



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **88440** (13) **C2**
(51) **МПК (2009)**
A61K 38/21
A61P 13/12 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЛІКУВАННЯ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТУ ТА ХРОНІЧНОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЗА ДОПОМОГОЮ ІНТЕРФЕРОНУ-β

1

2

(21) a200501449

(22) 17.07.2003

(24) 26.10.2009

(86) PCT/US03/22440, 17.07.2003

(31) 60/396,393

(32) 17.07.2002

(33) US

(46) 26.10.2009, Бюл.№ 20, 2009 р.

(72) ЛОББ РОЙ Р., US

(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК., US

(56) US 5 908 626 A, 01.06.1999

SCHWARTING, A. ET AL: 'Prophylaxis and Therapy of Severe Lupus Nephritis by Interferon-beta Treatment' KIDNEY BLOOD PRESS. RES. vol. 24, no. 4-6, 2001, page 218

(57) 1. Застосування терапевтичного агента ІФН-β для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики гломерулонефриту у ссавця.

2. Застосування за п. 1, де гломерулонефрит вибраний з групи, що складається з фокального гломерулосклерозу, колабуючих гломерулопатій, хвороби з мінімальними змінами, серпоподібного гломерулонефриту, нефритичного синдрому, нефротичного синдрому, первинного гломерулонефриту, вторинного гломерулонефриту, проліферативного гломерулонефриту, мембранозного гломерулонефриту, імунотоксичного гломерулонефриту, гломерулонефриту з антитілами проти базальної мембрани клубочків (анти-GBM), олігоімунного гломерулонефриту, діабетичної гломерулопатії, хронічного гломерулонефриту та спадкового нефриту.

3. Застосування за п. 1 або п. 2, де терапевтичний агент ІФН-β містить зрілий ІФН-β.

4. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, де ІФН-β являє собою ІФН-β людини.

5. Застосування за п. 4, де ІФН-β щонайменше приблизно на 95 % ідентичний повнорозмірному зрілому ІФН-β людини, що має SEQ ID NO:4.

6. Застосування за п. 4, де ІФН-β являє собою ІФН-β-1a.

7. Застосування за п. 4, де ІФН-β являє собою ІФН-β-1b.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-7, де ссавець являє собою людину.

9. Застосування терапевтичного агента ІФН-β для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики хронічної ниркової недостатності у ссавця.

10. Застосування за п. 9, де терапевтичний агент ІФН-β містить зрілий ІФН-β.

11. Застосування за п. 9 або п. 10, де ІФН-β являє собою ІФН-β людини.

12. Застосування за п. 11, де ІФН-β щонайменше приблизно на 95 % ідентичний повнорозмірному зрілому ІФН-β людини, що має SEQ ID NO:4.

13. Застосування за п. 11, де ІФН-β являє собою ІФН-β-1a.

14. Застосування за п. 11, де ІФН-β являє собою ІФН-β-1b.

15. Застосування за будь-яким з пп. 9-14, де ссавець являє собою людину.

16. Застосування за будь-яким з пп. 1-15, у якому ссавець немає інших показань для лікування ІФН-β.

17. Застосування за п. 16, у якому у ссавця немає вірусної інфекції, яку можна лікувати за допомогою ІФН-β.

18. Застосування за п. 16, у якому ссавець не є носієм вірусу гепатиту.

19. Застосування за п. 16, у якому у ссавця немає вовчака.

20. Спосіб лікування гломерулонефриту у ссавця, що включає виявлення ссавця, що має гломерулонефрит, і введення даному ссавцеві терапевтично ефективної кількості терапевтичного агента ІФН-β.

21. Спосіб за п. 20, де гломерулонефрит вибраний з групи, що складається з фокального гломерулосклерозу, колабуючих гломерулопатій, хвороби з мінімальними змінами, серпоподібного гломерулонефриту, нефритичного синдрому, нефротичного синдрому, первинного гломерулонефриту, вторинного гломерулонефриту, проліферативного гломерулонефриту, мембранозного гломерулонефриту, мембранопроліферативного гломерулоне-

(13) **C2**

(11) **88440**

(19) **UA**

фриту, імунокомплексного гломерулонефриту, гломерулонефриту з антитілами проти базальної мембрани клубочків (анти-GBM), олігоімунного гломерулонефриту, діабетичної гломерулопатії, хронічного гломерулонефриту та спадкового нефриту.

22. Спосіб за п. 20 або п. 21, де терапевтичний агент ІФН- β містить зрілий ІФН- β .

23. Спосіб за будь-яким з пп. 20-22, де ІФН- β являє собою ІФН- β людини.

24. Спосіб за п. 23, де ІФН- β щонайменше приблизно на 95 % ідентичний повнорозмірному зрілому ІФН- β людини, що має SEQ ID NO:4.

25. Спосіб за п. 23, де ІФН- β являє собою ІФН- β - 1a.

26. Спосіб за п. 23, де ІФН- β являє собою ІФН- β - 1b.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 20-26, де ссавець являє собою людину.

28. Спосіб лікування хронічної ниркової недостатності у ссавця, що включає виявлення ссавця, який має хронічну ниркову недостатність, і введення даному ссавцеві терапевтично ефективної кількості терапевтичного агента ІФН- β .

29. Спосіб за п. 28, де терапевтичний агент ІФН- β містить зрілий ІФН- β .

30. Спосіб за п. 28 або п. 29, де ІФН- β являє собою ІФН- β людини.

31. Спосіб за п. 30, де ІФН- β щонайменше приблизно на 95 % ідентичний повнорозмірному зрілому ІФН- β людини, що має SEQ ID NO:4.

32. Спосіб за п. 30, де ІФН- β являє собою ІФН- β - 1a.

33. Спосіб за п. 30, де ІФН- β являє собою ІФН- β - 1b.

34. Спосіб за будь-яким з пп. 28-33, де ссавець являє собою людину.

35. Спосіб за будь-яким з пп. 20-34, у якому ссавець немає інших показань для лікування ІФН- β .

36. Спосіб за п. 35, у якому у ссавця немає вірусної інфекції, яку можна лікувати за допомогою ІФН- β .

37. Спосіб за п. 35, у якому ссавець не є носієм вірусу гепатиту.

38. Спосіб за п. 35, у якому у ссавця немає вовчка.

Хронічна ниркова недостатність (ХНН) може бути визначена як прогресуюче, перманентне і істотне зниження швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), зумовлене значною і триваючою втратою нефронів. Хронічна декомпенсована ниркова недостатність зазвичай починається з того моменту, коли хронічна ниркова недостатність (тобто перманентне зниження функції нирок щонайменше на 50-60%), веде до деякого ушкодження ниркової тканини, що викликає істотну втрату нефронів. Початкове ушкодження може бути пов'язане або не пов'язане з епізодом гострої ниркової недостатності, або воно може бути пов'язане з будь-якою кількістю ниркових порушень, включаючи, але не обмежуючись цим, кінцеву стадію ниркового захворювання, хронічну діабетичну нефропатію, діабетичну гломерулопатію, діабетичну ниркову гіпертрофію, гіпертензивний нефросклероз, гіпертензивний гломерулосклероз, хронічний гломерулонефрит, спадковий нефрит, ниркову дисплазію та хронічне відторгнення після трансплантації ниркового алотрансплантата. Незалежно від природи початкового ушкодження хронічна декомпенсована ниркова недостатність проявляється у вигляді «загальних кінцевих проявів» ознак і симптомів в результаті прогресуючої втрати нефронів і прогресивного зниження ХНН. Дане прогресуюче погіршення функції нирок є повільним, зазвичай таким, що триває у хворих людей багато років або десятиріч, але, мабуть, неминучим.

У людини при прогресуванні декомпенсованої ниркової недостатності і продовженні зниження ШКФ до менше ніж 10% від норми (наприклад, 5-10мл/хв) суб'єкт входить в кінцеву стадію ниркового захворювання (ESRD). Протягом даної фази

нездатність нефронів, що залишилися, адекватно видаляти відходи життєдіяльності з крові при утриманні корисних продуктів і підтримці балансу рідини та електролітів призводить до погіршення стану, при якому може швидко розвинутиися недостатність багатьох систем органів і особливо серцево-судинної системи. З цього моменту ниркова недостатність буде швидко прогресувати, призводячи до смерті, поки суб'єкт не почне зазнавати ниркової замісної терапії (тобто хронічного гемодіалізу, постійного перитонеального діалізу або трансплантації нирки).

Одним нирковим захворюванням, яке може вести до ХНН, є гломерулонефрит. Гломерулонефрит характеризується запаленням і виникаючим внаслідок цього збільшенням клубочків, що зазвичай зумовлено утворенням імунних комплексів. Акумуляція імунних комплексів у клубочках веде до запальних відповідей, що залучають, серед іншого, гіперплазію клітин, яка може викликати повну або часткову блокаду клубочкової фільтрації, серед інших факторів, звужуючи просвіти капілярів. Одним з результатів даного процесу є інгібування нормальної фільтраційної функції клубочка. Блокада може виникати у великій кількості клубочків, безпосередньо погіршуючи функцію нирок і часто викликаючи аномальне відкладення білків в стінках капілярів, що входять до складу клубочка. Таке відкладення може, в свою чергу, викликати пошкодження базальних мембран клубочків. У тих клубочках, які не заблоковані, розвивається підвищена проникність, що дозволяє великій кількості білка надходити до сечі, стан, що позначається як протеїнурія.

У багатьох випадках тяжкого гломерулонефриту в просторі Боумена утворюються патологічні структури, які називаються серпоподібними, додатково перешкоджаючи клубочковій фільтрації. Дані структури можуть бути виявлені тільки при мікроскопічному дослідженні зразків тканини, отриманих при біопсії або некропсії, і, таким чином, не завжди виявляються у тих хворих, у яких вони існують. Серпоподібні структури є виявом гіперплазії клітин і, як вважається, виникають через екстенсивну аномальну проліферацію пристінкових епітеліальних клітин, клітин, які утворюють внутрішню вистілку капсули Боумена. Клінічне дослідження показало, що існує приблизна кореляція між відсотком клубочків з серпоподібними структурами і тяжкістю захворювання і, таким чином, прогнозом для хворого. За присутності у великій кількості серпоподібних структур є ганою прогностичною ознакою.

Приблизно 600 хворих на мільйон в США знаходяться на хронічному діалізі кожного року при середній вартості, що наближується до 60000\$-80000\$ на хворого за рік. З нових випадків кінцевої стадії ниркового захворювання кожного року приблизно 28-33% зумовлено діабетичною нефропатією (або діабетичною гломерулопатією чи діабетичною нирковою гіпертрофією), 24-29% зумовлено гіпертензивним нефросклерозом (або гіпертензивним гломерулосклерозом) і 15-22% зумовлено гломерулонефритом. 5-річний коефіцієнт виживаності для всіх хворих на хронічному діалізі становить приблизно 40%, але для хворих, старших 65 років, коефіцієнт знижується до приблизно 20%. Отже, існує потреба в лікуванні, яке повинне запобігти прогресуючій втраті ниркової функції, яка примушує майже двісті тисяч хворих тільки в США ставати залежними від хронічного діалізу і яка веде до передчасної смерті десятків тисяч хворих кожний рік.

В одному з втілень винахід являє собою спосіб лікування гломерулонефриту або хронічної ниркової недостатності у ссавця, у якого є гломерулонефрит або ймовірність розвитку гломерулонефриту, що включає введення ссавцеві терапевтично ефективного кількості ІФН-β-вмісного терапевтичного агента. У винаході також пропонується застосування ІФН-β-вмісного терапевтичного агента для виробництва лікарського засобу для лікування або профілактики гломерулонефриту. Гломерулонефрит може бути вибраний з групи, що складається з фокального гломерулосклерозу, колабуючих гломерулопатій, захворювання з мінімальними змінами, серпоподібного гломерулонефриту, нефритичного синдрому, нефротичного синдрому, первинного гломерулонефриту, вторинного гломерулонефриту, проліферативного гломерулонефриту, мембранозного гломерулонефриту, мембранопроліферативного гломерулонефриту, імунокомплексного гломерулонефриту, гломерулонефриту з антитілами проти базальної мембрани клубочків (анти-GBM), оліго-імунного гломерулонефриту, діабетичного гломерулонефриту, хронічного гломерулонефриту та спадкового гломерулонефриту. ІФН-β може бути зрілим або незрілим і може бути позбавлений початкового метіоніну. ІФН-β може являти собою ІФН-β людини, наприклад, ІФН-β-1a та ІФН-β-1b. ІФН-β може бути

білком, який є щонайменше приблизно на 95% ідентичним повнорозмірному зрілому ІФН-β людини, що має SEQ ID NO: 4. ІФН-β може бути повнорозмірним зрілим ІФН-β людини, що включає або складається з SEQ ID NO: 4. ІФН-β може бути глікозильованим або не глікозильованим. Терапевтичний агент ІФН-β може також бути повнорозмірним зрілим ІФН-β людини, що включає SEQ ID NO: 4, сполучену з константною ділянкою молекули імуноглобуліну людини, наприклад, з важким ланцюгом IgG1. Наприклад, терапевтичний агент ІФН-β може включати SEQ ID NO: 14. Терапевтичний агент ІФН-β може також включати пегільований ІФН-β.

Терапевтичний агент ІФН-β може включати стабілізуючий агент, який може являти собою кислоту амінокислоту. Він також може являти собою аргінін. Терапевтичний агент ІФН-β може мати рН між приблизно 4,0 та 7,2. У переважному здійсненні терапевтичний агент ІФН-β являє собою AVONEX®.

Терапевтичний агент ІФН-β може вводитися парентерально, наприклад, внутрішньовенно (в. в.), підшкірно та внутрішньом'язово (в. м.). Спосіб може включати введення ссавцеві декількох доз терапевтичного агента ІФН-β. Терапевтичний агент ІФН-β можна вводити протягом декількох днів. Наприклад, його можна вводити щотижня в дозі 6 MIU. Його можна також вводити тричі на тиждень в дозі 3, 6 або 12 MIU. Введення терапевтичного агента ІФН-β може знизити, наприклад, протеїнурію, проліферацію клітин клубочків або запалення клубочків у ссавця.

У переважному здійсненні ссавцем є людина. Людина може бути пацієнтом. Ссавцем може бути ссавець, який має схильність до розвитку гломерулонефриту, що виявляється, наприклад, за ознаками розвитку запалення щонайменше одного клубочка. Ссавцем може бути ссавець, який має схильність до розвитку хронічної тяжкої ниркової недостатності або мати хронічну тяжку ниркову недостатність, що виявляється, наприклад, за наявністю хронічної ниркової недостатності. Ссавець ідентифікується як такий, що має гломерулонефрит, за присутністю запалення щонайменше одного клубочка; гіпертрофії клубочків; гіпертрофії клубочок; гломерулосклерозу; або тубулоінтерстиціального склерозу. У певних здійсненнях "ссавець" в даному контексті не означає ссавця, який є носієм вірусу, наприклад, вірусу гепатиту, такого як гепатит В або С, що викликає гломерулонефрит, або ссавця, в якого гломерулонефрит був викликаний вірусом. В інших втіленнях ссавець не страждає кінцевою стадією тяжкої ниркової недостатності або нирково-клітинною карциномою.

На Фіг.1 представлені послідовності нуклеотидів (SEQ ID NO: 11) і амінокислот (SEQ ID NO: 12) гібридного білка, що складається з сигнальної послідовності VCAM, з'єднаної зі зрілим повнорозмірним ІФН-β людини (SEQ ID NO: 3 і 4), в якому гліцин в амінокислоті 162 SEQ ID NO: 4 замінений на цистеїн, з'єднаний з шарнірними CH2 і CH3 доменами IgG1Fc людини (ZL5107).

На Фіг.2 представлені послідовності нуклеотидів (SEQ ID NO: 13) і амінокислот (SEQ ID NO: 14) гібридного білка, що складається з сигнальної послідовності VCAM, з'єднаної зі зрілим повнорозмірним ІФН-β людини (SEQ ID NO: 3 і 4), в якому гліцин в амінокислоті 162 SEQ ID NO: 4 замінений на цистеїн, з'єднаний з лінкером G4S, який з'єднаний з шарнірними CH2 і CH3 доменами IgGIFc людини (ZL6206).

На Фіг.3 представлений рівень протеїнуриї на 7-ий, 14-ий, 21-ий та 28-ий день у щурів, страждаючих нефротоксичним нефритом (NTN), які отримували 3×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день, 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («контроль») 6 днів на тиждень, починаючи з доби 0.

На Фіг.4 представлений рівень протеїнуриї на 7-ий, 14-ий, 21-ий та 28-ий день у щурів, страждаючих нефротоксичним нефритом (NTN), які отримували 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («контроль») 6 днів на тиждень, починаючи з доби 0.

На Фіг.5 представлена кількість проліферуючих клітин клубочків щурів, страждаючих нефротоксичним нефритом (NTN), які отримували 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («RSA») 6 днів на тиждень з доби 0 до 7-ї доби.

На Фіг.6 представлений рівень протеїнуриї на 7-ий та 10-ий день у щурів, страждаючих гломерулонефритом Thy 1, які отримували 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («RSA») 6 днів на тиждень, починаючи з доби 0 до 10-ї доби.

На Фіг.7 представлений рівень кліренсу креатину на 7-ий та 10-ий день у щурів, страждаючих гломерулонефритом Thy 1, які отримували 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («RSA») 6 днів на тиждень, починаючи з доби 0 до 10-ї доби.

На Фіг.8 представлена шкала проліферації клубочків на 10-ий день у щурів, страждаючих гломерулонефритом Thy 1, які отримували 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («RSA») 6 днів на тиждень, починаючи з доби 0 до 10-ї доби.

На Фіг.9 представлений рівень протеїнуриї на 7-ий і 14-ий день у щурів, страждаючих пуроміцин-амінонуклеозидною нефропатією (PAN), які отримували 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 або 6×10^5 одиниць ІФН-β щурів на день або тільки вектор («контроль»).

Винахід щонайменше частково ґрунтується на відкритті того, що щонайменше певного роду симптоми гломерулонефриту у ссавця можуть бути полегшені введенням ІФН-β ссавцеві. Зокрема, виявлено, що протеїнурія, проліферація клітин клубочків і запалення значно знижуються при введенні ІФН-β. Відповідно, у винаході пропонуються способи та композиції для лікування гломерулонефриту у ссавців.

1. Визначення

Для більш виразної і короткої вказівки предмету обговорення, заявленого у винаході, пропонуються наступні визначення специфічних термінів, що застосовуються в описі та доданій формулі винаходу.

Єдині форми, що застосовуються в описі та доданій формулі винаходу, включають численні загдки, якщо в контексті ясно не вказано інакше.

«Швидкість клубочкової фільтрації» або «ШКФ» пропорційна швидкості кліренсу в сечу речовини, що знаходиться в плазмі, яка не зв'язана з білками сироватки, вільно фільтрується клубочками та не секретується або не реабсорбується нирковими трубками. ШКФ (GFR) переважно визначається наступним рівнянням:

$$GFR = \frac{U_{\text{conc}} \times V}{P_{\text{conc}}}$$

де U_{conc} являє собою концентрацію маркера в сечі, P_{conc} являє собою концентрацію маркера в плазмі і V являє собою швидкість потоку сечі в мл/хв. Необов'язково ШКФ коректують на площу поверхні тіла. Отже, величини ШКФ, що застосовуються тут, можуть бути розглянуті як такі, що знаходяться в одиницях мл/хв/1,73м². Переважним вимірюванням ШКФ є кліренс інсуліну, але через важкість вимірювання концентрацій даної речовини в клінічній практиці зазвичай застосовують кліренс креатиніну. Наприклад, для здорового чоловіка середнього розміру (70кг, 20-40 років) типова ШКФ, виміряна за кліренсом креатиніну, як очікується, становить приблизно 125мл/хв при концентрації креатиніну в плазмі 0,7-1,5мг/дл. Для порівняння у жінки середнього розміру типова ШКФ, виміряна за кліренсом креатиніну, як очікується, становить приблизно 115мл/хв при рівні креатиніну 0,5-1,3мг/дл. У період гарного самопочуття величини ШКФ людини є відносно стабільними до віку приблизно 40 років, коли ШКФ зазвичай починає вікове зниження. Для суб'єктів, які прожили до віку 85 або 90 років, ШКФ може бути знижена до 50% в порівнянні з величинами у віці 40 років. Може бути запропоноване визначення «очікуваної ШКФ» або "GFR_{exp}" (ШКФ_{очікувана}) на основі врахування віку суб'єкта, маси, статі, площі поверхні тіла та ступеня розвитку м'язів, а також концентрації в плазмі деякої маркерної сполуки (наприклад, креатиніну), що визначається за тестуванням у крові. Таким чином, як приклад, очікувана ШКФ або ШКФ_{exp} може бути визначена як:

$$GFR_{\text{exp}} \approx \frac{(140 - \text{вік}) \times \text{маса(кг)}}{72 \times P_{\text{conc}}(\text{мг/дл})}$$

Дане визначення не враховує такі фактори, як площу поверхні, ступінь розвитку м'язів або відсоток жирової тканини в організмі. Однак, при застосуванні рівня креатиніну в плазмі як маркера дана формула застосовувалася для чоловіків як недорогий спосіб визначення ШКФ. Оскільки креатинін продукується нирково-смуғастими м'язами, очікувана ШКФ або GFR_{exp} жінок визначається за допомогою того ж рівняння, помноженого на 0,85 для врахування очікуваних відмінностей у м'язовій масі. [Дивись Lemann, et al., (1990) Am. J. Kidney Dis. 16 (3):2236-243].

«Гломерулонефрит», «нефрит», «гострий нефрит» і «гломерулярний нефрит» застосовуються тут як взаємозамінні терміни.

«ІФН-β-1а» відноситься до молекули ІФН-β, що має амінокислотну послідовність ІФН-β людини дикого типу та глікозильованої.

«ІФН-β-1b» відноситься до молекули ІФН-β, що має амінокислотну послідовність ІФН-β дикого типу, в якій цистеїн в положенні 17 замінений на серин; метіонін в положенні 1 («початковий метіонін») відсутній і молекула не глікозильована.

«Варіант ІФН-β» відноситься до білка ІФН-β дикого типу, що має одну або більше модифікацій, наприклад, делецій амінокислот, домішок, замін, посттрансляційну модифікацію або введення одного чи більше неіснуючих в природі амінокислотних залишків або лінкерів між ними. Частини ІФН-β включаються до терміну «варіант ІФН-β». «Біологічно активний варіант ІФН-β» являє собою варіант ІФН-β, який має щонайменше деяку активність при лікуванні ниркових порушень, наприклад, гломерулонефриту. Варіант ІФН-β може бути існуючим в природі ІФН-β, таким, що має, наприклад, вставку, делецію або заміну однієї або більше амінокислот по відношенню до ІФН-β дикого типу, тобто існуючим в природі мутантом або поліморфним варіантом, або він може бути неіснуючим в природі ІФН-β.

