagoknak az előállítása a szakterület művelői által jól ismert módszerekkel,

például szövettenyésztéssel, állati eredetű termékek extrakciójával vagy rekombináns DNS-technológiával történhez. Az úgynevezett transzgén forrásokból származó alfa-interferont vagy rokon szerkezetű termékeket szintén ide kell sorolnunk. Ezek az anyagok transzgén állatokból, például egérből, disznóból, szarvasmarhából vagy hasonlókól származhatnak, és az  $\alpha$ IFN típusú fehérje a tejben, vérben vagy a szövetekben lehet jelen. Könnyen belátható, hogy rekombináns technikával beépíthető a molekulába egy glikozilációs hely, így a rekombináns polipeptidhez egy szénhidrát is kapcsolódhat. Mindazonáltal ki kell mondanunk, hogy a találmány szerinti konjugátumokhoz megfelelő alfa-interferon előállításának lehetőségei semmiképpen nem korlátozhatók az itt ismertetett eljárásokra.

Az alfa-interferon bizonyos előnyökkel rendelkezik a többi interferon típussal, például a béta- vagy gamma-interferonnal szemben. A találmány szerinti alkalmazás céljára mindenképpen az alfa-interferonokat tartjuk előnyösnek, elsősorban biokémiai és szerológiai tulajdonságaik miatt. Részletesebben kifejtve, az  $\alpha$ IFN vírusellenes hatását már bizonyították, azonfelül a véráramba való bejutás tekintetében is felülmúlják a többi interferon típust. A találmány szempontjából különösen lényegesnek tartjuk azt a felismerést, hogy ellentétben más interferonokkal, az alfa-interferon esetében a polipeptid aktív centrumában három lizin található, és — amint azt megállapítottuk — meglepő módon, a találmány szerinti kapcsolási eljárásokat alkalmazva, ezek a lizinrészek kielégítően védettnek bizonyultak a polimer rákapcsolódásával szemben, vagyis a konjugáció úgy megy végbe,

hogy a polimer láncok többsége az alfa-interferon más lizinjeire kapcsolódik — olyanokra, amelyek nem hozhatók összefüggésbe a biológiai aktivitással — , és nem ezekre, amelyeknek a szubsztitúciója inaktiválódáshoz vezet.

Az  $\alpha$ IFN és a megfelelő nem antigén tulajdonságú polimer, például egy poli(alkilén-oxid), azaz PAO összekapcsolását úgy végezzük, hogy a polimer lánc végén elhelyezkedő hidroxicsoporthok egyikét valamilyen reaktív funkciós csoporttá alakítjuk át, mégpedig olyanná, amely az adott körülmények között lehetővé teszi a konjugációt. Ezt a műveletet gyakran aktiválásnak nevezik, a termék neve pedig aktivált poli(alkilén-oxid). Természetesen más alapvetően nem antigén tulajdonságú polimerek hasonlóképpen aktiválhatók, illetve funkcionálizálhatók.

Az aktivált polimereket az alfa-interferonnal úgy reagáltatjuk, hogy a kapcsolódás előnyösen a lizin molekularészek  $\epsilon$ -amincsoportján történjen meg, mindazonáltal szabad karboxicsoporthok, megfelelően aktivált karbonilcsoportok, oxidált szénhidrát molekularészek és merkaptocsoportok — ha ilyenek találhatók az interferonmolekulában — szintén kapcsolódási helyként szolgálhatnak.

A találmány szerinti eljárás egyik előnyös formáját valósítjuk meg, ha az  $\alpha$ IFN-molekulában található  $\epsilon$ -amino-csoportok és az aktivált poli(alkil-oxid) között uretán-kötést létesítünk. Előnyösen az uretán-kötések kialakítását az U.S. 5 122 614 számú szabadalmi iratban megadottak szerint hajtjuk végre. A leírásban nyilvánosságra hozott módszer szerint úgy járunk el, hogy a poli(alkilén-oxid)-ok N-szukcinimid-karbonát származékait állít-

juk elő. Az amidképző linkerekkel vagy hasonló csoportokkal aktivált polimerek szintén a találmány részét képezik, azonban, és ugyancsak használhatjuk a többi funkciós csoportot is, amelyek alkalmasak arra, hogy általuk a polimert egy  $\varepsilon$ -amino-csoporton vagy más csoporton keresztül az alfa-interferonhoz kapcsoljuk.

