



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86749

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 38/21

A61P 25/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) ЛІКУВАННЯ ХРОНІЧНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ ДЕМІЄЛІНІЗУЮЧОЇ ПОЛІНЕВРОПАТІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ ІНТЕРФЕРОНУ**

1

2

(21) а200503909

(22) 26.09.2003

(24) 25.05.2009

(86) PCT/US03/30532, 26.09.2003

(31) 60/414,307

(32) 27.09.2002

(33) US

(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.

(72) СЕНДРОК АЛЬФРЕД

(73) БАЙОДЖЕН АЙДЕК МА ІНК.

(56) HADDEN R.D.M.: 'Randomized trial of interferon beta-1a in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy' NEUROLOGY vol. 53, 1999, pages 57 - 61

VAN DER MEIDE P.H.: 'Discontinuation of treatment with IFN-beta leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. Rapid reversal of the antiproliferative activity of IFN-beta and excessive expansion of autoreactive T cells as disease promoting mechanisms' JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY vol. 84, 1998, pages 14 - 23

(57) 1. Застосування препарату IFN-β для одержання лікарського засобу для лікування хронічної демієлінізуючої невропатії, де вказаний лікарський засіб вводиться суб'єкту, який раніше не був стійким до інших видів лікування хронічної демієлінізуючої невропатії, де препарат IFN-β вводять у комбінованому лікуванні, вибраному з групи, яка складається з введення IVIg, введення імунодепресанту, введення протизапального лікарського засобу і плазмаферезу.

2. Застосування за п. 1, де другим лікуванням є введення IVIg.

3. Застосування за п. 1, де другим лікуванням є введення імунодепресанту.

4. Застосування за п. 3, де імунодепресант вибраний з групи, яка складається зі стероїду, азотіоприну, циклоспорину, циклофосфаміду та мікофеноляту.

5. Застосування за п. 1, де другим лікуванням є введення протизапального лікарського засобу.

6. Застосування за п. 3, де другим лікуванням є плазмаферез.

7. Застосування препарату IFN-β для отримання лікарського засобу для лікування хронічної демієлінізуючої невропатії, де препарат IFN-β вводять у

комбінованій терапії, яка включає введення імунодепресанту, протизапального засобу або плазмаферезу.

8. Застосування за п. 7, де препарат IFN-β вводять у комбінованій терапії, яка включає введення імунодепресанту або плазмаферезу.

9. Застосування за п. 7, де комбінованою терапією є введення препарату IFN-β та імунодепресанту.

10. Застосування за п. 9, де імунодепресант вибраний із групи, яка складається зі стероїду, азотіоприну, циклоспорину, циклофосфаміду та мікофеноляту.

11. Застосування за п. 7, де комбінована терапія являє собою введення препарату IFN-β і протизапального засобу.

12. Застосування за п. 7, де комбінована терапія являє собою плазмаферез і введення препарату IFN-β.

13. Застосування за будь-яким з пунктів 7-12, де лікарський засіб вводять суб'єкту, у якого раніше не була виявлена стійкість до інших видів лікування хронічної демієлінізуючої невропатії.

14. Застосування за будь-яким з пп. 1-13, в якому препарат IFN-β вводять парентеральним способом, який відрізняється від підшкірного введення.

15. Застосування за п. 14, в якому препарат IFN-β вводять внутрішньом'язово.

16. Застосування за п. 14, в якому препарат IFN-β вводять внутрішньовенно.

17. Застосування за будь-яким з пунктів 1-16, де хронічна демієлінізуюча невропатія є хронічною запальною демієлінізуючою невропатією.

18. Застосування за будь-яким з пп. 1-17, в якому препарат IFN-β містить зрілий IFN-β.

19. Застосування за будь-яким з пп. 1-18, в якому в препараті IFN-β відсутній перший залишок метіоніну.

20. Застосування за будь-яким з пп. 1-19, в якому IFN-β є людським IFN-β.

21. Застосування за п. 20, в якому IFN-β щонайменше приблизно на 95% ідентичний непроцесованому зрілому людському IFN-β, який має SEQ ID NO:4.

22. Застосування за п. 21, у якому IFN-β містить SEQ ID NO:4.

(13) C2

(11) 86749

(19) UA

23. Застосування за будь-яким з пп. 1-22, в якому IFN- $\beta$  глікозилований.
24. Застосування за будь-яким з пп. 1-22, в якому IFN- $\beta$  не глікозилований.
25. Застосування за п. 20 в якому IFN- $\beta$  є IFN- $\beta$ -la.
26. Застосування за п. 20, в якому IFN- $\beta$  є IFN- $\beta$ -lb.
27. Застосування за будь-яким з пп. 1-26, в якому препарат IFN- $\beta$  містить IFN- $\beta$ , злитий з константним доменом молекули імуноглобуліну.
28. Застосування за п. 27, в якому молекула імуноглобуліну є молекулою людського імуноглобуліну.
29. Застосування за п. 28, в якому молекула імуноглобуліну є важким ланцюгом IgG1.
30. Застосування за п. 29, в якому IFN- $\beta$  містить SEQ ID NO:14.
31. Застосування за будь-яким з пп. 1-30, в якому препарат IFN- $\beta$  містить пегільований IFN- $\beta$ .
32. Застосування за будь-яким з пп. 1-31, в якому препарат IFN- $\beta$  містить стабілізуючий агент.
33. Застосування за п. 32, в якому стабілізуючий агент є кислотою амінокислотою.

34. Застосування за п. 33, в якому стабілізуючий агент є аргініном.
35. Застосування за будь-якими з пп. 1-34, в якому лікарський засіб має значення pH у межах від близько 4,0 до 7,2.
36. Застосування за будь-яким з пп. 1-35, яке включає введення ссавцю декількох доз препарату IFN- $\beta$ .
37. Застосування за будь-яким з пп. 1-36, в якому препарат IFN- $\beta$  вводять один раз на тиждень у дозі близько 6 ММО.
38. Застосування за будь-яким з пп. 1-36, в якому препарат IFN- $\beta$  вводять двічі на тиждень у дозі близько 6 ММО.
39. Застосування за будь-яким з пп. 1-36, в якому препарат IFN- $\beta$  вводять один раз на тиждень у дозі близько 12 ММО.
40. Застосування за будь-яким з пп. 1-36, в якому препарат IFN- $\beta$  вводять двічі на тиждень у дозі близько 12 ММО.
41. Застосування за будь-яким з пп. 1-40, в якому лікарський засіб вводять людині.

Хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) є неврологічним захворюванням, що характеризується повільно прогресуючою слабкістю і порушенням чутливості в ногах і руках. Причиною виникнення даного захворювання є руйнування мієлінової оболонки периферичних нервів. Опухання нервових корінців також є відмітною ознакою даного захворювання. Хоча вказане захворювання може виникати в будь-якому віці і в представників обох статей, CIDP частіше виявляється у молодих людей, причому у чоловіків частіше, ніж у жінок. Характерними симптомами є поколювання або оніміння (починаючи з пальців ніг і рук), слабкість рук і ніг, ниючі болі в м'язах, втрата глибоких сухожильних рефлексів (арефлексія), втома і атипові відчуття.

CIDP взаємопов'язана з деякими іншими захворюваннями. Наприклад, встановлено, що запальна демієлінізуюча невропатія, наприклад CIDP, діагностована у третини серопозитивних суб'єктів, інфікованих вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), що направляються до лікаря з приводу периферичних нервових захворювань. Крім того, встановлено, що CIDP зустрічається у суб'єктів, які страждають вовчаком, парепротейнемією, лімфомою або діабетом.

За відсутності лікування CIDP приводить до втрати працездатності, що вимагає проведення фізіотерапії і трудотерапії, застосування ортопедичних апаратів і тривалого лікування. Для призначення правильного лікування треба, щоб кваліфікований лікар спостерігав хворого у позалікарняних умовах.

Сучасні методи лікування CIDP включають введення кортикостероїдів, таких як преднізон, який може бути призначений окремо або в поєднанні з імунодепресантами.

Імунодепресанти можуть бути також призначені без стероїду. Плазмаферез (заміна плазми) і внутрішньовенне введення імуноглобуліну (IVIg) також є досить ефективними методами, що засто-

совуються в цей час. IVIg можна використати навіть як основне лікування. Крім того, фізіотерапія може збільшити м'язову силу, функціональність і рухливість кінцівок і мінімізувати розвиток контрактур.

CIDP по-різному розвивається у різних людей. У деяких людей після одного приступу CIDP може піти спонтанне видужання, в той час як в інших може бути багато приступів з частковим відновленням між рецидивами. Дане захворювання є набутою невропатією, що піддається лікуванню, тому лікування рекомендується починати якомога раніше, щоб запобігти втраті нервових клітин. Однак у деяких суб'єктів зберігається деяке залишкове оніміння або слабкість кінцівок.