«Виділений» (такий, що застосовується взаємозамінно з «по суті чистий») при застосуванні до поліпептидів означає поліпептид, який внаслідок свого походження або маніпуляцій: (i) присутній в клітині-хазяїні як продукт експресії частини експресійного вектора; (ii) зв'язаний з білком або іншою хімічною частиною, відмінною від тієї, до якої він приєднаний в природі; або (iii) не існує в природі, наприклад, білок, який хімічно модифікований шляхом привішування або додання щонайменше однієї гідрофобної частини до білка, так що білок знаходиться у формі, яка не існує в природі. Під «виділенням» додатково мається на увазі білок, який: (i) синтезується хімічно; або (ii) експресується в клітині-хазяїні і очищується від зв'язаних або забруднюючих білків. Термін зазвичай означає поліпептид, який відділений від інших білків і нуклеїнових кислот, з якими він співіснує в природі. Краще, щоб поліпептид був також відділений від речовин, таких як антитіла або матрикси гелю (поліакриламід), які застосовують для його очищення. «Виділений» (такий, що застосовується взаємозамінно з «по суті чистий») при застосуванні до нуклеїнових кислот відноситься до полінуклеотиду РНК або ДНК, частини геномного полінуклеотиду, кДНК або синтетичного полінуклеотиду, який внаслідок свого походження або маніпуляцій: (i) не зв'язаний з повним полінуклеотидом, з яким він зв'язаний в природі (наприклад, присутній в клітині-хазяїні як експресійний вектор або його частина); або (ii) зв'язаний з нуклеїновою кислотою або іншою хімічною частиною, відмінною від тієї, до якої він приєднаний в природі; або (iii) не існує в природі. Під «виділеною» додатково мається на увазі полінуклеотидна послідовність, яка (i) ампліфікується *in vitro* за допомогою, наприклад, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); (ii) синтезується хімічно; (iii) продукується рекомбінантно шляхом клонування; або (iv) очищується, наприклад, шляхом відщеплення та розділення на гелі.

Нуклеїнова кислота є «оперативно пов'язаною» з іншою нуклеїновою кислотою, коли вона розміщена в функціональному взаємозв'язку з послідовністю іншої нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для препослідовності лідера секреції (наприклад, сигнальної послідовності сигнального пептиду) оперативно зв'язана з ДНК, що кодує поліпептид, якщо ДНК експресується у вигляді пребілка, який бере участь в секреції поліпептиду; промотор або енхансер оперативно зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію послідовності; і зв'язувальний сайт рибосоми оперативно зв'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він розташований так, що сприяє трансляції. Зазвичай «оперативно зв'язані» означає, що послідовності ДНК, будучи зв'язаними, є стичними і у випадку, наприклад, лідери секреції стикаються в процесі читування. Скріплення супроводжується лігуванням у відповідних сайтах рестрикції. Якщо таких сайтів не існує, можуть бути використані синтетичні олігонуклеотидні адаптери або лінкери відповідно до загальноприйнятої практики.

«Відсоток ідентичності» або «відсоток схожості» відноситься до схожості послідовностей двох поліпептидів, молекул або двох нуклеїнових кислот. Коли положення в обох з двох послідовностей, що порівнюються, зайняте однією і тією ж мономерною одиницею основи або амінокислоти, то відповідні молекули є ідентичними за даним положенням. Відсоток ідентичності двох послідовностей є функцією кількості відповідних або ідентичних положень, що є в двох послідовностях, розділеної на кількість порівнюваних положень $\times 100$. Наприклад, якщо 6 з 10 положень в двох послідовностях відповідають або ідентичні, то дві послідовності гомологічні на 60%. Як приклад, послідовності ДНК CTGACT і CAGGTT проявляють 50% гомологію (3 з сумарних 6 положень відповідають). Зазвичай порівняння роблять, коли дві послідовності вирівняні для отримання максимальної ідентичності. Таке вирівнювання може бути забезпечене при застосуванні, наприклад, способу Karlin і Altschul, описаного нижче більш детально. По відношенню до нуклеїнової кислоти «відсоток гомології» і «відсоток ідентичності» застосовується взаємозамінно, в той час як по відношенню до поліпептиду «відсоток гомології» відноситься до міри схожості, коли амінокислоти, що представляють консервативні заміни інших амінокислот, розглядаються як ідентичні цим іншим амінокислотам. «Консервативна заміна» залишку в базовій послідовності являє собою заміну амінокислотою, котра фізично або функціонально схожа з відповідним базовим залишком, наприклад, має схожий розмір, конфігурацію, електричний заряд, хімічні властивості, включаючи здатність утворювати ковалентні або водневі зв'язки, або тому подібне. Особливо переважними консервативними замінами є ті, які задовольняють критерії, визначені для «прийнятих точкових мутацій» в Dayhoff et al., 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: Suppl. 3, chapter 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, Відсоток гомології або ідентичності двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнових кислот може

бути визначений із застосуванням алгоритму вирівнювання Karlin і Altschul [Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 2264 (1990)], модифікованого Karlin і Altschul [Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 5873 (1993)]. Такий алгоритм включено до програми NBLAST або XBLAST у Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). BLAST пошуки виконуються за допомогою програми NBLAST, бальна оцінка=100, довжина послідовностей=12, для отримання нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеїновій кислоті винаходу. BLAST пошуки білків виконуються за допомогою програми XBLAST, бальна оцінка=50, довжина послідовностей=3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних базовому поліпептиду. Для одержання вирівнювань з пропусками для порівнянь застосовується BLAST з пропусками, [як описано в Altschul et al., Nucleic Acid Res., 25: 3389 (1997)]. При застосуванні BLAST і BLAST з пропусками застосовуються параметри відповідних програм (XBLAST і NBLAST) за умовчанням. Дивись <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Терапевтичний агент ІФН- β , як зазначається, має «терапевтичну ефективність» і кількість терапевтичного агента ІФН- β , як зазначається, є «терапевтично ефективною», якщо введення даної кількості терапевтичного агента ІФН- β є достатнім для індукції клінічно значного поліпшення стандартних маркерів функції нирок при введенні суб'єкту (наприклад, на тваринній моделі або людині), який страждає або відноситься до групи ризику розвитку гломерулонефриту або хронічної ниркової недостатності. Такі маркери ниркової функції добре відомі в медичній літературі і включають, не обмежуючись цим, швидкості збільшення рівнів азоту сечовини BUN, швидкості збільшення креатиніну сироватки, статичні вимірювання BUN, статичні вимірювання креатиніну сироватки, швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ), відношення BUN/креатинін, сироваткові концентрації натрію (Na⁺), відношення сеча/плазма для креатиніну, відношення сеча/плазма для сечовини, осмотичний тиск сечі, добову продукцію сечі тощо [дивись, наприклад, Brenner and Lazarus (1994) in Harrison's Principles of Internal Medicine, 13th edition, Isselbacher et al., eds., McGraw Hill Text, New York; Luke and Strom (1994), in Internal Medicine, 4th Edition, J.H. Stein, ed., Mosby-Year Book, Inc. St. Louis]. У переважному здійсненні введення терапевтично ефективної кількості терапевтичного агента ІФН- β призводить до зниження протеїнурії, проліферації клітин клубочків або до зниження присутності запальних клітин, наприклад, CD8⁺ Т-клітин і макрофагів в клубочках.

2. Терапевтичні агенти ІФН- β

Терапевтичні агенти ІФН- β , які можуть бути застосовані за винаходом, включають ІФН- β дикого типу та їх біологічно активні варіанти, наприклад, існуючі в природі і не існуючі в природі варіанти. Нуклеотидні та амінокислотні послідовності існуючого в природі людського ІФН- β дикого типу представлені в SEQ ID NO: 1 і 2, відповідно, які ідентичні номерам доступу GenBank NO: M28622 і AAA36040, відповідно. Дані ІФН описуються також, наприклад, в Seghal (1985) J. Interferon Res. 5:521. Повнорозмірний білок ІФН- β людини складає по

довжині 187 амінокислот, і кодує послідовність SEQ ID NO: 1 відповідає нуклеотидам 76-639. Сигнальна послідовність відповідає амінокислотам з 1 по 21. Амінокислотна послідовність зрілої форми даного ІФН- β відповідає амінокислотам 22-187 (нуклеотиди 139-639 SEQ ID NO: 1). Зрілий білок ІФН- β людини і кодує його нуклеотидна послідовність представлені в SEQ ID NO: 4 і 3, відповідно.

ІФН- β , який продукується клітинами ссавців, є глікозилізованим. Існуючий в природі ІФН- β дикого типу глікозилізований по залишку 80 (Asn 80) зрілого поліпептиду SEQ ID NO: 4 або залишку 101 (Asn 101) незрілого поліпептиду SEQ ID NO: 2.

Терапевтичні агенти ІФН- β також включають ІФН- β , що не відноситься до людини, наприклад, хребетного, такого як ссавець, наприклад, не людиноподібних приматів, бичачий, овечий, свинний, кінський, котячий, собачий, щурячий та мишачий; або птахів чи амфібій. Послідовності ІФН- β даних видів можуть бути одержані з GenBank і/або публікацій, або вони можуть бути визначені з нуклеїнових кислот, виділених при м'яких умовах гібридації з геном ІФН- β інших видів.

Варіанти білків ІФН- β дикого типу включають білки, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше приблизно на 70%, 80%, 90%, 95%, 98% або 99% ідентична або гомологічна ІФН- β дикого типу, наприклад, ІФН- β людини, що має SEQ ID NO: 2 або 4. Варіанти можуть мати одну або більше заміни амінокислот, делецій або добавок. Наприклад, можуть бути застосовані біологічно активні фрагменти білків ІФН- β дикого типу. Такі фрагменти можуть мати 1, 2, 3, 5, 10 або 20 амінокислот, видалених, доданих або замінені на С- або N-кінці білка. Варіанти можуть також мати 1, 2, 3, 5, 10 або 20 амінокислотних замін, делецій або добавок. Деякі варіанти можуть мати менш ніж приблизно 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7 або 5 амінокислотних замін, делецій або добавок. Заміни можуть бути існуючими в природі амінокислотами або їх аналогами, наприклад, D-стереоізомерними амінокислотами.

В обсяг винаходу також входять варіанти ІФН- β , що кодується нуклеїновими кислотами, які гібридизуються в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, що кодує існуючий в природі ІФН- β , наприклад, представлений послідовностями SEQ ID NO: 1 або 3, або комплементарними їм. Відповідна суворість умов, які сприяють гібридизації ДНК, наприклад, 6,0 x хлорид натрію/цитрат натрію (SSC) при приблизно 45°C з подальшим промиванням 2,0xSSC при 50°C, відомі фахівцям в даній галузі техніки або можуть бути знайдені в Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Наприклад, концентрація солі на стадії промивання може бути вибрана від м'яких умов гібридизації - приблизно 2,0xSSC при 50°C до суворих умов - приблизно 0,2xSSC при 50°C. Крім того, температура на стадії промивання може бути збільшена від м'яких умов - при кімнатній температурі приблизно 22°C, до дуже суворих умов - при приблизно 65°C. Як температуру, так і сіль можна варіювати, або температуру та концентрацію солі можна підтримувати постійними при

зміні іншої змінної. У переважному здійсненні нуклеїнова кислота, що кодує варіант ІФН-β, буде гібридуватися з однією з SEQ ID NO: 1 або 3 або комплементарних їм в помірно суворих умовах, наприклад, і, включаючи промивання при приблизно 2,0×SSC і приблизно 40°C. В особливо переважному здійсненні нуклеїнова кислота, що кодує варіант ІФН-β, буде зв'язуватися з однією з SEQ ID NO: 1 або 3 або комплементарних їм в дуже суворих умовах, наприклад, і, включаючи промивання при приблизно 0,2×SSC і приблизно 65°C.

Прикладами модифікацій є консервативні модифікації, які надають мінімального ефекту вторинній та третинній структурі білка. Приклади консервативних заміни включають описані Dayhoff в Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978) і Argos в EMBO J., 8, 779-785 (1989). Наприклад, амінокислоти, що належать до однієї з наступних груп, являють собою консервативні заміни: ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe, lys, arg, his; і phe, tyr, trp, his.

Інші модифікації включають заміну однієї амінокислоти іншою амінокислотою, що може не обов'язково являти собою консервативну заміну. Наприклад, можуть бути зроблені заміни, які істотно не впливають на тривимірну структуру ІФН-β. Три-вимірна структура не глікозильованого ІФН-β людини описана, наприклад, в Radhakrishnan et al. (1996) Structure 4: 1453, і тривимірна структура глікозильованого ІФН-β описана, наприклад, в Karpusas et al. (1997) PNAS 94:11813. Істотно, що ІФН-β включає п'ять спіралей: спіраль А, яка складається з приблизно амінокислот 2-22 SEQ ID NO: 4; спіраль В, яка складається з приблизно амінокислот 51-71 SEQ ID NO: 4; спіраль С, яка складається з приблизно амінокислот 80-107 SEQ ID NO: 4; спіраль D, яка складається з приблизно амінокислот 118-136 SEQ ID NO: 4; і спіраль Е, яка складається з приблизно амінокислот 139-162 SEQ ID NO: 4 [Karpusas et al., вище]. Спіралі А, В, С і Е утворюють закручену ліворуч чотириспіральну зв'язку типу 2. Існує довга петля у вигляді листка конюшини, петля АВ, яка зв'язує спіралі А і В, і три коротші петлі (позначаються ВС, CD і DE), які зв'язують спіралі, що залишилися [Karpusas et al., вище]. Попередні дослідження показали, що N-кінцева, C-кінцева та глікозильована ділянки спіралі С молекули ІФН-β не лежать в межах зв'язувального сайту для рецептора [дивись WO 00/23472 і USSN 09/832659]. Відповідно, мутації в даних ділянках не повинні особливо несприятливо позначитися на біологічній активності молекули ІФН. Раніше також було показано, що мутації в спіралі С (амінокислоти 81, 82, 85, 86 і 89 зрілого ІФН-β людини) ведуть до молекули, що має більш високу противірусну активність в порівнянні з ІФН-β дикого типу [дивись WO 00/23472 і USSN 09/832659]. Подібно було показано, що мутанти по спіралі А (амінокислоти 2, 4, 8 і 11 зрілого ІФН-β людини) і по петлі CD (амінокислоти 110, 111, 113, 116 і 119) мають більш високу зв'язувальну активність відносно рецептора і більш високу противірусну та антипроліферативну активності в порівнянні

з існуючим в природі людським ІФН-β дикого типу [див. WO 00/23472 і USSN 09/832659].

Інші переважні модифікації або заміни усувають сайти міжмолекулярних поперечних зв'язок або утворення неправильних дисульфідних місточків. Наприклад, ІФН-β, як відомо, має три залишки cys в дикому типі в положеннях 17, 31 і 141 SEQ ID NO: 4. Один варіант ІФН являє собою ІФН, в якому cys (C) в положенні 17 замінений на ser (S), [як описано в патенті США №4588585]. Інші варіанти ІФН-β включають варіанти ІФН-β, що мають, наприклад, один або більше ser (S), що заміщують cys (C) в положенні 17 і val (V) в положенні 101, заміщений phe (F), trp (W), tyr (Y) або his (H), переважно phe (F) при нумерації відповідно до ІФН-β дикого типу, що має, наприклад, SEQ ID NO: 4, такого, як описаний, наприклад, в патенті США 6127332. Інші переважні варіанти включають поліпептиди, що мають послідовність ІФН-β дикого типу, наприклад, SEQ ID NO: 4, де val (V) в положенні 101 при нумерації відповідно до ІФН-β дикого типу заміщений на phe (F), tyr (Y), trp (W), his (H) або phe (F), так само, [як описано, наприклад, в патенті США 6127332].

Іншими варіантами ІФН-β є зрілі молекули ІФН-β з відсутністю початкового метіоніну, наприклад, метіоніну 1 SEQ ID NO: 4. Ілюстративні варіанти ІФН-β не мають початкового метіоніну і мають щонайменше одну амінокислотну заміну, наприклад, в положенні 17 зрілої форми, [як описано в патенті США №4588585].

Молекули ІФН-β можуть також бути модифіковані шляхом заміни однієї або більше амінокислот однією чи більше дериватизованими амінокислотами, які є природними або не природними амінокислотами, в яких існуючий в нормі бічний ланцюг або кінцева група модифікований за допомогою хімічної реакції. Такі модифікації включають, наприклад, гамма-карбоксилування, бета-карбоксилування, пегілювання, сульфатування, сульфонування, фосфорилування, амідування, естерифікацію, N-ацетилювання, карбобензилювання, тозилування та інші модифікації, відомі в даній галузі техніки.

Інші модифікації включають застосування аналогів амінокислот або дериватизованих амінокислот, в яких бічний ланцюг подовжений або укорочений при забезпеченні, що все ще зберігається, карбоксильною, аміно- або іншою функціональною групою-попередником для кристалізації, а також аналогів амінокислот, що мають варіантні бічні ланцюги з відповідними функціональними групами. Наприклад, цільова сполука може включати амінокислотний аналог, такий як, наприклад, ціаноаланін, канаванін, д'єнколеву кислоту, норлейцин, 3-фосфосерин, гомосерин, дигідроксифенілаланін, 5-гідрокситриптофан, 1-метилгістидин, 3-метилгістидин, діамінопімелінову кислоту, орнітин або діаміномасляну кислоту. Інші існуючі в природі метаболіти або попередники амінокислот, що мають відповідні бічні ланцюги, повинні бути відомі фахівцям в даній галузі техніки і включаються в обсяг даного винаходу.

Інші варіанти ІФН-β включають зворотні або ретро пептидні послідовності. «Зворотною» або

«ретро» пептидною послідовністю позначають ту частину повної послідовності ковалентно пов'язаних амінокислотних залишків (або їх аналогів чи міметиків), в якій утворення пептидного зв'язку в нормальному напрямі від карбоксилу до аміно в амінокислотному кістязку реверсовано так, що при зчитуванні в загальноприйнятому напрямі зліва направо аміночастина пептидного зв'язку передує карбонільній частині (а не йде за нею). [Див., зазвичай, Goodman, M. and Chorev, M. Accounts of Chem. Res. 1979, 12, 423]. Описана тут зворотна орієнтація пептидів включає (а) таку, коли один або більше амінокінцевих залишків переведений в зворотну ("rev") орієнтацію (з отриманням, таким чином, другого «карбоксильного кінця» в самому лівому положенні молекули), і (b) таку, коли один або більше карбоксильних кінцевих залишків переведений в зворотну ("rev") орієнтацію (з отриманням другого «амінокінця» в самому правому положенні молекули). Пептидний (амідний) зв'язок не може бути утворений на межі між залишком з нормальною орієнтацією та залишком зі зворотною орієнтацією. Отже, певні зворотні поліпептиди винаходу можуть бути утворені за допомогою застосування відповідного компонента у вигляді амінокислотного міметика для зв'язку двох сусідніх частин послідовностей, що використовують зворотний пептидний (амідний) зв'язок. У випадку (а), представленому вище, центральний залишок дикетосполуки може бути легко застосований для зв'язку структур з двома амідними зв'язками з досягненням структури пептидоміметика. У випадку (b), представленому вище, центральний залишок діаміносполуки буде також придатний для зв'язку структур з двома амідними зв'язками з утворенням структури пептидоміметика. Зворотний напрям зв'язків в таких поліпептидах повинен зазвичай додатково вимагати інверсії енантіомерної конфігурації зворотних амінокислотних залишків для підтримки просторової орієнтації бічних ланцюгів, яка схожа з такою не зворотного пептиду. Конфігурація амінокислот в зворотному положенні пептидів являє собою переважно (D), і конфігурація не зворотного положення являє собою переважно (L). Протилежні або змішані конфігурації прийнятні, коли підходять для оптимізації зв'язувальної активності. Модифікації поліпептидів додатково описані, наприклад, в патенті США №6399075.

Терапевтичні агенти ІФН-β включають також білки ІФН-β і їх варіанти (наприклад, зрілий білок), сполучені з гетерологічним пептидом. Гетерологічний пептид може бути доданий, наприклад, з метою збільшення напівперіоду життя білка ІФН-β або поліпшення його продукції. Приклади гетерологічних пептидів включають молекули імуноглобулінів (Ig) або їх частини, наприклад, константний домен легкого або важкого ланцюга молекули Ig. В одному здійсненні білок ІФН-β або його варіант приєднують (або іншим чином з'єднують) до всієї або частини шарнірної та константної ділянок легкого ланцюга імуноглобуліну, важкого ланцюга або до обох. Таким чином, в даному винаході охарактеризована молекула, яка включає: (1) частину білка ІФН-β (тобто ІФН-β або його варіант), (2) другий пептид, наприклад, такий, який збільшує розчинність або тривалість життя *in vivo* частини ІФН-

β, наприклад, член суперсімейства імуноглобулінів або його фрагмент, або частину, наприклад, частину або фрагмент IgG, наприклад, константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини, наприклад, CH2, CH3 та шарнірні ділянки. Конкретно «ІФН-β/Ig гібрид» являє собою білок, що включає біологічно активну частину ІФН-β, з'єднану з N-кінцем ланцюга імуноглобуліну. Види ІФН-β/Ig гібриду являють собою «ІФН-β/Fc гібрид», який є білком, що включає частину ІФН-β, сполучену з щонайменше частиною константної ділянки імуноглобуліну. Переважний гібрид Fc включає частину ІФН-β, сполучену з фрагментом антитіла, що містить C-кінцевий домен важких ланцюгів імуноглобуліну.

Відповідно, в одному здійсненні гібридний білок має загальну формулу X-Y-Z, де X являє собою поліпептид, що має амінокислотну послідовність ІФН-β або її частину чи варіант; Y являє собою необов'язковий лінкерний залишок, Z являє собою поліпептид, що включає щонайменше частину поліпептиду, відмінну від частини X інтерферону бета. В інших здійсненнях гібридний білок має загальну формулу Z-Y-X, в якій поліпептид, що не є ІФН-β, сполучений з N-кінцевою частиною лінкера, який сполучений з N-кінцевою частиною поліпептиду ІФН-β або його частиною чи варіантом. Частина Z може бути частиною поліпептиду, який містить імуноглобуліноподібні домени. Приклади таких інших поліпептидів включають GD1, CD2, CD4 і члени класу I та класу II антигенів головного комплексу гістосумісності. Див. патент США 5565335 [Capon et al.] для прикладів таких поліпептидів.

Частина Z може включати, наприклад, безліч гістидинових залишків або переважно Fc ділянку імуноглобуліну, "Fc" визначається тут як фрагмент антитіла, що містить C-кінцевий домен важких ланцюгів імуноглобуліну.

Частина Y може бути будь-яким лінкером, який дозволяє частині ІФН-β зберігати свою біологічну активність. Частина Y може бути довжиною в одну амінокислоту або щонайменше в дві амінокислоти. Y може також складатися від приблизно 2 до приблизно 5 амінокислот; від приблизно 3 до приблизно 10 амінокислот в довжину або 10 чи більше амінокислот. У переважному здійсненні Y складається з або включає GlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO: 6), яка кодується, наприклад, нуклеотидною послідовністю GGCGGTGGTGGCAGC (SEQ ID NO: 5). Y може також складатися з або включати сайт впізнавання ентерокіназою, наприклад, AspAspAspAspLys (SEQ ID NO: 8), який кодується, наприклад, GACGATGATGACAAG (SEQ ID NO: 7). В іншому здійсненні Y складається з або включає SerSerGlyAspAspAspAspLys (SEQ ID NO: 10), яка кодується, наприклад,

AGCTCCGGAGACGATGATGACAAG (SEQ ID NO: 9).

