

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 575**

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: **07800860 .4**  
96 Fecha de presentación: **04.09.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2196475**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2010**

54 Título: **Interferón alfa 2a modificado por polietilenglicol, su proceso de síntesis y su aplicación**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**23.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**23.08.2012**

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;  
LIU, Bin;  
LIN, Song;  
LIU, Min;  
YIN, Fenghong;  
ZHUANG, Lu y  
LEI, Lifang**

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

ES 2 386 575 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 2a modificado por polietilenglicol, su proceso de síntesis y su aplicación

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a interferón  $\alpha$ -2a modificado por polietilenglicol ramificado con forma de Y (PEG) en un único residuo de aminoácido y su preparación, al igual que el uso del IFN- $\alpha$ 2a 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 producida por células eucariotas en respuesta a infección vírica y otros estímulos antigénicos, que muestran efectos antivíricos, antiproliferativos e inmunomoduladores de amplio espectro. Los IFN han sido ampliamente aplicados en el tratamiento de varias condiciones y enfermedades, tales como infecciones víricas, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C y VIH; trastornos y enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis quística y enfermedad de pulmón intersticial; y tumores, por ejemplo, mielomas, linfomas, cáncer de hígado, cáncer pulmonar, leucemia de células pilosas, y así sucesivamente 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).

[0003] Los IFN se clasifican en cuatro tipos según sus diferencias en propiedades químicas, inmunológicas y biológicas: interferón- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\epsilon$ . Interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) se segrega por leucocitos. IFN- $\alpha$  humanos se codifican por una familia multigénica que consiste en aproximadamente 20 genes, las proteínas codificadas comparten sobre aproximadamente 90% de homología de secuencia de aminoácido (Henco K., Brosius F.J., *et al. J. Mol. Biol.*, 185, 227-260, 1985). IFN- $\alpha$ 2a humano es uno de los subtipos de la subfamilia  $\alpha$ 2 de la familia de IFN- $\alpha$  humano y es una proteína monocatenaria con varias actividades biológicas. La única proteína de cadena consiste en 165 residuos de aminoácidos, como se muestra en la SEC ID n° 1, en la que el aminoácido N-terminal es Cys con un grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> libre, y los residuos en las posiciones 23, 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 grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> libre.

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

[0005] PEG es un polímero orgánico biodegradable e inerte no tóxico, y es importante en los campos de ambas biotecnología y farmacéutica. Técnica de modificación PEG es para unir PEG a una proteína activa vía enlace covalente. Después de la PEGilación, las propiedades de la proteína pueden mejorarse significativamente, por ejemplo, la prolongación de vida media metabólica del fármaco, la reducción de inmunogenicidad, el aumento de seguridad, la mejora de eficacia terapéutica, la reducción de frecuencia de dosificación, el aumento de solubilidad solubilidad/agua del fármaco, el aumento de resistencia contra la proteólisis, la facilitación de liberación controlada del fármaco, etcétera. Para detalles adicionales consulte 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 la publicación de patente U.S. UP 4179337.

[0006] Se describe en la patente US n° 4179337, después de unión de PEG a una enzima o insulina, la inmunogenicidad de la proteína fue reducida, mientras simultáneamente las actividades de la proteína fueron reducidas 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

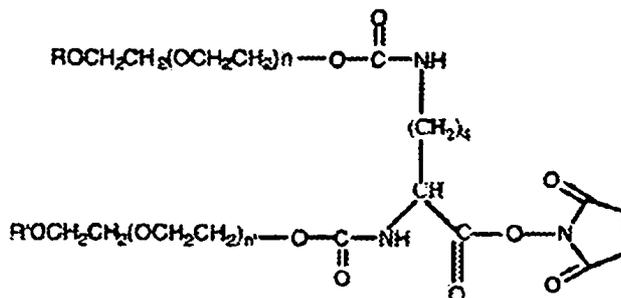
[0007] Habitualmente muchos tipos de proteínas pegiladas han sido aplicados clínicamente. En 1990, la adenosina-desaminasa bovina pegilada (Adagen) producida por ENZON Inc. fue aprobada por FDA, y usada para tratar enfermedad de inmunodeficiencia severa combinada (pegfamg013102LB, <http://www.fda.gov>). En 1994, otra proteína PEG-modificada para tratar leucemia linfoblástica aguda, la asparaginasa pegilada (pegaspargase, Oncaspar), fue también comercializada en EEUU (103411s50521b1, <http://www.fda.gov>). El interferón- $\alpha$ 2b modificado por PEG (PEG IFN- $\alpha$ 2b, PEG-intrón) desarrollado por Schering-Plough fue aprobado por FDA para mercadeo en 2000 y el interferón- $\alpha$  pegilado (PEG IFN- $\alpha$ 2a, Pegasys) producido por Hoffman-la Roche Ltd. fue también aprobado para mercadeo 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 por 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>). El FDA también aceptó la aplicación para antagonista de factor de crecimiento humano pegilado

65

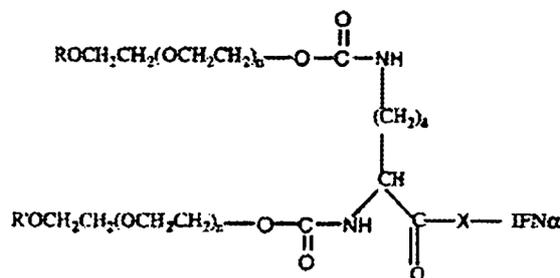
desarrollado por Pharmacia. El fragmento de anticuerpo TNF- $\alpha$  combinado PEG de Celltech y el receptor PEG-TNF de Amgen se evalúan en los ensayos clínicos avanzados. La primera molécula PEG-orgánica conjugada, camptotecina pegilada, también entró en fase II de prueba clínica. En 2004, el oligonucleótido modificado por PEG (Pegaptanib, Macugen™) fue aprobado por FDA. El metabolismo *in vivo* del PEG en el fármaco (o PEG en sí mismo) ha sido entendido claramente, y PEG ha sido probado para ser un fármaco modificador bueno y seguro sin ningún efecto adverso.

[0008] Generalmente, una molécula de PEG modifica una proteína uniéndose al N-terminal de un grupo  $\alpha$ -amino o  $\epsilon$ -amino de un residuo de Lys interno en la molécula de proteína. Hay normalmente tres tipos de PEG para modificación de proteína: una molécula de cadena lineal (EP 0593868), una molécula ramificada con forma de U (EP 0809996) y una molécula ramificada con forma de Y (CN1243779C). Hasta la fecha, no hay todavía ninguno de los informes sobre la preparación de ramificado con forma de Y de IFN- $\alpha$ 2a modificado por PEG y la separación de diferentes IFN- $\alpha$ 2a con una única modificación de molécula de PEG en posiciones de aminoácido diferentes. Se informó que la proteína ramificada PEG-modificada mostró mejor pH tolerancia, termo-estabilidad y resistencia contra la proteólisis que proteínas PEG-modificadas de cadena lineal (Monfardini *et al. Bioconjugate Chem.*, 6, 62, 1995).

[0009] Los PEG que se pueden unir a un fármaco de proteína normalmente necesitan ser derivatizados, de modo que uno o dos grupos terminales de los extremos de PEG pueden ser activados 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 fármaco con el que va a unirse. Por ejemplo, PEG se pueden unir a  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de un 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 de péptido 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 de 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 como sigue:



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 de los PEG es de 26KD a 66KD. La fórmula molecular del IFN- $\alpha$  PEG<sub>2</sub>-NHS-modificado de como sigue:

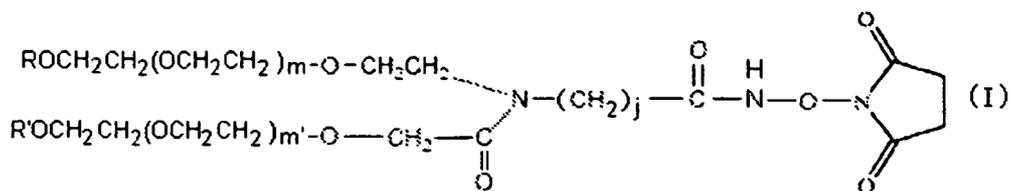


[0010] Donde una o más moléculas PEG<sub>2</sub>-NHS se unen por  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal o  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de Lys en IFN- $\alpha$ , los productos obtenidos son una mezcla de IFN- $\alpha$  no pegilado, IFN- $\alpha$  pegilado en un único residuo de aminoácido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

