

Область изобретения

Данное изобретение относится к новым соединениям полиалкиленгликоля, конъюгатам полимеров и белков и их применениям.

Предпосылка изобретения

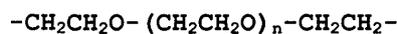
Ковалентное связывание гидрофильных полимеров, таких как полимеров полиалкиленгликоля, также называемые полиалкиленоксидами, с биологически активными молекулами и поверхностями представляет интерес в биотехнологии и медицине.

В частности, многие исследования были сосредоточены на применении конъюгатов поли(этиленгликоля) (PEG), также называемого поли(этиленоксидом) (ПЭО), для повышения растворимости и стабильности и пролонгирования времени полужизни молекул в системе кровообращения.

В своей наиболее общей форме PEG является линейным полимером, заканчивающимся на каждом из концов гидроксильными группами:



Указанный выше полимер, альфа-, омега-дигидроксиполи(этиленгликоль) также можно представить в виде HO-PEG-OH, при этом подразумевается, что символ -PEG- означает следующую структурную единицу:



где n обычно находится в пределах примерно от 4 до 10000.

PEG обычно используют в виде метокси-PEG-OH, или mPEG, в котором один конец представляет собой относительно инертную метоксигруппу, тогда как другой конец является гидроксильной группой, которая легко подвергается химической модификации. Кроме того, во многих применениях PEG может быть заменен случайными или блок-сополимерами различных алкиленоксидов (например, этиленоксида и пропиленоксида), которые являются близко родственными PEG по своей химической природе.

Чтобы связать PEG с представляющей интерес молекулой часто необходимо активировать PEG путем получения производного PEG, имеющего реакционноспособную функциональную группу по меньшей мере на одном конце. Функциональную группу выбирают на основе типа доступной реакционноспособной группы в молекуле, которая будет связана с PEG.

PEG является полимером, обладающим свойствами растворимости в воде и многих органических растворителях, отсутствием токсичности и отсутствием иммуногенности. Одним из применений PEG является ковалентное связывание полимера с нерастворимыми молекулами, чтобы сделать полученный в результате «конъюгат» PEG-молекула растворимым. Например, показано, что нерастворимое в воде лекарственное средство паклитаксел при связывании с PEG становится водорастворимым. Greenwald et al., J. Org. Chem., 60: 331-336 (1995).

Способ на основе пролекарств, при котором лекарственные средства высвобождаются в результате деградации более сложных молекул (пролекарств) при физиологических условиях, является эффективным элементом доставки лекарственного средства. Пролекарства, например, можно образовать в результате связывания PEG с лекарственными средствами посредством связей, которые разрушаются при физиологических условиях. Время жизни пролекарств на основе PEG in vivo зависит от типа функциональной группы(групп), образующих связи между PEG и лекарственным средством. В общем, сложноэфирные связи, образованные в результате взаимодействия PEG-карбоновых кислот или активированных PEG-карбоновых кислот со спиртовыми группами лекарственного средства, гидролизуются в физиологических условиях, высвобождая лекарственное средство, тогда как амидные и карбаматные связи, образованные на основе аминоксипролекарственного средства, стабильны и не гидролизуются с высвобождением свободного лекарственного средства. Показано, что гидролитическую доставку лекарственных средств из сложных эфиров PEG можно в определенной степени легко регулировать посредством регулирования количества связывающих метиленовых групп в спейсере между концевым кислородом PEG и карбонильной группой связанной карбоновой кислоты или производного карбоновой кислоты. Например, Narris et al. в патенте США № 5672662 описывают PEG-бутановую кислоту и PEG-пропановую кислоту и их активированные производные в качестве альтернативы карбоксиметил-PEG для соединений в тех случаях, когда желательна меньшая гидролитическая реакционная способность соответствующих сложноэфирных производных. В общем, см. публикацию PCT WO 01/46291.

Одним фактором, ограничивающим пригодность протеинизированных веществ для применений в лечебных целях, является то, что при парентеральном введении они элиминируются из организма в течение короткого периода времени. Указанная элиминация может происходить в результате деградации протеазами или в результате выведения с использованием обычных путей элиминации белка, таких как фильтрация в почках. Пероральное введение указанных веществ еще более проблематично, поскольку кроме протеолиза в желудке высокая кислотность желудка разрушает указанные вещества до того, как они достигают намеченной ткани-мишени. Проблемы, связанные с указанными путями введения белков, хорошо известны в фармацевтической промышленности, и при попытках их решения используются различные методики. Опубликовано много работ, связанных со стабилизацией белка. Известны различные способы конъюгации белков с полимерными материалами, включая использование декстранов, поливи-

нилпирролидонов, гликопептидов, полиэтиленгликоля и полиаминокислот. Сообщается, что полученные в результате конъюгированные полипептиды сохраняют свои биологические активности и растворимость в воде для парентеральных применений.

Особый интерес представляет повышение биологической активности интерферонов наряду с уменьшением токсичности, вызванной применением указанных белков для лечения больных людей. Интерфероны являются семейством встречающихся в природе небольших белков и гликопротеидов, продуцируемых и секретируемых большинством ядерных клеток в ответ на вирусную инфекцию, а также другие антигенные стимулы. Интерфероны делают клетки резистентными к вирусной инфекции и проявляют широкое множество действий на клетки. Они проявляют свои клеточные активности посредством связывания со специфичными мембранными рецепторами на поверхности клеток. После связывания с клеточной мембраной интерфероны инициируют сложную последовательность внутриклеточных событий. Исследования *in vitro* показали, что указанные активности включают индукцию некоторых ферментов; подавление пролиферации клеток, иммуномодулирующие активности, такие как усиление фагоцитарной активности макрофагов; увеличение специфичной цитотоксичности лимфоцитов по отношению к клеткам-мишеням; и ингибирование репликации вирусов в инфицированных вирусом клетках.

Интерфероны тестировали при лечении различных клинических патологических состояний. Применение человеческого интерферона бета введено для лечения множественного склероза. Две формы рекомбинантного интерферона бета недавно лицензированы в Европе и в США для лечения данного заболевания: интерферон-бета-1a (AVONEX®, Biogen, Inc., Cambridge, MA и REBIF®, Serono, Geneva, Switzerland) и интерферон-бета-1b (BETASERON®, Berlex, Richmond, CA). Интерферон бета-1a продуцируется в клетках млекопитающих при использовании природной последовательности гена человека и гликозилируется, тогда как интерферон-бета-1b продуцируется в бактериях *E. coli* при использовании модифицированной последовательности гена человека, которая содержит генетически сконструированную замену цистеина на серин в положении аминокислоты 17, и не гликозилируется.

Известно, что неиммунные интерфероны, которые включают как альфа-, так и бета-интерфероны, подавляют вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) как в остроинфицированных, так и в хронически инфицированных клетках. См. Poli and Fauci, 1992, *AIDS Research and Human Retroviruses* 8 (2): 191-197. Благодаря своей противовирусной активности интерфероны, особенно альфа-интерфероны, привлекли большое внимание в качестве терапевтических средств для лечения заболевания, связанного с вирусом гепатита С (HCV). См. Hoofnagle et al., в: *Viral Hepatitis 1981 International Symposium*, 1982, Philadelphia, Franklin Institute Press; Hoofnagle et al., 1986, *New Eng. J. Med.* 315: 1575-1578; Thomson, 1987, *Lancet* 1: 539-541; Kiyosawa et al., 1983, в: Zuckerman, ed., *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Allen K. Liss, New York pp. 895-897; Hoofnagle et al., 1985, *Sem. Liv. Dis.*, 1985, 9: 259-263.

Конъюгаты интерферон-полимер описаны, например, в патенте США № 4766106, патенте США № 4917888, Европейской заявке на выдачу патента № 0236987, Европейской заявке на выдачу патента № 0510356 и в публикации международной заявки на выдачу патента № WO 95/13090.

Хронический гепатит С является коварным и медленно прогрессирующим заболеванием, оказывающим значительное влияние на качество жизни. Несмотря на улучшение качества пула донорской крови и недавнее внедрение тестирования сданной крови на ВИЧ, доля острой инфекции среди лиц, получавших переливание, составляет согласно оценкам от 5 до 10%. См. Alter et al., в: Zuckerman, ed., *Viral Hepatitis and Liver Disease*, Allen K. Liss, New York, 1988, pp. 537-542. Таким образом, примерно из 3 млн человек, которым ежегодно проводят переливание в Соединенных Штатах, примерно у 150000 разовьется гепатит С. Хотя у многих пациентов, которые заразились гепатитом С, будет иметь место субклиническое или умеренное заболевание, примерно у 50% будет наблюдаться прогрессирование до хронического состояния болезни, характеризуемого флуктуирующими нарушениями сывороточной трансаминазы и воспалительными повреждениями в ткани печени. По оценкам цирроз будет развиваться у части представителей данной группы, составляющей примерно до 20%. См. Koretz et al., 1985, *Gastroenterology* 88:1251-1254.

Известно, что интерфероны влияют на множество клеточных функций, включая репликацию ДНК и синтез РНК и белка как в нормальных, так и аномальных клетках. Таким образом, цитотоксические действия интерферона не ограничены опухолевыми или инфицированными вирусом клетками, но также проявляются и в нормальных, здоровых клетках. В результате в ходе терапии интерферонами могут возникать нежелательные побочные эффекты, особенно в том случае, когда требуются высокие дозы. Введение интерферона может привести к миелосупрессии, тем самым приводя к снижению числу красных кровяных клеток и пониженным уровням белых кровяных клеток и тромбоцитов. Интерфероны обычно вызывают подобные гриппу симптомы (например, жар, усталость, головные боли и озноб), желудочно-кишечные расстройства (например, анорексию, тошноту и диарею), головокружение и кашель. Часто долговременный ответ ВИЧ-пациентов на лечение непегилированным интерфероном является низким, и лечение может индуцировать тяжелые побочные эффекты, включая, но не ограничиваясь указанным, ретинопатию, тиреоидит, острый панкреатит и депрессию.

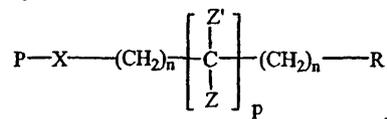
Нежелательные побочные эффекты, которые сопровождают лечение интерфероном, часто ограни-

чивают терапевтическую пригодность схем лечения интерфероном. Таким образом, существует необходимость в сохранении или повышении терапевтической пользы такого лечения при снижении или исключении нежелательных побочных эффектов.

Сущность изобретения

Изобретение относится к новым соединениям полиалкиленгликоля, композициям на их основе, полимерным конъюгатам указанных соединений, фармацевтическим композициям на их основе, а также к способам лечения вирусных инфекций, множественного склероза и рака у пациента.

В одном аспекте изобретение относится к активированному полимеру полиалкиленгликолю, имеющему структуру согласно формуле X



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

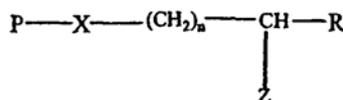
Z и Z' в отдельности означают водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы X и биологически активным соединением или его предшественником;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

p равно 1, 2 или 3.

В другом аспекте изобретение включает активированное соединение полиалкиленгликоля (PGC), имеющее структуру согласно формуле Xa



В указанных соединениях P означает полимер полиалкиленгликоля, такой как, например, PEG или mPEG.

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR', и R', в том случае, если присутствует, означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещен-

ный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

R является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы X и биологически активным соединением или его предшественником; и

n равно 0 или является целым числом от 1 до 5, так что имеется от 0 до 5 метиленовых групп между X- и Z-содержащим атомом углерода.

В одном варианте R выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

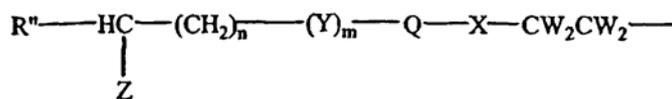
В другом варианте P означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II



где E означает водород, C_1 - C_{20} алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку; и a является целым числом от 4 до 10000. В следующем варианте E может быть метилом.

В еще одном варианте P означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II, где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы X и биологически активным соединением или его предшественником, и a является целым числом от 4 до 10000.

В дополнительном варианте E выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля. Альтернативно E может иметь структуру согласно формуле III



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X и Y независимо означают O, S, CO, CO_2 , COS, SO, SO_2 , CONR', SO_2NR' или NR';

Q означает C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, описанные выше;

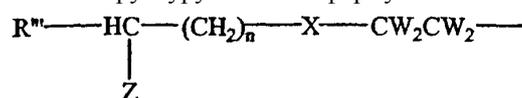
m равно 0 или 1;

каждый W независимо является водородом или C_1 - C_7 алкилом;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником. Гетероциклические и карбоциклические группы включают конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры.

В еще одном варианте E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, определенные выше;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом; и

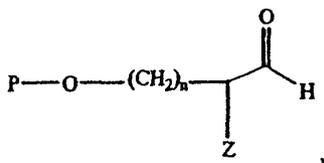
R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

В дополнительном варианте R'' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В следующем варианте R''' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В другом варианте E является регистрируемой меткой. Кроме того, E может быть выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемиллюминесцентных остатков и квантовых меток.

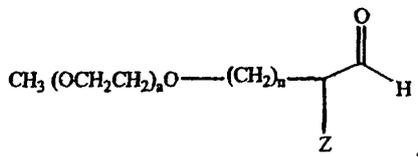
В еще одном варианте активированный PGC согласно изобретению имеет структуру согласно формуле XI



где P означает полимер полиалкиленгликоля; и

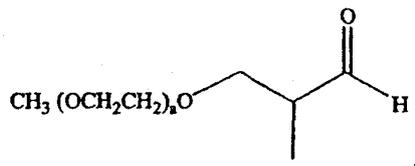
n и Z имеют значения, которые определены.

В другом варианте активированный полиалкиленгликоль имеет структуру согласно формуле XII



где n, a и Z имеют значения, определенные выше. В одном варианте Z может быть метилом. В некоторых вариантах n равно 1.

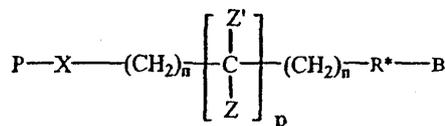
В другом аспекте изобретение включает активированное соединение полиалкиленгликоля, имеющее структуру согласно формуле XIII



где a является целым числом от 4 до 10000.

Изобретение также относится к композиции активированных соединений полиалкиленгликоля согласно изобретению и биологически активного соединения или его предшественника. В различных вариантах биологически активное соединение или его предшественник выбраны из группы, состоящей из пептида, аналога пептида, белка, фермента, малой молекулы, красителя, липида, нуклеозида, олигонуклеотида, аналога олигонуклеотида, сахара, олигосахарида, клетки, вируса, липосомы, микрочастицы, поверхности и мицеллы.

В другом аспекте изобретение относится к полимерному конъюгату, имеющему структуру согласно формуле XXII



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамои́ла, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамои́ла, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

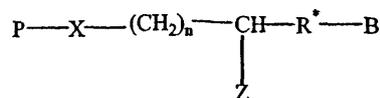
R* означает связывающий остаток;

B означает биологически активную молекулу;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

r равно 1, 2 или 3.

В следующем аспекте изобретение относится к полимерному конъюгату, имеющему структуру согласно формуле XXIIa



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'; и

n равно 0 или является целым числом от 1 до 5.

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамои́ла, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамои́ла, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R* означает связывающий остаток, образованный в результате взаимодействия R с биологически активным соединением или его предшественником, и

B означает биологически активное соединение или его предшественник после конъюгации с R.

В одном варианте R* образуется в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислотой, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группой, защищенной гидроксильной группой, остатком карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата,

акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила или глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

В дополнительном варианте Р означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку; и а является целым числом от 4 до 10000. В данном варианте E может быть метилом.

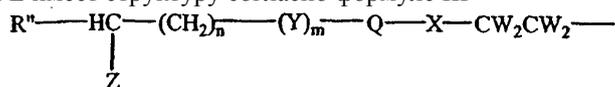
В другом варианте Р означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II



где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы II и биологически активным соединением или его предшественником, и а является целым числом от 4 до 10000. В данном варианте E может связываться с биологически активным соединением или его предшественником, отличным от В. В других вариантах E образует дополнительную связь с биологически активным соединением В.

В различных вариантах E может быть выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В других вариантах E имеет структуру согласно формуле III



где Р означает полимер полиалкиленгликоля;

каждый X и Y независимо означают O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфирила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрида, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, описанные выше;

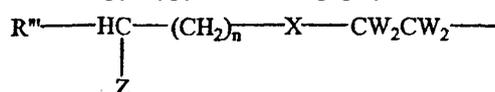
m равно 0 или 1;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5;

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником; и

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом.

В следующем варианте E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, определенные выше;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом; и

R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

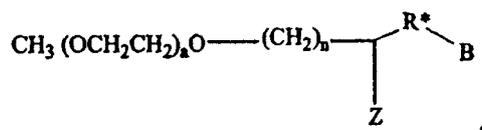
В следующих вариантах R'' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

Еще в других вариантах R''' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В дополнительных вариантах E является регистрируемой меткой. Например, E может быть выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемилуминесцентных остатков и квантовых меток.

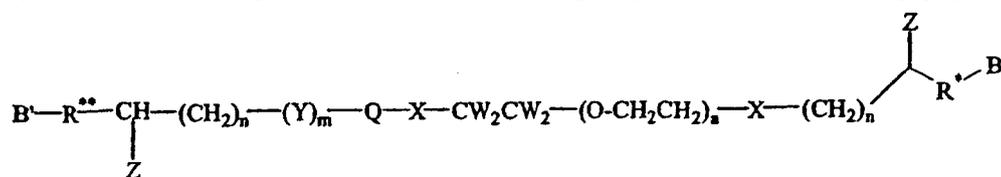
В другом варианте R* является метиленом и B является биологически активной молекулой, связанной посредством амина. Например, амин является аминоконцом пептида. В следующем варианте пептид является интерфероном, таким как интерферон-бета-1a.

В другом варианте изобретение относится к полимерному конъюгату, имеющему структуру согласно формуле XXIII



где n, a, R*, B и Z имеют значения, определенные выше. В одном дополнительном варианте Z является метилом и n равно единице.

В следующем аспекте изобретение относится к полимерному конъюгату согласно формуле XXIV



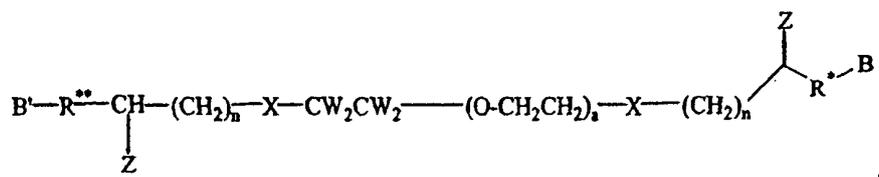
где m равно 0 или 1; a является целым числом от 4 до 10000; каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5. Каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'; каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью; и каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил.

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкирил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тiaoацетата, тiaoформата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

R* и R** независимо являются связывающими остатками, образованными в результате взаимодействия R и R'' с биологически активным соединением или его предшественником, и каждый B и B' является биологически активным соединением или его предшественником после конъюгации с R и R'', соответственно.

В некоторых вариантах B и B' представляют собой один и тот же тип биологически активного соединения. В других вариантах B и B' являются разными биологически активными соединениями. В других вариантах B и B' являются одной и той же биологически активной молекулой. В дополнительных вариантах R* и R** представляют собой одно и то же. В других вариантах R* и R** являются разными.

В следующем аспекте изобретение относится к полимерному конъюгату согласно формуле XXV



где X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'; a является целым числом от 4 до 10000; и каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

других вариантах В и В' являются одной и той же биологически активной молекулой. В дополнительных вариантах R* и R** представляют собой одно и то же. В других вариантах R* и R** являются разными.

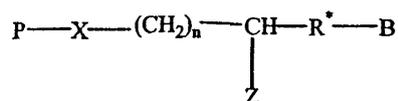
В одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей композицию активированного полимера полиэтиленгликоля формулы X и биологически активного соединения или его предшественника в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

В ещё одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полимерный конъюгат согласно формуле XXIV и фармацевтически приемлемый носитель.

В ещё одном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полимерный конъюгат согласно формуле XXV и фармацевтически приемлемый носитель.

В ещё одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей продукт взаимодействия соединения по п.1 и биологически активного соединения или его предшественника.

В одном из вариантов композиция содержит продукт взаимодействия, имеющий структуру согласно формуле XXII

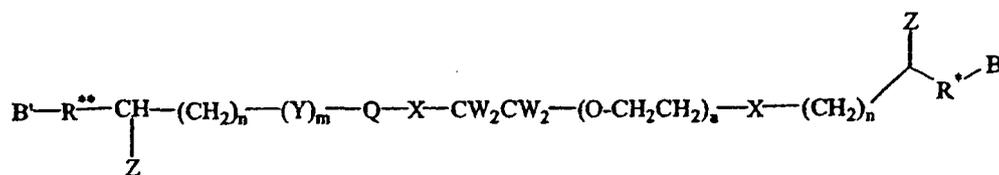


где все переменные имеют значения, определенные выше;

R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении или его предшественнике; и

B является биологически активным соединением или его предшественником.

В другом варианте композиция содержит продукт взаимодействия, имеющий структуру согласно формуле XXIV



где все переменные имеют значения, определенные выше;

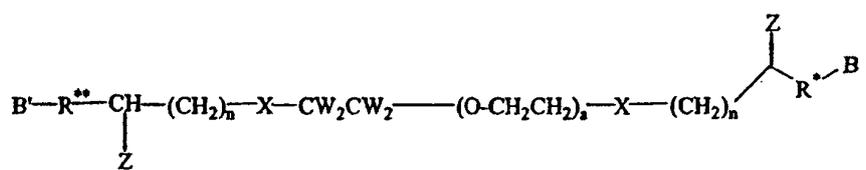
каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении B или его предшественнике;

R** является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R'' с химически активным остатком на биологически активном соединении B' или его предшественнике; и

B и B' независимо являются биологически активным соединением или его предшественником.

В другом варианте композиция содержит продукт взаимодействия, имеющий структуру согласно формуле XXV



где все переменные имеют значения, определенные выше;

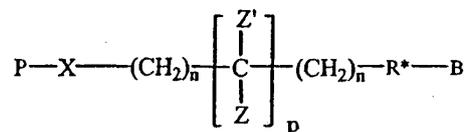
каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении B или его предшественнике;

R** является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R''' с химически активным остатком на биологически активном соединении B' или его предшественнике; и

B и B' независимо являются биологически активным соединением или его предшественником.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающему введение пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXII



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* означает связывающий остаток;

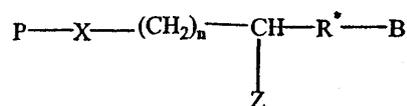
V означает биологически активную молекулу;

m равно 0 или 1;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

r равно 1, 2 или 3.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающему введение пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXIIa



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

m равно 0 или 1;

n равно 0 или является целым числом от 1 до 5;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'; и

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

R* означает связывающий остаток, образованный в результате взаимодействия R с биологически активным соединением или его предшественником, и V означает биологически активное соединение или его предшественник после конъюгации с R.

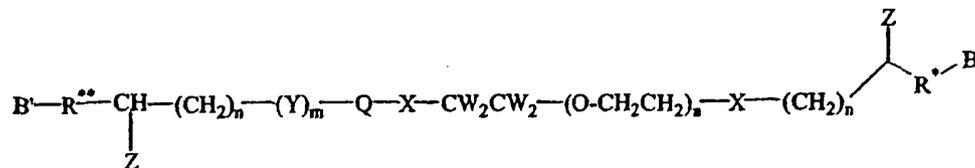
В различных вариантах V является биологически активным пептидом, таким как интерферон. На-

пример, В может быть интерфероном-бета-1а.

В другом варианте композиция, кроме того, содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусного средства в виде малой молекулы, противовирусного средства в виде нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства. Например, противовирусное средство может быть выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, ЗТС, ФТС, МВ686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

В следующем варианте вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

Кроме того, в другом аспекте изобретение относится к способу лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией путем введения пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXIV



где m равно 0 или 1;

a является целым числом от 4 до 10000;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5;

каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью; и

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил.

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, араккила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы.

R* и R** независимо являются связывающими остатками, образованными в результате взаимодействия R и R' с биологически активным соединением или его предшественником, и каждый B и B' является биологически активным соединением или его предшественником после конъюгации с R и R'', соответственно.

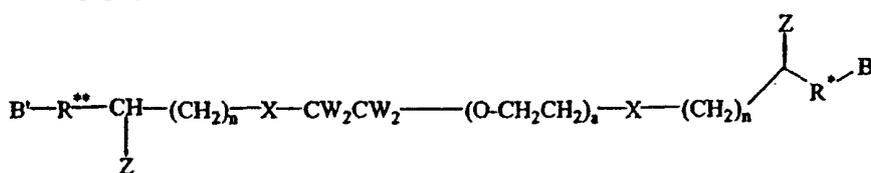
В некоторых вариантах B и B' представляют собой один и тот же тип биологически активного соединения. В других вариантах B и B' являются разными биологически активными соединениями. Кроме того, в других вариантах B и B' являются одной и той же биологически активной молекулой. В дополнительных вариантах R* и R** представляют собой одно и то же. В других вариантах R* и R** являются разными.

В различных вариантах B является биологически активным пептидом, таким как интерферон. Например, B может быть интерфероном-бета-1а.

В других вариантах композиция, кроме того, содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусного средства в виде малой молекулы, противовирусного средства в виде нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства. Например, противовирусное средство может быть выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, ЗТС, ФТС, МВ686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

Кроме того, в других вариантах вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией путем введения пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXV



где каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

a является целым числом от 4 до 10000;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5;
 X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'; и
 каждый Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью.

R* и R** независимо являются связывающими остатками, образованными в результате взаимодействия R и R' с биологически активным соединением или его предшественником, и каждый B и B' является биологически активным соединением или его предшественником после конъюгации с R и R'', соответственно.

В некоторых вариантах B и B' представляют собой один и тот же тип биологически активного соединения. В других вариантах B и B' являются разными биологически активными соединениями. Кроме того, в других вариантах B и B' являются одной и той же биологически активной молекулой. В дополнительных вариантах R* и R** представляют собой одно и то же. В других вариантах R* и R** являются разными.

В различных вариантах B является биологически активным пептидом, таким как интерферон. Например, B может быть интерфероном-бета-1a.

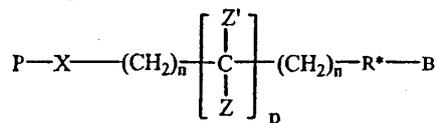
В другом варианте композиция, кроме того, содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусного средства в виде малой молекулы, противовирусного средства в виде нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства. Например, противовирусное средство может быть выбрано из группы, состоящей из рибавирин, левовирин, ЗТС, ФТС, МВ686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

Кроме того, в других вариантах вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

Данное изобретение также относится к способу лечения пациента, у которого предполагается инфекция гепатита С, путем введения пациенту комбинации любой из композиций согласно изобретению и противовирусного средства. В различных вариантах композицию и противовирусное средство вводят одновременно, последовательно или попеременно.

В одном варианте противовирусным средством является рибавирин.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения множественного склероза у пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXII, где формула XXII представляет собой



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфофила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфофила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетата, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина,

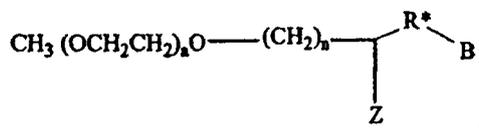
йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

В означает интерферон;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

r равно 1, 2 или 3.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения множественного склероза у пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXIII, где формула XXIII представляет собой



где Z означает насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

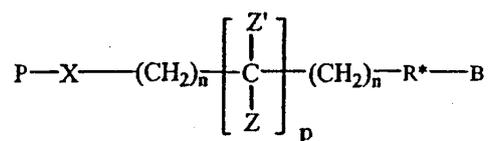
R^* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

В означает интерферон;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

a является целым числом от 0 до 4.

В ещё одном аспекте изобретение относится к способу лечения рака у пациента, включающему введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXII, где формула XXII представляет собой



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O , S , CO , CO_2 , COS , SO , SO_2 , $CONR'$, SO_2NR' или NR' ;

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокар-

бонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминоксильной группы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

В означает интерферон;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5; и

r равно 1, 2 или 3.

Если не оговорено особо все технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в данной области, к которой относится изобретение. Хотя на практике или при проверке данного изобретения можно использовать способы и вещества, сходные или эквивалентные способам и веществам, описанным в данном изобретении, подходящие способы и вещества описаны далее. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие ссылки, упоминаемые в данном описании, включены в виде ссылки в полном объеме. В случае конфликта данное описание, включая определения, будут проверены. Кроме того, вещества, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие признаки и преимущества изобретения будут понятны из следующего подробного описания и из формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Данное изобретение будет более понятным из следующего описания со ссылками на фигуры, в которых:

на фиг. 1 представлен восстанавливающий SDS-ПААГ-гель, показывающий чистоту немодифицированного IFN-β-1a и модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a: Дорожка A: маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа и 18 кДа, соответственно); Дорожка B: 4 мкг немодифицированного IFN-β-1a; Дорожка C: 4 мкг модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a.

На фиг. 2 изображены кривые эксклюзионной хроматографии по размеру немодифицированного IFN-β-1a и модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a: Панель A: стандарты молекулярной массы; Панель B: модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a; Панель C, немодифицированный IFN-β-1a.

На фиг. 3 изображена кривая эксклюзионной хроматографии по размеру модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a.

На фиг. 4 представлен восстанавливающий SDS-ПААГ-гель, показывающий чистоту немодифицированного IFN-β-1a и модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a: Дорожка A: 2,5 мкг модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a; Дорожка B: 2,5 мкг немодифицированного IFN-β-1a; Дорожка C: маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа и 18 кДа, соответственно).

На фиг. 5 изображены кривые эксклюзионной хроматографии по размеру модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a; Панель A: стандарты молекулярной массы; Панель B: модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a.

На фиг. 6 представлен восстанавливающий SDS-ПААГ-гель, показывающий стабильность модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a: Дорожка A: маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа, 18 кДа и 15 кДа, соответственно); Дорожки B, C, D и E: 2 мкг модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a, взятого для анализа в 0, 2, 5 и 7 день, соответственно.

На фиг. 7A-B показана противовирусная активность различных пегелированных образцов IFN-β-1a человека в виде функции концентрации белка. Фиг. 7A: немодифицированный IFN-β-1a (o), модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a (□), модифицированные 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a(Δ) и модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN-β-1a (◇). Фиг. 7B: немодифицированный IFN-β-1a (o), модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-пара-фенилацетальдегидом IFN-β-1a (□), модифицированные 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом IFN-β-1a (Δ) и модифицированный 20 кДа mPEG-O-

мета-фенилацетальдегидом IFN- β -1a (\diamond).

Фиг. 8 А-В представляют собой графики, на которых изображена фармакокинетика немодифицированного и различных пегилированных образцов IFN- β -1a человека. Фиг. 8А: немодифицированный IFN- β -1a (верхняя панель) и IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом (нижняя панель). Фиг. 8В: IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (верхняя панель) и 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом (нижняя панель).

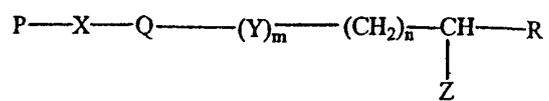
Фиг. 9 А-В представляют собой графики, на которых изображена фармакокинетика немодифицированного и различных пегилированных образцов IFN- β -1a человека. Фиг. 9А: немодифицированный IFN- β -1a (верхняя панель) и IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом (нижняя панель). Фиг. 9В: IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом (верхняя панель) и 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (нижняя панель).

Фиг. 10 представляет собой гистограмму, на которой сравнивается однократное введение модифицированного 20 кДа PEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a с ежедневным введением немодифицированного IFN- β -1a по восстановлению количества радиально ориентированных новых сосудов у мышей nu/nu, несущих клетки злокачественной меланомы человека SK-MEL-1: однократное лечение контрольным наполнителем только в 1 день (столбик А); лечение 1 MU (5 мкг) немодифицированного IFN- β -1a ежедневно в 1-9 дни включительно (столбик В); лечение 1 MU (10 мкг) модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a только один раз в 1 день (столбик С); и лечение контрольным наполнителем ежедневно в 1-9 дни включительно (столбик D).

Подробное описание изобретения

Изобретение направлено на соединения и способы, применимые для лечения различных заболеваний и расстройств. Как объясняется более подробно ниже, такие заболевания и расстройства, в частности, включают заболевания и расстройства, которые поддаются терапевтическому лечению интерфероном, включая, но не ограничиваясь указанным, вирусные инфекции, такие как инфекции гепатита, и аутоиммунные заболевания, такие как множественный склероз.

Представленные в описании соединения включают новые активированные соединения полиалкиленгликоля согласно формуле I



где Р является водорастворимым полимером, таким как полимер полиалкиленгликоля. Неограничивающий список таких полимеров включает другие гомополимеры полиалкиленоксидов, такие как полипропиленгликоли, полиоксиэтиленированные полиолы, их сополимеры и их блок-сополимеры. Другие примеры подходящих водорастворимых и непептидных полимерных основных цепей включают поли(оксиэтилированный полиол), поли(олефиновый спирт), поли(винилпирролидон), поли(гидроксипропилметакриламид), поли(α -оксикислота), поли(виниловый спирт), полифосфазен, полиоксазолин, поли(N-акриллоилморфолин) и сополимеры, тройные сополимеры и их смеси. В одном варианте основной цепью полимера является поли(этиленгликоль) или монометоксиполиэтиленгликоль (mPEG), имеющий среднюю молекулярную массу примерно от 200 до 400000 Да. Следует понимать, что другие родственные полимеры также подходят для применения в практике данного изобретения и подразумевается, что в этом отношении использование термина PEG или поли(этиленгликоль) является включающим, а не исключаящим указанное. Термин PEG включает поли(этиленгликоль) в любых его формах, включая алкокси-PEG, бифункциональный PEG, мультиветвящийся PEG, раздвоенный PEG, разветвленный PEG, PEG с подвешенными группами или PEG с деградируемыми связями в молекуле.

