

(19)



(10) **LT 3174 B**

(12)

PATENTO APRAŠYMAS

(11) Patent numeris: **3174**

(51) Int.Cl.⁵: **C07K 15/26,
A61K 37/66,
A61K 31/475**

(21) Paraiškos numeris: **IP888**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 08 25**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 08 25**

(45) Patent paskelbimo data: **1995 02 27**

(31,32,33) Prioritetas: **07/935770, 1992 08 26, US**

(72) Išradėjas:

Robert Karasiewicz, US

Carlo Nalin, US

Perry Rosen, US

(73) Patent savininkas:

F.Hoffmann-La Roche AG, 124 Grenzacherstrasse, 4002 Basle, CH

(74) Patentinis patikėtinis:

Liudmila Gerasimovič, 9, J.Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Polietilenglikolio-interferono konjugatai

(57) Referatas:

Šiame išradime aprašomi fiziologiškai aktyvūs, tirpūs vandenyje polietilenglikolio konjugatai su interferonu ir nauji polietilenglikolio junginiai, kurie gali būti panaudoti konjugatų gamybai.

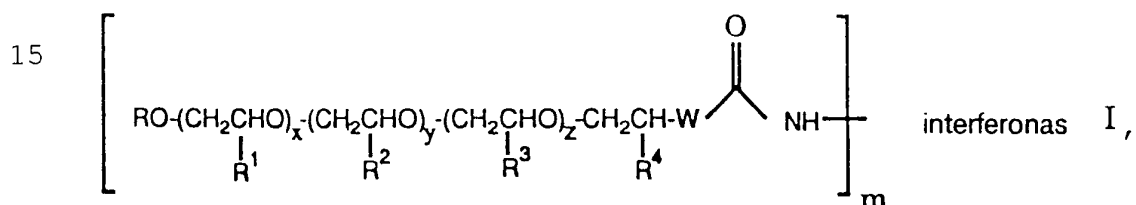
Ivairūs gamtiniai ir rekombinantiniai baltymai yra naudingi medicinoje ir farmacijoje. Išgryninti baltymai, kuriems surasta tinkama vaistinė forma, gali būti taikomi parenteraliai esant įvairioms terapinėms indikacijoms. Tačiau parenteraliai taikomi baltymai gali būti imunogeniški, gali prastai tirpti vandenyje bei turėti trumpą farmakologinį gyvavimo puslaikį. Dėl to gali būti sunku pasiekti pacientų kraujyje terapinę baltymo koncentraciją.

Šias problemas galima įveikti baltymus konjuguojant su polimerais, pavyzdžiui, polietilenglikoliu. Davis ir kt. JAV patente Nr. 4,179,337 aprašytas polietilenglikolio (PEG) konjugavimas su baltymais, pavyzdžiui, su fermentais ir insulinu, siekiant gauti konjugatus, kuriuose baltymas būtų mažiau imunogeniškas, tačiau išlaikytų didžiąją dalį savo fiziologinio aktyvumo. Nakagawa ir kt. aprašo PEG konjugavimą su saleles aktyvuojančiu baltymu, siekiant sumažinti šalutinius jo efektus ir imunogeniškumą. Veronese ir kt. (Applied Biochem. and Biotech., 11; 141-152 (1985) aprašo fenilchlorformiatų panaudojimą polietilenglikolių aktyvavimui, siekiant modifikuoti ribonukleazę ir superoksiddismutazę. Katre ir kt. JAV patentuose Nr. 4,766,106 ir Nr. 4,917,888 taip pat aprašo baltymų soliuobilizavimo būdą, konjuguojant juos su polimerais. PEG ir kiti polimerai konjuguojami su rekombinantiniais baltymais, siekiant sumažinti jų imunogeniškumą ir padidinti gyvavimo puslaikį. Žr. Nitecki ir kt., JAV patentą Nr. 4,902,502, Enzon, Inc., PCT/US90/03133, Nishimura ir kt., paraišką Nr. 154,316 ir Tomasi, PCT/US85/02572.

Žinomi konjugatų PEG-baltymas gamybos metodai bei konjugatai, gaminami pagal šiuos metodus, pasižymi kai kuriais trūkumais. Vienas iš jų yra tas, kad kai kurie konjugatų gamybos būdai gali inaktyvuoti baltymą, todėl

gaunamas konjugatas turi menką biologinį aktyvumą. Be to, kai kurie linkeriai, naudojami sintetinant PEG ir baltymo konjugatus, gali būti jautrūs hidrolizei *in vivo*. Kai toks skilimas įvyksta panaudojus vaistą, konjugatai netenka savo pranašumų, kuriuos jiems suteikia PEG.

Vienas šio išradimo pavyzdžių yra nauji interferono-PEG konjugatai, turintys unikalius linkerius, kurie jungia interferono (IFN) amino grupę su PEG. Šio išradimo pagrindinis tikslas yra susintetinti fiziologiškai aktyvius interferono konjugatus, turinčius tokią bendrą formulę:



kurioje R yra žemesnysis alkilas; R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra H arba žemesnysis alkilas;

m yra sveikas skaičius nuo 1 iki skaičiaus, atitinkančio pasiekiamų amino grupių skaičių interferone;

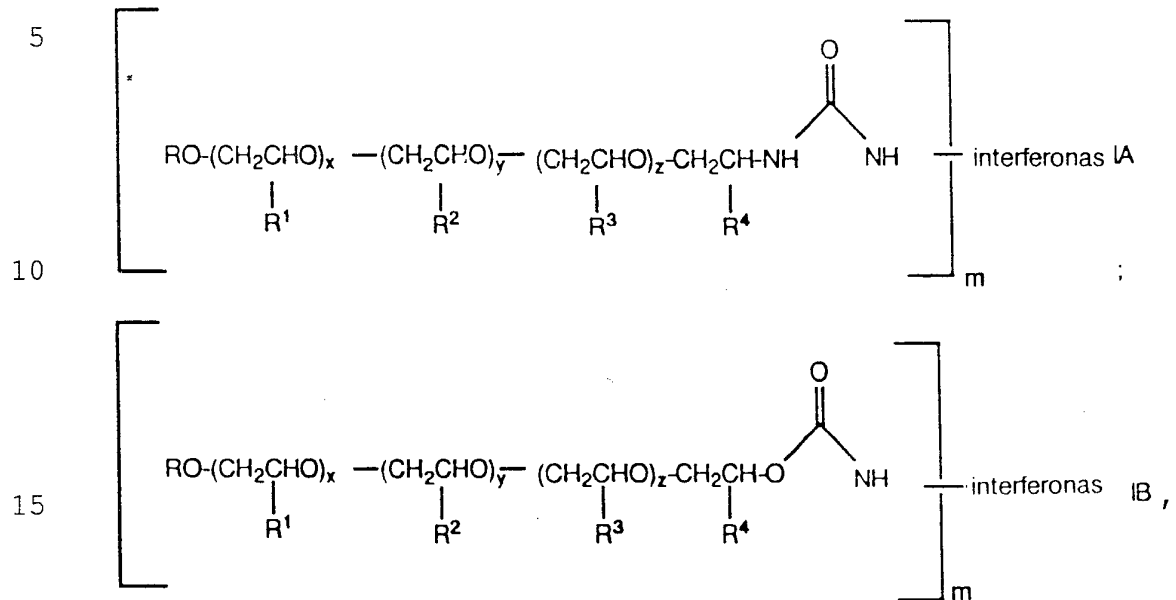
W yra O arba NH;

x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 1 iki 1000, o x, y ir z suma yra nuo 3 iki 1000;

su sąlyga, kad bent vienas iš R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra žemesnysis alkilas.

Akivaizdu, kad -NH grupė formulėje I yra iš pasiekiamų amino grupių interferono molekulėje.

Kalbant konkrečiau, du skirtingi interferono konjugatai turi tokias formules:



kuriuose R yra žemesnysis alkilas; R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra H arba žemesnysis alkilas;

m yra sveikas skaičius, atitinkantis pasiekiamų amino grupių skaičių interferone, ir x, y ir z yra parinkti iš įvairių skaičių kombinacijų taip, kad konjugatas išlaikytų bent dalį biologinio aktyvumo baltymo, kuris įeina į konjugato sudėtį, tačiau su sąlyga, kad bent vienas iš radikalų R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra žemesnysis alkilas.

30 Trumpas figūrų aprašymas

Fig. 1.

Junginio iš 7 pavyzdžio modifikavimo PEG'u eiga. Interferonas (5 mg/ml) inkubuojamas su 10-, 20- ar 40-kartiniu reagento pertekliumi baltymo atžvilgiu nurodytas laiko atkarpos tirpale, kuris sudarytas iš 25

mM Tricino (pH 10.0), 0.5 M KSCN ir 100 mM NaCl. Įvairiais laiko tarpais imami mėginiai, reakcija sustabdoma glicinu ir analizuojama 15 % SDS-PAGE metodu (poliakrilamidinio gelio elektroforezės metodu, 5 dalyvaujant natrio dodecilsulfatui). Raide "T" žymimas interferonas.

Fig. 2.