Таким чином, сучасні методи лікування CIDP є шкідливими (наприклад, стероїди або імунодепресанти), або незручними (наприклад, плазмаферез) методами, що дорого коштують (наприклад, IVIg і плазмаферез). Тому вельми бажані ефективні терапевтичні методи лікування хронічних демієлінізуючих невропатій, наприклад CIDP, які будуть менш токсичними, більш дешевими і більш зручними в порівнянні з сучасними методами.

Один варіант здійснення винаходу відноситься до способів лікування хронічної демієлінізуючої рухової невропатії у ссавця. Вказаний спосіб може включати введення ссавцеві терапевтично ефективною кількістю препарату IFN- $\beta$ . Препарат IFN- $\beta$  можна вводити парентерально, не вдаючись до підшкірних ін'єкцій, наприклад внутрішньом'язово. У переважному варіанті здійснення винаходу невропатія є хронічною запальною демієлінізуючою невропатією (CIDP).

Препарат IFN- $\beta$  може містити людський IFN- $\beta$ . Наприклад, препарат IFN- $\beta$  може містити білок, який щонайменше приблизно на 95% ідентичний непроцесованому зрілому людському IFN- $\beta$ , що має SEQ ID NO:4. Препарат IFN- $\beta$  може також містити непроцесований зрілий людський IFN- $\beta$ , що

має SEQ ID NO:4. Препарат IFN- $\beta$  може також містити непроцесований зрілий людський IFN- $\beta$ , що має SEQ ID NO:4, злитий з гетерологічним поліпептидом, наприклад, з константним доменом молекули людського імуноглобуліну. Молекула імуноглобуліну може являти собою важкий ланцюг IgG1. Препарат IFN- $\beta$  може містити SEQ ID NO:14. Препарат IFN- $\beta$  може також містити пегільований IFN- $\beta$ .

Препарат IFN- $\beta$  або утримуюча його композиція може включати стабілізуючий агент, такий як білок або амінокислота. Наприклад, стабілізуючим агентом може бути аргінін. Препарат IFN- $\beta$  або утримуюча його композиція може мати значення pH в межах від близько 4,0 до 7,2.

Препарат IFN- $\beta$  можна вводити один, два або три рази на тиждень. У деяких варіантах здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять в кількості приблизно 6 або 12 мільйонів міжнародних одиниць (ММО). Препарат IFN- $\beta$  можна вводити внутрішньом'язово або підшкірно. У переважному варіанті здійснення винаходу суб'єкт є ссавцем, переважно людиною.

Даний винахід відноситься також до способів лікування невропатії, наприклад CIDP, що включає введення суб'єкту, страждаючому невропатією, фармацевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$  і подальше введення суб'єкту імунодепресанту або проведення плазмаферезу. Вказаний спосіб може включати введення суб'єкту імунодепресанту, вибраного з групи, що складається з стероїду, азотіоприну, циклоспорину, циклофосфаміду і мікофеноляту.

В об'єм даного винаходу входять також способи лікування невропатії, наприклад CIDP, що включають введення хворому невропатією фармацевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$  в поєднанні з додатковим лікуванням невропатії, причому препарат IFN- $\beta$  вводять парентеральним способом, відмінним від підшкірного введення. Препарат IFN- $\beta$  можна вводити внутрішньом'язово. Препарат IFN- $\beta$  можна вводити один раз на тиждень, наприклад, близько 6 ММО препарату IFN- $\beta$  один раз на тиждень. Коли невропатія являє собою CIDP, додаткове лікування може бути вибрано з групи, що включає введення стероїду, введення IVIg, введення протизапального засобу і проведення плазмаферезу.

Інший варіант здійснення винаходу відноситься до способів лікування невропатії, наприклад CIDP, що включає введення хворому невропатією фармацевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$  в поєднанні з додатковим лікуванням невропатії, причому препарат IFN- $\beta$  вводять один раз на тиждень. Якщо невропатія являє собою CIDP, додаткове лікування CIDP може бути вибрано з групи, що включає введення стероїду, введення IVIg, введення протизапального засобу і проведення плазмаферезу.

Інший варіант здійснення винаходу відноситься до способів лікування CIDP у суб'єкта, що проходить основний курс лікування CIDP, вибраний з групи, що складається з введення стероїду, введення протизапального засобу, введення IVIg і проведення плазмаферезу, які крім основного лі-

кування CIDP включають введення препарату IFN- $\beta$  в кількості, ефективній для значного зменшення дози або частоти проведення основного лікування CIDP, причому препарат IFN- $\beta$  вводять парентеральним способом, відмінним від підшкірного введення, для досягнення ефективного ослаблення симптомів CIDP. Відповідно до іншого способу лікування CIDP потребуючий суб'єкт проходить основний курс лікування CIDP, вибраний з групи, що складається з введення стероїду, введення протизапального засобу, введення IVIg і проведення плазмаферезу, при цьому крім основного лікування CIDP суб'єкту вводять препарат IFN- $\beta$  один раз на тиждень в кількості, ефективній для значного зменшення дози або частоти проведення основного лікування CIDP, для досягнення ефективного ослаблення симптомів CIDP. Суб'єкту, що має CIDP, може бути також призначено основне лікування CIDP, вибрано з групи, що складається з введення стероїду, введення протизапального засобу і проведення плазмаферезу, при цьому крім основного лікування CIDP суб'єкту вводять препарат IFN- $\beta$  в кількості, ефективній для значного зменшення дози або частоти проведення основного лікування CIDP, для досягнення ефективного ослаблення симптомів CIDP.

На Фігурах 1A-C показані нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:11) і амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:12) злитого білка, що містить сигнальну послідовність VCAM, злику з зрілим непроцесованим людським IFN- $\beta$  (SEQ ID NO:3 і 4), в якому гліцин в положенні амінокислоти 162 SEQ ID NO:4 замінений цистеїном, злитим з шарнірними, CH2- і CH3-доменами Fc-фрагмента IgG1 людини (ZL5107).

На Фігурах 2A-C показані нуклеотидна послідовність (SEQ ID NO:13) і амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:14) злитого білка, що містить сигнальну послідовність VCAM, злику з зрілим непроцесованим людським IFN- $\beta$  (SEQ ID NO:3 і 4), в якому гліцин в положенні амінокислоти 162 SEQ ID NO:4 замінений цистеїном, злитим з лінкером G4S, який в свою чергу злитий з шарнірними, CH2- і CH3-доменами Fc-фрагмента IgG1 людини (ZL6206).

Даний винахід відноситься до способів лікування хронічних демієлінізуючих невропатій, наприклад CIDP, що включає введення фармацевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$ .

#### 1. Визначення термінів

Для більш чіткого і точного викладення предмета винаходу, описаного в формулі винаходу, нижче приведені визначення деяких термінів, використаних в описі винаходу і прикладеній формулі винаходу.

У значенні, використаному в описі винаходу і прикладеній формулі винаходу, терміни в формі однини мають узагальнююче значення за винятком тих випадків, коли з контексту винаходу виходить зворотне.

Термін «хронічна запальна демієлінізуюча поліневропатія» має взаємозамінне значення з терміном «CIDP». Нижченаведені захворювання є ідентичними або вважаються по суті ідентичними CIDP і тому входять у визначення терміну «CIDP», що використовується в даному описі винаходу:

«хронічна рецидивна поліневропатія», «хронічна ідіопатична демієлінізуюча поліневропатія», «хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія» і «хронічна набута демієлінізуюча поліневропатія» («CADP»). CIDP є хронічним прогресуючим захворюванням з поступовим розвитком або рецидивами [див., наприклад, Dyck et al., (1993) in Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F., (Eds.), *Peripheral Neuropathy*, 3<sup>rd</sup> ed. Saunders, Philadelphia, pp. 1498-1517]. Патологічні ознаки CIDP включають сегментну демієлінізацію і ремієлінізацію і наявність мононуклеарних клітинних інфільтратів в ендоневрії [Dyck et al., див. вище]. CIDP іноді визначають як периферичний різновид розсіяного склерозу (MS) [Toyka and Hartung (1996) *Curr. Opin. Neurol.* 9, 240-250]. Дане захворювання іноді визначають також як хронічну форму синдрому Гійєна-Барре. Критеріями для діагностики CIDP є клінічні, електрофізіологічні дослідження і аналіз цереброспінальної рідини (CSF), описані, наприклад, в [звіті спеціального підкомітету Американської академії неврології, AIDS task force (1991) *Neurology* 41:617]. Діагностичні дослідження включають голковколання в дев'ять точок; проходження 10 метрів; шкалу Ранкіна або її модифіковану форму і підсумовування балів по шкалі MRC або її модифікованій формі [Mathiowetz et al., (1985) *Occupational Therapy J. of Res.* 5: 24; Thompson et al., (1996) *J. Neurol.* 243: 280; Collen et al., (1990) *Int. Disability Studies* 12: 6; van Swieten et al. (1988) *Stroke* 19: 604 and Kleyweg et al., (1991) *Muscle Nerve* 14: 1103]. Неврологічні оцінки можуть також включати шкалу неврологічної втрати працездатності (NDS); шкалу втрати працездатності (0, повністю здоровий; 1, незначні симптоми; 2, може ходити без допомоги, але не може бігати; 3, може пройти 5 метрів з допомогою; 4, прикований до інвалідного крісла/ліжка); тест рухової здатності Хамерсміта (HMAT) [Dyck P.J., In «*Peripheral Neuropathy*» (1993), supra, pages 686-697; Scott et al. (1982) *Muscle Nerve* 5:291] і дослідження провідності нервів. Визначення м'язової сили може включати оцінку рухових функцій, наприклад вимірювання максимального довільного ізометричного скорочення м'яза (MVIC), відоме в даній галузі, і вимірювання м'язової сили. Інші дослідження втрати працездатності включають індекс здатності переміщатися; вимірювання функціональної незалежності; шкалу неврологічної втрати працездатності Гая (GNDS); підсумовування балів по шкалі Медичної науково-дослідної ради; підсумовування балів по шкалі чутливості і функціональну шкалу Хьюза [Hauser et al. (1983) *N. Engl. J. Med.* 308:173; Hall et al. (1993) *J. Head Trauma Rehabilitation* 8:60; Sharrack et al. (1996) *J. Neurol.* 243:332 and Merkies et al. (2002) *Neurology* 59:84]. Електрофізіологічні критерії діагностики CIDP були запропоновані спеціальним комітетом Американської академії неврології (AAN) в 1991р. і недавно були переглянуті [Nicolais et al. (2002) *Muscle Nerve* 25:26]. Іншим дослідженням, що використовується для діагностики імуніопосередкованої сенсорно-рухової поліневропатії, наприклад, CIDP і синдрому Гійєна-Барре (GBS), є психометрична оцінка причини виникнення і лікування запальної невропатії

(INCAT) за допомогою підсумовування балів чутливості (ISS) [Merkies et al. (2000) *Neurology* 54:943]. Антигени лейкоцитів людини Dw3, DRw3, A1 і B8 частіше зустрічаються у хворих на CIDP, ніж у здорових людей [Zvartau-Hind et al. (2002) *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy*, адреса в Інтернеті [www.emedicine.com/neuro/](http://www.emedicine.com/neuro/)].

Термін «IFN- $\beta$ -1a» означає глікозильовану молекулу IFN- $\beta$ , що містить амінокислотну послідовність людського IFN- $\beta$  дикого типу.

Термін «IFN- $\beta$ -1b» означає неглікозильовану молекулу IFN- $\beta$ , що містить амінокислотну послідовність IFN- $\beta$  дикого типу, де цистеїн в положенні 17 замінений серином і відсутній метіонін в положенні 1 («ініціюючий метіонін»).

Термін «варіант IFN- $\beta$ » означає білок IFN- $\beta$  дикого типу, що містить одну або декілька модифікацій, наприклад, делецій, додавань, заміни амінокислот, посттрансляційну модифікацію або включає один або декілька штучних амінокислотних залишків або зв'язків між ними. Частини IFN- $\beta$  входять у визначення терміну «варіант IFN- $\beta$ ». Термін «біологічно активний варіант IFN- $\beta$ » означає варіант IFN- $\beta$ , який володіє щонайменше деякою активністю при лікуванні невропатії, наприклад CIDP. Варіант IFN- $\beta$  може бути природним IFN- $\beta$ , що включає, наприклад вставку, делецію або заміну однієї або декількох амінокислот в порівнянні з IFN- $\beta$  дикого типу, тобто природним мутантом або поліморфним варіантом, або штучним IFN- $\beta$ .

Термін «міжнародні одиниці» або (МО) у застосуванні до IFN- $\beta$  означає одиниці вимірювання, прийняті Всесвітньою організацією охорони здоров'я (WHO) як міжнародний стандарт для вимірювання інтерферону.

Термін «виділений» (що має взаємозамінне значення з терміном «по суті чистий») у застосуванні до поліпептидів означає поліпептид, який за своїм походженням або внаслідок маніпуляцій: (1) присутній в клітині-хазяїні як продукт експресії частини експресуючого вектора; (ii) пов'язаний з білком або іншою хімічною частиною молекули, що не є частиною молекули, з якою він зв'язаний в природі; або (iii) не зустрічається в природі, наприклад, білок, який хімічно модифікований шляхом приєднання або додання щонайменше однієї гідрофобної частини, внаслідок чого білок набуває форми, що не зустрічається в природі. Термін «виділений» далі означає білок, який: (i) синтезований хімічним способом; або (ii) експресований в клітині-хазяїні і очищений від пов'язаних і забруднюючих білків. Даний термін звичайно служить для позначення поліпептиду, який був відділений від інших білків і нуклеїнових кислот, разом з якими він зустрічається в природних умовах. Крім того, вказаний поліпептид переважно відділений від таких речовин, як антитіла або гелеві матриці (поліакриламід), що використовуються для його очищення. Термін «виділений» (що використовується взаємозамінно з терміном «по суті чистий») у застосуванні до нуклеїнових кислот означає полінуклеотид РНК або ДНК, частину геномного полінуклеотиду, кДНК або синтетичний полінуклеотид,

ябсий за своїм походженням або внаслідок маніпуляції: (i) не зв'язаний з всім полінуклеотидом, з яким він зв'язаний в природі (наприклад, знаходиться в клітині-хазяїні у вигляді експресуючого вектора або його частини); (ii) пов'язаний з нуклеїновою кислотою або іншою хімічною частиною молекули, яка не є частиною молекули, з якою він зв'язаний в природі; або (iii) не зустрічається в природі. Термін «виділений» далі означає полінуклеотидну послідовність, яка: (i) ампліфікована *in vitro*, наприклад, внаслідок виконання полімеразної реакції синтезу ланцюга (PCR); (ii) синтезована хімічним способом; (iii) продукована методами рекомбінантних ДНК шляхом клонування; або (iv) очищена шляхом розщеплення і розділення в гелі.

Термін «багатоосередкова рухова невропатія» або «MMN» означає хронічну імуніопосередковану демієлінізуючу невропатію, яка характеризується поступовим розвитком асиметричної м'язової слабості і аміотрофії, локалізованої в ділянках анатомічного розподілу периферичних нервів [Pestronk et al. (1988) *Aim. Neurol.* 24:73 and Kornberg et al. (1995) *Ann. Neurol. (suppl. 1)* S43]. Електрофізіологічною ознакою багатоосередкової рухової невропатії є постійне блокування провідності нервів. У клінічному відношенні дане захворювання описане як асиметричний чисторуховий варіант CIDP з багатоосередковим блокуванням провідності рухових нервів. У процесі розвитку багатоосередкової рухової невропатії характер даного захворювання може поступово трансформуватися з виникненням по суті симетричної картини, яка в клінічному відношенні нагадує рухову форму CIDP. Дослідження патології дозволили об'єднати ці два захворювання [Krendel et al. (1996) *Ann. Neurol.* 40:948 і Oh et al. (1995) *Neurology* 45:1828]. Більшість хворих на багатоосередкову рухову невропатію характеризуються високим титром антитіл проти гангліозиду GM1 [Pestronk et al., див. вище і Kornberg et al., див. вище].

Нуклеїнова кислота «функціонально пов'язана» з іншою нуклеїновою кислотою, коли вона знаходиться в функціональному взаємозв'язку з послідовністю іншої нуклеїнової кислоти. Наприклад, ДНК для передпослідовності або секреторної лідерної послідовності (наприклад, сигнальної послідовності або сигнального пептиду) функціонально пов'язана з ДНК, що кодує поліпептид, якщо дана ДНК експресована у вигляді білка-попередника, що бере участь в секреції поліпептиду; промотор або енхансер функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо він впливає на транскрипцію даної послідовності; і сайт зв'язування рибосоми функціонально пов'язаний з кодуючою послідовністю, якщо його положення полегшує трансляцію. Термін «функціонально зв'язаний» звичайно означає, що зв'язані послідовності ДНК є суміжними і, наприклад, у випадку секреторної лідерної послідовності, є суміжними і знаходяться в рамці читування. Зв'язування може бути досягнуте в результаті лігування, наприклад, на зручних сайтах рестрикції. Якщо такі сайти відсутні, можна використати синтетичні олігонуклеотидні адаптери або лінкери відповідно до відомої практики.