В классе соединений, представленных формулой I, имеется от 0 до 5 метиленовых групп между Y и атомом углерода, содержащим Z (например, n равно нулю или является целым числом от 1 до 5) и m равно 0 или 1, например, Y присутствует или отсутствует.

X и Y независимо являются O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'. В некоторых вариантах X и Y являются кислородом.

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, сульфамойл, сульфонат, силлил, простой эфир или алкилтиогруппа.

Заместитель Z является водородом, насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильной группой. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, сил, простой эфир или алкилтиогруппа.

В том случае, когда X или Y является NR', R' может быть водородом, насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильной группой. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, сил, простой эфир или алкилтиогруппа.

R является химически активной функциональной группой, т.е. активирующим остатком, способным взаимодействовать с образованием мостика или связи между соединением формулы I и биологически активным соединением или его предшественником. Таким образом, R представляет собой «активирующую группу» активированных соединений полиалкиленгликоля (PGC), представленных формулой I. R может быть, например, карбоновой кислотой, сложным эфиром, альдегидом, гидратом альдегида, ацеталем, гидроксильной группой, защищенный гидроксильной группой, карбонатом, алкенилом, акрилатом, метакрилатом, акриламидом, замещенным или незамещенным тиолом, галогеном, замещенным или незамещенным амином, защищенным амином, гидразидом, защищенным гидразидом, сукцинимидилом, изоцианатом, изотиоцианатом, дитиопиридином, винилпиридином, йодацетамидом, эпоксидом, гидроксисукцинимидилом, азолом, малеимидом, сульфеном, аллилом, винилсульфеном, трезилом, сульфо-N-сукцинимидилом, дионом, мезилом, тозилем или глиоксалем. В конкретных вариантах R является гидратом альдегида.

Конкретные примеры R в литературе включают N-сукцинимидилкарбонат (см., например, патенты США № 5281698, 5468478), амин (см., например, Buckmann et al. *Makromol. Chem.* 182: 1379 (1981), Zaplisky et al. *Eur. Polym. J.* 19: 1177 (1983)), гидразид (см., например, Andresz et al. *Makromol. Chem.* 179: 301 (1978)), сукцинимидилпропионат и сукцинимидилбутаноат (см., например, Olson et al. в *Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications*, pp. 170-181, Harris and Zaplisky Eds., ACS, Washington, DC, 1997; см. также патент США № 5672662), сукцинимидилсукцинат (см., например, Abuchowski et al. *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 175 (1984) и Joppich et al. *Macromol. Chem.* 180: 1381 (1979)), сложный сукцинимидиловый эфир (см., например, патент США № 4670417), карбонат бензотриазола (см., например, патент США № 5650234), глицидиловый эфир (см., например, Pitha et al. *Eur. J. Biochem.* 94: 11 (1979), Elling et al., *Biotech. Appl. Biochem.* 13: 354 (1991)), оксикарбонилимидазол (см., например, Beauchamp, et al., *Anal. Biochem.* 131: 25 (1983), Tondelli et al. *J. Controlled Release* 1: 251 (1985)), паранитрофенилкарбонат (см., например, Veronese, et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 11: 141 (1985); и Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotech.*, 27: 45-10 (1991)), альдегид (см., например, Harris et al. *J. Polym. Sci. Chem. Ed.* 22: 341 (1984), патент США № 5824784, патент США 5252714), малеимид (см., например, Goodson et al. *Bio/Technology* 8: 343 (1990), Romani et al. в *Chemistry of Peptides and Proteins* 2: 29 (1984) и Kogan, *Synthetic Comm.* 22: 2417 (1992)), ортопиридилдисульфид (см., например, Woghiren, et al. *Bioconj. Chem.* 4: 314 (1993)), акрилол (см., например, Sawhney 15 et al., *Macromolecules*, 26: 581 (1993)), винилсульфон (см., например, патент США № 5900461). Кроме того, две молекулы полимера согласно данному изобретению также могут быть связаны с аминокислотой лизином с образованием дизамещенного лизина, который затем можно дополнительно активировать N-гидроксисукцинимидом с образованием активного остатка N-сукцинимидила (см., например, патент США № 5932462).

Термины «функциональная группа», «активный остаток», «активная группа», «активирующая группа», «активирующий остаток», «реакционноспособный участок», «химически активная группа» и «химически реакционноспособный остаток» используют в данной области и в данном описании для указания отдельных, определяемых частей и элементов молекулы. Термины до некоторой степени являются синонимами в области химии и используются в данном описании для того, чтобы указать части молекул, обладающие характерной химической активностью, и которые обычно химически активны по отношению к другим молекулам. Подразумевается, что термин «активный» при использовании в связи с функциональными группами включает те функциональные группы, которые легко взаимодействуют с электрофильными или нуклеофильными группами других молекул, в отличие от тех групп, которые требуют

сильных катализаторов или в значительно степени трудно осуществимых условий реакций для взаимодействия. Например, как может быть понятно в данной области, термин «активный сложный эфир» может включать такие сложные эфиры, которые легко взаимодействуют с нуклеофильными группами, такими как амины. Как правило, активный сложный эфир будет взаимодействовать с амином в водной среде в течение минут, тогда как некоторые сложные эфиры, такие как сложные метиловый или этиловый эфиры, требуют сильного катализатора для того, чтобы взаимодействовать с нуклеофильной группой.

В соединениях согласно изобретению, которые определены выше, функциональная группа R становится связывающим остатком, R*, после того, как она прореагировала с биологически активной молекулой с образованием связывания или связи между активированным соединением полиалкиленгликоля (PGC) и биологически активным соединением. Таким образом, B является биологически активным соединением после конъюгации с PGC, а R* является остатком, образованным в результате взаимодействия R на активированном PGC с одной или несколькими химически активными функциональными группами на биологически активном соединении B, так что в результате возникает одна ковалентная связь между PGC и биологически активным соединением. В предпочтительном варианте, R* является остатком, образованным в результате взаимодействия R на активированном PGC с одной химически активной функциональной группой на биологически активном соединении, так что в результате происходит ковалентное связывание между активированным соединением полиалкиленгликоля (PGC) и биологически активным соединением.

Присутствие PGC предпочтительно не оказывает неблагоприятного воздействия на биологически активное соединение или его предшественник (B). Кроме того, B либо естественно имеет функциональную группу, которая способна взаимодействовать и образовать связь с активированным PGC, либо модифицировано так, чтобы оно содержало такую реакционноспособную группу.

В используемом в данном описании смысле предшественник B является неактивной или менее активной формой B, которая превращается в активную или более активную форму, соответственно, при контактировании с физиологическими условиями, например, при введении субъекту. Такие изменения могут быть конформационными или структурными изменениями, включая, но не ограничиваясь указанным, превращение защищенной формы в незащищенную форму B. В используемом в данном описании смысле такое изменение не включает высвобождение конъюгированных PGC согласно данному изобретению.

Как подразумевается в данной области, термин «защищенный» относится к присутствию защитной группы или остатка, который препятствует взаимодействию химически активной функциональной группы при определенных условиях реакции. Защитная группа будет варьировать в зависимости от типа защищаемой химически активной группы. Например, если химически активной группой является амин или гидразид, защитная группа может быть выбрана из группы трет-бутилоксикарбонила (t-Boc) и 9-флуоренилметоксикарбонила (Fmoc). Если химически активной группой является тиол, защитной группой может быть ортопиридилдисульфид. Если химически активной группой является карбоновая кислота, такая как бутановая или пропионовая кислота, или гидроксильная группа, защитной группой может быть бензил или алкильная группа, такая как метил или этил. Другие защитные группы, известные в данной области, также могут быть использованы в изобретении.

Термины «связывающий остаток», «связывание» или «линкер» в данном описании используются по отношению к остаткам или связям, которые образуются в результате химической реакции и, как правило, являются ковалентными связями. Таким образом, связывание, представленное связью R*-B в указанных выше формулах, возникает в результате реакции между активированным остатком R в PGC с биологически активным соединением, т.е. B'. R* является связывающим остатком, образованным из R при взаимодействии с B', и B является биологически активным соединением, конъюгированным с PGC в результате взаимодействия функциональной группы в B' с R.

В используемом в данном описании смысле термин «биологически активное соединение» относится к таким соединениям, которые демонстрируют один или несколько биологических ответов или действий при введении субъекту и содержат химически активные остатки, которые способны взаимодействовать и конъюгировать по меньшей мере с одним активированным PGC согласно изобретению. Термин «биологически активная молекула», «биологически активный остаток» или «биологически активное средство» при использовании в данном описании означает любое вещество, которое может влиять на любые физические или биохимические свойства любого субъекта, включая, но не ограничивая указанным, вирусы, бактерии, грибы, растения, животных и человека. В частности, в используемом в данном описании смысле биологически активные молекулы включают любое вещество, предназначенное для диагностики, облегчения, лечения или профилактики заболевания человека или других животных или для улучшения иным образом физического или психического здоровья людей и животных.

Примеры биологически активных молекул включают, но не ограничены указанным, пептиды, аналоги пептидов, белки, ферменты, малые молекулы, красители, липиды, нуклеозиды, олигонуклеотиды, аналоги олигонуклеотидов, сахара, олигосахариды, клетки, вирусы, липосомы, микрочастицы, поверхности и мицеллы.

Классы биологически активных средств, которые подходят для применения в случае данного изо-

бретения, включают, но не ограничены указанным, хемокины, лимфокины, антитела, растворимые рецепторы, противоопухолевые средства, седативные средства, гормоны, факторы роста, антибиотики, фунгициды, фунгистатические средства, противовирусные средства, стероидные средства, противомикробные средства, гермицидные средства, антипиретики, антидиабетические средства, бронходилататоры, антидиарейные средства, средства расширения коронарных сосудов, гликозиды, спазмолитики, противогипертонические средства, антидепрессанты, успокоительные средства, другие психотерапевтические средства, кортикостероиды, анальгетики, контрацептивы, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства, средства, понижающие уровень глюкозы в крови, средства, понижающие уровень холестерина, противосудорожные средства, другие противоэпилептические средства, иммуномодуляторы, антихолинергические средства, симпатолитики, симпатомиметики, сосудорасширяющие средства, антикоагулянты, противоаритмические средства, простагландины, имеющие различные фармакологические активности, диуретики, вспомогательные средства для сна, антигистаминные средства, противоопухолевые средства, онколитические средства, антиандрогены, противомаларийные средства, противолепрозные средства и различные другие типы лекарственных средств. См. Goodman and Gilman's The Basis of Therapeutics (Ninth Edition, Pergamon Press, Inc., USA, 1996) и The Merck Index (Thirteenth Edition, Merck and Co., Inc., USA, 2001), каждая из которых включена в данное описание в виде ссылки.

Биологически активные соединения включают любое соединение, которое демонстрирует биологический ответ в своей имеющейся форме, или любое соединение, которое демонстрирует биологический ответ в результате химического превращения его структуры из его имеющейся формы. Например, биологически активные соединения будут включать любое соединение, которое содержит защитную группу, которая при отщеплении приводит в результате к соединению, которое вызывает биологический ответ. Такое отщепление может быть, например, результатом взаимодействия соединения *in vivo* с эндогенными ферментами или реакции соединения перед введением, включая его взаимодействие с активированными PGC согласно данному изобретению. В качестве следующего примера биологически активные соединения также будут включать любое соединение, которое подвергается стереопревращению *in vivo* или *ex vivo* с образованием соединения, которое вызывает биологический ответ или действие.

Биологически активные соединения обычно содержат несколько химически активных участков, в которых возможно ковалентное связывание активированного PGC. Например, аминогруппы могут подвергаться ацилированию, сульфгидрильные группы могут подвергаться реакциям присоединения и алкилированию, карбонильные и карбоксильные группы могут подвергаться ацилированию, и альдегидные и гидроксильные группы могут подвергаться аминированию или восстановительному аминированию. Одну или несколько из указанных реакций можно использовать при получении модифицированных полиалкиленгликолем биологически активных соединений согласно изобретению. Кроме того, биологически активные соединения можно модифицировать с образованием реакционноспособных остатков в соединении, которые облегчают такие реакции и получаемую в результате конъюгацию с активированным PGC.

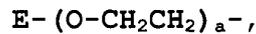
Специалистам в данной области будут известны многочисленные имеющиеся механизмы реакций для облегчения конъюгации активированного PGC с биологически активным соединением. Например, в том случае, когда активирующим остатком R является группа гидразида, она может быть ковалентно связана с сульфгидрилом, остатками сахара и карбонильным остатком в биологически активных соединениях (после того, как указанные остатки подвергаются окислению с получением альдегидов). В реакции активирующих остатков гидразида (R) с альдегидами в биологически активных соединениях (B') создается гидразонная связь (R*-B). В том случае, когда R является малеимидной группой, она может взаимодействовать с сульфгидрильной группой с образованием стабильной тиоэфирной связи. Если сульфгидрильные группы не присутствуют в биологически активном соединении, то их можно создать посредством восстановления дисульфида или посредством тиолирования 2-иминотиолоном или SATA. Когда R является сложным имидоэфиром, он может взаимодействовать с первичными аминами в B' с образованием имидоамидной связи. Конъюгация сложного имидоэфира обычно осуществляется в диапазоне pH 8,5-9,0. При связывании активированных PGC с биологически активными белками сложные имидоэфиры обеспечивают преимущество по сравнению с другими R-группами, так как они не влияют на общий заряд белка. Они несут положительный заряд при физиологическом pH, как и первичные амины, которые они заменяют. Реакции со сложными имидоэфирами проводят в диапазоне от 0°C до комнатной температуры (например, при 4°C) или при повышенных температурах в безводных условиях. Когда R является сложным NHS-эфиром, его главной мишенью являются первичные амины. Доступные α-аминогруппы, например группы, присутствующие на N-концах пептидов и белков, взаимодействуют со сложными NHS-эфирами с образованием ковалентной амидной связи.

В некоторых вариантах R*-B является гидролитически стабильной связью. Гидролитически стабильная связь означает, что связь в значительной степени стабильна в воде и не взаимодействует с водой при используемых значениях pH, например, связь является стабильной при физиологических условиях в течение длительного периода времени, возможно даже бесконечно. В других вариантах R*-B является гидролитически нестабильной или деградируемой связью. Гидролитически нестабильная связь означает,

что связь разрушается в воде или в водных растворах, включая, например, кровь. Энзиматически нестабильные или деградируемые связи также означают, что связь может быть разрушена одним или несколькими ферментами.

Как известно в данной области, полиалкилен и родственные полимеры могут содержать деградируемые связи в основной цепи полимера или линкерную группу между основной цепью полимера и одной или несколькими концевыми функциональными группами молекулы PGC. Например, сложноэфирные связи, образованные в результате взаимодействия, например, карбоновых кислот PGC или активированных карбоновых кислот PGC со спиртовыми группами в биологически активном соединении, обычно гидролизуются при физиологических условиях с высвобождением средства. Другие гидролитически деградируемые связи включают карбонатные связи; иминные связи, возникающие в результате взаимодействия амина и альдегида (см., например, Ouchi et al., *Polymer Preprints*, 38 (1): 582-3 (1997)); связи сложного фосфатного эфира, образованные в результате взаимодействия спирта с фосфатной группой; ацетальные связи, которые являются продуктом реакции альдегида и спирта; связи сложных ортоэфиров, которые являются продуктом реакции формиата и спирта; пептидные связи, образованные аминогруппой, например, на конце PGC и карбоксильной группой пептида; и олигонуклеотидные связи, образованные фосфорамидитной группой, например, на конце полимера и 5'-гидроксильной группой олигонуклеотида.

Полиалкиленгликоль P может быть полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



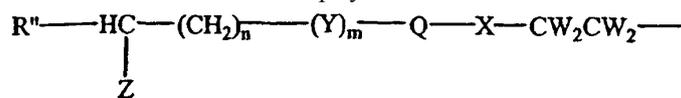
где a является целым числом от 4 до 10000 и E является водородом или C₁-C₂₀ алкильной группой с прямой или разветвленной цепью, регистрируемой меткой или остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы I и биологически активным соединением или его предшественником.

Таким образом, когда E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы I и биологически активным соединением или его предшественником, E может быть карбоновой кислотой, сложным эфиром, альдегидом, гидратом альдегида, ацеталем, гидроксильной группой, защищенной гидроксильной группой, карбонатом, алкенилом, акрилатом, метакрилатом, акриламидом, замещенным или незамещенным тиолом, галогеном, замещенным или незамещенным амином, защищенным амином, гидразидом, защищенным гидразидом, сукцинимидилом, изоцианатом, изотиоцианатом, дитиопиридином, винилпиридином, йодацетамидом, эпоксидом, гидроксисукцинимидилом, азолом, малеимидом, сульфеном, аллилом, винилсульфеном, трезилом, сульфо-N-сукцинимидилом, дионом, мезилом, тозиллом или глиоксалем. Должно быть понятно, что E должен быть совместим с R, так чтобы не происходила реакция между E и R.

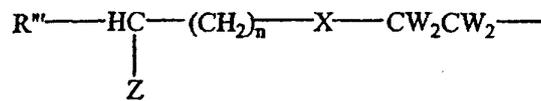
Под «регистрируемой меткой» имеется в виду любая метка, поддающаяся регистрации. Неограничивающие примеры включают радиоактивные изотопы, флуоресцентные остатки, фосфоресцентные остатки, хемилуминесцентные остатки и квантовые метки. Другие регистрируемые метки включают биотин, цистеин, гистидин, гемагглютинин, тус- или flag-метки.

В некоторых вариантах E имеет структуру согласно формуле III или формуле IV

Формула III



Формула IV



Каждый Q, X, Y, Z, m и n имеют значения, определенные выше, и каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил.

В данном классе соединений R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником; и R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

R'' и R''' могут быть карбоновой кислотой, сложным эфиром, альдегидом, гидратом альдегида, ацеталем, гидроксильной группой, защищенной гидроксильной группой, карбонатом, алкенилом, акрилатом, метакрилатом, акриламидом, замещенным или незамещенным тиолом, галогеном, замещенным или незамещенным амином, защищенным амином, гидразидом, защищенным гидразидом, сукцинимидилом, изоцианатом, изотиоцианатом, дитиопиридином, винилпиридином, йодацетамидом, эпоксидом, гидроксисукцинимидилом, азолом, малеимидом, сульфеном, аллилом, винилсульфеном, трезилом, сульфо-N-сукцинимидилом, дионом, мезилом, тозиллом или глиоксалем. Должно быть понятно, что R'' и R''' должны быть совместимы с R, так чтобы не происходила реакция с R.

В используемом в данном описании смысле R" и R'" при конъюгации с биологически активным соединением или его предшественником образуют связывающие остатки, которые определены выше. Таким образом, R** является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R"-группы или R'"-группы на активированном PGC с реакционноспособной функциональной группой на биологически активном соединении, так что происходит ковалентное связывание между PGC и биологически активным соединением. R и R" или R'" могут представлять собой одни и те же остатки, и биологически активные соединения, связываемые с каждым из них, могут быть одинаковыми или разными.

В используемом в данном описании смысле термин «алкил» относится к радикалу насыщенных алифатических групп, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, замещенные алкилом циклоалкильные группы и замещенные циклоалкилом алкильные группы. В предпочтительных вариантах алкил с прямой цепью или разветвленной цепью содержит 30 или меньше атомов углерода в своей основной цепи (например, C₁-C₃₀ в случае прямой цепи, C₃-C₃₀ в случае разветвленной цепи) и более предпочтительно 20 или меньше. Подобным образом, предпочтительные циклоалкилы содержат 3-10 атомов углерода в своей циклической структуре и более предпочтительно содержат 5, 6 или 7 атомов углерода в своей циклической структуре.

Кроме того, подразумевается, что термин «алкил» (или «низший алкил») включает как «незамещенные алкилы», так и «замещенные алкилы», последние из которых относятся к алкильным остаткам, содержащим заместители, замещающие водород у одного или нескольких атомов углерода основной углеводородной цепи. Такие заместители могут, например, включать галоген, гидроксил, карбонил (такой как карбоксил, алкоксикарбонил, формил или ацил), тиокарбонил (такой как сложный тиоэфир, тиоацетат или тиоформиат), алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппу, амидогруппу, амидин, имин, цианогруппу, нитрогруппу, азидогруппу, сульфгидрил, алкилтиогруппу, сульфат, сульфонат, сульфоамид, сульфоамидогруппу, сульфонил, гетероцикл, алкил или ароматический или гетероароматический остаток. Специалистам в данной области будет понятно, что остатки, введенные в качестве заместителей углеводородной цепи, сами по себе могут быть замещены, если это уместно. Например, заместители замещенного алкила могут включать замещенные и незамещенные формы аминогруппы, азидогруппы, иминогруппы, амидогруппы, фосфорил (включая фосфонат и фосфинат), сульфонила (включая сульфат, сульфоамидогруппу, сульфоамид и сульфонат) и силильной группы, а также простые эфиры, алкилтиогруппы, карбонилы (включая кетоны, альдегиды, карбоксилазы и сложные эфиры), -CF₃, -CN и тому подобное. Циклоалкилы, кроме того, могут быть замещены алкилами, алкенилами, алкоксигруппами, алкилтиогруппами, аминоалкилами, замещенными карбонилем алкилами, -CF₃, -CN и тому подобным.

Термин «аралкил» в используемом в данном описании смысле относится к алкильной группе, замещенной арильной группой (например, ароматической или гетероароматической группой). Примеры аралкильных групп включают, но не ограничены указанным, бензил и в более общем виде (CH₂)_nPh, где Ph означает фенил или замещенный фенил и n равно 1, 2 или 3.

Термины «алкенил» и «алкинил» относятся к ненасыщенным алифатическим группам аналогичным по длине и возможно к замещению описанным выше алкилам, но которые содержат по меньшей мере одну двойную или тройную связь, соответственно.

Если количество атомов углерода не оговорено особо, «низший алкил» в используемом в данном описании смысле означает алкильную группу, которая определена выше, но содержащую от одного до десяти атомов углерода, более предпочтительно от одного до шести атомов углерода в своей структуре основной цепи. Подобным образом «низший алкенил» и «низший алкинил» имеют сходные длины цепей. Предпочтительными алкильными группами являются низшие алкилы. В предпочтительных вариантах заместитель, указанный в данном описании как алкил, является низшим алкилом.

Термин «арил» в используемом в данном описании смысле включает 5-, 6- и 7-членные однокольцевые ароматические группы, которые могут содержать от нуля до четырех гетероатомов, например, бензол, пиррол, фуран, тиофен, имидазол, оксазол, тиазол, триазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и тому подобное. Указанные арильные группы, содержащие гетероатомы в кольцевой структуре, также могут быть названы «арильными гетероциклами» или «гетероароматическими соединениями». Ароматический цикл может быть замещен в одном или нескольких положениях цикла такими заместителями, которые описаны выше, например, галогеном, азидом, алкилом, аралкилом, алкенилом, алкинилом, циклоалкилом, гидроксилом, алкоксилом, аминогруппой, нитрогруппой, сульфгидрилом, иминогруппой, амидогруппой, фосфонатом, фосфинатом, карбонилем, карбоксилем, силилом, простым эфиром, алкилтиогруппой, сульфонилем, сульфоамидогруппой, кетоном, альдегидом, сложным эфиром, гетероциклилом, ароматическими или гетероароматическими остатками, -CF₃, -CN или тому подобным. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, содержащие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец (кольца являются «конденсированными кольцами»), в которых по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут быть циклоалкилами, циклоалкенилами, циклоалкинилами, арилами и/или гетероциклами.

Термины «орто», «мета» и «пара» применяются по отношению к 1,2-, 1,3- и 1,4-дизамещенным бен-

золам, соответственно. Например, названия 1,2-диметилбензол и орто-диметилбензол являются синонимами.

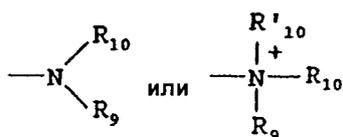
Термины «гетероцикл» или «гетероциклическая группа» относятся к 3-10-членным кольцевым структурам, более предпочтительно 3-7-членным кольцам, циклические структуры которых содержат от 1 до 4 гетероатомов. Гетероциклы также могут быть полициклами. Гетероциклические группы включают, например, тиофен, тиантрен, фуран, пиран, изобензофуран, хромен, ксантен, феноксатиин, пиррол, имидазол, пиразол, изотиазол, изоксазол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, пиримидин, фенантролин, феназин, фенарсазин, фенотиазин, фуразан, феноксазин, пирролидин, оксолан, тиолан, оксазол, пиперидин, пиперазин, морфолин, лактоны, лактамы, такие как азетидиноны и пирролидиноны, сультамы, сультоны и т.п. Гетероциклическое кольцо может быть замещено в одном или нескольких положениях заместителями, которые описаны выше, такие, например, как галоген, алкил, аралкил, алкенил, алкинил, циклоалкил, гидроксил, аминогруппа, нитрогруппа, сульфгидрил, иминогруппа, амидогруппа, фосфонат, фосфинат, карбонил, карбоксил, силил, простой эфир, алкилтиогруппа, сульфонил, кетон, альдегид, сложный эфир, гетероцикл, ароматический или гетероароматический остаток, $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ или тому подобное.

Термин «карбоцикл» в используемом в данном описании смысле относится к ароматическому или неароматическому кольцу, в котором каждый атом кольца является атомом углерода.

Гетероциклы и карбоциклы включают конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры.

В используемом в данном описании смысле термин «нитрогруппа» означает $-\text{NO}_2$; термин «галоген» означает $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ или $-\text{I}$; термин «сульфгидрил» означает $-\text{SH}$; термин «гидроксил» означает $-\text{OH}$ и термин «сульфонил» означает $-\text{SO}_2-$.

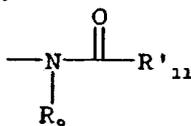
Термины «амин» и «аминогруппа» являются общепризнанными в данной области и относятся как к незамещенным, так и замещенным аминам, например, остатку, который может быть представлен общей формулой



в которой R_9 , R_{10} и R'_{10} каждый независимо означает водород, алкил, алкенил, $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_8$, или R_9 и R_{10} вместе с атомом N, с которым они связаны, достраивают гетероцикл, имеющий от 4 до 8 атомов в кольцевой структуре; R_8 означает арил, циклоалкил, циклоалкенил, гетероцикл или полицикл; и m равно 0 или является целым числом в пределах от 1 до 8.

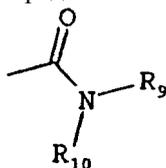
Термин «алкиламин» в используемом в данном описании смысле означает аминогруппу, которая определена выше, имеющую связанный с ней замещенный или незамещенный алкил, т.е. по меньшей мере один из R_9 и R_{10} является алкильной группой.

Термин «ациламиногруппа» является общепризнанным в данной области и относится к остатку, который может быть представлен общей формулой



где R_9 имеет значение, определенное выше и R'_{11} означает водород, алкил, алкенил или $-(\text{CH}_2)_m-\text{R}_8$, где m и R_8 имеют значения, определенные выше.

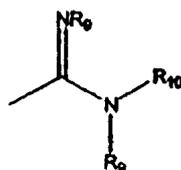
Термин «амидогруппа» является общепризнанным в данной области как аминзамещенный карбонил и включает остаток, который может быть представлен общей формулой



где R_9 , R_{10} имеют значения, определенные выше.

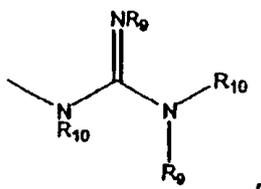
Предпочтительные варианты амида не будут включать имиды, которые могут быть нестабильными.

Термин «амидин» является общепризнанным в данной области как группа, которая может быть представлена общей формулой



где R_9 , R_{10} имеют значения, определенные выше.

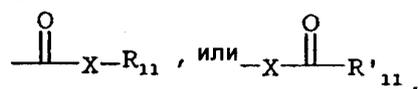
Термин «гуанидин» является общепризнанным в данной области как группа, которая может быть представлена общей формулой



где R_9 , R_{10} имеют значения, определенные выше.

Термин «алкилтиогруппа» относится к алкильной группе, которая определена выше, имеющей связанный с ней радикал серы. В предпочтительных вариантах «алкилтиоостаток» представлен одним из следующих остатков: -S-алкил, -S-алкенил, -S-алкинил и -S-(CH₂)_m-R₈, где m и R₈ определены выше. Типичные алкилтиогруппы включают метилтиогруппу, этилтиогруппу и тому подобное.

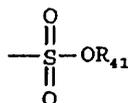
Термин «карбонил» является общепризнанным в данной области и включает остатки, которые могут быть представлены общей формулой



где X является связью или означает кислород или серу, и R₁₁ означает водород, алкил, алкенил, -(CH₂)_m-R₈ или фармацевтически приемлемую соль, R'₁₁ означает водород, алкил, алкенил или -(CH₂)_m-R₈, где m и R₈ имеют значения, определенные выше. В том случае, когда X является кислородом и R₁₁ или R'₁₁ не являются водородом, формула представляет «сложный эфир». В том случае, когда X является кислородом и R₁₁ имеет значение, определенное выше, остаток в данном описании называют карбоксильной группой, и, в частности, когда R₁₁ является водородом, формула представляет «карбоновую кислоту». Когда X является кислородом и R'₁₁ является водородом, формула означает «формиат». В общем, когда атом кислорода в указанной выше формуле заменен серой, формула означает «тиолкарбонильную» группу. Когда X является серой и R₁₁ или R'₁₁ не является водородом, формула означает «сложный тиоэфир». Когда X является серой и R₁₁ является водородом, формула означает «тиокарбоновую кислоту». Когда X является серой и R'₁₁ является водородом, формула означает «тиоформиат». С другой стороны, когда X является связью и R₁₁ не является водородом, указанная выше формула означает «кетонную» группу. Когда X является связью и R₁₁ является водородом, указанная выше формула означает «альдегидную» группу.

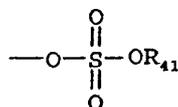
Термины «алкоксил» или «алкоксигруппа» в используемом в данном описании смысле относятся к алкильной группе, которая определена выше, имеющей связанный с ней кислородный радикал. Типичные алкоксильные группы включают метокси-, этокси-, пропилокси-, трет-бутоксигруппу и тому подобное. «Простой эфир» представляет собой два углеводорода, ковалентно связанных кислородом. Соответственно, заместитель алкила, который превращает данный алкил в простой эфир, является или имеет сходство с алкоксилом, таким, который может быть представлен одной из групп: -O-алкил, -O-алкенил, -O-алкинил, -O-(CH₂)_m-R₈, где m и R₈ имеют значения, описанные выше.

Термин «сульфонат» является общепризнанным в данной области и включает остаток, который может быть представлен общей формулой

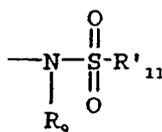


в которой R₄₁ является электронной парой, водородом, алкилом, циклоалкилом или арилом.

Термин «сульфат» является общепризнанным в данной области и включает остаток, который может быть представлен общей формулой

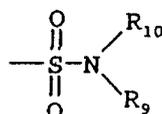


в которой R₄₁ имеет значение, определенное выше. Термин «сульфонамидогруппа» является общепризнанным в данной области и включает остаток, который может быть представлен общей формулой



в которой R₉ и R'₁₁ имеют значения, определенные выше.

Термин «сульфоамил» является общепризнанным в данной области и включает остаток, который может быть представлен общей формулой



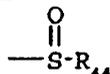
в которой R₉ и R₁₀ имеют значения, определенные выше.

Термин «сульфонил» в используемом в данном описании смысле относится к остатку, который может быть представлен общей формулой



в которой R₄₄ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила, арила или гетероарила.

Термин «сульфоксидогруппа» в используемом в данном описании смысле относится к остатку, который может быть представлен общей формулой



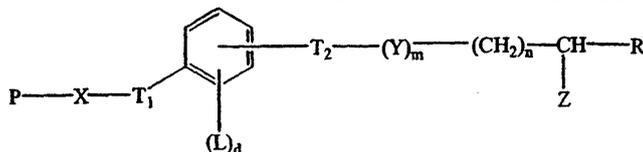
в которой R₄₄ выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, гетероциклила, аралкила или арила.

Будет понятно, что «замещение» или «замещенный» включает подразумеваемое условие, что такое замещение находится в соответствии с допустимой валентностью замещаемого атома и заместителя и что результатом замещения является стабильное соединение, например, соединение, которое спонтанно не подвергается такому превращению, как при перестановке, циклизации, элиминировании и т.д.

Предполагается, что используемый в данном описании термин «замещенный» включает все допустимые заместители органических соединений. В широком аспекте допустимые заместители включают ациклические и циклические, разветвленные и неразветвленные, карбоциклические и гетероциклические, ароматические и неароматические заместители органических соединений. Иллюстративные заместители включают, например, заместители, описанные выше. Допустимых заместителей может быть один или несколько, и они могут быть одинаковыми или разными в случае соответствующих органических соединений. В целях данного изобретения гетероатомы, такие как азот, могут иметь водородные заместители и/или любые допустимые заместители органических соединений, описанные в данном изобретении, которые удовлетворяют валентностям гетероатомов. Имеется в виду, что данное изобретение ни коим образом не ограничено допустимыми заместителями органических соединений.

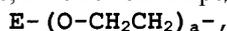
Полный список сокращений, используемых химиками-органиками, специалистами в данной области, публикуется в первом выпуске каждого тома Journal of Organic Chemistry; данный список обычно представлен в таблице, озаглавленной «Стандартный список сокращений». Сокращения, имеющиеся в указанном списке, и все сокращения, используемые химиками-органиками, специалистами в данной области, включены таким образом в виде ссылки.

В некоторых вариантах соединения согласно изобретению имеют структуру согласно формуле V



X, Y, m, n, Z и R' имеют значения, определенные выше, и R является активирующим остатком, который определен выше, подходящим для образования связи между соединением формулы V и биологически активным соединением или предшественником. В конкретных вариантах R является гидратом альдегида.

R имеет значение, определенное выше, и может быть представлен формулой II



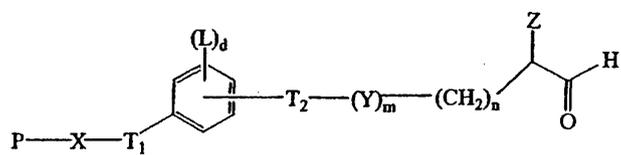
где E имеет значение, описанное выше, и в некоторых вариантах может быть представлен формулами III или IV.