Az alapvetően nem antigén tulajdonságú polimerek közül elsősorban a monoaktivált és a láncvégen alkilezett poli(alkilén-oxid)-okat, így például a polietilénglikol-monometil-étereket (mPEG) tartjuk előnyösnek, de azok a poli(alkilén-oxid)-ok, amelyek kétszeresen aktiváltak (bisz-aktivált poli alkilén-oxid), szintén fontosak lehetnek például térhálósított alfa-interferonok előállításánál, vagy eszközként szolgálhatnak annak a lehetőségnek a kiaknázására, hogy ilyen módon valamilyen más molekulát is hozzákapcsoljunk a polimer- $\alpha$ IFN konjugátumhoz. Ez a hozzákapcsolt rész lehet többek között egy, a konjugátumot a kívánt helyre, például a májba célzottan eljuttató, úgynevezett „targeting” elem.

A találmány szerinti célnak megfelelő polimerek relatív molekulatömege széles határok között változhat, és általában 200 és 35 000 közötti relatív molekulatömegű polimerek közül választjuk ki azt, amellyel dolgozni akarunk, de előnyösnek az 1000 és 15 000 közötti, kiváltképpen a 2000 és 12 500 közötti relatív molekulatömegű polimereket tartjuk.

Előnyös, ha a kiválasztott polimer vegyület szobahőmérsékleten vízzel oldható. A korlátozás szándéka nélkül említhetjük az ilyen tulajdonságú polimerek közül a poli(alkilén-oxid) homopolimereket, például a polietilén-glikolt (PEG) vagy a



polipropilénglikolt, a poli(oxi-etil)-ezett polioloikat, illetve ezek kopolimerjeit vagy az ilyen alkotóelemekből álló blokkpolimereket, feltéve, hogy a blokkpolimer vízzoldhatósága változatlanul megmarad. A polietilénglikol-monometil-éteren kívül az 1-4 szénatomos alkil-éterek szintén használhatók.

A PAO-bázisú polimereken kívül, mintegy azok helyettesítésére használhatunk más, ténylegesen nem antigén tulajdonságú anyagokat, így például dextránt, poli(vinil-pirrolidon)-okat, poliakrilamidokat, poli(vinil-alkohol)-okat, szénhidrát alapú polimereket és hasonlókat. Az e területen átlagos ismeretekkel rendelkező szakember is azonnal láthatja, hogy a felsorolt anyagok csupán a szemléltetést szolgálják, és a találmány szerinti konjugátumhoz bármely, az itt közölt tulajdonságokkal bíró polimer anyag alkalmas lehet. A „ténylegesen nem antigén tulajdonságú” kifejezést illetően annyi magyarázattal tartozunk, hogy ebbe a kategóriába soroljuk mindazokat az anyagokat, amelyekről tudományos megalapozottsággal állíthatjuk, hogy ismereteink szerint nem toxikusak, és emlőszövetben nem váltanak ki észlelhető immunválaszt.

A találmány szerinti eljárás során használatos szurfaktánsok előnyösen ionos típusúak. Az egyik különösen előnyösnek tartott ilyen anyag a nátrium-dodecil-szulfát (a nemzetközi szakirodalomban röviden SDS), mindazonáltal más ionos szurfaktánsokat is használhatunk, például lítium-dodecil-szulfátot, kvaterner ammónium-vegyületeket, taurokólsavat, oktánsavat, dekánszulfonsavat és így tovább. Az egyéb anyagok közül például a Tween márkaneven ismert poli(oxi-etilén)-szorbitánok vagy a Triton márkanevű

poli(oxi-etilén)-éterek ugyancsak használhatók, de a szakirodalom [lásd például: A Guide to the Properties and Use of Detergents in Biology and Biochemistry, (1992), Calbiochem Corp.] alapján még további vegyületeket is találhatunk. A találmány szerinti eljáráshoz megfelelő szurfaktánsok kiválasztásánál csupán olyan szempontokat kell figyelembe venni, hogy a szurfaktáns nem okozhatja az interferon jelentős denaturációját, továbbá nem gátolhatja teljes mértékben a polimerrel történő konjugációt. A reakcióelegyben jelen levő szurfaktáns mennyisége rendszerint 0,01-0,5 %, előnyösen 0,05-0,5 %, illetve legelőnyösebb, ha ez az érték 0,075 és 0,25 % között van. Megjegyezzük, hogy szurfaktánsok keverékét is használhatuk. Bár nem szándékunk elméleti fejtegetésekbe bocsátkozni, mindazonáltal úgy gondoljuk, hogy a szurfaktánsok átmeneti, reverzibilis védelmi rendszert képeznek a konjugációs lépés során. Az alfa-interferon aktív centrumában három lizin található, és a polipeptidnek ezek a viszonylag pozitív töltésű régiói valamiféle védelem nélkül nagyon is aktívan vesznek részt a konjugátumképzésben, ha oldatban megy végbe a folyamat, és ez a biológiai aktivitás jelentős csökkenését vagy teljes elvesztését eredményezi. A szurfaktánsok meglepő módon szelektíven gátolják, hogy ez a régió a polimerrel történő konjugációban részt vegyen, miközben a polipeptid más részein található lizin-amino-csoportokon végbemegy a kapcsolódás.