Термін «процентна тотожність» або «процентна схожість» означає схожість послідовностей двох поліпептидів, молекул або двох нуклеїнових кислот. Якщо в певному положенні двох послідовностей, що порівнюються, знаходиться одна і та ж основа або мономерна амінокислотна субодинаця, відповідні молекули вважаються ідентичними в даному положенні. Процентна ідентичність двох послідовностей визначається числом співпадаючих або ідентичних положень в двох послідовностях, діленим на число положень, що порівнюються,  $\times 100$ . Наприклад, якщо 6 з 10 положень в двох послідовностях співпадають або є ідентичними, тоді дві послідовності характеризуються 60% гомологією. Як приклад можна порівняти послідовності ДНК CTGACT і CAGGTT, які є гомологічними на 50% (співпадають 3 з 6 положень). Порівняння звичайно виконують при вирівнюванні двох послідовностей для досягнення максимальної ідентичності. Таке вирівнювання можна зробити, наприклад методом Карліна і Альтскула, який більш детально описаний нижче. Застосовно до нуклеїнової кислоти терміни «процентна гомологія» і «процентна ідентичність» мають взаємозамінні значення, а застосовно до поліпептиду термін «процентна гомологія» означає міру схожості, при якій амінокислоти, що являють собою консервативні заміни інших амінокислот, вважаються ідентичними вказаним іншим амінокислотам. Термін «консервативна заміна» залишку в еталонній послідовності являє собою заміну амінокислотою, яка фізично і функціонально подібна відповідному еталонному залишку, наприклад, має аналогічний розмір, форму, електричний заряд, хімічні властивості, включаючи здатність утворювати ковалентні або водневі зв'язки, або подібні характеристики. Особливо переважними консервативними замінами є такі заміни, які задовольняють критерію, що визначається для «прийнятої точкової мутації» в [публікації Dayhoff et al., 5: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, 5: Suppl. 3, chapter 22:354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington], Процентну гомологію або ідентичність двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнових кислот можна визначити за допомогою алгоритму вирівнювання Карліна і Альтскула [Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 87:2264 (1990)], модифікованого в публікації Карліна і Альтскула [Proc. Nat. Acad. Sci., USA 90:5873 (1993)]. Вказаний алгоритм вводять в програми NBLAST або XBLAST, описані в [публікації Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)]. Пошук методом BLAST виконують за допомогою програми NBLAST, оцінка = 100, довжина слова = 12, для виявлення нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеїновій кислоті згідно з даним винаходом. Пошук білка методом BLAST виконують за допомогою програми XBLAST, оцінка = 50, довжина слова = 3, для виявлення амінокислотних послідовностей, гомологічних еталонному поліпептиду. Для порівняння вирівняних послідовностей з розривами ланцюга використовують метод BLAST з пропусками відповідно до опису, приведенного в [публікації Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25:3389 (1997)]. При використанні методів BLAST і BLAST з пропусками застосовують параметри за умовчанням відповід-

них програм (XBLAST і NBLAST). Див. в Інтернеті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Якість життя можна виміряти по візуальній аналоговій шкалі EuroQol і підсумовуванню балів по анкеті EuroQoL; шкалі визначення стану здоров'я з 36 пунктів Medical Outcome Study (SF-36) і візуальній аналоговій шкалі (VAS) [EuroQoL Group (1990) Health Policy 16: 199 і Merckies et al. (2002) Neurology 59: 84].

Вважається, що препарат IFN- $\beta$  володіє «терапевтичною ефективністю» і кількість препарату IFN-B є «терапевтичною ефективною», якщо введення такої кількості одного препарату IFN- $\beta$  в комбінованій терапії достатньо для досягнення клінічно значущого ослаблення щонайменше одного симптому захворювання в порівнянні з відсутністю лікування препаратом IFN- $\beta$ . У переважному варіанті здійснення винаходу введення терапевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$  суб'єкту, страждаючому CИDP, спричиняє ослаблення щонайменше одного симптому CИDP, наприклад, м'язових або нервових порушень.

Термін «IFN- $\beta$  дикого типу» означає нативний або рекомбінантний IFN- $\beta$ , що містить природну амінокислотну послідовність нативного IFN- $\beta$ . Нуклеотидна і амінокислотна послідовність нативного людського IFN- $\beta$  приведені відповідно в SEQ ID NO:1 і 2, які є послідовностями, представленими, наприклад в банку генів GenBank під номерами доступу M28622 (і E00029) і AAA36040, відповідно.

## 2. Препарати IFN- $\beta$

Препарати IFN- $\beta$ , які можна використати відповідно до даного винаходу, включають IFN- $\beta$  дикого типу і його біологічно активні варіанти, наприклад, природні і штучні варіанти. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності природного людського IFN- $\beta$  дикого типу приведені відповідно в SEQ ID NO:1 і 2, які ідентичні послідовностям, представленим в банку генів GenBank під номерами доступу M28622 і AAA36040, відповідно. Вказані IFN- $\beta$  описані також в [публікації Seghal (1985) J. Interferon Res. 5:521]. Непроцесований білок людський IFN- $\beta$  складається з 187 амінокислот, і кодує послідовність SEQ ID NO:1 відповідає нуклеотидам 76-639. Сигнальна послідовність відповідає амінокислотам 1-21. Амінокислотна послідовність зрілої форми IFN- $\beta$  відповідає амінокислотам 22-187 (нуклеотиди 139-639 SEQ ID NO:1). Зрілий білок IFN- $\beta$  людини і нуклеотидна послідовність, що кодує вказаний білок, представлені відповідно у вигляді SEQ ID NO:4 і 3.

IFN- $\beta$ , продукований в клітинах ссавця, є глікозильованим. Природний IFN- $\beta$  дикого типу глікозильований по залишку 80 (Asn 80) зрілого поліпептиду SEQ ID NO:4 або залишку 101 (Asn 101) незрілого поліпептиду SEQ ID NO:2.

Препарати IFN- $\beta$  також включають IFN- $\beta$ , відмінні від людського, наприклад, IFN- $\beta$  хребетних, таких як ссавці, наприклад, приматів крім людини, великої рогатої худоби, овець, свиней, коней, кішок, собак, щурів і мишей, а також птахів або амфібій. З послідовностями IFN- $\beta$  вказаних видів можна ознайомитися в банку генів і/або в публікаціях або визначити по нуклеїнових кислотах, отри-

маних шляхом гібридизації в умовах низької суворості з геном IFN- $\beta$  іншого виду.

Варіанти білків IFN- $\beta$  дикого типу включають білки, що мають амінокислотну послідовність, яка щонайменше на 70%, 80%, 90%, 95%, 98% або 99% ідентична або гомологічна IFN- $\beta$  дикого типу, наприклад, людський IFN- $\beta$ , що має SEQ ID NO:2 або 4. Варіанти можуть включати заміни, делеції або додавання однієї або декількох амінокислот. Наприклад, можна використати біологічно активні фрагменти білків IFN- $\beta$  дикого типу. У таких фрагментах можуть бути видалені, додані або замінені 1, 2, 3, 5, 10 або до 20 амінокислот біля C- або N-кінця білка. Варіанти можуть також включати заміни, делеції або додавання 1, 2, 3, 5, 10 або до 20 амінокислот. Деякі варіанти можуть включати заміни, делеції або додавання менше 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 7 або 5 амінокислот. Для заміні можуть бути використані природні амінокислоти або їх аналоги, наприклад, D-стереоізомерні амінокислоти.

В об'єм даного винаходу входять варіанти IFN- $\beta$ , кодовані нуклеїновими кислотами, гібридизуючими в суворих умовах з нуклеїновою кислотою, що кодує природний IFN- $\beta$ , наприклад, виражений SEQ ID NO:1 або 3, або її комплементом. Умови відповідної суворості, які стимулюють гібридизацію ДНК, наприклад, 6,0-кратний об'єм хлориду натрію/цитрату натрію (SSC) при температурі близько 45°C з подальшим промиванням 2,0-кратним об'ємом SSC при 50°C, відомі фахівцям в даній галузі або з ними можна ознайомитися в [публікаціях: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; S. Agrawal (ed.), Methods in Molecular Biology, volume 20 і Tijssen (1993), Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes, e.g., part I chapter 2 «Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays», Elsevier, New York]. Наприклад, концентрацію солі на стадії промивання можна вибрати в діапазоні від умов низької суворості, відповідних приблизно 2,0-кратному об'єму SSC при 50°C, до умов високої суворості, відповідних приблизно 0,2-кратному об'єму SSC при 50°C. Крім того, температуру на стадії промивання можна підвищити в інтервалі від умов низької суворості при кімнатній температурі, близько 22°C, до умов високої суворості при температурі близько 65°C. Можна змінювати температуру і концентрацію солі, або температура або концентрація солі можуть мати постійні значення при одночасній зміні іншого параметра. Типові умови гібридизації включають гібридизацію в 6,0-кратному об'ємі хлориду натрію/цитрату натрію (SSC) при температурі близько 50°C з подальшим промиванням в 0,2-кратному об'ємі SSC при кімнатній температурі. Температуру на стадії промивання можна підвищити приблизно до 45°C, 50°C, 55°C, 60°C або 65°C з метою посилення суворості гібридизації. Гібридизацію можна також виконувати в 5-кратному об'ємі SSC, 4-кратному об'ємі SSC, 3-кратному об'ємі SSC, 2-кратному об'ємі SSC, 1-кратному об'ємі SSC або 0,2-кратному об'ємі SSC. Гібридизацію можна викону-