Крім того, на з'єднання між частиною ІФН-β (X) та іншою не-ІФН-β частиною Z (наприклад, ділянкою Fc імуноглобуліну) можна також вплинути за допомогою будь-якої хімічної реакції, яка повинна зв'язувати дві молекули разом так, щоб частини X і Z зберігали свою відповідну активність. Дане хімічне зв'язування може включати багато хімічних

механізмів, таких, як ковалентне зв'язування, афінне зв'язування, інтеркалювання, кординаційне зв'язування та комплексування. Приклади з'єднувальних агентів (тобто лінкерів "Y" у загальній формулі) для створення ковалентного зв'язування між частиною ІФН-β та частиною Z можуть включати органічні сполуки, такі як тіоефіри, карбодііміди, сукцинімідні ефіри, діізоціанати, такі як толілен-2,6-діізоціанат, глутеральдегіди, діазобензоли та гексаметилендіаміни, такі як біс-(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін, біфункціональні похідні імідоефірів, такі як диметиладипімідат, та біс-активні сполуки фтору, такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол. Даний перелік не розглядається як вичерпний для різних класів хімічних приєднувальних агентів, відомих в даній галузі техніки. Багато з них є в продажу, такі як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду гідрохлорид (EDC); 4-сукцинімідилдоксикарбоніл-альфа-мети-толуол (SMPT: Pierce Chem. Co., Cat. # 21558G).

Переважаючий гібридний білок ІФН-β /Ig складається з або включає SEQ ID NO: 12, яка містить повнорозмірну зрілу форму ІФН-β людини, тобто SEQ ID NO: 4, сполучену з IgGIFc людини (ZL5107) [див. WO 00/23472 і USSN 09/832659] (див. Фіг.1). Відповідна нуклеотидна послідовність представлена в SEQ ID NO: 11. ДНК, що кодує ІФН-β людини, закінчується нуклеотидним триплетом 568-570 (AAC, що кодує аргінін), і ДНК, що кодує константну ділянку IgG1 людини, починається з триплету (GAC, що кодує аспарагінову кислоту), який починається з нуклеотидного номеру 574 SEQ ID NO: 11.

Інший переважний гібридний білок ІФН-β/Ig представлений в SEQ ID NO: 14 і кодується SEQ ID NO: 13 [див. WO 00/23472 і USSN 09/832659]. Даний останній гібридний білок складається з ІФН-β людини, сполученого з лінкером G4S, який сам сполучений з IgGIFc людини (ZL6206). Лінкер G4S (що кодується нуклеотидами з 571 по 585 SEQ ID NO: 7) складається з амінокислотної послідовності GGGGS (SEQ ID NO: 9). Способи отримання даних білків описані в WO 00/23472 і USSN 09/832659.

У переважному здійсненні поліпептид ІФН-β з'єднують через його С-кінець з щонайменше частиною ділянки Fc імуноглобуліну. ІФН-β утворює амінокінцеву частину, а ділянку Fc утворює карбоксикінцеву частину. У даних гібридних білках ділянка Fc переважно обмежена шарнірною ділянкою константного домену та доменами CH2 і CH3. Ділянка Fc в даних гібридах може бути також обмежена частиною шарнірної ділянки, причому частина здатна утворювати міжмолекулярні дисульфідні місточки, і доменами CH2 і CH3 або їх функціональними еквівалентами. Дані константні ділянки можуть походити від будь-якого виду ссавців (переважно людини) і можуть походити від будь-якого відповідного класу і/або ізотипу, включаючи IgA, IgD, IgM, IgE та IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4.

Рекомбінантні молекули нуклеїнових кислот, які кодують гібриди Ig, можуть бути одержані будь-яким способом, відомих в даній галузі техніки [Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, N.Y.] або одержані з клонів, що знаходяться у відкритому доступі. Способи отримання генів, які кодують константні ділянки важкого і легкого ланцюгів імуноглобулінів вказані, наприклад, Robinson, R. et al., заявка PCT, публікація №W087/02671. Послідовність кДНК, що кодує молекулу або фрагмент інтерферону, може бути прямо сполучена з кДНК, що кодує константні ділянки важких ланцюгів Ig, або може бути приєднана через лінкерну послідовність. У додаткових здійсненнях винаходу може бути створена система рекомбінантних векторів для адаптації послідовностей, що кодують інтерферон бета, до правильної рамки зчитування з синтетичною шарнірною ділянкою. Додатково може бути бажано включити у вигляді частини рекомбінантної векторної системи нуклеїнові кислоти, які відповідають 3'-фланкуючій ділянці гена імуноглобуліну, включаючи сайти розщеплення РНК/поліаденілування та нижчевикладені послідовності. Більш того, може бути бажано сконструювати сигнальну послідовність, вищу за послідовності, що кодують імуноглобуліновий гібридний білок, для полегшення секреції гібридної молекули з клітини, трансформованої рекомбінантним вектором.

У даному винаході пропонуються димерні гібридні молекули, а також мономерні або мультимерні молекули, що включають гібридні білки. Такі мультимери можуть бути створені із застосуванням ділянок Fc або їх частин, молекул Ig, які зазвичай мультивалентні, таких як пентамери IgM або димери IgA. Зрозуміло, що для утворення та стабілізації пентамерів IgM і димерів IgA може бути необхідний ланцюг J поліпептиду. Альтернативно, мультимери гібридних білків ІФН-β можуть бути утворені із застосуванням білка з афінністю до ділянки Fc молекул Ig, такого як протеїн А. Наприклад, безліч гібридних білків ІФН-β/імуноглобулін може бути приєднано до кульок протеїн А-агарози.

Дані полівалентні форми корисні, оскільки вони містять безліч інтерферон-зв'язувальних сайтів для рецептора. Наприклад, двовалентний розчинний ІФН-β може складатися з двох тандемних повторів амінокислот з 1 по 166 SEQ ID NO: 4 (або таких, що кодуються нуклеїновими кислотами під номерами з 1 по 498 SEQ ID NO: 3) (частина X в загальній формулі), розділених лінкерною ділянкою (частина Y), повтори зв'язані щонайменше з частиною константного домену імуноглобуліну (частина Z). Можуть бути також сконструйовані альтернативні полівалентні форми, наприклад, за допомогою хімічного приєднання гібридів ІФН-β/Ig до будь-якої клінічно прийнятної молекули-носія, полімеру, вибраного з групи, що складається з фіколу, поліетиленгліколу або декстрану із застосуванням загальноприйнятих способів приєднання. Альтернативно, ІФН-β може бути хімічно приєднаний до біотину, і потім біотин-інтерферон бета-Fc кон'югату дають зв'язатися з авідіном, що дає чотирихвалентні молекули авідин/біотин/інтерферон бета. Гібриди ІФН-β/Ig можуть бути також ковалентно приєднані до динітрофенолу (DNP) або тринітрофенолу (TNP), і одержаний кон'югат осаджений анти-DNP- або анти-TNP-IgM з утворенням декамерних кон'югатів

з валентністю 10 для зв'язувальних сайтів рецепторів інтерферону бета.

Похідні білків винаходу також включають різні структурні форми первинного білка, які зберігають біологічну активність. Завдяки присутності аміно- та карбоксильних груп, що іонізуються, наприклад, білки ІФН- β та їх варіанти можуть бути у формі солей кислоти або основи, або можуть бути в нейтральній формі. Індивідуальні амінокислотні залишки можна також модифікувати за допомогою окислення або відновлення. Крім, того, первинну амінокислотну структуру (включаючи N- і/або C-кінцеві частини) або глікан ІФН- β можна модифікувати («дериватизувати») за допомогою утворення ковалентних або агрегатних кон'югатів з іншими хімічними частинами, такими як глікозильні групи, полімери поліалкіленгліколю, такі як поліетиленгліколь, ліпіди, фосфат, ацетильні групи тощо, або за допомогою створення мутантних амінокислотних послідовностей.

Інші похідні інтерферону бета/Ig включають ковалентні або агрегатні кон'югати інтерферону бета або його фрагментів з іншими білками або поліпептидами, такими як додаткові N-кінці або C-кінці, одержані за допомогою синтезу в рекомбінантній культурі. Наприклад, кон'югований пептид може бути сигнальною (або лідируючою) поліпептидною послідовністю N-кінцевої ділянки білка, який котрансляційно або посттрансляційно направляє перенесення білка з місця його синтезу до місця його функції всередині або зовні клітинної мембрани чи стінки (наприклад, дріжджовий лідеральфа-фактор). Наприклад, сигнальний пептид може бути від ІФН- β , тобто амінокислоти з 1 по 21 SEQ ID NO: 2, які відповідають нуклеотидам 1-138 SEQ ID NO: 1. Сигнальний пептид може бути також від VCAM, тобто амінокислоти 1-24 SEQ ID NO: 12, які кодуються нуклеотидами 1-72 SEQ ID NO: 11.

Гетерологічний поліпептид (наприклад, пептид) або інша молекула може також бути використана як мітка або для допомоги в очищенні терапевтичного агента ІФН- β . Такі пептиди добре відомі в даній галузі техніки. Наприклад, поліпептид цього винаходу може бути сполучений в рамці зчитування з маркерною послідовністю, що позначається тут також як Tag-sequence («таг-послідовність»), що кодує «таг-пептид», що дозволяє маркувати і/або очищувати поліпептид цього винаходу. У переважному здійсненні маркерна послідовність являє собою гексагістидиновий таг, наприклад, такий, що поставляється вектором PQE-9. Є в продажу інші численні таг-пептиди. Інші таги, які часто застосовуються, включають епітопи мус [наприклад, див. Ellison et al. (1991) J Biol. Chem. 266:21150-21157], які включають послідовність із 10 залишків від c-туса, систему pFLAG (International Biotechnologies, Inc.), систему pEZZ-протеїн А (Pharmacia, NJ) і частину з 16 амінокислот від білка гемаглютиніну *Haemophilus influenza*. Більш того, будь-який пептид може бути використаний як таг за умови, що реагент, наприклад, антитіло, яке взаємодіє специфічно з таг-поліпептидом, є в наявності або може бути одержане або ідентифіковане.

В одному здійсненні білок ІФН- β або його варіант з'єднують на N- або C-кінці з одним з наступних пептидів: HisHisHisHisHisHis (SEQ ID NO: 16), який може кодуватися нуклеотидною послідовністю CATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 15); SerGlyGlyHisHisHisHisHisHis (SEQ ID NO: 18), який може кодуватися нуклеотидною послідовністю

TCCGGGGGCCATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO: 15) і

SerGlyGlyHisHisHisHisHisHisSerSerGlyAspAspAspAspLys (SEQ ID NO: 20), який може кодуватися нуклеотидною послідовністю

TCCGGGGGCCATCATCATCATCATCATAGCT CCGGAGACGATGATGACAAG (SEQ ID NO: 19).

Амінокислотна послідовність інтерферону бета може бути також приєднана до пептиду AspTyrLysAspAspAspAspLys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO: 21) [Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988]. Остання послідовність є високо антигенною і забезпечує епітопом, що оборотно зв'язується специфічним моноклональним антитілом, дозволяючи швидко тестувати і легко очищувати рекомбінантний білок, що експресується. Дана послідовність також специфічно розщеплюється ентерокиназою слизової бика по залишку, який іде одразу після пари Asp-Lys.

В іншому здійсненні терапевтичний агент ІФН- β включає білок ІФН- β або його варіант, сполучений з білком альбуміном, його варіантом або частиною. Такий гібридний білок може бути створений, [як описано, наприклад, в WO 01/77137].

Терапевтичний агент ІФН- β може також включати молекулу, яка не є поліпептидом. Наприклад, білок ІФН- β або його варіант можуть бути приєднані ковалентно або не ковалентно до полімеру, наприклад, полімеру, який біодеградується. Наприклад, білок ІФН- β або його варіант можуть бути пегільовані, наприклад, приєднані до поліетиленгліколю (ПЕГ), [як описано в WO 00/23114].

В широких рамках цього винаходу єдина молекула полімеру може бути застосована для кон'югації з ІФН- β , хоч також передбачається, що може бути приєднано також більше однієї полімерної молекули. Повинно бути зрозуміло, що при кон'югації полімеру можуть застосовуватися будь-які групи, частини або інші варіанти кон'югуючих агентів, які підходять для кінцевого використання при застосуванні. Як приклад, в деяких застосуваннях може бути придатне ковалентне прив'язування до полімеру функціональної частини, що надає стійкості до УФ-деградації або антиоксидантної, або такої, що має інші властивості чи характеристики. Як додатковий приклад, в деяких застосуваннях може бути вигідно функціоналізувати полімер, додаючи йому реакційної здатності або здатності до поперечного зшивання, для підсилення різних властивостей або характеристик всього кон'югованого матеріалу. Відповідно, полімер може містити будь-яку функціональну частину, групи, що повторюються, зв'язки або інші постійні структури, які не перешкоджають ефективності композиції кон'югованого ІФН- β в призначених для нього цілях.

ІФН- β кон'югують переважно через кінцеву реакційно здатну групу полімеру, хоча кон'югації можуть також бути відгалужені від не кінцевих реак-

ційно здатних груп. Полімер з реакційно здатною(ними) групою(ами) позначають тут як «активований полімер». Реакційно здатна група вибірково взаємодіє з вільними аміно- або іншими реакційно здатними групами на білкові. Активованій(и) полімер(и) взаємодіє(ють) так, що приєднання може здійснюватися до будь-якої доступної аміногрупи ІФН-β, такої, як альфа-аміногрупи або епсилон-аміногрупи лізину. Вільні карбоксильні групи, належним чином активовані карбонільні групи, гідроксил, гуанідил, окислені вуглеводневі частини і меркаптогрупи ІФН-β (якщо вони є доступними) також можуть бути використані як сайти приєднання.

Хоча полімер може бути приєднаний де завгодно на молекулі ІФН-β або його варіанті, або інших амінокислотах, приєднаних прямо або посередньо до молекули ІФН-β, найбільш переважний сайт для приєднання полімеру являє собою N-кінець молекули ІФН-β. Вторинний(и) сайт(и) знаходиться(яться) у або біля C-кінця і приєднані через залишки цукрів. Таким чином, винахід охоплює як свої найбільш переважні здійснення: (i) кон'югати ІФН-β або його варіанту, з'єднані з полімером по N-кінцю; (ii) кон'югати ІФН-β або його варіанту, з'єднані з полімером по C-кінцю; (iii) з'єднані з цукрами кон'югати полімерних кон'югатів; (iv) а також кон'югати білків ІФН-β або їх варіантів, з'єднані з полімером по N-, C-кінцях і по цукрах.

Звичайно застосовують від приблизно 1,0 до приблизно 10 моль активованого полімеру на моль білка в залежності від концентрації білка. Кінцева кількість являє собою баланс між максималізацією ступеня реакції при мінімалізації неспецифічних модифікацій продукту і при визначенні в той же час хімічного складу, який повинен підтримувати оптимальну активність, нарівні з цим при оптимізації в той же час, якщо це можливо, напівперіоду життя білка.

Найкраще, щоб зберігалася щонайменше приблизно 50% біологічної активності білка, і найкраще, щоб зберігалася 100%.

Реакції можна здійснювати за допомогою будь-якого доцільного методу, що застосовується для взаємодії біологічно активних матеріалів з інертними полімерами, переважно приблизно при рН 5-7, якщо реакційно здатні групи знаходяться на альфа-аміногрупі на N-кінці. Зазвичай процес включає одержання активованого полімеру (який може мати щонайменше одну кінцеву гідроксильну групу) і після цього взаємодія білка з активованим полімером для одержання розчинного білка, підходящого для складу. Модифікації вказаної вище реакції можуть бути проведені декількома способами, які можуть включати одну або більше стадій.

Як вказувалося вище, в найбільш переважних здійсненнях винаходу як лінкер до полімеру застосовується N-кінцева ділянка ІФН-β. Одним ілюстративним способом є спосіб відновного алкілювання, в якому використовується диференційна реакційна здатність різних типів первинних аміногруп (епсилон-аміногруп на лізіні в порівнянні з аміногрупами N-кінцевого метіоніну), доступних для дериватизації на ІФН-β. За відповідних вибірових умов може бути досягнута по суті вибіркова

дериватизація ІФН-β по N-кінцю карбонільною групою, що містить полімер. Реакцію проводять при рН, який дозволяє досягнути переваги у відмінностях рKа між епсилон-аміногрупами залишків лізину і альфа-аміногрупою N-кінцевого залишку ІФН-β. Даний тип хімічних перетворень добре відомий фахівцям в даній галузі техніки.

Наприклад, може бути використана реакційна схема, в якій дана вибірність підтримується за допомогою проведення реакцій при низькому рН (зазвичай 5-6) за умов, коли полімер ПЕГ-альдегід вводять в реакцію з ІФН-β в присутності ціаноборгідриду натрію. Після очищення ПЕГ-ІФН-β і аналізу за допомогою ДДС-Na ПААГЕ, мас-спектрометрії MALDI і пептидного секвенування/ картування це дає ІФН-β, чий N-кінець специфічно помічений частиною ПЕГ.

Кристалічна структура ІФН-β вказує на те, що N- і C-кінці локалізовані близько один до одного [див. Karpusas et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 11813-11818]. Таким чином, модифікації C-кінцевої ділянки ІФН-β також повинні мати мінімальний ефект на активність. Оскільки не існує простої хімічної стратегії для цільового приєднання поліалкіленгліколевого полімеру, такого як ПЕГ, до C-кінця, потрібно вдатися прямо до генної інженерії сайту, який може бути застосований як мішень для полімерної частини. Наприклад, включення Cys в сайт, який знаходиться у або біля C-кінця, повинно дозволити створити специфічну модифікацію із застосуванням малеїмиду, вінілсульфону або галогенцетат-активованого поліалкіленгліколю (наприклад, ПЕГ). Дані похідні можуть бути специфічно застосовані для модифікації сконструйованих цистеїнів, завдяки високій вибірності даних реагентів для Cys. Інші стратегії, такі як включення гістидинового тагу, який може бути мішенню [Fancy et al., (1996) Chem. & Biol. 3: 551], або додаткового сайту глікозилювання, являють собою інші альтернативи для модифікації C-кінця ІФН-β.

Глікан на певному ІФН-β знаходиться також в положенні, яке дозволяє зробити додаткову модифікацію без зміни активності. Способи цільових цукрів як сайтів для хімічної модифікації також добре відомі і, отже, можливо, щоб поліалкіленгліколевий полімер був доданий прямо і специфічно до цукрів на ІФН-β, які були активовані окисленням. Наприклад, може бути створений поліетиленгліколь-гідрозид, який утворює відносно стабільні гідразонів зв'язки шляхом конденсації з альдегідами і кетонами. Дана властивість була використана для модифікації білків через окислені олігосахаридні зв'язки. [Див. Andresz, H. et al., (1978), Makromol. Chem. 179: 301]. Зокрема, обробка ПЕГ-карбоксиметилгідрозиду нітритом дає ПЕГ-карбоксиметилазид, який являє собою електрофільно активну групу, реакційно здатну по відношенню до аміногруп. Дана реакція може бути використана також для отримання білків, модифікованих поліалкіленгліколем. [Див. патенти США 4101380 і 4179337].

Хімічні модифікації, опосередковані тіоловим лінкером, можуть додатково сприяти поперечним зшивкам білків. Це може бути виконано, наприклад, шляхом створення реакційно здатних альде-

гідів на вуглеводних частинах за допомогою періодату натрію з утворенням цистамінових кон'югатів через альдегіди і індукцією поперечних зв'язок через тілові групи на цистамінах [див. Рерінскі, В. et al., (1991), J. Biol. Chem., 266: 18244-18249 і Chen, L.L. et al., (1991) J. Biol. Chem., 266: 18237-18243]. Відповідно, даний тип хімічних перетворень, як очікується, буде підходити для модифікації поліалкіленгліколевыми полімерами, коли лінкер включається до цукру та поліалкіленгліколевий полімер приєднується до лінкера. Тоді як лінкери, що містять амінотіол або гідразин, здатні допускати приєднання одиничної полімерної групи, структура лінкера може варіюватися так, щоб приєднувалася безліч полімерів і/або щоб просторова орієнтація полімеру по відношенню до ІФН-β змінювалася.

Приклади полімерів включають розчинний у воді полімер, такий як поліалкіленгліколевий полімер. Перелік таких полімерів, що не обмежується, включає інші поліалкіленоксидні гомополімери, такі як поліпропіленгліколи, поліоксиетиленовані поліолі, їх співполімери та їх блок-співполімери. Інші приклади відповідних розчинних у воді і не пептидних полімерних кістяків включають полі(оксиетильований поліол), полі(олефіновий спирт), полі(вінілпіролідон), полі(гідроксипропілметакриламід), полі(α-гідроксикислоту), полівініловий спирт), поліфосфазен, поліоксазолін, полі(N-акрилоїлморфолін) і їх співполімери, триполімери та суміші. В одному здійсненні полімерний кістяк являє собою полі(етиленгліколь) або монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ), що мають середню молекулярну масу від приблизно 200Да до приблизно 400000Да. Повинно бути зрозуміло, що інші споріднені полімери також підходять для застосування при здійсненні даного винаходу і що застосування терміну ПЕГ або полі(етиленгліколь) розглядається як таке, що включає, а не виключає в даному відношенні. Термін ПЕГ включає полі(етиленгліколь) в будь-якій з його форм, включаючи алкоксиПЕГ, біфункціональний ПЕГ, "багаторукий" ПЕГ, роздвоєний ПЕГ, розгалужений ПЕГ, підвішений ПЕГ або ПЕГ з деградуючими зв'язками у ньому.

В одному здійсненні поліалкіленгліколеві залишки C1-C4 алкілполіалкіленгліколей, переважно поліетиленгліколю (ПЕГ), або полі(окси)алкіленгліколеві залишки таких гліколей включаються в полімерні системи, що цікавлять. Таким чином, полімер, до якого приєднується білок, може бути гомополімером поліетиленгліколю (ПЕГ) або являти собою поліоксиетилюваний поліол, що пропонується у всіх випадках так, що полімер є розчинним у воді при кімнатній температурі. Необмежуючі приклади таких полімерів включають поліалкіленоксидні гомополімери, такі як ПЕГ або поліпропіленгліколи, поліоксиетилювані гліколи, їх співполімери та їх блок-співполімери, які пропонуються так, що підтримується розчинність у воді блоку-співполімеру. Приклади поліоксиетилюваних поліолів включають, наприклад, поліоксиетилюваний гліцерин, поліоксиетилюваний сорбіт, поліоксиетилювану глюкозу або тому подібне. Гліцериновий кістяк поліоксиетилювано-

го гліцерину являє собою той самий кістяк, що й існуючий в природі, наприклад, у тварин і людини в моно-, ди- і тригліцеридах. Отже, дане розгалуження не повинне обов'язково розглядатися як чужорідний агент в організмі.

Як альтернатива поліалкіленовим оксидам можуть бути застосовані декстран, полівінілпіролідони, поліакриламід, полівінілові спирти, полімери на основі вуглеводів і тому подібне. Фахівець в даній галузі техніки повинен знати, що попередній перелік є тільки ілюстративним і що охоплюються всі полімерні матеріали, що мають якості, які описуються тут.

Необов'язково, щоб полімер мав якусь конкретну молекулярну масу, але бажано, щоб молекулярна маса була між приблизно 300 і 100000, краще між 10000 і 40000. Зокрема, розміри 20000 або більше є найкращими для запобігання втрати білка через фільтрацію в нирках.

Створення похідних поліалкіленгліколей дає ряд вигідних властивостей для складу кон'югатів полімер-ІФН-β при здійсненні даного винаходу, пов'язаних з наступними властивостями похідних поліалкіленгліколей: поліпшення розчинності у воді за відсутності в той самий час антигенної або імуногенної відповіді; високий ступінь біосумісності; відсутність біодеградації похідних поліалкіленгліколей *in vivo*; і вільна екскреція живими організмами.