A konjugációs vagy kapcsolási reakció — egyes esetekben pegilációs reakciónak is, a műveletet pedig pegilezésnek nevezzük a polietilénglikol rövidítéseként használt PEG betűszóból képezve ezeket a kifejezéseket — kivitelezése rendszerint oldat-

ban történik, tekintet nélkül arra, hogy a polimer a fehérje melyik részén vált ki reakciót. Ez a módszer azonban semmiképpen nem megfelelő az alfa-interferon-konjugátumok előállítására. Amint azt fentebb már tárgyaltuk, a legfontosabb szempont, hogy a biológiai aktivitás megmaradjon, és ehhez az kell, hogy a polimerrel való összekapcsolódásból teljesen vagy jelentős mértékben kimaradjanak azok a lizin-részek, amelyek az aktív centrumban találhatók.

A találmány szerinti eljárás azzal, hogy a konjugációs reakció kivitelezése valamilyen szurfaktáns jelenlétében, és a polimernek az alfa-interferonra számított viszonylag kis feleslegével történik, megvalósítja a fenti célkitűzést. A találmány szerint tehát az alkalmazott moláris felesleg 1-8-szoros, előnyösen 1,5-7-szeres, és legelőnyösebben 1,7-5-szörös. Egy másik megoldást választva, eljárhatunk azonban úgy is, hogy a konjugációt az aktivált polimer kis moláris feleslegével, szurfaktáns nélkül hajtjuk végre.

A találmány szerinti eljárás során — előnyösen — az  $\alpha$ IFN-oldathoz hozzákeverjük a szurfaktánst, mielőtt beadagolnánk az aktivált polimert. A konjugációs reakció kivitelezése szobahőmérsékleten, azaz 20 és 25 °C közötti hőmérsékleten történhet. Az is előnyös, ha a kapcsolási reakcióra viszonylag rövid időt, például 1-2 órát hagyunk, majd a reakciót leállítjuk.

A találmány szerinti eljárással előállított konjugátumban a poli(alkilén-oxid)-szubsztitúció foka különböző, és a reakcióelegyben jelen lehet elreagálatlan poli(alkilén-oxid) (PAO) vagy  $\alpha$ IFN is. A reakcióelegy tipikus esetben egy pufferoldat, amely

egy vagy több foszfát-, klorid- és hidrogén-karbonát-aniont tartalmaz. A poli(alkilén-oxid)-ot (PAO), alfa-interferont ( $\alpha$ IFN) és konjugátumot (PAO- $\alpha$ IFN) tartalmazó elegyet előnyösen 1-10 mg/ml PAO- $\alpha$ IFN konjugátumot tartalmazó pufferoldatban frakcionáljuk. A megfelelő oldatok pH-ja 7,0 és 9,0 között, előnyösen 7,5 és 8,5 között van. Az oldat előnyösen egy vagy több pufferhatású só, például kálium-kloridot, nátrium-kloridot, dikálium-hidrogén-foszfátot, kálium-dihidrogén-foszfátot, dinátrium-hidrogén-foszfátot, nátrium-dihidrogén-foszfátot, nátrium-hidrogén-karbonátot, nátrium-borátot, ammónium-karbonátot vagy glicin-nátrium-sót tartalmaz. A nátrium-foszfát pufferek előnyösek.

A reagáltatáshoz használt puffertől függően a PAO- $\alpha$ IFN konjugátum oldatát először puffercserének és/vagy ultraszűrésnek vethetjük alá. A PAO- $\alpha$ IFN konjugátumoldat ultraszűrését végezhethetjük például molekulatömeg-szelektív (10 000 - 30 000 dalton) membránon, így a legtöbb szurfaktánst is eltávolíthatjuk a termék mellől.