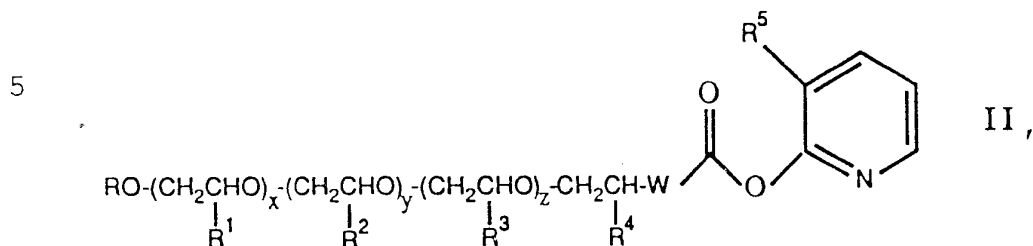
10 Junginio iš 5 pavyzdžio modifikavimo PEG'u eiga. Interferonas inkubuojamas su 3- ar 10-kartiniu reagento pertekliumi laiko atkarpas, nurodytas fig. 1. Nurodytomis laiko atkarpomis imami mėginiai, reakcija sustabdoma glicinu ir analizuojama 15 % SDS-PAGE 15 metodu. Raide "S" žymimi baltymų molekulinės masės standartai, o raide "I" žymimams interferonas.

Fig. 3.

20 Junginio iš 1 pavyzdžio (kairėje) ir junginio iš 3 pavyzdžio (dešinėje) modifikavimo PEG'u palyginimas. Interferonas inkubuojamas su 3-kartiniu reagento pertekliumi 0.25, 1.5 ar 24 valandas. Imami mėginiai, reakcija sustabdoma glicinu ir analizuojama 15 % SDS- 25 PAGE metodu. Raide "S" žymimi baltymų molekulinio svorio standartai, o raide "I" žymimas interferonas.

Pagal šią išradimą IFN konjugatai, turintys formules IA ir IB, gali būti susintetinti kondensuojant aktyvuotą 30 PEG'ą, kurio galinė hidroksi- ar aminogrupė pakeista aktyvuotu linkeriu. Tokie reagentai gali reaguoti su viena arba keliomis IFN amino grupėmis. Labiau tinkamas šio išradimo įgyvendinimas yra toks, kai kondensacija vyksta tik su viena amino grupe ir susidaro 35 monoPEG'inis konjugatas. Todėl išradimas taip pat aprašo naujus aktyvuotus junginius (reagentus), kurie

gali būti panaudoti šio išradimo interferono konjugatų sintezei. Šie junginiai turi tokią bendrą formulę:

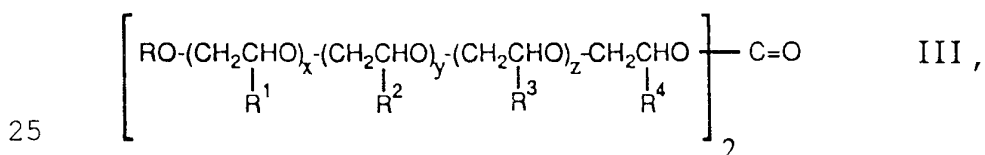


10 kurioje R yra žemesnysis alkilas; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 yra H arba žemesnysis alkilas;

W yra NH arba O;

15 x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 0 iki 1000, o x, y ir z suma yra nuo 3 iki 1000;

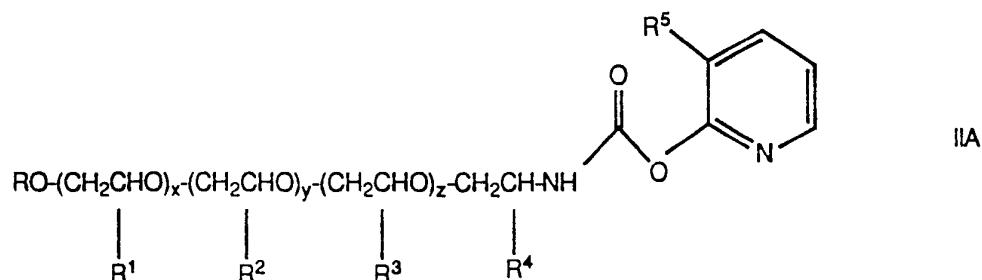
20 su sąlyga, kad jei W yra NH arba W yra O ir R^5 yra H, bent vienas iš R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra žemesnysis alkilas, ir



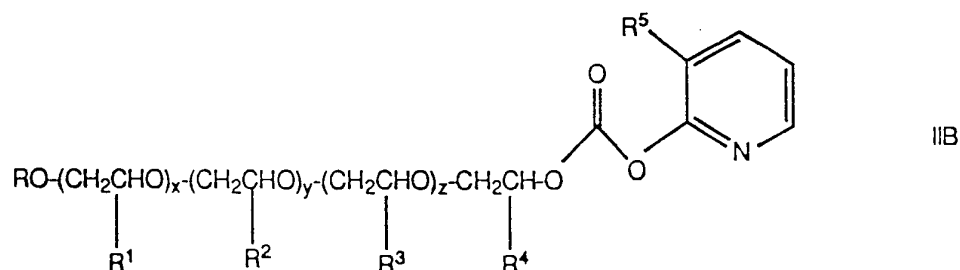
30 kurioje R yra žemesnysis alkilas; R^1 , R^2 , R^3 , R^4 yra H arba metilas, x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 1 iki 1000, o x, y ir z suma yra nuo 3 iki 1000.

Kalbant konkrečiau, formulė II apima tokių dviejų tipų junginius:

5



10



15

Radikalų R, R¹, R², R³, R⁴ ir R⁵ reikšmės junginiuose IIA, IIB ir III nurodytos aukščiau, o x, y ir z yra parinkti iš įvairių skaičių kombinacijų taip, kad konjugatas išlaikytų bent dalį laisvojo baltymo, kuris įeina į konjugato sudėtį, biologinio aktyvumo, tačiau su išlyga, nurodyta po formule II.

Pagal šį išradimą konjugatų gaminimui naudojant aktyvuotus PEG konjugatus, turinčius formules IIA, IIB ir III, grupė, jungiančioji baltymo, pavyzdžiui, interferono (IFN), laisvas amino grupes ir PEG, suformuojama taip, kad gaunamas konjugatas išsaugo bent dalį baltymo biologinio aktyvumo ir yra mažiau imunogeniškas. Be to, jungiančioji grupė, kuri susidaro šio išradimo konjugatuose naudojant aktyvuotus polietilenglikolius, kurių formulė IIA, IIB ir III, suteikia baltymo konjugatui atsparumą hidrolizei *in vivo* ir konjugatas neturi trūkumų, būdingų ankstesniems PEG baltymams.

Pagal šią išradimą R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 gali būti bet koks žemesnysis alkilas, labiau tinka metilas. Terminas "žemesnysis alkilas" reiškia žemesniasias alkilo grupes, turinčias nuo 1 iki 6 anglies atomų, pavyzdžiui, metilo, etilo, n-propilo, izopropilo ir kt. grupes. Paprastai labiau tinka žemesnioji alkilo grupė, turinti nuo 1 iki 4 anglies atomų. Labiau tinka metilas. R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 gali būti ir vandenilis, tačiau R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 negali vienu metu būti vandenilis.

Pagal šią išradimą x , y ir z gali būti bet kokia skaičių kombinacija, parinkta taip, kad gaunamas konjugatas išlaiko bent dalį IFN, sudarančio konjugatą, biologinio aktyvumo. Akivaizdu, kad x , y , z ir m suma atvirkščiai proporcinga IFN biologinio aktyvumo dydžiui, kuris išlieka konjugate. Skaičiai x , y ir z reiškia glikolio subvienetų, esančių konjugatą sudarančiame poliglikolyje, skaičių. Skaičius m reiškia laisvų arba prieinamų amino grupių, galinčių reaguoti su PEG mišiniu, skaičių interferone. Kuo didesnės m , x , y ir z reikšmės, tuo didesnė konjugato molekulinė masė. Pagal šią išradimą x , y ir z yra tokie skaičiai, kad konjugato molekulinė masė, atmetus baltymo molekulinę masę, yra nuo 300 iki 30000 daltonų. Labiau tinkamos interferono atveju m reikšmės yra nuo 1 iki 3. Ypač tinkamas pavyzdys yra monoPEG'o konjugatas, kai m lygus 1, pagamintas taip, kad IFN konjugatas su didele išeiga gaunamas reaguojant vienintelei laisvai amino grupei su PEG reagentu, turinčiu formulę II-A, II-B arba III. Šiame ypač tinkamame pavyzdyje, kai m lygus 1, x , y ir z yra tokie skaičiai, kad glikolis, kuris sudaro konjugatą, turi vidutinę molekulinę masę nuo maždaug 300 iki maždaug 30000 daltonų, labiau tinka molekulinė masė nuo maždaug 1000 iki maždaug 10000 daltonų, ypač nuo 1000 iki 5000 daltonų. Tinkamiausias atvejis, kai molekulinė masė yra maždaug 2000 daltonų.

Skaičius x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 0 iki 1000, o $x6 y$ ir z suma yra skaičius nuo 3 iki 1000.

- 5 Labai tinkamas konjugato, turinčio formules IA ir IB, pavyzdys, kai x ir y yra nuo 5 iki 500 ir z yra nuo 0 iki 4.