Більш того, в іншому аспекті винаходу можна застосовувати ІФН-β, ковалентно зв'язаний з полімерним компонентом, в якому природа кон'югації включає хімічні ковалентні зв'язки, що розщеплюються. Це дозволяє здійснювати контроль в плані плинності часу, за який полімер може бути відщеплений від ІФН-β. Даний ковалентний зв'язок між ліками ІФН-β і полімером може бути розщеплений шляхом хімічної або ферментативної реакції. Продукт полімер-ІФН-β зберігає прийнятний рівень активності. Одночасно частини поліетиленгліколю присутні в кон'югуючому полімері для надання кон'югату полімер-ІФН-β високої розчинності у воді і збільшеної здатності до циркуляції в кровотоці. Внаслідок даних поліпшених характеристик винахід охоплює парентеральну, інтраназальну та пероральну доставку обох активних видів полімеру-ІФН-β і, після гідролітичного розщеплення, біодоступність ІФН-β *per se* при застосуванні *in vivo*.

Взаємодія полімеру з ІФН-β для отримання кон'югатів, наприклад, N-кінцевих кон'югованих продуктів, може бути легко здійснена із застосуванням широкого спектра реакційних схем. Активність і стабільність кон'югатів ІФН-β може варіюватися декількома способами за допомогою застосування полімеру з різним розміром молекули. Розчинність кон'югатів може варіюватися шляхом зміни пропорції та розміру фрагмента поліетиленгліколю, включеного в полімерну композицію.

В одному здійсненні кон'югати за даним винаходом отримують шляхом взаємодії білка з активованою поліалкіленгліковою сполукою (PCG). Наприклад, ІФН може бути введений в реакцію з ПЕГ-альдегідом в присутності відновлювального агента (наприклад, ціаноборгідриду натрію) з оде-

ржанням через відновне алкілювання кон'югату ПЕГ-білок, з'єднаних через амінний зв'язок. [Див., наприклад, європейський патент 0154316 В1 і міжнародну патентну заявку № PCT/US03/01559].

В певних здійсненнях винаходи ІФН-β людини пегільований з наступними активованими поліалкіленгліколями: 20кДа мПЕГ-0-2-метилпропіональдегідом, 20кДа мПЕГ-0-п-метилфеніл-0-2-метилпропіональдегідом, 20кДа мПЕГ-0-м-метилфеніл-0-2-метилпропіональдегідом, 20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегідом, 20кДа мПЕГ-0-п-фенілпропіональдегідом і 20кДа мПЕГ-0-м-фенілацетальдегідом, з одержанням ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-2-метилпропіональдегідом, ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-п-метилфеніл-0-2-метилпропіональдегідом, ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-м-метилфеніл-0-2-метилпропіональдегідом, ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегідом, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-п-фенілпропіональдегідом, і ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-м-фенілацетальдегідом відповідно. Докладний опис одержання і характеристика людського ІФН-β, модифікованого 20кДа мПЕГ-0-2-метилпропіональдегідом і 20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегідом, представлено нижче і також пропонується в міжнародній патентній заявці No. PCT/US03/01559.

В одному здійсненні пегільований ІФН-β одержують таким чином. ІФН-β, наприклад, сипкий проміжний продукт ІФН-β-1а (клінічна партія сипких ліків, яка проходить всі тести для застосування у людини) в концентрації 250мкг/мл в 100мМ фосфаті натрію, рН 7,2, 200мМ NaCl, розводять рівним об'ємом 100мМ MES, рН 5,0 і рН, доводять до 5,0 за допомогою HCl. Зразок наносять на колонку FF SP-Сефарози® (Pharmacia, Piscataway, NJ) при 6мг ІФН-β/мл смоли. Колонку промивають 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і продукт елюють 30мМ фосфату натрію, рН 6,0, 600мМ NaCl. Фракції елюату можуть бути проаналізовані на їх величини поглинання при 280нм, і концентрацію інтерферону в зразках, визначену за поглинанням із застосуванням коефіцієнта екстинкції 1,51 для розчину 1мг/мл.

До розчину ІФН-β 1мг/мл з елюату SP додають 0,5М фосфат натрію, рН 6,0, до 50мМ, ціаноборгидрид натрію (Aldrich, Milwaukee, WI) додають до 5мМ і 20К ПЕГ альдегіду (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) додають до 5мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 20 годин. Пегільований інтерферон очищують від продуктів реакції за допомогою послідовних хроматографічних стадій на колонці для FPLC Суперози® 6 (Pharmacia), що ділить за розміром, 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 150мМ NaCl як рухома фаза, і на SP-Сефарози® FF. Використання колонки, що ділить за розміром, веде до базисної лінії розділення модифікованого і не модифікованого ІФН-β. Пул елюату з гель-фільтрації, що містить ПЕГ-інтерферон бета, розводять 1:1 водою і наносять на колонку SP-Сефарози® 2мг інтерферону бета/мл смоли. Колонку промивають 5мМ фосфатом

натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і потім пегільований інтерферон бета елюють з колонки 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 800мМ NaCl. Фракції елюату аналізують на вміст білка за поглинанням при 280нм. Концентрацію пегільованого інтерферону представляють в еквівалентах інтерферону, оскільки частина ПЕГ не дає внеску в поглинання при 280нм. Даний спосіб та характеристика отриманого пегільованого ІФН-β додатково описані в WO 00/23114. Кон'югація ПЕГ з ІФН-β, очевидно, не змінює його противірусної активності. Крім того, було виявлено, що специфічна активність пегільованого ІФН-β є більш високою (приблизно в 10 раз), ніж така сама не пегільованого ІФН-β [WO 00/23114].

ІФН-β може бути також пегільований частиною 5К ПЕГ, яку можна придбати, наприклад, у Fluka, Inc. (Cat. №75936, Ronkonkoman, NY), дотримуючись того самого протоколу, що описаний вище для 20К ПЕГ альдегіду.

ІФН-β, модифікований 20кДа мПЕГ-0-2-метилпропіональдегідом, може бути одержаний таким чином. 10мл сипкого проміжного продукту ІФН-β (клінічна партія сипких ліків, яка проходить всі тести для застосування у людини), 250мкг/мл, в 100мМ фосфату натрію, рН 7,2, 200мМ NaCl, розводять 12мл 165мМ MES, рН 5,0, і 50мл 5н HCl. Зразок наносять на 300мкл колонку FF SP-Сефарози (Pharmacia). Колонку промивають 3×300мкл 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і білок елюють 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 600мМ NaCl. Фракції елюату аналізують на їх поглинання при 280нм, і концентрацію ІФН-β в зразках, визначену із застосуванням коефіцієнта екстинкції 1,51 для розчину 1мг/мл. Фракції піка об'єднують, що дає концентрацію ІФН-β 3,66мг/мл, яка розводиться потім до 1,2мг/мл водою.

До 0,8мл ІФН-β з розведеного пулу елюату з SP-Сефарози додають 0,5М фосфат натрію, рН 6,0, до 50мМ, ціаноборгидрид натрію (Aldrich) додають до 5мМ і 20кДа мПЕГ-0-2-метилпропіональдегід додають до 5мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 16 годин у темряві. Пегільований ІФН-β очищують з реакційної суміші на колонці FF SP-Сефарози, 0,5мл, таким чином: 0,6мл реакційної суміші розводять 2,4мл 20мМ MES, рН 5,0, і наносять на колонку SP-Сефарози. Колонку промивають фосфатом натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і потім пегільований ІФН-β елюють з колонки 25мМ MES, рН 6,4, 400мМ NaCl. Пегільований ІФН-β додатково очищують на колонці для FPLC Суперози 6 HR 10/30, що ділить за розміром, 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 150мМ NaCl як рухома фаза. Швидкість струму крізь колонку, що ділить за розміром (25мл), становить 20мл/годину, і збирають фракції по 0,5мл. Фракції елюату аналізують на вміст білка за поглинанням при 280нм, об'єднують і визначають концентрацію білка пулу. Концентрацію пегільованого ІФН-β представляють в еквівалентах ІФН, оскільки частина ПЕГ не дає внесок в поглинання при 280нм. Зразки пулу відбирають для аналізу, і частина, що залишилася, може розводитися до 30мкг/мл буфером складу, який містить

HSA, аліквотуватися по 0,25мл/флакон і зберігатися при -70°C .

ІФН- β , модифікований 20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегідом, може бути одержаний таким чином. 20мл сипкого проміжного продукту ІФН- β (клінічна партія сипких ліків, яка проходить всі тести для застосування у людини), 250мг/мл, в 100мМ фосфату натрію, рН 7,2, 200мМ NaCl, розводять 24мл 165мМ MES, рН 5,0, 100мкл 5н HCl і 24мл води. Зразок наносять на 600мкл колонку FF SP-Сефарози (Pharmacia). Колонку промивають 2х900мкл 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і білок елюють 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 600мМ NaCl. Фракції елюату аналізують на їх поглинання при 280нм, і концентрацію ІФН- β в зразках визначають із застосуванням коефіцієнта екстинії 1,51 для розчину 1мг/мл. Фракції піка об'єднують, що дає концентрацію ІФН- β 2,3мг/мл. До 1,2мл ІФН- β -1а з пулу елюату з SP-Сефарози додають 0,5М фосфат натрію, рН 6,0, до 50мМ, ціаноборгідрид натрію (Aldrich) додають до 5мМ і 20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегід додають до 10мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 18 годин в темряві. Пегільований ІФН- β може бути очищений з реакційної суміші на колонці FF SP-Сефарози, 0,75мл, таким чином: 1,5мл реакційної суміші розводять 7,5мл 20мМ MES, рН 5,0, 7,5мл води і 5мкл 5н HCl і наносять на колонку SP-Сефарози. Колонку промивають фосфатом натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і потім пегільований ІФН- β елюють з колонки 20мМ MES, рН 6,0, 600мМ NaCl. Пегільований ІФН- β додатково очищують на колонці для FPLC Суперози 6 HR 10/30, що ділить за розміром, 5мМ фосфатом натрію, рН 5,5, 150мМ NaCl як рухома фаза. Швидкість струму через колонку, що ділить за розміром (25мл), становить 20мл/годину, і збирають фракції по 0,5мл. Фракції елюату аналізують на вміст білка за поглинанням при 280нм, об'єднують і визначають концентрацію білка пулу. Концентрацію Пегільованого ІФН- β представляють в еквівалентах ІФН після врахування внеску ПЕГ (20кДа мПЕГ-0-п-фенілацетальдегід має коефіцієнт екстинії при 280нм 0,5 для розчину 1мг/мл) у поглинання при 280 нм із застосуванням коефіцієнта екстинії 2 для розчину Пегільованого ІФН- β 1мг/мл. Зразки пулу можуть бути відібрані для аналізу, і частина, що залишилася, може розводитися до 30мг/мл буфером складу, що містить HSA, аліквотуватися по 0,25мл/флакон і зберігатися при -70°C .

У способах винаходу може бути застосований глікозильований ІФН- β , сполучений з не існуючим в природі полімером. Полімер може включати поліалкіленгліколеву частину. Поліалкіленгліколева частина може бути приєднана до інтерферону-бета за допомогою групи, вибраної з альдегідної групи, малеїмідної групи, вінілсульфонової групи, галогенацетатної групи, безлічі гістидинових залишків, гідразинової групи і амінотіолової групи. ІФН- β може бути приєднаний до поліетиленглікової частини, де ІФН- β приєднують до поліетиленглікової частини за допомогою лабільного зв'язку, де лабільний зв'язок розщеплюється шляхом біохімічного гідролізу і/або протеолізу. Полімер може мати молекулярну масу від приблизно 5 до

приблизно 40 кілодальтон. Інший ІФН- β , який може бути застосований, являє собою фізіологічно активну композицію інтерферону-бета, що включає фізіологічно активний глікозильований інтерферон-бета, пов'язану на N-кінці з полімером, що включає поліалкіленгліколеву частину, де фізіологічно активний інтерферон-бета і поліалкіленгліколева частина організовані так, що фізіологічно активний інтерферон-бета в фізіологічно активній композиції інтерферону-бета має по суті схожу активність у порівнянні з фізіологічно активним інтерфероном-бета, що не має вказаної частини, при тестуванні на противірусну активність.

Гетерологічні поліпептиди або інші молекули можуть бути ковалентно або нековалентно зв'язані з білком ІФН- β або його варіантом. «Ковалентно зв'язані» означає, що різні залишки згідно з винаходом або прямо ковалентно зв'язані один з одним, або інакше посередньо ковалентно сполучені один з одним через проміжну частину або частини, такі як місточок, спейсер або лінкерна частина або частини. Проміжна частина або частини називають «приєднуючою групою». Термін «кон'югований» застосовують взаємозамінно з «ковалентно зв'язаним».

ІФН- β для застосування у винаході може бути глікозильованим або не глікозильованим (або без глікозилювання). Не глікозильовані ІФН- β можуть бути одержані, наприклад, в прокаріотичних клітинах-хазяїнах. Білки ІФН- β або їх варіанти також можуть бути модифіковані шляхом приєднання полісахаридів, які не присутні на ІФН- β в нормальних умовах.

3. Способи отримання терапевтичних агентів ІФН- β

Терапевтичні агенти ІФН- β цього винаходу можуть бути одержані будь-якими відповідними способами, такими як способи, що включають конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує терапевтичний агент ІФН- β , і експресію даної нуклеїнової кислоти у відповідному трансформованому хазяїні. Даний спосіб буде давати рекомбінантні терапевтичні агенти ІФН- β . Терапевтичні агенти ІФН- β можуть також бути одержані за допомогою хімічного синтезу або поєднання хімічного синтезу і технології рекомбінантної ДНК.

В одному здійсненні нуклеїнову кислоту, що кодує терапевтичний агент ІФН- β , конструюють шляхом виділення або синтезу послідовності ДНК, що кодує ІФН- β або його варіант. Наприклад, гібридний білок ІФН- β може бути одержаний як описано, наприклад, тут. Існуюча в природі нуклеїнова кислота ІФН- β може бути одержана відповідно до методів, добре відомих в даній галузі техніки. Наприклад, нуклеїнова кислота може бути виділена за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР) із застосуванням РНК, одержаною з клітини, відомої як експресуюча ІФН- β , наприклад, лейкоцита, і праймерів на основі послідовності гена ІФН- β , наприклад, SEQ ID NO: 1. Нуклеїнові кислоти, що кодують білки ІФН- β , можуть також бути виділені за допомогою скринінгових бібліотек, наприклад, бібліотек кДНК, створених від клітин, що експресують ІФН- β , із

зондом, наприклад, олігонуклеотидом, що включає частину послідовності ІФН-β.

Альтернативно, може бути використана повна амінокислотна послідовність для конструювання гена за зворотною трансляцією. Може бути синтезований олігомер ДНК, який містить нуклеотидну послідовність, що кодує терапевтичний агент ІФН-β. Наприклад, можна синтезувати декілька невеликих олігонуклеотидів, що кодують частини бажаного пептиду, і потім зв'язати їх разом. Індивідуальні нуклеотиди зазвичай містять 5' або 3' виступаючі кінці для комплементарного об'єднання.

Зміни в нуклеїнові кислоти, що кодують білки ІФН-β, можуть бути введені способами, добре відомими в даній галузі техніки. Наприклад, зміни можуть бути зроблені з допомогою сайт-направленого мутагенезу, [як описано, наприклад, в Mark et al., "Site-specific Mutagenesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 5662-66 (1984) і в патенті США №4588585].

Інший спосіб конструювання нуклеїнової кислоти, що кодує терапевтичний агент ІФН-β, полягає в хімічному синтезі. Наприклад, ген, який кодує бажаний терапевтичний агент ІФН-β, може бути синтезований хімічними способами із застосуванням олігонуклеотидного синтезатора. Такі олігонуклеотиди створюються на основі амінокислотної послідовності бажаного терапевтичного агента ІФН-β.

При виборі нуклеїнової кислоти для експресії в експресійній системі може бути бажаним відбір тих кодонів, які сприятливі для клітини-хазяїна або експресійної системи, в якій рекомбінантний агент ІФН-β буде продукуватися. Відомо, наприклад, що певні кодони експресуються переважно в порівнянні з іншими в прокаріотичних клітинах («перевага кодонів»).

Послідовність ДНК, що кодує терапевтичний агент ІФН-β, може також включати або не включати послідовність ДНК, яка кодує сигнальну послідовність. Така сигнальна послідовність, якщо вона присутня, повинна бути такою, що розпізнається клітиною, вибраною для експресії терапевтичного агента ІФН-β. Сигнальна послідовність може бути прокаріотичною, еукаріотичною або поєднанням їх двох. Сигнальні послідовності добре відомі в даній галузі техніки, і декілька різних представників описано в даній галузі техніки. Сигнальна послідовність може бути такою від нативного (тобто існуючого в природі) ІФН-β. Вмикання сигнальної послідовності залежить від того, чи є бажаним отримання терапевтичного агента ІФН-β, що секретується рекомбінантними клітинами, в яких він продукується. Якщо вибрані клітини є прокаріотичними, зазвичай бажано, щоб послідовність ДНК не кодувала сигнальну послідовність. Якщо вибрані клітини є еукаріотичними, зазвичай переважно, щоб сигнальна послідовність кодувалася, і найбільш бажано, щоб застосовувалася сигнальна послідовність ІФН-β дикого типу.

Вже скомпоновану (за допомогою синтезу, сайт-направленого мутагенезу або іншого способу) нуклеїнову кислоту, що кодує терапевтичний

агент ІФН-β, вставляють в експресійний вектор, в якому вона оперативно зв'язана з контролюючою експресію послідовністю, придатною для експресії терапевтичного агента ІФН-β в бажаному трансформованому хазяїні. Правильність компонування може бути підтверджена з допомогою секвенування нуклеотидів, рестрикційного картування і експресії біологічно активного поліпептиду у придатному хазяїні або клітині-хазяїні. Як добре відомо в даній галузі техніки, для того, щоб отримати високі рівні експресії трансфікованого гена в хазяїні або клітині-хазяїні, ген повинен бути оперативно зв'язаний з послідовностями, що здійснюють експресійний контроль транскрипції і трансляції, які функціонують в вибраному експресійному хазяїні.

Вибір послідовності, яка контролює експресію, і експресійного вектора повинен залежати від вибору клітини-хазяїна. Може бути застосована широка різноманітність поєднань хазяїна експресії/вектора. Придатні експресійні вектори для еукаріотичних хазяїнів, наприклад, еукаріотичних клітин-хазяїнів, містять, наприклад, вектори, що включають послідовності, контролюючі експресію, від SV40, вірусу папіломи бика, аденовірусу та цитомегаловірусу, наприклад, наступні вектори: вектори, що походять від pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVTV, pko-neo і pHyg. Альтернативно, похідні вірусів, таких як вірус папіломи бика (BPV-1) або вірус Епштейна-Барра (pHEBo, що походять від pREP і p205) можуть бути застосовані для тимчасової експресії білків в еукаріотичних клітинах. Різні способи, що застосовуються для отримання плазмід і трансформації організмів-хазяїнів, добре відомі в даній галузі техніки. З приводу інших експресійних систем [див. Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989) розділи 16 і 17].

Придатні для бактерійних хазяїнів експресійні вектори включають відомі бактерійні плазмиди, такі як плазмиди від E. coli, включаючи EI, pCR1, pBR322, pMB9 і їх похідні, широкий діапазон плазмід хазяїв, таких як RP4, ДНК фагів, наприклад, численні похідні фага лямбда, наприклад, NM989, і інші ДНК фагів, такі як M13 і односпіральні ДНК нитчастих фагів. Придатні експресійні вектори для дріжджових клітин включають плазмиду 2.mu. і її похідні. Придатні вектори для клітин комах включають pVL 941. [Див. також Gate et 1., "Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986)].

Крім того, будь-яка з широкої різноманітності послідовностей, які контролюють експресію, може бути застосована в даних векторах. Такі придатні послідовності, що контролюють експресію, включають контролюючі експресію послідовності, пов'язані зі структурними генами вказаних вище експресійних векторів. Приклади придатних послідовностей, контролюючих експресію, включають, наприклад, ранні і пізні промотори SV40 або аденовірусу, систему lac, систему trp, систему TAC або TRC, ділянки головного оператора і промотору фага лямбда, наприклад, PL, що контролюють ділянки оболонкового білка fd, промотор 3-

фосфогліцераткінази або інших гліколітичних ферментів, промотори кислої фосфатази, наприклад, P_{ho5}, промотори α -спряжувальної системи дріжджів і інші послідовності, відомі як такі, що контролюють експресію генів прокаріотичних або еукаріотичних клітин, або їх вірусів та їх різні поєднання.

Для одержання терапевтичних агентів ІФН- β може бути застосований будь-який відповідний хазяїн, включаючи бактерії, гриби (включаючи дріжджі), рослину, комаху, ссавця або інші відповідні клітини тварин чи клітинні лінії, а також трансгенні тварини або рослини. Приклади хазяїв включають штами *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, гриби, дріжджі, клітини комах, таких як *Spodoptera frugiperda* (SF9), клітини тварин, такі як клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO), і клітини мишей, такі як NS/O, клітини африканської зеленої мавпи, такі як COS 1, COS 7, BSC 40 і BMT 10, і клітини людини, а також клітини рослин в тканинній культурі. Такі клітини можуть бути одержані з американської колекції типових культур (ATCC). Переважні клітини-хазяї для експресії в клітинах тварин включають клітини CHO та клітини COS 7 і особливо клітинну лінію CHO-DDUKY-J31.

Повинно бути, звичайно, зрозуміло, що не всі вектори і послідовності, що контролюють експресію, будуть функціонувати однаково добре стосовно експресії описаних тут послідовностей ДНК. Не всі хазяї функціонують однаково добре з тією ж самою експресійною системою. Однак фахівець в даній галузі техніки може зробити відбір серед даних векторів, послідовностей, що контролюють експресію, і хазяїв без надмірних експериментів. Повинно також розглядатися число копій вектора, здатність контролювати дане число копій і експресія будь-яких інших білків, що кодуються вектором, таких як маркери антибіотиків. Наприклад, переважні вектори для застосування в даному винаході включають ті, які дозволяють ДНК, що кодує терапевтичний агент ІФН- β , ампліфікуватися в ряд копій. Такі вектори, що ампліфікуються, добре відомі в даній галузі техніки. Вони включають, наприклад, вектори, здатні до ампліфікації з допомогою ампліфікації DHFR [див., наприклад, Kaufman, патент США №4470461, Kaufman and Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrofolate Reductase cDNA Gene: Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", *Mol. Cell. Biol.*, 2, pp. 1304-19 (1982)], або ампліфікації глутамінсинтетази ("GS") [див., наприклад, патент США №5122464 і європейську опубліковану заявку 338841].

При виборі послідовності, що контролює експресію, повинні бути розглянуті різноманітні фактори. Вони включають, наприклад, відносну міцність послідовності, її контрольованість і сумісність з діючою послідовністю ДНК, що кодує терапевтичний агент ІФН- β , особливо відносно потенційних вторинних структур. Хазяї повинні бути вибрані при розгляді їх сумісності з вибраним вектором, токсичності продукту, що кодується для послідовностей ДНК даного винаходу, характеристик їх секреції, їх здатності до правильного укладання білків, вимог до їх ферментації або культивування і легкості очищення продуктів, що кодуються послідовностями ДНК.

В рамках даних параметрів фахівець в даній галузі техніки може обрати різні поєднання вектор/контролююча експресію послідовність/хазяїн, що призведе до експресії бажаних послідовностей ДНК при ферментації або в крупномасштабній тваринній культурі, наприклад, із застосуванням клітин CHO або клітин COS. Застосування клітинної лінії CHO CHO-KUKX-B1 *sup* для експресії варіантів ІФН- β додатково описане в патенті США №6127332.