A konjugátum frakcionálását, ami a kívánt terméket eredményezi, előnyösen olyan anioncserélő anyagokkal végezzük, amelyek képesek szelektíven megkötni az 1-4 PAO-láncot hordozó PAO- $\alpha$ IFN konjugátumokat, a PAO feleslegét, valamint a változatlan  $\alpha$ IFN-t. A frakcionálás alapját az képezi, hogy a különböző szubsztitúciós fokú  $\alpha$ IFN-molekulák izoelektromos pontja bizonyos fokig előre meghatározható módon változik meg. Az  $\alpha$ IFN izoelektromos pontját például a fehérje felületén elhelyezkedő szabad aminocsoportot hordozó lizinek száma döntően befolyásolja, márpedig ugyanezek a

lizin-amino-csoportok szolgálnak kapcsolódási pontként a konjugátum képződése során. Következésképpen, ahogyan a poli(al-kilén-oxid)-szubsztitúció foka növekszik, úgy csökken az izoelektromos pont, és a konjugátum és az anioncserélő gyanta között kialakuló kötéserősség ezzel párhuzamosan gyengül.

Különösen előnyösnek bizonyult erősen poláris anioncserélő gyanták használata a találmány szerinti eljáráshoz, ezért általában kvaterner amin típusú anioncserélőket alkalmazunk. A kvaterner amin típusú gyantát felvihetjük valamilyen polimer hordozóra, illetve szilikagélre is, de a polimer hordozó előnyösebb. Számos tetrametil-amin vagy más kvaterner metil-amin típusú anioncserélő gyanta kapható a kereskedelemben, valamilyen hordozóra felvitt formában. Ezek közül a kereskedelmi áruként beszerezhető kvaterner amin típusú gyanták közül néhány, a találmány szerinti eljáráshoz különösen jól használható készítményt itt név szerint is felsorolunk. Ilyenek tehát a Q-HD, a QA TRISACRYL<sup>®</sup>, és a QMA-SPHEROSil<sup>®</sup>, amelyek polimer hordozóra felvitt kvaterner amin típusú gyanták, és az IBF of Garenne (Franciaország) gyártja ezeket a Spracor of Marlborough (Massachusetts) számára; a TMAE650M<sup>®</sup>, amely polimer hordozóra felvitt tetrametil-amino-etil-gyanta, és az EM-Separators of Gibbstown (New Jersey) terméke; a QAE550C<sup>®</sup> és a SUPERQC<sup>®</sup>, mindkettő polimer hordozóra felvitt kvaterner amin típusú gyanta, és a TosoHaas of Montgomeryville (PA) gyártja. A fentiekén kívül jól használható még a QMA Accell, a Millipore of Millford (MA) terméke, és a JT Baker of Phillipsburg (NJ) által gyártott PEI gyanták.

Az anioncserélő gyantával töltött oszlopot a szokásos módon egyensúlyba hozzuk, olyan pufferoldatot használva, amelynek a pH-ja és az ozmolalitása azonos a konjugált  $\alpha$ IFN-oldatével. Ezt követően a konjugátumot tartalmazó oldatot felvisszük az oszlopra, majd az adszorbeálódott poli(alkilén-oxid)—alfa-interferon konjugátumot grádienselúciót alkalmazva, növekvő sókoncentrációjú pufferoldattal, a kívánt frakciók formájában leoldjuk az oszlopról. A frakciók alapvetően azonos molekulatömegű és szubsztitúciós fokú anyagot tartalmaznak.

Az előnyös poli(alkilén-oxid)—alfa-interferon konjugátum frakciók egy  $\alpha$ IFN-molekulára számítva 1-4 poli(alkilén-oxid)-láncot, még előnyösebben 1-3, és legelőnyösebben 2 PAO-láncot tartalmazó terméket képviselnek. Az eluens pufferoldat előnyösen egy vagy több sót tartalmaz a következők közül: kálium-klorid, nátrium-klorid, dikálium-hidrogén-foszfát, kálium-dihidrogén-foszfát, dinátrium-hidrogén-foszfát, nátrium-dihidrogén-foszfát, nátrium-hidrogén-karbonát, nátrium-borát és ammónium-karbonát. Ezek a frakciók lényegében mentesek az összes többi konjugátumtól. Bármely más nem konjugált termék ezután a szokásos módon lemosható az oszlopról.