T₁ и T₂ независимо отсутствуют или являются насыщенным или ненасыщенным C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенным или ненасыщен-

ным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильной группой. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силлил, простой эфир или алкилтиогруппа.

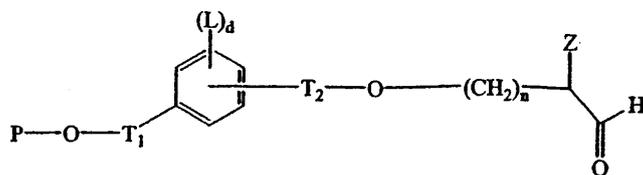
Когда d равен 0, дополнительных заместителей (L) в ароматическом цикле нет. Когда d является целым числом от 1 до 4, заместителями (L) могут быть насыщенная или ненасыщенная C_1 - C_{20} алкильная или гетероалкильная группа, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенная или незамещенная арильная или гетероарильная группа или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильная группа. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силлил, простой эфир или алкилтиогруппа.

В том случае, когда R является альдегидом, соединения относятся к соединениям, представленным формулой VI



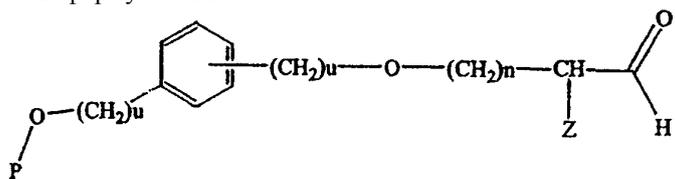
где все другие переменные имеют значения, определенные выше.

Например, когда X и Y являются кислородом, а R является альдегидом, соединения согласно изобретению представлены соединением J



где заместители T_1 и T_2 могут быть в орто-, мета- или пара-положении.

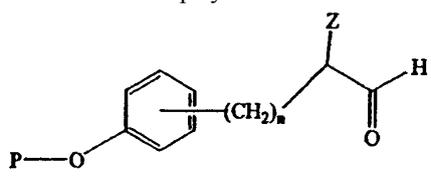
В том случае, когда заместители T_1 и T_2 являются алкильными группами с прямой цепью и d равно 0, соединения представлены формулой IX



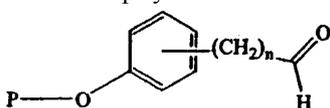
где каждый u независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5, а все другие переменные имеют значения, определенные выше. В конкретных вариантах Z является водородом или метилом.

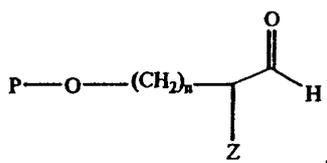
Конкретные классы соединений, относящихся к формуле IX, могут быть представлены формулами VII и VIII

Формула VII

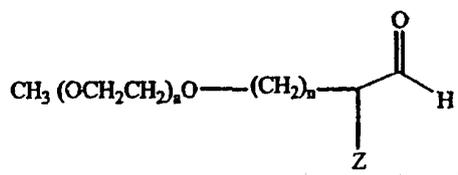


Формула VIII

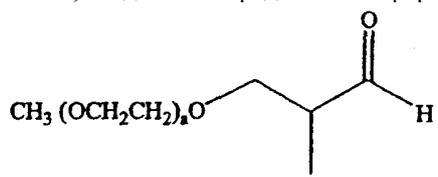




где P, Z и n имеют значения, определенные для формулы X. В том случае, когда P является mPEG, соединения описываются формулой XI.



и когда n равно 1 и Z является метилом, соединение представлено формулой XIII

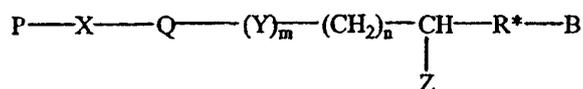


где a является целым числом от 4 до 10000.

Примеры путей синтеза для получения соединений согласно изобретению приведены в примерах ниже.

Изобретение также включает в себя композиции активированных соединений полиалкиленгликоля (PGC) согласно изобретению и одного или нескольких биологически активных соединений. Как описано выше, биологически активными соединениями являются такие соединения, которые демонстрируют биологический ответ или действие при введении субъекту. Кроме соединений согласно изобретению субъекту могут быть введены неконъюгированные биологически активные соединения. Кроме того, биологически активные соединения могут содержать химически активные группы, которые способны взаимодействовать и конъюгировать по меньшей мере с одним активированным PGC согласно изобретению.

В описании также представлены конъюгаты новых PGC с биологически активными соединениями. В одном варианте конъюгаты образуются из соединения формулы I и биологически активного соединения (B) и описываются согласно формуле XIV



Как указано выше m равно 0 или 1, так что Y присутствует или отсутствует, n равно 0 или является целым числом от 1 до 5 и X и Y независимо означают O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR'.

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу. В том случае, если заместители присутствуют, заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфоамидогруппа, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа.

Каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R* означает связывающий остаток, образованный в результате взаимодействия R с соответствующей функциональной группой на биологически активном соединении В, как описано выше. Например, R* образован в результате взаимодействия такого остатка, как функциональная группа карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксила, защищенного гидроксила, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила или глиоксаля с биологически активным соединением или его предшественником.

R является полимером полиалкиленгликоля, который определен выше, и может быть представлен формулой II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью (например, метил), регистрируемую метку или остаток, подходящий для образования связи между соединением формулы XIV и биологически активным соединением или его предшественником. Как указано выше, a является целым числом от 4 до 10000.

В том случае, когда E является регистрируемой меткой, метка может быть, например, радиоактивным изотопом, флуоресцентным остатком, фосфоресцентным остатком, хемилюминесцентным остатком или квантовой меткой.

Когда E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы XIV и биологически активным соединением или его предшественником, E может образовывать связь с другой молекулой биологически активного соединения (В), так что активированное соединение полиалкиленгликоля связано на каждом конце с молекулой одного и то же типа биологически активного соединения с образованием димера молекулы.

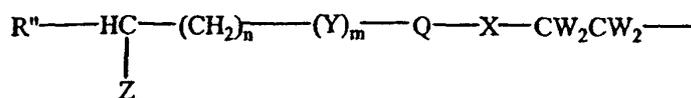
В некоторых вариантах E образует связь с другим биологически активным соединением, отличным от В, с созданием гетеродимера биологически активных соединений или их предшественников.

В других вариантах E образует дополнительную связь с биологически активным соединением В так что как E, так и R связаны посредством разных функциональных групп одной и той же молекулы биологически активного соединения или его предшественника.

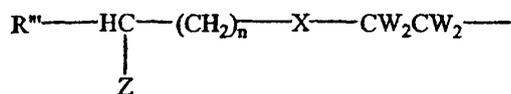
В том случае, когда E способен образовывать связь с биологически активной молекулой или ее предшественником, E может быть таким же как R или отличным от R и выбран из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

Когда E способен образовывать связь с биологически активной молекулой или ее предшественником, E может иметь структуру согласно формуле III или формуле IV

Формула III



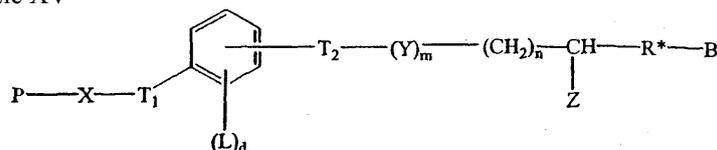
Формула IV



где каждый Q, X, Y, Z, m и n независимо имеют значения, которые определены выше, каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил, R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником, и R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

R'' и R''' независимо выбраны из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

Когда Q в формуле XIV является замещенным или незамещенным алкарилом конъюгат образуется из активированного полиалкиленгликоля формулы V и биологически активной молекулы (B) и описывается согласно формуле XV



где T_1 и T_2 независимо отсутствуют или являются насыщенной или ненасыщенной C_1 - C_{20} алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильной группой. В том случае, если присутствуют заместители, заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа. В некоторых вариантах T_1 и T_2 в случае присутствия являются насыщенной или ненасыщенной C_1 - C_{20} алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью.

d равно 0 (например, в ароматическом цикле нет заместителей L) или является целым числом от 1 до 4. Каждый L в случае присутствия означает насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа.

Все другие переменные имеют значения, описанные выше, включая P, который означает полимер полиалкиленгликоля и может быть представлен формулой II



где E означает водород, C_1 - C_{20} алкильную группу с прямой или разветвленной цепью (например, метил), регистрируемую метку или остаток, подходящий для образования связи между соединением формулы XV и биологически активным соединением или его предшественником. Как указано выше, a является целым числом от 4 до 10000.

В том случае, когда E является регистрируемой меткой, метка может быть, например, радиоактивным изотопом, флуоресцентным остатком, фосфоресцентным остатком, хемилюминесцентным остатком или квантовой меткой.

Когда E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы XV и биологически активным соединением B, E может образовывать связь с другой молекулой биологически активного соединения (B), так что активированное соединение полиалкиленгликоля связано на каждом конце с молекулой одного и того же типа биологически активного соединения с образованием димера молекулы.

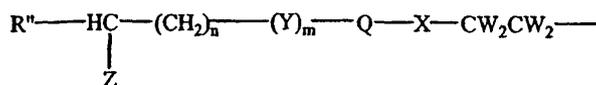
В некоторых вариантах E образует связь с другим биологически активным соединением, отличным от B, с созданием гетеродимера биологически активных соединений или их предшественников.

В других вариантах E образует дополнительную связь с биологически активным соединением B так что как E, так и R связаны посредством разных функциональных групп одной и той же молекулы биологически активного соединения или его предшественника.

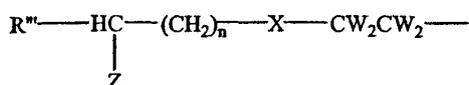
В том случае, когда E способен образовывать связь с биологически активной молекулой или ее предшественником, E может быть таким же как R или отличным от R и выбран из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

Когда E может образовывать связь с биологически активным соединением или его предшественником, E может быть представлен формулой III или формулой IV

Формула III



Формула IV

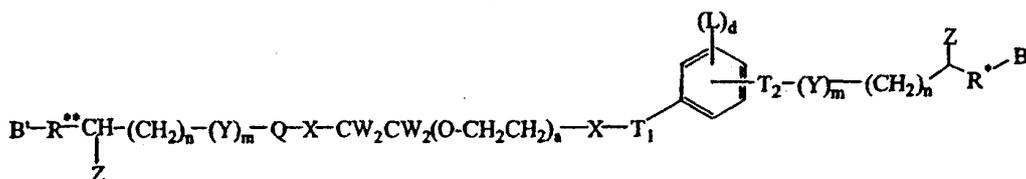


где каждый Q, X, Y, Z, m и n независимо имеют значения, которые определены выше, каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил, R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником, и R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

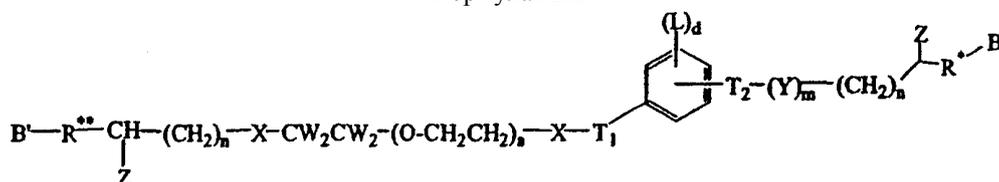
R'' и R''' независимо выбраны из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В случае связывания на обоих концах с биологически активным соединением или его предшественником данные бифункциональные молекулы могут быть представлены согласно формуле XX или формуле XXI

Формула XX



Формула XXI

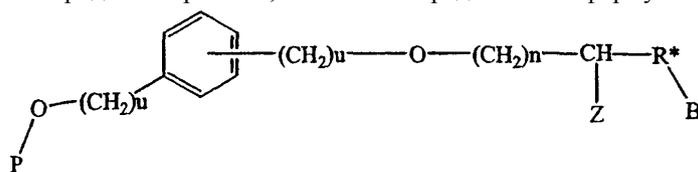


где каждый X и Y, T₁ и T₂, R' и Z, L, Q, m, n, a и n имеют значения, описанные выше, и каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил. R* и R** независимо являются связывающими остатками, образованными в результате взаимодействия R и R'' с биологически активным соединением или его предшественником, и каждый B и B' является биологически активным соединением или его предшественником после конъюгации с R и R'', соответственно.

В некоторых вариантах B и B' представляют собой один и тот же тип биологически активного соединения. В других вариантах B и B' являются разными биологически активными соединениями. Кроме того, в других вариантах B и B' являются одной и той же биологически активной молекулой. В дополнительных вариантах R* и R** являются одинаковыми. В других вариантах R* и R** являются разными. Например, в некоторых вариантах E может образовывать связь с другой молекулой биологически активного соединения (B=B'), так что активированное PGC на каждом конце связано с молекулой одного и того же типа биологически активного соединения с образованием димера молекулы. В некоторых вариантах E образует связь с другим биологически активным соединением, отличным от B (B не является B'), с образованием гетеродимера биологически активных соединений или их предшественников. В других вариантах E образует дополнительную связь с биологически активным соединением B, так что и E (посредством R'' или R'''), и R связаны посредством разных функциональных групп одной и той же молекулы биологически активного соединения или его предшественника.

В некоторых вариантах R* или R** является метиленовой группой и B или B' является биологически активной молекулой, содержащей аминогруппу, при этом метиленовая группа образует связь с аминогруппой на B. Например, амин может быть аминоконцом пептида, амином боковой цепи аминокислоты в пептиде или амином гликозилирующего заместителя гликозилированного пептида. В некоторых вариантах пептид является интерфероном, таким как интерферон-бета, например, интерферон-бета-1a. В некоторых вариантах указанный тип связи образуется в результате реакции восстановительного алкилирования.

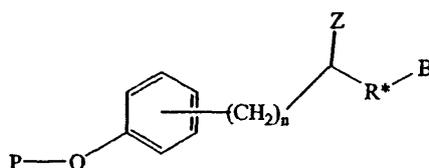
В том случае, когда заместители T_1 и T_2 формулы XV являются алкильными группами с прямой цепью, X и Y являются кислородом и d равно 0, конъюгаты представлены формулой XIX



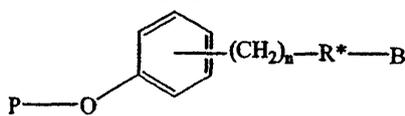
где каждый u независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5, и все другие переменные имеют значения, определенные выше. В конкретных вариантах Z является водородом или метилом.

Конкретные классы соединений, относящихся к формуле XV, могут быть представлены формулами XVII и XVIII и образованы в результате взаимодействия соединений формул VII и VIII, соответственно, с биологически активным соединением или его предшественником

Формула XVII



Формула XVIII



где n равно 0 или является целым числом от 1 до 5,

P означает полимер полиалкиленгликоля, который описан выше,

Z означает водород, насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу,

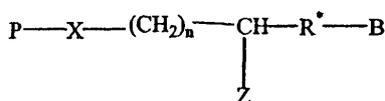
R* является связывающим остатком, который описан выше,

B является биологически активной молекулой.

Данные соединения могут быть бифункциональными или монофункциональными в зависимости от особенностей E, которые описаны выше.

В некоторых вариантах R* является метиленовой группой и B является биологически активной молекулой, содержащей аминогруппу, при этом метиленовая группа образует связь с аминогруппой на B. Например, амин может быть аминоконцом пептида, амином боковой цепи аминокислоты в пептиде или амином гликозилирующего заместителя гликозилированного пептида. В некоторых вариантах пептид является интерфероном, таким как интерферон-бета, например, интерферон-бета-1a. В некоторых вариантах указанный тип связи образуется в результате реакции восстановительного алкилирования.

Конъюгаты согласно изобретению также могут быть образованы в результате взаимодействия соединений согласно формуле X с биологически активным соединением или его предшественником с образованием конъюгатов согласно формуле XXII



где B является биологически активной молекулой, как описано выше, и n равно 0 или является целым числом от 1 до 5.

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR', в том случае, когда X является NR', R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу. В случае наличия заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфоамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аракил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силл, простой эфир и алкилтиогруппа.

Z означает насыщенную или ненасыщенную C_1 - C_{20} алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C_3 - C_8 насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или цикличе-

ский гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкирил, где алкил является C_1 - C_{20} насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкирильную группу. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силлил, простой эфир и алкилтиогруппа.

R^* означает связывающий остаток, образованный в результате взаимодействия R с соответствующей функциональной группой на биологически активном соединении B , которое описано выше. Например, R^* образуется в результате взаимодействия такого остатка, как функциональная группа карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксила, защищенного гидроксила, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила или глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

В некоторых вариантах Z является метилом и n равно 1.

P означает полимер полиалкиленгликоля, который определен выше и может быть представлен формулой II



где E означает водород, C_1 - C_{20} алкильную группу с прямой или разветвленной цепью (например, метил), регистрируемую метку или остаток, подходящий для образования связи между соединением формулы XXII и биологически активным соединением или его предшественником. Как указано выше, a является целым числом от 4 до 10000.

В том случае, когда E является регистрируемой меткой, метка может быть, например, радиоактивным изотопом, флуоресцентным остатком, фосфоресцентным остатком, хемилюминесцентным остатком или квантовой меткой.

Когда E является остатком, подходящим для образования связи с биологически активной молекулой или ее предшественником, в результате образуется бифункциональная молекула. E может образовывать связь с другой молекулой биологически активного соединения (B), так что активированное соединение полиалкиленгликоля связано на каждом конце с молекулой одного и того же типа биологически активного соединения с образованием димера молекулы.

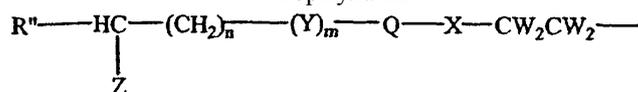
В некоторых вариантах E образует связь с другим биологически активным соединением, отличным от B , с созданием гетеродимера биологически активных соединений или их предшественников.

В других вариантах E образует дополнительную связь с биологически активным соединением B , так что как E , так и R связываются посредством разных функциональных групп одной и той же молекулы биологически активного соединения или его предшественника.

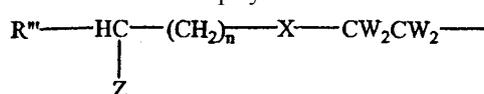
В том случае, когда E способен образовывать связь с биологически активной молекулой или ее предшественником, E может быть таким же как R или отличным от R и выбран из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В некоторых вариантах E может иметь структуру согласно формуле III или формуле IV

Формула III



Формула IV



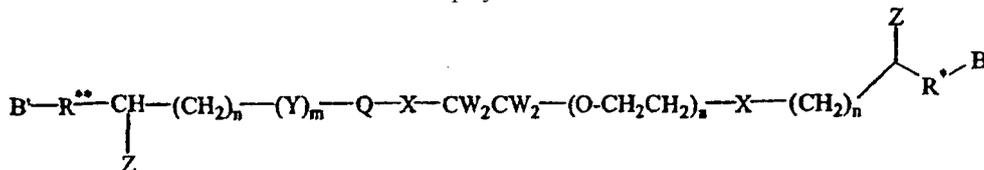
где каждый Q , X , Y , Z , m и n независимо имеют значения, которые определены выше, каждый W независимо означает водород или C_1 - C_7 алкил, R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником, и R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически ак-

тивным соединением или его предшественником.

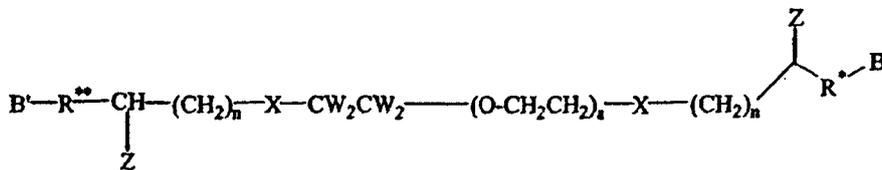
R" и R''' независимо выбраны из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винил сульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля и могут быть такими же как R или отличными от R.

В случае связывания на обоих концах с биологически активным соединением или его предшественником данные бифункциональные молекулы могут быть представлены согласно формуле XXIV или формуле XXV

Формула XXIV



Формула XXV



где каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR', и каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью.

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил (включая конденсированные бициклические и связанные мостиками бициклические кольцевые структуры), замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу. В случае присутствия заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, сульфамойл, сульфонат, силлил, простой эфир или алкилтиогруппа.

Каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил, m равно 0 или 1, а является целым числом от 4 до 10000 и каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

R* и R** независимо являются связывающими остатками, которые описаны выше, B и B' независимо являются биологически активными молекулами и могут быть одинаковыми или разными.

E (посредством R" или R''') может образовывать связь с другой молекулой биологически активного соединения (B), так что активированное соединение полиалкиленгликоля связывается на каждом конце с молекулой одного и того же типа биологически активного соединения с образованием димера молекулы.

В некоторых вариантах E (посредством R" или R''') образует связь с другим биологически активным соединением, отличным от B, с образованием гетеродимера биологически активных соединений или их предшественников.

В других вариантах E (посредством R" или R''') образует дополнительную связь с биологически активным соединением B, так что и E, и R связываются посредством разных функциональных групп одной и той же молекулы биологически активного соединения или его предшественника.

R" и R''' могут быть такими как R или отличными от R и выбраны из остатков карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

В некоторых вариантах R* или R** является метиленовой группой и B или B' является биологически активной молекулой, содержащей аминогруппу, при этом метиленовая группа образует связь с аминогруппой на B. Например, амин может быть аминоконцом пептида, амином боковой цепи аминокисло-

ты в пептиде или амином гликозилирующего заместителя гликозилированного пептида. В некоторых вариантах пептид является интерфероном, таким как интерферон-бета, например, интерферон-бета-1а. В некоторых вариантах указанный тип связи образуется в результате реакции восстановительного алкилирования.

Конъюгаты согласно изобретению могут быть получены посредством связывания биологически активного соединения с соединением полиалкиленгликоля, как описано в примерах. В некоторых вариантах связывание осуществляется посредством реакции восстановительного алкилирования.

Представляющие интерес биологически активные соединения включают любое вещество, предназначенное для диагностики, облегчения состояния, лечения или профилактики заболевания человека или других животных, или для улучшения иным образом физического или психического здоровья людей и животных. Примеры биологически активных молекул включают, но не ограничены указанным, пептиды, аналоги пептидов, белки, ферменты, малые молекулы, красители, липиды, нуклеозиды, олигонуклеотиды, аналоги олигонуклеотидов, сахара, олигосахариды, клетки, вирусы, липосомы, микрочастицы, поверхности и мицеллы. Данный класс соединений также включает предшественники указанных типов молекул. Классы биологически активных средств, которые подходят для применения в случае данного изобретения, включают, но не ограничены указанным, цитокины, хемокины, лимфокины, растворимые рецепторы, антитела, антибиотики, фунгициды, противовирусные средства, противовоспалительные средства, противоопухолевые средства, сердечно-сосудистые средства, седативные средства, гормоны, факторы роста, стероидные средства и тому подобное.

Биологически активным соединением может быть пептид, такой как интерферон, включая интерферон-бета (например, интерферон-бета-1а) или интерферон-альфа.

Так как модификация полимером PGC согласно изобретению снижает антигенные ответы, не требуется, чтобы чужеродный пептид был полностью аутологичным для того, чтобы его использовать в качестве терапевтического средства. Например, пептид, такой как интерферон, используемый для получения полимерных конъюгатов, может быть получен из экстракта из млекопитающего, как интерферон человека, жвачного животного или быка, или может быть получен синтетическим или рекомбинантным способом.

Например, в одном аспекте изобретение относится к соединениям и способам лечения состояний, которые поддаются лечению интерфероном альфа или бета. Введение конъюгированного с полиалкиленгликолем интерферона бета (в дальнейшем «PGC IFN-бета», «PGC IFN-β», например, «PEG IFN-бета», «PEG IFN-β», «пегилированный IFN-бета» или «пегилированный IFN-β») дает улучшенный терапевтический эффект наряду с существенным снижением или полным исключением нежелательных побочных эффектов, обычно связанных с обычно используемыми на практике схемами лечения интерфероном альфа или бета.

PGC IFN-бета может быть получен посредством связывания полиалкиленового полимера с концевой аминогруппой молекулы IFN бета. Одна молекула активированного полиалкиленгликоля может быть конъюгирована с N-концом IFN бета в результате реакции восстановительного алкилирования.

Конъюгат PGC IFN-бета может быть приготовлен, например, в виде жидкости или лиофилизованного порошка для инъекции. Целью конъюгации IFN бета с PGC является улучшение доставки белка при значительном пролонгировании его времени полужизни в плазме и тем самым обеспечение продолжительной активности IFN бета.

Термин «интерферон» или «IFN» в используемом в данном описании смысле означает семейство высокомолекулярных видоспецифичных белков, которые ингибируют репликацию вирусов и пролиферацию клеток и модулируют иммунный ответ. Интерфероны человека сгруппированы в два класса; тип I, включающий α- и β-интерферон, и тип II, который представлен только γ-интерфероном. Сконструированы и коммерчески доступны рекомбинантные формы каждой группы. Подтипы в каждой группе основаны на антигенных/структурных признаках.

Термины «бета интерферон», «бета-интерферон», «бета IFN», «бета-IFN», «β интерферон», «β-интерферон», «β IFN», «β-IFN», «интерферон бета», «интерферон-бета», «интерферон β», «интерферон-β», «IFN бета», «IFN-бета», «IFN β», «IFN-β» и «интерферон фибробластов человека» используются в данном описании взаимозаменяемо, чтобы описать представителей группы интерферонов бета, которые имеют особые аминокислотные последовательности, которые идентифицированы с помощью выделения и секвенирования ДНК, кодирующей пептиды.

Кроме того, термины «бета интерферон 1а», «бета интерферон-1а», «бета-интерферон 1а», «бета-интерферон-1а», «бета IFN 1а», «бета IFN-1а», «бета-IFN 1а», «бета-IFN-1а», «β интерферон 1а», «β интерферон-1а», «β-интерферон 1а», «β-интерферон-1а», «β IFN 1а», «β IFN-1а», «β-IFN 1а», «β-IFN-1а», «интерферон бета 1а», «интерферон бета-1а», «интерферон-бета 1а», «интерферон-бета-1а», «интерферон β 1а», «интерферон β-1а», «интерферон-β-1а», «интерферон-β-1а», «IFN бета 1а», «IFN бета-1а», «IFN-бета 1а», «IFN-бета-1а», «IFN β 1а», «IFN β-1а», «IFN-β 1а», «IFN-β-1а» используются в данном описании взаимозаменяемо, чтобы описать рекомбинантно или синтетически полученный интерферон бета, который имеет аминокислотные последовательности, встречающиеся в природе (дикого типа).

Появление технологии рекомбинантной ДНК, применяемой для получения интерферона, позволило успешно синтезировать несколько интерферонов человека, тем самым сделав возможным крупномасштабную ферментацию, продуцирование, выделение и очистку различных интерферонов до гомогенности. Рекомбинантно полученный интерферон сохраняет некоторые или большинство его противовирусных и иммуномодулирующих активностей *in vitro* и *in vivo*. Также понятно, что рекомбинантные способы также могут включать сайты гликозилирования для добавления остатка углевода к рекомбинантно полученному полипептиду.

Также предполагается конструирование рекомбинантных DNA-плазмид, содержащих последовательности, кодирующие по меньшей мере часть интерферона фибробластов человека, и экспрессия полипептида, обладающего иммунологической или биологической активностью интерферона фибробластов человека. Конструирование гибридных генов бета-интерферона, содержащих комбинации последовательностей различных подтипов, можно осуществить способами, известными специалистам в данной области.

Типичные подходящие рекомбинантные бета-интерфероны, которые можно использовать в практике изобретения, включают, но не ограничены указанным, интерферон бета-1а, такой как AVONEX®, доступный от Biogen, Inc., Cambridge, MA, и интерферон-бета-1b, такой как BETASERON®, доступный от Berlex, Richmond, CA.

Существует множество механизмов, с помощью которых IFN-индуцированные генные продукты обеспечивают защитное действие против вирусной инфекции. Такое ингибирующее действие на вирусы происходит на разных стадиях жизненного цикла вирусов. См. патент США № 6030785. Например, IFN может ингибировать снятие оболочки вирусных частиц, проникновение и/или слияние, вызванное вирусами.

Состояния, которые можно лечить согласно данному изобретению, обычно представляют собой состояния, которые поддаются лечению интерфероном. Например, поддающиеся лечению состояния включают состояния, которые могут положительно или благоприятно отвечать (как указанные термины известны в области медицины) на терапию, основанную на интерфероне бета. В целях данного изобретения состояния, которые можно лечить с помощью терапии интерфероном бета, описанной в данном изобретении, включают такие состояния, при которых лечение интерфероном бета проявляет определенную эффективность, но при которых отрицательные побочные эффекты лечения с помощью IFN- β перевешивают полезный результат. Лечение способами согласно изобретению приводит к значительно сниженным побочным эффектам или их исключению по сравнению с обычным лечением интерфероном бета. Кроме того, состояния, традиционно считающиеся неподдающимися лечению с помощью IFN- β , или состояния, которые невозможно лечить достигаемой дозой IFN- β , можно лечить способами согласно данному изобретению.

Соединения PGC IFN- β согласно изобретению можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими средствами, применимыми для лечения конкретного состояния. Проведено по меньшей мере одно пилотное исследование рекомбинантного интерферона бета-1а для лечения хронического гепатита. См. в основном публикацию Habersetzer et al., *Liver* 30: 437-441 (2000), включенную в данное описание в виде ссылки. Например, соединения можно вводить в комбинации с известными противовирусными средствами для лечения вирусной инфекции. См. Kakumu et al., *Gastroenterology* 105: 507-12 (1993) и Pepinsky, et al., *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297: 1059-1066 (2001), включенные в данное описание в виде ссылки.

В используемом в данном описании смысле термин «противовирусные средства» может включать, например, малые молекулы, пептиды, сахара, белки, молекулы, полученные из вирусов, ингибиторы протеаз, аналоги нуклеотидов и/или аналоги нуклеозидов. «Малая молекула» в качестве термина, который используется в данном описании, относится к органической молекуле примерно менее 2500 а.е.м. (атомные единицы массы), предпочтительно примерно менее 1000 а.е.м. Примеры подходящих противовирусных соединений включают, но не ограничены указанным, рибавирин, левовирин, MB6866, зидовудин ЗТС, FTC, ацикловир, ганцикловир, вирамид, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

Примерные состояния, которые можно лечить с помощью интерферона, включают, но не ограничены указанным, нарушения пролиферации клеток, в частности множественный склероз, злокачественную опухоль (например, лейкоз ворсистых клеток, саркому Капоши, хронический миелогенный лейкоз, множественную миелому, карциному базальных клеток и злокачественную меланому, рак яичника, кожную Т-клеточную лимфому) и вирусные инфекции. Без ограничения лечение интерфероном можно использовать для лечения состояний, при которых лечение успешно в результате ингибирования репликации чувствительных к интерферону вирусов. Например, интерферон можно использовать отдельно или в комбинации с AZT при терапии против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ)/СПИД или в комбинации с рибавирином при терапии против HCV. Вирусные инфекции, которые можно лечить согласно изобретению, включают, но не ограничены указанным, гепатит А, гепатит В, гепатит С, другой не-А/не-В гепатит, вирус герпеса, вирус Эпштейна-Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), простой герпес, вирус герпеса человека типа 6 (HHV-6), папиллому, поксвирус, пикорнавирус, аденовирус, риновирус, Т-

лимфотропный вирус человека типа 1 и 2 (HTLV-1/-2), ротавирус человека, бешенство, ретровирусы, включая ВИЧ, энцефалит и респираторные вирусные инфекции. Способы согласно изобретению также можно использовать для модификации различных иммунных ответов.

Обнаружена корреляция между генотипом HCV и ответом на терапию интерфероном. См. патент США № 6030785; Enomoto et al., N. Engl. J. Med. 334: 77-81 (1996); Enomoto et al., J. Clin. Invest. 96: 224-30 (1995). Процент ответа у пациентов, инфицированных HCV-1b, составляет менее 40%. См. патент США № 6030785. Сходные низкие проценты ответа также наблюдались у пациентов, инфицированных HCV-1a. См. там же; Hoofnagel et al., Intervirology 37: 87-100 (1994). Однако процент ответа у пациентов, инфицированных HCV-2, составляет около 80%. См. патент США № 6030785; Fried et al., Semin. Liver Dis. 15: 82-91 (1995). В действительности обнаружено, что аминокислотная последовательность отдельной области белка NS5A HCV-генотипа 1b коррелирует с чувствительностью к интерферону. См. патент США № 6030785, включенный в данное описание в виде ссылки. См. также Enomoto et al. 1996; Enomoto et al. 1995. Данная область идентифицирована как область, определяющая чувствительность к интерферону (ISDR). См. там же.

Конъюгат PGC IFN-бета вводят в фармакологически эффективном количестве для лечения любого из описанных выше состояний, и он основан на активности IFN бета полимерного конъюгата. Термин «фармакологически эффективное количество» означает количество лекарственного средства или фармацевтического средства, которое будет вызывать биологический или терапевтический ответ ткани, системы, животного или человека, которого добивается исследователь или клиницист. Это такое количество, которое достаточно для того, чтобы в значительной степени повлиять на положительный клинический ответ при сохранении пониженных уровней побочных эффектов. Количество PGC IFN-бета, которое можно вводить нуждающемуся в этом субъекту, находится в пределах 0,01-100 мкг/кг или более предпочтительно 0,01-10 мкг/кг, вводимых в виде однократной или дробных доз.

Введение описанных доз можно осуществлять через день, но предпочтительно его осуществляют раз в неделю или через неделю. Дозы вводят в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 24 недели, путем инъекции.

Введение дозы может осуществляться пероральным, местным, внутривенным, подкожным, внутримышечным или любым другим приемлемым системным способом. По усмотрению лечащего врача количество вводимого лекарственного средства и используемая схема лечения конечно будет зависеть от возраста, пола и истории болезни пациента, подвергаемого лечению, числа нейтрофилов (например, тяжести нейтропении), тяжести конкретного состояния болезни и толерантности пациента к лечению, о которой свидетельствует местная токсичность и системные побочные эффекты.