Терапевтичний агент ІФН- β може бути також одержаний в системі *in vitro*, наприклад, в трансляційній системі *in vitro*, наприклад, клітинному лізаті, наприклад, лізаті ретикулоцитів. Термін «трансляційний система *in vitro*», який застосовується тут взаємозамінно з терміном «безклітинна трансляційна система» відноситься до трансляційної системи, яка являє собою безклітинний екстракт, що містить щонайменше мінімум елементів, необхідних для трансляції молекули РНК в білок. Трансляційний системи *in vitro* зазвичай включають макромолекули, такі як ферменти, фактори трансляції, ініціації та елонгації, хімічні реагенти та рибосоми. Наприклад, трансляційний система *in vitro* може включати, щонайменше, рибосоми, ⁷⁰РНК, що ініціює метіоніл-⁷⁰РНК^{мет}, білки або комплекси, залучені до трансляції, наприклад, eIF₂, eIF₃, кеп-зв'язувальний (СВ) комплекс, який включає кеп-зв'язувальний білок (СВР) і еукаріотичний фактор ініціації 4F (eIF_{4F}). Безліч трансляційних систем *in vitro* добре відома в даній галузі техніки, і вони включають набори, що є в продажу. Приклади трансляційних систем *in vitro* включають еукаріотичні лізати, такі як лізати ретикулоцитів кролика, лізати ооцитів кролика, лізати клітин людини, лізати клітин комах і екстракти зародків пшениці. Лізати є в продажу у виробників, таких як Promega Corp., Madison, Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amsterdam, Arlington Heights, Ill.; і GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. РНК для застосування в трансляційних системах *in vitro* може бути одержана *in vitro*, наприклад, із застосуванням промоторів SP6 або T7, відповідно до способів, відомих в даній галузі техніки.

В іншому способі терапевтичний агент ІФН- β експресується ендегенним геном клітини-хазяїна. Даний спосіб може включати введення гетерологічного промотору вище кодуючої ділянки гена ІФН- β , наприклад, промотору, що індукується, експресію ендегенного гена ІФН- β і відкриття ІФН- β , що продукується. Гетерологічний промотор може бути введений в клітини з допомогою «нокінгу» відповідно до способів, відомих в даній галузі техніки або альтернативно шляхом введення промотору в ген ІФН- β .

Терапевтичний агент ІФН- β , одержаний за даним винаходом, може бути глікозильованим або не глікозильованим в залежності від організму хазяїну, що застосовується для продукції терапевтичного агента. Якщо як хазяїн вибрані бактерії, то терапевтичний агент ІФН- β , що продукується, буде не глікозильованим. З іншого боку, еукаріотичні клітини будуть глікозилювати терапевтичні агенти ІФН- β .

Терапевтичний агент ІФН- β , який продукується трансформованим хазяїном, може бути очищений відповідно до будь-якого придатного способу. Для очищення ІФН- β відомі різні способи. [Див., наприклад, патент США № 4289689, 4359389, 4172071, 4551271, 5244655, 4485017, 4257938, 4541952 і 6127332]. В переважному здійсненні терапевтичний агент ІФН- β очищують імуноафінним способом, як описано, [наприклад, в Okamura et al., "Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography And N-Terminal Amino Acid Sequence." *Biochem.*, 19, pp. 3831-35 (1980)].

Наприклад, білки ІФН- β і їх варіанти можуть бути виділені і очищені відповідно до загальноприйнятих умов, таким як екстракція, преципітація, хроматографія, афінна хроматографія, електрофорез або тому подібне. Наприклад, білки і фрагменти інтерферону можуть бути очищені шляхом пропускання їх розчину через колонку, що має іммобілізований на ній рецептор інтерферону [див. патент №4725669]. Молекулу інтерферону, що зв'язалася, можна потім елюювати шляхом обробки хаотропною сіллю або шляхом елюції водним розчином оцтової кислоти. Гібридні білки з імуноглобуліном можуть бути очищені шляхом пропускання розчину, що містить гібридний білок, через колонку, яка містить іммобілізований протеїн А або протеїн G, які селективно зв'язують Fc частину гібридного білка. [Див., наприклад, Reis, K. J., et al., *J. Immunol.* 132:3098-3102 (1984); заявку PCT W087/00329]. Гібридне антитіло може бути потім елюйоване шляхом обробки хаотропною сіллю або шляхом елюції водним розчином оцтової кислоти.

Альтернативно, білки інтерферону і гібридні молекули з імуноглобуліном можуть бути очищені на колонках з антитілами проти інтерферону або на колонках з антитілами проти імуноглобуліну з одержанням по суті чистого білка. Під терміном «по суті чистий» мається на увазі, що білок вільний від забруднень, які зв'язані з ним в природі. Доказом істотної чистоти може бути одна смуга на електрофорезі.

ІФН- β , який був одержаний і очищений, може бути охарактеризований, наприклад, за допомогою пептидного картування. Наприклад, зразок терапевтичного агента ІФН- β може бути гідролізований ендопроотеїназою Lys-C і проаналізований на ВЕРХ з оберненою фазою, [як описано, наприклад, в патенті США №6127332].

В переважному здійсненні терапевтичний агент ІФН- β є по суті вільним від іншого клітинного матеріалу, наприклад, білків. Терміни «очищені препарати терапевтичного агента ІФН- β » відносяться до препаратів терапевтичного агента ІФН- β , що мають менш ніж приблизно 20% (по сухій масі) забруднюючого клітинного матеріалу, наприклад, нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, і переважно таким, що мають менш ніж приблизно 5% забруднюючого клітинного матеріалу. Переважні препарати терапевтичного агента ІФН- β мають менш ніж приблизно 2% забруднюючого клітинного матеріалу; навіть більш переважно менш ніж приблизно 1% забруднюючого клітинного матеріалу і найбільш переважно менш ніж приблизно 0,5; 0,2;

0,1; 0,01; 0,001% забруднюючого клітинного матеріалу.

Переважні композиції терапевтичного агента ІФН- β є також по суті вільними від інших клітинних білків (що також позначаються тут як «забруднюючі білки»), тобто композиції мають менш ніж приблизно 20% (по сухій масі) забруднюючого білка, і переважно мають менш ніж приблизно 5% забруднюючого білка. Переважні препарати цільових поліпептидів мають менш ніж приблизно 2% забруднюючого білка; навіть більш переважно менш ніж приблизно 1% забруднюючого білка і найбільш переважно менш ніж приблизно 0,5; 0,2; 0,1; 0,01; 0,001% забруднюючих білків.

Чистота і концентрація препаратів ІФН- β може бути визначена відповідно до способів, відомих в даній галузі техніки, наприклад, шляхом гелелектрофорезу зразків, і, [як описано, наприклад, в Robert K. Scopes, *Protein Purification, Principles and Practice*, Third Ed., Springer Verlag New York, 1993, і посиланнях, що цитуються там].

Біологічну активність терапевтичних агентів ІФН- β можна проаналізувати за допомогою будь-якого відповідного способу, відомого в даній галузі техніки, наприклад, за нейтралізацією антитілами протівірусної активності, за індукцією протеїнкінази, за активністю по відношенню до олігоаденілат 2,5-A синтетики або фосфодіестерази, наприклад, [як описано в патенті EP-B1-41313 і WO 00/23472]. Такі тести також включають оцінки імуномодуляторної активності [див., наприклад, патент США №4753795], тести на гальмування росту і вимірювання зв'язування з клітинами, що експресують рецептори інтерферону. Приклади протівірусних тестів додатково описані в патенті США 6127332 і WO 00/23472.

Здатність терапевтичних агентів ІФН- β лікувати гломерулонефрит може бути також оцінена на тваринних моделях, наприклад, тих, які описані тут далі в прикладах. Тестування може бути проведене, наприклад, як описано в прикладах.

Терапевтичні агенти ІФН- β можуть бути також придбані комерційно під наступними торговельними марками: AVONEX® (ІФН- β -1a) (Biogen, Inc., Cambridge, MA); REBIF® (ІФН- β -1a) (Serono, S.A., Geneva, Switzerland); BETAIFERON® або Bferon (ІФН- β -1b) (Schering Aktiengesellschaft, Berlin, Germany); і BETASERON® або Bseron (Berlex, Montville, NJ, ІФН- β -1b). AVONEX® і REBIF® є рекомбінантним глікозильованим ІФН- β людини, що продукується в клітинах яєчника китайського хом'ячка. BETAIFERON® і BETASERON® продукуються в бактеріях.

4. Способи лікування за допомогою терапевтичних агентів ІФН- β

У винаході пропонуються способи лікування гломерулонефриту або хронічної ниркової недостатності у суб'єкта, що має або припускається, що має гломерулонефрит, який розвивається, що включають введення суб'єкту терапевтично ефективного кількості терапевтичного агента ІФН- β . Суб'єктом може бути суб'єкт з виявленими гломерулонефритом або хронічною нирковою недостатністю.

Гломерулонефрит, що позначається також як «гострий нефрит» або «гострий гломерулонефрит», являє собою гострий, але скороминущий запальний процес, який торкається клубочків, що призводить до гострих реакцій ШКФ, внаслідок чого виникає дисбаланс рідини і відхилення від норми електролітів. Симптоми гломерулонефриту включають: протеїнурію; знижену швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ); зміни електролітів сироватки, включаючи азотемію (уремія, надлишковий азот сечовини в крові - BUN) і затримку солі, що веде до затримки води, яка призводить до гіпертензії та набряку; гематурію і аномальні осадки сечі, що включають згустки еритроцитів; гіпоальбумінемію; гіперліпідемію; і ліпідурію.

Ряд захворювань, наприклад, зазначених нижче, включають гломерулонефрит. При достатній тяжкості гострий гломерулонефрит може викликати гостру або таку ниркову недостатність, що швидко розвивається. Гострий гломерулонефрит, асоційований з нирковою недостатністю, що швидко розвивається, є звичайним сценарієм, який може бути названий гломерулонефритом, що швидко розвивається через його клінічний прояв. Оскільки ушкодження стінки клубочка є постійним фактором при гострому гломерулонефриті, еритроцити і альбумін зазвичай проникають у простір Боумена і надходять до сечі. Поєднання наявності еритроцитів в сечі, ниркової недостатності і аномалій гомеостазу рідини називають нефритичним синдромом. Масивна втрата білків плазми може вести до стану, званого нефротичним синдромом, коли втрата білків з сечею веде до порушення білкового балансу сироватки, що супроводжується низьким рівнем альбуміну в сироватці, аномаліями ліпідів і набряком. Таким чином, для діагнозу гострого гломерулонефриту потрібні лабораторні дані, що свідчать про протеїнурію (альбумінурію) та гематурію, зазвичай зі згустками еритроцитів, в той час як відсутність таких даних вказує на інший діагноз. Наприклад, тубулоінтерстиційний нефрит включає швидкоплинне гостре запалення ниркових каналців і інтерстицію, що не торкається капілярів клубочків. Як і при гострому гломерулонефриті, мають місце гематурія, згустки еритроцитів і зниження ШКФ, але протеїнурія менш виражена і включає переважно низькомолекулярні білки замість альбуміну.

За синдром гострого гломерулонефриту може бути відповідальним ряд складових захворювання. Зазвичай для оцінки хворих з гострим гломерулонефритом потрібна ниркова біопсія, незалежно від ступеня та наявності ниркової недостатності. Діагноз, прогноз і терапія визначаються точними гістологічними та ультраструктурними особливостями, виявленими на матеріалі ниркової біопсії. Більш того, біопсійні тканини можуть бути піддані аналізу для визначення типів імунних комплексів, імуноглобулінів і інших речовин, залучених в конкретний гломерулонефрит, причому зазвичай проводять імунофлуоресцентний аналіз. Захворювання, що ушкоджують нирки, можуть бути розділені на категорії відповідно до їх патогенезу, незалежно від того, чи приводять вони до ушкодження нефрону, достатнього для порушення швидкості клубочкової

фільтрації, спричиняючи тим самим появу деяких типів ниркової недостатності.

Для опису різних особливостей захворювання клубочків розроблена традиційна номенклатура. У літературі можуть застосовуватися взаємозамінно захворювання клубочків, гломерулопатія та гломерулонефрит, хоча термін гломерулонефрит часто означає запальний процес, як обговорювалося вище. Захворювання клубочків класифікують як первинні, коли патологія виникає в нирках і звідси викликає системні прояви; захворювання клубочків називають вторинними, коли вони виникають внаслідок деякого іншого, мультисистемного розладу. Патологічні особливості, видимі при світловій мікроскопії, забезпечують додаткову характеристику типу захворювання клубочків. Ушкодження, що торкається частини структури клубочків, називають сегментарним, а ушкодження, що торкається майже всієї структури клубочків, називають глобальним. Аномалії, що характеризуються збільшенням кількості клітин в клубочку, називають проліферативними, незалежно від того, чи зумовлено збільшення кількості клітин інфільтрацією лейкоцитів або проліферацією резидентних клітин клубочків. Клітинну проліферацію, що включає клітини капсули Боумена, називають екстракапілярною; проліферацію, що включає ендотеліальні або мезангіальні клітини, називають інтракапілярною або енкапілярною. Скупчення клітин, що збираються в просторі Боумена, і що має серпоподібну форму, називають серпоподібною структурою, і зазвичай воно складається з проліферувальних парієтальних епітеліальних клітин та інфільтрованих моноцитів. Серпоподібний гломерулонефрит являє собою тип гострого гломерулонефриту, відмінного утворенням серпоподібних структур в клубочках. Оскільки даний стан часто асоційований з швидко прогресуючою нирковою недостатністю, термін серпоподібний гломерулонефрит може застосовуватися взаємозамінно з швидко прогресуючим гломерулонефритом. Якщо захворювання клубочків відрізняється потовщенням базальної мембрани клубочка за рахунок імунного відкладення, то його називають мембранозним. Поєднання вказаних вище термінів застосовують для опису складових частин захворювання клубочків на підставі їх основних патологічних особливостей. Проліферативні гломерулопатії, які називаються також запальними гломерулопатіями, включають такі стани, як фокальний проліферативний гломерулонефрит, дифузний проліферативний гломерулонефрит, мезангіальний проліферативний гломерулонефрит і серпоподібний гломерулонефрит, причому кожний термін передбачає локалізацію і/або тип проліферувальних клітин. Дані стани відрізняються наявністю клітин крові та білків в осаді сечі, але відсутністю втрати білків, яка могла б викликати нефротичний синдром, так звану «нефритичну» картину. Мембранозні гломерулопатії включають зміну в клубочковому фільтраційному бар'єрі для білків, що включає базальну мембрану клубочків та вісцеральні епітеліальні клітини. Дані порушення, включаючи мембранну гломерулопатію, хворобу з мінімальною зміною та фокальний і сегментарний гломерулосклероз, ведуть до тяжкої втрати

білка і можуть призводити до нефротичного синдрому. Як передбачається назвою, мембранопроліферативний гломерулонефрит являє собою змішане захворювання з клінічними особливостями, що передбачають як клітинну проліферацію, так і ушкодження бар'єру клубочкової фільтрації. Дані захворювання, відмінні вираженням позасудинним відкладенням білкової або фібрилярної речовини, називають хворобами клубочкового відкладення. Вони можуть включати як нефритичні, так і нефротичні компоненти, що, таким чином, перекривається з таким, що має місце при проліферативних або мембранозних захворюваннях. До останньої категорії захворювань, що торкаються нирок, відносяться тромботичні мікроангіопатії, захворювання, при яких згортання відбувається всередині ниркової сітки мікросудин. Кожна з даних категорій володіє особливим типом етіології.

Існує спектр проліферативних гломерулопатій, що передбачає те, що різні гістопатологічні особливості виникають внаслідок різних запальних процесів. Наприклад, дифузний проліферативний гломерулонефрит може представляти собою гостру імунну відповідь на несподіване потужне надходження антигену. Серпоподібний гломерулонефрит може включати менш драматичну імунну відповідь на менше надходження антигену у презентованих індивідуумів. Фокальний проліферативний або мезангіальний проліферативний гломерулонефрит являють собою останню агресивну форму спектра, коли хворі можуть страждати лише від повільно прогресуючої ниркової недостатності.

Імунофлуоресцентні дослідження біопсійного матеріалу нирок допомагають розрізнити основні причини проліферативної гломерулопатії. Існують три широкі діагностичні категорії, кожна з яких пов'язана з конкретною особливістю відкладення імуноглобулінів, що виявляється за імунофлуоресценцією в поєднанні з сильною клітинною проліферацією. Гранулярні відкладення імуноглобуліну відрізняють першу категорію: імунокомплексний гломерулонефрит. Лінійне відкладення імуноглобуліну вздовж базальної мембрани клубочка відрізняє другу категорію: хворобу анти-GBM. Мінімальне відкладення імуноглобуліну відрізняє третю категорію: оліго-імунний гломерулонефрит. Імунокомплексний гломерулонефрит може являти собою відповідь на відомий антигенний стимул (наприклад, постстрептококовий гломерулонефрит) або може утворювати частину мультисистемного захворювання з імунними комплексами (наприклад, вовчачка, криоглобулінемії або бактеріального ендокардиту); в деяких випадках причину не вдається встановити, і захворювання розглядається як ідіопатичне. Хвороба анти-GBM є рідким захворюванням, при якому утворюються антитіла, що атакують колаген типу IV. У більшості хворих хворобою анти-GBM є також геморагія легень, стан, який називається синдромом Гудпасчера. Оліго-імунний гломерулонефрит відрізняється аномальним рівнем антитіл в кров'яному руслі проти цитоплазми нейтрофілів, що означає деяку дисрегуляцію гуморального імунітету.

Імунологічний опосередкований гломерулонефрит становить велику частину набутого захво-

рування нирок. Зазвичай є відкладення антитіл в клубочковому пучку, часто аутоантитіл. Механізми клітинного імунітету, залучені в опосередкований антитілами гломерулонефрит, додатково модулюють утворення антитіл і індукують залежну від антитіл цитотоксичність. Велика частина гломерулонефриту у хворих ініціюється взаємодією циркулюючих антитіл з аутоантигенами.

Антитіла можуть бути виявлені в клубочку як результат декількох різних процесів. По-перше, циркулюючі аутоантитіла можуть взаємодіяти з внутрішніми аутоантигенами, які є компонентами нормального клубочка. По-друге, циркулюючі аутоантитіла і зовнішні антигенні, які були відкладені всередині клубочка, можуть забезпечувати утворення *in situ* клубочкових імунних комплексів. Потретє, імунні комплекси, утворені в системному кров'яному руслі, можуть бути захоплені в клубочок. Локалізація відкладення антитіл зазвичай в значній мірі визначає клінічні особливості захворювання клубочків. Гостре відкладення антитіла в субендотеліальному просторі або мезангіумі може викликати сильну нефритичну відповідь, що відрізняється швидким рекрутуванням лейкоцитів і тромбоцитів з капілярів клубочків. Відкладення антитіл в субепітеліальному просторі зазвичай викликає відповідь нефротичного типу, що відрізняється протеїнурією з менш вираженою інфільтрацією клітин запалення.

Будь-який з даних імунологічних процесів може індукувати каскад запальних реакцій в клубочку, що призводять до ушкодження клубочка і подальшого відновлення. Здатність аутоантитіл до взаємодії з внутрішніми антигенами або антигенами пересаженого клубочка веде до утворення комплексу, хемоатрактантів, хемокінів і цитокінів. Тим самим ініціюються залежні від комплексу і незалежні від комплексу механізми, що призводять до ушкодження клітин клубочка. В клубочок рекрутуються також лейкоцити і тромбоцити, викликаючи додаткове ушкодження. Стійке відкладення імунного комплексу протягом від місяців до років може також провокувати значне збільшення утворення базальної мембрани. Процес відновлення для будь-якої імунологічної опосередкованої гломерулопатії не може відбутися доти, доки не припиниться локальна імунна активність з припиненням подальшої продукції імунного комплексу з видаленням відкладених і циркулюючих імунних комплексів, із запобіганням подальшого рекрутування клітин запалення, з видаленням медіаторів запалення в тканинах нирок та з нормалізацією судинного тону і адгезивності ендотелію.

Після ушкодження клубочка може наступити одужання з рубцюванням. Одужання може бути повним без залишкового ушкодження. Частіше рубцювання клубочка відбувається більш широко з порушенням функції нирок. Було виявлено, що трансформуючий фактор росту β (TGF- β), цитокін, який сприяє процесу загоєння в клубочках, стимулює утворення позаклітинного матриксу і інгібує синтез тканинних протеаз, які руйнують білки матриксу, тим самим підсилюючи утворення рубця після ушкодження клубочка. Утворення рубця після ушкодження клубочка додатково ушкоджує життєздатні нефрони, які залишилися, що веде до

прогресуючої втрати нефронів. По мірі втрати нефронів, що функціонують, нефрони, що залишилися їх компенсують, що, як описано вище, являє собою процес, який руйнує їх самих. Кінцевим результатом може бути прогресивне зниження функції нирок, що завершується хронічною нирковою недостатністю з її фінальною стадією кінцевої стадії хвороби нирок.

Терапевтичні агенти ІФН- β можуть бути також застосовані для лікування фокального гломерулосклерозу та колапсуючих гломерулопатій, включаючи ідіопатичні та вторинні форми, зумовлені інфекцією ВІЛ. Колапсуючий гломерулонефрит являє собою швидко прогресуюче захворювання, що веде до ниркової недостатності, для якої немає ефективної терапії. Дане захворювання має місце головним чином у хворих на ВІЛ. Оскільки при даних захворюваннях головну роль відіграє протеїнурія, очікується, що терапевтичні агенти ІФН- β , які значно знижують протеїнурію, повинні здійснювати значно поліпшувачий вплив на дані захворювання. Іншою хворобою, при якій протеїнурія відіграє головну роль і при якій, як очікується, придатні терапевтичні агенти ІФН- β , є хвороба з мінімальною зміною, яка називається також нефропатією з мінімальною зміною (MCN) та нефротичним синдромом з мінімальною зміною (MCNS).

Відповідно, терапевтичні агенти ІФН- β можуть застосовуватися для лікування станів нирок, пов'язаних із запаленням клубочків, наприклад, будь-яких з наступних станів нирок: фокальний гломерулосклероз та колапсуючі гломерулопатії, хвороба з мінімальними змінами, гострий гломерулонефрит, серпоподібний гломерулонефрит, нефритичний синдром, нефротичний синдром, первинний гломерулонефрит, вторинний гломерулонефрит, проліферативний гломерулонефрит, мембранозний гломерулонефрит, мембранопротиперативний гломерулонефрит, імунокомплексний гломерулонефрит, гломерулонефрит з антитілами проти базальної мембрани клубочків (анти-GBM), оліго-імунний гломерулонефрит, діабетична гломерулопатія, хронічний гломерулонефрит і спадковий нефрит. Будь-яке захворювання або стан, що виникає внаслідок захворювань нирок, таких як хронічна хвороба нирок і хвороба нирок кінцевої стадії, також може лікуватися відповідно до способів винаходу.