Az eluálást végezhetjük azonfelül több izokratikus lépésben, szakaszosan növelve a koncentrációt. A többlépcsős, izokratikus, de szakaszosan növekvő koncentráció mellett végzett elúció eredményeképpen egymás után kapjuk a PAO- $\alpha$ IFN konjugátumokat. A poli(alkilén-oxid)-szubsztitúció foka azonban minden egyes frakción belül lényegében azonos, és az elúciós idő növekedésével csökken a konjugátumban található poli(alkilén-oxid)-láncok szá-

ma. A PAO- $\alpha$ IFN konjugátum ioncserés tisztítása történhet még például Q-HD oszlopon (Sepracor) híg nátrium-foszfát-oldattal (10 mM  $\text{NaPO}_4$ -ion). A mintát először 10 mM  $\text{NaPO}_4$ -oldattal mossuk, hogy eltávolítsuk az el nem reagált poli(alkilén-oxid)-ot, aztán lépcsőzetes grádienszt képezve, nátrium-kloridot használunk az eluáláshoz. A 10 mM-nak megfelelő koncentrációjú nátrium-kloriddal kapott frakciók olyan konjugátumokat tartalmaznak, amelyekben több, mint 3 polimer lánc jut minden egyes interferonmolekulára; 50 mM nátrium-klorid-koncentrációnál kapunk 1-2 polimer láncot tartalmazó konjugátumot; és 150 mM nátrium-klorid-koncentráció szükséges ahhoz, hogy az elreagálatlan interferont lehozzuk az oszlopról.

Az eluálást általában 4 °C és 25 °C között, de előnyösen a 6 és 22 °C közötti hőmérséklet-tartományban végezzük. Az eluátumban a PAO- $\alpha$ IFN frakciókat UV-elnyelés alapján, 254 nm-nél detektáljuk. A frakciókat egyszerűen időegységenként szedjük, majd azokat, amelyek a kívánt terméket tartalmazzák, összeöntjük.

A találmány tárgya még továbbá eljárás emlősöknél különböző kóros állapotok kezelésére, ami abból áll, hogy az ilyen kezelésre szoruló emlős egyednek az itt leírtaknak megfelelően előállított  $\alpha$ IFN-polimer konjugátum hatékony mennyiségeit adjuk be. A konjugátumot többek között alkalmazhatjuk interferon-érzékeny kórokozók ellen, valamint interferonra pozitívan reagáló, illetve bármilyen kedvező változás reményével biztató állapotok kezelésére, az orvosi gyakorlatban, az interferon-gyógykezelés során szokásos értelmezést tulajdonítva ezeknek a kifejezéseknek. Így például, a korlátozás szándéka nélkül azt mondhatjuk, hogy

interferonkonjugátumokat alkalmazhatjuk olyan esetekben, amikor az interferonra érzékeny vírusok replikációjának gátlásában nyilvánul meg az előnyös hatás, továbbá olyan esetekben, amikor a különböző immunreakciók megváltoztatásával érhetünk el kedvező eredményt, beleértve például az antigének által kiváltott immunválasz gátlását, a túlérzékenységi reakciók gátlását, a természetes killersejtek (NK cell) aktivitásának regulációja által a citotoxikus T-sejt-aktivitás fokozását, a prosztaglandintermelés megváltoztatását és a makrofágok fagocitózisának fokozását.

Az IFN-polimer konjugátumok alkalmazási területei közé tartoznak még a tüskéssejtes leukémia, a venereális és genitális papillómák (condyloma acuminatum), az AIDS-szel összefüggő Kaposi-féle szarkóma, a hepatitis és hepatitis-szerű vírusos betegségek, köztük a hepatitis-B és a krónikus, nem A- és nem B- vagy C-típusú hepatitis.

A fenti állapotok kezelése céljával beadandó  $\alpha$ IFN-polimer konjugátum mennyiségét az interferonaktivitás alapján állapítjuk meg. Általában olyan mennyiségekkel kell a kezelést végezni, hogy annak eredményeképpen klinikailag értékelhető pozitív változás következzen be. Az emlősöknek — beleértve az embert is — beadható maximális dózis az a legnagyobb dózis, amely nem okoz klinikailag jelentős mellékhatásokat. A találmány esetében akkor beszélünk klinikailag jelentős mellékhatásokról, amikor a gyógykezelést meg kell szakítani, mivel súlyos influenzaszerű tünetek, központi idegrendszeri depresszió vagy komoly gastrointesztinális rendellenességek lépnek fel, illetve alopecia, erős bőrviszketés vagy bőrkiütés figyelhető meg. Számottevő fe-

hér- és/vagy vörösvérsejtszám és/vagy májenzimszint eltérések vagy anémiához hasonló állapotok szintén dóziskorlátozó tényezők lehetnek.

Természetesen a különböző alfa-interferont tartalmazó készítmények dózissai különböznek némileg a kiválasztott alfa-interferontól és a polimertől függően, mindazonáltal azt mondhatjuk, hogy a konjugátumot, az emlős egyed állapotát figyelembe véve, naponta 100 000 és néhány millió NE/m<sup>2</sup> közötti mennyiségben adhatjuk. Ezek a számok azonban csak tájékoztatásként szolgálnak, és a képzett szakember feladata, hogy a klinikai tapasztalataira hagyatkozva, a kezelést kiváltó ok ismeretében meghatározza az optimális adagolás körülményeit.

