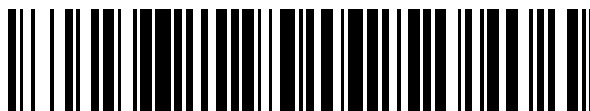


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 124**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/56** (2006.01) **A61P 11/00** (2006.01)  
**C07K 17/08** (2006.01) **C07K 14/48** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61P 11/06** (2006.01)  
**A61P 1/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07800861 .2**  
96 Fecha de presentación: **04.09.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2186830**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2010**

54 Título: **Interferón alfa 2b modificado con polietilenglicol y método de preparación y aplicaciones de este**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**05.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**05.06.2012**

73 Titular/es:  
**BIOSTEED GENE EXPRESSION TECH. CO., LTD.  
NO. 330, WENGJIAO ROAD XINYANG  
INDUSTRIAL ZONE HAICANG  
XIAMEN FUJIAN 361022, CN**

72 Inventor/es:  
**ZHOU, Weidong;  
XIAO, Qingjiang;  
SUN, Li;  
WANG, Tiebing;  
YIN, Fenghong;  
LUO, Shihong;  
ZHUANG, Lu;  
LIU, Min;  
XU, Tianle y  
ZHANG, Yong**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 382 124 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Interferón alfa 2b modificado con polietilenglicol y método de preparación y aplicaciones de este

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a interferón- $\alpha$ 2b modificado con polietilenglicol ramificado con forma de Y (PEG) en un único residuo de aminoácido y su preparación, al igual que al uso del IFN- $\alpha$ 2b pegilado preparado en un único residuo de aminoácido en el campo farmacéutico.

10

## Antecedentes de la invención

[0002] Interferones (IFN) son una familia de proteínas de molécula pequeña o glicoproteínas producidas por células eucariotas en respuesta a infección vírica y otros estímulos antigénicos, que muestran amplio espectro antivírico, efectos inmunomoduladores y antiproliferativos. Los IFN se han aplicado mucho en el tratamiento de varias condiciones y enfermedades, como infecciones víricas, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C y VIH; trastornos inflamatorios y enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis cística y enfermedad pulmonar intersticial; y tumores, por ejemplo, mielomas, linfomas, cáncer de hígado, cáncer pulmonar, leucemia de células pilosas, y etcétera, en (Kenji Oritani, Paul W Kincade, *et al. 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, *et al. Structural and biological characterization of PEGylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. Advance Drug Delivery Reviews, 54, 547-570, 2002*).

20

25

[0003] Los IFN $\alpha$  se clasifican en cuatro tipos según sus diferencias en propiedades químicas, inmunológicas y biológicas: interferón- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\epsilon$ . El interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) se segrega por leucocitos. IFNs- $\alpha$  humanos se codifican por una familia multigénica que consiste en aproximadamente 20 genes, las proteínas codificadas comparten aproximadamente 90% de homología de secuencia de aminoácido (Henco K., Brosius F.J., *et al. J. Mol. Biol., 185, 227-260, 1985*). IFN- $\alpha$ 2b humano es uno de los subtipos  $\alpha$ 2 de la subfamilia de familia de IFN- $\alpha$  humano, y es una proteína de una cadena sencilla con varias actividades biológicas. La proteína de cadena sencilla consiste en 165 residuos de aminoácidos con 4 Cys, donde dos enlaces de disulfuro intracatenarios se forman entre Cys1-Cys98 y Cys29-Cys138 respectivamente y el aminoácido N-terminal es Cys con un libre grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>. Los residuos en las posiciones 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134 y 164 de la secuencia de aminoácidos son Lys, cada uno de los cuales contiene un libre grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>. Esta proteína es glicosilada y sensible a muchas proteasas. La secuencia de aminoácidos de interferón- $\alpha$ 2b humano se muestra en la SEC ID n<sup>o</sup>: 1.

30

35

[0004] Los IFN se administran normalmente parenteralmente en tratamientos clínicos. La vida media *in vivo* corta (2-4h) e inmunogenicidad fuerte de los IFN suponen un intervalo de dosificación más corto y una frecuencia de dosificación mayor. Como los anticuerpos generados significativamente reducen la eficacia terapéutica, es difícil conseguir eficacia ideal clínica. La tecnología de modificación de polietilenglicol (PEG) desarrollada en los últimos años ha proporcionado una solución posible a los problemas anteriores.

40

[0005] PEG es un polímero orgánico biodegradable, no tóxico e inerte y es importante en los campos de biotecnología y farmacéutica. La técnica de modificación de PEG es unir PEG a una proteína activa vía enlace covalente. Después de la glicosilación del polietileno (pegilación), las propiedades de la proteína pueden mejorarse significativamente, por ejemplo, la prolongación de vida media metabólica del medicamento, la reducción de inmunogenicidad, el aumento de seguridad, la mejora de eficacia terapéutica, la reducción de frecuencia de dosificación, el aumento de solubilidad de solubilidad/agua del medicamento, el aumento de resistencia contra la proteólisis, la facilitación de liberación controlada del medicamento etcétera. Para más detalles consultar Inada *et al. J. Bioact. and Compatible Polymers, 5, 343, 1990*, Delgado *et al. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 9, 249, 1992*, Katre. *Advanced Drug Delivery Systems, 10, 91, 1993* y U.S. Patent publication UP 4179337.

50

[0006] Se describe en la patente US n<sup>o</sup>4179337, después de unión de PEG a una enzima o insulina, la inmunogenicidad de la proteína se redujo, mientras simultáneamente las actividades de la proteína se redujeron también. Esto también se encontró en G-CSF (Satake-Ishikawa *et al. Cell Structure and Function, 17, 157-160, 1992*), IL-2 (Katre *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1487, 1987*), TNF- $\alpha$  (Tsutsumi *et al. Jpn. J. Cancer Res., 85, 9, 1994*), IL-6 (Inoue *et al. J. Lab. Clin. Med., 124, 529, 1994*) y CD4-IgG (Chamow *et al. Bioconj. Chem., 5, 133, 1994*).

55

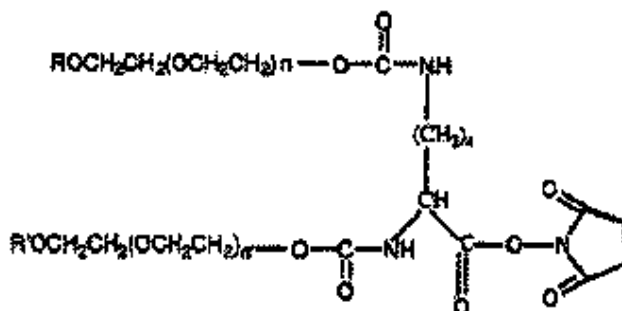
[0007] Se informó de que la proteína ramificada PEG-modificada mostraba mejor tolerancia de pH, termo-estabilidad y resistencia contra la proteólisis que proteínas PEG-modificadas de cadena lineal (Monfardini *et al. Bioconjugate Chem., 6, 62, 1995*).

60

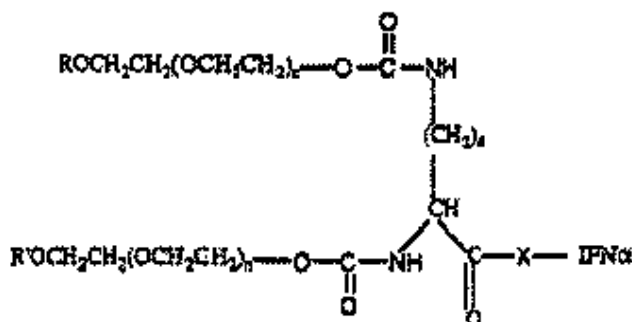
Generalmente, una molécula de PEG modifica una proteína por conexión de esta al grupo  $\alpha$ -amino N-terminal o grupos  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys en la molécula de proteína. Hay normalmente tres tipos de PEG para modificación de proteína: un PEG de cadena lineal (EP 0593868), un PEG ramificado con forma de U (EP 0809996) y un PEG ramificado con forma de Y (CN1243779C).

[0008] Habitualmente muchos tipos de proteínas pegiladas se han aplicado clínicamente. En 1990, la adenosina-desaminasa de bovino pegilada (Adagen) producido por ENZON Inc. fue aprobada por FDA y usada para tratar la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (pegfamg013102LB, <http://www.fda.gov>). En 1994, otra proteína PEG-modificada para tratar leucemia aguda linfoblástica, la asparaginasa pegilada (pegaspargase, Oncaspar), se comercializó también en EEUU (103411s50521b1, <http://www.fda.gov>). El interferón- $\alpha$ 2b modificado de PEG (PEG IFN- $\alpha$ 2b, PEG-intrón) desarrollado por Schering-Plough fue aprobado por FDA para comercialización en 2000 y el interferón- $\alpha$  pegilado (PEG IFN- $\alpha$ 2a, Pegasys) producido por Hoffman-la Roche Ltd. fue también aprobado para comercialización en 2002, ambos se usan para tratar hepatitis (103964s50371b1, pegsche011901LB, <http://www.fda.gov>). En 2002, el factor de estimulación de colonia de granulocito humano modificado de PEG producido por Amgen Inc. (PEG-filgrastim, Neulasta) fue también aprobado por FDA, que se usa para tratar cáncer de mama metastásico (pegfamg013102LB, <http://www.fda.gov>). La FDA también aceptó la solicitud para antagonista factor de crecimiento de humano pegilado desarrollado por Pharmacia. El PEG combinado con fragmento de anticuerpo de TNF- $\alpha$  de Celltech y el receptor de PEG-TNF de Amgen se evalúan en los ensayos clínicos avanzados. La primera molécula PEG-orgánica conjugada, camptotecina pegilada, también ha entrado en la fase II de la prueba clínica. En 2004, el PEG modificado oligonucleótido (Pegaptanib, Macugen™) fue aprobado por FDA. El metabolismo *in vivo* del PEG en el medicamento (o PEG mismo) ya se ha entendido claramente, y PEG ha demostrado ser un modificador de medicamento bueno y seguro sin ningún efecto adverso.