5. Суб'єкти для лікування

Загалом способи цього винаходу можуть бути застосовані до будь-якого ссавцевого суб'єкту, що має гломерулонефрит, хронічну ниркову недостатність або такого, що має ризик їх розвитку або ризик в результаті ниркової замісної терапії (тобто хронічного діалізу або трансплантації нирки). «Суб'єктом, що має ризик розвитку гломерулонефриту або хронічної ниркової недостатності» є суб'єкт, який, як обґрунтовано очікується, буде страждати від прогресуючої втрати функції нирок, пов'язаної з прогресуючою втратою функціональних нефронових одиниць. Чи має суб'єкт гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність або має ризик їх розвитку, є предметом визначення, яке може бути звичайним чином проведене фахівцем у відповідній ділянці медичної або ветеринарної техніки. Суб'єкти, що мають гломерулонефрит або хроні-

ну ниркову недостатність або що мають ризик їх розвитку (або ризик внаслідок необхідності ниркової замісної терапії), включають, але не обмежуються цим, наступних: суб'єкти, яких можна розглядати як страждаючих на хронічну ниркову недостатність, на кінцеву стадію хвороби нирок, на хронічну діабетичну нефропатію, гіпертензивний нефросклерозом, хронічний гломерулонефрит, спадковий нефрит і/або ниркову дисплазію; суб'єкти, що мають протеїнурію, зміни електролітів сироватки, наприклад, азотемію (уремію, тобто надмірний азот сечовини в крові або "BUN"); затримку солі, що призводить до гіпертензії і набряку, гематурію і аномальні осадки сечі, що включають згустки еритроцитів; гіпоальбумінемію, гіперліпідемію та ліпідурію; суб'єкти з біопсією, що вказує на гіпертрофію клубочків, гіпертрофію каналців, хронічний гломерулосклероз і/або хронічний тубулоінтерстиціальний склероз; суб'єкти, що зазнали ультразвукового, MRI, CAT сканування або іншого неінвазивного обстеження, вказуючого на нирковий фіброз або менший у порівнянні з нормою розмір нирок. Додаткові вказування на суб'єктів, що мають гломерулонефрит або ХНН чи ризик їх розвитку, добре відомі фахівцям в даній галузі техніки. Наприклад, все наступне може служити критерієм для визначення того, чи має суб'єкт гломерулонефрит або ХНН чи ризик їх розвитку: суб'єкти з незвичайною кількістю великих згустків, що знаходяться в осаді сечі; суб'єкти з ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 50% і особливо менш ніж приблизно 40%, 30% або 20% від очікуваної ШКФ для суб'єкта; суб'єкти-чоловіки з масою щонайменше приблизно 50кг і маючі ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 50мл/хв і особливо менш ніж приблизно 40мл/хв, 30мл/хв або 20мл/хв; суб'єкти-жінки з масою щонайменше приблизно 40кг і маючі ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 40мл/хв і особливо менш ніж приблизно 30мл/хв, 20мл/хв або 10мл/хв; суб'єкти з кількістю функціональних нефронових одиниць, що складає менш ніж приблизно 50% і особливо менш ніж приблизно 40%, 30% або 20% від кількості функціональних нефронових одиниць, що є у здорового, але в інших відношеннях схожого суб'єкта; суб'єкти, що мають одну нирку; і суб'єкти, що є реципієнтами ниркового трансплантату.

Ссавцеві суб'єкти, які можуть зазнавати лікування, включають, але не обмежуються цим, суб'єктів-людей або пацієнтів. Окрім того, винахід може бути застосований для лікування одомашнених ссавців, які містяться як компаньйони людини (наприклад, собак, кішок, коней), що мають значну комерційну цінність (наприклад, дійні корови, м'ясна велика рогата худоба, спортивні тварини), які мають значну наукову цінність (наприклад, поневолені або вільні представники вимираючих видів), або які мають іншу цінність. Суб'єкти для лікування не потребують надання показань для лікування терапевтичними агентами ІФН- β , відмінних від того показання, яке пов'язане з ризиком гломерулонефриту, хронічної ниркової недостатності і хвороби нирок кінцевої стадії, наприклад, при необхідності замісної ниркової терапії. Тобто, очікується, що суб'єкти для лікування в інших відно-

шеннях вільні від показань для лікування терапевтичними агентами ІФН-β. В деяких випадках, однак, можуть існувати суб'єкти з іншими симптомами (наприклад, вірусним захворюванням, таким як інфекція гепатиту), для яких лікування терапевтичними агентами ІФН-β могло б бути показане. У таких випадках лікування повинне бути відповідним чином адаптоване до того, щоб уникнути надмірного дозування.

Фахівець в галузі медичної або ветеринарної техніки навчений розпізнавати суб'єкти, які можуть мати значний ризик гломерулонефриту, хронічної ниркової недостатності або значний ризик замісної ниркової терапії. Зокрема, клінічні і неклінічні випробування, а також накопичений досвід, що стосуються розкритих тут і інших способів лікування, як очікується, повинні дати досвідченому професіоналу інформацію при розв'язанні питання про те, чи має даний суб'єкт гломерулонефрит, хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності замісної ниркової терапії, і того, чи є будь-яке конкретне лікування найбільш відповідним потребам суб'єкта, включаючи лікування згідно з цим винаходом.

Загалом, ссавцевий суб'єкт може розглядатися як такий, що має гломерулонефрит, хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності замісної ниркової терапії, якщо у даного суб'єкта вже було діагностоване ураження або якщо даного суб'єкта можна було б розглядати як ураженого станом, який зазвичай веде до прогресуючої втрати функції нирок, пов'язаної з прогресуючою втратою функціональних нефронових одиниць. Такі стани включають, але не обмежуються цим, хворобу нирок кінцевої стадії, хронічну діабетичну нефропатію, діабетичну гломерулопатію, діабетичну ниркову гіпертрофію, гіпертензивний нефросклероз, гіпертензивний гломерулосклероз, хронічний гломерулонефрит, спадковий нефрит, ниркову дисплазію та хронічне відторгнення після пересадки ниркового алотрансплантату і тому подібне. Дані і інші захворювання і стани, відомі в даній галузі техніки, зазвичай ведуть до прогресивної втрати функціональних нефронів та настання хронічної ниркової недостатності.

Часто фахівець в галузі медицини або ветеринарії може обґрунтувати прогноз, діагноз або рішення про лікування на основі обстеження біопсійного зразка нирок. Такі біопсії забезпечують багату інформацію, корисну для діагностики захворювань нирок. Суб'єкти, що мають гломерулонефрит, хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності замісної ниркової терапії, можуть бути виявлені за гістологічними показаннями на основі ниркових біопсій, включаючи, але не обмежуючись цим, наявність клітин запалення, наприклад, Т-клітин та макрофагів, в клубочках, клубочкової гіпертрофії, каналцевої гіпертрофії, гломерулосклерозу, тубулоінтерстиційного склерозу і тому подібного.

Менш інвазивні способи оцінки морфології нирок включають MRI, CAT і ультразвукове сканування. Придатні також способи сканування, при яких застосовують контрастуючі або формуючі зображення агенти (наприклад, радіоактивні барв-

ники), однак потрібно зазначити, що деякі з них є особливо токсичними для тканин і структур нирок і, отже, їх застосування може бути нерозсудливим у суб'єктів, що мають гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку. Такі неінвазивні способи сканування можуть застосовуватися для визначення таких станів, як нирковий фіброз або склероз, фокальний нирковий некроз, ниркові кісти та ниркова масивна гіпертрофія, які зазвичай є у суб'єкта, що відноситься до категорії таких, що мають ризик розвитку гломерулонефриту, хронічної ниркової недостатності або ризик необхідності замісної ниркової терапії.

Часто прогноз, діагноз і/або рішення про лікування ґрунтуються на клінічних показниках функції нирок. Одним з таких показників служить наявність в осаді сечі незвичайної кількості «великих» або «пов'язаних з нирковою недостатністю» згустків, що є указанням на каналцеву гіпертрофію і передбачає компенсаторну ниркову гіпертрофію, що є типовою для хронічної ниркової недостатності. Іншим показником ниркової функції є швидкість клубочкового потоку (ШКФ), яка може бути виміряна прямо шляхом кількісного визначення швидкості кліренсу конкретних маркерів, або яка може бути виведена з непрямих вимірювань.

Способи лікування згідно з даним винаходом не повинні бути обмежені суб'єктами, що мають будь-які конкретні значення ШКФ або будь-якого іншого конкретного маркера ниркової функції. Дійсно, немає необхідності в тому, щоб ШКФ у суб'єкта або будь-який інший конкретний маркер ниркової функції визначалися до здійснення лікування відповідно до даного винаходу. Проте, вимірювання ШКФ розглядають як переважний інструмент оцінки ниркової функції.

Як добре відомо в даній галузі техніки, ШКФ відображає швидкість кліренсу референтної або маркерної сполуки з плазми в сечу. Маркерна сполука, що розглядається, зазвичай являє собою сполуку, яка вільно фільтрується клубочками, але яка не секретується активно або реабсорбується нирковими каналцями і яка не зв'язується в значній мірі білками в кровеносному руслі. Швидкість кліренсу зазвичай визначають за формулою, представленою вище, в якій співвідносять об'єм сечі, утвореної за двадцятичотиригодинний період, і відносні концентрації маркера в сечі і плазмі. Для більшої точності ШКФ потрібно також відкоригувати на площу поверхні тіла. Референтною сполукою «золотого стандарту» служить інсулін завдяки його фільтраційним властивостям та відсутності зв'язування в сироватці. Однак, важко кількісно виміряти концентрацію даної сполуки в крові або сечі. Тому замість інсуліну часто використовують швидкості кліренсу інших сполук, включаючи креатинін. Крім того, часто застосовують формули, в яких для спрощення визначення дійсної ШКФ опускають розгляд дійсних концентрацій маркера в сечі, дійсних добових, об'ємів утвореної сечі і дійсної площі поверхні тіла. Дані величини можуть бути замінені величинами, оснований на інших факторах, базовими величинами, встановленими для того ж самого суб'єкта, або стандартними величинами для схожих суб'єктів. Дані величини, однак, потрібно застосовувати з обережністю, оскільки

вони можуть вести до невиправданих висновків, що ґрунтуються на нирковій функції нормальних або здорових суб'єктів. Крім того, для визначення швидкості ниркового кліренсу застосовують п-аміногіпурат (ПАН).

В даній галузі техніки були розроблені різні способи і формули, які описують очікувану величину ШКФ у здорового суб'єкта з певними показниками. Зокрема, є формули, які дають очікувану величину ШКФ на основі рівня креатиніну в плазмі, віку, маси і статі (див., наприклад, розділ «Визначення» тут). Звичайно, можуть бути застосовані інші формули, і можуть бути створені таблиці стандартних величин для суб'єктів даного віку, маси, статі і/або концентрації креатиніну в плазмі. В цей час в даній галузі техніки доступні також і більш нові способи вимірювання або встановлення ШКФ (наприклад, із застосуванням способів ЯМР або MRI), і вони можуть бути застосовані згідно з цим винаходом [див., наприклад, патенти США №5100646 і 5335660].

Загалом, незалежно від способу вимірювання або встановлення ШКФ, суб'єкт можна розглядати як такий, що має гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності в замісній нирковій терапії, коли суб'єкт має ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 50% від очікуваної ШКФ для даного суб'єкта. При більшому зниженні ШКФ ризик вважається великим. Таким чином, суб'єкт розглядають як такий, що має зростаючий ризик, якщо суб'єкт має ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 40%, 30% або 20% від очікуваної ШКФ. Суб'єкт-чоловік з масою щонайменше приблизно 50кг може розглядатися як такий, що має гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності в замісній нирковій терапії, якщо суб'єкт має ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 50мл/хв. При більшому зниженні ШКФ ризик вважається великим. Таким чином, суб'єкт розглядають як такий, що має зростаючий ризик, якщо суб'єкт має ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 40, 30 або 20мл/хв. Суб'єкт-жінка з масою щонайменше приблизно 40кг може розглядатися як такий, що має гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність чи ризик їх розвитку або ризик необхідності в замісній нирковій терапії, якщо суб'єкт має ШКФ, яка хронічно становить менш ніж приблизно 30, 20 або 10мл/хв. Загалом, суб'єкт може розглядатися як такий, що має гломерулонефрит або хронічну ниркову недостатність чи їх ризик або ризик необхідності в замісній нирковій терапії, якщо у суб'єкта кількість функціональних нефронових одиниць складає менш ніж приблизно 50% від кількості функціональних нефронових одиниць, яка є у здорового, але в інших відношеннях схожого суб'єкта. Як вказано вище, ризик вважається великим по мірі подальшого зниження кількості функціональних нефронів. Таким чином, суб'єкт розглядають як такий, що має зростаючий ризик, якщо суб'єкт має кількість функціональних

нефронів, яка складає менш ніж приблизно 40, 30 або 20% від кількості у схожого, але здорового суб'єкта.

Нарешті, потрібно зазначити, що суб'єкти, які мають одну нирку, незалежно від історії втрати другої нирки (наприклад, фізичної травми, хірургічного видалення, дефекту при народженні), можуть розглядатися як такі, що мають, за відсутністю доказів на користь протилежного, ризик гломерулонефриту, хронічної ниркової недостатності або необхідності в замісній нирковій терапії. Це особливо вірно відносно тих суб'єктів, у яких одна нирка була втрачена через захворювання або стан, який може пошкодити нирку, що залишилася. Схожим чином, суб'єкти, які вже є реципієнтами ниркового трансплантату або які вже зазнають хронічного діалізу (наприклад, хронічного гемодіалізу або тривалого амбулаторного перитонеального діалізу), можуть розглядатися як такі, що мають ризик гломерулонефриту, хронічної ниркової недостатності або необхідності в подальшій замісній нирковій терапії.

Суб'єкти, які можуть лікуватися згідно зі способами винаходу, включають також тих, які мають стан або захворювання, яке, як відомо, може лікуватися ІФН-β, наприклад, розсіяний склероз та вірусні інфекції. Типові вірусні інфекції включають гепатит, наприклад, інфекції гепатиту В. В таких ситуаціях може бути розроблений режим введення терапевтичного агента ІФН-β, адаптований для лікування обох станів. Суб'єктами можуть бути також суб'єкти, в яких немає вірусної інфекції, яку можна лікувати ІФН-β, або вірусної інфекції, що викликає гломерулонефрит. Відповідно, типові приклади суб'єктів включають ті, які не є носіями вірусу гепатиту, наприклад, вірусу гепатиту В або С, або ті, у яких гломерулонефрит не був викликаний вірусом гепатиту, наприклад, вірусом гепатиту В або С. Альтернативно, суб'єктом може бути також суб'єкт, що має гломерулонефрит або що має ймовірність його розвитку, викликаний вірусною інфекцією. В інших здійсненнях у суб'єкта немає ниркової недостатності кінцевої стадії або нирково-клітинної карциноми.

6. Склади та способи лікування

Терапевтичні агенти ІФН-β можуть вводитися будь-яким шляхом, який є сумісним з конкретним терапевтичним агентом, що застосовується для нирок. Так, придатним може бути пероральне або парентеральне введення, включаючи внутрішньовенний, внутрішньочеревинний або внутрішньокапсульний нирковий шляхи введення. Крім того, введення може проводитися шляхом періодичних ін'єкцій болюсу агента (агентів), описаних тут (тобто терапевтичних агентів ІФН-β, або проводиться більш тривало шляхом внутрішньовенного або внутрішньочеревинного введення з резервуара, який є зовнішнім (наприклад, в. в. мішок) або внутрішнім (наприклад, біоеродований імплантат або імплантований насос). У способі згідно з винаходом терапевтичні агенти ІФН-β переважно вводять парентерально. Термін «парентеральний», що застосовується тут, включає аерозольний, підшкірний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, внутрішньосуглобовий, внутрішньосиновіальний, внутрішньогрудинний, внутрішньооболонковий,

внутрішньопечінковий, всередину ушкодження і внутрішньочерепний способи ін'єкції або інфузії.

Агенти винаходу можуть вводитися індивідуально за допомогою будь-яких відповідних засобів, переважно прямо (наприклад, локально, у вигляді ін'єкції або місцевого нанесення на локус тканини) або системно (наприклад, парентерально або перорально). Коли агент призначений для парентерального введення, такого як внутрішньовенне, підшкірне або внутрішньом'язове введення, агент переважно включає частину водного розчину. Розчин є фізіологічно прийнятним, так що в доповнення до доставки бажаного агента суб'єкту розчин не надає в інших відношеннях несприятливої дії на електролітний і/або об'ємний баланс у суб'єкта. Водне середовище для агента, таким чином, може включати нормальний фізіологічний сольовий розчин (наприклад, 0,9% NaCl, 0,15M, pH 7-7,4).

Терапевтичні агенти ІФН-β переважно вводять у вигляді стерильної фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій, який може бути будь-яким з безлічі добре відомих носіїв, таких як вода, сольовий розчин, забуферений фосфатом сольовий розчин, декстроза, гліцерин, етанол і тому подібне, або їх поєднанням. Терапевтичні агенти ІФН-β можуть бути одержані в композиції, що включає один або більше інших білків, наприклад, для стабілізації терапевтичного агента ІФН-β. Наприклад, терапевтичні агенти ІФН-β можуть бути змішані з альбуміном.

Фармацевтичні композиції можуть включати терапевтичний агент ІФН-β разом з будь-яким фармацевтично прийнятним носієм. Термін "носій", що застосовується тут, включає прийнятні ад'юванти та розчинники. Фармацевтично прийнятні носії, які можуть застосовуватися в фармацевтичних композиціях даного винаходу, включають, але не обмежуються цим, іонообмінники, оксид алюмінію, стеарат алюмінію, лецитин, білки сироватки, такі як альбумін сироватки людини, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінову кислоту, сорбат калію, суміші часткових гліцеридів насичених рослинних жирних кислот, воду, солі або електроліти, такі як протамінсульфат, динатрійфосфат, дикалійфосфат, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний оксид кремнію, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, речовини на основі целюлози, поліетиленгліколь, карбоксиметилцелюлоза натрію, поліакрилати, воски, поліетилен-поліоксипропілен-блок-полімери, поліетиленгліколь та жир вовни.

ІФН-β або його варіанти можна також вводити у формі ліпосомних систем доставки, таких як малі одношарові пухирці, великі одношарові пухирці та багатошарові пухирці. Ліпосоми можуть бути утворені з безлічі фосфоліпідів, що містять холестерин, стеариламін або фосфатидилхоліні. У деяких здійсненнях плівку з ліпідних компонентів гідрують водним розчином ліків з утворенням ліпідного шару, що заключають ліки в капсулу, [як описано в патенті США №5262564].

ІФН-βs або їх варіанти можуть бути також приєднані до розчинних полімерів як спрямовувані носії ліків. Такі полімери можуть включати полівінілпіролідон, пірановий співполімер, полігідроксипропілметакриламідфенол, полігідроксietиласпанаїдфенол або поліетиленоксидполілізін,

заміщений пальмітоїльними залишками. ІФН-βs або їх варіанти можуть бути також приєднані до білків, таких як, наприклад, рецепторні білки і альбумін. Більш того, ІФН-βs або їх варіанти можуть бути також приєднані до класу біодеградованих полімерів, придатних для контрольованого досягнення вивільнення ліків, наприклад, полімолочної кислоти, поліепсилон-капролактону, полігідроксимасляної кислоти, поліортоєфірів, поліацеталей, полідігідропіранів, поліціаноакрилатів та поперечно-зшитих або амфіпатичних блок-сополімерів гідрогелів.

Згідно з винаходом, фармацевтичні композиції можуть знаходитися в формі стерильного препарату для ін'єкцій, наприклад, стерильної водної або маслянистої суспензії для ін'єкцій. Дана суспензія може бути складена згідно зі способами, відомими в даній галузі техніки, із застосуванням прийнятних диспергуючих або зволожуючих агентів та суспендуєчих агентів. Стерильний препарат для ін'єкцій може бути також стерильним розчином або суспензією для ін'єкцій в нетоксичному, парентерально прийнятному розріджувачі або розчиннику, наприклад, у вигляді розчину в 1,3-бутандіолі. Серед прийнятних носіїв і розчинників, які можуть бути застосовані, знаходяться вода, розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як розчинник або суспендуєче середовище традиційно застосовують стерильні, тверді масла. Для даної мети може бути застосоване будь-яке м'яке нелетке масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Для одержання препаратів для ін'єкцій придатні такі жирні кислоти, як олеїнова кислота і її гліцеридні похідні, а також природні фармацевтично прийнятні масла, такі як оливкова олія або касторове масло, особливо в їх поліоксиетильованому варіанті. Дані масляні розчини або суспензії можуть також містити довголанцюговий спиртовий розріджувач або диспергуючий агент.

Фармацевтичні композиції, що включають терапевтичні агенти ІФН-β, можна також вводити перорально. Наприклад, їх можна вводити в будь-якій перорально прийнятній лікарській формі, включаючи, але не обмежуючись цим, капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. У випадку таблеток для перорального застосування носії, які зазвичай застосовують, включають лактозу та кукурудзяний крохмаль. Зазвичай також додають змачувальні агенти, такі як стеарат магнію. Для перорального введення у формі капсул прийнятні розріджувачі включають лактозу та висушений кукурудзяний крохмаль. Коли для перорального застосування необхідні водні суспензії, активний інгредієнт з'єднують з емульгуювальними та суспендуєчими агентами. При бажанні, можуть бути також додані деякі підсолоджувачі, віддушки або барвники. Можуть застосовуватися також місцеві черезшкірні пластири.

У переважному здійсненні ІФН-β або його варіант вводять у вигляді рідкої композиції, що включає стабілізуючий агент. Стабілізуючий агент може знаходитися в кількості від 0,3% до 5% від маси ІФН-β або його варіанту. Стабілізуючий агент може являти собою амінокислоту, таку як кисла амінокислота (наприклад, глутамінова кислота і аспарагінова кислота), або аргінін або гліцин. Якщо стабі-

лізуючий агент являє собою аргінін-HCl, його концентрація повинна переважно знаходитися в діапазоні від 0,5% (мас/об.) до 5%, і найбільш переважно 3,13% (еквівалентно 150мМ аргінін-HCl). Якщо стабілізуючий агент являє собою гліцин, його концентрація повинна переважно знаходитися в діапазоні від 0,5% (мас/об.) до 2,0%, і найбільш переважно 0,52% (еквівалентно від 66,7мМ до 266,4мМ, і найбільш переважно 70мМ). Якщо стабілізуючий агент являє собою глутамінову кислоту, його концентрація повинна переважно знаходитися в діапазоні від 100 до 200мМ, і найбільш переважно 170мМ (що еквівалентно мас/об відсоткам в діапазоні від 1,47% до 2,94%, і найбільш переважно 2,5% мас/об.). Переважний діапазон концентрацій ІФН-β або його варіанту в рідких складах складає від приблизно 30мкг/мл до приблизно 250мкг/мл. Переважний діапазон концентрацій складає від 48 до 78мкг/мл, і найбільш переважною концентрацією є приблизно 69мкг/кг. У термінах Міжнародних Стандартних величин внутрішній стандарт Biogen був стандартизований по відношенню до Міжнародного Стандарту WHO для інтерферону, Природний #Gb-23-902-531, так що діапазон концентрацій в IU (для 0,5мл об'єму для ін'єкції) складає від приблизно 6 IMU до 50 IMU, і найбільш переважна концентрація дорівнює 12 IMU.

Переважно, щоб амінокислотним стабілізуючим агентом був аргінін, який включають в його кислотній формі (аргінін-HCl) в розчинах з рН приблизно 5,0. Відповідно, переважними є полііонні наповнювачі. Переважно, щоб рідка композиція знаходилася в посудині, наприклад, шприці, в якій посудина має поверхню, що знаходиться в контакті з рідиною, яка покрита речовиною, інертною по відношенню до ІФН-β, наприклад, силіконом або політетрафторетиленом. Ще більш переважні композиції, що мають рН від 4,0 до 7,2. Переважно, щоб розчин, що включає стабілізуючий агент, не був ліофілізований і не зазнавав дії газу, що містить кисень, під час одержання та зберігання.