A találmány szerinti  $\alpha$ IFN-polimer konjugátumokat hatóanyagként használhatjuk különböző, emlősöknek beadható gyógyszerkészítményekben. A megfelelő gyógyszerforma lehet például oldat, szuszpenzió, tabletta, kapszula vagy ezekhez hasonló. Ezeket a gyógyszerkészítményeket a szakterület művelői előtt jól ismert eljárásokkal állíthatjuk elő. Megjegyezzük, hogy a találmány szerinti gyógyszerkészítmények esetében főleg a parenterális alkalmazási formákat kell előtérbe állítani, de adhatók ezek a készítmények esetleg orálisan vagy inhalációs úton is, a kezelést végző szakember megítélésétől függően.

A következőkben példákat adunk meg a találmány további ismertetése végett, de felhívjuk a figyelmet arra, hogy ezek a példák semmiképpen nem korlátozhatják a találmány oltalmi körét.

1. példa **$\alpha$ IFN-PEG<sub>5000</sub> előállítása 0,1 % SDS jelenlétében**

Ebben a példában ismertetjük a Schering Corporation (Kenilworth, New Jersey) rekombináns  $\alpha$ IFN-2b ( $\alpha$ IFN) termékének konjugálását aktivált polietilén-glikol-N-szukcinimid-karbonáttal (SC-PEG) az U.S. 5 122 614 számú szabadalmi iratban leírtak szerint. A polimer relatív molekulatömege hozzávetőleg 5000.

36 mg  $\alpha$ IFN-t 7,5-ös pH-jú, 0,1 M nátrium-foszfát-oldattal szemben dializálunk egy Centricon-10 (az Amicon Corporation of Beverly, Mass. terméke) berendezést használva. Az  $\alpha$ IFN végső koncentrációja hozzávetőleg 3 mg/ml. Ezt követően 0,1 ml 10 %-os SDS-t adunk az  $\alpha$ IFN-oldathoz, majd az elegyet 10 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk. Ezután 42 mg SC-PEG<sub>5000</sub> reagenst adunk a fehérjét és a nátrium-dodecil-szulfátot tartalmazó oldathoz, 2 óra hosszat szobahőmérsékleten keveredni hagyjuk az elegyet, végül a reakciót glicinnel leállítjuk. A reakcióelegyet 8-as pH-jú, 10 mM nátrium-foszfát-oldattal szemben dializáljuk egy Centricon-30 berendezésben, hogy a pegilezett interferon frakcionáljuk.

2. példa **$\alpha$ IFN-PEG<sub>12000</sub> előállítása 0,1 % SDS jelenlétében**

Ebben a példában megismételjük az 1. példában megadott lépéseket, azzal a különbséggel, hogy itt a polietilén-glikol relatív molekulatömege hozzávetőleg 12 000. A pontosan megismételt reakciólépések eredményeképpen megkapjuk a PEG<sub>12000</sub> konjugátumot.

### 3. példa

#### **A 2PEG<sub>5000</sub>- $\alpha$ IFN frakcionálása**

Ebben a példában közöljük azt az eljárást, ahogyan az 1. példában leírtak szerint előállított konjugátumokat frakcionáljuk, hogy megkapjuk a kívánt 2PEG<sub>5000</sub> frakciót. A nátrium-foszfát-pufferben oldott PEG- $\alpha$ IFN konjugátumot felvisszük egy QHD anioncserélő oszlopra. A 2PEG frakciót úgy eluáljuk, hogy a 8-as pH-jú, 10 mM foszfát-pufferben a nátrium-klorid koncentrációját, grádienszt képezve, 0-tól 400 mM-ig növeljük. A 2PEG frakció szerkezetét méret-szelektív kromatográfiás eljárással (ismertebb nevén gélszűrés) és SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel (SDS-Page) igazoltuk.

### 4. példa

#### **A 2PEG<sub>12000</sub>- $\alpha$ IFN frakcionálása**

A 2. példa szerinti polimer konjugátumokat a 3. példában megadott módon frakcionáljuk, és azonos módon elvégezzük a szerkezetvizsgálatot.

### 5-8. példák

Ezekben a példákban beszámolunk arról, hogy az előzőekben leírtak szerint, de szurfaktáns hozzáadása nélkül további PEG<sub>12000</sub>- $\alpha$ IFN konjugátumokat állítottunk elő, és megállapítottuk a visszamaradó aktivitást, valamint a polietilén-glikol-láncok számát.