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



[0013] 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 la fórmula (I):

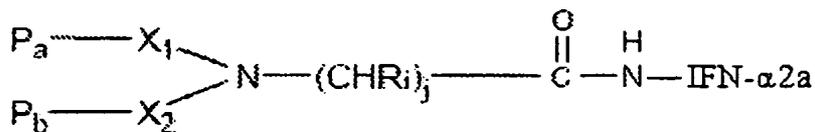


5 donde R y R' son independientemente un grupo alquilo C1-C4, preferiblemente metilo; m y m' indica el grado de polimerización y puede ser cualquier número entero; m+m' es preferiblemente de 600 a 1500; J es un número entero de 1 el 12 y el peso molecular medio total del PEG es aproximadamente 40000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

10 [0014] Los presentes inventores usaron derivados de PEG con forma de Y ramificados (YPEG) para modificar interferon-α2a (IFN-α2a), y aislar el yPEG-IFNs-α2a, modificado por YPEG en un único residuo de aminoácido, por cromatografía de intercambio de iones de Q-Sepharose FF. Por otra parte, los YPEG-IFNs-α2a aislados modificados en un único residuo de aminoácido fue además separado por cromatografía de SP-Sepharose FF para obtener YPEG-IFN-α2a donde el YPEG es principalmente unido a la cadena lateral ε-NH2 de Lys en la posición 134 en la SEC ID n° 1, que es llamado YPEG-IFN-α2a(134). Después de medición, se ha encontrado que la actividad *in vitro* del YPEG-IFN-α2a(134) es significativamente superior a la del YPEG-IFN-α2a en el que el YPEG se une a otra posición de aminoácido, y la vida media del YPEG-IFN-α2a(134) en el suero es significativamente más larga que la del IFN-α2a inmodificado.

15 [0015] Por lo tanto, la presente invención proporciona IFN-α2a pegilados en un único residuo de aminoácido, la estructura del cual es como sigue:

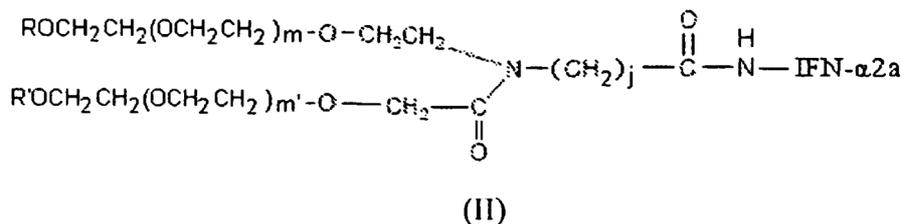
20



25 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 alquilo grupo C1-C12 sustituido o no sustituido, un arilo sustituido, un aralquilo, o un grupo de heteroalquilo; X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son independientemente grupos de unión, donde X<sub>1</sub> es (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, y X<sub>2</sub> es seleccionado 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.

30 [0016] En una forma de realización preferida de la presente invención, la fórmula estructural del IFN-α2a pegilado de la presente invención es como sigue:

35



40 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; m+m' es preferiblemente de 600 a 1500. En esta estructura, una molécula de PEG ramificada con forma de Y se une a una molécula IFN-α2a vía un único residuo de aminoácido. El peso molecular medio de los YPEG-IFN-α2a en la fórmula (II) depende principalmente del grado de polimerización, m y m'. 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. 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.

[0017] En una forma de realización preferida, en el IFN- $\alpha$ 2a pegilado de la presente invención, una molécula de PEG se une a IFN- $\alpha$ 2a vía un enlace amido formado por grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido N-terminal o la cadena lateral del grupo  $\epsilon$ -amino del residuo de Lys de IFN- $\alpha$ 2a correspondiente a posición 23, 31, 49, 70, 83, 112, 121, 131, 133, 134, o 164 como se muestra en la SEC ID n° 1.

5

[0018] En otra forma de realización preferida, en el IFN- $\alpha$ 2a pegilado de la presente invención, una molécula de PEG se une a IFN- $\alpha$ 2a vía un enlace amido principalmente formado por la cadena lateral de grupo  $\epsilon$ -amino de residuo de Lys de IFN- $\alpha$ 2a correspondiente a la posición 134 como se muestra en la SEC ID n° 1.

10

[0019] Opcionalmente, el IFN- $\alpha$ 2a de la presente invención puede ser extraído de fuentes naturales u obtenido por biotecnología recombinante. Preferiblemente, el IFN- $\alpha$ 2a es IFN- $\alpha$ 2a humano (hIFN- $\alpha$ 2a) con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n° 1, que es extraído de fuentes naturales u obtenido por biotecnología recombinante. Más preferiblemente, el IFN- $\alpha$ 2a humano es IFN- $\alpha$ 2a humano recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2a). El rhIFN- $\alpha$ 2a puede ser artificialmente sintetizado, o ser expresado de sistemas de expresión procariotas tal como *E. coli*, o ser expresado de sistemas de expresión de levaduras eucariotas tal como *Pichia*, o ser expresado de sistemas de expresión de célula de insecto o sistemas de expresión de células mamíferas tales como CHO. Los métodos de preparación del IFN- $\alpha$ 2a recombinante o natural y las pruebas de actividad de IFN- $\alpha$ 2a y IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG se conocen en la técnica precedente.

15

20

[0020] Similar al IFN- $\alpha$ 2a, el YPEG-IFN- $\alpha$ 2a de la presente invención también puede usarse clínicamente para tratar tumores e infecciones víricas, tal como hepatitis, leucemia de células pilosas, linfólisis mediada de célula, sarcoma de Kaposi, etcétera. En clínica, el YPEG- IFN- $\alpha$ 2a de la presente invención es claramente mejorado, en comparación con IFN- $\alpha$ 2a, en estabilidad, solubilidad, vida media en el suero y eficacia terapéutica clínica. Para el modo de administración, el YPEG- IFN- $\alpha$ 2a de la presente invención se puede administrar a los pacientes en forma de una composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz del YPEG-IFN- $\alpha$ 2a 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- $\alpha$ 2a pegilado de la presente invención y un portador farmacéuticamente aceptable o excipiente. Preferiblemente, la composición comprende manitol, un aminoácido, cloruro sódico y acetato sódico, donde el aminoácido es preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico, asparagina y glicina.

25

30

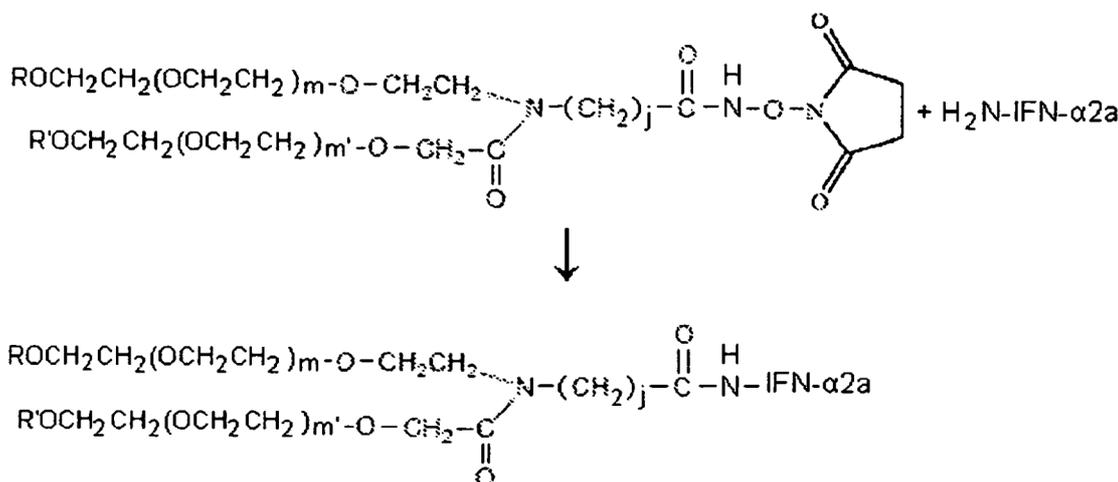
[0021] En otro aspecto, la presente invención también proporciona el uso del IFN- $\alpha$ 2a pegilado de la invención o la composición comprendiendo el IFN- $\alpha$ 2a pegilado de la invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad en necesidad de tratamiento con IFN- $\alpha$ 2a. Preferiblemente, la enfermedad en necesidad de tratamiento con IFN- $\alpha$ 2a es seleccionada 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 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, o carcinoma de célula renal metastática o recurrente; trastornos inflamatorios y enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis cística y enfermedad de pulmón intersticial, y trombocitemia relacionada con enfermedades mieloproliferativas.