На практике конъюгаты согласно изобретению вводят в количествах, которые будут достаточны для подавления или предотвращения нежелательных состояний здоровья или заболевания у субъекта, такого как млекопитающее, и используются в форме, наиболее подходящей для таких целей. Композиции предпочтительно приспособлены для внутреннего применения и содержат эффективное количество фармакологически активного соединения согласно изобретению отдельно или в комбинации с другими активными средствами с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями. Соединения особенно полезны, так как они обладают очень низкой токсичностью, если таковая имеет место.

Конъюгаты, описанные в данном изобретении, могут составлять активный ингредиент фармацевтической композиции и обычно их вводят в смеси с подходящими фармацевтическими разбавителями, эксципиентами и носителями (вместе называемыми в данном описании «веществами-носителями»), соответствующим образом выбранными в соответствии с предполагаемой формой введения, т.е. в форме пероральных таблеток, капсул, эликсиров, сиропов и т.п. Как правило, композиции будут содержать эффективное количество активного соединения или его фармацевтически приемлемой соли и, кроме того, также может содержать любые вещества-носители, которые обычно используются в фармацевтической области. В зависимости от предполагаемого способа введения композиции могут быть в твердой, полутвердой или жидкой дозированной форме, такой, например, как инъекционные препараты, таблетки, суппозитории, пилюли, капсулы замедленного высвобождения, порошки, жидкости, суспензии и т.п., предпочтительно в дозированной лекарственной форме.

Обычные фармацевтические композиции, содержащие фармакологически эффективное количество конъюгата, например, PGC IFN-бета, вместе с фармацевтически приемлемыми носителями, адьювантами, разбавителями, консервантами и/или солибулизаторами, можно использовать в практике данного изобретения. Фармацевтические композиции интерферона содержат разбавители различных буферов (например, аргинин, трис-HCl, ацетат, фосфат), имеющих пределы pH и ионной силы, носители (например, сывороточный альбумин человека), солибулизаторы (например, твин, полисорбат) и консерванты (например, бензиловый спирт). См., например, патент США № 4496537.

Введение активных соединений, описанных в данном изобретении, может осуществляться с помощью любых приемлемых способов введения терапевтических средств. Указанные способы включают системное или местное введение, такое как пероральное, назальное, парентеральное, трансдермальное, подкожное или местное введение.

Например, для перорального введения в форме таблетки или капсулы (например, желатиновой кап-

сулы) активный компонент лекарственного средства можно комбинировать с пероральным, нетоксичным фармацевтически приемлемым инертным носителем, таким как этанол, глицерин, вода и тому подобное. Кроме того, при желании или необходимости в смесь также могут быть включены подходящие связующие, лубриканты, дезинтегранты и красители. Подходящие связующие включают крахмал, алюмосиликат магния, крахмальную пасту, желатин, метилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу и/или поливинилпирролидон, сахара, кукурузные подсластители, природные и синтетические камеди, такие как аравийская камедь, трагакантовая камедь или альгинат натрия, полиэтиленгликоль, воски и тому подобное. Лубриканты, используемые в указанных дозированных формах, включают олеат натрия, стеарат натрия, стеарат магния, бензоат натрия, ацетат натрия, хлорид натрия, диоксид кремния, тальк, стеариновую кислоту, ее магниевую или кальциевую соль и/или полиэтиленгликоль и т.п. Дезинтегранты включают без ограничения крахмал, метилцеллюлозу, агар, бентонит, ксантановую камедь, крахмалы, агар, альгиновую кислоту или ее натриевую соль или шипучие смеси и т.п. Разбавители включают, например, лактозу, декстрозу, сахарозу, маннит, сорбит, целлюлозу и/или глицин.

Конъюгаты согласно изобретению также можно вводить в таких пероральных дозированных формах, как таблетки или капсулы с рассчитанным по времени высвобождением и замедленным высвобождением, пиллолы, порошки, гранулы, эликсиры, настои, суспензии, сиропы и эмульсии.

Жидкие, в частности инъекционные, композиции можно, например, приготовить растворением, диспергированием и т.д. Активное соединение растворяют или смешивают с фармацевтически чистым растворителем, таким как, например, вода, физиологический раствор, водная декстроза, глицерин, этанол и тому подобное, чтобы таким образом образовать инъекционный раствор или суспензию. Кроме того, можно приготовить твердые формы, подходящие для растворения в жидкости перед инъекцией. Инъекционные композиции предпочтительно представляют собой водные изотоничные растворы или суспензии. Композиции могут быть стерилизованными и/или могут содержать вспомогательные вещества, такие как консерванты, стабилизаторы, увлажнители или эмульгирующие агенты, активаторы растворения, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы. Кроме того, они также могут содержать другие терапевтически полезные вещества.

Конъюгаты согласно данному изобретению можно вводить в виде внутривенной (например, в виде боллуса или инфузии), внутривенной, подкожной или внутримышечной формы, все используемые формы хорошо известны специалистам в области фармации. Инъекционные препараты могут быть приготовлены в обычных формах, либо в виде жидких растворов, либо суспензий.

Парентеральное инъекционное введение обычно используют для подкожных, внутримышечных или внутривенных инъекций и инфузий. Например, в том случае, когда используют подкожную инъекцию для доставки 0,01-100 мкг/кг или более предпочтительно 0,01-10 мкг/кг пегилированного IFN-бета в течение одной недели, можно вводить две инъекции по 0,005-50 мкг/кг или более предпочтительно 0,005-5 мкг/кг, соответственно, в 0 и 72 часа. Кроме того, в одном из способов парентерального введения используют имплантацию системы медленного высвобождения или длительного высвобождения, которая обеспечивает сохранение постоянного уровня дозы, согласно патенту США № 3710795, включенному в данное описание в виде ссылки.

Кроме того, предпочтительные для данного изобретения конъюгаты можно вводить в интраназальной форме посредством местного применения подходящих интраназальных наполнителей или посредством трансдермальных путей, используя формы трансдермальных кожных пластырей, которые хорошо известны специалистам в данной области. При введении в форме системы трансдермальной доставки введение дозы конечно будет непрерывным, а не периодическим в ходе всего режима дозирования. Другие предпочтительные местные препараты включают кремы, мази, примочки, аэрозоли, спреи и гели, при этом вводимое количество может быть 10-100-кратным по сравнению с дозой, обычно вводимой при парентеральном введении.

Для твердых композиций можно использовать эксципиенты, которые включают фармацевтически чистый маннит, лактозу, крахмал, стеарат магния, сахарин натрия, тальк, целлюлозу, глюкозу, сахарозу, карбонат магния и тому подобное. Активное соединение, определенное выше, также может быть приготовлено в виде суппозитория с использованием в качестве носителя, например, полиалкиленгликолей, например, пропиленгликоля. В некоторых вариантах суппозитории преимущественно готовят из жировых эмульсий или суспензий.

Конъюгаты согласно данному изобретению также можно вводить в форме липосомных систем доставки, таких как небольшие однослойные везикулы, крупные однослойные везикулы и многослойные везикулы. Липосомы могут быть образованы из множества фосфолипидов, включающих холестерин, стеариламин или фосфатидилхолины. В некоторых вариантах пленка липидных компонентов гидратирована водным раствором лекарственного средства с образованием липидного слоя, инкапсулирующего лекарственное средство, как описано в патенте США № 5262564.

Конъюгаты согласно данному изобретению также могут доставляться с использованием слияний с иммуноглобулином, используемых в качестве отдельных носителей, с которыми связаны молекулы соединений. Соединения согласно данному изобретению также могут быть связаны с растворимыми полимерами в качестве направляемых к мишени носителей лекарственных средств. Такие полимеры могут

включать поливинилпирролидон, сополимер пирана, полигидроксипропил-метакриламид-фенол, полигидроксиэтиласпанамидафенол или полиэтиленоксидполилизин, замещенный остатками пальмитоила. Конъюгаты также могут быть связаны с белками, такими, например, как рецепторные белки и альбумин. Кроме того, соединения согласно данному изобретению могут быть связаны с классом биodeградируемых полимеров, применимых для достижения контролируемого высвобождения лекарственного средства, например, полимолочной кислотой, полиэpsilonкапролактоном, полигидроксимасляной кислотой, сложными полиортоэфирами, полиацеталами, полидигидропиранами, полицианоакрилатами и сшитые или амфипатические блок-сополимеры гидрогелей.

При желании вводимая фармацевтическая композиция также может содержать минорные количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгирующие агенты, агенты для рН-буферов и другие вещества, такие, например, как ацетат натрия, олеат триэтанолamina и т.д.

Режим дозирования с использованием конъюгатов выбирают в соответствии с множеством факторов, включая тип, вид, возраст, массу, пол и состояние здоровья пациента; тяжесть состояния, которое необходимо лечить; путь введения; функционирование почек и печени пациента; и конкретное используемое соединение или его соль. Во внимание также принимаются активность соединений согласно изобретению и чувствительность пациента к побочным эффектам. Специалист, лечащий врач или ветеринар, легко может определить и назначить эффективное количество лекарственного средства, необходимое для предотвращения, оказания противодействия или сдерживания прогрессирования состояния.

Пероральные дозы согласно данному изобретению при использовании для получения идентичных эффектов будут находиться в диапазоне примерно 0,01-100 мкг/кг/сутки перорально или более предпочтительно 0,01-10 мкг/кг/сутки перорально. Композиции предпочтительно готовят в форме таблеток с насечками, содержащих 0,5-5000 мкг или более предпочтительно 0,5-500 мкг активного ингредиента.

Для любого пути введения можно использовать дробные или однократные дозы. Например, соединения согласно данному изобретению можно вводить ежедневно или еженедельно в виде одной дозы или суммарную дозу можно вводить дробными дозами в виде двух, трех или четырех доз.

Любая из указанных выше фармацевтических композиций может содержать 0,1-99%, 1-70% или предпочтительно 1-50% активных соединений согласно изобретению в качестве активных ингредиентов.

Как описано выше, за течением заболевания и его ответом на лечение лекарственными средствами можно следить с помощью клинического обследования и данных лабораторных исследований. Эффективность терапии согласно изобретению определяют по степени, с которой ослабляются описанные ранее признаки и симптомы состояния, например хронического гепатита, и степени, в которой исключаются или в существенно снижаются обычные побочные эффекты интерферона (т.е. подобные гриппу симптомы, такие как повышенная температура, головная боль, озноб, миалгия, усталость и т.д., и симптомы, связанные с центральной нервной системой, такие как депрессия, парестезия, нарушение концентрации и т.д.).

В некоторых вариантах полиалкилированное соединение согласно изобретению (например, пегилированный интерферон) вводят вместе с одним или несколькими фармацевтическими средствами, применимыми для лечения конкретного состояния. Например, полиалкилированный белок можно вводить в комбинации с известными противовирусным средством или средством для лечения вирусной инфекции. Такие противовирусные соединения включают, например, рибавирин, левовирин, MB6866 и зидовудин, 3ТС, FTC, ацикловир, ганцикловир, вирамид, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

Конъюгат и противовирусное средство можно вводит одновременно (например, средства вводят пациенту вместе); вводить последовательно (например, средства вводят пациенту один за другим); или вводить попеременно (например, средства вводят в виде повторяющейся серии, такой как агент А, затем агент В, затем агент А и т.д.).

В практике изобретения предпочтительный PGC IFN-бета (например, PEG IFN-бета) можно вводить пациентам, инфицированным вирусом гепатита С. Предпочтительно применение PEG IFN-бета-1a.

Пациентов для лечения выбирают из пациентов, позитивных по анти-HCV-антителам с документально подтвержденным с помощью биопсии активным хроническим гепатитом.

Для того чтобы следить за ходом репликации HCV у субъектов в ответ на лечение лекарственным средством, можно измерять HCV-РНК в образцах сыворотки, например, с помощью анализа групповой полимеразной цепной реакции, в которой используют два набора праймеров, полученных из неструктурных областей генов NS3 и NS4 генома HCV. См. Farci et al., 1991, New Eng. J. Med. 325: 98-104. Ulrich et al., 1990. J. Clin. Invest., 86: 1609-1614.

Противовирусную активность можно измерить по изменению титра HCV-РНК. Данные о HCV-РНК можно анализировать путем сравнения титров в конце лечения с измерением исходного уровня до лечения. Снижение HCV-РНК к 4 неделе дает доказательство противовирусной активности соединения. См. Kleter et al., 1993, Antimicrob. Agents Chemother. 37 (3): 595-97; Orito et al., 1995, J. Medical Virology, 46:109-115. Изменения величин по меньшей мере на два порядка (> 2 log) интерпретируют как доказательство противовирусной активности.

У человека, страдающего в результате хронической инфекции гепатитом С, может проявляться один или несколько из следующих признаков или симптомов: (а) повышенный уровень аланинами-

нотрансферазы (ALT) в сыворотке, (b) положительный тест на анти-НСV-антитела, (c) присутствие НCV, о чем свидетельствует положительный тест на НCV-РНК, (d) клинические признаки хронической болезни печени, (e) повреждение клеток печени. Такие критерии могут быть использованы не только для диагностики гепатита С, но могут быть использованы для оценки реакции пациента на лечение лекарственным средством.

Известно, что повышенный уровень аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) возникает в случае неконтролируемого гепатита С, и заверенный ответ на лечение обычно определяют как нормализацию уровней указанных ферментов в сыворотке, особенно ALT. См. Davis et al., 1989, New Eng. J. Med. 321: 1501-1506. ALT является ферментом, высвобождаемым когда разрушаются клетки печени, и является симптомом НCV-инфекции. Интерферон вызывает синтез фермента 2',5'-олигоаденилатсинтетазы (2'5'OAS), который в свою очередь приводит к деградации вирусной мРНК. См. Houghlum, 1983, Clinical Pharmacology 2: 20-28. Увеличения уровней 2'5'OAS в сыворотке соответствует снижению уровней ALT.

Гистологические исследования образцов биопсии печени можно использовать в качестве второго критерия для оценки. См., например, Knodell et al., 1981, Hepatology 1: 431-435, предложенный которым гистологический индекс активности (портальное воспаление, мелкоочаговый или мостовидный некроз, лобулярное повреждение и фиброз) обеспечивает способ оценки активности заболевания.

Безопасность и толерантность или эффективность лечения можно определить по клиническим оценкам и измерению количества лейкоцитов и нейтрофилов. Это можно оценить посредством периодического мониторинга гематологических параметров, например, количества лейкоцитов, нейтрофилов, тромбоцитов и эритроцитов.

Могут быть приготовлены различные другие препараты замедленного или длительного высвобождения с использованием обычных способов, хорошо известных в данной области.

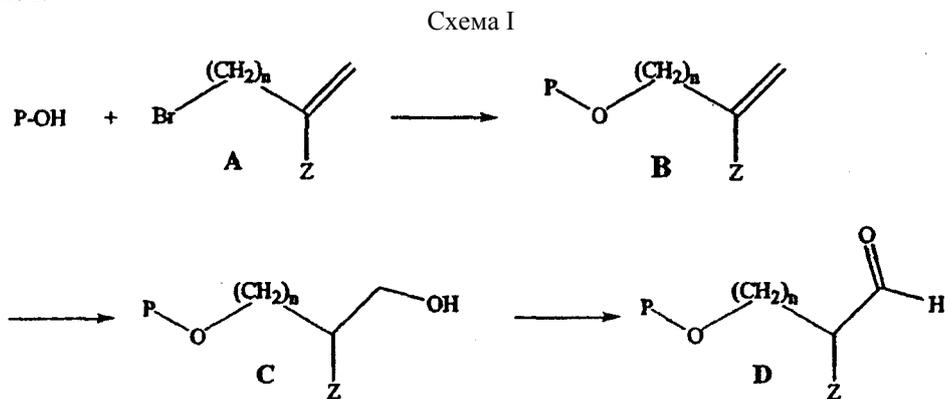
Как будет понятно специалистам в данной области, может быть осуществлено множество модификаций и изменений данного изобретения, не отходя от сути и не выходя за рамки объема. Приведенные в данном описании конкретные варианты предложены только в качестве примера, и изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения, вместе с полным объемом эквивалентов, на которые указанная формула изобретения дает право. Все патенты и публикации, цитированные в данном описании, включены в виде ссылки.

Примеры

Пример 1. Синтез активированных полиалкиленгликолей.

А) Алкилирование спиртов.

Активированные полиалкиленгликоли синтезировали с помощью алкилирования полиалкиленгликоля, имеющего свободную концевую гидроксильную функциональную группу. Общая реакция изображена на схеме I.

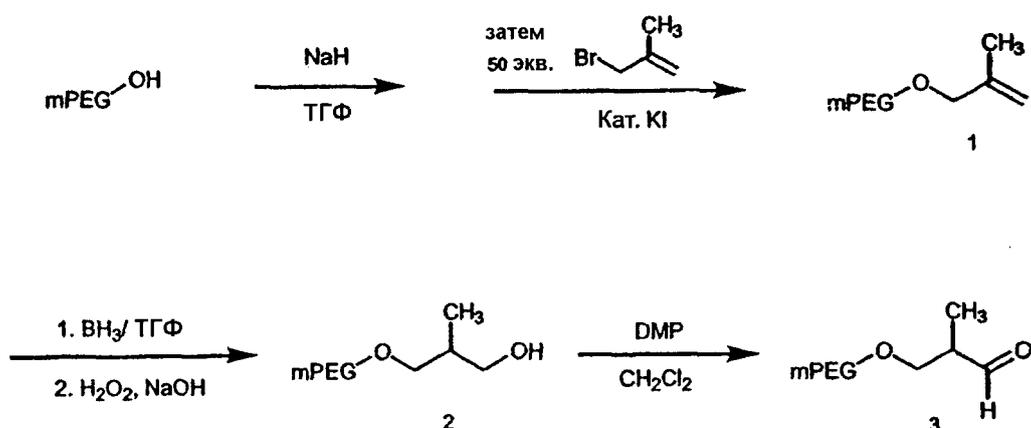


Полиалкиленгликоль (P-OH) подвергают взаимодействию с алкилгалогенидом (A) с образованием простого эфира (B). Затем соединение B гидроксилируют с образованием спирта (C), который окисляют до альдегида (D). В указанных соединениях n является целым числом от 0 до 5 и Z может быть насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью. Z также может быть C₃-C₇ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенной или незамещенной алкарильной (алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом) или гетероалкарильной группой. В случае замещенных соединений заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа. Обычно P-OH является полиэтиленгликолем

(PEG) или монометоксиполиэтиленгликолем (mPEG), имеющим молекулярную массу от 5000 до 40000 Дальтон (Да).

Например, синтез mPEG-O-2-метилпропиональдегида изображен на схеме II.

Схема II



mPEG-OH с молекулярной массой 20000 Да (mPEG-OH 20 кДа; 2,0 г; 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывали NaH (12 мг; 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл). Затем к смеси добавляли пятьдесят эквивалентов 3-бром-2-метилпропена (3,34 г; 5 ммоль) и каталитическое количество KI. Полученную в результате смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. Затем добавляли воду (1 мл) и растворитель удаляли в вакууме. К остатку добавляли CH₂Cl₂ (25 мл) и органический слой отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ и объем уменьшали примерно до 2 мл. Указанный CH₂Cl₂-раствор по каплям добавляли к эфиру (150 мл). Полученный в результате белый осадок собирали, получая 1,9 г соединения 1.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 4,98 (с, 1H), 4,91 (с, 1H), 1,74 (с, 3H).

К соединению 1 (1,9 г; 0,1 ммоль) в ТГФ (20 мл) и CH₂Cl₂ (2 мл) при 0°C добавляли NH₃ в ТГФ (1,0 М; 3,5 мл). Смесь перемешивали на бане со льдом в течение 1 ч. К полученной смеси медленно добавляли NaOH (2,0 М; 2,5 мл), затем 30% H₂O₂ (0,8 мл). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Следуя описанному выше способу обработки (CH₂Cl₂, осаждение из эфира), получали 1,8 г соединения 2 в виде белого твердого вещества.

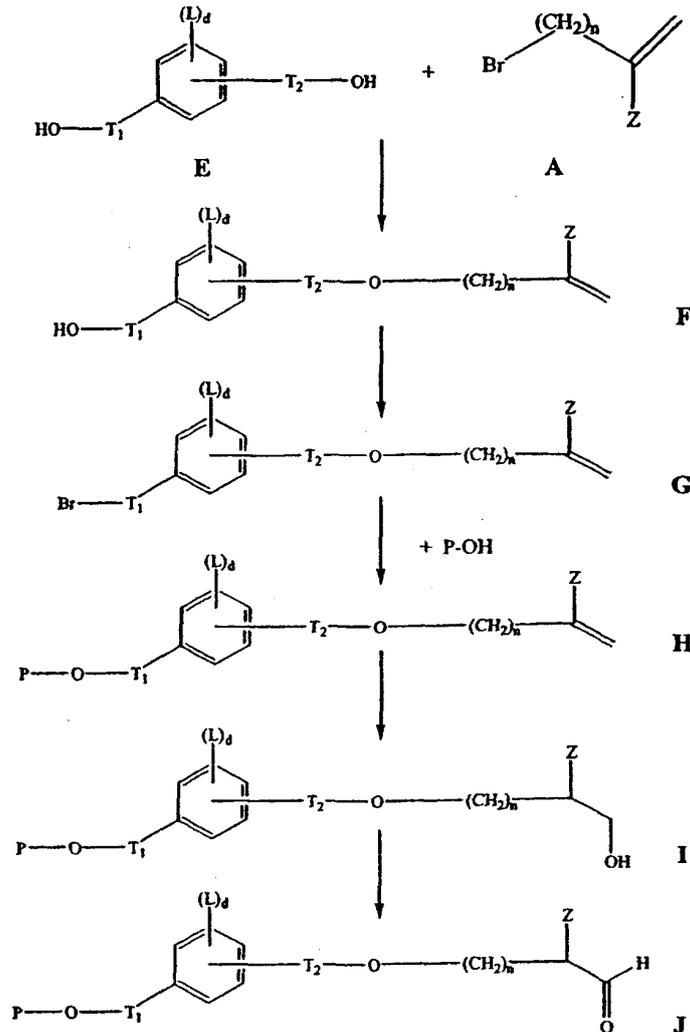
¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,80 (м, 1H), 0,84 (д, 3H).

Соединение 2 (250 мг) растворяли в CH₂Cl₂ (2,5 мл) и добавляли периодинан Десс-Мартина (DMP; 15 мг) при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли насыщенный NaHCO₃ и Na₂S₂O₃ (2 мл) и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Следуя описанному выше способу обработки, получали 3 (mPEG-O-2-метилпропиональдегид, 120 мг) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 9,75 (с, 1H), 2,69 (м, 1H), 1,16 (д, 3H).

Сходному способу следуют в случае ароматических спиртов, как показано на схеме III.

Схема III



В общем, ароматический спирт (E) подвергают взаимодействию с алкилгалогенидом (A) с образованием простого моноэфира (F). Затем оставшуюся спиртовую группу соединения F превращают в галогенид (например, бромид) в соединении G, которое подвергают взаимодействию с полиалкиленгликолем (P-OH), получая простой эфир (H). Затем полученное соединение превращают в альдегид (J) через гидроборирование до первичного спирта (I) с последующим окислением. В указанных соединениях n является целым числом от 0 до 5, d равно 0 или является целым числом от 1 до 4 и Z может быть насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью. Z также может быть C₃-C₇ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенной или незамещенной алкарильной (алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом) или гетероалкарильной группой. В случае замещенных соединений заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфамойл, сульфонамидогруппа, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа.

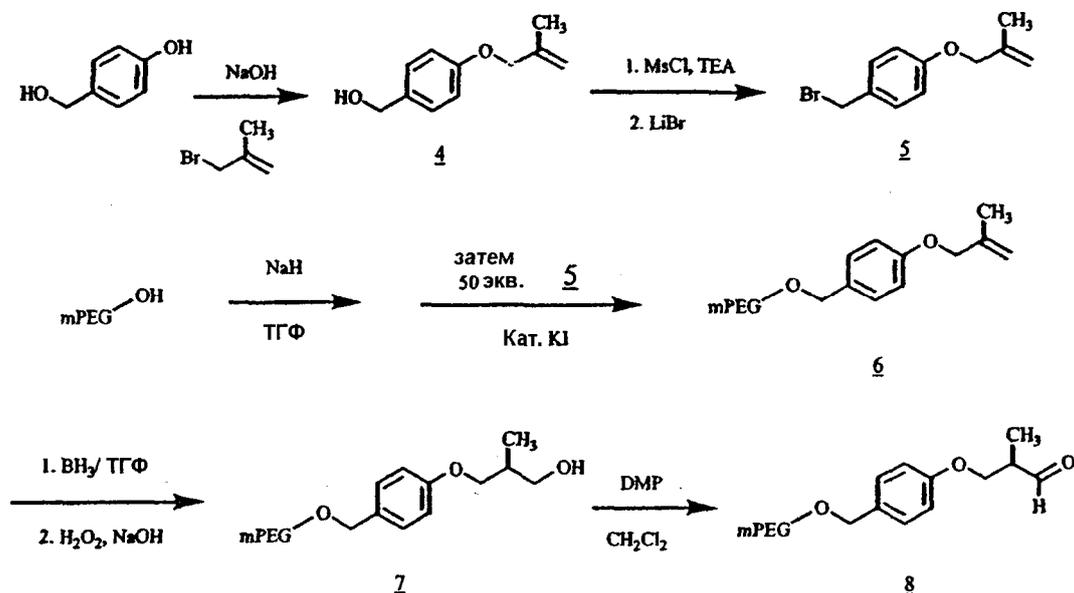
Кроме того, T₁ и T₂ независимо отсутствуют или являются насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью и могут быть в орто-, мета- или пара-положении друг к другу. Каждый L (если присутствует) независимо является насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₇ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклическим гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильной группой. Заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, суль-

фат, сульфонат, сульфоамил, сульфонидамогруппа, сульфонил, гетероцикл, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силил, простой эфир или алкилтиогруппа.

Обычно Р-ОН является полиэтиленгликолем (PEG) или метоксиполиэтиленгликолем (mPEG), имеющим молекулярную массу от 5000 до 40000 Да.

Например, синтез mPEG-О-параметилфенил-О-2-метилпропиональдегида (8) показан на схеме IV.

Схема IV



К раствору 4-гидроксibenзилового спирта (2,4 г; 20 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воде (2,5 мл) сначала добавляли гидроксид натрия (1,5 г; 37,5 ммоль), а затем 3-бром-2-метилпропен (4,1 г; 30 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. К смеси добавляли 10% лимонную кислоту (2,5 мл) и растворитель удаляли в вакууме. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным NaCl (10 мл), сушили и концентрировали, получая соединение 4 (3,3 г; 93%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 1,29 (м, 2H), 6,92 (м, 2H), 5,14 (с, 1H), 5,01 (с, 1H), 4,56 (с, 2H), 4,46 (с, 2H), 1,85 (с, 3H).

Мезилхлорид (MsCl; 2,5 г; 15,7 ммоль) и триэтиламин (TEA; 2,8 мл; 20 ммоль) добавляли к раствору соединения 4 (2,0 г; 11,2 ммоль) в CH₂Cl₂ (25 мл) при 0°C и реакционную смесь помещали в холодильник на 16 ч. Обычная обработка давала бледно-желтое масло (2,5 г; 87%).

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,31 (м, 2H), 6,94 (м, 2H), 5,16 (с, 1H), 5,01 (с, 1H), 5,03 (с, 2H), 4,59 (с, 2H), 4,44 (с, 2H), 3,67 (с, 3H), 1,85 (с, 3H).

Полученное масло (2,4 г; 9,4 ммоль) растворяли в ТГФ (20 мл) и добавляли LiBr (2,0 г; 23,0 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. К смеси добавляли воду (2,5 мл) и растворитель удаляли в вакууме. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным NaCl (10 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали, получая требуемый бромид 5 (2,3 г; 96%) в виде бледно-желтого масла.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,29 (м, 2H), 6,88 (м, 2H), 5,11 (с, 1H), 4,98 (с, 1H), 4,53 (с, 2H), 4,44 (с, 2H), 1,83 (с, 3H).

mPEG-OH 20 кДа (2,0 г; 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывали NaH (12 мг; 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл) и к смеси добавляли соединение 5 (0,55 г; 22,8 ммоль) с каталитическим количеством KI. Полученную в результате смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. К смеси добавляли воду (1,0 мл) и растворитель удаляли в вакууме. К остатку добавляли CH₂Cl₂ (25 мл) и органический слой отделяли, сушили над безводным Na₂SO₄ и объем уменьшали примерно до 2 мл. Добавление по каплям в раствору эфира (150 мл) давало белый осадок, который собирали, получая 6 (1,5 г) в виде белого порошка.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,21 (д, 2H), 6,90 (д, 2H), 5,01 (с, 1H), 4,99 (с, 1H), 4,54 (с, 2H), 4,43 (с, 2H), 1,84 (с, 3H).

К раствору соединения 6 (1,0 г; 0,05 ммоль) в ТГФ (10 мл) и CH₂Cl₂ (2 мл), охлажденному до 0°C, добавляли BH₃/ТГФ (1,0 М; 3,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Медленно добавляли 2,0 М раствор NaOH (2,5 мл) и затем 30% H₂O₂ (0,8 мл). Реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Следуя описанному выше способу обработки (CH₂Cl₂, осаждение из эфира), получали 7 (350 мг) в виде белого твердого вещества.

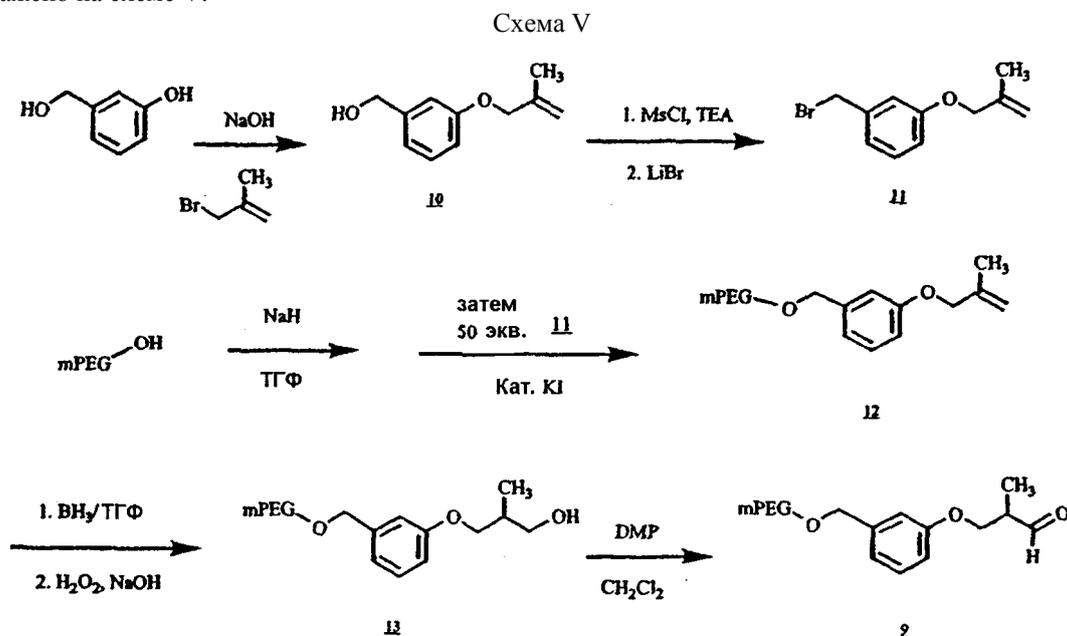
¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,21 (д, 2H), 6,84 (д, 2H), 4,54 (с, 2H), 2,90 (м, 2H), 1,96 (д, 3H).

Соединение 7 (150 мг; 0,0075 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (1,5 мл) и добавляли DMP (15 мг) при перемешивании реакционной смеси при комнатной температуре в течение 1,5 ч.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 9,76 (с, 1H), 7,21 (д, 2H), 6,78 (д, 2H), 4,44 (с, 2H), 4,14 (м, 2H), 2,85 (м, 1H), 1,21 (д, 3H).

К смеси добавляли насыщенный NaHCO_3 (0,5 мл) и $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,5 мл) и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 1 ч. Следуя описанному выше способу обработки (раствор CH_2Cl_2 , осажденный из эфира), получали 8 (92 мг) в виде белого твердого вещества.

Подобным образом синтезировали mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегид (9), как изображено на схеме V.



К раствору 3-гидроксibenзилового спирта (2,4 г; 20 ммоль) в ТГФ (50 мл) и воде (2,5 мл) сначала добавляли гидроксид натрия (1,5 г; 37,5 ммоль), а затем 3-бром-2-метилпропен (4,1 г; 30 ммоль). Полученную реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. К смеси добавляли 10% лимонную кислоту (2,5 мл) и растворитель удаляли в вакууме. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным NaCl (10 мл), сушили и концентрировали, получая соединение 10 (3,2 г; 90%).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 7,26 (м, 1H), 6,94 (м, 2H), 6,86 (м, 1H), 5,11 (с, 1H), 5,01 (с, 1H), 4,61 (с, 1H), 4,44 (с, 2H), 1,82 (с, 3H).

MsCl (2,5 г; 15,7 ммоль) и TEA (2,8 мл; 20 ммоль) добавляли к раствору соединения 10 (2,0 г; 11,2 ммоль) в CH_2Cl_2 (25 мл) при 0°C и реакционную смесь помещали в холодильник на 16 ч. Обычная обработка давала бледно-желтое масло (2,5 г; 87%).

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 7,31 (м, 1H), 7,05 (м, 2H), 6,91 (м, 1H), 5,16 (с, 1H), 5,04 (с, 1H), 4,59 (с, 1H), 4,46 (с, 2H), 3,71 (с, 3H), 1,84 (с, 3H).