вати протягом щонайменше 1 години, 2 годин, 5 годин, 12 годин або 24 годин. У процесі гібридизації може бути також використаний інший агент, що впливає на суворість гібридизації, наприклад формамід. Наприклад, сувору гібридизацію може бути виконана в присутності 50% формаміду, який підвищує суворість гібридизації при вказаній температурі. Стадія промивання може бути виконана в присутності детергента, наприклад SDS, в такій кількості, як 0,1% або 0,2% SDS. Після гібридизації може бути виконане промивання, що включає одну стадію або щонайменше дві стадії, які можуть проводитися при однаковій або різній солоності і температурі. Наприклад, після гібридизації можуть бути виконані два промивання при 65°C кожне протягом приблизно 20 хвилин в 2-кратному об'ємі SSC, 0,1% SDS, з подальшим виконанням двох промивань при 65°C кожна протягом приблизно 20 хвилин в 0,2-кратному об'ємі SSC, 0,1% SDS. Типові суворі умови гібридизації включають гібридизацію протягом ночі при 65°C в розчині, що містить 50% формаміду, 10-кратний об'єм розчину Денхардта (0,2% фіколу, 0,2% полівінілпіролідону, 0,2% альбуміну бичачої сироватки) і 200мкг/мл денатурованої несучої ДНК, наприклад, фрагментованої ДНК сперми лосося, з подальшим виконанням двох промивань при 65°C кожне протягом приблизно 20 хвилин в 2-кратному об'ємі SSC, 0,1% SDS, і двох промивань при 65°C протягом приблизно 20 хвилин в 0,2-кратному об'ємі SSC, 0,1% SDS. Гібридизація може включати гібридизацію двох нуклеїнових кислот в розчині або нуклеїнової кислоти в розчині з нуклеїновою кислотою, прикріпленою до твердої підкладки, такої як фільтр. У деяких випадках, наприклад, коли одна нуклеїнова кислота знаходиться на твердій підкладці, гібридизації може передувати стадія попередньої гібридизації, яку виконують протягом щонайменше 1 години, 3 годин або 10 годин в такому ж розчині і при такій же температурі, що і в розчині для гібридизації (без зонда). У переважному варіанті здійснення винаходу нуклеїнову кислоту, що кодує варіант IFN- $\beta$ , гібридизують з послідовністю SEQ ID NO: 1 або 3 або її комплементом в умовах помірної суворості, наприклад, що включають промивання в 2,0-кратному об'ємі SSC при температурі близько 40°C. В особливо переважному варіанті здійснення винаходу нуклеїнову кислоту, що кодує варіант IFN- $\beta$ , гібридизують з послідовністю SEQ ID NO: 1 або 3 або її комплементом в умовах високої суворості, наприклад, що включають промивання в 0,2-кратному об'ємі SSC при температурі близько 65°C.

Типовими модифікаціями є консервативні модифікації, які впливають мінімальний чином на вторинну і третинну структуру білка. Типові консервативні заміни включають заміни, описані в [публікаціях Dayhoff in the Atlas of Protein Sequence and Structure 5 (1978) і Argos in EMBO J., 8, 779-785 (1989)]. Наприклад, амінокислоти, що відносяться до однієї з нижченаведених груп, являють собою консервативні заміни: ala, pro, gly, gin, asn, ser, thr; cys, ser, tyr, thr; val, ile, leu, met, ala, phe; lys, arg, his; і phe, tyr, tip, his.

Інші модифікації включають заміну однієї амінокислоти іншою амінокислотою, яка необов'язко-

во може являти собою консервативну заміну. Наприклад, можна виробляти заміни, які по суті не впливають на тривимірну структуру IFN- $\beta$ . Тривимірна структура неглікозильованого людського IFN- $\beta$  описана, наприклад, в [публікації Radhakrishnan et al. (1996) Structure 4: 1453], і тривимірна структура глікозильованого IFN- $\beta$  описана, наприклад, в [публікації Karpusas et al. (1997) PNAS 94:11813]. Зокрема IFN- $\beta$  містить п'ять спіралей: спіраль A, що включає амінокислоти 2-22 SEQ ID NO:4; спіраль B, що включає амінокислоти 51-71 SEQ ID NO:4; спіраль C, що включає амінокислоти 80-107 SEQ ID NO:4; спіраль D, що включає амінокислоти 118-136 SEQ ID NO:4, і спіраль E, що включає амінокислоти 139-162 SEQ ID NO:4 [Karpusas et al., див. вище]. Спіралі A, B, C і E утворюють лівосторонній чотириспіральний тяж типу 2. В IFN- $\beta$  є довга верхня петля AB, що з'єднує спіралі A і B, і три більш короткі петлі (що іменуються BC, CD і DE), що з'єднують інші спіралі [(Karpusa et al., див. вище)]. Раніше виконані дослідження показали, що N-кінцеві, C-кінцеві і глікозильовані ділянки спіралі C молекули IFN- $\beta$  не знаходяться в сайті зв'язування рецептора (див. заявки WO 00/23472 і USSN 09/832659). Тому мутації у вказаних ділянках не впливають істотно шкідливого чином на біологічну активність молекули IFN. Крім того, раніше було встановлено, що мутації в спіралі C (амінокислоти 81, 82, 85, 86 і 89 зрілого людського IFN- $\beta$ ) спричиняють утворення молекули, яка володіє більш високою антивірусною активністю в порівнянні з IFN- $\beta$  дикого типу (див. заявки WO 00/23472 і USSN 09/832659). Аналогічним чином було встановлено, що мутанти в спіралі A (амінокислоти 2, 4, 5, 8 і 11 зрілого людського IFN- $\beta$ ) і петлі CD (амінокислоти 110, 11, 113, 116 і 119) володіють більше високою активністю зв'язування з рецептором і більш високою антивірусною і антипроліферативною активністю в порівнянні з природним людським IFN- $\beta$  дикого типу (див. заявки WO 00/23472 і USSN 09/832659).

Інші переважні модифікації або заміни усувають сайти для міжмолекулярного перехресного зшиття і неправильного утворення дисульфідних зв'язків. Наприклад, відомо, що IFN- $\beta$  має три залишки cys в положеннях 17, 31 і 141 SEQ ID NO:4 дикого типу. Одним варіантом IFN є IFN, в якому залишок cys (C) в положенні 17 замінений залишком ser (S), як це описано, наприклад, в патенті США №4588585. Іншими варіантами IFN- $\beta$  є варіанти IFN- $\beta$ , в яких один або декілька залишків cys (C) в положенні 17 замінені залишками ser (S) і залишок val (V) в положенні 101 замінений залишком phe (F), trp (W), tyr (Y) або his (H), переважно phe (F), при нумерації у відповідності до IFN- $\beta$  дикого типу, що має, наприклад, SEQ ID NO:4, аналогічно описаному, наприклад, в патенті США №6127332. Інші переважні варіанти включають поліпептиди, які містять послідовність IFN- $\beta$  дикого типу, наприклад, SEQ ID NO:4, в якій залишок val (V) в положенні 101 при нумерації у відповідності до IFN- $\beta$  дикого типу замінений залишком phe (F), tyr (Y), trp (W), his (H) або phe (F), як це описано в патенті США №6127332.

Інші варіанти IFN- $\beta$  являють собою молекули зрілого IFN- $\beta$ , в яких відсутній ініціюючий метіонін, наприклад, метіонін 1 SEQ ID NO:4. У типових варіантах IFN- $\beta$  відсутній ініціюючий метіонін і замінена щонайменше одна амінокислота, наприклад, в положенні 17 зрілої форми, як це описано в патенті США №4588585.

Молекули IFN- $\beta$  можна також модифікувати шляхом заміни однієї або декількох амінокислот однією або декількома похідними амінокислот, природними або існуючими штучними амінокислотами, в яких природний бічний ланцюг або кінцева група модифікована внаслідок виконання хімічної реакції. Такі модифікації включають, наприклад, гамма-карбоксилування, бета-карбоксилування, пегілювання, сульфатування, сульфуровання, фосфорилювання, амідкування, етерифікацію, N-ацетилювання, карбобензилювання, тозилування і інші модифікації, відомі в даній галузі.