35

40

[0022] Para obtener el IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG, en una forma de realización de la presente invención, inicialmente la fracción de PEG de derivados activados de YPEG tal como PEG N-hidroxil succinimidil éster (YPEG-NHS) es unido 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 y un grupo  $\epsilon$ -amino de residuo de Lys de la proteína. La ecuación de reacción para la generación de YPEG- IFN- $\alpha$ 2a a partir de YPEG y IFN- $\alpha$ 2a es como sigue:

45



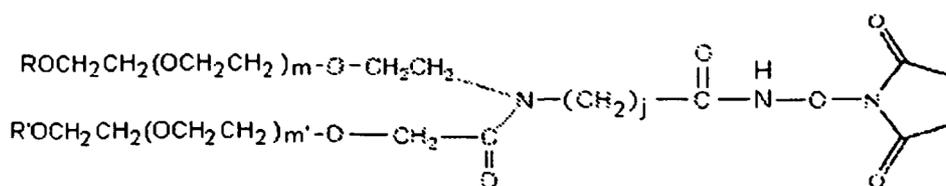
[0023] Las condiciones de reacción son moderadas, el pH está en un intervalo de 4,5 a 9,5, la temperatura está entre 0-25°C y mediciones de agitación u otra mezcla mide son necesarias. Para condiciones detalladas véanse los ejemplos en la descripción detallada de la invención. Todos los YPEG con pesos moleculares diferentes se pueden unir a IFN-α2a usando el método anterior. Los productos incluyen IFN-α2a modificado en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN-α2a), IFN-α2a modificado en dos residuos de aminoácido (YPEG2-IFN-α2a) IFN-α2a modificados en residuos de aminoácidos múltiples (YPEG<sub>n</sub>-IFN-α2a), donde los productos modificados en un único residuo de aminoácido pueden ser los productos predominantes ajustando la condición de la reacción.

[0024] Posteriormente, los YPEG-IFN-α2a, modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, se pueden aislar de la mezcla de todos los tipos de los IFN-α2a modificados por YPEG usando un método tal como cromatografía de intercambio de cationes, cromatografía de intercambio de aniones, o cromatografía de exclusión, y luego los IFN-α2a modificados por PEG en residuos de aminoácidos diferentes únicos puede ser además resuelto para obtener el YPEG-IFN-α2a 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 modificado por PEG en un único residuo de aminoácido de aquellos modificados por PEG en dos o múltiples residuos de aminoácidos y IFN-α2a no modificado. Los métodos de purificación anteriormente mencionados también pueden usarse para resolver además los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido para obtener isómeros diferentes con la modificación de PEG en posiciones diferentes únicas. Las actividades biológicas *in vitro* de todos los tipos de los productos modificados por PEG se pueden medir según cualquier ensayo conocido para IFN-actividad, por ejemplo, inhibición de efecto citopático. Para IFN modificado por PEG en un único residuo de aminoácido, las fracciones de PEG en los isómeros diferentes tienen efectos diferentes en mantener los dominios activos de IFN, dando como resultado diferencias grandes en las actividades biológicas de diferentes isómeros. En términos generales, las actividades *in vitro* de IFN disminuyen notablemente después de modificación por 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 ha sido medida, y los resultados indican que el aislado de pico 3 (SP2) tiene actividad específica significativamente más alta que el aislado de otros picos y PEGASYS (Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza), y tiene vida media significativamente más larga en el suero que IFN-α2a no modificado.

[0025] En otra forma de realización, el péptido ramificado con forma de Y unido por PEG del SP2 fue secuenciado usando degradación de Edman, y los resultados mostraron que el componente primario de SP2 fue YPEG-IFN-α2a (134).

[0026] Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención también proporciona la preparación y métodos de purificación para YPEG-IFN-α2a, comprendiendo:

(a) bajo una condición alcalina, preferiblemente a pH 9,0, permitiendo al PEG ramificado con forma de Y como se muestra en la fórmula (I) de debajo reaccionar con 1 IFN-α2a y obtener IFN-α2a pegilado;



(I)

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 Sepharose FF y elución 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 catiónico, preferiblemente SP Sepharose FF, en un gradiente de cationes, preferiblemente en un gradiente de iones sodio, y 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 la máxima actividad.

Breve descripción de los dibujos

[0027]

FIG.1: SDS-PAGE de 3 lotes de IFN- $\alpha$ 2a modificado con YPEG (40KD). La concentración del gel de separación fue 12%, y azul brillante Coomassie R-250 fue usado como tinte de coloración. Columnas 1-2: 20060804; Columnas 3-4: 20060807-1; Columnas 5-6: 20060807-2.

FIG.2: El perfil de resolución de isómeros de modificación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a por SP-Sepharose FF.

FIG.3: SDS-PAGE teñido de plata (12%) de las muestras YPEG-IFN- $\alpha$ 2a purificadas a través de SP-Sepharose FF. Columna 1: Marcadores de peso molecular; Columnas: 2, 4, 6, 8, blanco; Columnas 3, 5, 7, 9, correspondientes respectivamente a máximos 1 a 4 en el perfil de elución.

FIG.4: Pesos moleculares aparentes de los isómeros de modificación de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a en la tinción de plata SDS-PAGE. Columna 1: Marcador de peso molecular (GE Lifesciences); Columna 2: YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP3, 0,4 $\mu$ g; Columna 3: YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2, 0,4 $\mu$ g; Columna 4: YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP1, 0,4 $\mu$ g.

FIG.5: Los pesos moleculares de las muestras YPEG-IFN- $\alpha$ 2a purificadas a través de SP-Sepharose FF por MALDI-TOF MS. YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP1 corresponde a la muestra en la columna 4 de la FIG.4; YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 corresponde a la muestra en la columna 3 de la FIG.4, y YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP3 corresponde a la muestra en la columna 2 de la FIG.4.

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

FIG.7: La concentración de suero del fármaco y 2', 5'-A concentración después de una inyección única de 30  $\mu$ g·kg<sup>-1</sup> YPEG-rhIFN- $\alpha$ 2a SP2 en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*).

FIG.8: el análisis de mapeo peptídico Trypsinase de la tripsina digerida (0h) YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 muestra por HPLC-RP C18. El tiempo de retención de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 fue 62,105min, el pico de elución a 71,882min fue el fondo solvente, y picos de elución a 2-3min fueron tripsina.

FIG.9: El análisis de mapeo peptídico Trypsinase de la tripsina digerida (48h) YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 muestra por HPLC-RP C18. Pico de solvente a 71,581min fue detectado, correspondiente al pico de solvente a 71,882min en la muestra de tripsina digerida (0h). Ningún pico de proteína de sustrato (62,105min) fue detectado entre 59,5min y 62,5min, demostrando que la muestra fue digerida sustancialmente de manera completa.

FIG.10: Perfil de separación Sefacril S-100 HR de los péptidos modificados por YPEG de la muestra de tripsina YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 digerida completamente.

Descripción detallada de la invención

[0028] La presente invención será además descrita por los siguientes ejemplos, pero cualquier ejemplo o su combinación debería no ser entendido 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 técnica anterior, personas expertas en la técnica claramente entenderían el alcance limitado por las reivindicaciones.

#### Ejemplo 1

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

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

[0029] 166,3mg de YPEG (fórmula, (I) peso molecular medio 40KD, brazos iguales, número de cantidad RD010P041, Beijing JenKem Technology Co., Ltd.) fue ponderado y disuelto en 1 ml de 2mM de HCl (Guangdong Guanghua Chemical Factory Co., Ltd.). 40mg de IFN- $\alpha$ 2a (Xiamen Amoytop Biotech Co., Ltd.) y 50mM de tampón de ácido bórico (pH 9,0, Sinopharm Shanghai Chemical Reagent Co., Ltd.) fueron añadidos a un volumen de reacción final de 10ml. En este sistema de reacción, la concentración final de IFN- $\alpha$ 2a fue 4mg/ml y la proporción molar de reacción de YPEG y IFN- $\alpha$ 2a fue 1:2. El sistema de reacción fue matenido bajo 0-25°C durante 2h con agitación. El IFN- $\alpha$ 2a pegilado fue generado luego y la reacción fue detenida por adición de ácido glacial acético (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.) a hacer pH<4,0. La prueba A fue sometida a SDS-PAGE. El sistema de reacción fue diluido 50 veces con agua y luego filtrada 0,2 $\mu$ m antes de almacenamiento a 4°C para uso posterior.