Полученное масло (2,4 г; 9,4 ммоль) растворяли в ТГФ (20 мл) и добавляли LiBr (2,0 г; 23,0 ммоль). Реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 1 ч и затем охлаждали до комнатной температуры. К смеси добавляли воду (2,5 мл) и растворитель удаляли в вакууме. Остаток экстрагировали этилацетатом (3×15 мл) и объединенные органические слои промывали насыщенным NaCl (10 мл), сушили над безводным Na_2SO_4 и концентрировали, получая требуемый бромид 11 (2,2 г; 92%) в виде бледно-желтого масла.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 7,29 (м, 1H), 6,98 (м, 2H), 6,85 (м, 1H), 5,14 (с, 2H), 4,98 (с, 2H), 4,50 (с, 2H), 4,44 (с, 2H), 1,82 (д, 3H).

mPEG-OH 20 кДа (2,0 г; 0,1 ммоль, Sunbio) обрабатывали NaH (12 мг; 0,5 ммоль) в ТГФ (35 мл) и к смеси добавляли соединение 11 (0,55 г; 22,8 ммоль) с каталитическим количеством KI . Полученную в результате смесь кипятили с обратным холодильником в течение 16 ч. К смеси добавляли воду (1,0 мл) и растворитель удаляли в вакууме. К остатку добавляли CH_2Cl_2 (25 мл) и органический слой отделяли, сушили над безводным Na_2SO_4 и объем уменьшали примерно до 2 мл. Добавление по каплям к раствору эфира (150 мл) давало белый осадок, который собирали, получая 12 (1,8 г) в виде белого порошка.

^1H ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): δ 7,19 (м, 1H), 6,88 (м, 2H), 6,75 (м, 1H), 4,44 (с, 2H), 4,10 (м, 2H), 1,82 (д, 3H).

К раствору соединения 12 (1,0 г; 0,05 ммоль) в ТГФ (7,5 мл) и CH_2Cl_2 (2,5 мл), охлажденного до 0°C , добавляли $\text{BH}_3/\text{TГФ}$ (1,0 М; 3,5 мл) и реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Медленно

добавляли 2,0 М раствор NaOH (3 мл), затем 30% H₂O₂ (0,85 мл). Реакционной смеси давали возможность нагреться до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Следуя описанному выше способу обработки (CH₂Cl₂, осаждение из эфира), получали 13 (450 мг) в виде белого твердого вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 7,15 (м, 1H), 6,84 (м, 2H), 6,69 (м, 1H), 4,50 (с, 2H), 2,90 (м, 2H), 1,95 (д, 3H).

Соединение 13 (200 мг; 0,01 ммоль) растворяли в CH₂Cl₂ (1,5 мл) и добавляли DMP (20 мг) при перемешивании реакционной смеси при комнатной температуре в течение 1 ч.

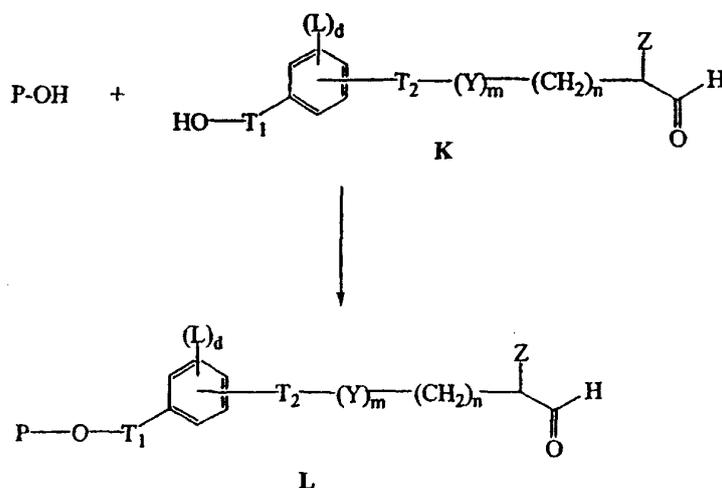
¹H ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ 9,74 (с, 1H), 7,17 (м, 1H), 6,86 (м, 2H), 6,74 (м, 1H), 4,48 (с, 2H), 4,15 (м, 2H), 2,78 (м, 1H), 1,22 (д, 3H).

К смеси добавляли насыщенный NaHCO₃ (0,5 мл) и Na₂S₂O₃ (0,5 мл) и перемешивание продолжали при комнатной температуре в течение 1 ч. Следуя описанному выше способу обработки (CH₂Cl₂-раствор, осаждение из эфира), получали 9 (142 мг) в виде белого твердого вещества.

В) Получение посредством взаимодействия с ароматическими спиртами.

Активированные полиалкиленгликоли синтезировали с помощью реакции Митсунобу между полиалкиленгликолем, имеющим свободную концевую гидроксильную функциональную группу, и ароматическим спиртом. Схема реакции изображена на схеме VI.

Схема VI



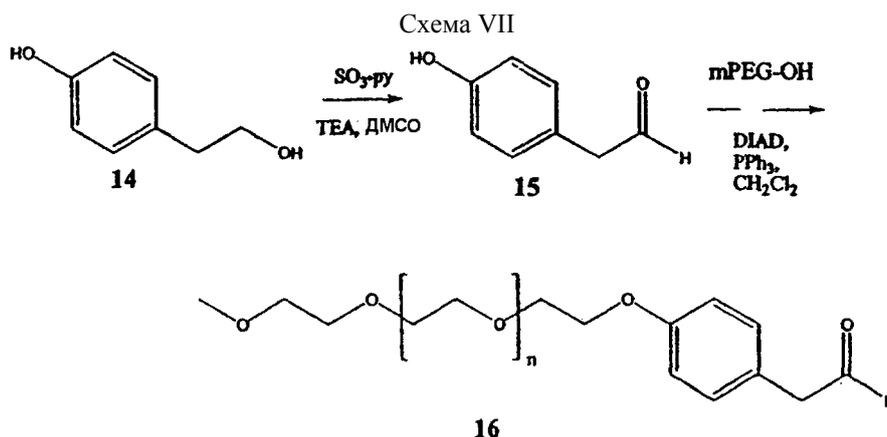
Полиалкиленгликоль (P-OH) подвергают взаимодействию со спиртом (K) с образованием простого эфира (L). В указанных соединениях m равно 0 или 1, d равно 0 или является целым числом от 1 до 4 и n равно 0 или является целым числом от 1 до 5. Y означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' и NR'. T₁ и T₂ независимо отсутствуют или являются насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью.

R' и Z независимо означают водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью.

Каждый L (если присутствует) независимо является насыщенной или ненасыщенной C₁-C₂₀ алкильной или гетероалкильной группой с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₇ насыщенным или ненасыщенным циклическим алкилом или циклический гетероалкилом, замещенной или незамещенной арильной или гетероарильной группой или замещенным или незамещенным алкарилом. Алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом или гетероалкарильной группой, и заместителями могут быть галоген, гидроксил, карбонил, карбоксилат, сложный эфир, формил, ацил, тиокарбонил, сложный тиоэфир, тиоацетат, тиоформиат, алкоксил, фосфорил, фосфонат, фосфинат, аминогруппа, амидогруппа, амидин, имин, цианогруппа, нитрогруппа, азидогруппа, сульфгидрил, сульфат, сульфонат, сульфоамил, сульфоамидогруппа, сульфонил, гетероциклил, аралкил, ароматический остаток, гетероароматический остаток, иминогруппа, силл, простой эфир или алкилтиогруппа.

P означает полимер полиалкиленгликоля. Обычно P-OH является полиэтиленгликолем (PEG) или монометоксиполиэтиленгликолем (mPEG), имеющим молекулярную массу от 5000 до 40000 Да.

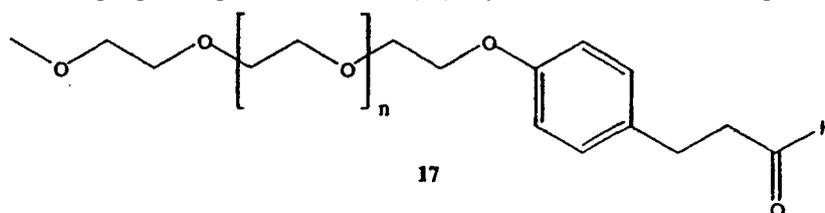
Например, синтез mPEG-O-пара-фенилацетальдегида (16) изображен на схеме VII.



4-Гидроксифенилацetalальдегид (15) синтезировали как описано в Heterocycles, 2000, 53, 777-784. 4-Гидроксифениловый спирт (соединение 14; 1,0 г; 7,3 ммоль; Aldrich) растворяли в диметилсульфоксиде (8 мл; Aldrich). Медленно при перемешивании добавляли TEA (2,2 мл; 16 ммоль; Aldrich). Комплекс пиридин-триоксид серы ($\text{SO}_3\cdot\text{py}$) (2,5 г; 16 ммоль; Aldrich) полностью растворяли в диметилсульфоксиде (9 мл; Aldrich) и полученный раствор по каплям добавляли к спирту при энергичном перемешивании. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 , затем промывали ледяной водой. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха. Очистка с использованием хроматографии на силикагеле со смесью гексан-этилацетат в качестве элюента (5:1, затем 2:1) дала 488 мг (49%) 4-гидроксифенилацetalальдегида (15).

mPEG-OH 20 кДа (101 мг; 0,005 ммоль) и 4-гидроксифенилацetalальдегид (15) (39 мг; 0,29 ммоль) подвергали четырехкратной азеотропной перегонке с толуолом, затем собирали безводным CH_2Cl_2 (2 мл; Aldrich). К полученному раствору при перемешивании добавляли трифенилфосфин (PPh_3 ; 66 мг; 0,25 ммоль; Aldrich) и затем диизопропилазодикарбоксилат (DIAD; 49 мкл; 0,25 ммоль; Aldrich). После перемешивания в течение 3 дней при комнатной температуре реакционную смесь по каплям добавляли к энергично перемешиваемому диэтиловому эфиру. Полученный в результате осадок выделяли фильтрованием и три раза промывали диэтиловым эфиром. Неочищенный продукт собирали в ШУК и промывали водой. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха. Продукт собирали в минимальном количестве CH_2Cl_2 , затем осаждали, добавляя по каплям к перемешиваемому диэтиловому эфиру. Полученный продукт собирали фильтрованием, три раза промывали диэтиловым эфиром и сушили, получая 63 мг (62%) mPEG-O-пара-фенилацetalальдегида (16).

Синтез mPEG-O-пара-фенилпропиональдегид (17) осуществляли сходным образом.

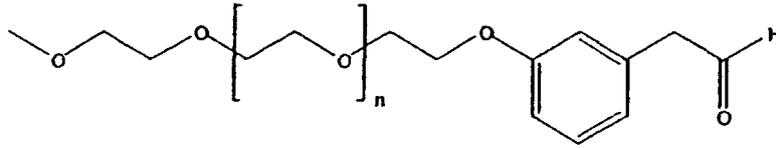


4-Гидроксифенилпропиональдегид получали в результате синтеза, аналогичного синтезу 4-гидроксифенилацetalальдегида (Heterocycles, 2000, 53, 777-784). 3-(4-Гидроксифенил)-1-пропанол (1,0 г; 6,6 ммоль; Aldrich) растворяли в диметилсульфоксиде (8 мл; Aldrich). Медленно при перемешивании добавляли TEA (2,0 мл; 14 ммоль; Aldrich). Комплекс пиридин-триоксид серы ($\text{SO}_3\cdot\text{py}$) (2,3 г; 15 ммоль; Aldrich) полностью растворяли в диметилсульфоксиде (9 мл; Aldrich) и полученный раствор по каплям добавляли к спирту при энергичном перемешивании. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре реакционную смесь разбавляли CH_2Cl_2 , затем промывали ледяной водой. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха. Очистка с использованием хроматографии на силикагеле со смесью гексан-этилацетат в качестве элюента (5:1, затем 2:1) дала 745 мг (75%) 4-гидроксифенилпропиональдегида.

mPEG-OH 20 кДа (100 мг; 0,005 ммоль) и 4-гидроксифенилпропиональдегид (40 мг; 0,27 ммоль) подвергали четырехкратной азеотропной перегонке с толуолом, затем собирали безводным CH_2Cl_2 (2 мл; Aldrich). К полученному раствору добавляли трифенилфосфин (66 мг; 0,25 ммоль; Aldrich) и затем диизопропилазодикарбоксилат (49 мкл; 0,25 ммоль; Aldrich) при перемешивании. После перемешивания в течение 3 дней при комнатной температуре реакционную смесь по каплям добавляли к энергично перемешиваемому диэтиловому эфиру. Полученный в результате осадок выделяли фильтрованием и три раза промывали диэтиловым эфиром. Неочищенный продукт собирали в CH_2Cl_2 и промывали водой. Органический слой сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали досуха. Продукт собирали в минимальном количестве CH_2Cl_2 , затем осаждали, добавляя по каплям к перемешиваемому диэтиловому эфиру.

ру. Полученный продукт собирали фильтрованием, три раза промывали диэтиловым эфиром и сушили, получая 60 мг (60%) mPEG-O-пара-фенилпропиональдегида (17).

Таким образом также получали mPEG-O-мета-фенилацетальдегид (18).



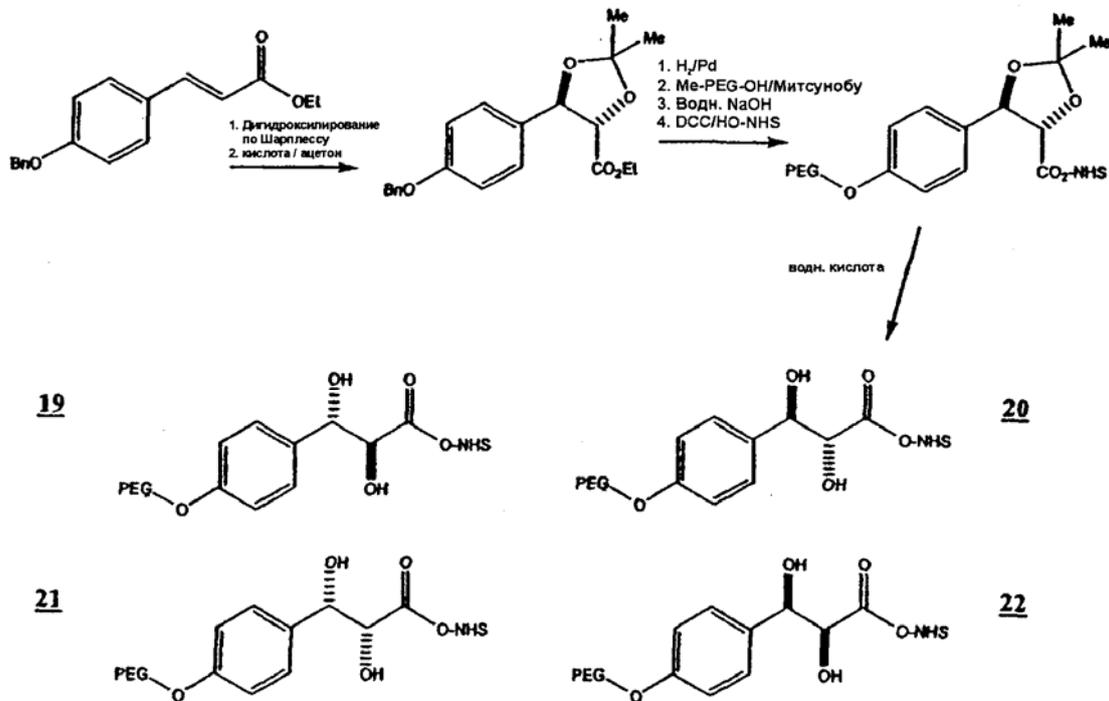
18

3-Гидроксифенилацетальдегид получали в результате синтеза, аналогичного синтезу 4-гидроксифенилацетальдегида (Heterocycles, 2000, 53, 777-784). 3-Гидроксифениловый спирт (1,0 г; 7,5 ммоль; Aldrich) растворяли в диметилсульфоксиде (8 мл, Aldrich). Медленно при перемешивании добавляли TEA (2,0 мл; 14 ммоль, Aldrich). Комплекс пиридин-триоксид серы (SO₃·py) (2,4 г; 15 ммоль; Aldrich) полностью растворяли в диметилсульфоксиде (8 мл, Aldrich) и полученный раствор по каплям добавляли к спирту при энергичном перемешивании. После перемешивания в течение 1 ч при комнатной температуре реакцию гасили ледяной водой, затем экстрагировали CH₂Cl₂. Органический слой сушили над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали досуха. Очистка с использованием хроматографии на силикагеле со смесью гексан-этилацетат в качестве элюента (3:1, затем 1:1) давала 225 мг (22%) 3-гидроксифенилацетальдегида.

mPEG-OH 20 кДа (307 мг; 0,015 ммоль) и 3-гидроксифенилацетальдегид (117 мг; 0,86 ммоль) подвергали четырехкратной азеотропной перегонке с толуолом, затем собирали безводным CH₂Cl₂ (5 мл, Aldrich). К полученному раствору добавляли трифенилфосфин (200 мг; 0,76 ммоль, Aldrich) и затем диизопропилазодикарбоксилат (147 мкл; 0,75 ммоль; Aldrich) при перемешивании. После перемешивания в течение 3 дней при комнатной температуре реакционную смесь по каплям добавляли к энергично перемешиваемому диэтиловому эфиру. Полученный в результате осадок выделяли фильтрованием и три раза промывали диэтиловым эфиром и сушили, получая 284 мг (93%) mPEG-O-мета-фенилацетальдегида (18).

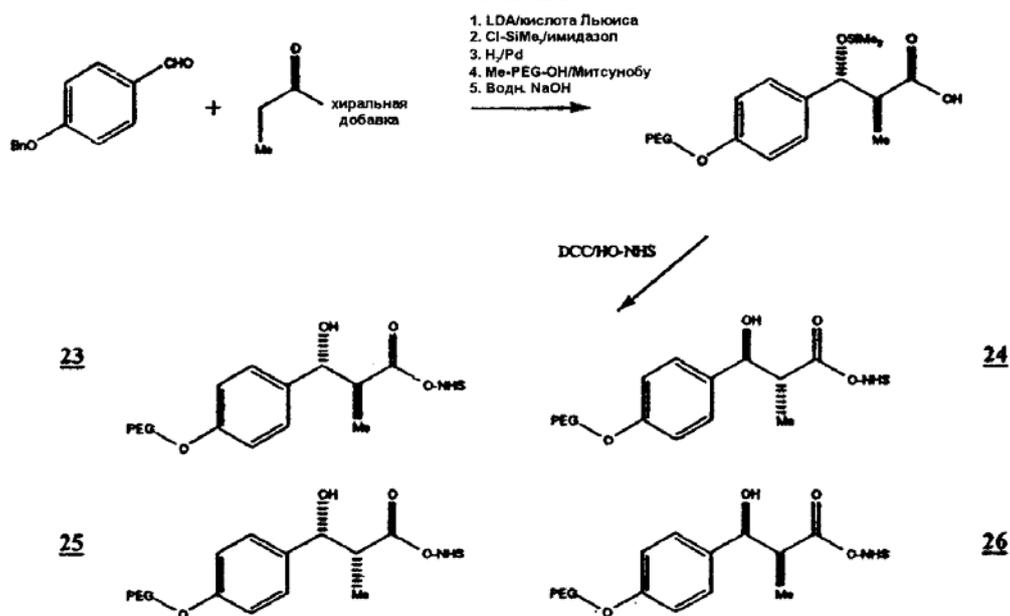
Хиральные соединения PEG-циннамат-N-гидроксиsuccинимата (NHS) получали, например, как показано на схемах VIII и IX.

Схема VIII



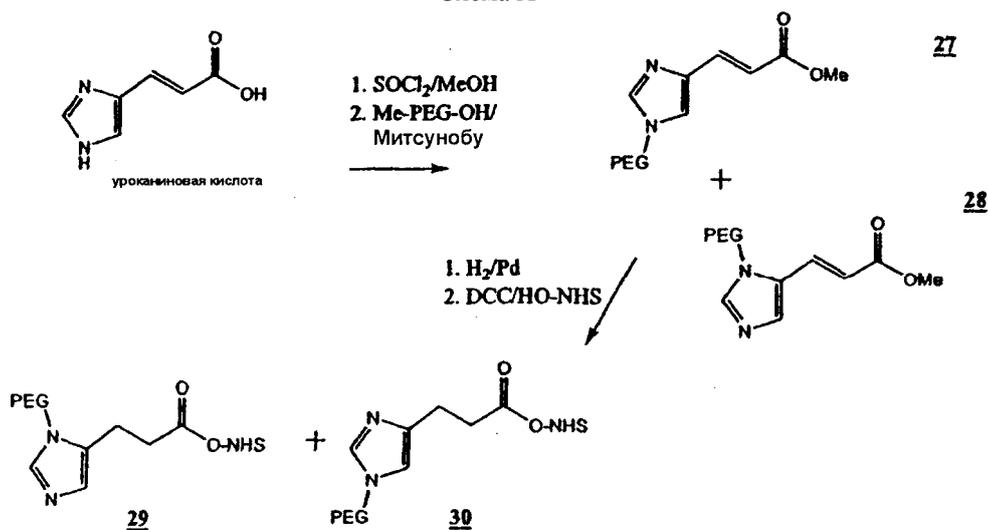
дигидроксидигидроциннамат

Схема IX

 **α -метил- β -гидроксисукциннамат**

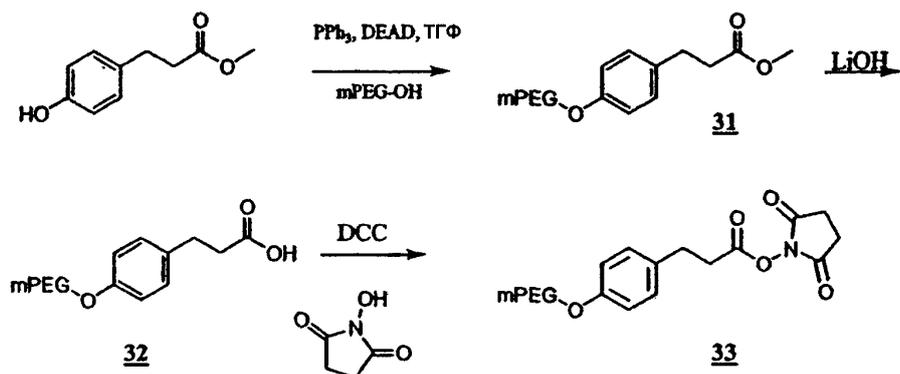
Соединения PEG-дигидроурооканат-NHS также получали помощью реакции Митсунобу, как показано на схеме X.

Схема X



Соединения PEG-дигидроциннамат-NHS соединения также создавали из ароматического спирта, как показано на схеме XI.

Схема XI



PEG-бензофураны и PEG-индолы получали, как показано на схемах XII и XIII.

Схема XII

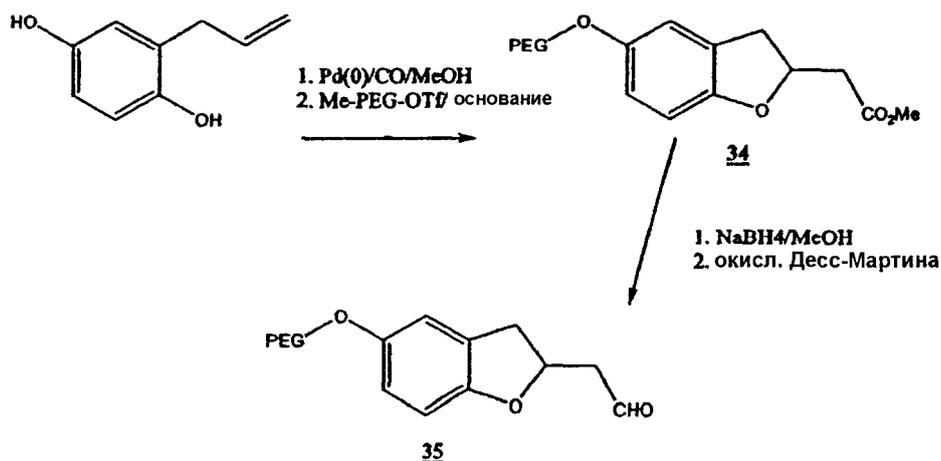
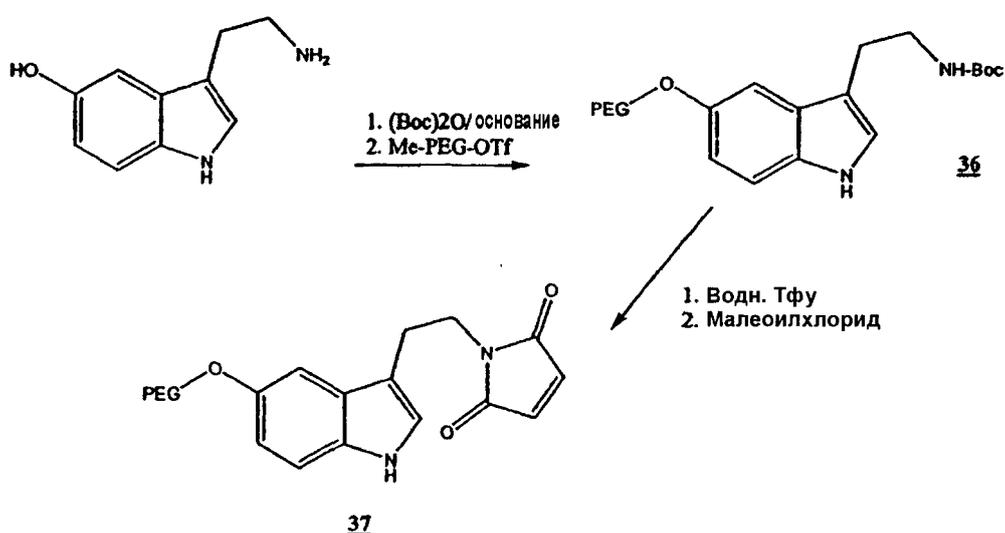


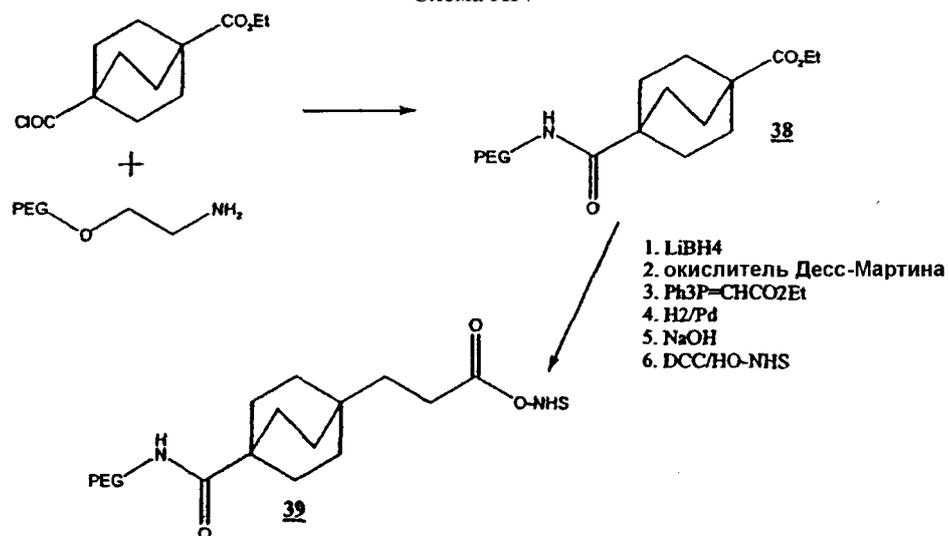
Схема XIII



С) Получение с помощью реакции PEG-аминов.

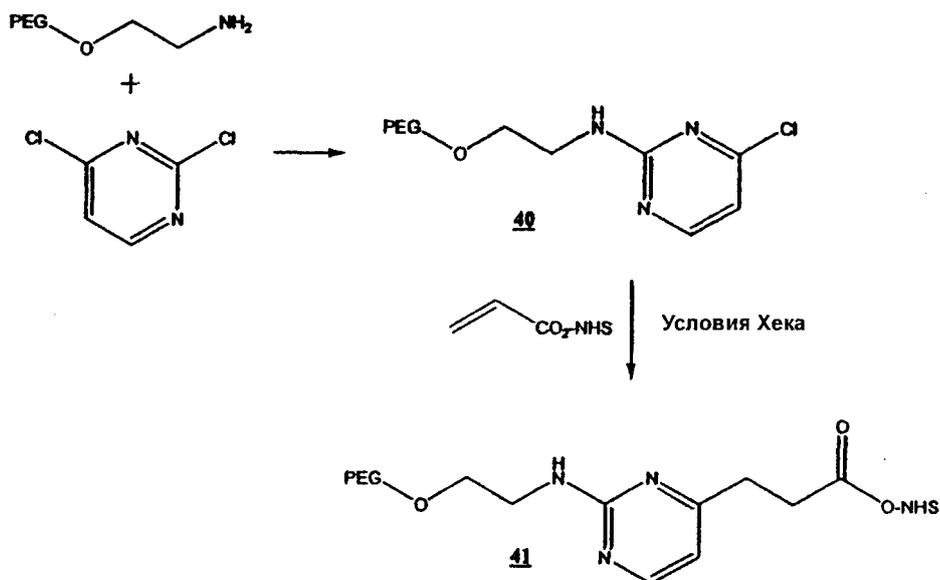
PEG-амины подвергали взаимодействию с алкилгалогенидами с образованием PEG-амидов. Пример образования конъюгата PEG-амид-бициклооктан-NHS показан на схеме XIV.

Схема XIV



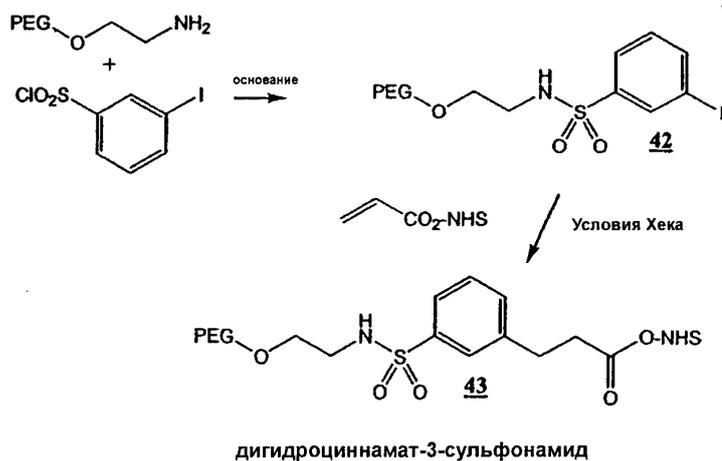
PEG-первичный амин конъюгируют с арилгалогенидом с образованием конъюгата PEG-вторичный амин, который затем подвергают взаимодействию в условиях Хека (стереоспецифичное катализируемое палладием связывание алкена с органическим галогенидом или трифлатом в отсутствии β-атомов водорода при sp³-гибридизованных атомах) с NHS-алкеном с образованием требуемого PEG-конъюгата. Синтез содержащего пиримидин конъюгата показан на схеме XV.

Схема XV

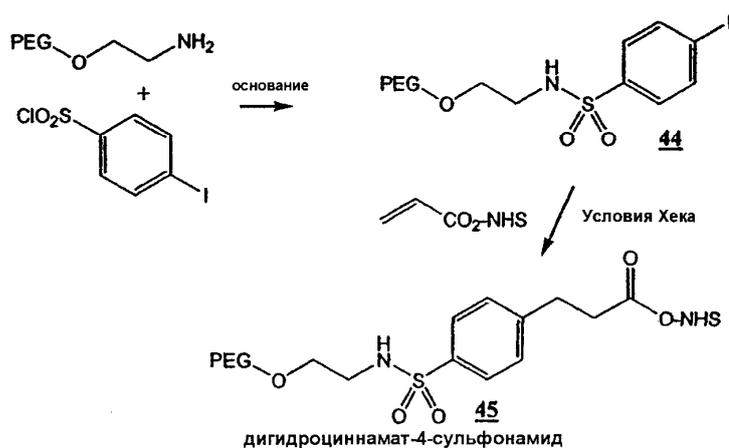


Подобным способом также синтезируют конъюгаты PEG-сульфонамид, как показано на схеме XVI.

Схема XVI



и



D) Соединения, образованные в результате реакции с гетероциклами.

PEG-соединения подвергают взаимодействию с находящимися в цикле или не в цикле атомами азота в гетероциклах с образованием химически активных видов PEG. Типичные реакции показаны на схемах XVII для аминопирролидина и XVIII для различных пиперазинов.

Схема XVII

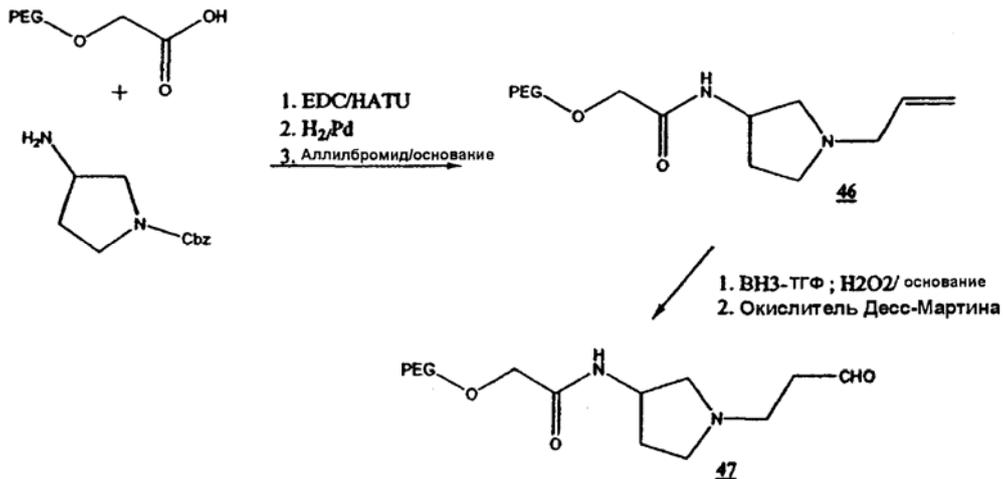
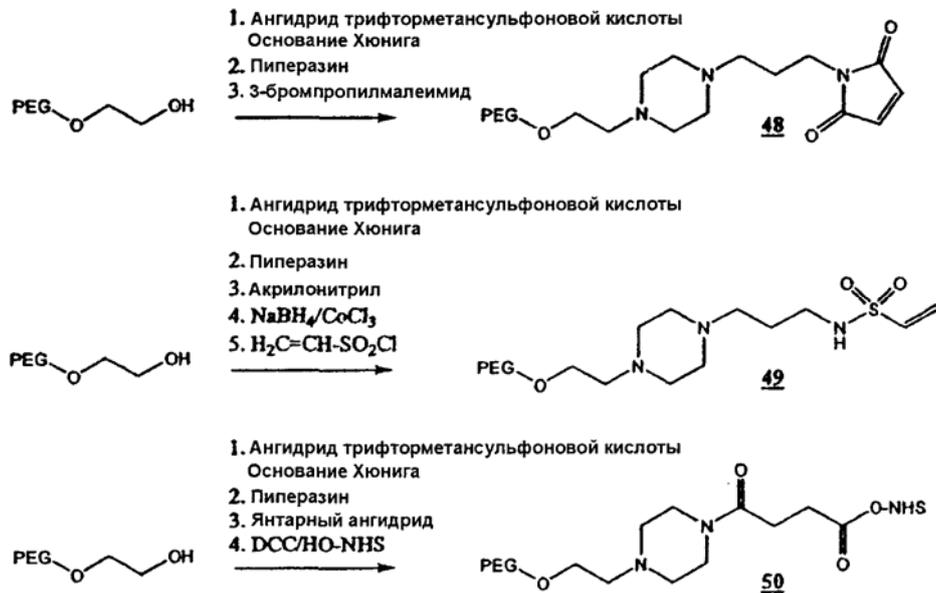


Схема XVIII



Пример 2. Получение пептидных конъюгатов.