[0009] Los PEG que se pueden unir a un medicamento de proteína normalmente necesitan derivatización, de modo que uno o dos grupos terminales de los extremos de PEG pueden activarse químicamente para poseer un grupo funcional apropiado que muestra actividad, y así pueden formar un enlace covalente estable con, al menos, un grupo funcional del medicamento para ser unido. Por ejemplo, PEG se puede unir a  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> del residuo de Lys en la cadena de péptido de proteína, o a  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> del residuo de aminoácido N-terminal de la cadena peptídica de proteína. En la pegilación de IFN- $\alpha$  descrita en la patente europea EP0809996, PEG-NHS se une a través de sustitución nucleofílica a  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal o  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de Lys en IFN- $\alpha$ . El PEG-NHS mencionado en la patente anterior es un derivado de PEG ramificado con forma de U (PEG<sub>2</sub>-NHS), la fórmula molecular de este es la siguiente:

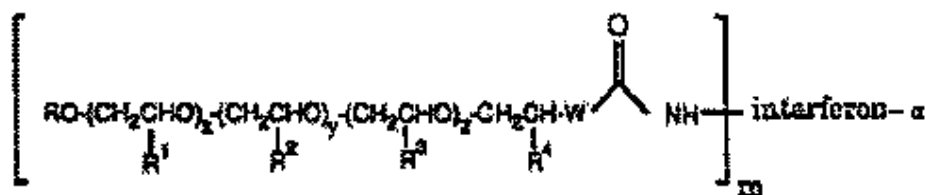


donde, R y R' son independientemente un grupo alquilo de peso molecular bajo, n y n' son de 600 a 1500, y el peso molecular medio del PEG es de 26KD a 66KD. La fórmula molecular del PEG<sub>2</sub>-NHS-modificado-IFN- $\alpha$  es la siguiente:

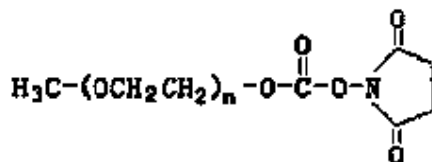


[0010] Donde una o más moléculas PEG<sub>2</sub>-NHS se unen a  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal o  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de Lys en IFN- $\alpha$ , los productos obtenidos son una mezcla de IFN- $\alpha$  no pegilados, IFN- $\alpha$  pegilados en un único residuo de aminoácido y IFN- $\alpha$  pegilados en residuos de aminoácidos múltiples. El IFN- $\alpha$  pegilado en un único residuo de aminoácido se puede aislar de los productos obtenidos por cualquier medio de purificación apropiado. IFN- $\alpha$  tiene un aminoácido N-terminal y más de un residuo Lys, a saber diferentes sitios reactivos para PEG<sub>2</sub>-NHS, así el aislado de IFN- $\alpha$  pegilados en un único residuo de aminoácido son una mezcla de los isómeros de los IFN- $\alpha$  pegilados en residuos de aminoácidos únicos diferentes.

[0011] En la patente europea EP 0593868, PEG de cadena lineal se utiliza para modificar IFN, la fórmula molecular del producto modificado es la siguiente:



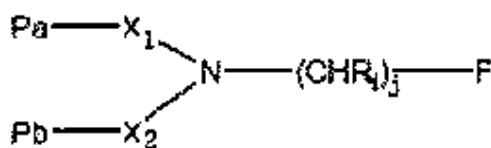
5 Donde R es un grupo alquilo de peso molecular bajo; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> son H o grupos alquilo de peso molecular bajo; m es desde 1 al número de posiciones de modificación de PEG posibles en IFN; W es O o NH; x es de 1 a 1000, y y z son de 0 a 1000, x+y+z es de 3 a 1000 y al menos uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> es un grupo alquilo de peso molecular bajo. Yu-Sen Wang *et al* (Yu- Sen Wang *et al*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 547-570, 2002. Yu-Sen Wang *et al*, *Biochemistry*, 39, 10634- 10640, 2000.) han proporcionado la modificación de rIFN-α2b con 12KD monometoxi-PEG lineal (PEG-intrón) y mostraron que los productos analizados por HPLC-IE son una mezcla superior a 14 isómeros modificados por PEG en residuos de aminoácidos únicos diferentes. La fórmula molecular de los PEG lineales usados para Yu-sen Wang *et al* se muestra a continuación:



15 donde el peso molecular medio del PEG es 12KD.

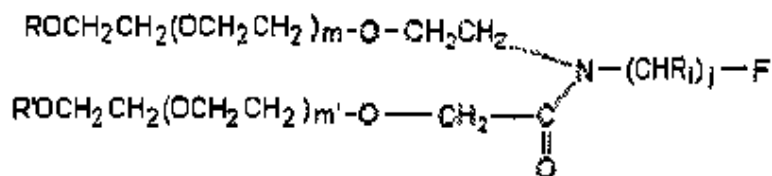
Resumen de la invención

20 [0012] Los derivados de PEG usados en la presente invención son derivados de PEG ramificados con forma de Y y nuevos ramificados y sus estructuras son diferentes de aquellas de los PEG ramificados con forma de U. La diferencia mayor entre estos dos tipos de PEG es que: dos cadenas de PEG ramificadas de los derivados de PEG con forma de Y según la presente invención están conectadas juntas a través de un átomo de N, mientras que las dos cadenas de PEG ramificadas de los derivados de PEG con forma de U en EP0809996 se conectan juntas a través de un átomo de C. La composición molecular de los derivados de PEG con forma de Y según la presente invención se muestra como sigue:



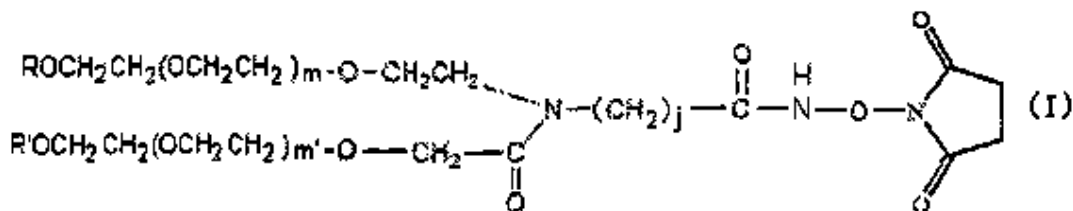
30 donde, P<sub>a</sub> y P<sub>b</sub> son PEG iguales o diferentes; J es un número entero de 1 a 12; R<sub>i</sub> es H, un grupo alquilo C1-C12 sustituido o no sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo o un heteroalquileo; X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son independientemente un grupo de unión, donde X<sub>1</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, y X<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH)<sub>n</sub>OCO, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHCO y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO; n es un número entero de 1 a 10 y F es un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, acil cloruro, hidrazida, maleimida, bisulfuro de piridina, capaz de reacción con amino, hidroxilo o grupo de mercapto de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente.

[0013] En una forma de realización preferida de la presente invención, la molécula de derivado de PEG con forma de Y se muestra como sigue:



donde, R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo; m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero; m+m' es preferiblemente de 600 a 1500; R<sub>i</sub> es H, un alquilo C1-C12 sustituido o no sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, o un grupo de heteroalquileo; j es un número entero de 1 a 12 y F es un grupo terminal seleccionado del grupo que consiste en un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo, un grupo éster, cloruro de ácido carboxílico, hidrazida, maleimida, bisulfuro de piridina, capaz de reacción con un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo de mercapto de un agente terapéutico o un sustrato para formar un enlace covalente. Preferiblemente, el peso molecular medio total del PEG es de aproximadamente 10000 a aproximadamente 60000 Dalton, de forma más preferida aproximadamente 40000 Dalton.

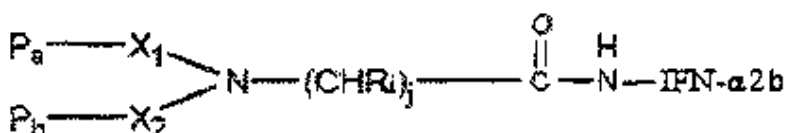
[0014] En una forma de realización preferida de la presente invención, una fórmula estructural posible de la molécula de derivado de PEG con forma de Y se muestra como fórmula (I):



donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo; m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero; m+m' es preferiblemente de 600 a 1500; j es un número entero de 1 el 12 y el peso molecular medio total de los PEG es de aproximadamente 40000 Dalton.

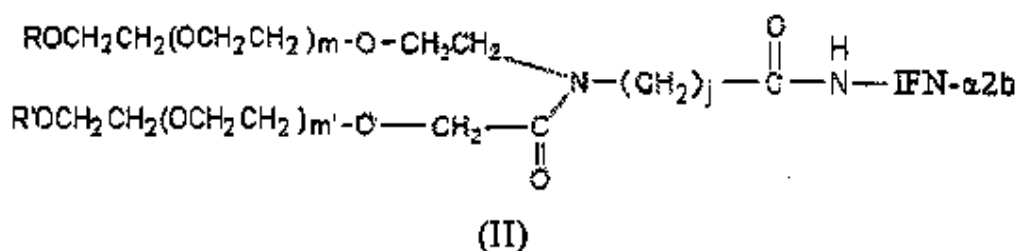
[0015] Los presentes inventores usaron derivados de PEG forma de Y ramificados (YPEG) para modificar interferón- $\alpha 2b$  (IFN- $\alpha 2b$ ), y aislaron el YPEG-IFNs- $\alpha 2b$ , modificado por PEG en un único residuo de aminoácido, por cromatografía de intercambio de iones Q-sefarosa FF. Por otra parte, el YPEG-IFNs- $\alpha 2b$  aislado, modificado por PEG en un único residuo de aminoácido, se separó además por cromatografía SP-sefarosa FF para obtener YPEG-IFN- $\alpha 2b$ , donde el YPEG se une principalmente a la cadena lateral de  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de Lys en la posición 134 en la SEC ID n°1, que se llama YPEG-IFN- $\alpha 2b$ (134). Después de medición, se ha encontrado que la actividad in vitro del YPEG-IFN- $\alpha 2b$ (134) es significativamente superior a la del YPEG-IFN- $\alpha 2b$  en el que el YPEG se une a otro residuo de aminoácido, y la vida media del YPEG-IFN- $\alpha 2b$ (134) en el suero es significativamente más larga que la del IFN- $\alpha 2b$  no modificado.