- 10 Labiau tinkamas pavyzdys, kai naudojamas glikolis yra glikolių mišinys, kai x yra nuo 10 iki 100, y yra nuo 1 iki 10 ir z yra lygus 0. Tinkamiausias yra interferono konjugatas, turintis formulę IA, kai m lygus 1, R , R^2 ir R^4 yra CH_3 ; R^1 yra H; x yra maždaug 19, y - maždaug 2 ir z lygus 0. Tai atitinka PEG subvieneto vidutinę
15 molekulinę masę 1000 daltonų.

- 20 Siekiant išvengti neaiškumų, nustatant subvienetų skaičių PEG molekulėje, polietilenglikolio polimeras charakterizuojamas pagal molekulinę masę, o ne pagal pasikartojančių subvienetų (PS) skaičius, žymimus x , y ir z . Šiuos dydžius gali būti keblu įvertinti dėl galimo pradinių PEG junginių nehomogeniškumo, paprastai apibūdinamų vidutine molekuline mase, o ne pasikartojančių subvienetų skaičiumi. Pradiniai PEG junginiai,
25 turintys įvairią molekulinę masę, gali būti susintetinti pagal žinomus metodus arba gauti komerciniais keliais.

- 30 Tuo atveju, kai x , y ir z reikšmės, gautos apskaičiuojant molekulinę masę arba nurodytos gamintojo, nėra sveiki skaičiai (paprastai taip ir būna), jas reikia standartiniu būdu suapvalinti iki didesnio arba mažesnio skaičiaus tam, kad polimero molekulėje, kuri sudaro didžiąją polimerų mišinio dalį,
35 būtų sveiki skaičiai.

Kai reagentas, turintis formulę IIA, IIB arba III, reaguoja su IFN, kuriame yra daugiau nei viena laisva amino grupė, gaunamas konjugatas yra įvairių IFN ir PEG'c reakcijos produktų mišinys. Šie reakcijos produktai susidaro reaguojant PEG'ui su viena ar keliomis laisvomis amino grupėmis. Tą parodo m reikšmė formulėse IA ir IB. Pavyzdžiui, tuo atveju, kai IFN turi tris laisvas amino grupes, aktyvuotas PEG'as gali reaguoti su viena, dviem arba trim amino grupėmis. Šiuo atveju mišinyje yra konjugatai, atitinkantys visus tris variantus. Kadangi įvairių konjugatų molekulinės masės gerokai skiriasi priklausomai nuo m reikšmės, kuri gali būti lygi 1, 2 arba 3, šie reakcijos produktai atskiriami standartiniais metodais, pavyzdžiui, chromatografiškai. Norint nustatyti, ar m, x, y ir z reikšmės tinkamai parinktos, izoliuotų konjugavimo reakcijos produktų biologinis aktyvumas tiriamas tais pačiais metodais, kaip ir pradinio IFN - taip nustatoma, ar konjugate dar išlieka IFN, naudoto konjugatui gaminti, biologinis aktyvumas. Šitokiu būdu m, x, y ir z reikšmės gali būti taip suderintos, kad būtų gautas norimas aktyvumas.

Pagal tinkamiausią pavyzdį m yra lygus 1. Kai m lygus 1, konjugatą galima gauti ir esant dviems ar daugiau amino grupių. Aktyvuoto PEG'o reagentas iš pradžių reaguoja su viena iš laisvų amino grupių, esančių IFN. Reguliuojant reagentų koncentraciją, pavyzdžiui, IFN koncentraciją, bei reakcijos sąlygas, atsižvelgiant į standartinius aminorų kondensavimo metodus, galima reguliuoti laisvų amino grupių, esančių baltyme, reagavimo su PEG'u laipsnį. Kai baltymuose, turinčiuose vieną ar kelias laisvas amino grupes, viena amino grupė yra aktyvesnė už kitas, galima taip parinkti reakcijos sąlygas, kad baltymui reaguojant su PEG junginiu, gaunami reakcijos produktai, kurių formulė yra IA arba IB ir m yra lygus 1. Kitos laisvos amino rūgštys,

esančios baltymo molekulėje, gali taip pat reaguoti su PEG'u, jei kondensacijos reakcija vykdoma ilgiau arba esant griežtesnėms sąlygoms.

5 Terminai "interferonas" ir "IFN", naudojami šiame aprašyme bei išradimo apibrėžtyje, reiškia visų tipų interferonus (t.y. molekules, pasižyminčias interfero-
niniu aktyvumu), pavyzdžiui, α , β , γ ir ω interferonai
bei jų subtipai, pavyzdžiui, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$ arba $\alpha 2C$,
10 arba įvairių tipų ir/arba subtipų hibridai arba
chimeros. Interferonas gali būti bet kokios kilmės,
gaunamas iš gamtinių šaltinių, audinių kultūrų arba
susintetintas, naudojantis rekombinantinės DNR
metodais. Natūralių ar rekombinantinių interferonų
15 gamybos ir skyrimo būdai yra gerai žinomi specialistams
ir yra aprašyti, pavyzdžiui, patentuose EP Nr. 43 980,
EP Nr. 211 148, EP Nr. 140 127, DE Nr. 3 028 919, US
Nr. 4,503,035 ir US Nr. 4,414,150.

20 Naudojant reagentus, turinčius formules IIA, IIB ir
III, kai bent vienas iš R , R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra
žemesnysis alkilas, ypač metilas (reagentai, pakeisti
alkilo grupe), pranašumai pasireiškia tuo, kad
netikėtai padidėja konjugato išeiga, t.y. naudojant
25 reakcijoje alkilpakeistus reagentus padidėja, lyginant
su nepakeistais reagentais, PEG'o ir baltymo junginio
išeiga. Naudojant alkilpakeistus reagentus per tą patį
laiką gaunama dvigubai daugiau konjugato, negu
naudojant nepakeistus reagentus.

30 Skiriant pacientų gydymui konjugatus, turinčius formulę
IA ir IB, bei pagamintus naudojant aukščiau aprašytus
pakeistus reagentus, pastebėta, kad šių konjugatų *in*
vivo gyvavimo paciento kraujo apytakoje puslaikis
35 žymiai didesnis lyginant su konjugatais, susintetintais
iš nepakeistų reagentų. Nors gyvavimo puslaikis *in vivo*
tiesiog proporcingas konjugato molekuliniam svoriui,

konjugatas, susintetintas iš pakeisto reagento, netikėtai pasirodė turįs tokią patį gyvavimo puslaikį, kaip ir didesnės molekulinės masės konjugatas, pagamintas iš nepakeisto reagento. Ilgesnis terapinio

5 agento gyvavimo puslaikis paciento kraujyje reiškia didesnę agento efektyvumą paciento organizme. Pavyzdžiui, konjugatai, pagaminti iš alkilpakeistų reagentų, gali būti skiriami rečiau ir/arba mažesnėmis dozėmis, negu konjugatai, pagaminti iš atitinkamo nepakeisto

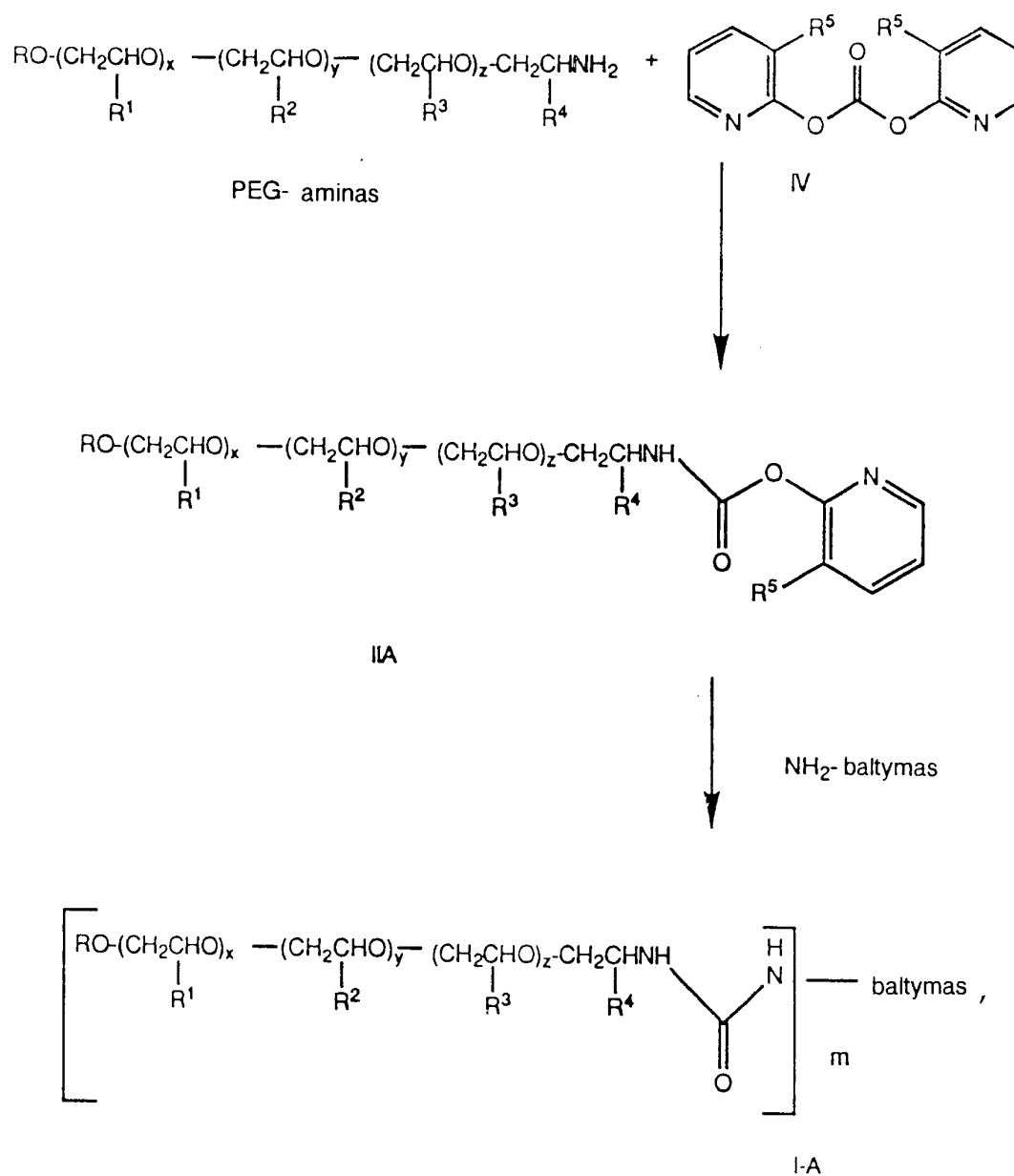
10 reagento. Siekiant padidinti skiriamo biologiškai aktyvaus baltymo konjugato su polietilenglikoliu efektyvumą, konjugatų sintezei buvo naudojami didesnio molekulinio svorio polietilenglikoliai. Tačiau konjuguoto IFN biologinis efektyvumas mažėja didinant