Буфери органічних кислот та фосфату для застосування в даному винаході для підтримки рН в діапазоні від приблизно 4,0 до приблизно 7,2 і переважно від приблизно 4,5 до приблизно 5,5 і найбільш переважно 5,0, можуть бути традиційними буферами органічних кислот та їх солей, такими як цитратні буфери (наприклад, сумішшю мононатрійцитрат-динатрійцитрат, сумішшю лимонна кислота-тринатрійцитрат, сумішшю лимонна кислота-мононатрійцитрат тощо), сукцинатні буфери (наприклад, сумішшю бурштинова кислота-мононатрійсукцинат, сумішшю бурштинова кислота-гідроксид натрію, сумішшю бурштинова кислота-динатрійсукцинат тощо), тартратні буфери, fumarатні буфери, глюконатні буфери, оксалатні буфери, лактатні буфери, фосфатні буфери і ацетатні буфери, [як додатково розкрито в WO 98/28007].

Типові склади, які можуть бути одержані, [як описано в WO 98/38007], включають:

(i) 20мМ ацетатний буфер з рН 5,0, буфер, який переважно раніше не ліофілізували, де буфер включає ІФН-β і щонайменше один інгредієнт, вибраний з (a) 150мМ аргінін-HCl; (b) 100мМ хло-

риду натрію і 70мМ гліцину; (c) 150мМ аргінін-HCl і 15мг/мл альбуміну сироватки людини; (d) 150мМ аргінін-HCl і 0,1% Pluronic F-68; (e) 140мМ хлориду натрію; (f) 140мМ хлориду натрію і 15мг/мл альбуміну сироватки людини; і (g) 140мМ хлориду натрію і 0,1% Pluronic F-68;

(ii) рідина з рН 5,0, яка включає ІФН-β або його варіант, 170мМ L-глутамінову кислоту і 150мМ гідроксид натрію, рідину, яка переважно раніше не була ліофілізована; і

(iii) 20мМ фосфатний буфер з рН 7,2, причому буфер переважно раніше не був ліофілізований, де буфер включає ІФН-β і щонайменше один інгредієнт, вибраному з: (a) 140мМ аргінін-HCl і (b) 100мМ хлориду натрію і 70мМ гліцину.

Переважні композиції також включають полісорбат, наприклад, 0,005% полісорбат 20.

ІФН-β можуть бути складені у формі сухого порошку, який може бути, але може і не бути солюбілізований або суспендований перед введенням суб'єкту. Зокрема, було показано, що ІФН-βs, приєднані до полімеру, наприклад, ПЕГ, особливо стабільні в сухій формі [див., наприклад, WO 00/23114 і PCT/US/95/06008].

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть також вводитися за допомогою назального аерозолю або інгаляції із застосуванням розпилювача, інгалятора сухого порошку або інгалятора з дозою, що відмірюється. Такі композиції одержують згідно зі способами, добре відомими в галузі техніки фармацевтичних складів, і можуть бути одержані у вигляді розчинів в сольовому розчині із застосуванням бензилового спирту або інших прийнятних консервантів, стимуляторів абсорбції для підвищення біологічної доступності, фторвуглеців і/або інших традиційних солюбілізуючих або диспергуючих агентів. Згідно з іншим здійсненням, композиції, що містять сполуки даного винаходу, можуть також включати додатковий агент, вибраний з групи, що складається з кортикостероїдів, протизапальних агентів, імуносупресорних агентів, агентів, що гальмують метаболізм, та імуномодуляторів. З'єднання всередині кожного з даних класів можуть бути вибрані з будь-яких, [перелічених у відповідних групових рубриках в "Comprehensive Medicinal Chemistry", Pergamon Press, Pxford, pp. 970,986 (1990), розкриття яких включене тут як посилання]. Конкретними сполуками є теофілін, сульфасалазин та аміносаліцилати (протизапальні агенти); циклоспорин, FK-506 та рапаміцин (імуносупресорні агенти); циклофосфамід та метотрексат (агенти, що гальмують метаболізм); стероїди (для інгаляції, перорального або місцевого застосування) та інші інтерферони (імуномодулятори).

Придатні для парентерального введення розчини можуть бути одержані будь-якими способами, добре відомими в галузі фармацевтичної техніки, [описаними, наприклад, в Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., ed), Mack Pub., 1990].

Парентеральне введення у вигляді ін'єкції зазвичай застосовують для підшкірних, внутрішньом'язових або внутрішньовенних ін'єкцій та інфузій. Наприклад, коли застосовують підшкірну ін'єкцію для доставки 0,01-100мкг/кг, або більш переважно 0,01-10мкг/кг ІФН-β, наприклад, пегільованого

ІФН-β, протягом одного тижня можна вводити дві ін'єкції по 0,005-50мкг/кг або більш переважно 0,005-5мкг/кг, відповідно, через 0 та 72 години. Крім того, в одному підході для парентерального введення застосовують імплантацію системи з повільним вивільненням або постійним вивільненням, яка забезпечує підтримку постійного рівня дози, [згідно з патентом США №3710795, включеним тут як посилання].

Як повинно бути зрозуміло фахівцям в даній галузі техніки, складені композиції містять терапевтично ефективні кількості терапевтичних агентів ІФН-β. Тобто, вони містять кількості, які забезпечують прийнятні для тканин нирок або інших прийнятних тканин концентрації терапевтичного агента ІФН-β протягом часу, достатнього для профілактики, гальмування, затримки або пом'якшення постійної або прогресуючої втрати функції нирок, або забезпечують терапевтичну ефективність іншим чином. Як це повинно бути зрозумілим для фахівця в даній галузі техніки, концентрація сполук, описаних в терапевтичній композиції цього винаходу, повинна варіювати в залежності від ряду факторів, включаючи біологічну ефективність вибраного агента, хімічні властивості (наприклад, гідрофобність) сполук, що застосовуються, склад наповнювачів для сполуки, шлях введення та передбачуване лікування, включаючи те, чи буде активний інгредієнт вводитися прямо в нирку або ниркову капсулу, або він буде вводитися системно. Переважна доза для введення, очевидно, також повинна залежати від таких змінних, як стан тканин нирок, міра втрати ниркової функції та загальний стан здоров'я конкретного суб'єкта. Дози можна вводити безперервно або щодня, але в цей час переважно, щоб дози вводилися один, два або три рази на тиждень стільки часу, скільки продовжується задовільна відповідь (вимірювана, наприклад, за стабілізацією і/або поліпшенням ниркової функції за допомогою відповідних медичних показників і/або за показниками якості життя). Можуть застосовуватися також менш часті дози, наприклад, щомісячні дози. Для суб'єктів, для яких в інших умовах були б потрібні постійні, двічі або тричі на тиждень сесії гемодіалізу, постійні, двічі або тричі на тиждень внутрішньовенні або внутрішньочеревинні інфузії не можна розглядати як занадто незручні. Крім того, для полегшення постійних інфузій може бути доцільною імплантація напівперманентного стенту (наприклад, внутрішньовенного, внутрішньочеревинного або внутрішньокапсулярного).

Режим доз із застосуванням ІФН-β вибирають відповідно до безлічі чинників, включаючи тип, вигляд, вік, масу, стать і медичний стан хворого; тяжкість підлягаючого лікуванню стану; шлях введення; функцію нирок і печінки хворого; конкретну сполуку, що застосовується, або її сіль. Враховують також активність сполук винаходу і чутливість хворого до побічних ефектів. Досвідчений лікар або ветеринар може легко визначити і прописати ефективну кількість ліків, що потребується для профілактики, подолання або зупинки прогресування стану.

Пероральні дози цього винаходу, переважно для пегільованих терапевтичних агентів ІФН-β,

зазвичай знаходяться в діапазоні між приблизно 0,01-100мкг/кг/день перорально, або більш переважно 0,01-10мкг/кг/день перорально. Композиції переважно пропонуються у формі таблеток з насичками, що містять 0,5-5000мкг, або більш переважно 0,5-500мкг активного інгредієнта. Для будь-якого шляху введення можна застосовувати розділені або одиничні дози. Наприклад, сполуки цього винаходу можна вводити щодня або щотижня в одиничній дозі, або сумарну дозу можна вводити у вигляді дози, розділеної на дві, три або чотири частини.

Будь-яка з приведених вище фармацевтичних композицій може містити 0,1-99,9%, 1-70% або, переважно, 1-50% активних сполук винаходу як активні інгредієнти.

Перебіг хвороби і її відповідь на лікування ліками можуть бути відстежені за допомогою клінічного обстеження і лабораторних даних. Ефективність терапії винаходу визначають за ступенем, в якому пом'якшуються раніше описані ознаки і симптоми стану, наприклад, хронічного гепатиту, і за ступенем, в якому виключаються або істотно знижуються звичайні побічні ефекти інтерферону (тобто схожі з грипом симптоми, такі як лихоманка, головний біль, озноб, міалгія, втома тощо, і симптоми, пов'язані з центральною нервовою системою, такі як депресія, парестезії, порушена увага тощо).

Терапевтичні агенти ІФН-β можна вводити окремо або в поєднанні з іншими молекулами з відомою сприятливою дією в лікуванні описаних тут станів, наприклад, протизапальними ліками. При застосуванні в поєднанні з іншими агентами може виникнути необхідність у відповідній зміні доз терапевтичних агентів ІФН-β.

Кількість активного інгредієнта, яка може бути сполучена з речовинами-носіями для одержання одиниці лікарської форми, зазвичай варіює в залежності від хазяїна, що піддається лікуванню і конкретного способу введення. Потрібно розуміти, однак, що конкретна доза і режим лікування для кожного конкретного хворого зазвичай залежать від безлічі факторів, включаючи активність конкретної сполуки, що застосовується, віку, маси тіла, загального стану здоров'я, статі, дієти, часу введення, швидкості екскреції, поєднання ліків та рішення лікаря-куратора та тяжкості підлягаючого лікуванню конкретного захворювання. Кількість активного інгредієнта може також залежати від терапевтичного або профілактичного агента, з яким, якщо це має місце, спільно вводять інгредієнт.

Ефективна доза і швидкість введення дози терапевтичних агентів ІФН-β зазвичай залежать від безлічі факторів, таких як природа інгібітору, розміри хворого, мета лікування, природа патології, що підлягає лікуванню, конкретна фармацевтична композиція та рішення лікаря-куратора. Придатні рівні дози між приблизно 0,001 і приблизно 100мг/кг маси тіла в день, переважно між приблизно 0,1 і приблизно 50мг/кг маси тіла сполуки активного інгредієнта. Найбільш переважно, щоб терапевтичний агент ІФН-β вводився в дозі між приблизно 0,1мг/кг маси тіла і приблизно 20мг/кг маси тіла, переважно в діапазоні між приблизно

1мг/кг маси тіла і приблизно 3мг/кг маси тіла з інтервалами кожні 1-14 днів. Переважні дози складаються з ін'єкції приблизно 6 MIU на тиждень або тричі на тиждень. Оптимізація дозування може бути визначена, наприклад, шляхом введення терапевтичних агентів ІФН-β з подальшою оцінкою концентрації терапевтичного агента ІФН-β в кровосносному руслі або локально.

У найбільш переважному здійсненні потребуючим цього суб'єктам вводять AVONEX®. AVONEX® є в продажу у вигляді ліофілізованого порошку, що складається з наступного:

Склад на 1мл дози:

30мкг інтерферону-b-1a (6 мільйонів міжнародних одиниць (MIU))

50мМ фосфату натрію

100мМ хлориду натрію

15мг альбуміну сироватки людини

pH 7,2

Питома активність AVONEX® інтерферону становить 2×10^8 одиниць/мг, тобто 200 MU антивірусної активності на міліграм білка ІФН-b-1a. Хворий додає до порошку стерильну воду перед внутрішньом'язовою ін'єкцією 1мл один раз на тиждень. AVONEX® можна також одержувати у вигляді рідкого складу, що складається з наступного:

30мкг ІФН-b-1a (6 мільйонів міжнародних одиниць (MIU))

20мМ ацетату (ацетату натрію і оцтової кислоти)

150мМ аргініну HCl

0,005% полісорбату 20

води для ін'єкцій

pH4,8

Даний склад може бути вміщений в заздалегідь наповнений шприц. Хворий може застосовувати шприц або вручну, або за допомогою автоінжектору. Режим дозування становить 6 MU (тобто 30мкг) внутрішньом'язово один раз на тиждень.

В іншому здійсненні ІФН-β являє собою Rebif, який постачається у вигляді ліофілізованого порошку і у вигляді рідкого складу. Ліофілізований порошок складається з наступного:

Склад на дозу 2,0мл:

3 МШ ІФН-b-1a

маніт

ЛСА

Ацетат натрію

pH 5,5

Питома активність Rebif інтерферону становить $2,7 \times 10^8$ одиниць/мг, тобто 270 MU антивірусної активності на міліграм білка ІФН-b-1a. Хворий додає до порошку розчин хлориду натрію (0,9% NaCl) перед підшкірною ін'єкцією тричі на тиждень. Склад рідкого Rebif є наступним:

6або 12 MIU ІФН-b-1a

4 або 2мг ЛСА

27,3мг маніту

0,4мг ацетату натрію

вода для ін'єкцій

Рідкий склад може бути вміщений в заздалегідь наповнений шприц і введений із застосуванням аутоінжекторного пристрою (Rebiject) або без нього 3 рази (6 або 12 MIU, відповідних

66мкг/тиждень або 132мкг/тиждень, відповідно) на тиждень підшкірно.

У ще одному здійсненні ІФН-β являє собою BETASERON® (від Berlex), ІФН-β, що містить мутацію cys-17 замість ser, одержаний в E. coli. Даний неглікозильований ІФН-β є менш активним у порівнянні з AVONEX® або REBIF®, обидва яких продукуються в клітинах CHO. Дози продаються у вигляді доз 250мкг (8 MIU) як в ліофілізованих, так і в рідких складах для підшкірної ін'єкції через кожні два дні. Іншим ІФН-β, що є у продажу, є BETAFERON®, який можна вводити підшкірно відповідно до інструкцій виробника.

ІФН-β або його варіант може також вводитися разом з розчинним рецептором ІФН типу I або його частиною, такою як ІФН-зв'язувальний ланцюг рецептора, [як описано, наприклад, в патенті США №6372207]. Як описано в патенті, введення ІФН типу I в формі комплексу з ІФН-зв'язувальним ланцюгом рецептора поліпшує стабільність ІФН і збільшує ефективність ІФН. Комплекс може бути нековалентним комплексом або ковалентним комплексом.

Терапевтичні агенти ІФН-β можуть бути тестовані на моделях гломерулонефриту у тварин. Моделі гломерулонефриту у ссавців, наприклад, у мишей, щурів, морських свинок, кішок, собак, овець, кіз, свиней, корів, коней і відмінних від людини приматів, можуть бути одержані шляхом індукції прямого або посереднього ушкодження або інсульту тканин нирок тварини. Моделі гломерулонефриту у тварин можуть бути одержані, наприклад, шляхом ін'єкції антитіл проти базальної мембрани клубочків, як у разі тваринної моделі нефротоксичного нефриту (NTN) у щурів, описаної в прикладах. Інші тваринні моделі можуть бути одержані шляхом ін'єкції антитіл проти Thy1, як додатково описано в прикладах. Ще один тип тваринних моделей одержують імунізацією аутологічною базальною мембраною клубочків або односторонньою обструкцією уретри (UUO).

Терапевтичні агенти ІФН-β можна оцінювати за їх терапевтичною ефективністю в індукції клінічно значущого поліпшення стандартного маркера ниркової функції при введенні ссавцевому суб'єкту (наприклад, хворій людині), що має ризик розвитку гломерулонефриту або хронічної ниркової недостатності. Такі маркери ниркової функції добре відомі в медичній літературі і включають, але не обмежуються цим, швидкість підвищення протеїнуриї, рівень BUN, швидкість підвищення креатиніну сироватки, статичні вимірювання BUN, статичні вимірювання креатиніну сироватки, швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), відношення BUN/креатинін, концентрацію натрію (Na+) в сироватці, відношення креатиніну в плазмі/сечі, відношення сечовини в плазмі/сечі, осмолярність сечі, добове утворення сечі і тому подібне [див., наприклад, Brenner and Lazarus (1994), in Harrison's Principles of internal Medicine, 13th edition].

Даний винахід додатково ілюструється наступними прикладами, які не треба тлумачити як такі, що обмежують яким-небудь чином. Зміст всіх цитованих джерел (включаючи літературні посилання, видані патенти, опубліковані патентні заявки як

цитовані за допомогою цього заявки) ясно включені тут як посилання.

При здійсненні цього винаходу зазвичай використовують, якщо це не вказано інакше, традиційні способи клітинної біології, клітинних культур, молекулярної біології, трансгенної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК та імунології, які знаходяться в рамках даної ділянки техніки. Такі способи повністю пояснені в літературі. [Див., наприклад, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); *DNA Cloning*, Volumes I and II (D.N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait ed., 1984); Mullis et al. U.S. Patent № 4683195; *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J.H. Miller and M.P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 і 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV (D. M. Weir і C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)].

Приклади

Приклад 1: ІФН-β викликає значне зниження протеїнурії при нирковій недостатності

У даному прикладі описується те, що ІФН-β значно знижує протеїнурію на тваринній моделі NTN (нефротоксичного нефриту) у щурів, яка являє собою модель запалення, що є гістологічно близькою до серпоподібного гломерулонефриту людини, що веде до хронічної ниркової недостатності.

Захворювання індукують у щурів за допомогою в. в. ін'єкції нефротоксичної (NTS) сироватки, яку отримують імунізацією кроликів препаратом ліофілізованої базальної мембрани клубочків (GBM). NTS швидко зв'язується з GBM, що веде до енергійної внутрішньоклубочкової запальної відповіді з підвищенням рівня прозапальних цитокінів і молекул адгезії. Відбувається приплив лейкоцитів в клубочок. Потім в клубочках розвиваються ділянки некрозу з відкладенням фібрину та руйнуванням капілярних петель. Це веде до розвитку серпоподібних структур - акумуляції клітин запалення та проліферуючих епітеліальних клітин клубочка в просторі Боумена. Даний простір запалення відрізняється втратою великої кількості білка з сечею. У клубочках розвивається прогресуюче рубцювання з накопиченням колагену в пучок та фіброзною трансформацією серпоподібних структур. Потім у щурів розвивається кінцева ниркова недостатність. Таким чином, при даній моделі щури відповідають на антитіла проти GBM гострим, але скороминущим захворюванням нирок, і потім 100% тварин прогресує до ХНН чітко певним чином. Різні лінії щурів володіють варіюючою схильністю до

даної форми ушкодження нирок, причому надзвичайно чутливими є щури Wistar-Kyoto (WKY). Дана тваринна модель додатково описана, [наприклад, в Tarn et al. (1999) *Nephrol. Dial. Transplant.* 14:1658 і Alien et al. (1999) *J. Immunol.* 162:5519].

Застосований в даному дослідженні ІФН-β являв собою ТФН-β щура, що відповідає амінокислотам 22-184 з GenBank з реєстраційним №P70499. ІФН-β експресували в клітинах S-32 яєчників китайського хом'ячка (CHO), адаптованих до росту в суспензії і таких, що здійснюють секрецію в середовище. Клітини вирощували в середовищі, що містить сироватку, в ферментерних культурах. ІФН-β очищували зі стандартизованого культурального середовища із застосуванням послідовної хроматографії на Pharmacia SP-сефарозі, блакитній сефарозі та смолах супероза 12, Biorad Bio-Scale керамічному гідроксилапатиті та смолах Bio-Scale S. Після цього ІФН-β інтенсивно діалізували проти 25мМ цитрату/150мМ NaCl (pH 4,5) і стерилізували фільтрацією (0,2мкм). Препарат ІФН-β мав >99% чистоту за даними денситометрії забарвлених кумасі невідновлювальних ДДС-Na ПАГЕ гелів. За результатами вимірювання на клітинах RATEC щура було визначено, що питома активність становить приблизно 3×10^8 одиниць/мг.

У даному прикладі NTN індукують у 28 щурів WKY, отриманих від Charles River Laboratories. Чотирьох щурів забивали на 14-й день для базової гістології, а інших рандомізували для отримання або ІФН-β 3×10^5 одиниць/день внутрішньочеревинно (в. ч.), або ІФН-β 6×10^5 одиниць/день в. ч., або тільки розчинника. Ін'єкції проводили 6 днів на тиждень, і лікування продовжували до 30-го дня. Протеїнурію вимірювали на 7-й день і потім щотижня. У щурів брали кров на 14-й день, 28-й день і при забої. При забої нирки, легені, печінку та селезінку фіксували в формаліні, а нирки швидко заморожували.

Оцінювали наступні функціональні параметри, визначені в даному і/або подальших прикладах.

Альбумінурію/протеїнурію: даний показник відображає витік в клубочках і, в меншій мірі, недостатність канальцевого метаболізму фільтрованих білків. Інтерпретація таких даних може бути ускладнена, оскільки вони є результатом двох незалежних змінних; підвищена проникність GBM веде до більшої протеїнурії, але знижена швидкість клубочкової фільтрації знижує клубочкову протеїнурію.

Сечу збирали в метаболічних клітинах за 24 години до забою. Концентрацію альбуміну сечі визначали ракетним імуноелектрофорезом. Концентрацію білка сечі визначали осадженням сульфосаліциловою кислотою.

Сироватковий креатинін та кліренс креатиніну (CrCl): Периферичну кров отримували при забої для визначення концентрації креатиніну сироватки із застосуванням реактивів Olympus і аналізатора Olympus AU600 (Olympus, Eastleigh, U.K.). Вимірювали також концентрацію креатиніну в сечі (Bayer RA-XT, Newbury, U.K.) для здійснення розрахунків кліренсу креатиніну.

Виживання. Кінцевою точкою даних досліджень є або несподівана смерть, або забій для

виявлення дистресу. Тварини оглядаються щодня непосвяченим, незалежним спостерігачем, і тварин, що гинуть, забивають за рішенням третьої сторони. На практиці приблизно половина тварин в дослідженнях на виживання досягала кінцевої точки "забою".

Для грубої оцінки рубцювання клубочків, випадіння каналців, інтерстиційних запальних інфільтратів та інтерстиційного фіброзу із застосуванням умовних бальних шкал отримували зрізи, забарвлені гематоксиліном та еозином.

Фіброз клубочків: за допомогою комп'ютера встановлювали % площі кори нирок, забарвленої в зелений колір за допомогою гістохімії Masson-Trichrome, яка передбачає спосіб оцінки «навантаження» колагеном в нирках. Для кількісної оцінки інтерстиційного фіброзу в клубочках зрізи нирок, поміщені в парафін, забарвлювали за допомогою стандартного триколірного способу (Martius Yellow, Brilliant Crystal Scarlet і Aniline Blue). Для кількісної оцінки відкладення фібрину в клубочках (наприклад, фібриноїдного некрозу) зрізи нирок, поміщені в парафін, забарвлювали за допомогою Martius Yellow, який забарвлює фібрин в червоний/оранжевий колір. Зрізи досліджують при збільшенні X200 за допомогою мікроскопа Olympus BX40 (Olympus Optical, London, U.K.), з'єднаного з цифровим фотонний фотоапаратом (Photonic Science, East Sussex, U.K.). Зображення фіксували і аналізували за допомогою програми Image-Pro Plus™ (Media Cybernetics, Silver Spring, MD).

Кількісне визначення % площі кори нирок, забарвленої коричневим кольором після імунопероксидазного фарбування домену ED (A) фібронектину на зрізах нирок, мабуть, забезпечує розрізнення ХНН з різною функціональною тяжкістю. Схожим чином імуногістохімія колагену типу III дозволяє розрахувати % забарвленої площі кори нирок.