[0016] Por lo tanto, la presente invención proporciona IFN- $\alpha 2b$  pegilados en un único residuo de aminoácido, la estructura del cual es la siguiente:

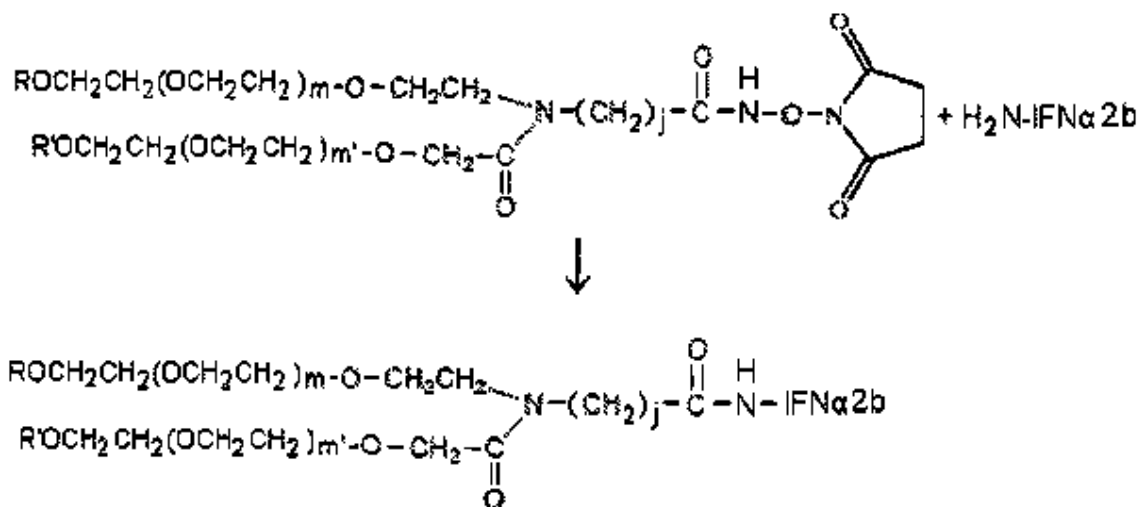


donde P<sub>a</sub> y P<sub>b</sub> son PEG iguales o diferentes; j es un número entero de 1 a 12; R<sub>i</sub> es H, un grupo alquilo C1-C12 sustituido o no sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, o un grupo de heteroalquileo; X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son independientemente un grupo de unión, donde X<sub>1</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, y X<sub>2</sub> se selecciona del grupo que consiste en (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCO, (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NHCO y (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CO, donde n es un número entero de 1 a 10.

[0017] En una forma de realización preferida de la presente invención, los IFN- $\alpha b$  pegilados de la presente invención es de la fórmula estructural (II) de debajo:



- donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo; j es un número entero de 1 a 12; m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero diferente o igual. En esta estructura, una molécula de PEG ramificada con forma de Y se une a una molécula de IFN- $\alpha$ 2b vía un único residuo de aminoácido. El peso molecular medio del YPEG-IFN- $\alpha$ 2b en la fórmula (II) depende principalmente del grado de polimerización, m y m'.  
 5 Donde m+m' es preferiblemente de 600 a 1500, el peso molecular medio correspondiente del YPEG es de aproximadamente 26000 a aproximadamente 66000 Dalton.  
 Donde m+m' es preferiblemente de 795 a 1030, el peso molecular medio correspondiente del YPEG es de aproximadamente 35000 a aproximadamente 45000 Dalton.  
 10 Donde m+m' es preferiblemente de 885 a 1030, el peso molecular medio correspondiente del YPEG es de aproximadamente 39000 a aproximadamente 45000 Dalton.  
 Donde m+m' es de forma más preferida 910, el peso molecular medio correspondiente del YPEG es 40000 Dalton.  
 La proporción de m y m' puede estar en un intervalo de 0,5 a 1,5, preferiblemente de 0,8 a 1,2.
- [0018] En una forma de realización preferida, en el IFN- $\alpha$ 2b pegilado de la presente invención, una molécula de PEG se une a IFN- $\alpha$ 2b vía un enlace amido formado por grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido N-terminal o la cadena lateral del grupo  $\epsilon$ -amino de residuo de Lys de IFN- $\alpha$ 2b correspondiente en posición 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134, o 164 como se muestra en la SEC ID n°1.  
 15
- [0019] En un otra forma de realización preferida, en el IFN- $\alpha$ 2b pegilado de la presente invención, una molécula de PEG se une a IFN- $\alpha$ 2b vía un enlace amido principalmente formado por la cadena lateral del grupo  $\epsilon$ -amino de residuo de Lys de IFN- $\alpha$ 2b correspondiente a la posición 134 como se muestra en la SEC ID n°1.  
 20
- [0020] Opcionalmente, el IFN- $\alpha$ 2b de la presente invención puede ser extraído de fuentes naturales u obtenido por biotecnología recombinante. Preferiblemente, el IFN- $\alpha$ 2b es IFN- $\alpha$ 2b humano (hIFN- $\alpha$ 2b) con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n°1, que es extraído de fuentes naturales u obtenido por la biotecnología recombinante. Más preferiblemente, el IFN- $\alpha$ 2b humano es IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2b). El rhIFN- $\alpha$ 2b puede sintetizarse artificialmente, o expresarse de sistemas de expresión procariotas como *E. coli*, o expresarse de sistemas de expresión de levadura eucariota como *Pichia*, o expresarse de sistemas de expresión de célula de insecto o sistemas de expresión de células mamíferas como CHO. Los métodos de preparación del IFN- $\alpha$ 2b recombinante o natural y las pruebas de actividad de IFN- $\alpha$ 2b e YPEG modificado IFN- $\alpha$ 2b se conocen en la técnica anterior.  
 25  
 30
- [0021] Similar al IFN- $\alpha$ 2b, el YPEG-IFN- $\alpha$ 2b de la presente invención también puede usarse clínicamente para tratar tumores e infecciones víricas, como hepatitis, leucemia de células pilosas, linfólisis mediada por célula, sarcoma de Kaposi, etcétera. En clínico, el YPEG-IFN- $\alpha$ 2b de la presente invención es mejorado claramente, en comparación con IFN- $\alpha$ 2b, en estabilidad, solubilidad, vida media en suero y eficacia terapéutica clínica. Para el modo de administración, el YPEG-IFN- $\alpha$ 2b de la presente invención se puede administrar a los pacientes en forma de una composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz del YPEG-IFN- $\alpha$ 2b y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. Por lo tanto, la presente invención, en otro aspecto, también proporciona una composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz del IFN- $\alpha$ 2b pegilado de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. Preferiblemente, la composición comprende manitol, aminoácidos, cloruro sódico y acetato sódico, donde los aminoácidos se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en ácido aspártico, asparagina y glicina.  
 35  
 40
- [0022] En otro aspecto, la presente invención también proporciona el uso del IFN- $\alpha$ 2b pegilado de la invención o la composición comprendiendo el IFN- $\alpha$ 2b pegilado de la invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad en necesidad de tratamiento con IFN- $\alpha$ 2b. Preferiblemente, la enfermedad en necesidad tratamiento con IFN- $\alpha$ 2b se selecciona del grupo que consiste en infecciones víricas, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y condiloma acuminado; tumores, por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide crónica, leucemia maligna no Hodgkin de grado bajo, linfólisis mediada por célula, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, melanoma maligno, linfoma de células T cutáneas, papiloma laríngeo, recurrente o carcinoma de célula metastásica renal; trastornos inflamatorios y enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis cística y enfermedad pulmonar intersticial y trombocitemia relacionada con enfermedades mieloproliferativas.  
 45  
 50
- [0023] Para obtener el YPEG modificado IFN- $\alpha$ 2b, en una forma de realización de la presente invención, inicialmente la fracción de PEG de derivados de YPEG derivados como N-hidroxil succinimidil éster PEG (YPEG-NHS) se une de manera covalente a un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de la proteína a través de sustitución nucleofílica, donde el grupo amino incluye grupo  $\alpha$ -amino N-terminal de la proteína y un grupo  $\epsilon$ -amino de residuo de Lys.  
 55 La ecuación de reacción para la generación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b de IFN- $\alpha$ 2b y YPEG es la siguiente:



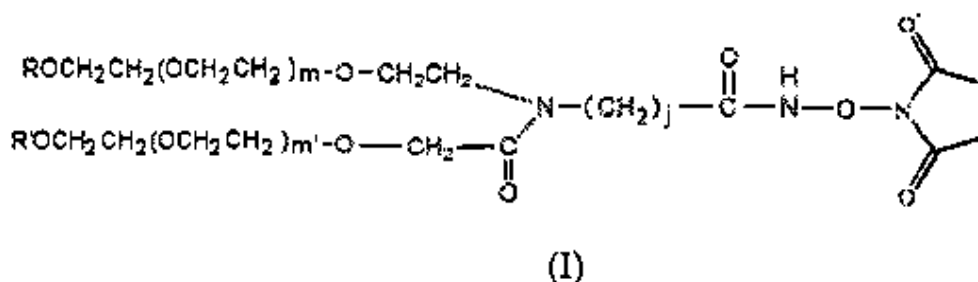
[0024] Las condiciones de reacción son moderadas, el pH está en un intervalo de 4,5 a 9,5, la temperatura está entre 0-25°C, y mediciones de agitación u otra mezcla son necesarias. Para condiciones detalladas ver los ejemplos en la descripción detallada de la invención. Todos los YPEG con pesos moleculares diferentes se pueden unir a IFN-α2b usando el método anterior. Los productos incluyen el modificado por PEG en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN-α2b), el modificado por PEG en dos residuos de aminoácido (YPEG<sub>2</sub>-IFN-α2b) y el modificado por PEG en residuos de aminoácidos múltiples (YPEG<sub>n</sub>-IFN-α2b), donde los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido pueden ser los productos predominantes para ajuste de la condición de reacción.

[0025] Posteriormente, el YPEG-IFN-α2b, modificado por PEG en un único residuo de aminoácido, se puede aislar de la mezcla de todos los tipos del YPEG modificado IFN-α2b usando un método como cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de intercambio de aniones, o cromatografía de exclusión, y luego los IFN-α2b modificados por PEG en residuos de aminoácidos diferentes únicos puede además resolverse para obtener el YPEG-IFN-α2b en el que el YPEG se une en una posición específica. Métodos de purificación convencionales incluyen cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de intercambio de aniones, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de exclusión. Análisis característico se puede realizar por un método conocido en la técnica, por ejemplo, la espectroscopia de masas, la electroforesis en gel de poliacrilamida y la cromatografía de exclusión de líquido de alto rendimiento pueden utilizarse para analizar el peso molecular de los productos, para distinguir los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido de aquellos modificado por PEG en dos o residuos de aminoácidos múltiples e IFN-α2b no modificado. Los métodos de purificación anteriormente mencionados también se pueden usar para además resolver los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido para obtener isómeros diferentes con la modificación de PEG en posiciones únicas diferentes. Las actividades biológicas *in vitro* de todos los tipos de los productos modificados de PEG se pueden medir según cualquier ensayo conocido para IFN-actividad, por ejemplo, inhibición de efecto citopático. Para IFN modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, las fracciones de PEG en los isómeros diferentes tienen efectos diferentes en mantenimiento de los dominios activos de IFN, dando como resultado las grandes diferencias en las actividades biológicas de diferentes isómeros. En términos generales, las actividades *in vitro* de IFN se disminuyen notablemente después de modificación PEG. No obstante, según la presente invención, la actividad específica *in vitro* de los aislados de tres picos obtenidos por cromatografía de intercambio de iones se han medido, y los resultados indican que el aislado de valor máximo 3 (SP2) tiene actividad específica significativamente más alta que los aislados de otros picos y PEGASYS (PEGASYS (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza), y tiene vida media significativamente más larga en suero que IFN-α2b no modificado.