Інші модифікації включають використання амінокислотних аналогів або похідних амінокислот, в яких бічний ланцюг подовжений або укорочений з утворенням карбоксильної, аміногрупи або іншої реакційноздатної функціональної групи-попередника для циклізації, а також амінокислотних аналогів, що мають різні бічні ланцюги з відповідними функціональними групами. Наприклад, сполука згідно з даним винаходом може включати амінокислотний аналог, такий як, наприклад, ціаноаланін, канаванін, д'енколова кислота, норлейцин, 3-фосфосерин, гомосерин, дигідроксифеніланін, 5-гідрокситриптофан, 1-метилгістидин, 3-метилгістидин, діамінопімелінова кислота, орнітин або діаміномасляна кислота. Фахівцям в даній галузі повинні бути відомі інші природні амінокислотні метаболіти або попередники, що мають прийнятні бічні ланцюги, які входять в об'єм даного винаходу.

Інші варіанти IFN- $\beta$  включають зворотні або ретро пептидні послідовності. «Зворотна» або «ретро» пептидна послідовність означає частину загальної послідовності ковалентно пов'язаних амінокислотних залишків (їх аналогів або псевдозалишків), в якій нормальне утворення пептидного зв'язку в напрямі від карбоксикінця до амінокінця в амінокислотному кістяку було змінено таким чином, що при зчитуванні в звичайному напрямі зліва направо амінокінцева частина пептидного зв'язку передувє (а не знаходиться позаду) карбоксикінцевої частини. [Див. публікацію Goodman, M. and Chorev, M. Accounts of Chem. Res. 1979, 12, 423]. Пептиди із зворотною орієнтацією, розглянуті в даному описі винаходу, включають (а) пептиди, в яких один або декілька амінокінцевих залишків розташовані в зворотній («rev») орієнтації (утворюючи таким чином другий «карбоксикінець» в лівій частині молекули), і (b) пептиди, в яких один або декілька карбоксикінцевих залишків розташовані в зворотній («rev») орієнтації (утворюючи другий «амінокінець» в правій частині молекули). Пептидний (амідний) зв'язок не може бути утворений на поверхні розділу між залишком з нормальною орієнтацією і залишком із зворотною орієнтацією. Тому деякі зворотні поліпептиди згідно з даним винаходом можна отримати, використовуючи відповідну амінокислотну псевдочас-

тину для зв'язування двох суміжних частин послідовностей за допомогою зворотного пептидного (зворотного амідного) зв'язку. У вищезгаданому випадку (a) центральний залишок дикетосполуки можна успішно використати для зв'язування структур двома амідними зв'язками з отриманням псевдопептидної структури. У вищезгаданому випадку (b) центральний залишок діаміносполуки можна аналогічним чином використати для зв'язування структур двома амідними зв'язками з утворенням псевдопептидної структури. Зворотний напрям зв'язування в таких поліпептидах звичайно вимагає додаткової інверсії енантіомерної конфігурації зворотних амінокислотних залишків для збереження просторової орієнтації бічних ланцюгів, яка аналогічна орієнтації нормального пептиду. Конфігурація амінокислот в зворотній частині пептидів переважно є D-конфігурацією, і конфігурація нормальної частини переважно є L-конфігурацією. Протилежні або змішані конфігурації є прийнятними для оптимізації активності зв'язування в тих випадках, коли це можливо. Модифікації поліпептидів далі описані, наприклад, в патенті США №6399075.

Препарати IFN- $\beta$  включають також білки IFN- $\beta$  і їх варіанти (наприклад зрілий білок), злиті з одним або декількома гетерологічними поліпептидами. Гетерологічний поліпептид може бути доданий, наприклад, для збільшення напівперіоду існування білка IFN- $\beta$  або посилення його продуктування. Типові гетерологічні поліпептиди включають молекули імуноглобуліну (Ig) або їх частини, наприклад, константний домен легкого або важкого ланцюга молекули Ig. В одному варіанті здійснення винаходу білок IFN- $\beta$  або його варіант зливають або яким-небудь іншим чином зв'язують з всією або частиною шарнірної і константної ділянок легкого ланцюга, важким ланцюгом або обома ланцюгами імуноглобуліну. Таким чином, даний винахід відноситься до молекули, яка включає: (1) білкову частину IFN- $\beta$  (тобто IFN- $\beta$  або його варіант), (2) другий пептид, наприклад, пептид, що збільшує розчинність або час існування *in vivo* частини IFN- $\beta$ , зокрема, член надсімейства імуноглобулінів, його фрагмент або частину, наприклад, частину або фрагмент IgG, а саме константну ділянку важкого ланцюга IgG1 людини, наприклад, CH2-, CH3- і шарнірні ділянки. Зокрема, термін «злитий білок IFN- $\beta$ /Ig» означає білок, що містить біологічно активну частину IFN- $\beta$ , пов'язану з N-кінцем ланцюга імуноглобуліну. Підвидом злитого білка IFN- $\beta$ /Ig є «злитий білок IFN- $\beta$ /Fc», який є білком, що містить частину IFN- $\beta$ , пов'язану щонайменше з частиною константного домену імуноглобуліну. Переважний Fc-злитий білок містить частину IFN- $\beta$ , пов'язану з фрагментом антитіла, що включає C-кінцевий домен важких ланцюгів імуноглобуліну.

Злитий білок може містити поліпептид IFN- $\beta$  або його варіант, з N- і C-кінцями якого зв'язані гетерологічні поліпептиди. Гетерологічний поліпептид може також знаходитися всередині поліпептиду IFN- $\beta$  або його варіанту.

В одному варіанті здійснення винаходу злитий білок має загальну формулу X-Y-Z, де X означає



поліпептид, що має амінокислотну послідовність IFN- $\beta$ , його частини або варіанту; Y означає не-обов'язкову лінкерну частину і Z означає поліпептид, що містить щонайменше частину поліпептиду, що не є бета-інтерфероном частини X. В інших варіантах здійснення винаходу злитий білок має формулу Z-Y-X, де поліпептид, що не є IFN- $\beta$ , злитий з N-кінцевою частиною лінкера, злитий з N-кінцевою частиною поліпептиду IFN- $\beta$ , його частини або варіанту. Частина Z може бути частиною поліпептиду, що містить імуноглобуліноподібні домени. Приклади таких поліпептидів включають GDI, CD2, CD4 і основні антигени гістосумисності, що відносяться до класу I і класу II. Див. патент США №5565335 (Capon et al) для ознайомлення з прикладами таких поліпептидів.

Частина Z може включати, наприклад, декілька залишків гістидину або, переважно, Fc-ділянку імуноглобуліну; термін «Fc» в даному описі винаходу означає фрагмент антитіла, що містить C-кінцевий домен важкого ланцюга імуноглобуліну.

Частина Y може бути будь-яким лінкером, що дозволяє частині IFN- $\beta$  зберігати свою біологічну активність. Частина Y може складатися з однієї амінокислоти або щонайменше з двох амінокислот. Y може також включати від близько 2 до близько 5 амінокислот; від близько 3 до близько 10 амінокислот або 10 або більше амінокислот. У переважному варіанті здійснення винаходу Y включає послідовність GlyGlyGlyGlySer (SEQ ID NO:6), кодовану, наприклад, нуклеотидною послідовністю GGCGGTGGTGGCAGC (SEQ ID NO:5). Y може також включати сайт впізнавання ентерокинази, наприклад, AspAspAspAspLys (SEQ ID NO:8), кодований, наприклад, послідовністю GACGATGATGACAAG (SEQ ID NO:7). В іншому варіанті здійснення винаходу Y включає послідовність SerSerGlyAspAspAspAspLys (SEQ ID NO:10), кодовану, наприклад, послідовністю AGCTCCGGAGACGATGATGACAAG (SEQ ID NO:9).

Крім того, частина IFN- $\beta$  (X) і друга частина Z, що не є IFN- $\beta$  (наприклад, Fc-ділянка імуноглобуліну), можуть бути частини зв'язані внаслідок здійснення будь-якої хімічної реакції, яка дозволяє зв'язати дві молекули разом при збереженні частинами X і Z відповідної активності. Вказане хімічне зв'язування може включати багато які хімічні механізми, такі як ковалентне зв'язування, афінне зв'язування, інтеркаляція, координатне зв'язування і комплексоутворення. Типові зв'язуючі агенти (тобто лінкери (Y) в загальній формулі), що використовуються для ковалентного зв'язування частини IFN- $\beta$  з частиною Z, можуть включати органічні сполуки, такі як складні тіоефіри, карбодііміди, сукцинімідоефіри, діізоціанати, такі як толілен-2, 6-діізоціанат, глутеральдегіди, діазобензоли і гексаметилендіаміни, такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін, біфункціональні похідні імідоефірів, такі як диметиладіпімідат, і біс-активні сполуки фтору, такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол. У вищезгаданий перелік входять різні класи хімічних зв'язуючих агентів, відомих в даній галузі. Багато які вказані агенти можна придбати комерційним шляхом, зокрема, N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP),

гідрохлорид 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC), 4-сукцинімідилоксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридилтіо)толуол (SMPT; Pierce Chem. Co., № за каталогом 21558G).