Пептидные конъюгаты согласно данному изобретению можно получить в результате взаимодействия белка с активированной молекулой PEG. Например, интерферон (IFN) можно подвергнуть взаимодействию с PEG-альдегидом в присутствии восстановителя (например, цианборгидрида натрия) посредством восстановительного алкилирования, чтобы получить конъюгат PEG-белок, связанный амидной связью. См., например, Европейский патент 0154316 B1.

IFN- β -1a человека пегилировали следующими активированными полиалкиленгликолями согласно изобретению: 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом и 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом. Пегилированные белки очищали до гомогенности от соответствующих реакционных смесей и подвергали серии характеристических тестов, чтобы идентифицировать, выяснить чистоту и эффективность модифицированных белков.

Подробное описание получения и характеристики IFN- β -1a человека, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом и 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом приведено ниже.

А) Получение и характеристика модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a человека пегилировали по его N-концу 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом. Продукт химической реакции восстановительного алкилирования, используемой для включения PEG в основную цепь IFN- β -1a, приводил к образованию аминной связи, которая очень стабильна по отношению к деградации. Пегилированный IFN- β -1a подвергали всесторонней характеристике, включая анализ с помощью SDS-ПААГ, эксклюзионной хроматографии по размеру (SEC), пептидного картирования и оценки активности при анализе противовирусной активности *in vitro*. Чистота продукта, которую оценивали с помощью SDS-ПААГ и SEC, составляла более 90%. В пегилированном образце не было признаков

агрегатов. Остаточные уровни немодифицированного IFN- β -1a в продукте были ниже предела количественного определения, но по-видимому составляли примерно 1% продукта.

Удельная активность пегелированного IFN- β -1a в анализе противовирусной активности была снижена примерно в 2 раза по сравнению с немодифицированным IFN- β -1a (EC_{50} =32 пг/мл для IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом по сравнению с EC_{50} =14 пг/мл для немодифицированного IFN- β -1a). Основную массу пегелированного IFN- β -1a готовили в концентрации 30 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,3, содержащем 14 мг/мл сывороточного альбумина человека (ЧСА), подобно составу, используемому для AVONEX® (Biogen, Cambridge, MA), который был подвергнут всесторонней характеристике. Продукт предоставляли в виде замороженной жидкости, которую хранили при -70°C.

Свойства IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, суммированы в табл. 1.

Эффективность пегелирования	>90%
Отношение IFN- β -1a/PEG	1:1
Чистота	>90%
Положение связывания	N-конец
Противовирусная активность EC_{50}	32 пг/мл

1. Получение IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом.

10 мл AVONEX®, не приготовленного в виде препарата (нефасованный промежуточный продукт IFN- β -1a, клиническая партия нефасованного лекарственного средства, которая прошла все испытания для применения на человеке, в концентрации 250 мкг/мл в 100 мМ фосфате натрия, pH 7,2, 200 мМ NaCl), разбавляли 12 мл 165 мМ MES, pH 5,0, и 50 мкл 5 N HCl. Образец наносили на колонку FF с SP-сефарозой объемом 300 мкл (Pharmacia). Колонку промывали 3×300 мкл 5 мМ фосфата натрия pH 5,5, 75 мМ NaCl и белок элюировали 5 мМ фосфатом натрия pH 5,5, 600 мМ NaCl. Элюированные фракции анализировали в отношении поглощения при 280 нм и концентрацию IFN- β -1a в образцах оценивали, используя коэффициент экстинкции 1,51 для раствора 1 мг/мл. Фракции пика объединяли, получая раствор с концентрацией IFN- β -1a 3,66 мг/мл, который затем разбавляли до 1,2 мг/мл водой.

К 0,8 мл IFN- β -1a из разбавленного пула элюата с SP-сефарозы добавляли 0,5 М фосфат натрия pH 6,0 до 50 мМ, добавляли цианоборогидрид натрия (Aldrich) до 5 мМ и добавляли 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегид до 5 мг/мл. Образец инкубировали при комнатной температуре в течение 16 ч в темноте. Пегелированный IFN- β -1a очищали из реакционной смеси на FF-колонке с SP-сефарозой объемом 0,5 мл следующим образом: 0,6 мл реакционной смеси разбавляли 2,4 мл 20 мМ MES pH 5,0 и наносили на колонку с SP-сефарозой. Колонку промывали фосфатом натрия pH 5,5, 75 мМ NaCl и затем пегелированный IFN- β -1a элюировали с колонки с помощью 25 мМ MES pH 6,4, 400 мМ NaCl. Затем пегелированный IFN- β -1a очищали на фракционирующей по размеру колонке Superose 6 HR 10/30 FPLC, используя 5 мМ фосфат натрия pH 5,5, 150 мМ NaCl в качестве подвижной фазы. Фракционирующую колонку (25 мл) элюировали при 20 мл/ч и собирали фракции по 0,5 мл. Элюированные фракции анализировали в отношении содержания белка по поглощению при 280 нм, объединяли и определяли концентрацию белка в пуле. Концентрацию пегелированного IFN- β -1a выражали в эквивалентах IFN, так как остаток PEG не вносит вклада в поглощение при 280 нм. Отбирали образцы пула для анализа и остаток разбавляли до 30 мкг/мл буфером для приготовления препарата, содержащим ЧСА, делили на аликвоты 0,25 мл/флакон и хранили при -70°C.

2. УФ-спектр очищенного IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом.

УФ-спектр (240-340 нм) IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, получали с использованием предварительно приготовленного в виде препарата с ЧСА нефасованного образца. Пегелированный образец проявлял максимум поглощения при 278-279 нм и минимум поглощения при 249-250 нм, что согласуется с данными, наблюдаемыми в случае немодифицированного нефасованного промежуточного продукта IFN- β -1a. Концентрацию белка пегелированного продукта оценивали на основании спектра, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%}=1,51$. Концентрация белка в пегелированном нефасованном продукте составляла 0,23 мг/мл. В образце не было мутности, о чем свидетельствует отсутствие поглощения при 320 нм.

3. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью SDS-ПААГ.

4 мкг немодифицированного и модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a подвергали электрофорезу в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях в геле с 10-20% градиентом. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250, и он показан на фиг. 1 (дорожка А, маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа и 18 кДа, соответственно); дорожка В, немодифицированный IFN- β -1a; дорожка С, IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом). Анализ в SDS-ПААГ модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a выявил одну основную полосу с кажущейся массой 55 кДа, что согласуется с модификацией одним PEG. Не выявлено форм с более высокой массой, возникающих в результате присутствия дополнительных групп PEG. В очищенном пегилированном продукте обнаружен немодифицированный IFN- β -1a; однако его количество ниже предела количественного определения. Уровень немодифицированного IFN- β -1a в препарате по оценкам составляет только около 1% суммарного белка.

4. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру.

Немодифицированный и модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a подвергали SEC на аналитической фракционирующей колонке Superose 6 HR10/30, для FPLC используя PBS pH 7,2 в качестве подвижной фазы. Колонку элюировали при 20 мл/ч и элюент контролировали в отношении поглощения при 280 нм, как показано на фиг. 2: панель А: стандарты молекулярной массы (670 кДа, тиреоглобулин; 158 кДа, гамма-глобулин; 44 кДа, овальбумин; 17 кДа, миоглобин; 1,3 кДа, витамин В12), панель В: IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом; панель С: немодифицированный IFN- β -1a. Модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a элюировался в виде отдельного острого пика с кажущейся молекулярной массой примерно 200 кДа, что согласуется большим гидродинамическим объемом PEG. Не наблюдалось признаков агрегатов. В препарате выявляли немодифицированный IFN- β -1a, но его количество было ниже предела количественного определения. На основании величины пика количества немодифицированного IFN- β -1a составляли 1% или меньше всего продукта, что согласуется с наблюдениями с использованием SDS-ПААГ.

5. Анализ IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью пептидного картирования.

Специфичность реакции пегилирования оценивали пептидным картированием. Немодифицированный и модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a расщепляли эндопротеиназой Lys-C из *Achromobacter* (Wako Bioproducts) и полученные в результате продукты расщепления фракционировали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C₄, используя 30-минутный градиент от 0 до 70% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Элюент из колонки контролировали по поглощению при 214 нм.

Все предполагаемые пептиды, получаемые при расщеплении IFN- β -1a эндопротеиназой Lys-C, идентифицированы ранее N-концевым секвенированием и масс-спектрометрией (Pepinsky et al., (2001) *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297: 1059), и из них только пептид, который содержит N-конец IFN- β -1a, был изменен модификацией 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом; о чем свидетельствует его исчезновение на пептидной карте. Таким образом, данные картирования свидетельствуют, что остаток PEG специфично связывается с данным пептидом. Данные, кроме того, свидетельствуют, что мишенью модификации PEG является N-конец белка, так как только N-концевая модификация может приводить к специфичной утрате данного пептида.

В) Получение и характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом.

IFN- β -1a человека пегилировали по его N-концу 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом. Продукт химической реакции восстановительного алкилирования, используемой для включения PEG в основную цепь IFN- β -1a, приводил к образованию аминной связи, которая очень стабильна по отношению к деградации. Пегилированный IFN- β -1a подвергали всесторонней характеристике, включая анализ с помощью SDS-ПААГ, SEC, пептидного картирования и оценки активности при анализе противовирусной активности *in vitro*. Чистота продукта, которую оценивали с помощью SDS-ПААГ и SEC, составляла более 95%. В пегилированном образце IFN- β -1a не было признаков агрегатов. Остаточные уровни немодифицированного IFN- β -1a в продукте были ниже предела количественного определения, но, по-видимому, составляли примерно 1% продукта. Удельная активность пегилированного IFN- β -1a при анализе противовирусной активности была снижена примерно в 2 раза по сравнению с немодифицированным IFN- β -1a (EC_{50} =31 пг/мл для IFN- β -1a, модифицированного mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом по сравнению с EC_{50} =14 пг/мл для немодифицированного IFN- β -1a). Основную массу пегилированного IFN- β -1a готовили в концентрации 30 мкг/мл в PBS, pH 7,2, содержащем 15 мг/мл ЧСА, подобно составу, используемому для AVONEX®, который был подвергнут всесторонней характеристике. Продукт предоставляли в виде замороженной жидкости, которую хранили при -70°C.

Свойства IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-

метилпропиональдегидом, обобщены в табл. 2.

Таблица 2

Свойства IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом

Эффективность пегилирования	>80%
Отношение IFN- β -1a/PEG	1:1
Чистота	>95%
Положение связывания	N-конец
Противовирусная активность EC ₅₀	31 пг/мл

1. Получение IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом.

80 мл AVONEX®, не приготовленного в виде препарата (нефасованный промежуточный продукт IFN- β -1a, клиническая партия нефасованного лекарственного средства, которая прошла все испытания для применения на человеке, в концентрации 254 мкг/мл в 100 мМ фосфате натрия, pH 7,2, 200 мМ NaCl), разбавляли 96 мл 165 мМ MES, pH 5,0, и 400 мкл 5 N HCl. Образец наносили на колонку FF с SP-сефарозой объемом 1,2 мл (Pharmacia). Колонку промывали 6,5 мл 5 мМ фосфата натрия pH 5,5, 75 мМ NaCl и белок элюировали 5 мМ фосфатом натрия pH 5,5, 600 мМ NaCl. Элюированные фракции анализировали в отношении поглощения при 280 нм и концентрацию IFN- β -1a в образцах оценивали, используя коэффициент экстинкции 1,51 для раствора 1 мг/мл. Фракции пика объединяли, получая раствор с концентрацией IFN- β -1a 4,4 мг/мл. К 2,36 мл IFN- β -1a с концентрацией 4,4 мг/мл из пула элюата с SP-сефарозы добавляли 0,5 М фосфат натрия pH 6,0 до 50 мМ, добавляли цианоборогидрид натрия (Aldrich) до 5 мМ и добавляли 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегид до 10 мг/мл. Образец инкубировали при комнатной температуре в течение 21 ч в темноте. Пегилированный IFN- β -1a очищали из реакционной смеси на FF-колонке с SP-сефарозой объемом 8,0 мл следующим образом: 9,44 мл реакционной смеси разбавляли 37,7 мл 20 мМ MES pH 5,0 и наносили на колонку с SP-сефарозой. Колонку промывали фосфатом натрия pH 5,5, 75 мМ NaCl и затем пегилированный IFN- β -1a элюировали с колонки с помощью 25 мМ MES pH 6,4, 400 мМ NaCl. Затем пегилированный IFN- β -1a очищали на фракционирующей по размеру колонке Superose 6 HR 10/30 для FPLC, используя 5 мМ фосфат натрия pH 5,5, 150 мМ NaCl в качестве подвижной фазы. Фракционирующую колонку (25 мл) элюировали при 24 мл/ч и собирали фракции по 0,25 мл. Элюированные фракции анализировали в отношении содержания белка с помощью SDS-ПААГ, объединяли и определяли концентрацию белка в пуле. Концентрацию пегилированного IFN- β -1a выражали в эквивалентах IFN после корректировки, связанной со вкладом PEG в поглощение при 280 нм, используя коэффициент экстинкции 2 для раствора 1 мг/мл пегилированного IFN- β -1a. Отбирали образцы пула для анализа и остаток разбавляли до 30 мкг/мл буфером для приготовления препарата, содержащим ЧСА, делили на аликвоты 0,25 мл/флакон и хранили при -70°C.

2. УФ-спектр очищенного IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом.

УФ-спектр (240-340 нм) IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, получали с использованием предварительно приготовленного в виде препарата с ЧСА нефасованного образца. Пегилированный образец проявлял максимум поглощения при 278-279 нм и минимум поглощения при 249-250 нм, что согласуется с данными, наблюдаемыми в случае немодифицированного нефасованного промежуточного продукта IFN- β -1a. Концентрацию белка пегилированного продукта оценивали на основании спектра, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%}=2,0$. Концентрация белка в пегилированном нефасованном продукте составляла 0,42 мг/мл. В образце не было мутности, о чем свидетельствует отсутствие поглощения при 320 нм.

3. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью SDS-ПААГ.

2,1 мкг модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a подвергали электрофорезу в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях в 10-20% градиентном геле. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250. Анализ в SDS-ПААГ модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a выявил одну основную полосу с кажущейся массой 55 кДа, что согласуется с модификацией одним PEG. В очищенном пегилированном продукте обнаружен немодифицированный IFN- β -1a; однако его количество ниже предела количественного определения. Оценено, что уровень немодифицированного IFN- β -1a в препарате составляет только около 1% суммарного белка.

4. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру.

Модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a

подвергли SEC на аналитической фракционирующей колонке Superose 6 HR10/30 для FPLC, используя PBS pH 7,2 в качестве подвижной фазы. Колонку элюировали при 20 мл/ч и элюент контролировали в отношении поглощения при 280 нм. Пегилированный IFN- β -1a элюировался в виде отдельного острого пика, при этом не было признаков агрегатов (фиг. 3).

5. Анализ IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, с помощью пептидного картирования.

Специфичность реакции пегилирования оценивали пептидным картированием. 13,3 мкг немодифицированного и модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом IFN- β -1a расщепляли 20% (мас./мас.) эндопротеиназой Lys-C из *Achromobacter* (Wako Bioproducts) в PBS, содержащем 5 мМ ДТТ, 1 мМ EDTA при pH 7,6 при комнатной температуре в течение 30 ч (конечная концентрация = 100 мкл). Затем добавляли 4 мкл 1 М ДТТ и 100 мкл 8 М мочевины и образцы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Пептиды разделяли обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ (214TP51), используя 70-минутный градиент 0-63% ацетонитрила в 0,1% ТФУ с последующим 10-минутным градиентом 63-80% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Элюент с колонки контролировали в отношении поглощения при 214 нм.

Все предполагаемые пептиды, получаемые при расщеплении IFN- β -1a эндопротеиназой Lys-C, идентифицированы ранее N-концевым секвенированием и масс-спектрометрией (Pepinsky et al., (2001) *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297: 1059), и из них только пептид, который содержит N-конец IFN- β -1a, был изменен модификацией 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом; о чем свидетельствует его исчезновение на карте. Таким образом, данные картирования свидетельствуют, что остаток PEG специфично связывается с данным пептидом. Данные, кроме того, свидетельствуют, что мишенью модификации PEG является N-конец белка, так как только N-концевая модификация может приводить к специфичной утрате данного пептида.

С) Получение и характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом.

IFN- β -1a человека пегилировали по его N-концу 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом. Продукт химической реакции восстановительного алкилирования, используемой для включения PEG в основную цепь IFN- β -1a, приводил к образованию аминной связи, которая очень стабильна по отношению к деградации. Пегилированный IFN- β -1a подвергали всесторонней характеристике, включая анализ с помощью SDS-ПААГ, SEC, пептидное картирование и оценку активности при анализе противовирусной активности *in vitro*. Чистота продукта, которую оценивали с помощью SDS-ПААГ и SEC, составляла более 95%. В пегилированном образце IFN- β -1a не было признаков агрегатов. Остаточные уровни немодифицированного IFN- β -1a в продукте были ниже предела количественного определения, но, по-видимому, составляли примерно 1% продукта. В тесте на стабильность не наблюдали агрегации и деградации IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, в трис-буфере с pH 7,4 в ходе инкубации при 37°C до 7 дней. Удельная активность пегилированного IFN- β -1a в анализе противовирусной активности была снижена примерно в 2 раза по сравнению с немодифицированным IFN- β -1a (EC_{50} = 31 пг/мл для IFN- β -1a, модифицированного mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом по сравнению с EC_{50} = 14 пг/мл для немодифицированного IFN- β -1a). Основную массу пегилированного IFN- β -1a готовили в концентрации 30 мкг/мл в PBS, pH 7,3, содержащем 14 мг/мл ЧСА, подобно составу, используемому для AVONEX®, который был подвергнут всесторонней характеристике. Продукт предоставляли в виде замороженной жидкости, которую хранили при -70°C.

Свойства IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, обобщены в табл. 3.

Таблица 3
Свойства IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом

Эффективность пегилирования	>80%
Отношение IFN- β -1a/PEG	1:1
Чистота	>95%
Положение связывания	N-конец
Противовирусная активность EC_{50}	31 пг/мл

1. Получение IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом.

80 мл AVONEX®, не приготовленного в виде препарата (нефасованный промежуточный продукт IFN- β -1a, клиническая партия нефасованного лекарственного средства, которая прошла все испытания для применения на человеке, в концентрации 250 мкг/мл в 100 мМ фосфате натрия, pH 7,2, 200 мМ NaCl), разбавляли 24 мл 165 мМ MES, pH 5,0 и 400 мкл 5 N HCl и 24 мл воды. Образец наносили на колонку FF с SP-сефарозой объемом 600 мкл (Pharmacia). Колонку промывали 2×900 мкл 5 мМ фосфата

натрия pH 5,5, 75 mM NaCl и белок элюировали 5 mM фосфатом натрия pH 5,5, 600 mM NaCl. Элюированные фракции анализировали в отношении поглощения при 280 нм и концентрацию IFN- β -1a в образцах оценивали, используя коэффициент экстинкции 1,51 для раствора 1 мг/мл. Фракции пика объединяли, получая раствор с концентрацией IFN- β -1a 2,3 мг/мл. К 1,2 мл IFN- β -1a из пула элюата с SP-сефарозы добавляли 0,5 M фосфат натрия pH 6,0 до 50 mM, добавляли цианоборогидрид натрия (Aldrich) до 5 mM и добавляли 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегид до 10 мг/мл. Образец инкубировали при комнатной температуре в течение 18 ч в темноте. Пегилированный IFN- β -1a очищали из реакционной смеси на FF-колонке с SP-сефарозой объемом 0,75 мл следующим образом: 1,5 мл реакционной смеси разбавляли 7,5 мл 20 mM MES pH 5,0, 7,5 мл воды и 5 мкл HCl и наносили на колонку с SP-сефарозой. Колонку промывали фосфатом натрия pH 5,5, 75 mM NaCl и затем пегилированный IFN- β -1a элюировали с колонки с помощью 20 mM MES pH 6,0, 600 mM NaCl. Затем пегилированный IFN- β -1a очищали на фракционирующей по размеру колонке для Superose 6 HR 10/30 FPLC, используя 5 mM фосфат натрия pH 5,5, 150 mM NaCl в качестве подвижной фазы. Фракционирующую колонку (25 мл) элюировали при 20 мл/ч и собирали фракции по 0,5 мл. Элюированные фракции анализировали в отношении содержания белка по поглощению при 280 нм, объединяли и определяли концентрацию белка в пуле. Концентрацию пегилированного IFN- β -1a выражали в эквивалентах IFN после корректировки, связанной со вкладом PEG (20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегид имеет коэффициент экстинкции при 280 нм, равный 0,5 для раствора 1 мг/мл) в поглощение при 280 нм, используя коэффициент экстинкции 2 для раствора 1 мг/мл пегилированного IFN- β -1a. Отбирали образцы пула для анализа и остаток разбавляли до 30 мкг/мл буфером для приготовления препарата, содержащим ЧСА, делили на аликвоты 0,25 мл/флакон и хранили при -70°C.

2. УФ-спектр очищенного IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом.

УФ-спектр (240-340 нм) IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, получали с использованием предварительно приготовленного в виде препарата с ЧСА нефасованного образца. Пегилированный образец проявлял максимум поглощения при 278-279 нм и минимум поглощения при 249-250 нм, что согласуется с данными, наблюдаемыми в случае немодифицированного нефасованного промежуточного продукта IFN- β -1a. Концентрацию белка пегилированного продукта оценивали на основании спектра, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{280}^{0,1\%} = 2,0$. Концентрация белка пегилированного нефасованного средства составляла 0,10 мг/мл. В образце не было мутности, о чем свидетельствует отсутствие поглощения при 320 нм.

3. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, с помощью SDS-ПААГ.

2,5 мкг немодифицированного и модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN- β -1a подвергали электрофорезу в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях в 10-20% градиентном геле. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250, и он показан на фиг. 4 (дорожка А: IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом; дорожка В: немодифицированный IFN- β -1a; дорожка С: маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа и 18 кДа, соответственно)). Анализ в SDS-ПААГ модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN- β -1a выявил одну основную полосу с кажущейся массой 55 кДа, что согласуется с модификацией одним PEG. Не выявлено форм с более высокой массой, возникающих в результате присутствия дополнительных групп PEG. В очищенном пегилированном продукте обнаружен немодифицированный IFN- β -1a; однако его количество ниже предела количественного определения. Оценено, что уровень немодифицированного IFN- β -1a в препарате составляет только около 1% суммарного белка.

4. Характеристика IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру.

Модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN- β -1a подвергали SEC на аналитической фракционирующей колонке Superose 6 HR10/30 для FPLC, используя PBS pH 7,2 в качестве подвижной фазы. Колонку элюировали при 20 мл/ч и элюент контролировали в отношении поглощения при 280 нм, как показано на фиг. 5: панель А: стандарты молекулярной массы (670 кДа, тиреоглобулин; 158 кДа, гамма-глобулин; 44 кДа, овальбумин; 17 кДа, миоглобин; 1,3 кДа, витамин В12), панель В: IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом. Пегилированный IFN- β -1a элюировался в виде отдельного острого пика с кажущейся молекулярной массой около 200 кДа, что согласуется с большим гидродинамическим объемом PEG. Не наблюдалось признаков агрегатов. В препарате выявляли немодифицированный IFN- β -1a, но его количество было ниже предела количественного определения. На основании величины пика количества немодифицированного IFN- β -1a составляли 1% или меньше от всего продукта, что согласуется с наблюдениями с использованием SDS-ПААГ.

5. Анализ IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, с помощью пептидного картирования.

Специфичность реакции пегилирования оценивали пептидным картированием. Немодифицирован-

ный и модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом IFN- β -1a расщепляли эндопротеиназой Lys-C из *Achromobacter* (Wako Bioproducts) и полученные в результате продукты расщепления фракционировали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Vydac C₄, используя 30-минутный градиент от 0 до 70% ацетонитрила в 0,1% ТФУ. Элюент с колонки контролировали в отношении поглощения при 214 нм.

Все предполагаемые пептиды, получаемые при расщеплении IFN- β -1a эндопротеиназой Lys-C, идентифицированы ранее N-концевым секвенированием и масс-спектрометрией (Pepinsky et al., (2001) *J Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297: 1059), и из них только пептид, который содержит N-конец IFN- β -1a, был изменен модификацией 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом; о чем свидетельствует его исчезновение на карте. Таким образом, данные картирования свидетельствуют, что остаток PEG специфично связывается с данным пептидом. Данные, кроме того, свидетельствуют, что мишенью модификации PEG является N-конец белка, так как только N-концевая модификация может приводить к специфичной утрате данного пептида.

6. Стабильность IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом.

Чтобы тестировать стабильность IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, образцы разбавляли до 0,1 мкг/мл 100 мМ трис-HCl-буфером, pH 7,4, и затем инкубировали при 37°C до 7 дней. Образцы объемом 20 мкл (2 мкг) отбирали в 0, 2, 5 и 7 дни и анализировали в SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях, как показано на фиг. 6: дорожка А: маркеры молекулярной массы (сверху вниз; 100 кДа, 68 кДа, 45 кДа, 27 кДа, 18 кДа и 15 кДа, соответственно); дорожки В, С, D и E: IFN- β -1a, модифицированный mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, отобранный в 0, 2, 5 и 7 дни, соответственно. Не наблюдали признаков агрегации или дегградации пегилированного IFN- β -1a даже после 7 дней при 37°C.

Пример 3. Удельная активность IFN- β -1a человека в анализе противовирусной активности *in vitro*.

Удельную противовирусную активность образцов пегилированного IFN- β -1a тестировали на клетках карциномы легкого человека (клетки A549), которые были подвергнуты воздействию вируса энцефаломиокардита (ЕМС), используя метаболический краситель 2,3-бис-[2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил]-2Н-тетразолий-5-карбоксиянид (МТТ; М-5655, Sigma, St. Louis, MO) в качестве меры метаболически активных клеток, оставшихся после экспонирования с вирусом. Коротко, клетки A549 предварительно обрабатывали в течение 24 ч либо немодифицированным, либо пегилированным IFN- β -1a (начиная с 66,7 пг/мл, проводя серийные разведения в 1,5 раза до 0,8 пг/мл) перед заражением вирусом. Затем клетки заражали в течение 2 дней вирусом ЕМС в разведении, которое давало полную гибель клеток в отсутствие IFN. Затем планшеты проявляли с помощью МТТ. Маточный раствор МТТ готовили в концентрации 5 мг/мл в Р3S и стерильно фильтровали, и 50 мкл полученного раствора разбавляли в культурах клеток (100 мкл на лунку). После инкубации при комнатной температуре в течение 30-60 мин раствор МТТ/среда сливали, клетки промывали 100 мкл PBS и наконец метаболизируемый краситель солиubilizировали в 100 мкл 1,2 N HCl в изопропанол. Жизнеспособные клетки (которые определяли по наличию красителя) количественно оценивали по поглощению при 450 нм. Данные анализировали, нанося на графике поглощение против концентрации IFN- β -1a, и активность IFN- β -1a определяли в виде концентрации, при которой погибало 50% клеток, т.е. наблюдалось 50% цитопатическое действие (EC₅₀) или 50% от максимума OD₄₅₀. Анализ проводили восемь раз для немодифицированного IFN- β -1a и от трех до четырех раз для разных пегилированных образцов IFN- β -1a. Для каждого анализа получали точки данных в двух повторах для каждой концентрации белка. Типичные графики жизнеспособности клеток против концентрации немодифицированного или пегилированного IFN- β -1a показаны на фиг. 7А и 7В. На фиг. 7А символы означают следующее: немодифицированный IFN- β -1a (o), IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом (□), IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (Δ) и IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (◇). На фиг. 7В символы означают следующее: немодифицированный IFN- β -1a (o), IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом (□), IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом (Δ) и IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом (◇).

Значения EC₅₀ (концентрация при полумаксимальной защите от вируса) для IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом и 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом, показаны в табл. 4. Все пегилированные IFN- β -1a модифицировали и очищали до гомогенности, по существу, как описано для IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, как описано выше.

Таблица 4

Удельная противовирусная активность немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a

Белок	Средняя ЕС ₅₀ (пг/мл)
Немодифицированный IFN- β -1a	14 (пределы 12-16)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом	32 (пределы 26-37)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом	41 (пределы 36-47)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом	31 (пределы 27-35)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом	31 (пределы 25-39)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом	31 (пределы 27-34)
IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом	27 (пределы 25-29)

Пример 4. Фармакокинетика вводимого внутривенно немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a у крыс.

Канюлированным самкам крыс Lewis внутривенно вводили либо 80 мкг/кг немодифицированного IFN- β -1a, либо 24 мкг/кг одного из следующих пегилированных IFN- β -1a: IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом. Как немодифицированный, так и пегилированные белки готовили в виде препарата в присутствии 14-15 мг/мл ЧСА в качестве носителя. В случае немодифицированного белка кровь (0,2 мл) получали через канюлю в разных временных точках; непосредственно перед введением и в 0,083; 0,25; 0,5; 1,25; 3 и 5 часов после введения. В случае пегилированных белков кровь (0,2 мл) получали через канюлю непосредственно перед введением и в 0,083; 0,25; 0,5; 1,25; 3; 24; 48 и 72 часа после введения. Цельную кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки (Beckton Dickinson № 365956) и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин, давая возможность свернуться. Свернувшуюся кровь центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и извлекали сыворотку и хранили при -70°C вплоть до анализа.

Затем образцы сыворотки размораживали и тестировали в анализах на противовирусную активность. Образцы сыворотки разбавляли 1:50 в содержащей сыворотку среде (модифицированная по Дюльбекко среда Игла, содержащая 10% (об./об.) фетальной сыворотки теленка, по 100 ед. пенициллина и стрептомицина и 2 мМ L-глутамин) и тестировали в анализах на противовирусную активность. Образцы титровали в размеченные лунки 96-луночного планшета для культуры ткани, содержащие клетки карциномы легкого человека (A549, #CCL-185, ATCC, Rockville, MD). На каждом планшете анализировали разведения стандарта (66,7; 44,4; 29,6; 19,8; 13,2; 8,8; 5,9; 3,9; 2,6; 1,7; 1,2 и 0,8 пг/мл той же самой формы IFN- β -1a, вводимого крысам) и три образца сыворотки. Клетки A549 предварительно обрабатывали разведенными образцами сыворотки за 24 ч до заражения вирусом энцефаломиелокардита (ЕМС). После 2 дней инкубации с вирусом жизнеспособные клетки красили раствором МТТ (в концентрации 5 мг/мл в фосфатном буфере) в течение 1 ч, промывали фосфатным буфером и солубилизировали с помощью 1,2 N HCl в изопропанол. Затем лунки считывали при 450 нм. Стандартные кривые немодифицированного или пегилированного IFN- β -1a получали для каждого планшета и использовали для определения количества немодифицированного или пегилированного IFN- β -1a в каждом тестируемом образце. Затем рассчитывали фармакокинетические параметры, используя непараметрический анализ с помощью компьютерной программы WinNonLin, версия 3.0 или 3.3.

На фиг. 8А показана концентрация против временных точек для немодифицированного IFN- β -1a (верхняя панель) и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом (нижняя

панель), и на фиг. 8В показана концентрация против временных точек для IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (верхняя панель) и 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом (нижняя панель). Точки данных являются средними из измерений на 3 крысах.

В табл. 5 показаны фармакокинетические параметры C_{\max} (максимально наблюдаемая концентрация), $t_{1/2}$ (время полуэлиминации), AUC (площадь под кривой), Vss (объем распределения в стационарном состоянии), скорость клиренса и MRT (среднее время удержания) для немодифицированного IFN- β -1a и указанных форм пегилированного IFN- β -1a. Данные, показанные на фиг. 8А и 8В и в табл. 5, получали в одном и том же исследовании.

На фиг. 9А показана концентрация против временных точек для немодифицированного IFN- β -1a (верхняя панель) и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O- β -фенилпропиональдегидом (нижняя панель). Точки данных являются средними из измерений для 2 крыс. На фиг. 9В показана концентрация против временных точек для IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом (верхняя панель) и 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом (нижняя панель). Точки данных являются средними из измерений для 3 крыс.

В табл. 6 показаны фармакокинетические параметра для немодифицированного IFN- β -1a и указанных форм пегилированного IFN- β -1a. Данные, показанные на фиг. 9А и 9В и в табл. 6, получали в одном и том же исследовании; независимо от данных, показанных на фиг. 8А и 8В и в табл. 5.