[0030] Cromatografía de Q-Sepharose FF fue usado para separar el PEG restante e hidrolatos de PEG, IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples, IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG en un único residuo de aminoácido y el IFN- $\alpha$ 2a no modificado. Columna de Q-Sepharose FF (GE Healthcare) ( $\phi$ 2mm $\times$ 90mm; 1CV=10ml) fue regenerada con 3 volumen de columna (CV) de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-1M NaCl (BBI), y luego equilibrada con 5CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0). Longitud de onda de detección UV fue fijada a

280nm. La muestra entera almacenada a 4°C fue cargada. Después de carga, la columna fue equilibrada con 3CV de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0), y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-12mM de NaCl fue usado para elución hasta que el primer pico fue completamente eluido, este pico fue el PEG restante 20mM tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-60mM de NaCl fue luego usado para elución, y la muestra recogida en este pico de elución fue principalmente YPEG-IFN- $\alpha$ 2a modificado por PEG en un único residuo de aminoácido. Y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-500mM de NaCl fue usado para elución y el pico de elución fue el IFN- $\alpha$ 2a no modificado.

[0031] Los productos objetivo fueron principalmente los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, IFN- $\alpha$ 2a, con un índice de rendimiento de 20-40%.

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

[0032] 4989,6mg de YPEG (fórmula, (I) peso molecular medio 40KD, brazos iguales, número de cantidad RD010P041, PBeijing JenKem Technology Co., Ltd.) fue pesado y disuelto en 25ml de 2mM de HCl. Y 1200mg de IFN- $\alpha$ 2a y 50mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH 9,0) fueron añadidos a un volumen de reacción final de 200ml. En este sistema de reacción, la concentración de reacción final de IFN- $\alpha$ 2a fue 6mg / ml, y la proporción molar de reacción de YPEG y IFN- $\alpha$ 2a fue 1:2. El sistema de reacción fue mantenido bajo 0-25°C durante 2h con agitación. La reacción fue detenida añadiendo ácido acético glacial para hacer pH<4,0. La prueba A fue sometida a SDS-PAGE. El sistema de reacción fue diluido 50 veces con agua y luego filtrada 0,2 $\mu$ m antes de almacenamiento a 4°C para uso posterior.

[0033] Cromatografía de Q-Sepharose FF fue usada para separar el PEG restante e hidrolatos de PEG, IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples, IFN- $\alpha$ 2a modificado por YPEG en un único residuo de aminoácido y el IFN- $\alpha$ 2a no modificado. Columna de Q-Sepharose FF (GE Healthcare) ( $\Phi$ 38mm $\times$ 265mm; 1CV=300ml) fue regenerada con 3 CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-1M de NaCl, y luego equilibrada con 5CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0). Longitud de onda de detección UV fue fijada a 280nm. La muestra entera almacenada a 4°C fue cargada. Después de carga, la columna fue equilibrada con 3CV de 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0), y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-12mM de NaCl fue usado para elución hasta que el primer pico fue completamente eluido, este pico fue el PEG restante. 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-60mM de NaCl fue luego usado para elución, y la muestra recogida en este pico de elución fue principalmente el YPEG-IFN- $\alpha$ 2a modificado por PEG en un único residuo de aminoácido. Y luego 20mM de tampón de ácido/bórax bórico (pH9,0)-500mM de NaCl fue usado para elución y el pico de elución fue el IFN- $\alpha$ 2a no modificado.

[0034] Los productos objetivo fueron principalmente los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, YPEG- IFN- $\alpha$ 2a, con un índice de rendimiento de 35-50%.

[0035] La Fig. 1 muestra resultados de SDS-PAGE durante 3 lotes de IFN- $\alpha$ 2a modificado con YPEG (40KD). Esto se puede ver en la Figura 1 que, bajo la condición, el índice de modificación de PEG de rIFN- $\alpha$ 2a fue entre 35-50% y se mantuvo estable. Los productos primarios modificados fueron modificados por PEG en un único residuo de aminoácido, y había también algunos productos modificados por PEG en residuos de aminoácidos múltiples.

## Ejemplo 2

### Resolviendo YPEG-IFN- $\alpha$ 2a por SP-Sepharose FF

[0036] La muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a capturada por Q-Sepharose FF fue ajustada a pH 5,0 con 20% de ácido acético, luego diluido 15 veces con 5mM de NaAc/HAc (Shantou Xilong Chemical Co., Ltd.). La muestra fue cargada a 0,5mg/m de capacidad de carga para columna de SP-Sepharose FF 100ml (GE Healthcare) ( $\Phi$ 18mm $\times$ 394mm). La columna fue equilibrada con 3CV de 5mM de NaAc/HAc (pH5,0), y luego eluida 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- $\alpha$ 2a fue resuelto como 4 picos de elución por SP-Sepharose FF 100ml. Las muestras fueron recogidas según estos picos y luego evaluadas por SDS-PAGE con coloración de plata respectivamente. Según los resultados de SDS-PAGE, se puede observar que pico 1 resuelto por SP-Sepharose FF fue principalmente los productos modificados por YPEG en residuos de aminoácidos múltiples (YPEGn-IFN- $\alpha$ 2a). Pico 2 por SP-Sepharose FF fue principalmente los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido (YPEG-IFN- $\alpha$ 2a), y también contuvo algunos productos modificados por PEG en residuos de aminoácidos múltiples. Pico 3 y pico 4 por SP-Sepharose FF fueron los productos modificados por PEG en un único residuo de aminoácido. Picos 2-4 resueltos por SP-Sepharose FF fueron isómeros modificados con YPEG en posiciones diferentes únicas, y fueron nombrados respectivamente como YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP1; YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 y YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP3. El perfil de resolución y resultados de tinción de plata SAD-PAGE fueron mostrados en las FIG. 2 y FIG.3 respectivamente.

[0037] Cada muestra de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP1-3 fue complementada con cloruro sódico, acetato sódico, manitol, ácido aspártico y fue esterilizada con filtro 0,22 $\mu$ m antes de almacenamiento a 4°C para uso posterior.

## Ejemplo 3

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

**(1) Concentración de proteína por el método de Kjeldahl**

[0038] Las concentraciones de isómeros de modificación de YPEG-IFN-α2a fueron determinadas por el método de Kjeldahl.

**(2) Peso molecular aparente de proteína**

[0039] Los pesos moleculares aparentes de isómeros de modificación de YPEG-IFN-α2a fueron determinados por SDS-PAGE. El método fue según a Laemmli *et al* (*Nature* 227: 680, 1970). La concentración del gel fue 7,5% y el gel fue visualizado por coloración de plata. Los pesos moleculares aparentes de isómeros de modificación de YPEG-IFN-α2a fueron casi iguales, aproximadamente 120KD (FIG. 4).

**(3) Peso molecular determinado por MALDI-TOF MS**

[0040] MALDI-TOF MS (sistema Autoflex TOF/TOF, Bruker Daltonics, Alemania) fue usado para determinar los pesos moleculares de isómeros de modificación de YPEG-rHuIFN-α2a. Ácido sinapínico (SA, C<sub>11</sub> H<sub>12</sub> O<sub>5</sub>, M.W. 224.22, número de lote: 2006 236870 002, Bruker Daltonics, Alemania) fue usado como matriz. Estándar de calibración de proteína II (Parte n° 207234, Bruker Daltonics, Alemania) fue usado como estándar de peso molecular de proteína, y el software para análisis de datos fue FlexAnalysis Ver.3.0.54.0. Los pesos moleculares de isómeros de modificación MS de YPEG-IFN-α2a fueron casi iguales, aproximadamente 59000 Dalton (FIG.5).