Переважний злитий білок IFN $\beta$ /Ig має SEQ ID NO:12, яка містить непроцесовану зрілу форму людського IFN- $\beta$ , тобто SEQ ID NO:4, злику з Fc-ділянкою людського IgG1 (ZL5107) (див. заявки WO 00/23472 і USSN 09/832659) (див. Фіг.1). Відповідна нуклеотидна послідовність приведена в SEQ ID NO:11. ДНК, що кодує людський IFN- $\beta$ , закінчується біля триплету нуклеотидів 568-570 (AAC, що кодує аргінін), і ДНК, що кодує константну ділянку людського IgG1, починається біля триплету (GAC, що кодує аспарагінову кислоту), що починається з нуклеотиду 574 SEQ ID NO:11.

Інший переважний злитий білок IFN- $\beta$ /Ig приведений в SEQ ID NO:14 і кодований SEQ ID NO:13 (див. заявки WO 00/23472 і USSN 09/832659) (див. Фіг.2). Вказаний злитий білок включає людський IFN- $\beta$ , злитий з лінкером G4S, який в свою чергу пов'язаний з Fc-ділянкою людського IgG1 (ZL6206). Лінкер G4S (кодований нуклеотидами 571-585 SEQ ID NO:7) включає амінокислотну послідовність GGGGS (SEQ ID NO:9). Способи продукування вказаних білків описані в заявках WO 00/23472 і USSN 09/832659.

У переважному варіанті здійснення винаходу поліпептид IFN- $\beta$  злитий біля C-кінця щонайменше з частиною Fc-ділянки імуноглобуліну. IFN- $\beta$  утворює амінокінцеву частину, і Fc-ділянка утворює карбоксикінцеву частину. У вказаних злитих білках Fc-ділянка переважно обмежена шарнірною ділянкою константного домену і CH2- і CH3-доменами. Fc-ділянка у вказаних злитих білках може бути також обмежена частиною шарнірної ділянки, здатною утворювати міжмолекулярні дисульфідні зв'язки, і CH2- і CH3-доменами або їх функціональними еквівалентами. Вказані константні ділянки можуть бути отримані у будь-якого ссавця (переважно людини) і виділені з будь-якого відповідного класу і/або ізотипу, включаючи IgA, IgD, IgM, IgE і IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4.

Молекули рекомбінантних нуклеїнових кислот, які кодують Ig-злиті білки, можуть бути отримані будь-яким методом, відомим в даній галузі [Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.], або виділені з доступних клонів. Методи отримання генів, що кодують константні ділянки важкого або легкого ланцюга імуноглобулінів, розглянуті, наприклад, в заявці PCT, Robinson, R. et al., публікація WO 87/02671. Послідовність кДНК, що кодує молекулу інтерферону або її фрагмент, може бути безпосередньо зв'язана з кДНК, що кодує константні ділянки важкого ланцюга Ig, або за допомогою лінкерної послідовності. В інших варіантах здійснення винаходу може бути створена рекомбінантна векторна система для введення послідовностей, що кодують бета-інтерферон, в правильну рамку зчитування з синтетичною шарнірною ділянкою. Крім того, може бути бажано, щоб рекомбінантна векторна система включала у вигляді складової частини нуклеїнові кислоти, відповідні 3'-фланкуючій ділянці гена

імуноглобуліну, що містить сайти розщеплення/поліадактилізації РНК і нижні послідовності. Далі може бути бажано створити сигнальну послідовність вгорі від послідовностей, що кодують злитий білок імуноглобуліну, для полегшення секреції зливої молекули з клітини, трансформованої рекомбінантним вектором.

Даний винахід відноситься до димерних злитих молекул, а також до мономерних або багатомерних молекул, що містять злиті білки. Такі багатомери можна отримати, використовуючи Fc-ділянки або їх частини молекул Ig, які звичайно є багатовалентними, такі як пентамери IgM або димери IgA. Очевидно, що для утворення і стабілізації пентамерів IgM і димерів IgA може бути потрібен з'єднувальний поліпептид J. Альтернативно, багатомери злитих білків IFN- $\beta$  можуть бути утворені з використанням білка, що володіє спорідненістю до Fc-ділянки молекул Ig, такого як білок A. Наприклад, декілька злитих білків IFN- $\beta$ /імуноглобулін можна зв'язати з агарозними гранулами, що містять білок A.

Вказані багатовалентні форми є вельми корисними, оскільки вони мають декілька сайтів зв'язування з рецепторами бета-інтерферону. Наприклад, двовалентний розчинний IFN- $\beta$  може містити два послідовних повтори амінокислот 1-166 SEQ ID NO:4 (або повтори, кодовані нуклеїновими кислотами 1-498 SEQ ID NO:3) (частина X в загальній формулі), розділених лінкерною ділянкою (частина Y), причому вказані повтори зв'язані щонайменше з однією частиною константного домену імуноглобуліну (частина Z). Можна також створити альтернативні багатовалентні форми, наприклад, внаслідок хімічного зв'язування злитих білків IFN- $\beta$ /Ig з будь-якою клінічно прийнятною несучою молекулою, полімером, вибраним з групи, що складається з фіколу, поліетиленгліколю або декстрану, за допомогою звичайних методів зв'язування. Альтернативно, IFN- $\beta$  може бути хімічно зв'язаний з біотином, і отриманий кон'югат біотину і Fc-ділянки бета-інтерферону потім зв'язують з авідином, внаслідок чого утворюються тривалентні молекули авідину/біотину/бета-інтерферону. Злиті білки IFN- $\beta$ /Ig можуть бути також ковалентно зв'язані з динітрофенолом (DNP) або тринітрофенолом (TNP), після чого отриманий кон'югат осаджують за допомогою антитіла проти DNP або антитіла проти TNP-IgM з утворенням декамерних кон'югатів з валентністю 10 для сайтів зв'язування рецепторів бета-інтерферону.

Похідні білків згідно з даним винаходом включають також різні структурні форми первинного білка, що зберігають біологічну активність. Завдяки наявності аміно- і карбоксильних груп, що іонізуються, білки IFN- $\beta$  і їх варіанти можуть знаходитися в формі кислих або основних солей або в нейтральній формі. Окремі амінокислотні залишки можуть бути також модифіковані окисненням або відновленням. Крім того, первинна амінокислотна структура (включаючи N- і/або C-кінці) або глікан IFN- $\beta$  може бути модифікована (з отриманням похідних сполук) шляхом утворення ковалентних або агрегованих кон'югатів з іншими хімічними частинами, такими як глікозильні групи, поліалкіленгліколи, зокрема, поліетиленгліколь, ліпіди, фосфати,

ацетильні групи і тому подібні, або шляхом створення мутантів амінокислотної послідовності.

Інші похідні бета-інтерферону/Ig включають ковалентні або агреговані кон'югати бета-інтерферону або його фрагментів з іншими білками або поліпептидами, наприклад, отримані внаслідок синтезу в рекомбінантній культурі у вигляді додаткових N- або C-кінців. Наприклад, кон'югований пептид може бути сигнальною (або лідерною) поліпептидною послідовністю в N-кінцевій ділянці білка, яка одночасно з трансляцією або після трансляції направляє перенесення білка з сайту синтезу на функціональний сайт всередині або зовні клітинної мембрани або стінки (наприклад, лідерна послідовність альфа-фактора дріжджів). Наприклад, сигнальний пептид може бути послідовністю IFN- $\beta$ , що включає, зокрема, амінокислоти 1-21 SEQ ID NO:2, відповідні нуклеотидам 76-138 SEQ ID NO:1. Сигнальний пептид може також мати послідовність VCAM, тобто включати амінокислоти 1-24 SEQ ID NO:12, яка кодована нуклеотидами 1-72 SEQ ID NO:11.

Гетерологічний поліпептид (наприклад пептид) або іншу молекулу можна також використати як мітку або для полегшення очищення препарату IFN- $\beta$ . Такі пептиди добре відомі в даній галузі. Наприклад, поліпептид згідно з даним винаходом може бути злитий в рамці зчитування з маркерною послідовністю, що визначається також як «Tag-послідовність», що кодує «Tag-пептид», яка дозволяє мітити і/або очищати поліпептид згідно з даним винаходом. У переважному варіанті здійснення винаходу маркерна послідовність являє собою гексагістидинову мітку, наприклад, так, яка переноситься вектором PQE-9. Багато які інші Tag-пептиди можна придбати комерційним шляхом. Інші, часто використовувані Tag-мітки включають тус-епітопи [див., наприклад, Ellison et al. (1991), J. Biol. Chem. 266:21150-21157], які містять послідовність із 10 залишків, виділену із с-тус, систему pFLAG (International Biotechnologies, Inc.), систему pEZZ-білок A (Pharmacia, NJ) і частину білка гемаглютинину Haemophilus influenza, що складається з 16 амінокислот. Крім того, як Tag-мітку можна використати будь-який поліпептид, якщо можна отримати або ідентифікувати реагент, наприклад, антитіло, специфічно взаємодіюче з Tag-поліпептидом.