[0026] En otra forma de realización, el péptido de PEG ramificado Y unido a aislado del SP2 se ordena usando la degradación de Edman, y los resultados mostraron que el componente primario de SP2 fue YPEG-IFN-α2b(134).

[0027] Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también proporciona la preparación y métodos de purificación para YPEG-IFN-α2b(134), comprendiendo:

(a) bajo una condición alcalina, preferiblemente a pH 9,0, permitiendo a PEG ramificado con forma de Y como se muestra en la fórmula (I) debajo reaccionar con IFN-α2b, y obtener IFN-α2b pegilado;



donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo; j es un número entero de 1 a 12; m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero; y m+m' es preferiblemente de 600 a 1500;

(b) captura de los productos reactivos en la fase (a) con una resina de intercambio de aniones, preferiblemente Q sefarosa FF, y elución de los productos en un gradiente de anión, preferiblemente en un gradiente de ión cloruro, para obtener productos modificados;

(c) elución de los productos reactivos capturados en la fase (b) con una resina de intercambio de cationes, preferiblemente SP sefarosa FF, en un gradiente de catión, preferiblemente en un gradiente de ión sodio, y recogida de cada pico separadamente;

(d) determinación de la actividad del producto de cada valor máximo y selección del pico correspondiente al producto de reacción con actividad máxima.

Breve descripción de los dibujos

[0028]

FIG.1: SDS-PAGE de 2 lotes de IFN- $\alpha$ 2b modificado con YPEG (40KD). La concentración del gel de separación fue 12%, y azul brillante Coomassie R-250 se usó como tinte de coloración. Esto se puede ver en el resultado de SDS-PAGE de la FIG.1, bajo la condición, el índice de modificación de PEG de rHuIFN- $\alpha$ 2b fue entre 30-50%, y fue estable. Los productos primarios modificados fueron IFN- $\alpha$ 2b modificado por PEG en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN- $\alpha$ 2b), y había también algún IFN- $\alpha$ 2b modificado por PEG en residuos de aminoácidos múltiples (YPEG<sub>n</sub>-IFN- $\alpha$ 2b). Columna 1: IFN- $\alpha$ 2b, NHS-YPEG (40KD) reacción de modificación a 0h; Columna 2: Lote 060604-1 de IFN- $\alpha$ 2b, NHS-YPEG (40KD) reacción de modificación a 2h; Columna 3: Lote 060604-2 de IFN- $\alpha$ 2b, NHS-YPEG (40KD) reacción de modificación a 2h; Columna 4: marcador (GE Lifescience).

FIG.2: el perfil de resolución de isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b por SP-sefarosa FF.

FIG.3: SDS-PAGE manchado de plata (12%) de las muestras de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b purificadas por SP-sefarosa FF. Columna 1: marcador de peso molecular (GE Lifescience); Columna 2: pico de purificación 1 SP-sefarosa FF de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b; Columna 3: pico de purificación 2 SP-sefarosa FF de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b, Columna 4: valor máximo de purificación 3 SP-sefarosa FF de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b; Columna 5: pico de purificación 4 SP-sefarosa FF de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b.

FIG.4: peso molecular aparente de la muestra de YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b purificada SP-sefarosa FF determinada por 7,5% de reducción de SDS-PAGE con coloración de plata.

Columna 1: marcador de peso molecular (GE Lifesciences); Columna 2: YPEG-HuIFN- $\alpha$ 2b SP1, 2 $\mu$ g; Columna 3: YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b SP2, 2 $\mu$ g; Columna 4: YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b SP3, 2 $\mu$ g.

FIG.5: los pesos moleculares de las muestras de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b purificadas SP-sefarosa FF determinadas por MALDI-TOF MS.

FIG.6: el peso molecular de YPEG-NHS (40KD) determinado por MALDI-TOF MS.

FIG.7: la concentración de medicamento en suero y actividad después de una única inyección s.c. de 30  $\mu$ g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> de YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*).

FIG.8: el ensayo en blanco de mapeo peptídico Trypsinase de tripsina digerida YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b SP2.

Dos pequeños picos se detectaron respectivamente a 71.674min y 17.589min; y el pico de tripsina se detectó entre 2-3 min.



FIG.9: el análisis de mapeo peptídico Trypsinase de la tripsina digerida (0h) muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 por HPLC-RP C18. El tiempo de retención de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 fue 62.114min; y el pico de elución a 71.908min fue el fondo, 2-3min.

5 FIG.10: el análisis de mapeo peptídico Trypsinase de la tripsina digerida (48h) muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 por HPLC-RP C18. Ningún pico de sustrato (62.114min) se detectó entre 60.5min-63.2min, lo que demuestra que la muestra se digirió completamente.

10 FIG.11: Sefacril S-100 HR perfil de separación de los péptidos YPEG modificados de la tripsina completamente digerida muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2. Las muestras fueron recogidas según los picos, S100-1 péptidos modificados fue YPEG, a saber la muestra de objetivo.

#### Descripción detallada de la invención

15 [0029] La presente invención se describirá además por los siguientes ejemplos, pero cualquier ejemplo o su combinación no debería entenderse como limitación del alcance o forma de realización de la invención. El ámbito de la invención está limitado solo por las reivindicaciones anexas. En combinación con la descripción y la técnica anterior, personas expertas en la técnica claramente entenderían el alcance limitado por las reivindicaciones.

#### 20 Ejemplo 1

##### Preparación de IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante modificado PEG ramificado con forma de Y

(1) Preparación a escala pequeña de IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante modificado PEG ramificado con forma de Y

25 [0030] 166,1mg de YPEG (fórmula (I), peso molecular medio 40KD, de brazos iguales, número de lote RD010P041, Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fue ponderado y disuelto en 1ml de 2mM de HCl (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.). Y 40mg de IFN- $\alpha$ 2b (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y 50mM de tampón de ácido bórico (pH 9,0, Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) se añadieron a un volumen de reacción final de 10ml. En este sistema de reacción, la concentración final de IFN- $\alpha$ 2b fue 4mg/ml y la proporción molar de reacción de IFN- $\alpha$ 2b y YPEG fue 1:2. El sistema de reacción se mantuvo por debajo de 0-20°C durante 2h con agitación. Los IFN- $\alpha$ 2b pegilados se generaron entonces y la reacción se detuvo por adición de ácido acético glacial (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) para hacer pH<4,0. Una muestra se sometió a SDS-PAGE. El sistema de reacción se diluyó 50 veces con agua y luego 0,2 $\mu$ m se filtró antes de almacenamiento a 4°C para uso posterior.

35 [0031] Cromatografía Q-sefarosa FF se usó para separar el PEG restante e hidrolatos de PEG, IFN- $\alpha$ 2b modificado por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples, IFN- $\alpha$ 2b modificados por YPEG en un único residuo de aminoácido y el IFN- $\alpha$ 2b no modificado. Columna de Q-sefarosa FF (GE Healthcare) ( $\Phi$ 12mm $\times$ 90mm; 1CV=10ml) se regeneró con 3CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-1M NaCl (BBI), y luego se equilibró con 5CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0). Longitud de onda de detección UV se fijó a 280nm. La muestra entera almacenada a 4°C fue cargada. Después de carga, la columna se equilibró con 3CV de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0), y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)- 12mM de NaCl se usó para elución hasta que el primer pico se eluyó completamente, este pico fue el PEG restante 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-60mM de NaCl se usó luego para elución, y la muestra recogida en este pico de elución fue principalmente los YPEG-IFN- $\alpha$ 2b, modificado por PEG en un único residuo de aminoácido. Y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-500mM de NaCl se usó para elución y el pico de elución fue el IFN- $\alpha$ 2b no modificado.

[0032] Los productos objetivo fueron principalmente los YPEG-IFN- $\alpha$ 2b modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, con un índice de rendimiento de 20-40%.

50 2) Preparación a gran escala de IFN- $\alpha$ 2b humano recombinante modificado PEG ramificado con forma de Y

[0033] 4982,4mg de YPEG (fórmula (I), peso molecular medio 40KD, de brazos iguales, número de lote RD010P041, Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fue ponderado y disuelto en 25ml de 2mM de HCl. Y 1200mg IFN- $\alpha$ 2b y 50mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH 9,0) se añadieron a un volumen de reacción final de 200ml. En este sistema de reacción, la concentración de reacción final de IFN- $\alpha$ 2b fue 6mg/ml, y la proporción molar de reacción de IFN- $\alpha$ 2b y YPEG fue 1:2. El sistema de reacción se mantuvo por debajo de 0-25°C durante 2h con agitación. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético glacial para hacer pH<4,0. Una muestra se sometió a SDS-PAGE. El sistema de reacción se diluyó 50 veces con agua y luego 0,2 $\mu$ m se filtraron de antes almacenamiento a 4°C para uso posterior.

60 [0034] Cromatografía Q-sefarosa FF se usó para separar el PEG restante e hidrolatos de PEG, IFN- $\alpha$ 2b modificados por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples, IFN- $\alpha$ 2b modificados por YPEG en un único residuo de aminoácido y el IFN- $\alpha$ 2b no modificado. Columna de Q-sefarosa FF (GE Healthcare) ( $\Phi$ 38mm $\times$ 265mm; 1CV=300ml) se regeneró con 3 CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-1M de NaCl, y luego se equilibró con 5CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0). Longitud de onda de detección UV se fijó a 280nm. La muestra entera almacenada a 4°C fue cargada. Después de carga, la columna se equilibró con 3CV de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0), y luego

20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)- 12mM de NaCl se usó para elución hasta que el primer pico se eluyó completamente, este pico fue el PEG restante 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-60mM de NaCl se usó luego para elución, y la muestra recogida en este pico de elución fue principalmente los YPEG-IFN- $\alpha$ 2b modificados por PEG en un único residuo de aminoácido. Y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-500mM de NaCl se usó para elución y el pico de elución fue el IFN- $\alpha$ 2b no modificado.