**(4) Pureza de proteína**

[0041] La pureza de isómeros de modificación de YPEG-IFN-α2a fue determinada por HPLC-SE. Columna de HPLC fue TSK G4000 SWXL (Φ7,8mm×300mm; TOSOH), el volumen de carga de muestra fue 20μl (aproximadamente 10μg de proteína), la fase móvil fue 0,1M de PBNa-0,1M de NaCl (pH7), la velocidad de flujo fue 0,8ml/min, y la longitud de onda de detección fue fijada a 280nm. El YPEG-IFN-α2a SP2 fue un único pico principal, con una pureza de más de 99%.

**(5) Prueba de contenido de endotoxina**

[0042] Basado en ensayo 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-α2a fue menos de 5,0EU/mg.

**(6) Actividad *in vivo* y farmacocinéticas de YPEG-IFN-α2a SP2 en animal**

□ Actividad *in vivo* de YPEG-IFN-α2a SP2 en animal

[0043] El mecanismo de acción de IFN es inducir parcialmente la producción de 2',5'-AS (2',5'-oligoadenilato sintetasa), que a su vez ejercita sus efectos antivíricos. Usando <sup>125</sup>I como trazador, los parámetros farmacodinámicos de IFN se reflejan por la actividad *in vivo* 2',5'-AS. 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 2',5'- A sintetizado). Primero, 2',5'-AS en las muestras se absorbe y se activa por Poly(I)-Poly(C) agarosa, luego cataliza el sustrato de ATP para generar 2',5'-A. Una mezcla de <sup>125</sup>I marcado 2',5'-A, anti-2',5'-A suero y anticuerpo secundario se añade en la muestra que luego es incubada y centrifugada para separar la mezcla. El sobrenadante se descarta y un gammámetro se utiliza para medir la radioactividad del sedimento. El índice de unión del <sup>125</sup>I añadido inicialmente marcado 2',5'-A es calculado. Regresión logística de cuatro parámetros se utiliza para generar curva estándar, y luego la concentración del 2',5'-AS- inducido por el producto 2',5'-A en una muestra desconocida podría estimarse.

[0044] Usando el método 2',5'-A mencionado anteriormente, 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 30μg·kg<sup>-1</sup> YPEG-rhIFN-α2a SP2 en el macaco cangrejero (*Macaca fascicularis*) (15 macacos cangrejeros, 7 hembras y 8 machos. Laboratory Animal Center de la Academy of Military Medical Sciences, certificado n°. SCXK-(MIL)2002-001. Peso corporal 2,5-3,7kg, elevados en jaulas separadas, alimentados con pienso de mono estándar, bebida libremente). Esto se puede ver en la FIG. 5, después de administración, la actividad de 2',5'-AS en el suero aumentó claramente, y el tiempo-a-pico de 2',5'-A en el suero fue retardado que el de YPEG-IFN-α2a SP2. El tiempo-a-pico medio fue 24±18,33h, y la concentración para pico fue 104,31±56,39Pmol·dL<sup>-1</sup>.

Tabla 1. Las concentraciones de suero 2',5'-A en el tiempo, después de una única inyección s.c. de 30 μg·kg<sup>-1</sup> YPEG-rhIFN-α2a SP2 en el macaco cangrejero. (Pmol·dL<sup>-1</sup>)

Tiempo (h)	Nº de macaco cangrejero			Medio	SD
	1	2	3		
0	16,08	19,01	42,91	26,00	± 14,72
1	39,04	--	16,19	27,61	± 16,16

2	48,21	16,90	20,20	28,44	±	17,21
4	55,22	36,09	74,16	55,15	±	19,04
8	32,04	59,69	99,52	63,75	±	33,92
10	13,52	41,21	51,85	35,53	±	19,79
12	37,35	53,32	119,76	70,14	±	43,71
24	58,29	167,22	87,42	104,31	±	56,39
48	77,50	160,67	71,41	103,19	±	49,87
72	62,88	165,97	58,52	95,79	±	60,82
96	73,53	119,79	90,85	94,72	±	23,37
168	45,41	135,26	68,92	83,20	±	46,60
240	48,14	102,61	73,97	74,90	±	27,25
312	93,23	21,69	62,84	59,26	±	35,90

□ Farmacocinética de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 y rhIFN- $\alpha$ 2a en el macaco cangrejero

5 [0045] Una única inyección s.c. de 7,5, 30 o 120  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 fue dado a macaco cangrejero. Para el grupo de administración, 1 ml de sangre venosa fue tomada 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. Para el grupo con una única inyección s.c. de rhIFN- $\alpha$ 2a (7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), 1 ml de sangre fue tomada al mismo tiempo antes, 0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h y 24h después de administración. Después se mantuvo a 4°C durante 30 min, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2000rpm durante 10min bajo temperatura baja, luego el suero fue separado inmediatamente y almacenado a -20°C para análisis posterior.

15 [0046] El inmunoanálisis en doble sándwich cuantitativo fue usado. Un anticuerpo monoclonal específico al IFN- $\alpha$  recombinante humano fue pre-revestido en la placa de microtitulación. El estándar y las muestras fueron pipetadas en los pocillos de microtitulación, donde el YPEG-IFN- $\alpha$ 2a o rhIFN- $\alpha$ 2a SP2 se uniría con el anticuerpo inmovilizado. La placa fue lavada para eliminar sustancias no unidas y luego IFN- $\alpha$  anti-humano IgG (anticuerpo secundario) fue añadido a los pocillos. Después de que la reacción fue completada, la placa fue lavada y la peroxidasa de rábano (HRP) fue añadida en los pocillos. Después de lavar la enzima no unida y los reactivos, el color generado añadiendo solución de sustrato HRP en cada pocillo fue proporcional a la cantidad del YPEG-IFN- $\alpha$ 2a o IFN  $\alpha$  SP2 unido en el primer paso. La reacción fue detenida y la intensidad de color fue medida. Más alto es el OD valor de absorbancia, más alta es la concentración de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a o IFN- $\alpha$ 2a SP2 en la muestra. Las curvas estándar fueron fijadas para YPEG-IFN- $\alpha$ 2a y IFN- $\alpha$ 2a SP2 respectivamente para medir la concentración de fármaco en suero en las muestras de sangre.

25 [0047] Según el protocolo en la descripción del kit (American Biomedical Co., número de lote 3271), 100 $\mu\text{l}$  estándar o muestra de sangre fue añadida en cada pocillo y mezclado con mezclador de placa suavemente. Según la concentración anticipada de una muestra desconocida, la muestra fue diluida con la solución diluida a los intervalos de concentración de la curva estándar. La curva estándar de rhIFN- $\alpha$ 2a o YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 para cada placa fue fijada para calcular la concentración de la muestra desconocida en esa placa. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 1h y lavada una vez con solución de lavado de placa. 100 $\mu\text{l}$  de anticuerpo secundario se añadió a cada pocillo se mantuvo a temperatura ambiente durante 1h. La placa fue lavada 3 veces y 100 $\mu\text{l}$  de HRP conjugado se añadió a cada pocillo. La placa fue incubada a temperatura ambiente durante 1 h y lavada 4 veces. 100 $\mu\text{l}$  de sustrato TMB fue añadido en cada pocillo, y matenido a temperatura ambiente a oscuras durante 15min. 100 $\mu\text{l}$  de solución de parada se añadió a cada pocillo y se mezcló suavemente para parar la reacción. El valor de absorbancia OD a 450nm fue medido con un lector de microplacas dentro de 5min para determinar la concentración de cada muestra.

35 [0048] Después de una única inyección s.c. de 7,5, 30 o 120  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  YPEG-rhIFN- $\alpha$ 2a en el macaco cangrejero, las vidas medias fueron 35,81 $\pm$ 2,50, 31,38 $\pm$ 11,84 y 36, 7 $\pm$ 2,24 h, respectivamente. Después de una única inyección s.c. de 7,5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  rhIFN- $\alpha$ 2a en el macaco cangrejero, la vida media fue 3,02 $\pm$ 0,55h. La vida media de rhIFN- $\alpha$ 2a se prolongó significativamente después de PEGilación.

40 **(7) Actividad específica *in vitro***

45 [0049] La actividad biológica *in vitro* de cada isómero de modificación YPEG-IFN- $\alpha$ 2a fue estimada usando ensayo de inhibición de efecto citopático. Según el método descrito en el método de determinación de actividad de interferón (*Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2005, Volume 3, Appendix X C*), el interferón protege células humanas amnióticas (WISH) del daño provocado por el virus de estomatitis vesicular (VSV). Violeta cristal fue usado para manchar células WISH sobrevividas, y el valor de absorbancia OD fue medido a 570nm. La curva de efecto de

protección de interferón fue fijada 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 fueron llevadas 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 y SP3, y también 1-2 veces más alta que la muestra irresoluble y PEGASYS (fabricada 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).