Експресію альфа-гладком'язового актину (SNA) в клубочках вимірювали з допомогою імунофлуоресценції. Даний білок визначає популяцію «міофібробластних» клітин в клубочках, які, як вважають, займають провідне місце в фіброзі клубочків. Кількісне визначення фарбування альфа-(SMA) добре корелює з показниками фіброзу клубочків Masson-trichrome.

Результати, які показані на Фіг.3, вказують на значне зниження протеїнуриї на 21-й і 28-й дні у тварин, що піддавалися лікуванню обома дозами ІФН-β. Не виявлено відмінностей в сироватковому креатиніні, кліренсі креатиніну, клубочковому або тубулоінтерстиційному рубцюванні по відношенню до "сліпого" зрізу Н&Е (тобто гістологічного рубцювання); в кількості макрофагів або CD8 в клубочках; або відкладенні фібронектину ED (A) або колагену типу IV в клубочках.

Приклад 2: ІФН-β значно знижує протеїнурію в гострій фазі ниркової недостатності

Даний приклад показує, що в доповнення до зниження протеїнуриї на більш пізніх стадіях ниркової недостатності ІФН-β також знижує протеїнурію в гострій фазі ниркової недостатності.

Для даного прикладу NTN індукували у 32 щурів за допомогою ін'єкції 0,1мл NTS в. в., як описано вище. Вісім щурів лікували ІФН-β щура

6х10⁵ одиниць/день в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 14-й день. Вісім щурів лікували RSA в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 14-й день. Вісім щурів лікували ІФН-β щура 6х10⁵ одиниць/день в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 28-й день. Вісім щурів лікували RSA в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 28-й день. Сечу збирали в метаболічних клітинах на 7-й, 14-й, 21-й і 28-й дні для вимірювання протеїнуриї і креатину. У всіх щурів брали кров на 14-й день і при забої для визначення креатину сироватки. Половину щурів кожної групи забивали на 14-й день і половину - на 28-й день. За годину до забою щурів на 28-й день вводили BrdU для оцінки клітинної проліферації. Для гістології в формаліні фіксували наступні тканини: нирки, легені, печінку і селезінку. Зрізи нирок фіксували в фіксаторі Carnoy для забарвлення BrdU. Нирки також швидко заморожували. Рубцювання клубочків, атрофію каналців та фіброз оцінювали напівкількісно на забарвлених Н&Е зрізах.

Результати, представлені на Фіг.4, вказують на те, що ІФН-β викликає значне зниження протеїнуриї на 14-й, 21-й і 28-й дні. Не було відмінностей в креатиніні сироватки та кліренсі креатиніну на 14-й і 28-й дні. Гістологічно було наявним значне зниження макрофагів клубочків (клітини ED1+) і клітин CD8 + на 14-й день, але більша кількість - на 28-й день. Відбувалося також значне зниження гладком'язового актину в клубочках на 28-й день. Таким чином, лікування ІФН-β впливало на протеїнурію, спричиняло зниження запалення, але не надавало вираженої дії на рубцювання.

В іншому прикладі NTN індукували у 16 щурів WKY, вісім з яких лікували ІФН-β щура 6х10⁵ одиниць/день в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 7-й день, а інших вісім щурів лікували лише носієм (альбуміном сироватки щура - RSA) в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 7-й день. Щурів утримували в метаболічних клітках на 6-й і 7-й дні. Всіх щурів забивали на 7-й день. За одну годину до забою щурам вводили BrdU для оцінки клітинної проліферації. При забої в формаліні фіксували нирки, легені, печінку і селезінку. Нирки фіксували в фіксаторі Carnoy для фарбування BrdU і швидко заморожували. Результати показують відсутність значних відмінностей в протеїнуриї, гістології клубочків або кількості макрофагів або CD8 клітин в клубочках. Однак показник фібриноїду на 7-й день у тварин, що лікувалися ІФН-β, був нижчим, ніж у контрольних тварин. Крім того, кількість проліферуючих клітин в клубочках була значно нижчою у тварин, що лікувалися ІФН-β, у порівнянні з контрольними тваринами (див. Фіг.5).

Приклад 3: ІФН-β викликає значне зниження протеїнуриї при нирковій недостатності на тваринній моделі Thy гломерулонефриту

Даний приклад показує, що протеїнурія також значно знижується під дією ІФН-β при мезангіальному проліферативному гломерулонефриті.

Для даного прикладу застосовували тваринну модель Thy1 гломерулонефриту. Вона являє собою модель мезангіального проліферативного гломерулонефриту, який відрізняється підвищеною протеїнурією, проліферацією мезангіальних клітин і накопиченням мезангіального матриксу. Дана модель залежить від того, що мезангіальні

клітини експресують антигенний Thy1. Щурам Lewis вводять однократну в. в. ін'єкцію моноклонального антитіла проти Thy1. Це веде до швидко-го та відтворюваного опосередкованого комплек-ментом некрозу мезангіальних клітин клубочків (мезангіолілізу). Протеїнурія стає явною до 24 годин і продовжується щонайменше протягом 10 днів. Мезангіолізис змінюється фазою репарації, в якій мезангіальні клітини проліферують, і відбува-ється утворення надлишку мезангіального матрик-су. Це являє собою модель протеїнурії і проліфе-рації мезангіальних клітин.

Thy1 гломерулонефрит індукували у 16 щурів Lewis і 4 щурів WKY шляхом ін'єкції 0,2мл (2,5мг/кг) антитіла ER4 проти Thy1. Вісім щурів Lewis отримували ІФН- β щура 6×10^5 одиниць/день в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 10-й день. Вісім щурів Lewis отримували носій (альбумін сироватки щура - RSA) в. ч. 6 днів на тиждень з 0-го по 10-й день. Чотири щури WKY не отримували лікування, і прогресування захворювання відстежували з 0-го по 10-й день. Щурів утримували в метаболічних клітках на 6-й і 7-й і 9-й і 10-й дні. Щурів забивали на 10-й день. За одну годину до забою щурам вво-дили BrdU для оцінки клітинної проліферації. При забої в формаліні фіксували нирки, легені, печінку та селезінку. Нирки фіксували в фіксаторі Сапоу для фарбування BrdU і швидко заморожували.

Результати, показані на Фіг.6, вказують на те, що протеїнурія значно знижувалася на 7-й і 10-й дні. Не виявлено яких-небудь відмінностей в креатиніні сироватки, однак кліренс креатину виявляв тенденцію до зниження в групі, яка піддавалася лікуванню (Фіг.7). Не було відмінностей в ушкодженні клубочків, що оцінювалося за наявністю мікроаневризмів клубочків. Однак гіперклітинність клубочків була значно знижена у щурів, що лікува-лися ІФН- β (Фіг.8).

Приклад 4: ІФН- β викликає значне зниження протеїнурії на тваринній моделі пуроміцинамінону-клеозидної нефропатії (PAN)

PAN індукували у 4 самців щурів Wistar по 200г кожний. Два щури отримували 20мг пуроміцинамінонуклеозид (PA;) внутрішньочеревинно (в. ч.) на 0-й день, і два щури отримували 20мг PA внутріш-ньосудинно (в. с.) на 0-й день. Щурів утримували в метаболічних клітках на 3-4-й і 7-8-й дні. Всіх щурів забивали на 8-й день. Результати показали, що середня величина протеїнурії становить 46 (мг/24 години) і 287 на 4-й і 8-й дні, відповідно, у щурів, ін'єктованих в. ч., і 122 і 194 на 4-й і 8-й дні, відпо-відно, у щурів, ін'єктованих в. в.

Дія ІФН- β на даній тваринній моделі була по-казана таким чином. PAN індукували у щурів, як вказано вище. Щури отримували 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 одиниць ІФН- β щура або тільки бу-фер. Результати, які показані на Фіг.9, вказують на те, що введення ІФН- β значно знижує протеїнурію на 7-й і 14-й дні, навіть при найменшій дозі ІФН- β .

Таким чином, результати даного прикладу вказують на те, що ІФН- β знижує запалення при захворюванні нирок, про що свідчить зниження протеїнурії та проліферації клубочків, а також зни-ження клітин запалення, наприклад, макрофагів і CD8+ клітин в клубочках. Таким чином, ІФН- β мо-же бути застосований для лікування, наприклад, профілактики гломерулонефриту, гострої і хроніч-ної ниркової недостатності.

Еквіваленти

Фахівці в даній галузі техніки повинні розуміти або бути здатні пересвідчитися при застосуванні лише звичайного експериментування, що є багато еквівалентів конкретних здійснень описаного тут винаходу. Мається на увазі, що такі еквіваленти охоплюються наступною формулою винаходу.

Відкрита рамка читування конструкції прямого з'єднання ІФН- β та G162C-Ig

```

1  ATGCCTGGGAAGATGGTCGTGATCCTTGGAGCCTCAAATATACTTTGGATAATGTTTGCA 60
   M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A
61  GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTTCCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAG 120
   A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q
121 TGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG 180
   C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M
181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCA 240
   N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A
241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTTCATCTAGC 300
   L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S
301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360
   T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N
361 CATCTGAAGACAGTCTCGAAGAAAAAAGTGGAGAAAGAAGATTTACCAGGGGAAAACTC 420
   H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L
421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480
   M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

```

Фіг. 1A

59 88440 60

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTACTTC 540
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGTCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC 600
I N R L T C Y L R N V D K T H T C P P C

601 CCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGAC 660
P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D

661 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGAA 720
T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E

721 GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA 780
D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T

781 AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTACCGTCTTG 840
K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L

841 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA 900
H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P

901 GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGCGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC 960
A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y

Фиг. 1B

961 ACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC 1020
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V

1021 AAAGGCTTCTATCCCGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGAGAAC 1080
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

1081 AACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG 1140
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K

1141 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT 1200
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H

1201 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGA 1257
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

Фиг. 1C

Відкрита рамка читування лінкерної конструкції G4S з'єднання ІФН-β та G162C-Ig

1 ATGCCTGGGAAGATGGTCTGATCCTTGGAGCCTCAAATATACTTTGGATAATGTTTGCA 60
M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A

61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTTGGATTCCCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAG 120
A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q

121 TGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG 180
C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M

181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCA 240
N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A

241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGC 300
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S

301 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360
T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N

361 CATCTGAAGACAGTCTCGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTACCAGGGGAAACTC 420
H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L

Фиг. 2A

61 88440 62

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480
M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTACTTC 540
E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGGCGGTGGTGGCAGCGTCGACAAAACCTCAC 600
I N R L T C Y L R N G G G G S V D K T H

601 ACATGCCACCGTGCACACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC 660
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P

661 CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTG 720
P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V

721 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG 780
D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V

781 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC 840
H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S

841 GTCCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC 900
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S

901 AACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA 960
N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

Fig. 2B

961 GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACAGC 1020
E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

1021 CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT 1080
L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

1081 GGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC 1140
G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

1141 TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA 1200
F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

1201 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCCTGTCT 1260
C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

1261 CCCGGGAAATGA 1272
P G K *

Fig. 2C

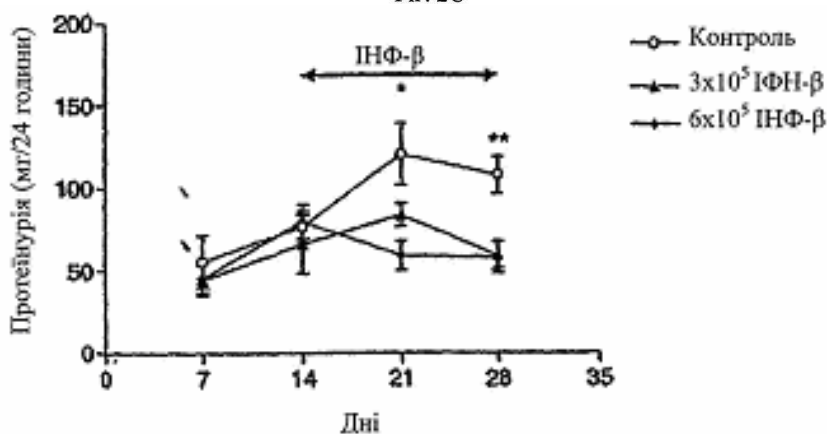


Fig. 3

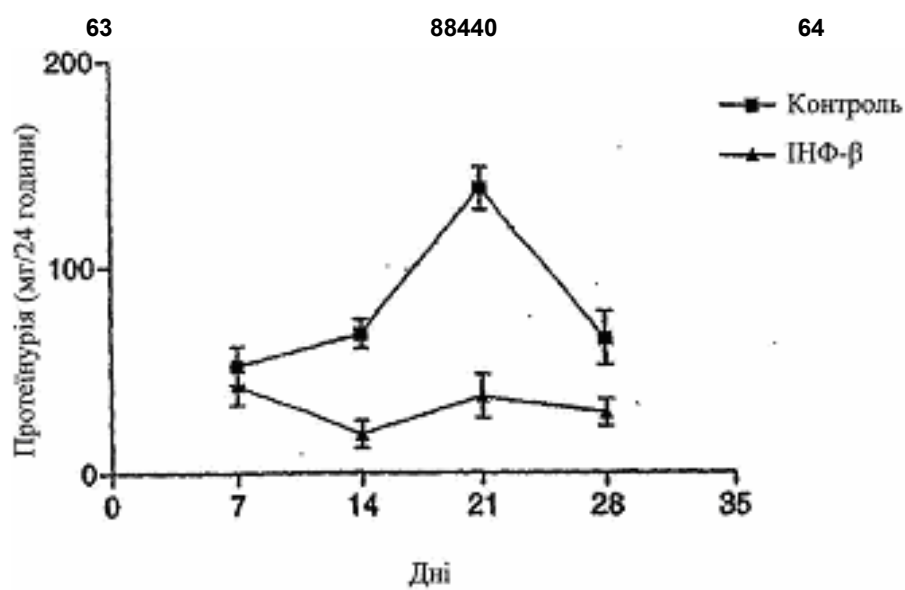


Fig. 4

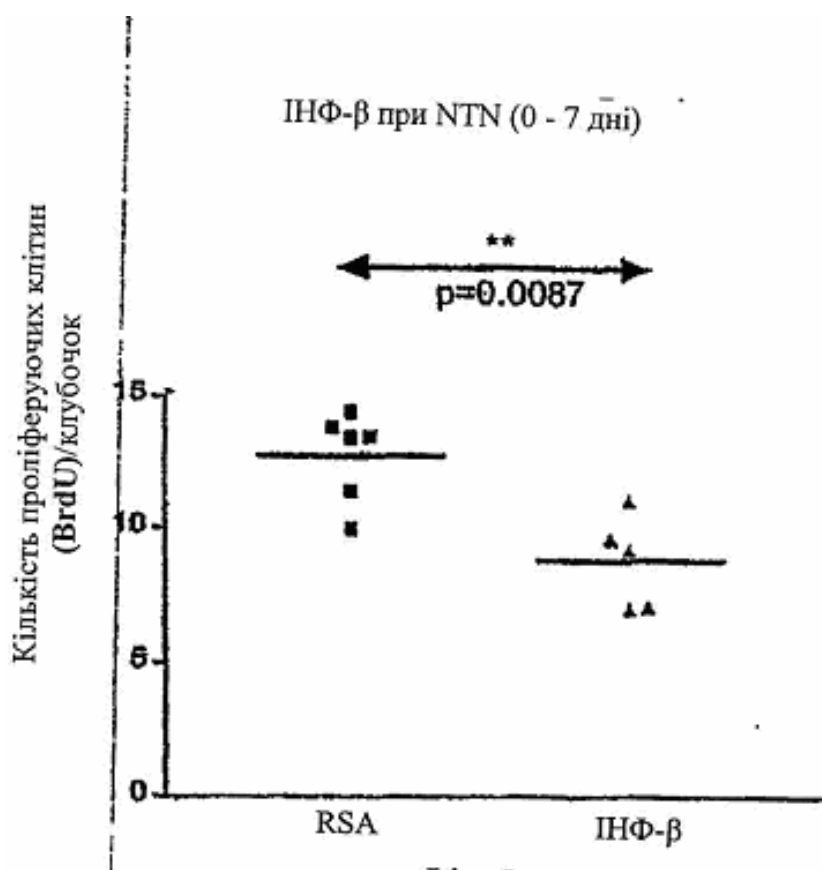
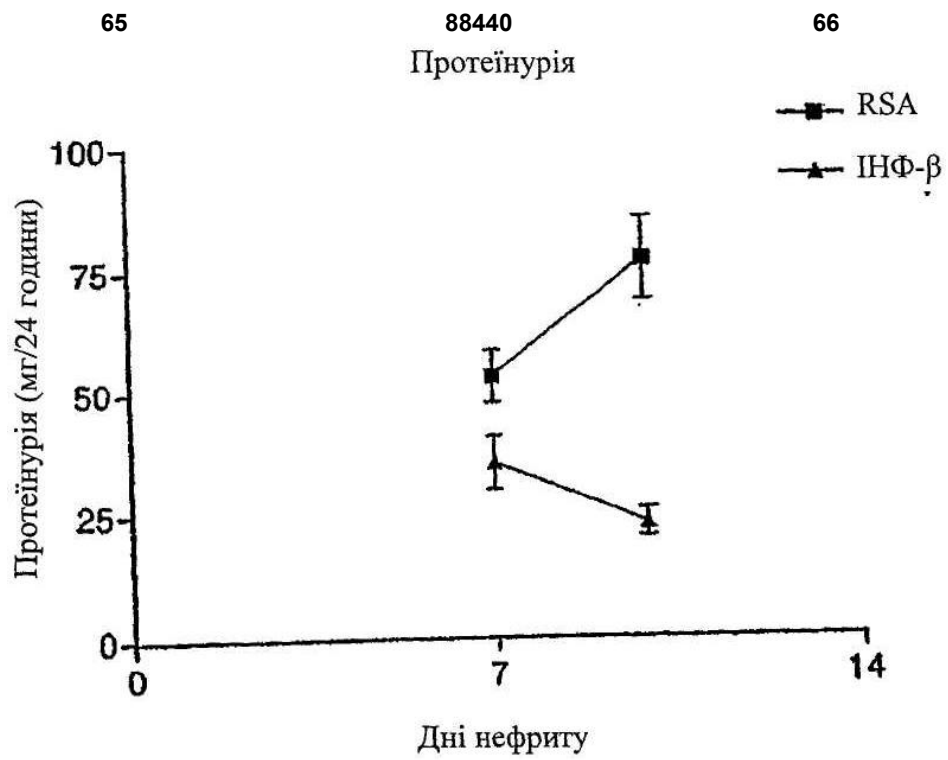
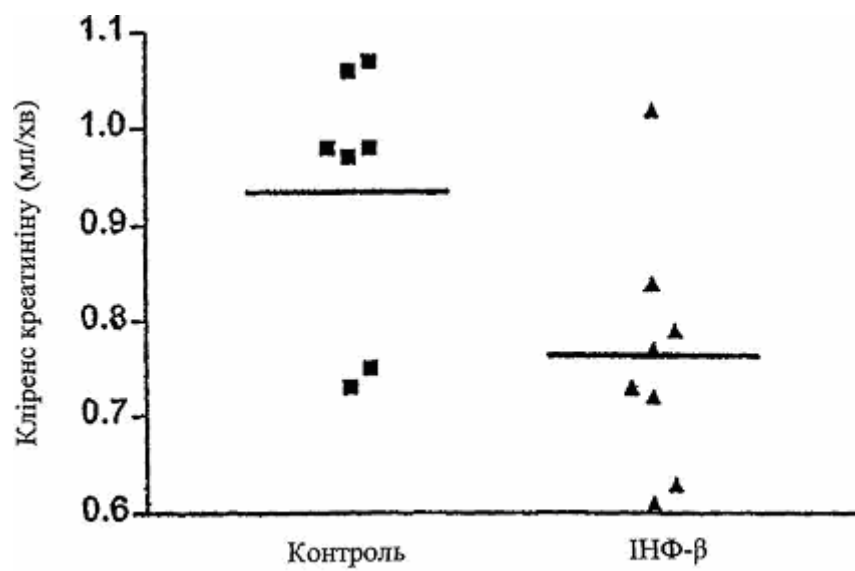


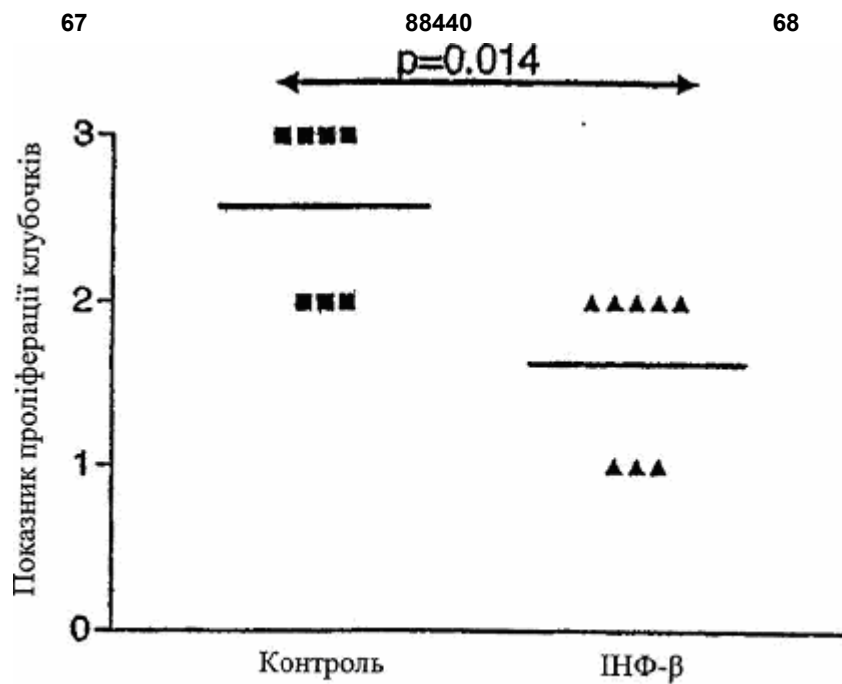
Fig. 5



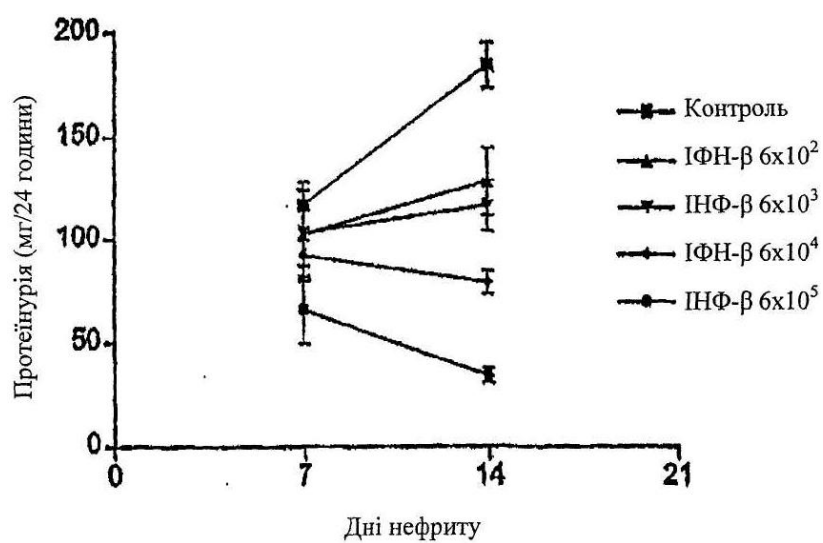
Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9