15 molekulinę masę. Nepaisant to, naudojant šio išradimo konjugatus, pagamintus vartojant pakeistus reagentus, terapinis efektyvumas didesnis, negu naudojant atitinkamus nepakeistus konjugatus, o molekulinė masė padidėja mažiau.

20 Kitame šio išradimo pavyzdyje aprašomas naujų konjugatų sintezės procesas.

Konjugatas, turintis formulę IA, gali būti

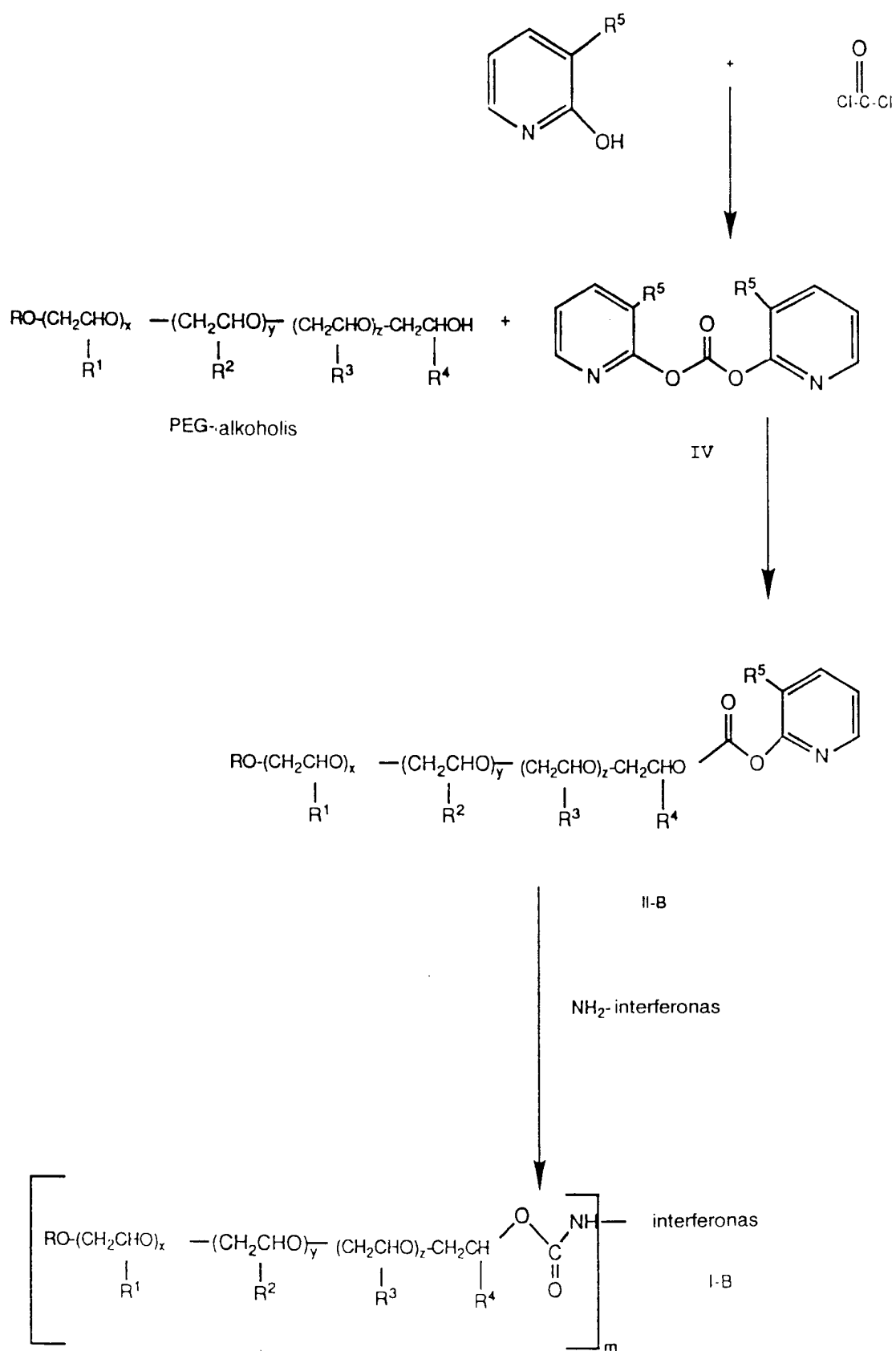
25 susintetintas tokiu būdu:



kai R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 , m , x , y ir z turi aukščiau nurodytas reikšmes su sąlyga, kad bet kuris iš R^1 , R^2 , R^3 , R^4 arba keli iš jų gali būti žemesnysis alkilas.

5 Šioje reakcijoje PEG-aminas maišomas su junginiu, turinčiu formulę IV, angliavandeniliniame arba chlorinto angliavandenilio tirpiklyje ir gaunamas junginys, turintis formulę IIA. Junginys, turintis formulę IIA, gali būti kondensuojamas vandeninėje
10 terpėje su viena arba keliomis laisvomis baltymo amino grupėmis - taip gaunamas konjugatas, turintis formulę IA. Ši reakcija atliekama pagal žinomas metodikas, skirtas aminų kondensacijai vandeninėje terpėje. Sintetinant konjugatą, turintį formulę IA, reakcija
15 paprastai vykdoma standartiniame vandeniniame buferio tirpale, kurio pH yra nuo 7 iki 10. Reakcijos metu, priklausomai nuo laisvų amino grupių skaičiaus baltyme ir nuo reakcijos trukmės, susidaro PEG'o ir baltymo konjugatų, turinčių įvairias molekulinės mases,
20 mišinys. PEG-baltymo konjugatų mišinys gali būti išfrakcionuotas iki individualių komponentų, naudojant standartinius metodus, pavyzdžiui, didelio efektyvumo skystinę chromatografiją (HPLC) arba gel-elektroforezę. Junginių atskyrimui pagal molekulinę masę, naudojant
25 HPLC arba gel-elektroforezę, tinka bet kokios standartinės sąlygos. Mišinys frakcionuojamas pagal susidarančių produktų molekulinę masę.