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

Muestra	Tipo de PEG	PEG P.M. (KD)	Nº de posiciones de modificación	Actividad específica media ( $\times 10^6$ IU/mg)
YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP1	Y-ramificado	40	1	1,04 $\pm$ 0,110
YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2	Y-ramificado	40	1	2,26 $\pm$ 0,129
YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP3	Y-ramificado	40	1	1,11 $\pm$ 0,091
YPEG-IFN- $\alpha$ 2a unresolved sample	Y-ramificado	40	1	1,01 $\pm$ 0,173
PEGASYS	U-ramificado	40	1	0,903 $\pm$ 0,056

#### (8) La resolución de la posición de modificación en YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2

15 [0050] El sistema de solvente de YPEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 fue cambiado a 50mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH8,0) por ultrafiltración con ultrafiltro 5K (filtro millipore, material de polietersulfona), y la concentración de proteína fue determinada para ser 4, 2mg/ml usando espectroscopia de UV. Tripsina TPCK (Promega) fue disuelta (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l) en la solución proporcionada por el fabricante. Muestras fueron añadidas según la tabla 3:

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

Componentes de la reacción	Volumen
50mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH8,0	7,15ml
PEG-IFN- $\alpha$ 2a SP2 (4,02mg/ml)	1,25ml
Tripsina (0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	0,2ml
Volumen total de reacción	8,6ml

25 [0051] El sistema de reacción fue mantenido al baño maría a 37°C durante 48h, luego 1,52ml de 20% de ácido acético se añadió para parar de la reacción. Una pequeña cantidad de muestra fue tomada para mapeo peptídico HPLC-RP C18. El instrumento para análisis fue sistema 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 $\times$ 150mm, producido por Phenomenex, USA). Fase móvil A fue 0,1 % TFA/ $\text{H}_2\text{O}$ , fase móvil B fue 0,1% TFA/90% ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ , la velocidad de flujo fue 1 ml/min y la longitud de onda de detección fue fijada a 214nm. Véase la tabla 4 para los gradientes de elución y los resultados se muestran en las FIG. 8-9.

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

[0052] Basado en los resultados de detección, se puede determinar que la muestra fue digerida casi completamente. Los productos fueron tratados con reducción de DTT después de que la reacción fue detenida. La columna de Sefacril S-100HR (Φ18×255mm, 1CV=64ml; GE Healthcare) fue preequilibrada con 3CV de 20mM de PBNa-400mM NaCl (pH7,0) y 3% CV de la muestra de YPEG-IFN-α2a SP2 por tripsina TPCK digerida completamente fue cargada por presión hidrostática. 20mM PBNa- 400mM de NaCl (pH7,0) fue usado para elución y la longitud de onda de detección fue fijada a 280nm. La muestra del primer pico de elución fue recogida (número de muestra: YPEG-IFN-α2a S100-1, FIG. 10) y el sistema de solvente fue cambiado a 5mM PBNa (pH 7) con ultrafiltro 5K. Liofilización en vacío se hizo. Los aminoácidos N-terminales de la muestra liofilizada fueron determinados usando degradación de Edman, y la secuencia de 7 aminoácidos en el N-terminal de la muestra fue XYSPXAW (tabla 5), donde X denota α-amino cisteína ácida (Cis), un no-α-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-α2a SP2 fue principalmente el producto modificado por YPEG en Lys134.

Tabla 5: Resultado de secuenciación para los aminoácidos N-terminales de YPEG-IFN-α2a S100-1

Único	Secuencia N-terminal detectada	Posición de modificación del PEG correspondiente
YP EG-IFN-α2a S100-1	XYSPXAW	Lys134
Nota: X denota α-aminoácido cisteína, un no-α-aminoácido u otro aminoácido modificado que no se puede detectar usando degradación de Edman.		

15 Listados de secuencias

[0053]

20 <110> BIOSTEED GENE EXPRESSION TECH. CO., LTD.

<120> INTERFERÓN ALPHA2A MODIFICADO POR POLIETILENGLICOL, SU PREPARACIÓN Y USO

<130> P2007473C

25 <160> 1

<170> Versión de patentIn 3.3

30 <210> 1

<211> 165

<212> PRT

<213> Homo sapiens

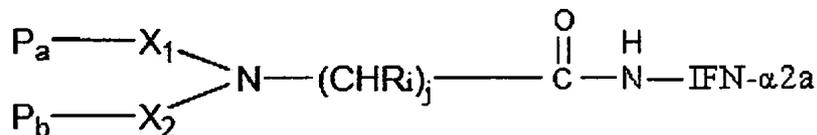
35 <400> 1

ES 2 386 575 T3

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 Lys 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

## REIVINDICACIONES

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



donde,

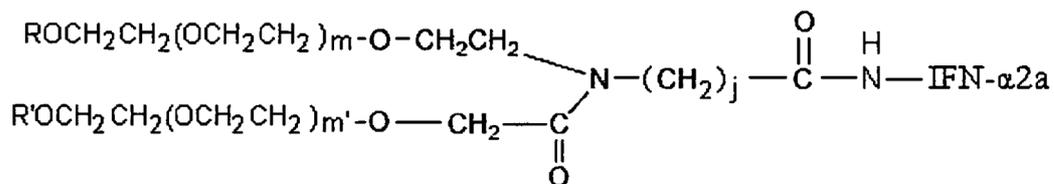
$P_a$  y  $P_b$  son polietilenglicol (PEG) iguales o diferentes;

$j$  es un número entero entre 1-12;

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

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

2. IFN- $\alpha$ 2a PEGilado según la reivindicación 1, con la estructura de debajo.



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

$j$  es un número entero entre 1-12;

$m$  y  $m'$  indican el grado de polimerización y pueden 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- $\alpha$ 2a PEGilado de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el IFN- $\alpha$ 2a es extraído de una fuente natural u obtenido a través de biotecnología recombinante, preferiblemente con la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID n° 1, de forma más preferida es un IFN- $\alpha$ 2a humano recombinante.

4. IFN- $\alpha$ 2a PEGilado según la reivindicación 3, donde el IFN- $\alpha$ 2a humano recombinante es sintetizado artificialmente o expresado de un sistema de expresión seleccionado del grupo que consiste en un sistema de expresión procarionta tal como *E. coli*, un sistema de expresión de levadura eucariota tal como *Pichia*, un sistema de expresión de célula de insecto o un sistema de expresión de célula mamífera tal como CHO.

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

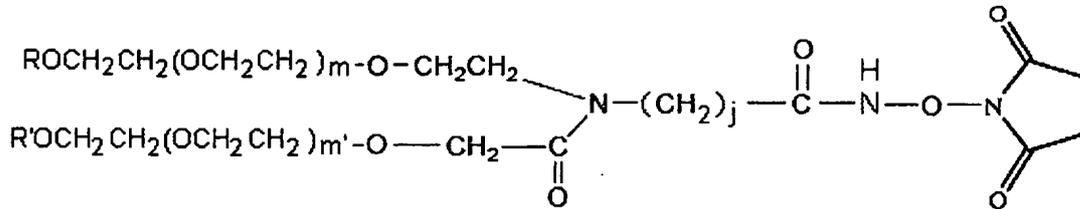
6. Composición comprendiendo una cantidad farmacéuticamente eficaz del IFN- $\alpha$ 2a PEGilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

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

8. Uso del IFN- $\alpha$ 2a PEGilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o composición según la reivindicación 6 o 7 en la preparación de un medicamento para tratamiento de una enfermedad en necesidad de tratamiento con IFN- $\alpha$ 2a, donde la enfermedad es preferiblemente seleccionada 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 de mieloides crónica, leucemia maligna no Hodgkin de grado bajo, linfólisis mediada por células, sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, melanoma maligno, linfoma de células T cutáneas, papiloma laríngeo, carcinoma de célula renal metastático o recurrente; trastornos y enfermedades inflamatorias, por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis, asma, fibrosis cística y enfermedad de pulmón intersticial, y trombocitemia relacionada con enfermedades mieloproliferativas.