[0035] Los productos objetivo fueron principalmente los YPEG-IFN- $\alpha$ 2b modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, con un índice de rendimiento de 35-50%.

[0036] La FIG.1 muestra resultados de SDS-PAGE durante 2 lotes de IFN- $\alpha$ 2b modificados con YPEG (40KD). Esto se puede ver en la figura 1 que bajo la condición, el índice de modificación de PEG de rhIFN- $\alpha$ 2b fue entre 35-50% y se mantuvo estable. Los productos primarios modificados se modificaron por PEG en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN- $\alpha$ 2b), y había también algunos productos modificados por PEG en residuos de ácido de aminos múltiples (YPEG<sub>n</sub>-IFN- $\alpha$ 2b).

## Ejemplo 2

### Determinación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b por SP-sefarosa FF

[0037] La Q-sefarosa FF que capturó muestras de YPEG-IFN- $\alpha$ 2 se ajustó a pH 5,0 con 20% de ácido acético, luego se diluyó 15 veces con 5mM de NaAc/HAc (f5,0, Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.). La muestra se cargó a 0,5mg/ml de capacidad de carga para SP-sefarosa FF 100ml de columna (GE Healthcare) ( $\Phi$  8mm $\times$ 394mm). La columna se equilibró con 3CV de 5mM de NaAc/HAc (pH5,0), y luego se eluyó con 2,5CV del gradiente de 0%-30% 5mM de NaAc/HAc-70mM de NaCl (pH5,0), seguido de 50CV del gradiente de 30%-100% 5mM de NaAc/HAc-70mM de NaCl (pH5,0). YPEG-IFN- $\alpha$ 2b se determinó como 4 picos de elución por SP-sefarosa FF 100ml. Las muestras se recogieron según estos picos y luego se midieron por SDS-PAGE con coloración de plata respectivamente. Según los resultados de SDS-PAGE, se puede observar que pico 1 determinado por SP-sefarosa FF fue principalmente los productos modificados por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples (YPEG<sub>n</sub>-IFN- $\alpha$ 2b). Pico 2 por SP-sefarosa FF fue principalmente los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN- $\alpha$ 2b), y también contuvo algunos productos modificados por PEG en residuos de aminoácidos múltiples. Pico 3 y pico 4 por SP-sefarosa FF fueron los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido. Picos 2-4 determinados por SP sefarosa FF fueron de isómeros con YPEG-modificación en posiciones únicas diferentes, y fueron nombrados respectivamente como YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP1; YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 y YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP3. El perfil de determinación y resultados de SAD-PAGE manchado de plata se muestran en las FIG. 2 y FIG.3 respectivamente.

[0038] Cada muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP1-3 se complementó con cloruro sódico, acetato sódico, manitol, ácido aspártico y se esterilizó con filtro 0,22 $\mu$ m antes de almacenamiento a 4°C para uso posterior.

## Ejemplo 3

### Análisis característico de isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b

(1) Concentración de proteína

[0039] Las concentraciones de isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b se determinaron por método de Kjeldahl.

(2) Peso molecular aparente de proteína

[0040] Los pesos aparentes moleculares de isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b se determinaron por SDS-PAGE. El método fue según a Laemmli et al (Nature 227: 680, 1970). La concentración del gel fue de 7,5%, y el gel se visualizó por coloración de plata. Los pesos aparentes moleculares de isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b fueron casi iguales, aproximadamente 123KD (FIG.4).

(3) Peso molecular determinado por MALDI-TOF MS

[0041] MALDI-TOF MS (Autoflex TOF/TOF system, Bruker Daltonics, Alemania) se usó para determinar los pesos moleculares de isómeros de modificación YPEG-rHuIFN- $\alpha$ 2b. Ácido sinápico (SA, C11 H12 O5, M.W. 224.22, número de lote: 2006 236870 002, Bruker Daltonics, Alemania) se usó como matriz. Estándar de calibración de proteína II (parte n° 207234, Bruker Daltonics, Alemania) se usó como estándar de peso molecular de proteína, y el software para análisis de datos fue FlexAnalysis Ver.3.0.54.0 Los pesos moleculares isómeros de modificación MS de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b fueron casi iguales, aproximadamente 59000 Dalton (FIG.5).

(4) Prueba de contenido de endotoxina

[0042] Basado en ensayo de limulus (*Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005, Volume 3, Appendix X C*), el contenido de endotoxina de cada muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b fue menos de 5,0EU/mg.

(5) Actividad *in vivo* y farmacocinética de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 en animales.

□ Actividad *in vivo* de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 en animales.

5

[0043] El mecanismo de acción de IFN es parcialmente inducir la producción de 2'.5'-AS (2'.5'-oligoadenilato sintetasa), que a su vez ejerce sus efectos antivíricos. Usando  $^{125}\text{I}$  como un trazador, los parámetros farmacodinámicos de IFN se reflejan por el las actividad 2'.5'-AS *in vivo*. 2'.5'-AS cataliza la síntesis de 2'.5'-A (2'.5'-oligoadenilato) de ATP en presencia de Poly(I)-Poly(C) agar (la actividad de 2'.5'-AS se puede representar por la concentración del sintetizado 2'.5'-A). Primero, 2', 5'-AS en las muestras se absorben y se activan por Poli(I)·Poli(C) agarosa, luego cataliza el sustrato ATP para generar 2'.5'-A. Una mezcla de  $^{125}\text{I}$  marcado 2'.5'-A, anti-2'.5'-A suero y anticuerpo secundario se añaden en la muestra que luego se incuba y se centrifuga para separar la mezcla. El sobrenadante se descarta y un gammámetro se usó para medir el radioactividad del sedimento. El índice de unión del  $^{125}\text{I}$  marcado añadido inicialmente 2'.5'-A se calcula. Regresión logística de parámetro de cuatro se utiliza para generar curva estándar y luego la concentración del 2'.5'-AS-inducido 2'.5'- A productos en una muestra desconocida podría estimarse.

10

15

[0044] Usar el método 2', 5'-A anteriormente mencionado, los resultados en la tabla 1 y la FIG.7 mostraron la concentración de suero 2', 5'-A después de una única inyección s.c. de  $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (18 macacos cangrejeros, Guangxi Weimei Biotechnology Co., Ltd., certificado n° S.CXK GUI 2002-0001, masa corporal 2,5-5,5kg, 6 hembras y 12 machos, elevados en jaulas separadas, alimentados con pienso de mono estándar, bebida libre). Esto se puede ver en la FIG.8 que el tiempo en pico medio fue  $64\pm 27,71\text{h}$ , y la concentración para pico fue  $292,30\pm 148,08\text{ Pmol}\cdot\text{dL}^{-1}$ . Después de administración, la actividad de 2', 5'-AS en el suero aumentó claramente, y el tiempo en pico de 2', 5'-A en el suero se retardo que el de YPEG-rhIFN $\alpha$ 2b SP2.

20

25

Tabla 1. Las concentraciones de suero 2'.5'-A sobre tiempo, después de una única inyección s.c. de  $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de YPEG-rhIFN- $\alpha$ 2b SP2 en el macaco cangrejero. ( $\text{Pmol}\cdot\text{dL}^{-1}$ )

tiempo(h)	Nº de macacos cangrejeros			Medio	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

30

②Farmacocinética de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b y rhIFN- $\alpha$ 2b en el macaco cangrejero

[0045] Una única inyección s.c. de 10, 30 o  $100\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b se administró a macaco cangrejero. Para el grupo de administración, 1ml de sangre venosa se tomó de la pierna posterior opuesta al lado inyectado al mismo tiempo antes, 1h, 2h, 4h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h, 240h, y 312h después de administración.

35

Para el grupo con una única inyección s.c. de IFN- $\alpha$ 2b ( $30\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 1ml de sangre se tomó al mismo tiempo antes, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, y 24h después de administración. Después de mantener a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, las muestras de sangre se centrifugaron a 2000rpm durante 10min bajo temperatura baja, luego el suero se separó inmediatamente y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para análisis posterior.

40

[0046] El inmunoanálisis en "sándwich" cuantitativo doble se usó. Un anticuerpo monoclonal específico al IFN- $\alpha$  humano recombinante fue prevestido en la placa de microtitulación. El estándar y las muestras fueron pipetadas en los pocillos de microtitulación, donde el IFN- $\alpha$ 2b o YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 se uniría con el anticuerpo inmovilizado. La placa se lavó para eliminar sustancias no unidas y luego IFN- $\alpha$  anti-humano IgG (anticuerpo secundario) se añadió en los pocillos.

Después de que la reacción se completó, la placa se lavó y la peroxidasa de rábano (HRP) se añadió en los pocillos. Después de lavado lejos de la enzima no unida y reactivos, el color generado añadiendo solución de sustrato HRP en cada pocillo fue proporcional a la cantidad del IFN- $\alpha$ 2b o YPEG-rhIFN- $\alpha$ 2b SP2 unido en el primer paso. La reacción se detuvo y la intensidad de color se midió. Entre más alto es el valor OD de absorbancia, más alta es la concentración de IFN- $\alpha$ 2b o YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 en la muestra. Las curvas estándar se fijaron para IFN- $\alpha$ 2b y YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 respectivamente para medir la concentración de medicamento en suero en las muestras de sangre.

[0047] Según el protocolo en la descripción del kit (American Biomedical Co., número de lote 3271), 100 $\mu$ l estándar o muestra de sangre se añadió en cada pocillo y se mezcló con mezclador de placa suavemente. Según la concentración anticipada de una muestra desconocida, la muestra se diluyó con la solución diluida a los intervalos de la concentración de la curva estándar. La curva estándar de IFN- $\alpha$ 2b o YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 para cada placa se fijó para calcular la concentración de la muestra desconocida en esa placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1h y se lavó una vez con solución de lavado de placa. 100 $\mu$ l de anticuerpo secundario se añadió a cada pocillo y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1h. La placa se lavó 3 veces y 100 $\mu$ l de conjugado HRP se añadió a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1h y se lavó 4 veces. 100 $\mu$ l de sustrato TMB se añadió en cada pocillo, y se mantuvo a temperatura ambiente a oscuras durante 15min. 100 $\mu$ l de solución de parada se añadió a cada pocillo y se mezcló suavemente para parar la reacción. El valor OD de absorbancia a 450nm se midió con un lector de microplacas dentro de 5min para determinar la concentración de cada muestra.