IFN konjugatas, turintis formulę IB, gali būti
30 pagamintas pagal tokią reakcijos schemą:



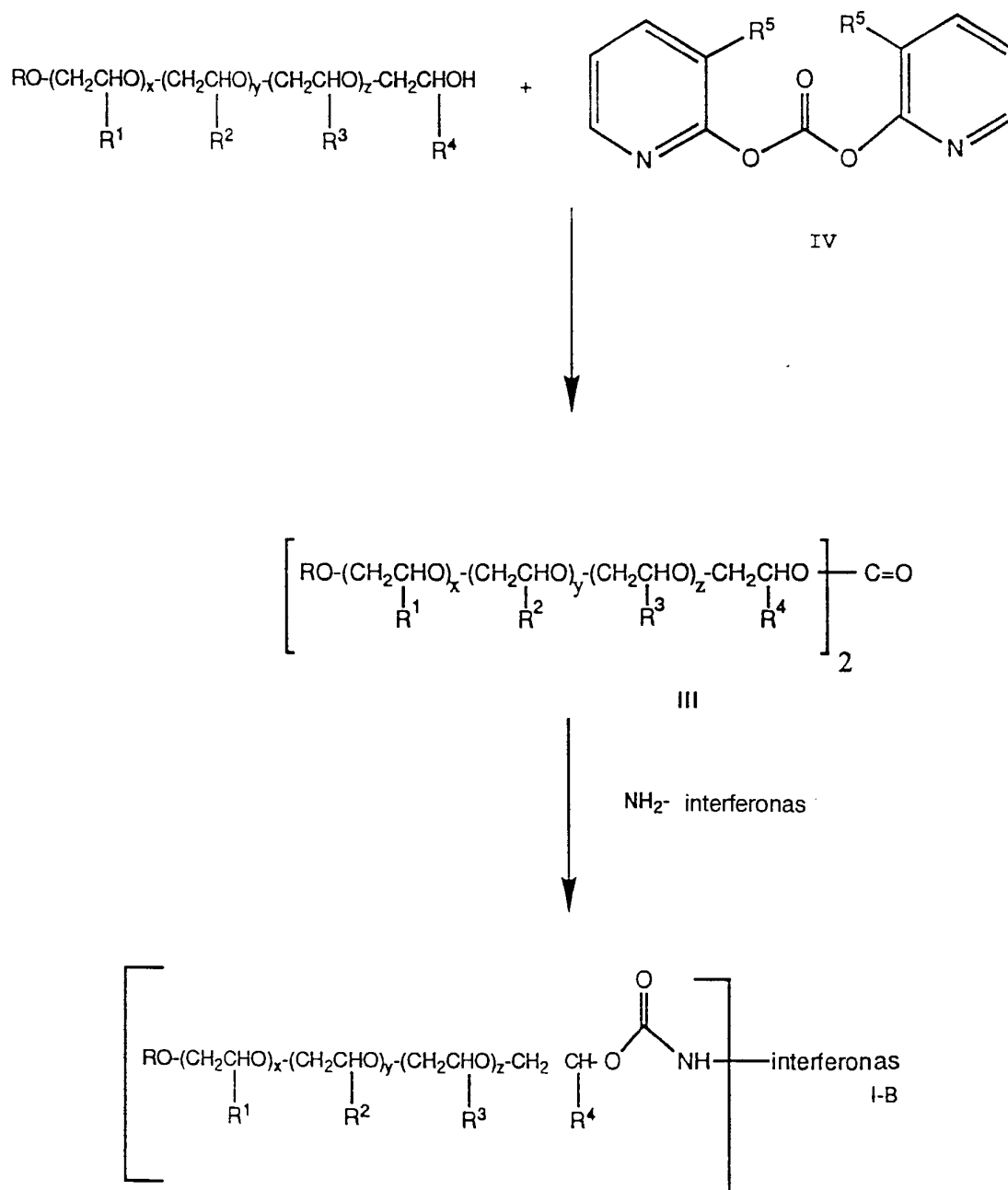
kai R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 m, x , y ir z reikšmės bei sąlyga apibrėžti aukščiau.

5 Junginys, turintis formulę IV, gaminamas kondensuojant fosgeną su 2-hidroksipiridinu (kuris pakeistas, jei R^5 yra žemesnysis alkilas), naudojant bet kurią standartinių rūgšties chloranhidrido ir alkoholio kondensacijos būdą.

10 PEG-alkoholio ir junginio, turinčio formulę IV, kondensacija, norint gauti junginius, turinčius formulę IIB, vykdoma esant standartinėms sąlygoms, kurios naudojamos kondensuojant alkoholius su karbonatais. Junginys, turintis formulę IIB, kondensuojamas su
15 baltymu per jo vieną ar kelias laisvas amino grupes ir gaunamas junginys, turintis formulę IB. Ši reakcija vykdoma tomis pačiomis sąlygomis, kaip ir aukščiau aprašyta junginio, turinčio formulę IIA, kondensacija gaminant konjugatus, kurių formulė IA. Priklausomai nuo
20 laisvų amino grupių skaičiaus baltyme, kuris reaguoja su junginiu, turinčiu formulę IIB, konjugatas, turintis formulę IB, gali būti sudarytas iš įvairios molekulinės masės konjugatų. Toks mišinys gali būti išfrakcionuotas aukščiau aprašytu būdu.

25

Junginys, turintis formulę IB, taip pat gali būti susintetintas pagal tokią schemą:



kai R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 m, x ir y reikšmės apibrėžtos aukščiau.

Šioje reakcijos schemoje PEG-alkoholis kondensuojamas su junginiu, turinčiu formulę IV, ir gaunamas junginys, turintis formulę III. Šioje reakcijoje junginys, turintis formulę IIB, susidaro kaip tarpinis junginys, kuris po to reaguoja su antru PEG-alkoholio moliu ir gaunamas junginys, turintis formulę III. Vykdamas šią reakciją, vienam moliui junginio, turinčio formulę IV, tenka mažiausiai 2 moliai PEG-alkoholio. Šiai procedūrai galima panaudoti bet kurią standartinių alkoholio ir karbonato kondensacijos būdą. Junginys, turintis formulę III, reaguodamas su interferonu tuo pačiu būdu, kaip tai aprašyta paverčiant junginį IIA į junginį IA, sudaro konjugatą, turintį formulę IB. Priklausomai nuo laisvų amino grupių skaičiaus baltyme, kondensuojant junginį, turintį formulę III, su baltymu, gaunamas mišinys, sudarytas iš įvairios molekulinės masės konjugatų. Toks mišinys gali būti išfrakcionuotas į atskirus komponentus būdu, aprašytu aukščiau konjugatams, turintiems formulę IA.

Nustatyta, kad šio išradimo interferono konjugatai tinka tam pačiam tikslui, kaip ir baltymas, kuris buvo panaudotas, gaminant konjugatą. Todėl šie konjugatai pasižymi tokio pat terapinio aktyvumu, kaip baltymas iš kurio jie pagaminti, ir gali būti naudojami taip pat, kaip ir pats baltymas, nesukeldami nepageidaujamo imuninio atsako, kuris gali būti susijęs su paties baltymo vartojimu. Todėl šis išradimas taip pat apima farmacines kompozicijas, sudarytas iš junginių, turinčių formulę I, arba jų druskų pagrindu, bei kokių kompozicijų gamybos būdus.

Iš šio išradimo farmacinių kompozicijų, naudojamų susirgimų gydymui arba profilaktikai, sudėti įeina

- interferono konjugatai, turintys formulę I, ir terapiniu požiūriu priimtinas, inertiškas ir netoksiškas nešiklis. Vartojimui skirtos farmacinės kompozicijos sudaromos ir dozuojamos pagal procedūras,
- 5 atitinkančias GMP (gera medicininė praktika) reikalavimus, atsižvelgiant į gydomą ligą, paciento būklę, baltymo konjugato taikymo vietą, taikymo būdą bei kitus žinomus specialistams faktorius.
- 10 Toliau pateikiami pavyzdžiai iliustruoja šį išradimą, tačiau jo neapriboja.
- Šiuose pavyzdžiuose minimas Jeffamine M-2070 yra monometoksipolioksialkilenų propilamino polimeras,
- 15 kurio vidutinė molekulinė masė yra 2070, susintetintas iš propileno ir etileno oksido ir sudarytas iš polietilenglikolinės pagrindinės grandinės, kurioje yra maždaug 30 % atsitiktiniu būdu įterptų propilenoksido grupių.
- 20 Jeffaminas M-1000 yra monometoksipolioksialkilenų propilamino polimeras, kurio vidutinė molekulinė masė yra 1000, susintetintas iš propileno ir etileno oksido ir sudarytas iš polietilenglikolinės pagrindinės gran-
- 25 dinės, kurioje yra 14 % specifiškai įterptų propileno oksido grupių, kai x vidurkis yra 18.6, y vidurkis yra 1,6 ir z yra 0 (x, y ir z reikšmės apibrėžtos aukščiau).
- 30 Visi šiuose pavyzdžiuose aprašyti reagentai, iki vartojimo saugomi sausai tamsios spalvos uždarytuose induose esant 4°C. Kiekvienam modifikavimui naudojamos šviežios reagentų porcijos.

1 pavyzdys

α , α -oksometilen-bis [ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil)]
PS 111 sintezė

5

Iš suspensijos, kurioje yra 1.5 g MPEG (metoksipoli-
etilenglikolio) (mol.sv. 5000) ir 80 ml sauso toluolo,
nudistiliuojama 50 ml tirpiklio. Tirpalas atšaldomas ir
pridedama 30.5 mg di-2-piridilkarbonato. Gautas mišinys
10 virinamas su grįžtamu šaldytuvu 24 valandas. Po to
tirpalas atšaldomas, iškritusios nuosėdos nufiltruo-
jamos ir perplaunamos mažu kiekiu toluolo bei dietilo
eteriu. Kieta medžiaga džiovinama, esant geram
vakuumui, ir gaunama 0.6 g baltų miltelių - α , α -
15 oksometilen-bis [ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil)] PS
111. PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas
pagal būdą, kuris aprašytas žemiau.

α -INTERFERONO, MODIFIKUOTO PEG'u, SINTEZė.