Az eredményeket az 1. táblázatban ismertetjük.

**1. táblázat**

| A példa száma | Aktivitás a sejtkárosító hatás (CPE) gátlása alapján, a kontroll %-ában | A PEG-láncok száma |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| 6             | 26                                                                      | 1,2                |
| 7             | 26                                                                      | 1,3                |
| 8             | 24                                                                      | 1,0                |

**9. példa****Összehasonlító adatok**

Ebben a példában a 3. példában leírtak szerint előállított konjugátum (SDS-2PEG<sub>5000</sub>- $\alpha$ IFN), a szurfaktáns alkalmazása nélkül előállított konjugátum (2PEG<sub>5000</sub>- $\alpha$ IFN) és a nem konjugált  $\alpha$ IFN összehasonlító vizsgálata során kapott eredményeket ismertetjük. A biológiai aktivitás meghatározása a sejtkárosító hatás gátlásán alapuló, úgynevezett CPE-assay-vel történt (CPE = cytopathic effect). Erre a célra az encephalomyocarditis-vírust (EMC) használtuk, és a kísérleteket A549 humán tüdőkarcinóma-sejteken végeztük. A keringési félidőket 3 patkánytól vett vérminta átlagából számítottuk. Az állatok előzőleg 1 millió egység hatóanyagot kaptak, a mintavételt 7 napon át végeztük. Az eredmények a 2. táblázatban láthatók.

**2. táblázat**

| A vizsgált anyag              | Aktivitás (%) | Vírusellenes hatás IC <sub>50</sub> (pg/ml) | Keringési fél-idő α-fázis (óra) |
|-------------------------------|---------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
| SDS-2PEG <sub>5000</sub> -IFN | 69            | 2,2                                         | 5,8                             |
| PEG <sub>5000</sub> -IFN      | 30            | 4,0                                         | 6,8                             |
| IFN                           | 100           | 1,5                                         | 0,17                            |

A táblázat adatai világosan mutatják a találmány szerinti eljárás előnyös voltát. A megtartott aktivitás kétszeres felettinek bizonyult az eddig ismert módon előállított konjugátuméhoz képest.

**10. példa**

Ebben a példában ismertetjük a különböző 2PEG-αIFN konjugátumok egyes farmakokinetikai adatait. A konjugátumokat a fentebb megadott eljárásokkal állítottuk elő. A mintákra vonatkozó adatokat a 3. táblázatban, a vizsgálat körülményeit pedig a mellékelt Farmakokinetikai Vizsgálati Jegyzőkönyv-ben adjuk meg.

**3. táblázat**

| Minta | A PEG relatív molekulatömege | Aktivitás (CPE-assay) a kontroll %-ában |
|-------|------------------------------|-----------------------------------------|
| A     | 5000                         | 35                                      |
| B     | 5000                         | 69                                      |
| C     | 12000                        | 26                                      |
| D     | 12000                        | 26                                      |

A B minta előállítása történt SDS jelenlétében.

### Farmakokinetikai Vizsgálati Jegyzőkönyv

Állat: Sprague Dawley (időpontonként 3 patkány)

Dózis:  $10 \times 10^6$  E IFN/patkány

Alkalmazás: Szubkután (s.c.)

Hatóanyag: 2PEG- $\alpha$ IFN, a PEG relatív molekulatömege 5000 és 12000

Időpontok: 0 perc, 5 perc, 15 perc, 30 perc, 1 óra, 2 óra, 4 óra, 8 óra, 24 óra, 48 óra, 5 nap és 7 nap a hatóanyag beadását követően.

Mérési módszer: CPE-assay a szérummintákkal, EMC-vírust és A549 humán tüdőkarcinóma-sejteket használunk a méréshez.

A minták farmakokinetikai adatait a 4. és 5. táblázat tartalmazza.