[0048] Después de una única inyección subcutánea de dosis baja, dosis media, o dosis alta (10, 30 y 100  $\mu$ g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, respectivamente) de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b en el macaco cangrejero, la vida media fue 48,87 $\pm$ 11,67, 51,94 $\pm$ 3,52 y 49,60 $\pm$ 2,97h, respectivamente. Después de una única inyección subcutánea de 30  $\mu$ g $\cdot$ kg<sup>-1</sup> de IFN- $\alpha$ 2b en el macaco cangrejero, la vida media fue 3,22 $\pm$ 0,10h. La vida media de IFN- $\alpha$ 2b se prolongó al menos diez veces después de modificación YPEG.

(6) La actividad biológica *in vitro* de cada isómeros de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2b se estimó usando ensayo de inhibición de efecto citopático.

[0049] Según el método descrito en *Determination Method of Interferon Activity (Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005, Volume 3, Appendix X C)*, interferón protege células humanas amnióticas (WISH) del daño provocado por el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Violeta cristal se usó para manchar células WISH sobrevividas y el valor OD de absorbancia se midió a 570nm. La curva de efecto de protección de interferón se fijó para células WISH, para determinar la actividad biológica *in vitro* de interferones. Los resultados de actividad biológica *in vitro* de cada muestra se muestran en la tabla 2, y 3 pruebas paralelas se llevaron a cabo para cada muestra. Después de modificación de YPEG, en todos los isómeros de modificación de los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, la muestra SP2 mostró la actividad específica *in vitro* máxima, que fue 1-2 veces superior a SP1, SP3 y PEGASYS (fabricado por Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza; empaquetado separadamente por Shanghai Roche Pharmaceuticals Ltd., número de lote de producto B1016, número de lote de embalaje SH0020), y fue también 1-2 veces superior a la muestra indeterminada.

Tabla 2. Resultados de actividad biológica *in vitro* para cada isómero de modificación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b (3 pruebas paralelas)

Muestra	Tipo de PEG	PEG PM (KD)	Nº d posiciones de modificación	Actividad específica media ( $\times 10^6$ IU/mg)
YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP1	forma de Y	40	1	1,07 $\pm$ 0,172
YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2	forma de Y	40	1	2,65 $\pm$ 0,185
YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP3	forma de Y	40	1	1,13 $\pm$ 0,215
Muestra indeterminada de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b	forma de Y	40	1	1,68 $\pm$ 0,217
PEGASYS	forma de Y	40	1	0,934 $\pm$ 0,042

Nota: muestra indeterminada se refiere a la muestra antes de determinación de YPEG-rhIFN- $\alpha$ 2b por SP-sefaroza FF

(7) La determinación de la posición de modificación en YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2

[0050] El sistema de solvente de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 se cambió a 50mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH8,0) por ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona), y la concentración de proteína se determinó para ser 3,82 mg/ml usando espectroscopia de UV. Tripsina TPCK (Promega) se disolvió (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) en la solución proporcionada por el fabricante.

Muestras se añadieron según la tabla 3:

Tabla 3. Composición de reacción de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 digestión de tripsina

Composición de reacción	Volumen
50mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , pH8,0	7,08ml
PEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 (3.82mg/ml)	1,32ml
Tripsina (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0,2ml
Volumen total de reacción	8,6ml

5 [0051] El sistema de reacción se mantuvo al baño maría a 37°C durante 48h, luego 1,52ml de ácido acético 20% se añadió para parar la reacción. Una pequeña cantidad de muestra se tomó para mapeo peptídico HPLC-RP C18. El instrumento para análisis fue sistema de Waters HPLC, con un controlador de tipo 600 detector de longitud de onda doble 2487, y el software para procesamiento de datos fue Empower 2. La columna analítica de HPLC fue Jupiter C 18 (diámetro de partícula 5 $\mu$ m, diámetro de poro 300Å,  $\Phi$ 4.6 $\times$ 150min, producido por Phenomenex, EEUU). Fase móvil A fue 0,1% de TFNH<sub>2</sub>O, fase móvil B fue 0,1 % de TFA/90% de ACN/H<sub>2</sub>O, la velocidad de flujo fue 1ml/min, y la longitud de onda de detección se fijó a 214nm. Ver tabla 4 para los gradientes de elución y los resultados se muestran en las FIG8-10.

Tabla 4. Los gradientes de elución para mapeo peptídico HPLC-RP C18 de la tripsina digerida YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP 2

	Tiempo (min )	A%	B%	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

15

[0052] Basado en el resultado de detección, se puede determinar que la muestra se digirió casi completamente. Los productos se trataron con reducción DTT después de la que reacción se detuvo. La columna de Sefacril S-100HR ( $\Phi$ 18 $\times$ 255mm, 1CV=64ml; GE Healthcare) fue preequilibrado con 3CV de 20mM PBNa-400mM NaCl (pH7,0), y 3% CV del YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 muestra por TPCK tripsina digerido completamente fue cargada por presión hidrostática. 20mM PBNa-400mM de NaCl (pH7,0) fue usada para elución, y la longitud de onda de detección fue conjunto a 280nm. La muestra del primer pico de elución se recogió (número de muestra: YPEG-IFN- $\alpha$ 2b S100-1; FIG.11), y el sistema de solvente se cambió a 5mM de PBNa (pH 7,0) con ultrafiltro 5K. Liofilización al vacío se hizo. Los aminoácidos N-terminales de las muestras liofilizadas se determinaron usando degradación de Edman, y la secuencia del 7 aminoácidos en el N-terminal de la muestra fue XYSPXAW (tabla 5), donde X denota  $\alpha$ -aminoácido cisteína (Cys), un no- $\alpha$ -aminoácido u otro aminoácido modificado que no puede ser detectado usando degradación de Edman. Según la secuencia mostrada en la SEC ID n°: 1, esto puede determinar que el YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 fue principalmente los productos modificados con YPEG a Lys134.

30

Tabla 5. Resultado de secuenciación para los aminoácidos N-terminales de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b S100-1

Muestra	Secuencia N-terminal detectada
YP EG-IFN- $\alpha$ 2b S100-1	XYSPXAW

Nota: X denota  $\alpha$ -aminoácido cisteína, un no- $\alpha$ -aminoácido u otro aminoácido modificado que no se puede detectar usando degradación de Edman.

Listados de secuencias

35

[0053]

<110> BIOSTEED GENE EXPRESSION TECH. CO., LTD.

40

<120> Interferón alfa 2B modificado por polietilenglicol, la preparación y uso de este