9. Método para preparación y purificación del IFN- $\alpha$ 2a PEGilado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que incluye las etapas:

5 (a) bajo una condición alcalina, preferiblemente a pH 9,0, permitiendo a PEG ramificado con forma de Y de la siguiente fórmula reaccionar con IFN- $\alpha$ 2a, y obtener IFN- $\alpha$ 2a 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' indican el grado de polimerización y pueden ser cualquier número entero y m+m' es preferiblemente de 600 a 1500;

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

15 (c) elución de los productos reactivos capturados en la fase (b) con una resina de intercambio de cationes, preferiblemente SP Sepharose FF, en un gradiente de cationes, preferiblemente en un gradiente de iones 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 la actividad más alta.

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

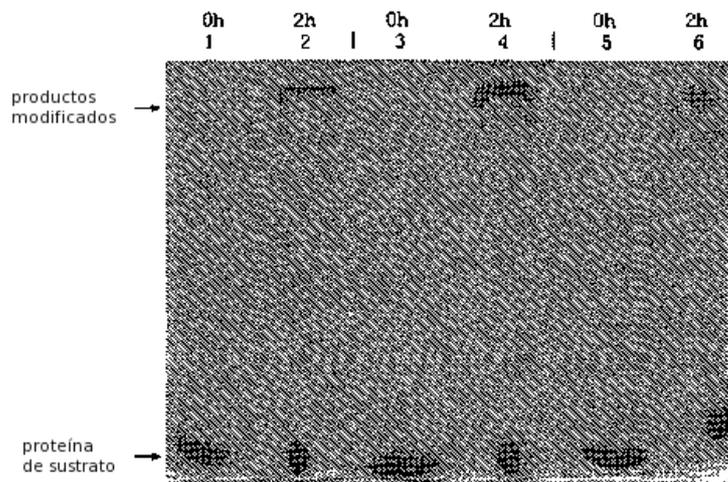
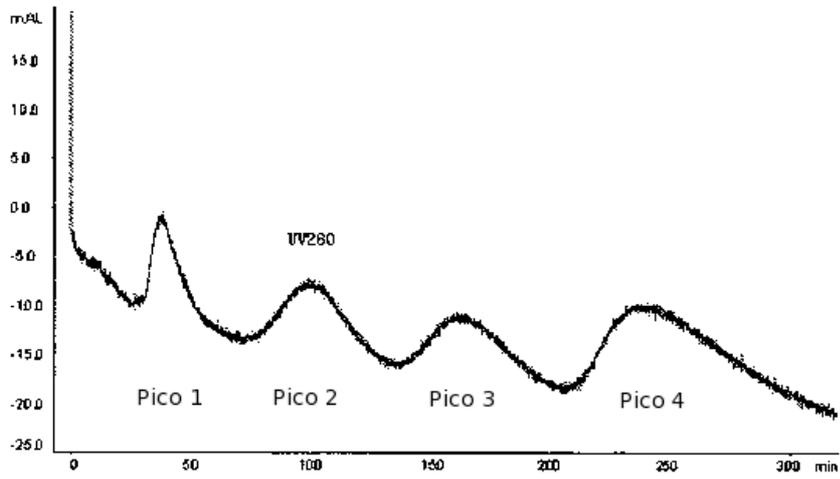


FIG.1



**FIG.2**

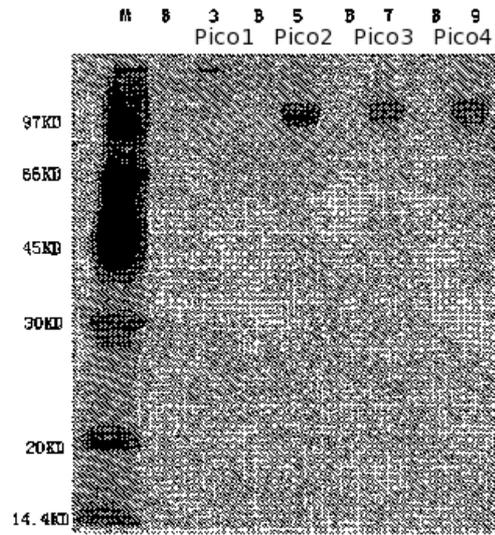


FIG.3

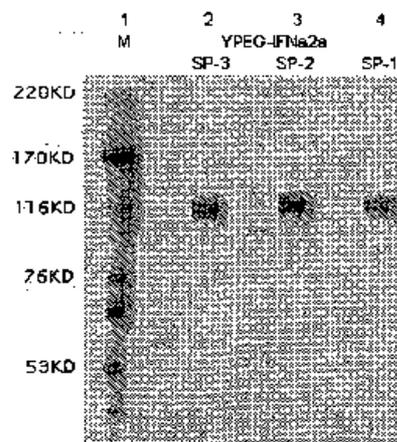
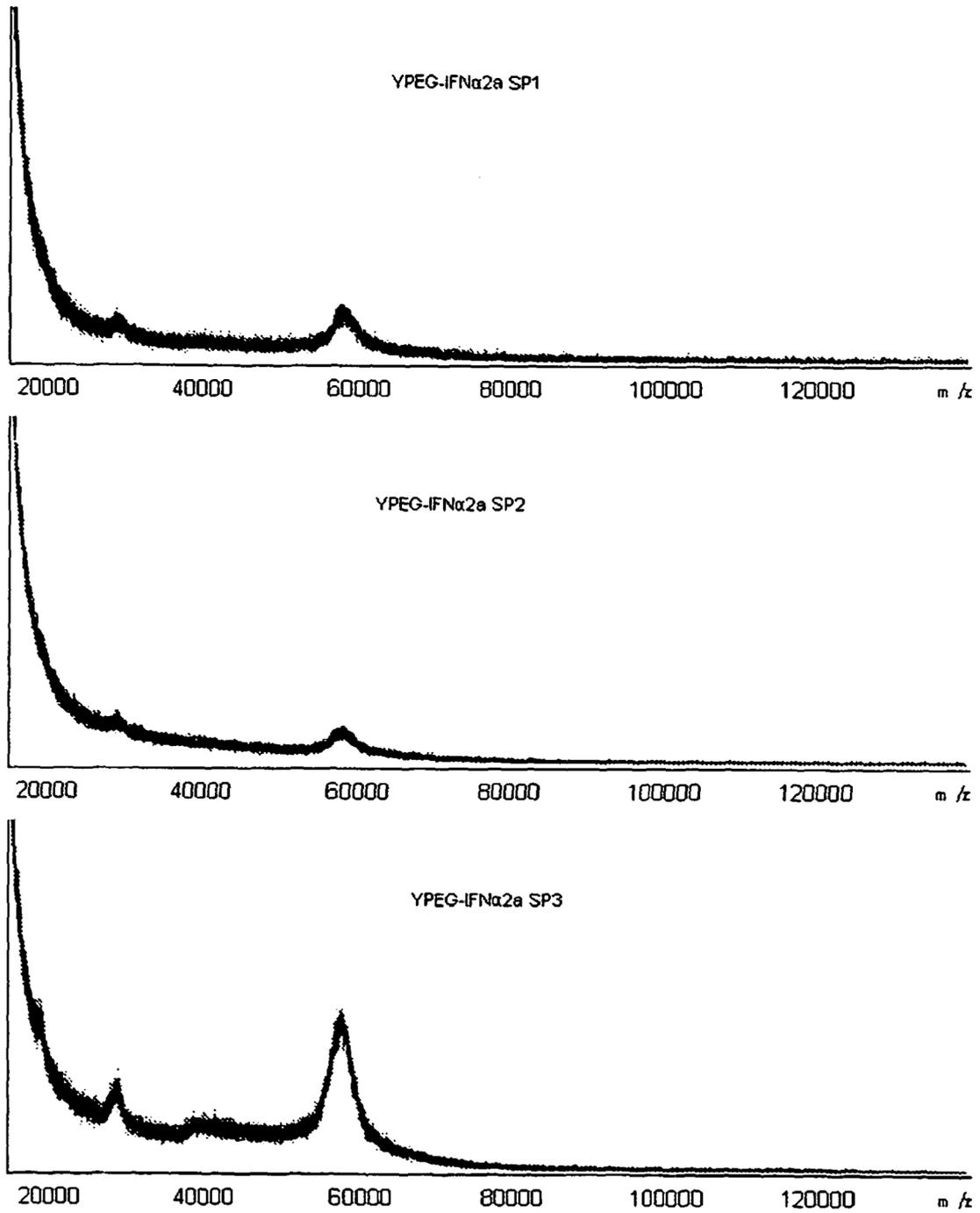