Как очевидно из данных, показанных на фиг. 8А, 8В, 9А и 9В и в табл. 5 и 6, пегилирование IFN- β -1a молекулами PEG согласно изобретению улучшает фармакокинетические свойства IFN- β -1a. Во всех случаях пегилированные белки подвергались клиренсу менее быстро, чем немодифицированный IFN- β -1a, что приводило к скоростям клиренса 3,9-8,3 мл/ч/кг по сравнению с 160-170 мл/ч/кг для немодифицированного белка. Вследствие сниженных скоростей клиренса среднее время удержания (MRT) возрастало примерно с 1 ч для немодифицированного белка до 4,8-7,6 ч для пегилированных белков. Подобным образом время полуэлиминации ($t_{1/2}$) возрастало примерно от 1 ч для немодифицированного белка до 5,2-13 ч для пегилированных белков. Значения площади под кривой (AUC) также существенно увеличивались при пегилировании IFN- β -1a. Для немодифицированного IFN- β -1a AUC составляла примерно 0,5 мкг·ч/мл, тогда как для пегилированных белков значения AUC находятся в пределах примерно от 3 до 6 мкг·ч/мл, несмотря на тот факт, что дозы пегилированных белков были на уровне в 3,3 раза ниже, чем уровень немодифицированного белка. Для максимально наблюдаемой концентрации (C_{\max}) значения были, как правило, выше для немодифицированного IFN- β -1a, чем для пегилированных белков, отражая более низкую дозу вводимых модифицированных белков. Для объема распределения в стационарном состоянии (Vss) значения для всех пегилированных белков были ниже, чем для немодифицированного IFN- β -1a, что свидетельствует об ограничении их способности существовать в центральном отделе кровообращения.

Таблица 5

Фармакокинетические параметры для немодифицированного IFN- β -1a, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилацетальдегидом после внутривенного введения крысам^a.

Параметр	Единицы	Немодифици- рованный IFN- β -1a	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2- метилпропиональ- дегидом	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара- метилфенил-O-2- метилпропиональдегидом	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара- фенилацетальдегидом
C_{\max}	пг/мл	1400000	720000	710000	590000
$t_{1/2}$	час	0,98	13	11	6,8
AUC	пг·час/мл	510000	4800000	4500000	2900000
Vss	мл/кг	160	39	40	53
Клиренс	мл/час/кг	160	5,0	5,3	8,3
MRT	час	0,98	7,6	7,4	6,4

^a Показанные фармакокинетические данные для немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a получали в одном и том же исследовании.

Таблица 6

Фармакокинетические параметры для немодифицированного IFN- β -1a, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом, IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом, и IFN- β -1a, модифицированного 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом, после внутривенного введения крысам^a.

Параметр	Единицы	Немодифицированный IFN- β -1a	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-пара-фенилпропиональдегидом	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-фенилацетальдегидом	IFN- β -1a, модифицированный 20 кДа mPEG-O-мета-метилфенил-O-2-метилпропиональдегидом
C _{max}	пг/мл	670000	930000	550000	700000
t _{1/2}	час	0,92	5,2	7,7	7,1
AUC	пг•час/мл	470000	4700000	3800000	6200000
V _{ss}	мл/кг	140	25	46	21
Клиренс	мл/час/кг	170	5,1	6,4	3,9
MRT	час	0,81	4,8	7,2	5,5

^a Показанные фармакокинетические данные для немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a получали в одном и том же исследовании.

Пример 5. Сравнительная фармакокинетика и фармакодинамика немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a человека у приматов, отличных от человека.

Сравнительные исследования однократных и повторяющихся доз проводили, используя немодифицированный и пегилированный IFN- β -1a, чтобы определить их относительную стабильность и активность у приматов, отличных от человека. В указанных исследованиях фармакокинетику и фармакодинамику конъюгатов пегилированного IFN- β -1a сравнивают с фармакокинетикой и фармакодинамикой немодифицированного IFN- β -1a, и обоснованные выводы могут быть распространены на человека.

Животные и способы.

Исследование 1 (повторяющиеся дозы).

Данное исследование представляет собой исследование повторяющейся дозы в параллельных группах для оценки сравнительной фармакокинетики и фармакодинамики немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a. Для данного исследования используют здоровых приматов (например, макак-резус). Перед введением доз ветеринарный врач оценивает всех лабораторных животных в отношении признаков нарушения здоровья два раза в пределах 14 дней до введения тестируемого продукта; при этом одна оценка должна проводиться в пределах 24 ч до первого введения тестируемого продукта. Тестируемый продукт получают только здоровые животные. Оценки включают общий медицинский осмотр и заборы крови до введения дозы для определения исходного уровня клинической патологии и исходного уровня антител к IFN- β -1a. Всех животных взвешивают и регистрируют температуру тела в пределах периода времени, равного 24 ч, до введения тестируемого продукта. Набирают двенадцать субъектов и распределяют по группам из трех субъектов для получения ими 1×10^6 ед./кг немодифицированного или пегилированного IFN- β -1a, но в других отношениях идентичного IFN- β -1a. Введение проводят либо подкожным (п/к), либо внутривенным (в/в) способами. Шесть животных мужского пола получают тестируемый продукт в/в путем (по 3 на обработку), другие 6 животных мужского пола получают тестируемый продукт п/к путем (по 3 на обработку). Ни одно из животных не должно было ранее подвергаться обработке IFN- β . Каждому животному вводят дозу два раза, дозы разделены периодом, составляющим четыре недели. Объем дозы составляет 1,0 мл/кг. Отбор крови для фармакокинетического тестирования проводят в 0; 0,083; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 48; 72 и 96 ч после каждой инъекции. Образцы крови для измерения IFN-индуцируемого маркера биологического ответа, неоптерина сыворотки, отбирают в 0, 24, 48, 72, 96, 168, 336 и 504 ч после введения исследуемого лекарственного средства. Оценки во время периода исследования включают клинические исследования, проводимые через 30 мин и 1 ч после введения дозы для выявления признаков токсичности. Проводят ежедневные наблюдения в клетках и регистрируют общий вид, симптомы токсичности, дискомфорта и изменения в поведении. Массу тела и температуру тела регистрируют с регулярными интервалами на протяжении 21 дня после введения дозы.

Исследование 2 (однократная доза).

Данное исследование представляет собой исследование однократной дозы в параллельных группах для оценки сравнительной фармакокинетики и фармакодинамики немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a. Для данного исследования используют здоровых приматов (например, макак-резус). Перед введением доз ветеринарный врач оценивает всех лабораторных животных в отношении признаков нарушения здоровья два раза в пределах 14 дней до введения тестируемого продукта; при этом одна оценка должна проводиться в пределах 24 ч до первого введения тестируемого продукта. Тестируемый

продукт получают только здоровые животные. Оценки включают общий медицинский осмотр и заборы крови до введения дозы для определения исходного уровня клинической патологии и исходного уровня антител к IFN- β -1a. Всех животных взвешивают и регистрируют температуру тела в пределах периода времени, равного 24 ч, до введения тестируемого продукта. Набирают двадцать субъектов и распределяют их в одну из пяти групп, состоящих из четырех животных (2 самца и 2 самки на группу), для получения ими 1×10^6 ед./кг немодифицированного или пегилированного IFN- β -1a внутримышечно (в/м) или 2×10^5 ед./кг, 1×10^6 ед./кг или 5×10^6 ед./кг пегилированного IFN- β -1a внутривенно (в/в). Ни одно из животных не должно было ранее подвергаться обработке IFN- β . Объем дозы обычно составляет 1,0 мл/кг. Отбор крови для фармакокинетического тестирования проводят в 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12; 24; 36; 48 и 96 часов и в 7, 14, 21 и 28 день после введения исследуемого лекарственного средства. Образцы крови для измерения IFN-индуцируемого маркера биологического ответа, 2'-5'-олигоаденилатсинтазы (2'-5'-OAS), отбирают в 0, 12, 24, 48, 72 и 96 час и в 7, 14, 21 и 28 день после введения исследуемого лекарственного средства. Оценки во время периода исследования включают клинические исследования, проводимые через 30 мин и 1 ч после введения дозы для выявления признаков токсичности. Проводят ежедневные наблюдения в клетках и регистрируют общий вид, симптомы токсичности, дискомфорта и изменения в поведении. Массу тела и температуру тела регистрируют с регулярными интервалами на протяжении 28 дней после введения дозы.

Способы анализа.

Уровни IFN- β -1a в сыворотке количественно оценивают с использованием биоанализа цитопатического действия (CPE). В анализе CPE измеряют уровни опосредованной IFN противовирусной активности. Уровень противовирусной активности в образце отражает число молекул активного IFN, находящегося в данном образце во время отбора крови. Указанный способ был стандартным способом для оценки фармакокинетики IFN- β -1a. Анализ CPE выявляет способность IFN- β защищать клетки карциномы легкого человека (A549, #CCL-185, ATCC, Rockville, MD) от цитотоксичности, обусловленной вирусом энцефаломиокардита (ЕМС). Клетки предварительно инкубируют в течение 15-20 ч с образцами сыворотки, обеспечивая индукцию и синтез IFN-индуцируемых белков. Которые ответственны за противовирусный ответ. Затем добавляют вирус ЕМС и инкубируют еще в течение 30 ч до того, как проводят оценку цитотоксичности с использованием кристаллического фиолетового красителя. Внутренний стандарт IFN- β , а также внутренний стандарт пегилированного IFN- β -1a тестируют одновременно с образцами на каждом планшете для анализа. Указанный стандарт калибруют относительно стандартного образца природного IFN фибробластов человека (Второй международный стандарт интерферона ВОЗ, фибробласты человека, Gb-23-902-53). Каждый планшет для анализа также содержит лунки контроля клеточного роста, не содержащие ни одного вида IFN- β , ни ЕМС, и лунки для вирусного контроля, которые содержат клетки и ЕМС, но не содержат IFN- β . Также готовят контрольные планшеты, содержащие стандарт и образцы, чтобы определить влияние, если таковое существует, образцов на рост клеток. Указанные планшеты красят без добавления вируса. Образцы и стандарты тестируют в двух повторах на каждом из двух планшетов для параллельного анализа, получая четыре точки данных на образец. Указывается геометрическая средняя концентрация четырех повторов. Предел определения в данном анализе составляет 10 ед./мл. Концентрации неоптерина в сыворотке определяют в единицах, принятых в клинической фармакологии, используя коммерчески доступные анализы. Концентрации 2'-5'-OAS в сыворотке определяли в лаборатории по контракту, используя утвержденный коммерчески доступный анализ.

Фармакокинетические и статистические способы.

Используют компьютерную программу Rstrip™ (MicroMath, Inc., Salt Lake City, UT) для включения данных в фармакокинетические модели. Геометрические средние концентрации откладывают на графике по временным точкам для каждой группы. Так как результаты анализа выражают в разведениях, геометрические средние считаются более подходящими, чем арифметические средние. Уровни IFN в сыворотке корректируют относительно значений исходного уровня и нерегистрируемые концентрации в сыворотке устанавливают на уровне 5 ед./мл, который соответствует половине нижнего предела определения. Для данных в случае в/в инфузии двухпараметрическую модель в/в инфузии подгоняют к регистрируемым концентрациям в сыворотке каждого субъекта и данные п/к введения подгоняют к двухпараметрической модели инъекции.

Рассчитывают следующие фармакокинетические параметры:

- (i) наблюдаемую пиковую концентрацию, C_{\max} (ед./мл);
 - (ii) область под кривой от 0 до 48 ч, AUC (ед. X ч/мл), используя формулу трапеций;
 - (iii) период полуэлиминации (ч);
- и на основании данных в/в инфузии (при в/в использовании):
- (iv) полупериод распределения (ч);
 - (v) клиренс (мл/ч/кг);
 - (vi) кажущийся объем распределения Vd (мл/кг).

Компьютерную программу WinNonlin (версия 1.0, Scientific Consulting Inc., Apex, NC) используют для расчета периода полуэлиминации после в/в и п/к инъекции. Для неоптерина и 2'-5'-OAS представле-

ны арифметические средние для каждой группы. Рассчитывают E_{\max} , максимальное изменение от исходного уровня. C_{\max} , AUC и E_{\max} подвергают однофакторному дисперсионному анализу, чтобы сравнить группы дозирования. C_{\max} и AUC подвергали логарифмическому преобразованию перед анализом; представлены геометрические средние.

Пример 6. Антиангиогенное действие пегилированного IFN- β -1а человека; способность пегилированного IFN- β -1а ингибировать пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro*.

Эндотелиальные венозные клетки человека (Cell Systems, Cat. № 2V0-P75) и эндотелиальные клетки капилляров кожи человека (Cell Systems, cat. № 2M1-C25) поддерживают в культуре с использованием набора для среды CS-C (Cell Systems, cat. № 4Z0-500). За 24 ч до эксперимента клетки обрабатывают трипсином и ресуспендируют в среде для анализа, 90% M199 и 10% фетальной сыворотки теленка (FBS) и доводят до требуемой плотности клеток. Затем клетки высевают на покрытые желатином 24- или 96-луночные планшеты, при плотности либо 12500 клеток/луночку, либо 2000 клеток/луночку, соответственно. После инкубации в течение ночи среду для анализа заменяют свежей средой, содержащей 20 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека (bFGF) (Becton Dickinson, cat. № 40060) и добавляют различные концентрации немодифицированного или пегилированного IFN- β -1а согласно изобретению или позитивный контроль (в качестве позитивного контроля можно использовать эндостатин, а также антитело к bFGF). Конечный объем доводят до 0,5 мл в 24-луночной планшете или 0,2 мл в 96-луночной планшете. Через 72 ч клетки обрабатывают трипсином для подсчета на Coulter, замораживают для регистрации флуоресценции на CyQuant или метят [^3H]-тимидином. С помощью указанного анализа *in vitro* проводят тестирование пегилированных молекул IFN- β -1а человека согласно изобретению в отношении влияния на пролиферацию эндотелиальных клеток, которое может быть показателем антиангиогенного действия *in vivo*. См. O'Reilly, et al., Cell 88: 277-285 (1997).

Пример 7. Модели *in vivo* для тестирования антиангиогенного и неоваскуляризирующего действия пегилированного IFN- β -1а человека и пегилированного IFN- β -1а грызунов.

Немодифицированный IFN- β -1а и IFN- β -1а, модифицированный 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом, тестировали в отношении их способности ингибировать образование радиально ориентированных сосудов, проникающих на периферию опухолей злокачественной меланомы человека SK-MEL-1 у бестимусных гомозиготных голых мышей (nu/nu). Клетки SK-MEL-1 выращивали в культуре до 80% слияния и затем 2×10^6 клеток инокулируют интрадермально (объем 0,1 мл в 0 день) сбоку от средней аксиллярной линии бестимусным гомозиготным голым мышам (nu/nu) NCR (Taconic, Germantown, NY) трехнедельного возраста. Спустя 24 ч (день 1) группам из трех мышей в каждой вводят следующие подкожные дозы контрольного наполнителя, немодифицированного IFN- β -1а или IFN- β -1а, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом.

Группа А: 0,1 мл сывороточного альбумина человека в концентрации 45,6 мг/мл (контрольный наполнитель) только один раз в 1 день.

Группа В: 0,1 мл сывороточного альбумина человека в концентрации 45,6 мг/мл, содержащего 1 MU (5 мкг) немодифицированного IFN- β -1а ежедневно в 1-9 дни включительно.

Группа С: 0,1 мл сывороточного альбумина человека в концентрации 45,6 мг/мл, содержащего 1 MU единиц (10 мкг) IFN- β -1а, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом только один раз в 1 день.

Группа D: 0,1 мл сывороточного альбумина человека в концентрации 45,6 мг/мл (контрольный наполнитель) ежедневно в 1-9 дни включительно.

Мышей забивали на 10 день (авертин, 0,5 мл внутривенно) и оценивали место инокуляции опухоли в отношении образования новых сосудов, измеряемого исследователем вслепую, не зная групп обработки. Сосуды подсчитывали при постоянном увеличении под препарационной лупой. Каждый радиально ориентированный сосуд, проникающий в периферию опухоли, считали как один сосуд. Каждая группа состояла из трех мышей.

Как показано на фиг. 10 однократное введение 1 MU IFN- β -1а, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом (группа С), было также эффективным в снижении количества новых сосудов, как и ежедневное введение 1 MU немодифицированного IFN- β -1а (группа В). Однако действие IFN- β -1а, модифицированного 20 кДа mPEG-O-2-метилпропиональдегидом более выражено, если учесть, что ежедневное введение одного наполнителя оказывает некоторое ингибирующее действие (сравните группу А, однократное введение наполнителя, с группой D, ежедневное введение наполнителя).

Также разработано множество других моделей, которые можно использовать для тестирования антиангиогенного действия и действия, направленного против образования новых сосудов, пегилированных молекул согласно изобретению. Некоторые из указанных моделей описаны в патентах Соединенных Штатов 5733876 (Mar. 31, 1998: «Method of inhibiting angiogenesis») и 5135919 (Aug. 4, 1992: «Method and a pharmaceutical composition for the inhibition of angiogenesis»). Другие анализы включают анализ обнаженной хориоаллантоисной мембраны (CAM) Taylor and Folkman; Nature 297: 307 (1982) и Crum et al., Science 230: 1375 (1985); модель антиангиогенеза на основе методики дорсального воздушного мешка у мышей Folkman et al.; J. Exp. Med. 133 : 275 (1971) и анализ микрокарманов роговицы крыс Gimbrone, Jr.

et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 413 (1974), в котором индуцируют васкуляризацию роговицы у взрослых самцов крыс линии Sprague-Dawley (Charles River, Japan) путем имплантации в каждую роговицу шариков из сополимера этилен-винилацетата, пропитанных 500 нг bFGF (бычий, R & D Systems, Inc.). Кроме того, существует модель, в которой ангиогенез индуцируют у мышей NIH-Swiss или бестимусных голых мышей (nu/nu) после имплантации клеток карциномы легкого MCF-7 или клеток карциномы яичников NIH-OVCAR-3, как описано Lindner and Borden; Int. J. Cancer 71: 456 (1997). Также можно использовать дополнительные линии опухолевых клеток, включая (но не ограничивая указанным) клетки злокачественной меланомы человека SK-MEL-1, чтобы индуцировать ангиогенез, как описано выше. Различные дозы с различной частотой дозирования и в течение разных по продолжительности периодов можно тестировать как в случае немодифицированного, так и пегелированного белков IFN- β -1a согласно изобретению.

Другие способы тестирования пегелированного мышинового и крысиного IFN- β -1a в отношении антиангиогенного действия в модели на животных включают (но не ограничены указанным) протоколы скрининга новых потенциально противоопухолевых агентов, как описано в исходном Cancer Chemotherapy Reports, Part 3, Vol. 3, № 2, September 1972 и в приложении In Vivo Cancer Models, 1976-1982, NIH Publication № 84-2635, February 1984. Из-за видовой специфичности интерферонов типа I для оценки антиангиогенной активности пегелированного IFN- β в моделях на грызунах получают препараты пегелированного IFN- β грызунов (например, мыши и крысы). Примером таких способов скрининга является протокол тестирования антиангиогенного действия пегелированного мышинового IFN- β на имплантированную подкожно карциному легкого Льюиса.

Источник опухолевой линии.

Данная опухолевая линия возникла спонтанно в 1951 как карцинома легкого у мышей C57BL/6.

Краткое изложение способа тестирования.

Фрагмент опухоли имплантируют подкожно в подмышечную область мыши B6D2F1. Тестируемое средство (т.е. пегелированный интерферон согласно изобретению) вводят в различных дозах подкожно (п/к) или внутрибрюшинно (в/б) в разные дни после имплантации опухоли. Измеряемым параметром является среднее время выживания. Результаты выражены в виде процента от контрольного времени выживания.

Животные.

Размножение: мыши C57BL/6.

Тестирование: мыши B6D2F1.

Масса: мыши с изменением по массе в пределах 3 г, при этом минимальная масса составляет 18 г для самцов и 17 г для самок.

Пол: и для тестируемых, и для контрольных животных в одном эксперименте использовали один пол.

Источник: по возможности один источник для всех животных в одном эксперименте.

Объем эксперимента.

Десять животных на группу тестирования.

Пересадка опухоли.

Размножение:

Фрагмент: готовят фрагмент размером 2-4 мм п/к-опухоли донора.

Время: 13-15 дни.

Место: имплантируют фрагмент п/к в аксиальную область с помощью пункции в паховую область.

Тестирование:

Фрагмент: готовят фрагмент размером 2-4 мм п/к-опухоли донора.

Время: 13-15 дни.

Место: имплантируют фрагмент п/к в аксиальную область с помощью пункции в паховую область.

Схема тестирования.

День 0: имплантируют опухоль. Размножают бактериальные культуры. Тестируют соединение позитивного контроля в каждом эксперименте с нечетным номером. Готовят материалы.

Регистрируют гибель за сутки.

День 1: проверяют культуры. Отбраковывают эксперимент в случае загрязнения. Рандомизируют животных. Обработывают согласно инструкции (в 1 день и последующие дни).

День 2: повторно проверяют культуры. Отбраковывают эксперимент в случае загрязнения.

День 5: день взвешивания 2 и день начальной оценки токсичности тестируемого средства.

День 14: день контроля ранней гибели.

День 48: день контроля отсутствия поглощения.

День 60: окончание и оценка эксперимента. Оценка легких в отношении опухоли.

Качественный контроль.

Регистрируют соединение позитивного контроля (NSC2 6271; цитоксан в дозе 100 мг/кг/инъекцию) в каждом эксперименте с нечетным номером, схема введения которого представляет собой внутрибрю-

шинное введение только в 1 день. Нижний предел тест/контроль для позитивного контроля составляет 140%. Допустимое среднее время выживания в случае контроля без обработки составляет 19-35,6 дня.

Оценка.

Измеряемым параметром является среднее время выживания. Подсчитывают средние массы тела животных в день 1 и день 5, подсчитывают отношение тест/контроль для всех тестируемых групп. Подсчитывают средние массы тела животных в день определенного этапа и день конечной оценки. Отношение тест/контроль рассчитывают для всех тестируемых групп при > 65% оставшихся в живых на 5 день. Значение отношение тест/контроль < 86% свидетельствует о токсичности. Завышенную разницу в изменении массы тела (тест минус контроль) также можно использовать для оценки токсичности.

Критерии активности.

Исходное отношение тест/контроль, большее или равное 140%, считается необходимым для доказательства умеренной активности. Воспроизводимое значение отношения тест/контроль, большее или равное 150%, рассматривается как значительная активность.

Пример 8. Модели *in vivo* для тестирования антипролиферативного и противоопухолевого действия пегилированного IFN- β -1a человека и пегилированных IFN- β грызунов.

Имеются различные модели *in vivo* для тестирования антипролиферативного и противоопухолевого действия немодифицированного и пегилированного IFN- β -1a человека согласно изобретению. В модели, описанной Bailon et al., *Bioconjugate Chemistry* 12: 195 (2001), голым бестимусным мышам (Harlan) подкожно имплантируют 2×10^6 клеток почки человека A498, клеток почки человека ACHN или клеток почки человека G402 с задней стороны и дают возможность развиваться опухолям в течение 3-6 недель. Затем вводят немодифицированный или пегилированный IFN- β -1a человека в разных дозах, с разной частотой дозирования и в течение периодов времени разной продолжительности и измеряют объем опухоли и проводят сравнения между обработками. В другой модели, описанной Lindner and Borden, *J. Interferon Cytokine Res.* 17: 681 (1997), бестимусным самкам голых мышей BALB/c (nu/nu), подвергнутым овариэктомии, имплантируют 2×10^6 клеток MCF-7 (плюс эстрадиол), MDA-MB-231, MDA-MB-468 или клеток карциномы легкого человека BT-20, клеток карциномы яичника человека NIH-OVCAR-3, клеток карциномы ободочной кишки человека HT-29 или клеток злокачественной миеломы человека SK-MEL-1 или FEMX, в дерму, покрывающую молочные железы, ближе всего к подмышечной впадине, и оценивают размер опухолей как функцию времени. Затем вводят немодифицированный или пегилированный IFN- β -1a человека в разных дозах, с разной частотой дозирования и в течение периодов времени разной продолжительности и измеряют объем опухоли и проводят сравнение между обработками. Другие модели для тестирования антипролиферативного и противоопухолевого действия пегилированного IFN- β -1a человека включают (но не ограничены указанным) модели локального и метастазирующего рака легкого, описанные Qin et al., *Molecular Therapy* 4: 356 (2001), и модели ксенотрансплантатов у голых мышей метастазов злокачественной опухоли ободочной и прямой кишки из печени человека, описанные Tada et al., *J Clinical Investigation* 108: 83 (2001).

Другие способы тестирования пегилированного IFN- β мыши и крысы в отношении антипролиферативного и противоопухолевого действия в моделях на животных включают (но не ограничены указанным) модель злокачественной мезотелиомы у мышей, описанную Odaka et al., *Cancer Res.* 61: 6201 (2001), модели локальной и метастазирующей злокачественной опухоли легкого, описанные Qin et al., *Molecular Therapy* 4: 356 (2001), и модели метастазов злокачественной опухоли ободочной и прямой кишки в печени у сингенных мышей, описанные Tada et al., *J Clinical Investigation* 108: 83 (2001).

Пример 9. Модели *in vivo* для тестирования противовирусного действия пегилированного IFN- β мыши и пегилированного IFN- β -1a человека.

Имеется мышинная модель *in vivo* для тестирования влияния немодифицированного и пегилированного мышинового IFN- β на уровни вируса гепатита В человека (HBV) у HBV-трансгенных мышей SCID. Larkin et al., *Nature Medicine* 5: 907 (1999). В указанной модели трансгенные мыши SCID, несущие димер голова-к-хвосту генома HBV человека, имеют регистрируемые уровни репликативных форм HBV и прегеномной РНК в печени, и вируса HBV в сыворотке. Гепатоциты трансгенных мышей также позитивны в отношении белков HBsAg, HBcAg и HbxAg, показателей репликации вируса. Пример протокола для сравнения немодифицированного и пегилированного мышинового IFN- β в данной модели приведен ниже:

30 мышей (5 групп по 5, плюс 5 резервных) со сравнимым титром вируса титруют в двух независимых временных точках (по меньшей мере, с разницей в 1 неделю), чтобы установить титр исходного уровня и удостовериться, что их титры остаются постоянными до введения дозы мышинового IFN- β . Группам по 5 мышей вводят дозу 3 раза в неделю (понедельник, среду и пятницу) подкожно, используя следующие образцы, которые указаны в табл. 7.

Таблица 7

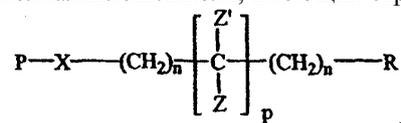
Группа	Образец дозирования			
	Контрольный	наполнитель	(1 мг/мл	мышинного
1	сывороточного альбумина (МСА)			
2	30 ед. немодифицированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА
3	300 ед. немодифицированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА
4	3000 ед. немодифицированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА
5	30 ед. пегилированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА
6	300 ед. пегилированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА
7	3000 ед. пегилированного	мышинного	IFN-β	в 1 мл/мл МСА

Титры вирусов определяют еженедельно во время введения доз и определяют еженедельно каждые две недели в течение 6 месяцев после введения доз. Строят графики титра вируса против времени для сравнения животных, обработанных наполнителем и IFN-β в отношении клиренса и повторного установления титра вирусов. Затем проводят второе исследование с соответствующими дозами немодифицированного и пегилированного мышинного IFN-β, используя 10-20 мышей на группу, всего 30-60 мышей (10-20 для контроля, 10-20 для немодифицированного мышинного IFN-β и 10-20 для пегилированного мышинного IFN-β). Титры вирусов оценивают, как описано выше, и при забивании, сыворотку анализируют в отношении титра вирусов, а также в отношении HbsAg с помощью SDS-ПААГ и Вестерн-блоттинга. Также извлекают печень, замораживают и фиксируют, как это требуется, и красят на наличие HbsAg, HbcAg и HbxAg. На образцах сыворотки и ткани также можно проводить другие подходящие гистологические, гистохимические или биохимические тесты, знакомые специалистам в данной области.

Также имеется мышинная модель *in vivo* для тестирования влияния немодифицированного и пегилированного IFN-β-1а человека на уровни вируса гепатита С человека (HCV) у мышей. Несущих химерную печень человека трансплантируют мышам SCID, несущим трансген активатора плазминогена (Alb-uPA) и мышам инокулируют сыворотку людей, инфицированных различными генотипами HCV. Привитые клетки печени человека становятся инфицированными вирусом, и вирус реплицируется. С помощью ПЦР могут быть количественно оценены уровни РНК HCV в сыворотке, а также уровни положительной и отрицательной (репликативной формы) РНК в клетках печени. Осуществляют соответствующий протокол исследования, подобный (но не ограничивающий) протоколу, описанному выше для немодифицированного и пегилированного мышинного IFN-β у трансгенных по HBV мышей SCID, чтобы оценить эффективность немодифицированного и пегилированного IFN-β-1а человека в данной модели, т.е. чтобы определить влияние обработки на титр HCV, гистологию печени, уровни ALT в сыворотке и наличие репликативных форм HCV в трансплантированной ткани печени человека. На образцах сыворотки и ткани также можно проводить другие подходящие гистологические, гистохимические или биохимические тесты, знакомые специалистам в данной области.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активированный полимер полиалкиленгликоля, имеющий структуру согласно формуле X



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформата, алкоксила, фосфирила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

Z и Z' в отдельности означают водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля,

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

r равно 1, 2 или 3.

2. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.1, где R означает остаток карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида или ацетала.

3. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.1, где R является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку и a является целым числом от 4 до 10000.

4. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.3, где E является метилом.

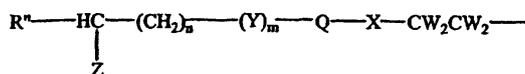
5. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.1, где R означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II



где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы X и биологически активным соединением или его предшественником, и a является целым числом от 4 до 10000.

6. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.5, где E выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

7. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.5, где E имеет структуру согласно формуле III



где X и Y независимо означают O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, ими́на, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, ими́ногруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, которые определены выше;

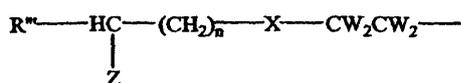
m равно 0 или 1;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником.

8. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.5, где E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, которые определены;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил и

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

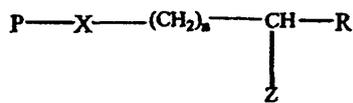
9. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.7, где R'' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

10. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.8, где R''' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

11. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.3, где E является регистрируемой меткой.

12. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.10, где E выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемилюминесцентных остатков и квантовых меток.

13. Активированный полимер полиалкиленгликоля, имеющий структуру согласно формуле Xa



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля; и

n равно 0 или является целым числом от 1 до 5.

14. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.13, где R означает остаток карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида или ацетала.

15. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.13, где P означает полиэтиленгликоль, имеющий структуру формулы II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку и a является целым числом от 4 до 10000.

16. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.15, где E является метилом.

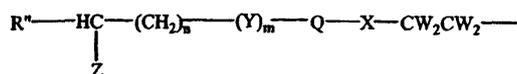
17. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.13, где P является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы X и биологически активным соединением или его предшественником, и a является целым числом от 4 до 10000.

18. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.17, где E выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

19. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.17, где E имеет структуру согласно формуле III



где X и Y независимо означают O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, описанные выше;

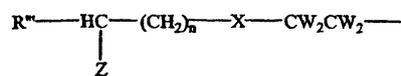
m равно 0 или 1;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником.

20. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.17, где E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, определенные выше;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом и

R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

21. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.19, где R'' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

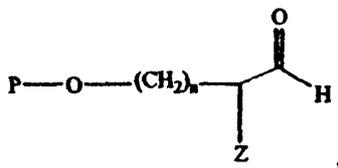
22. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.20, где R''' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещен-

ного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

23. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.15, где E является регистрируемой меткой.

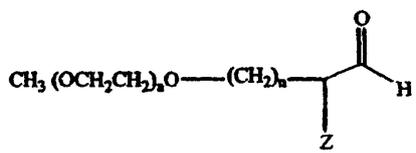
24. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.22, где E выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемилюминесцентных остатков и квантовых меток.

25. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.13, имеющий структуру согласно формуле XI



где P означает полимер полиалкиленгликоля и n и Z имеют значения, которые определены.

26. Активированный полиалкиленгликоль по п.15, имеющий структуру согласно формуле XII

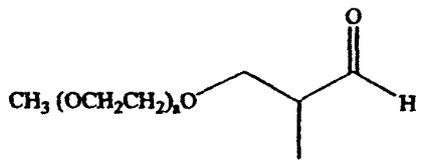


где n, a и Z имеют значения, которые определены.

27. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.26, где Z является метилом.

28. Активированный полимер полиалкиленгликоля по п.26, где n равно единице.

29. Активированный полимер полиалкиленгликоля, имеющий структуру согласно формуле XIII

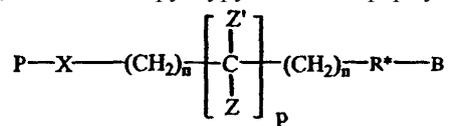


где a является целым числом от 4 до 10000.

30. Композиция, содержащая активированный полимер полиалкиленгликоля по п.1 и биологически активное соединение или его предшественник.

31. Композиция по п.30, где биологически активное соединение или его предшественник выбраны из группы, состоящей из пептида, аналога пептида, белка, фермента, малой молекулы, красителя, липида, нуклеозида, олигонуклеотида, аналога олигонуклеотида, сахара, олигосахарида, клетки, вируса, липосомы, микрочастицы, поверхности и мицеллы.

32. Полимерный конъюгат, имеющий структуру согласно формуле XXII



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщен-

ным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тiaoацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия В с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля;

В является интерфероном-бета;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

r равно 1, 2 или 3.

33. Полимерный конъюгат по п.32, где R* означает остаток карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида или ацеталя.

34. Полимерный конъюгат по п.32, где P является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку и a является целым числом от 4 до 10000.

35. Полимерный конъюгат по п.34, где E является метилом.

36. Полимерный конъюгат по п.32, где P является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



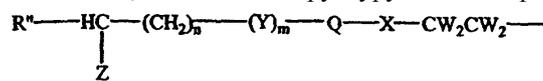
где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы II и биологически активным соединением или его предшественником, и a является целым числом от 4 до 10000.

37. Полимерный конъюгат по п.36, где E связывается с биологически активным соединением или его предшественником, отличным от В.

38. Полимерный конъюгат по п.36, где E образует дополнительную связь с биологически активным соединением В.