<130> P2007474C

<160> 1

5 <170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

<211> 165

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

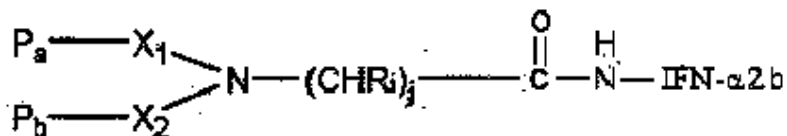
Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg Thr Leu Met
 1      5      10      15
Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp
 20      25      30
Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 35      40      45
Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile Phe
 50      55      60
Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu
 65      70      75      80
Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 85      90      95
Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys
100     105     110
Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu
115     120     125
Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
130     135     140
Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser
145     150     155     160
Leu Arg Ser Lys Glu
165

```

15

## REIVINDICACIONES

1. Interferón- $\alpha 2b$  pegilado (IFN- $\alpha 2b$ ) de la estructura de debajo, obtenido por unión de IFN- $\alpha 2b$  con un polietilenglicol ramificado con forma de Y (YPEG):



donde,

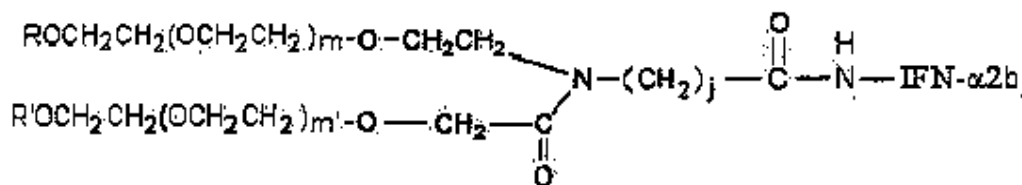
$P_a$  y  $P_b$  son iguales o diferentes polietilenglicoles (PEG);

$j$  es un número entero entre 1-12;

$R_i$  es H, grupo alquilo C1-C12 no sustituido o sustituido, arilo sustituido, aralquilo, o heteroalquileo; y

$X_1$  y  $X_2$  son independientemente un grupo de unión, donde  $X_1$  es  $(CH_2)_n$ , y  $X_2$  se selecciona del grupo que consiste en  $(CH_2)_n$ ,  $(CH_2)_nOCO$ ,  $(CH_2)_nNHCO$  y  $(CH_2)_nCO$ , donde  $n$  es un número entero entre 1-10, donde el YPEG se une a IFN- $\alpha 2b$  vía un enlace amido formado por la cadena lateral del grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de Lys dentro de IFN- $\alpha 2b$  correspondiente a la posición 134 en la SEC ID n°1.

2. IFN- $\alpha 2b$  pegilado según la reivindicación 1, con la estructura como sigue



donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo;

$j$  es un número entero entre 1-12;

$m$  y  $m'$  indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero;  $m+m'$  es preferiblemente de 600 a 1500, y

el peso molecular medio total del YPEG es preferiblemente de aproximadamente 10000 a aproximadamente 60000 Dalton, de forma más preferida aproximadamente 40000 Dalton.

3. IFN- $\alpha 2b$  pegilado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el IFN- $\alpha 2b$  se extrae de una fuente natural o se obtiene a través de biotecnología recombinante, es preferiblemente IFN- $\alpha 2b$  humano con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID n°1, de forma más preferida es un IFN- $\alpha 2b$  humano recombinante.

4. IFN- $\alpha 2b$  pegilado según la reivindicación 3, donde el IFN- $\alpha 2b$  humano recombinante se sintetiza artificialmente o se expresa de un sistema de expresión seleccionado del grupo que consiste en un sistema de expresión procariota como *E. coli*, un sistema de expresión de levadura eucariota como *Pichia*, un sistema de expresión de célula de insecto o un sistema de expresión de célula de mamífero como CHO.

5. IFN- $\alpha 2b$  pegilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el YPEG es un YPEG de brazos iguales de peso molecular de 40000 Dalton.

6. Composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz del IFN- $\alpha 2b$  pegilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente.

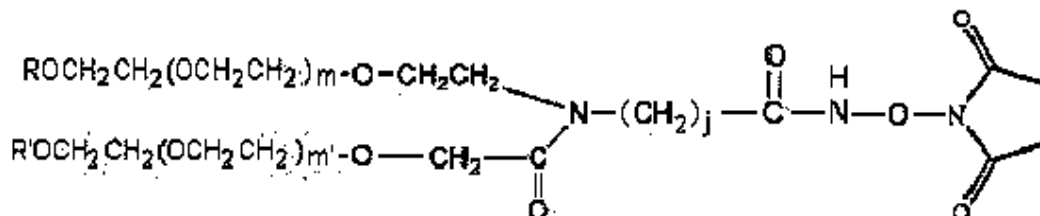
7. Composición según la reivindicación 6, comprendiendo además manitol, un aminoácido, cloruro sódico y acetato sódico, donde el aminoácido es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico, asparagina y glicina.

8. Uso del IFN- $\alpha 2b$  pegilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o de la composición según la reivindicación 6 o 7 en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad en necesidad de tratamiento con IFN- $\alpha 2b$ , donde la enfermedad se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en infecciones víricas, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D y condiloma acuminado; tumores, por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide crónica, leucemia maligna no Hodgkin de grado bajo, linfólisis mediada por célula sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, melanoma maligno, linfoma de células T cutáneas, papiloma laríngeo, carcinoma de célula renal metastásico o

recurrente; trastornos inflamatorios y enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis cística y enfermedad pulmonar intersticial y trombocitemia relacionada con enfermedades mieloproliferativas.