#### 4. táblázat

| Minta              | IC <sub>50</sub> (pg/ml) | %-os aktivitás | AUC       | C <sub>max</sub> (NE/ml) |
|--------------------|--------------------------|----------------|-----------|--------------------------|
| Natív IFN $\alpha$ | 1,52<br>(n = 6)          | 100            | 145 720   | 60 000                   |
| A                  | 4,0<br>(n = 3)           | 35             | 348 920   | 24 433                   |
| B                  | 2,2 $\pm$ 0,5<br>(n = 3) | 69             | 351 037   | -                        |
| C                  | 5,8 $\pm$ 2,2<br>(n = 3) | 26             | 1 574 682 | 62 750                   |

5. táblázat

| Minta              | $T_{\max}$ (óra) | $T_{1/2}$ $\alpha$ -fázis<br>(óra) | $T_{1/2}$ $\beta$ -fázis<br>(óra) |
|--------------------|------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Natív IFN $\alpha$ | 1                | 0,17                               | -                                 |
| A                  | 4                | 6,8                                | 48                                |
| B                  | 2-3              | 5,8                                | -                                 |
| C                  | 8                | 12,1                               | 33                                |

AUC (Area Under Curve = a görbe alatti terület,  $C_{\max}$ ,  $T_{1/2}\alpha$  és  $T_{1/2}\beta$  általánosan használt farmakokinetikai paraméterek, jelentésük itt is a szakterület művelői által jól ismert jelentésnek felel meg.

A fenti adatokból az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

A 2PEG- $\alpha$ IFN konjugátumok, akár 5000, akár 12000 relatív molekulatömegű polietilén-glikollal készültek, határozottan előnyösebbnek bizonyultak emlősökben a konjugátatlan interferonnál. A bőr alá fecskendezett (s.c.) készítmény esetében a  $T_{\max}$  jelentősen megnövekszik., ha a fehérjéhez hozzávetőleg 2 polietilén-glikolt kapcsolunk. Krónikus állapotoknál kívánatos a hosszabb  $T_{\max}$ , mivel a kezelőorvos a nyújtott hatásnak köszönhetően a kezelések közé nagyobb időközöket iktathat be. Sokkal meglepőbb azonban az a tény, hogy a 2PEG<sub>12000</sub> konjugátumokkal teljesen váratlanul 10-szeresnél nagyobb mértékben növekedett meg a görbe alatti terület (AUC) értéke. Az AUC értékének minden várakozást felülmúló növekedése egyáltalán nem volt arányos a hatást kiváltó tényezővel, nevezetesen a polimer relatív molekulatöme-

gének a megnövelésével. Nem kétséges, hogy ez a váratlan eredmény a terápiában hasznosítható előnyöket jelent.

### **S z a b a d a l m i   i g é n y p o n t o k**

1. Eljárás alfa-interferont tartalmazó, nyújtott hatású gyógyszerkészítmények előállítására, azzal jellemezve, hogy az alfa-interferont valamilyen szurfaktáns jelenlétében érintkezésbe hozzuk egy alapvetően nem antigén tulajdonságú polimerrel, olyan körülményeket alkalmazva, amelyek megfelelőek ahhoz, hogy az alfa-interferon és a polimer összekapcsolódása végbemenjen.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett polimer a reakcióelegyben molárisan feleslegben van jelen az alfa-interferonhoz viszonyítva.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mondott moláris felesleg hozzávetőleg 1-8-szoros.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mondott moláris felesleg hozzávetőleg 1,5-7-szeres.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mondott moláris felesleg hozzávetőleg 1,75-5-szörös.

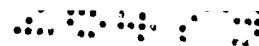
6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó polimer egy poli(alkilén-oxid).

7. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó poli(alkilén-oxid) egyik láncvégén egy alkilcsoport található.

8. A 6. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a poli(alkilén-oxid) polietilén-glikol.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a szóban forgó poli(alkilén-oxid) egy polietilén-glikol-monometil-éter (mPEG).

10. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy



az említett, alapvetően nem antigén tulajdonságú polimer relatív molekulatömege 200 és 35 000 között van.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett alapvetően nem antigén tulajdonságú polimer relatív molekulatömege 1000 és 15 000 között van.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett, alapvetően nem antigén tulajdonságú polimer relatív molekulatömege 2000 és 12 500 között van.

13. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett polimert a következők közül választjuk: dextrán, poli(vinil-pirrolidon)-ok, poliakrilsavamidok, poli(vinil-alkohol)-ok és szénhidrát alapú polimerek.

14. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szurfaktáns egy ionos szurfaktáns.

15. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szurfaktáns nátrium-dodecil-szulfátból (SDS) áll.

16. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett ionos szurfaktánst a következők közül választjuk: lítium-dodecil-szulfát, kvaterner ammóniumvegyületek, taurokólsav, oktánsav, dekánszulfonsav és ezek keverékei.

17. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szurfaktánst a következők közül választjuk: poli(oxi-etilén)-szorbitánok, poli(oxi-etilén)-éterek és ezek keverékei.

18. A 14. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett szurfaktáns hozzávetőleg 0,01 és 0,5 % közötti mennyiségben van jelen.

A meghatalmazott:

*Handwritten signature: Mészáros László*