20

1 būdas: Rekombinantinis α -interferonas (5 mg/ml)
dializuojamas prieš buferį, kuris sudarytas iš 5 mM
natrio acetato, pH 5.0, 120 mM NaCl. Pridedama kalio
tiocianato iki galutinės koncentracijos 0.5 M ir pH
25 koreguojamas iki galutinės reikšmės 10.0, pridedant
vieną dešimtąją tūrio 1 M tricino-natrio šarmo tūrio,
pH 11.9. Kieta pavidalo arba ištirpintas DMSO (DMSO
tūris sudaro mažiau nei 10 % bendro tūrio) PEG-
reagentas pridedamas į baltymą moliniu santykiu 3:1.
30 Modifikacija vykdoma kambario temperatūroje nuo 30
minučių iki 4 valandų, po to, siekiant sustabdyti
tolesnę modifikaciją, pridedamas 1 M L-glicinas (pH
6.3) iki galutinės koncentracijos 20 mM. PEG-
modifikuotas baltymas buvo išsodintas pridedant 3.5 M
35 amonio sulfato, 50 mM natrio fosfato, pH 7.0, kol
pasiekiami galutinė 1.1 M amonio sulfato koncentracija
(1.0 M amonio sulfato koncentracija PEG-10000 atveju),

nuosėdos atskiriamos centrifuguojant, plaunamos ir vėl tirpinamos 25 mM amonio acetato tirpale, pH 5.0. PEG'u modifikuoti baltymai buvo gryninami chromatografiniu būdu per hidrofobinės sąveikos kolonėlę (pavyzdžiui, 5 75x7.5 mm), tokia, kaip BioRad TSK Phenyl-5-PW arba Toyopearl Phenyl-650M, naudojant kaip eliuentą mažėjanti amonio sulfato gradientą 50 mM natrio fosfate, pH 7.0. Arba: PEG-IFN gryninimas gel-filtracijos būdu per Sephacryl S-200 kolonėlę 10 (pavyzdžiui, 90 cm x 3.2 cm) (Pharmacia), kuri nupusiausvirinama 25 mM natrio acetatu (pH 5.0), 200 mM NaCl. PEG'u modifikuotas baltymas identifikuojamas SDS-PAGE metodu. Buvo surinktos iš kolonėlės ištekančio baltymo frakcijos, atitinkančios interferoną, sujungta 15 su viena (PEG1-IFN) arba dviem (PEG2-IFN) PEG'o molekulėmis. Apjungtos frakcijos sukonzentruotos, jose pagal absorbciją prie 280 nm arba kolorimetriškai (Pierce) nustatytas baltymo kiekis. PEG-IFN laikomas esant 4°C buferyje, sudarytame iš 50 mM natrio fosfato 20 ir 0.3 M amonio sulfato, pH 7.0.

2 būdas: Interferonas α -2a (koncentracija maždaug 6 mg/ml) dializuojamas prieš tirpalą, sudarytą iš 5 mM natrio acetato, pH 5.0 bei 0.12 M natrio chlorido. 25 Baltymo koncentracija nustatoma pagal absorbciją prie 280 nm, naudojant ekstinkcijos koeficientą 1.0 mg^{-1}ml . Baltymo tirpalas sumaišomas su modifikuojančiu reagentu moliniu santykiu 1:3. Modifikacijos reakcija inicijuojama koreguojant pH reikšmę iki 10.0, naudojant 30 vieną dešimtadalį tūrio 1.0 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ - NaOH, pH 10.7. Po to 1 valandą reakcijos mišinys inkubuojamas kambario temperatūroje ir reakcija sustabdoma, pridedant vieną dvidešimtąją tūrio dalį 1 M glicino, pH 7.5. Po 3-5 minučių, pH sumažinamas iki 5.0-6.0, pridedant vieną 35 dvidešimtąją tūrio dalį 1 M natrio acetato, pH 4.0.

Tirpalas, kuriame yra PEG-interferonas, neutralizuotas reagentas ir nemodifikuotas interferonas, praskiedžiamas keturiais tūriais 40 mM amonio acetato, pH 4.5, ir leidžiamas per CM-celiuliozės kolonėlę (Whatman CM-52, maždaug 0.5 ml sorbento 1 mg baltymo). Perplovus kolonėlę 5 tūriais 40 mM amonio acetato, pH 4.5, PEG-interferonas ir nemodifikuotas interferonas eliuojami, naudojant tiesinį natrio chlorido gradientą (0-0.5 M) 40 mM amonio acetate, pH 4.5. Frakcijos, kuriose yra baltymo, identifikuojamos pagal absorbciją prie 280 nm, PEG-interferoną turinčios frakcijos identifikuojamos SDS-PAGE metodu.

Toliau PEG-interferonas gryninamas gel-filtracinės chromatografijos metodu per kolonėlę, kuri užpildyta Sephacryl S-200 sorbentu (Pharmacia-LKB). Frakcijos, surinktos ištekant iš kolonėlės, analizuojamos SDS-PAGE metodu, surenkamas piko eliuatas, atitinkantis PEG-interferoną.

2 pavyzdys

α , α -Oksometilen-bis [ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil)] PS 28.3 sintezė

Pagal metodiką, aprašytą 1 pavyzdyje, iš MPEG (molekulinis svoris 1300) buvo susintetintas α , α -oksometilen-bis [ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil)] PS 28.3 ir, panaudojus šį reagentą, pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje, buvo pagamintas PEG'u modifikuotas interferonas.

3 pavyzdys

α -Metil- ω -[2-[[(2-piridiniloksi)karbonil] oksil] -etoksi] -poli-(oksi-1,2-etandiil) PS 111.7 sintezė

Iš tirpalo, kuriame yra 1 g MPEG (mol. svoris 5000) ir 30 ml sauso metileno chlorido, nudistiliuojama 10 ml tirpiklio. Tirpalas atšaldomas iki kambario temperatūros ir į jį pridedama 132 mg (0.6 mM) di-2-
5 piridilkarbonato ir 4 mg DMAP. Tirpalas maišomas 14 valandų, po to tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje. Liekana ištrinama dietilo eteryje ir gautos nuosėdos nufiltruojamos. Produktas ištirpinamas 7 ml sauso glimo, pašildoma, kol viskas ištirpsta, ir
10 tirpalas atvėsinaamas ir paliekamas kambario temperatūroje keletą valandų. Iškritusios nuosėdos filtruojamos ir perplaunamos sausu glimu (2x5 ml). Kieta medžiaga džiovinama vakuuminėje krosnyje azoto srovėje ir gaunama 0.7 g α -(2-piridiniloksi)karbonil]- ω -
15 metoksipoli-(oksi-1,2-etandiil) PS 111.7

Analizė: $C_9H_{11}NO_4(CH_2CH_2O)_{111.7}$

20 Apskaičiuota; %: C, 54.57; H, 9.02; N, 0.28.

Rasta; %: C, 54.51; H, 9.19; N, 0.28.

PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1
25 pavyzdyje.

4 pavyzdys

30 α -(2-piridiniloksi)karbonil]- ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil) PS 225 sintezė

Pagal metodiką, aprašytą 3 pavyzdyje, iš MPEG (molekulinė masė 10000) buvo susintetintas α -(2-piridiniloksi)karbonil]- ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil) PS 225.
35

Analizė: $C_9H_{11}NO_4(CH_2CH_2O)_{225}$

Apskaičiuota; %: 54.54; H, 9.08; N, 0.14.

Rasta; %: C, 54.54; H, 9.12; N, 0.11.

5

PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

5 pavyzdys

10

α -metil- ω -[2-[2-[2--piridiniloksi)karbonil]oksi]-propoksi]propoksi]poli(oksi-1,2-etandiil) PS 64.7 sintezė

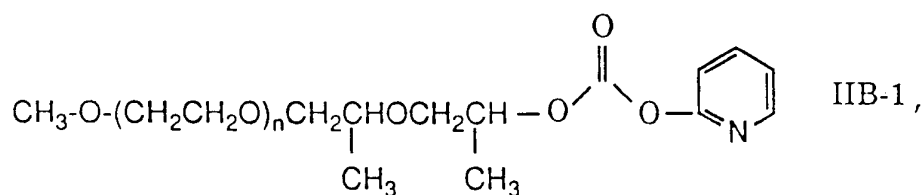
15

Iš tirpalo, kuriame yra 0.5 g α -2-[2-(hidroksipropoksi)propil]- ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil) PS 64.7 ir 40 ml sauso metileno chlorido, nudistiliuojama 15 ml tirpiklio. Po to į tirpalą pridedama 108 mg di-2-piridilkarbonato, 4 mg DMAP ir keli grūdėliai 4A molekulinio sieto. Mišinys maišomas per naktį, filtruojamas ir tirpiklis nudistiliuojamas sumažintame slėgyje. Liekana gryninama gel-filtracinės chromatografijos metodu.

20

Šis reagentas atitinka junginiui, kurio formulė yra

25



30

kurioje n yra maždaug 64.

Tai atitinka polimero molekulinę masę apie 3000 daltonų.

35

PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

5 **6 pavyzdys**

α -metil- ω -[2-[2-[[2-piridiniloksi)karbonil]oksi]-propoksi]propoksi]poli(oksi-1,2-etandiil)PS 110 sintezė

10 α -2-[2-(hidroksipropoksi)propil]- ω -metoksipoli(oksi-1,2-etandiil)PS 110 buvo paverstas α -metil- ω -[2-[2-[[2-piridiniloksi)karbonil]oksi]-propoksi]propoksi]poli(oksi-1,2-etandiil)PS 110, naudojantis metodika, aprašyta 5 pavyzdyje.