9. Método para preparar y purificar el IFN- $\alpha$ 2b pegilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que incluye las etapas:

(a) en una condición alcalina, preferiblemente a pH 9,0, permitir a PEG ramificado con forma de Y de la siguiente fórmula reaccionar con IFN- $\alpha$ 2b y obtener IFN- $\alpha$ 2b pegilado;



donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo;

j es un número entero entre 1-12;

m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero, y m+m' es preferiblemente de 600 a 1500;

(b) captura de los productos reactivos obtenidos en la etapa (a) con una resina de intercambio de aniones, preferiblemente Q sefarosa FF, y elución de los productos en un gradiente de aniones, preferiblemente en un gradiente de ión cloruro, para obtener productos modificados;

(c) elución de los productos reactivos capturados en la etapa (b) con una resina de intercambio de cationes, preferiblemente SP sefarosa FF, en un gradiente de cationes, preferiblemente en un gradiente de ión sodio, y luego recogida de cada pico separadamente;

(d) determinación de la actividad del producto de cada pico y selección del pico correspondiente al producto de reacción con actividad máxima.

10. Método según la reivindicación 9, donde el YPEG tiene un peso molecular de 40KG, y es preferiblemente un Y-PEG de brazos iguales, y más preferiblemente la proporción molar de reacción de IFN- $\alpha$ 2b y YPEG es 1:2.



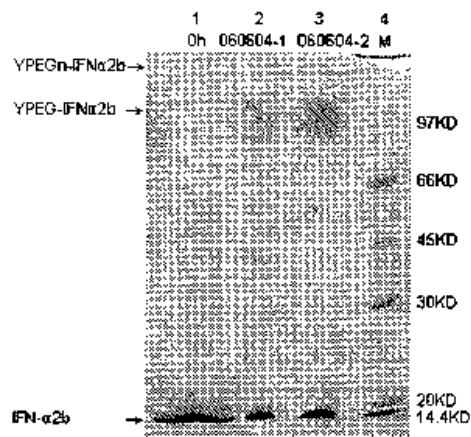
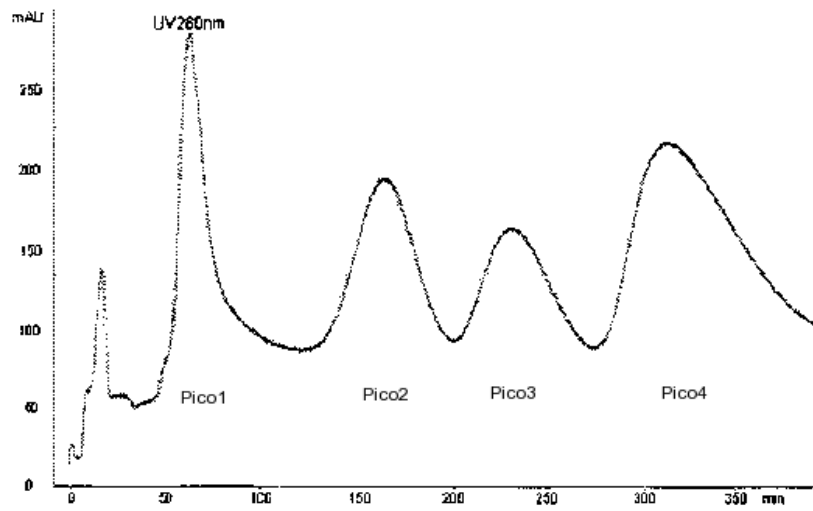


FIG. 1: SDS-PAGE para 2 lotes de IFN-α2b modificado con YPEG (40KD)

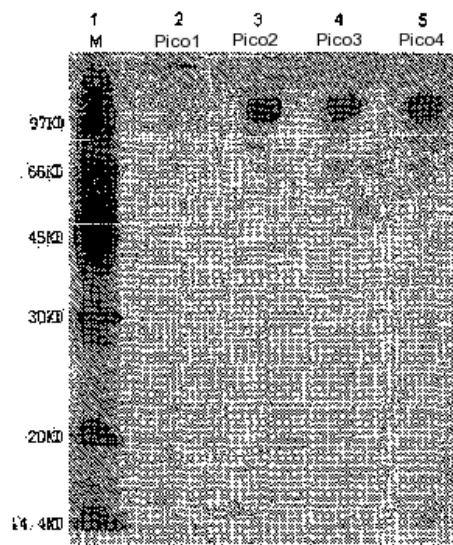
Columna 1: IFN-α2b, NHS-YPEG (40KD) modificado a 0h;  
Columna 2: Lote 060604-1 de IFN-α2b, NHS-YPEG (40KD) modificado durante 2h;  
Columna 3: Lote 060604-2 de IFN-α2b, NHS-YPEG (40KD) modificado durante 2h;  
Columna 4: marcador (GE Lifescience).

FIG. 1



El perfil de determinación de isómeros de modificación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b a través de SP-sefarosa FF

**FIG.2**



SDS-PAGE manchado de plata (12%) de SP-sefarosa FF purificado YPEG-IFN- $\alpha$ 2b muestras

Columna 1: marcador peso molecular (GE Lifescience)

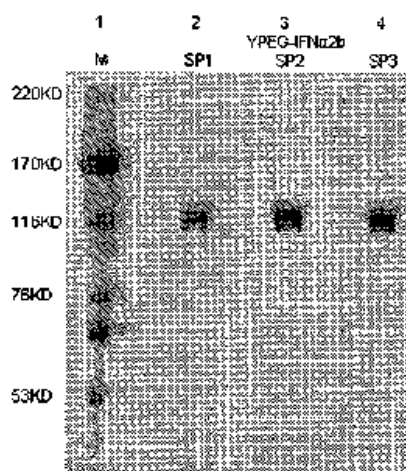
Columna 2: pico de purificación de SP-sefarosa FF 1 de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b

Columna 3: pico de purificación de SP-sefarosa FF 2 de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b

Columna 4: pico de purificación de SP-sefarosa FF 3 de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b

Columna 5: pico de purificación de SP-sefarosa FF 4 de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b

FIG.3



Peso molecular aparente determinada por la muestra YPEG-rHuIFN-α2b purificada por SP-sefarosa FF determinada por 7,5% de SDS-PAGE reductor con tinción plata

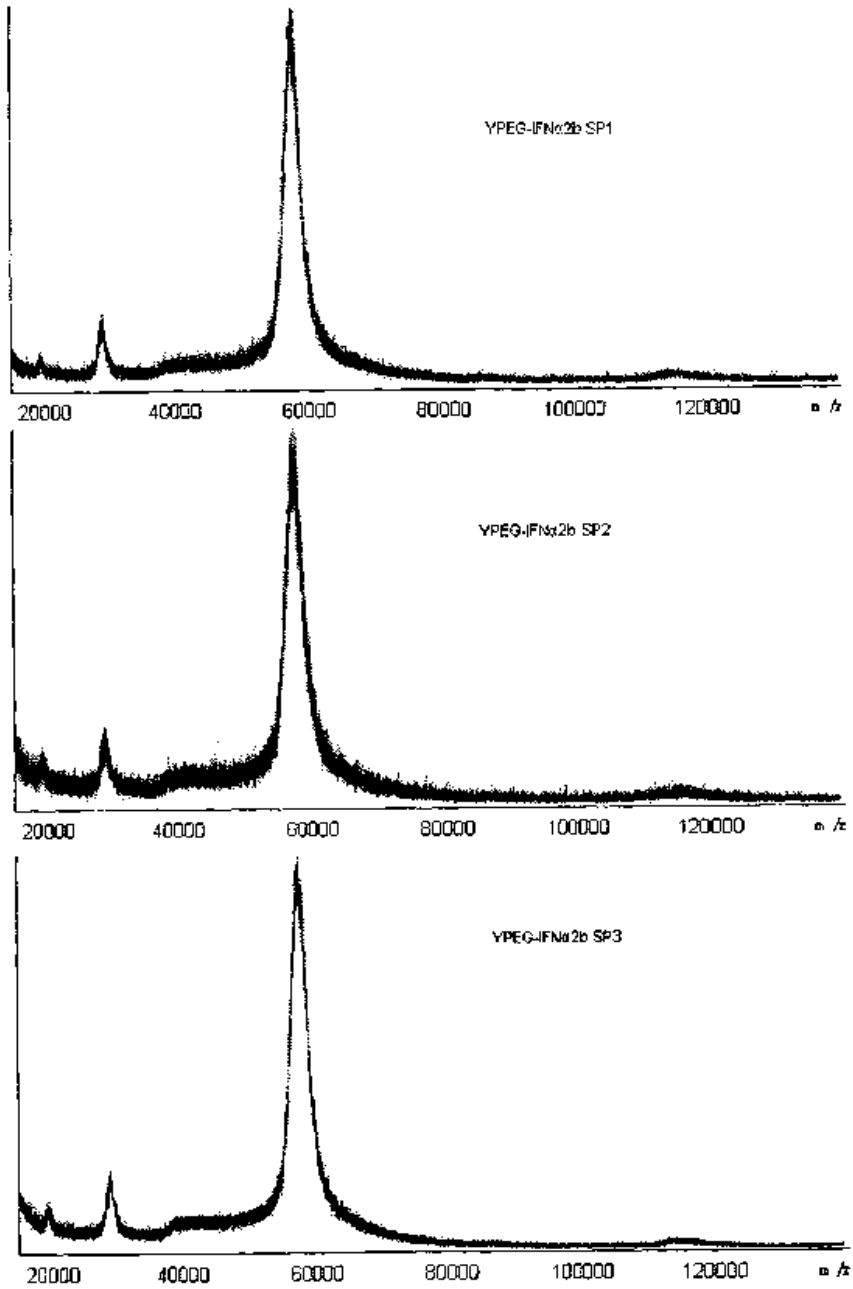
Columna 1: marcador de peso molecular (GE Lifesciences)

Columna 2: YPEG-rHuIFN-α2b SP1, 2μg

Columna 3: YPEG-rHuIFN-α2b SP2, 2μg

Columna 4: YPEG-rHuIFN-α2b SP3, 2μg

FIG.4



**FIG.5**

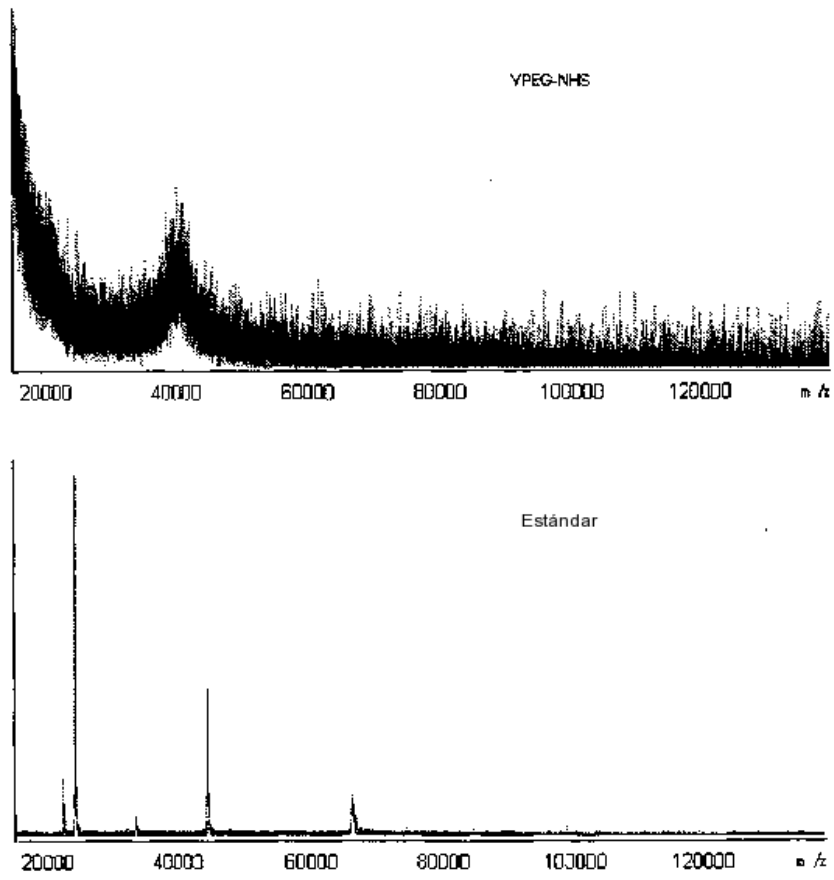
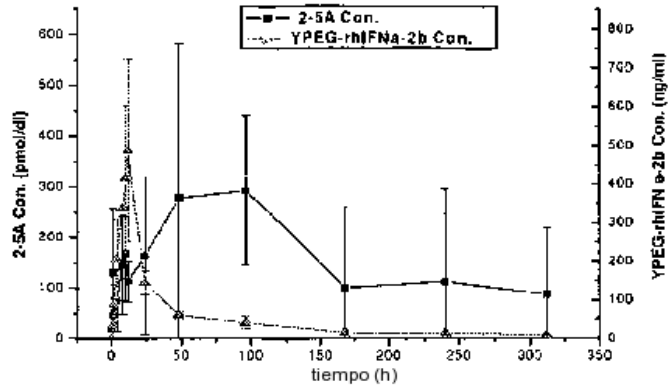
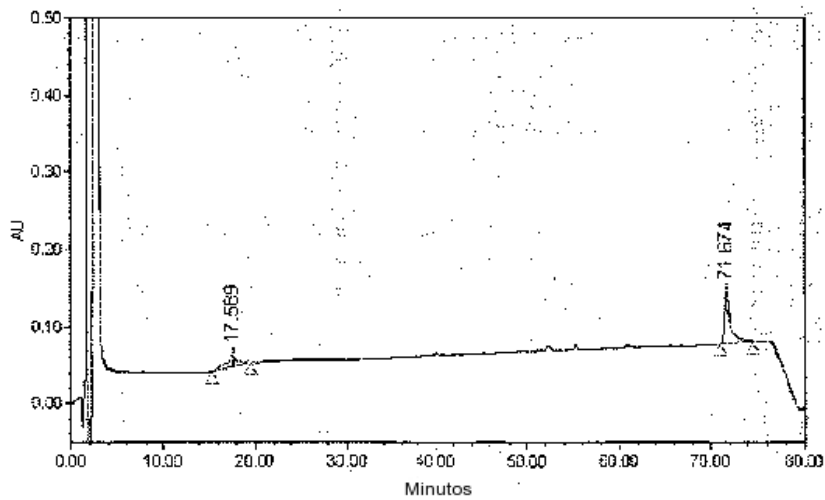


FIG.6



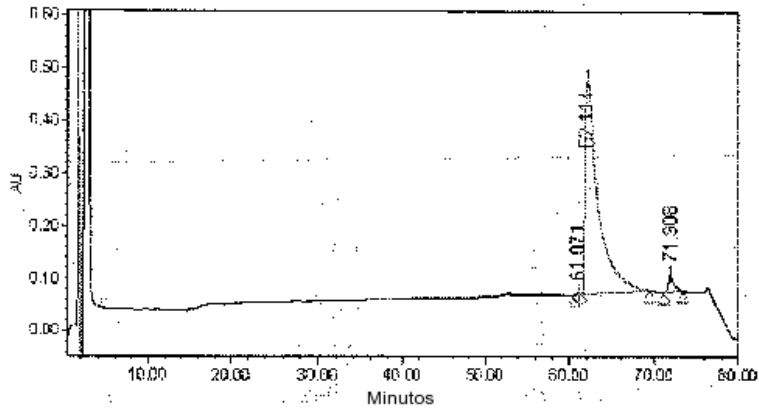
La concentración de medicamento en suero y actividad después de una única inyección s.c. de 30 µg·kg<sup>-1</sup> de YPEG-rhIFN-α2b SP2 en macaco cangrejero

FIG.7



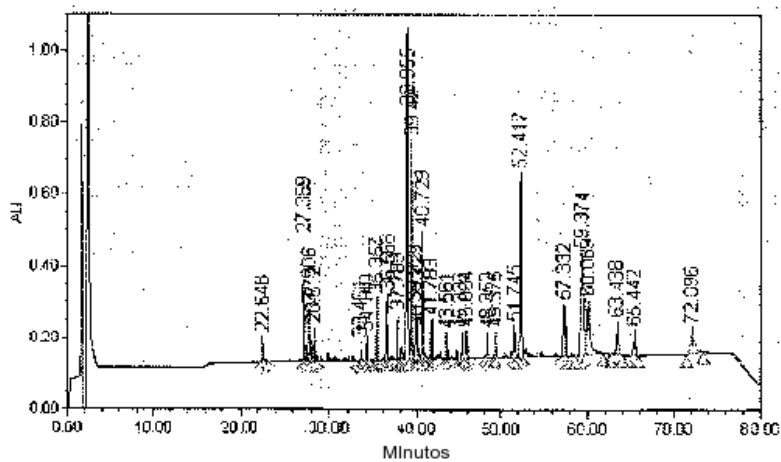
Ensayo en blanco del mapeo peptídico Trypsinase de la tripsina digerida YPEG-rHuIFN-α2b SP2. Dos pequeños picos se detectan respectivamente a los 71,674 min y 17,589 min; el pico de tripsina se detecta entre 2-3 min.

FIG.8



Mapeo peptídico Trypsinase de tripsina digerida (0h) muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 por HPLC-RPC18.  
El tiempo de retención de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 es 62,114 min; el pico de elución a 71,908 min es el pico de fondo, y el pico a 2-3 son los picos de tripsina.

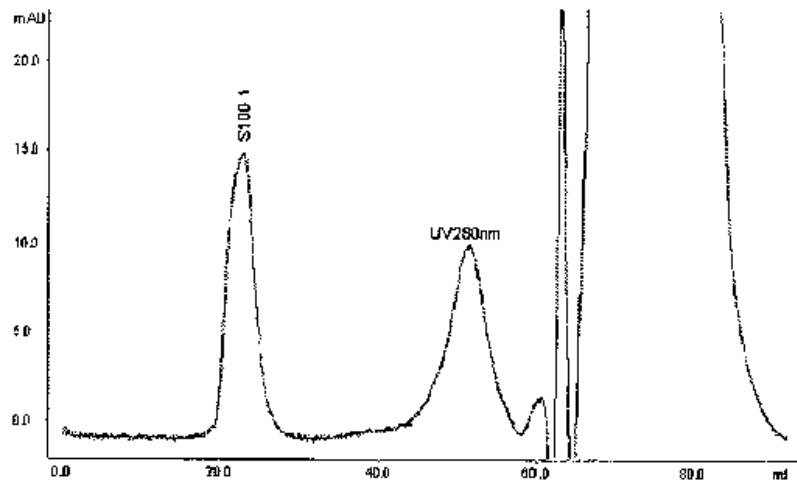
FIG.9



Mapeo peptídico de Trypsinase de tripsina digerida (48h) muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2 por HPLC-RPC18.  
Ningún pico de sustrato (62,114 min) se detecta entre 60,5 min-63,2 min, demostrando que la muestra no se digiere completamente.

FIG.10





Perfil de separación de Sefacril S-100 HR de los péptidos modificados por YPEG de la tripsina digerida completamente muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2b SP2.

Nota: los ejemplos se recogieron según los picos, y S100-1 es el péptido modificado por YPEG, a saber, la muestra objetivo.

FIG.11