FIG.4



**FIG.5**

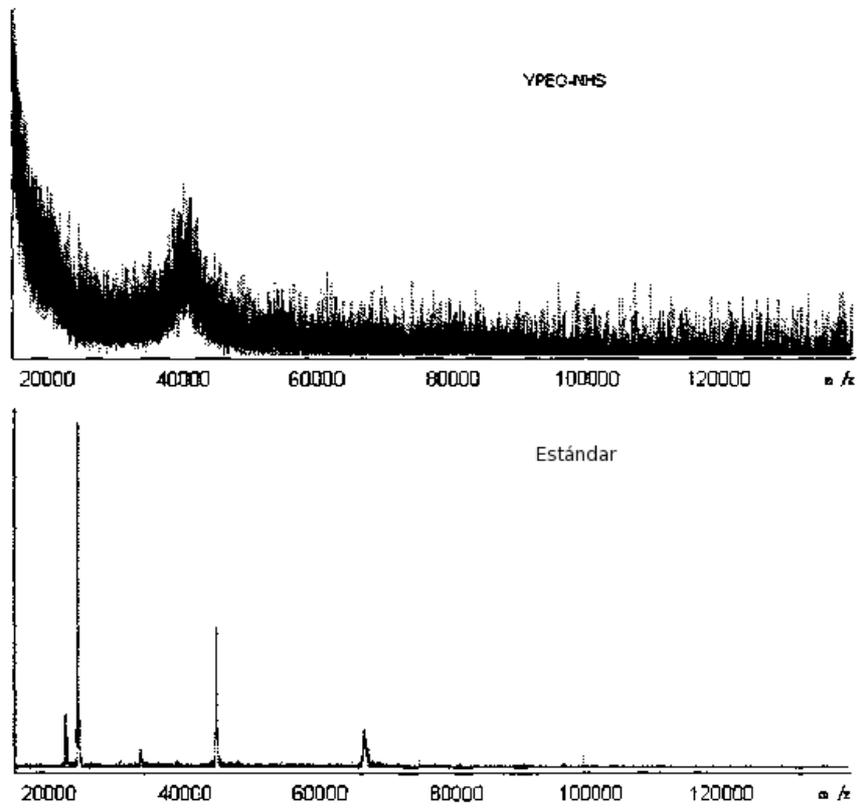


FIG.6

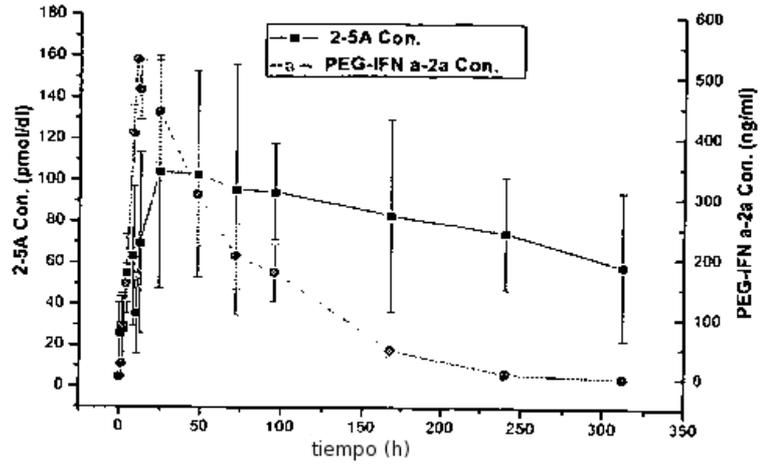


FIG.7

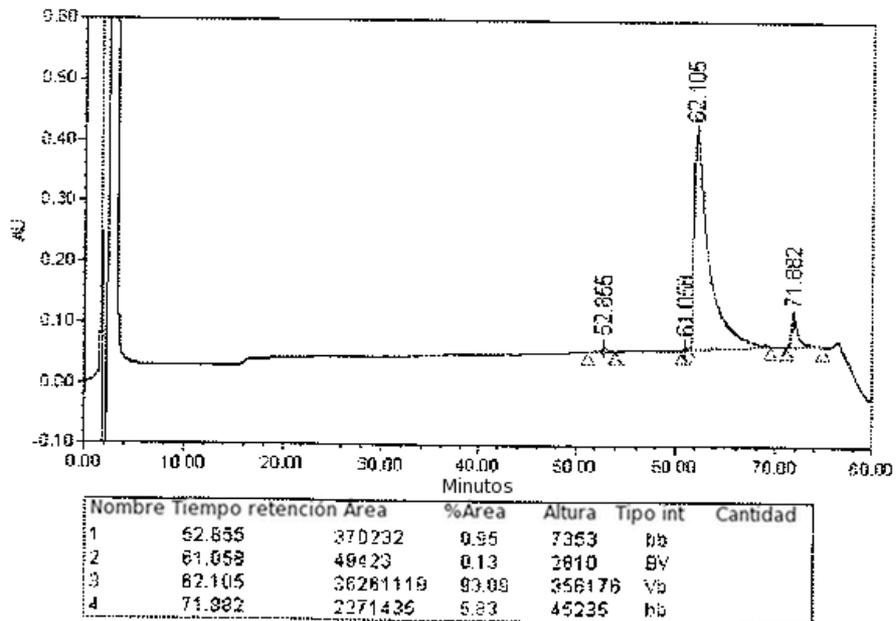


FIG.8

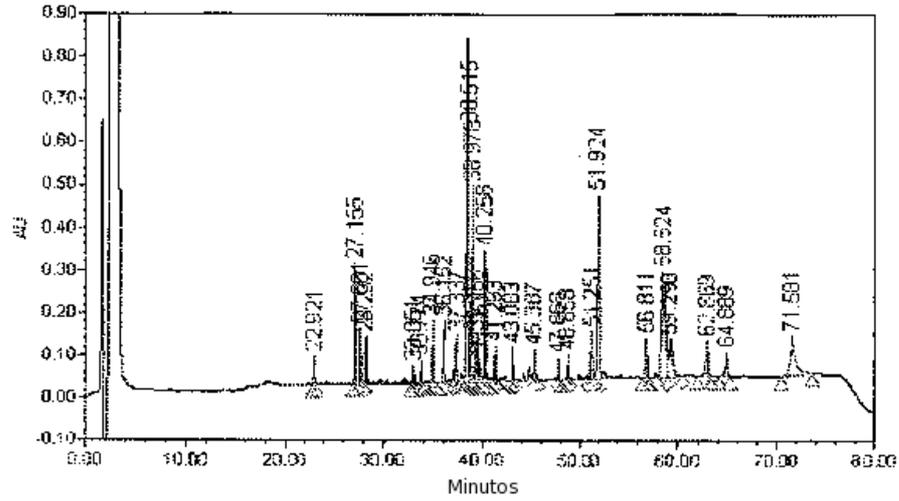


FIG.9

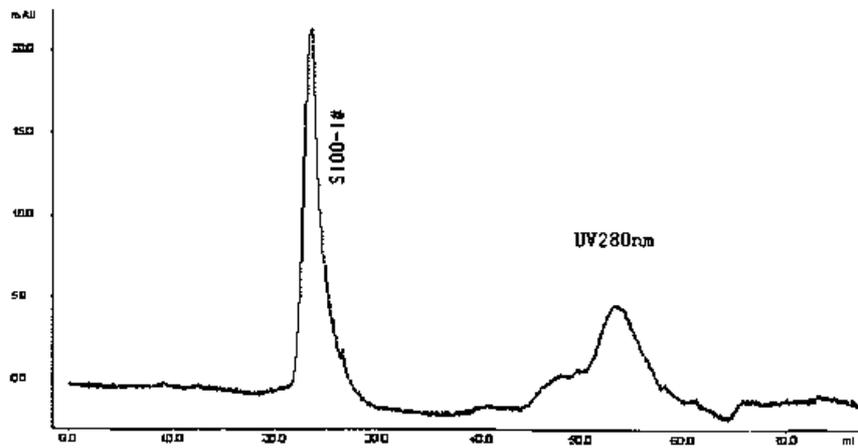


FIG.10