15 Šis reagentas (IIB-2) atitinka junginį, aprašytą 5 pavyzdyje, išskyrus tai, kad n reikšmė yra maždaug 110, kas atitinka apytikriai 5000 daltonų.

20 PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

7 pavyzdys

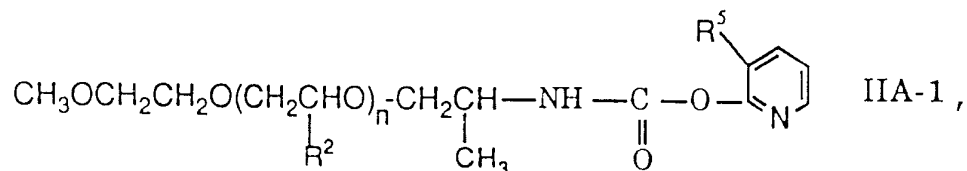
25 Metiloksirano, polimero su oksiranu, [2-[[2-piridiniloksi)-karbonil]amino]propilmetilo eterio (MO/O=10/32) sintezė.

30 Iš tirpalo, kuriame yra 1 g Jeffamine M-2070 (Texaco Chemical Co.) ir 40 ml sauso metileno chlorido, nugarinama 15 ml tirpiklio. Tirpalas atšaldomas iki 0°C ir pridedama 215 mg di-2-piridinilkarbonato. Tirpalas maišomas dar 4 valandas, esant 0°C, po to tirpiklis pašalinamas sumažintame slėgyje. Liekana gryninama
35 sujungus iš eilės dvi Phenomenex gel-filtracines

kolonėles (500 A ir 1000 A). Produktas turi dvi UV absorbcijos juostas: 232 nm ir 310 nm.

Šis reagentas atitinka junginį, turintį tokią formulę:

5



10

kurioje R^5 yra H, R^2 yra H arba metilas ir, skaičiuojant pagal vidutinį pasiskirstymą, n yra lygus 32, kai R^2 yra H ir n yra lygus 10, kai R^2 yra metilas.

15

PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

8 pavyzdys

20

Metiloksirano, polimero su oksiranu, [2-[[(3-metil-2-piridiniloksi)-karbonil] amino] propilmetilo eterio (MO/O=10/32) sintezė.

25

Pagal metodiką, pateiktą 7 pavyzdyje, 0.1 g Jeffamine M-2070 reaguoja su bis (3-metil-2-piridinil) karbonatu ir gaunamas metiloksiranas, polimeras su oksiranu, [2-[[(3-metil)-2-piridiniloksi)-karbonil] amino] propilmetilo eteris (MO/O=10/32).

30

Šis reagentas (IIA-2) atitinka junginį, aprašytą 7 pavyzdyje (IIA-1), išskyrus tai, kad R^5 yra CH_3 .

35

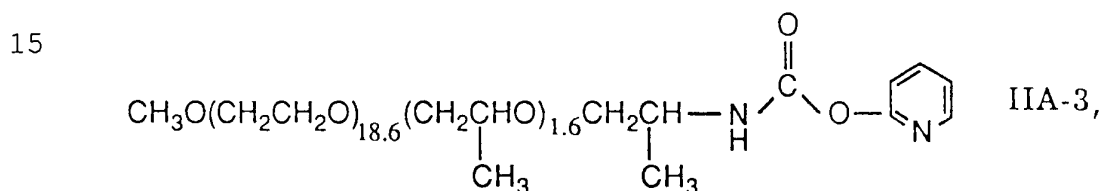
PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

9 pavyzdys

Metiloksirano, blokpolimero su oksiranu, [2-[(2-piridiniloksi)-karbonil] amino] propilmetilo eterio
 5 (MO/O=1.6/18.6) sintezė.

Pagal metodiką, pateiktą 7 pavyzdyje, 0.6 g Jeffamine M-1000 (Texaco Chemical Co.) reaguoja su 155.6 mg di-2-piridinilkarbonatu ir gaunamas metiloksiranas,
 10 blokpolimeras su oksiranu, [2-[(2-piridiniloksi)-karbonil] amino] propilmetilo eteris (MO/O=1.6/18.6).

Šis reagentas atitinka junginį, kurio formulė tokia:



20 kurioje skaičiais nurodytas vidutinis subvienetų pasiskirstymas polimerinėje grandinėje.

PEG'u modifikuotas interferonas buvo pagamintas
 25 naudojant šį reagentą pagal 1 būdą, aprašytą 1 pavyzdyje.

Antivirusinis interferono aktyvumas.

30 Interferono ir PEG'u modifikuoto interferono antivirusinis aktyvumas nustatytas pagal Rubenstein, et al., (1981) J.Virol. 37:755-758; Familletti, et al., (1981) Methods Enzymol. 78:387-394. Visi bandymai buvo palyginami su kontrole. Naujojo bandymuose interferono
 35 standarto specifinis aktyvumas buvo 2×10^8 vienetų/mg baltymo.

Interferono modifikavimui naudotos aukščiau aprašytos optimizuotos metodikos. Siekiant nustatyti interferono konversijos į PEG-interferoną laisvą priklausomai nuo inkubavimo laiko (cheminis reaktingumas) ir įvairių PEG-interferono konjugatų pasiskirstymą (selektyvumas), PEG'u modifikuoti produktai buvo analizuoti SDS-PAGE metodu. SDS-PAGE gėlyje PEG'u modifikuoti junginiai atitinka lėčiau judančias juostas. Tiek monoPEG, tiek diPEG-interferonas buvo susintetinti su pakankamai didele išeiga, todėl šiuos junginius buvo galima išskirti iš reakcijos mišinio naudojant hidrofobinės sąveikos chromatografiją. Buvo tiriamas išgrynintų PEG-interferonų antivirusinis aktyvumas ir lyginamas su nemodifikuoto interferono- $\alpha 2a$ standartu. Tirtų polimerų molekulinė masė ir kai kurių PEG'o darinių antivirusinis aktyvumas pateikti lentelėje.

Lentelė

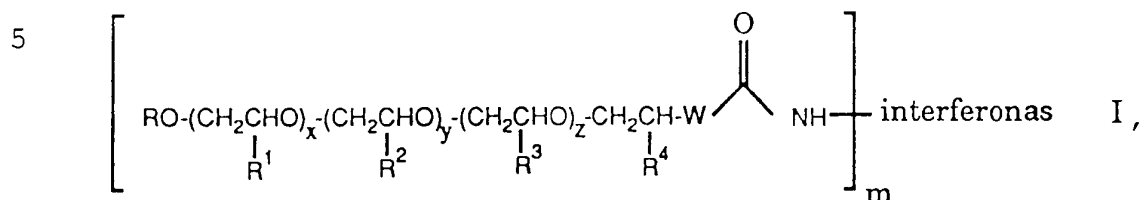
Fizikinės PEG-reagentų savybės ir jų konjugatų su baltymais biologinis aktyvumas

Antivirusinis aktyvumas (% nuo kontrolės)

Junginys iš pavyzdžio	Polimero mol. masė	mono PEG	diPEG
4	10000	25	2
3	5000	40	4
1	5000	40	nematuota
6	5000	40	nematuota
5	3000	60	nematuota
7	2070	45	nematuota
2	1300	70	nematuota
9	1000	100	40

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Interferono konjugatas, turintis formulę:



10 kurioje R yra žemesnysis alkilas; R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra H arba žemesnysis alkilas;

m yra sveikas skaičius 1, neviršijantis pasiekiamų amino grupių interferone skaičiaus;

15

W yra O arba NH;

x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 0 iki 1000, o x, y ir z suma yra
20 nuo 3 iki 1000;

su sąlyga, kad bent vienas iš R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra žemesnysis alkilas.

25 2. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s - k i r i a n t i s tuo, kad x, y ir z yra taip parinkti, kad konjugato polimerinio subvieneto molekulinė masė yra nuo maždaug 300 daltonų iki maždaug 30000 daltonų.

30

3. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s - k i r i a n t i s tuo, kad m lygus 1.

35 4. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s k - i r i a n t i s tuo, kad R yra metilas.

5. Interferono konjugatas pagal 2 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad x, y ir z yra taip
parinkti, kad konjugato polimerinio subvieneto
molekulinė masė yra nuo maždaug 1000 daltonų iki
5 maždaug 5000 daltonų.

6. Interferono konjugatas pagal 2 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad x, y ir z yra taip
parinkti, kad konjugato polimerinio subvieneto mole-
kulinė masė yra maždaug 1000 daltonų iki maždaug 2200
daltonų.

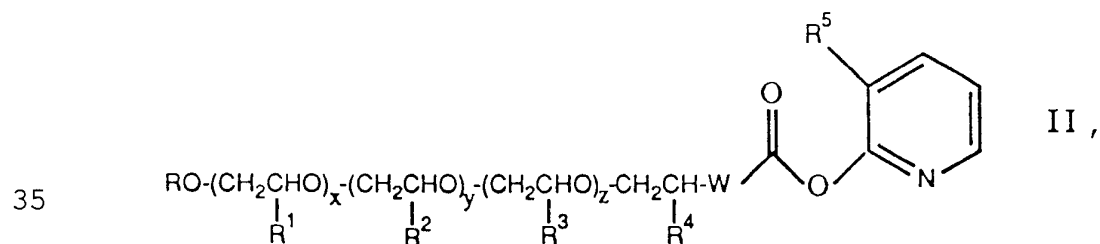
7. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad x ir y yra nuo 5.0 iki
15 500.0 ir z yra nuo 0.0 iki 4.0.

8. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s k i
r i a n t i s tuo, kad x yra nuo 10.0 iki 100.0, y yra
nuo 1.0 iki 10.0 ir z yra 0.

9. Interferono konjugatas pagal 1 punktą, b e s i s k i
r i a n t i s tuo, kad interferonu naudojamas
interferonas 2a.

10. Interferono konjugatas pagal 9 punktą, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad W yra NH; m yra 1; R, R² ir
R⁴ yra metilas; R¹ yra H; x yra 18.6, y yra 1.6 ir z yra
0.

11. Junginys, turintis formulę:



kurioje R yra žemesnysis alkilas, R^1 , R^2 , R^3 , R^4 ir R^5 yra H arba žemesnysis alkilas;

W yra NH arba O;

5 x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 0 iki 1000, o x, y ir z suma yra nuo 3 iki 1000,

10 su sąlyga, kad jei W yra NH arba jei W yra O ir R^5 yra H, tai bent vienas iš R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra žemesnysis alkilas.

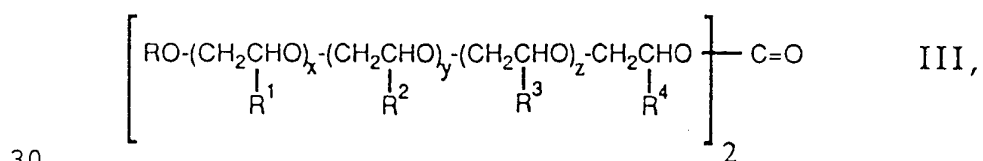
12. Junginys pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad x, y ir z yra parinkti taip, kad šio
15 junginio molekulinė masė yra maždaug nuo 300 daltonų iki maždaug 30000 daltonų.

13. Junginys pagal 11 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad R yra metilas.

20

14. Junginys pagal 13 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad x yra nuo 10.0 iki 100.0, y yra nuo 1.0 iki 10.0 ir z yra nuo 0.0 iki 4.0.

25 15. Junginys, turintis formulę:



35 kurioje R yra žemesnysis alkilas, R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra H arba metilas, x yra sveikas skaičius nuo 1 iki 1000, y ir z yra sveiki skaičiai nuo 0 iki 1000, o x, y ir z suma yra nuo 3 iki 1000.

16. Junginys pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad x, y ir z parinkti taip, kad šio
junginio molekulinė masė yra nuo maždaug 300 daltonų
iki maždaug 30000 daltonų.
- 5
17. Junginys pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad bent vienas iš R^1 , R^2 , R^3 ir R^4 yra
žemesnysis alkilas.
- 10
18. Junginys pagal 15 punktą, b e s i s k i r i a n -
t i s tuo, kad R yra metilas.
19. Interferono konjugatų pagal bet kurią iš 1-10 punktu
panaudojimas kaip terapiškai aktyvių junginių ligų
15 gydymui ir profilaktikai.
20. Interferono konjugatų pagal bet kurią iš 1-10 punktu
gaminimo būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
bet kurią junginį pagal 11-18 punktus konjuguoja su
20 interferonu arba jo druska ir interferono konjugatą
išskiria iš reakcijos mišinio.
21. Farmacinės kompozicijos, turinčios terapiniu
požiūriu inertiško nešiklio, b e s i s k i r i a n -
25 č i o s tuo, kad į jų sudėtį įeina interferono
konjugatas pagal bet kurią iš 1-10 punktų.
22. Farmacinės kompozicijos, turinčios terapiniu
požiūriu inertiško nešiklio, skirtos tokių imunomodu-
30 liatorinių sutrikimų, kaip neoplastinės arba infekcinės
ligos gydymui arba profilaktikai, b e s i s k i -
r i a n č i o s tuo, kad į jų sudėtį įeina interferono
konjugatas pagal bet kurią iš 1-10 punktų.
- 35
23. Interferono konjugatų pagal bet kurią iš 1-10 punktu
panaudojimas gyvūnų susirgimų gydymui arba profilak-
tikai.

24. Interferono konjugatų pagal bet kurią iš 1-10 punktų panaudojimas vaistų, skirtų ligų gydymui arba profilaktikai, gamybai.

Fig.1

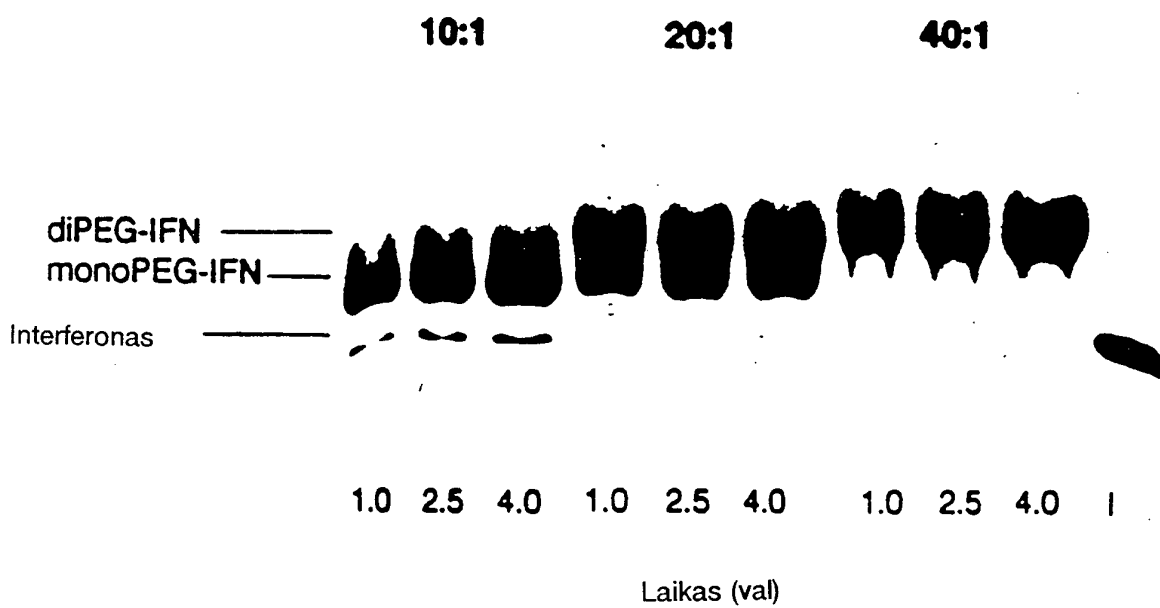


Fig.2

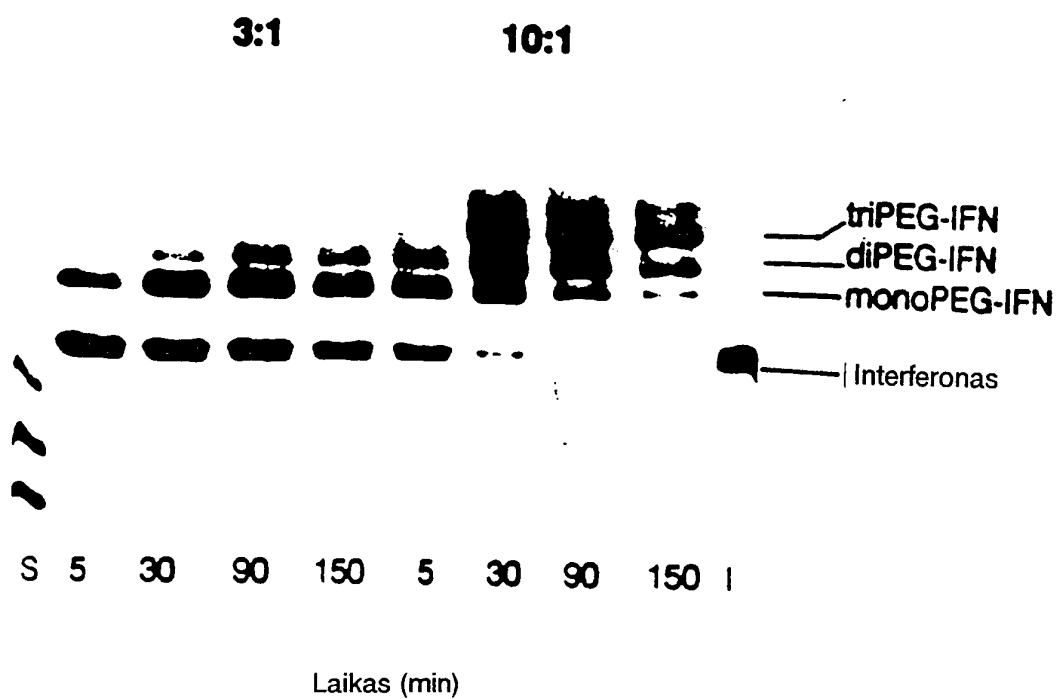


Fig.3