39. Полимерный конъюгат по п.36, где E выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

40. Полимерный конъюгат по п.36, где E имеет структуру согласно формуле III



где каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тiaoацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, которые определены выше;

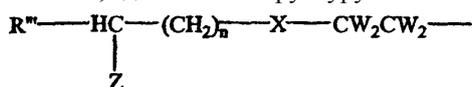
m равно 0 или 1;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5;

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником; и

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил.

41. Полимерный конъюгат по п.36, где E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, которые определены;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил и

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и биологически активным соединением или его предшественником.

42. Полимерный конъюгат по п.40, где R' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

43. Полимерный конъюгат по п.41, где R''' выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

44. Полимерный конъюгат по п.34, где E является регистрируемой меткой.

45. Полимерный конъюгат по п.44, где E выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемилюминесцентных остатков и квантовых меток.

46. Полимерный конъюгат по п.32, где R* является метиленом и B является биологически активной молекулой, связанной посредством амина.

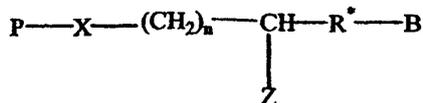
47. Полимерный конъюгат по п.46, где амин является аминоконцом пептида.

48. Полимерный конъюгат по п.47, где пептид является интерфероном.

49. Полимерный конъюгат по п.48, где пептид является интерфероном-бета.

50. Полимерный конъюгат по п.49, где интерферон-бета является интерфероном-бета-1a.

51. Полимерный конъюгат, имеющий структуру согласно формуле XXIIa



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

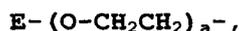
R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоно-

вой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником;

В означает биологически активную молекулу и
n равно 0 или является целым числом от 1 до 5.

52. Полимерный конъюгат по п.51, где R* означает остаток карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида или ацеталя.

53. Полимерный конъюгат по п.51, где Р является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



где E означает водород, C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью или регистрируемую метку и a является целым числом от 4 до 10000.

54. Полимерный конъюгат по п.53, где E является метилом.

55. Полимерный конъюгат по п.51, где Р является полиэтиленгликолем, имеющим структуру формулы II



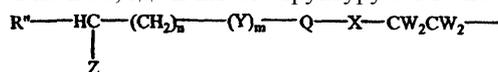
где E является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы II и биологически активным соединением или его предшественником, и a является целым числом от 4 до 10000.

56. Полимерный конъюгат по п.55, где E образует связь с биологически активным соединением или его предшественником, отличным от В.

57. Полимерный конъюгат по п.55, где E образует дополнительную связь с биологически активным соединением В.

58. Полимерный конъюгат по п.55, где E выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

59. Полимерный конъюгат по п.55, где E имеет структуру согласно формуле III



где каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформата, алкоксила, фосфорилата, фосфоната, аминогруппы, амидогруппы, амины, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R' и каждый Z независимо имеют значения, которые определены выше;

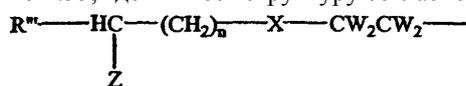
m равно 0 или 1;

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5;

R'' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы III и биологически активным соединением или его предшественником; и

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил.

60. Полимерный конъюгат по п.55, где E имеет структуру согласно формуле IV



где каждый X, Z и n независимо имеют значения, которые определены;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил и

R''' является остатком, подходящим для образования связи между соединением формулы IV и био-

логически активным соединением или его предшественником.

61. Полимерный конъюгат по п.59, где R" выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

62. Полимерный конъюгат по п.60, где R'" выбран из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля.

63. Полимерный конъюгат по п.53, где E является регистрируемой меткой.

64. Полимерный конъюгат по п.63, где E выбран из группы, состоящей из радиоактивных изотопов, флуоресцентных остатков, фосфоресцентных остатков, хемилюминесцентных остатков и квантовых меток.

65. Полимерный конъюгат по п.51, где R* является метиленом и B является биологически активной молекулой, связанной посредством амина.

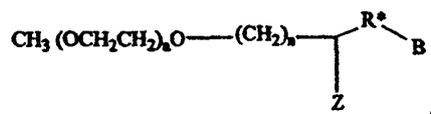
66. Полимерный конъюгат по п.65, где амин является аминоконцом пептида.

67. Полимерный конъюгат по п.66, где пептид является интерфероном.

68. Полимерный конъюгат по п.67, где пептид является интерфероном-бета.

69. Полимерный конъюгат по п.68, где интерферон-бета является интерфероном-бета-1a.

70. Полимерный конъюгат по п.51, имеющий структуру согласно формуле XXIII



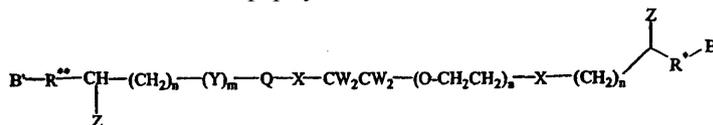
где n, a, R*, B и Z имеют значения, которые определены выше.

71. Полимерный конъюгат по п.70, где Z является метилом и n равно единице.

72. Полимерный конъюгат по п.71, где R* является метиленом и B является биологически активной молекулой, связанной посредством амина.

73. Полимерный конъюгат по п.72, где амин является аминоконцом интерферона-бета-1a.

74. Полимерный конъюгат согласно формуле XXIV



где каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью;

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

R* и R** независимо являются связывающими остатками;

B и B' независимо являются биологически активными молекулами;

m равно 0 или 1;

a является целым числом от 4 до 10000;

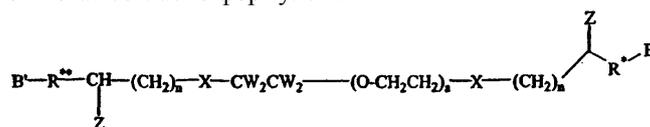
каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

75. Полимерный конъюгат по п.74, где B и B' представляют собой одну и ту же биологически активную молекулу.

76. Полимерный конъюгат по п.74, где B и B' являются разными биологически активными молеку-

лами.

77. Полимерный конъюгат согласно формуле XXV



где X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

каждый Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом;

R* и R** независимо являются связывающими остатками;

B и B' независимо являются биологически активной молекулой;

a является целым числом от 4 до 10000 и

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

78. Полимерный конъюгат по п.77, где B и B' представляют собой одну и ту же биологически активную молекулу.

79. Полимерный конъюгат по п.77, где B и B' являются разными биологически активными молекулами.

80. Фармацевтическая композиция, содержащая композицию по п.30 и фармацевтически приемлемый носитель.

81. Фармацевтическая композиция, содержащая полимерный конъюгат по п.32 и фармацевтически приемлемый носитель.

82. Фармацевтическая композиция, содержащая полимерный конъюгат по п.70 и фармацевтически приемлемый носитель.

83. Фармацевтическая композиция, содержащая полимерный конъюгат по п.74 и фармацевтически приемлемый носитель.

84. Фармацевтическая композиция, содержащая полимерный конъюгат по п.77 и фармацевтически приемлемый носитель.

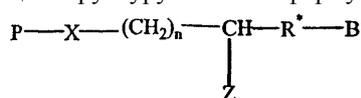
85. Фармацевтическая композиция по любому из пп.80-84, дополнительно содержащая биологически активное средство.

86. Фармацевтическая композиция по п.83, где биологически активное средство выбрано из группы, состоящей из пептида, аналога пептида, белка, фермента, малой молекулы, красителя, липида, нуклеозида, олигонуклеотида, аналога олигонуклеотида, сахара, олигосахарида, клетки, вируса, липосомы, микрочастицы, поверхности и мицеллы.

87. Фармацевтическая композиция по п.86, где биологически активным средством является противовирусное средство.

88. Композиция, содержащая продукт взаимодействия соединения по п.1 и биологически активного соединения или его предшественника.

89. Композиция по п.88, имеющая структуру согласно формуле XXII

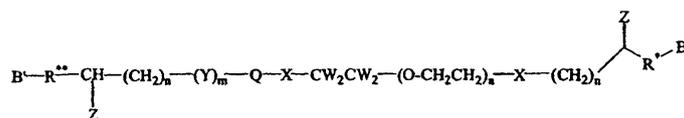


где все переменные имеют значения, определенные выше, и

где R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении или его предшественнике; и

B является биологически активным соединением или его предшественником.

90. Композиция по п.88, имеющая структуру согласно формуле XXIV



где все переменные имеют значения, определенные выше, и

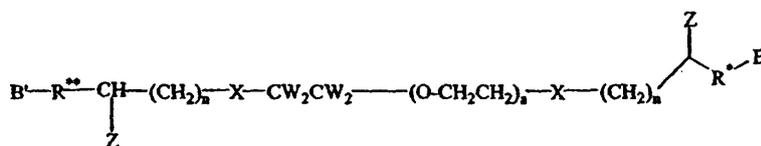
где каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении B или его предшественнике;

R** является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R' с химически активным остатком на биологически активном соединении B' или его предшественнике; и

B и B' независимо являются биологически активным соединением или его предшественником.

91. Композиция по п.88, имеющая структуру согласно формуле XXV



где все переменные имеют значения, определенные выше, и

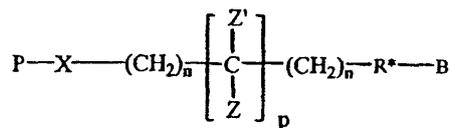
где каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

R* является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R с химически активным остатком на биологически активном соединении B или его предшественнике;

R** является связывающим остатком, образованным в результате взаимодействия R'' с химически активным остатком на биологически активном соединении B' или его предшественнике; и

B и B' независимо являются биологически активным соединением или его предшественником.

92. Способ лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXII



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником.

B означает интерферон;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

r равно 1, 2 или 3.

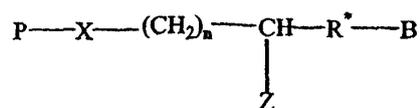
93. Способ по п.92, где композиция дополнительно содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусной малой молекулы, противовирусной нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства.

94. Способ по п.93, где противовирусное средство выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, 3ТС, FTC, MB686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

95. Способ по п.92, где вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

96. Способ лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающий введение

пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXIIIa



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетата, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником,

B означает интерферон, и

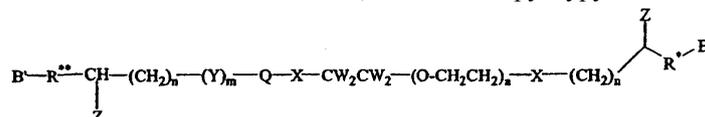
n равно 0 или является целым числом от 1 до 5.

97. Способ по п.96, где композиция дополнительно содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусной малой молекулы, противовирусной нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства.

98. Способ по п.97, где противовирусное средство выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, 3ТС, FTC, MB686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

99. Способ по п.96, где вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

100. Способ лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXIV



где каждый X и Y независимо означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

каждый R' и Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью;

каждый W независимо означает водород или C₁-C₇ алкил;

Q означает C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил означает C₁-C₂₀ насыщенный или ненасыщенный алкил, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиоацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имида, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

ногруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфамоида, сульфонамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником,

R** независимо является связывающим остатком,

V является интерфероном и B' - биологически активной молекулой;

m равно 0 или 1;

a является целым числом от 4 до 10000 и

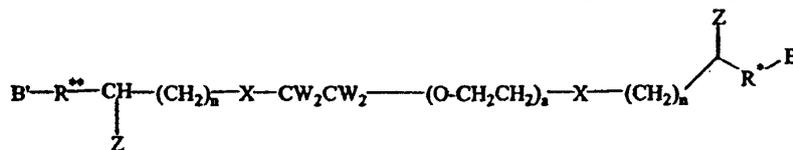
каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

101. Способ по п.100, где композиция дополнительно содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусной малой молекулы, противовирусной нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства.

102. Способ по п.101, где противовирусное средство выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, ЗТС, FTC, MB686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

103. Способ по п.100, где вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

104. Способ лечения пациента с поддающейся лечению вирусной инфекцией, включающий введение пациенту эффективного количества композиции, имеющей структуру согласно формуле XXV



где X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

каждый Z независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью;

R* образован в результате взаимодействия остатка, выбранного из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сулфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником,

R** независимо является связывающим остатком;

V является интерфероном и B' является биологически активной молекулой;

каждый W независимо является водородом или C₁-C₇ алкилом;

a является целым числом от 4 до 10000 и

каждый n независимо равен 0 или является целым числом от 1 до 5.

105. Способ по п.104, где композиция дополнительно содержит биологически активное средство, выбранное из группы, состоящей из противовирусной малой молекулы, противовирусной нуклеиновой кислоты и пептидного противовирусного средства.

106. Способ по п.105, где противовирусное средство выбрано из группы, состоящей из рибавирина, левовирина, ЗТС, FTC, MB686, зидовудина, ацикловира, ганцикловира, вирамида, VX-497, VX-950 и ISIS-14803.

107. Способ по п.104, где вирусной инфекцией является хронический гепатит С.

108. Способ лечения пациента, у которого предполагается инфекция гепатита С, включающий введение пациенту комбинации композиции по любому из пп.80-84 и противовирусного средства.

109. Способ по п.108, где композицию и противовирусное средство вводят одновременно.

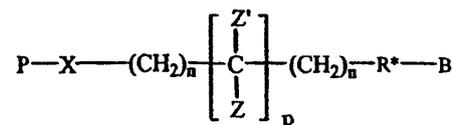
110. Способ по п.108, где композицию и противовирусное средство вводят последовательно.

111. Способ по п.108, где композицию и противовирусное средство вводят поочередно.

112. Способ по п.108, где противовирусным средством является рибавирин.

113. Способ лечения множественного склероза у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXII, где формула XXII

представляет собой



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфоцикла, гетероцикла, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфоцикла, гетероцикла, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия B с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацеталя, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля, с биологически активным соединением или его предшественником;

B является интерфероном-бета;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

p равно 1, 2 или 3.

114. Способ по п.113, где R* образован в результате взаимодействия B с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида и ацеталя.

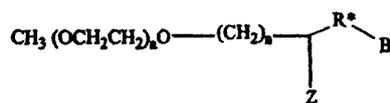
115. Способ по п.113 или 114, где R* является метиленом и B присоединен посредством амина.

116. Способ по любому из пп.113-115, где X означает O, S или NR'.

117. Способ по любому из пп.113-116, где Z и Z' независимо означает водород или насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью.

118. Способ по любому из пп.113-117, где B является интерфероном-бета-1a.

119. Способ лечения множественного склероза у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXIII, где формула XXIII представляет собой



где Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина,

имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

R* образован в результате взаимодействия В с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля;

В является интерфероном-бета;

n равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

a является целым числом от 4 до 10000.

120. Способ по п.119, где R* образован в результате взаимодействия В с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида и ацетала.

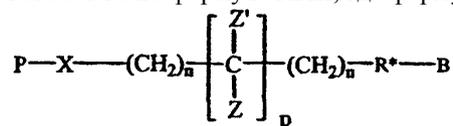
121. Способ по п.119 или 120, где Z означает насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью.

122. Способ по п.119 или 120, где n равен 1 и Z означает метил.

123. Способ по п.119, 121 или 122, где R* является метиленом и В присоединен посредством амина.

124. Способ по любому из пп.119-123, где В является интерфероном-бета-1a.

125. Способ лечения рака у пациента, включающий введение указанному пациенту эффективного количества полимерного конъюгата согласно формуле XXII, где формула XXII представляет собой



где P означает полимер полиалкиленгликоля;

X означает O, S, CO, CO₂, COS, SO, SO₂, CONR', SO₂NR' или NR';

R' означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы;

каждый Z и Z' независимо означает водород, насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную или гетероалкильную группу с прямой или разветвленной цепью, C₃-C₈ насыщенный или ненасыщенный циклический алкил или циклический гетероалкил, замещенную или незамещенную арильную или гетероарильную группу или замещенный или незамещенный алкарил, где алкил является C₁-C₂₀ насыщенным или ненасыщенным алкилом, или гетероалкарильную группу, где заместители выбраны из группы, состоящей из галогена, гидроксила, карбонила, карбоксилата, сложного эфира, формила, ацила, тиокарбонила, сложного тиоэфира, тиацетата, тиоформиата, алкоксила, фосфорила, фосфоната, фосфината, аминогруппы, амидогруппы, амидина, имина, цианогруппы, нитрогруппы, азидогруппы, сульфгидрила, сульфата, сульфоната, сульфоамила, сульфоамидогруппы, сульфонила, гетероциклила, аралкила, ароматического остатка, гетероароматического остатка, иминогруппы, силила, простого эфира и алкилтиогруппы, при условии, что по меньшей мере один Z или Z' не является водородом;

R* образован в результате взаимодействия В с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида, ацетала, гидроксильной группы, защищенной гидроксильной группы, карбоната, алкенила, акрилата, метакрилата, акриламида, замещенного или незамещенного тиола, галогена, замещенного или незамещенного амина, защищенного амина, гидразида, защищенного гидразида, сукцинимидила, изоцианата, изотиоцианата, дитиопиридина, винилпиридина, йодацетамида, эпоксида, гидроксисукцинимидила, азола, малеимида, сульфона, аллила, винилсульфона, трезила, сульфо-N-сукцинимидила, диона, мезила, тозила и глиоксаля;

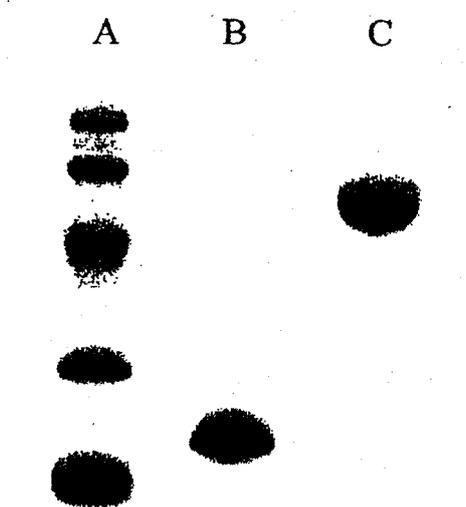
В является интерфероном-бета;

каждый n равен 0 или является целым числом от 1 до 5 и

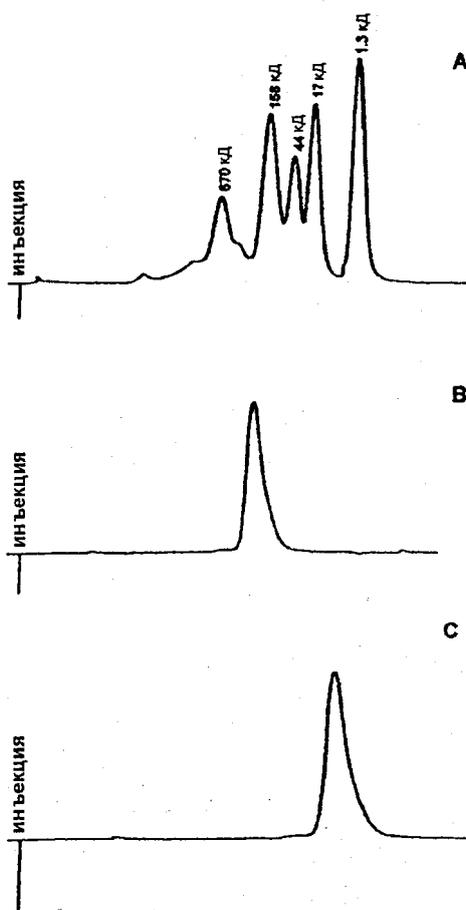
p равно 1, 2 или 3.

126. Способ по п.125, где R* образован в результате взаимодействия В с остатком, выбранным из группы, состоящей из карбоновой кислоты, сложного эфира, альдегида, гидрата альдегида и ацетала.

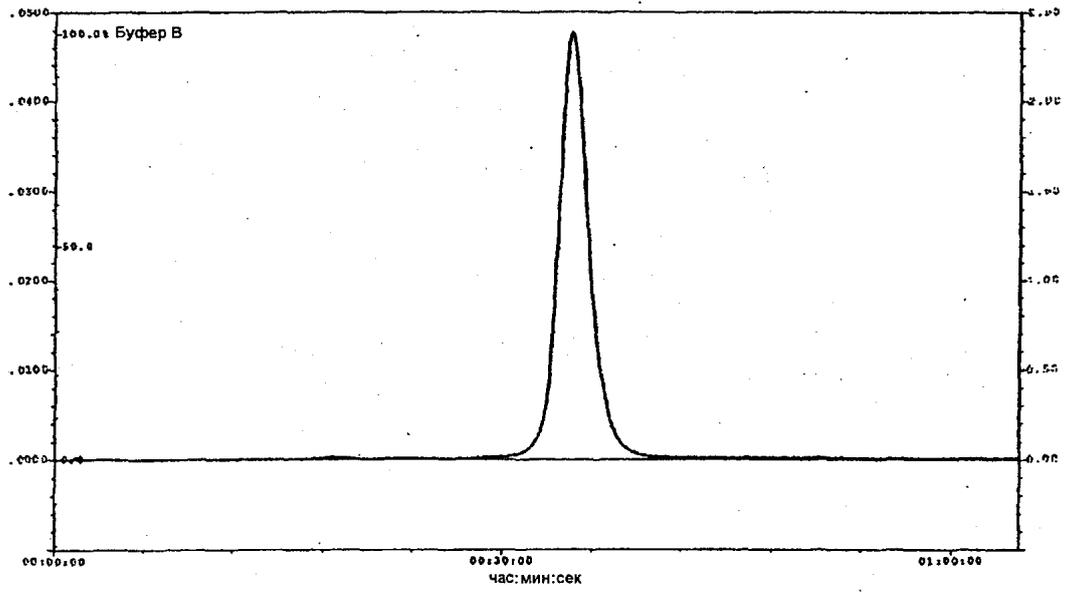
127. Способ по п.125 или 126, где R* является метилом и В присоединен посредством амина.
128. Способ по любому из пп.125-127, где X означает O, S или NR'.
129. Способ по любому из пп.125-128, где Z и Z' независимо означает водород или насыщенную или ненасыщенную C₁-C₂₀ алкильную группу с прямой или разветвленной цепью.
130. Способ по любому из пп.125-129, где В является интерфероном-бета-1а.
131. Способ по любому из пп.113-130, где указанным пациентом является человек.



Фиг. 1

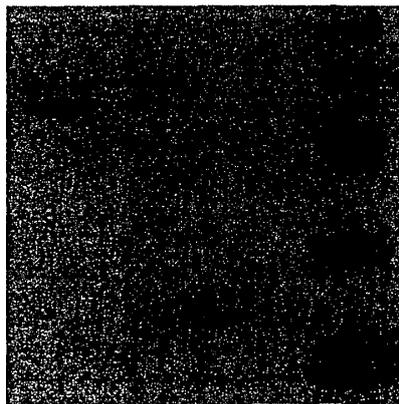


Фиг. 2

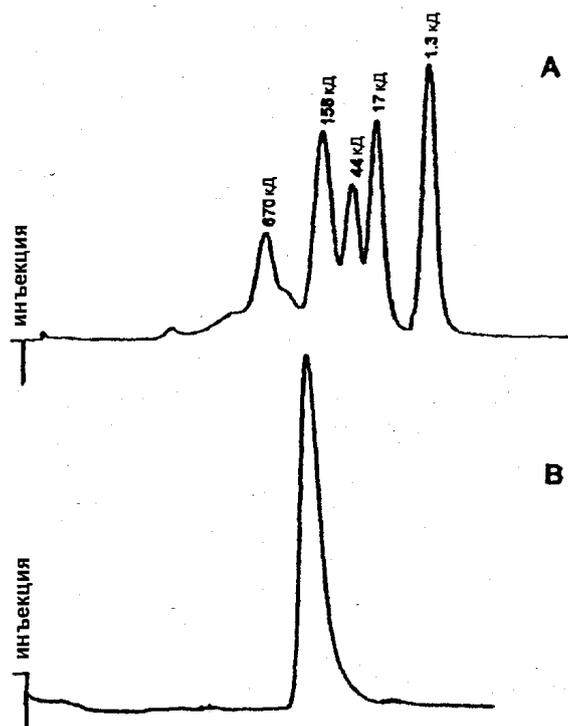


Фиг. 3

А В С



Фиг. 4

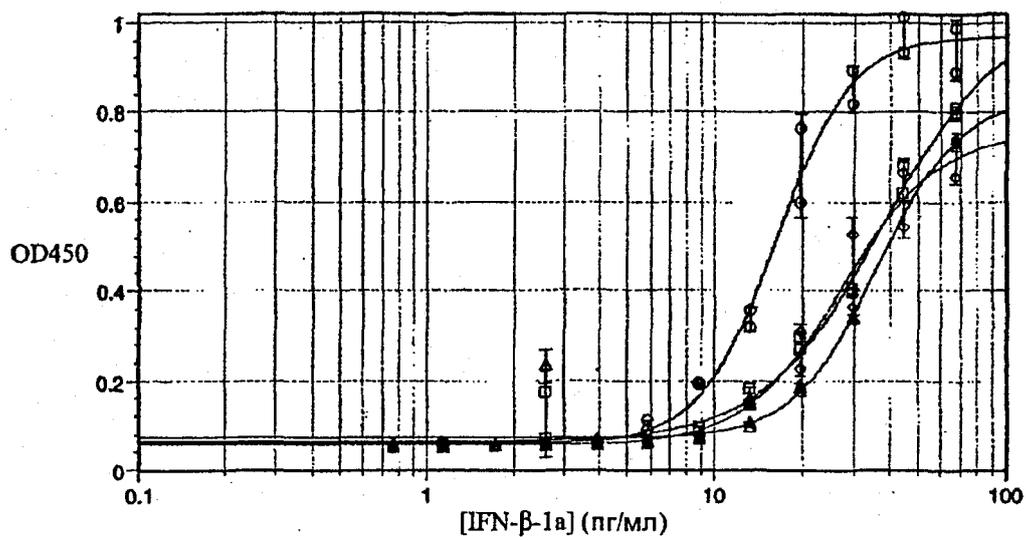


Фиг. 5

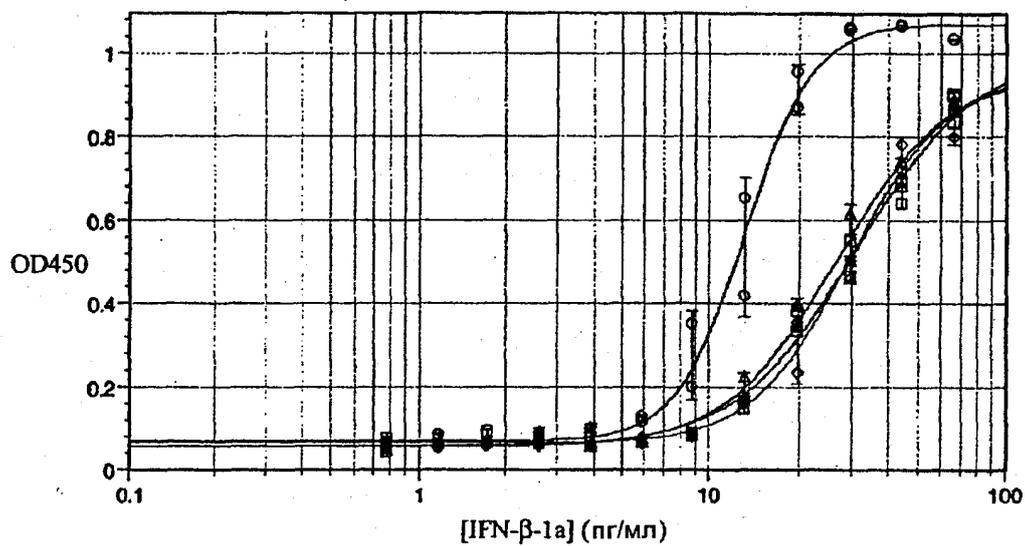
А В С D E



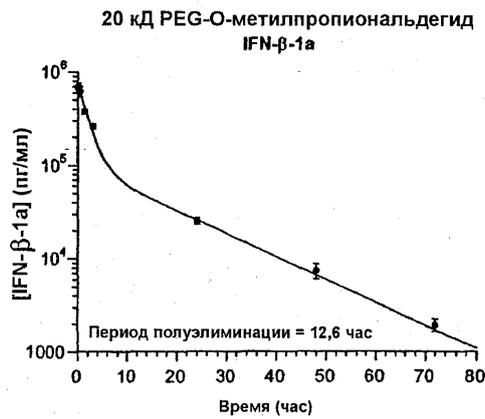
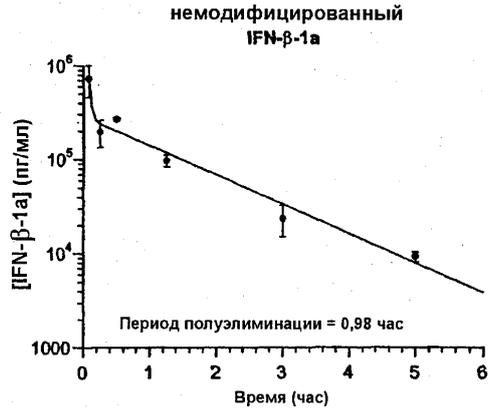
Фиг. 6



Фиг. 7А

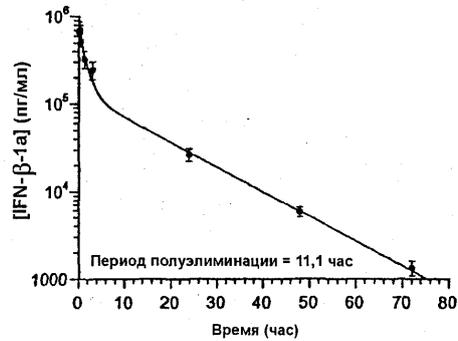


Фиг. 7В

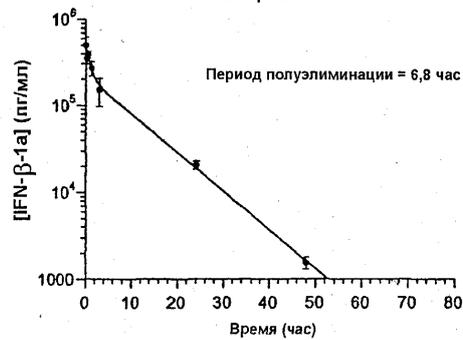


Фиг. 8А

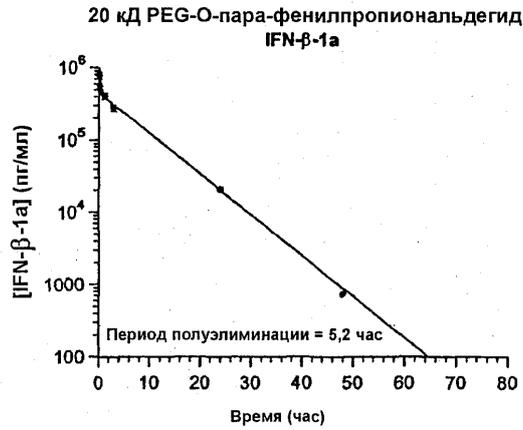
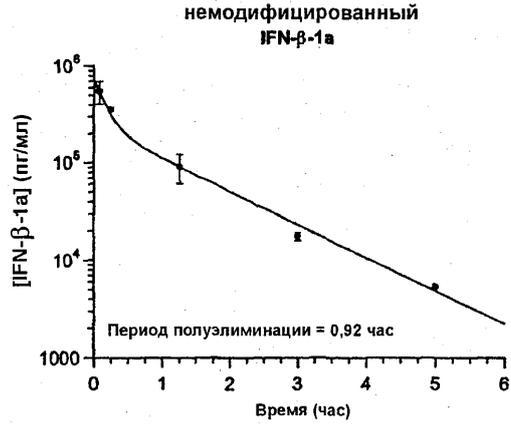
20 кД PEG-О-пара-метилфенил-О-2-метилпропиональдегид
IFN- β -1a



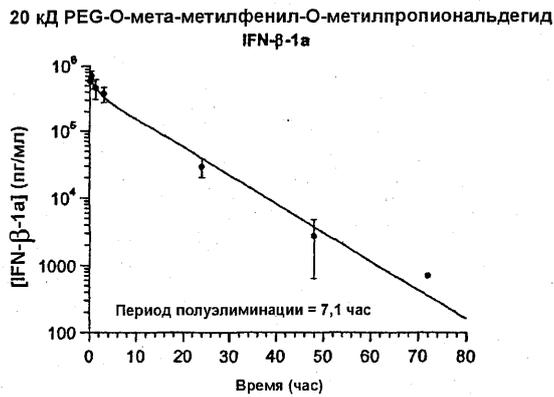
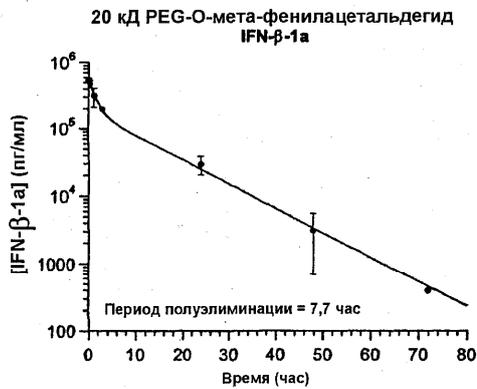
20 кД PEG-О-пара-фенилацетальдегид
IFN- β -1a



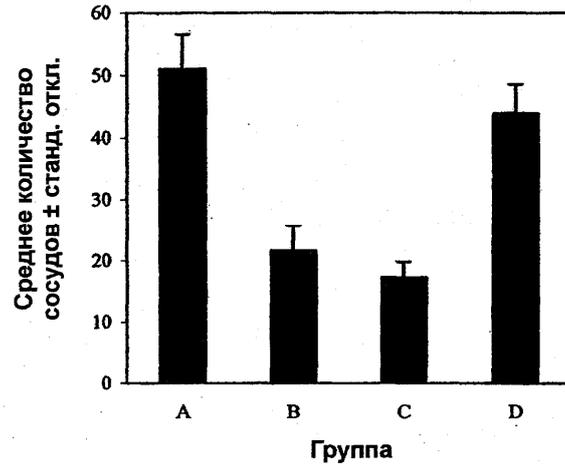
Фиг. 8В



Фиг. 9А



Фиг. 9В



Фиг. 10