В одному варіанті здійснення винаходу білок IFN- $\beta$  або його варіант злитий біля N- або C-кінця з одним з нижченаведених пептидів: HisHisHisHisHisHis (SEQ ID NO:6), який може бути кодований нуклеотидною послідовністю CATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO:15); SerGlyGlyHisHisHisHisHisHis (SEQ ID NO:18), який може бути кодований нуклеотидною послідовністю TCCGGGGGCCATCATCATCATCATCAT (SEQ ID NO:15) і SerGlyGlyHisHisHisHisHisHisSerSerGlyAspAspA (SEQ ID NO:20), який може бути кодований нуклеотидною послідовністю TCCGGGGGCCATCATCATCATCATCATAGCTCCG GAGACGATGATGACAAG (SEQ ID NO:19).

Амінокислотна послідовність бета-інтерферону може бути також пов'язана з пептидом AspTyrLysAspAspAspLys (DYKDDDDK)

(SEQ ID NO:21) [Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988]. Вказана послідовність є високоантигенною і містить епітоп, що зворотно зв'язується специфічним моноклональним антитілом, дозволяючи проводити експрес-аналіз і просте очищення експресованого рекомбінантного білка. Крім того, вказана послідовність специфічно розщеплюється ентерокиназою слизової оболонки великої рогатої худоби у залишку, що йде відразу ж за парою залишків Asp-Lys.

В іншому варіанті здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  містить білок IFN- $\beta$  або його варіант, злитий з білком альбуміну, його варіантом або частиною. Такий злитий білок можна отримати способом, описаним, наприклад, в заявці WO 01/77137.

Препарат IFN- $\beta$  може також містити молекулу, яка не є поліпептидом. Наприклад, білок IFN- $\beta$  або його варіант може бути ковалентно або нековалентно зв'язаний з полімером, наприклад, з полімером, що біологічно руйнується. Наприклад, білок IFN- $\beta$  або його варіант може бути модифікований поліетиленгліколем, наприклад, зв'язаний з поліетиленгліколем (ПЕГ) способом, описаним в заявці WO 00/23114.

Відповідно до широкого об'єму даного винаходу для кон'югації з IFN- $\beta$  може бути використана одна молекула полімеру, хоча відомо, що до IFN- $\beta$  може бути також приєднано декілька полімерних молекул. Очевидно, що для кон'югації полімеру можна використати будь-які групи, частини або інші кон'юговані різновиди, відповідні кінцевому застосуванню. Як приклад можна зазначити, що полімер можна використати в деяких застосуваннях для ковалентного зв'язування з функціональною частиною, що повідомляє полімеру стійкість до деструкції під дією УФ-випромінювання, антиоксидантні або інші властивості. Як інший приклад можна зазначити, що в деяких застосуваннях бажано активувати полімер, щоб зробити його реакційноздатним або перехресно зшиваним з метою посилення різних властивостей або характеристик кон'югованої речовини. Тому полімер може містити будь-які функціональні групи, групи, що повторюються, зв'язки або інші структури, які не погіршують ефективність кон'югованої композиції IFN- $\beta$  для передбачуваного застосування.

IFN- $\beta$  переважно кон'югують за допомогою кінцевої реакційноздатної групи в полімері, хоча кон'югацію можна також здійснювати у вигляді бічного ланцюга за допомогою некінцевих реакційноздатних груп. Полімер, що має одну або декілька реакційноздатних груп, визначається в даному описі винаходу як «активований полімер». Реакційноздатна група вибірно взаємодіє з вільними аміногрупами або іншими реакційноздатними групами в білку. Активований полімер піддають взаємодії так, щоб його можна було приєднати до будь-якої існуючої аміногрупи IFN- $\beta$ , такий як альфа-аміногрупи або епсилон-аміногрупи лізину. Вільні карбоксильні групи, належно активовані карбонільні групи, гідроксильні, гуанідильні, окислені вуглеводневі частини і меркаптогрупи IFN- $\beta$  (при їх наявності) можна також використати як сайти приєднання.

Незважаючи на те, що полімер можна приєднати в будь-якому місці ланцюга молекули IFN- $\beta$  або його варіанту або іншої амінокислоти, приєднаної за допомогою прямого або посереднього зв'язку до молекули IFN- $\beta$ , найбільш переважним сайтом для зв'язування полімеру є N-кінець молекули IFN- $\beta$ . Вторинні сайти розташовані біля C-кінця або поруч з ним і на всіх сайтах ланцюга цукрових частин. Таким чином, найбільш переважні варіанти здійснення даного винаходу включають: (i) кон'югати IFN- $\beta$  або його варіанту з полімером, приєднаним біля N-кінця; (ii) кон'югати IFN- $\beta$  або його варіанту з полімером, приєднаним біля C-кінця; (iii) кон'югати з полімером, зв'язані цукровими частинами; (iv) кон'югати білків IFN- $\beta$  або їх варіантів з полімером, приєднаним біля N-, C-кінця і за допомогою цукрових частин.

Звичайно використовують від близько 1,0 до близько 10 моль активованого полімеру на моль білка в залежності від концентрації білка. Кінцева кількість повинна являти собою баланс між максимальним збільшенням ефективності реакції і мінімальним утворенням неспецифічних модифікацій продукту, а також між створенням хімічної структури, що зберігає оптимальну активність, і оптимізацією, якщо це можливо, напівперіоду існування білка. Бажано зберегти щонайменше близько 50% біологічної активності білка і найбільш переважно 100%.

Вказані реакції можна виконувати будь-яким прийнятним методом, що використовується для здійснення взаємодії біологічно активних речовин з інертними полімерами, переважно при pH близько 5-7, якщо реакційноздатні групи знаходяться в положенні альфа-аміногрупи біля N-кінця. Вказаний процес звичайно включає отримання активованого полімеру (який може мати щонайменше одну кінцеву гідроксильну групу) і подальша взаємодія білка з активованим полімером з утворенням розчинного білка, прийнятного для отримання лікарського засобу. Вищезгадана модифікація реакції може бути виконана декількома методами, що включають одну або декілька стадій.

Як указано вище, в найбільш переважних варіантах здійснення винаходу використовується N-кінець IFN- $\beta$  як зв'язуюча ланка для полімеру. Існують прийнятні методи для вибірного отримання IFN- $\beta$  з модифікованим N-кінцем. Одним методом є відновне алкілювання, при виконанні якого використовують різну реакційну здатність первинних аміногруп різних типів (епсилон-аміногрупи лізину в порівнянні з аміногрупами N-кінцевого метіоніну), що використовуються для отримання похідних сполук IFN- $\beta$ . У відповідних вибірних умовах може бути отримана похідна сполука IFN- $\beta$ , до N-кінця якої приєднують полімер, що містить карбонільну групу. Вказану реакцію виконують при значенні pH, що дозволяє використати перевагу відмінностей між показниками pKa епсилон-аміногруп залишків лізину і альфа-аміногрупи N-кінцевого залишку IFN- $\beta$ . Хімічна реакція такого типу добре відома фахівцям в даній галузі.

Наприклад, можна використати схему реакцій, в якій подібна вибіркковість зберігається внаслідок виконання реакцій при низькому значенні pH (звичайно 5-7).

чайно 5-6) в умовах, при яких ПЕГ-альдегідний полімер піддають взаємодії з IFN- $\beta$  в присутності ціаноборогідриду натрію. Після очищення ПЕГ-IFN- $\beta$  і аналізу методом SDS-PAGE, мас-спектрометрії MALDI і секвенування/ картування пептиду отримують IFN- $\beta$ , до N-кінця якого направлено приєднана частина ПЕГ.

Кристалічна структура IFN- $\beta$  показує, що N- і C-кінці розташовані близько один до одного [див. Karpusas et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94:11813-11818]. Таким чином, модифікації C-кінця IFN- $\beta$  повинні також впливати мінімальним чином на активність. Хоча не існує простого хімічного методу направленої доставки поліалкіленгліколю, такого як ПЕГ, до C-кінця, подібний результат може бути досягнутий внаслідок генетичного створення сайту, який можна використати для направленої приєднання полімерної частини. Наприклад, введення залишку Cys в положення, розташоване біля C-кінця або поруч з ним, дозволяє отримати специфічну модифікацію з використанням іміду малеїнової кислоти, вінілсульфону або поліалкіленгліколю (наприклад, ПЕГ), активованого гелогенацетатом. Вказані похідні можна специфічно використати для модифікації створених цистеїнів завдяки високій селективності даних реагентів відносно залишків Cys. Інші методи, такі як введення гістидинової мітки, що володіє направленою дією [Fancy et al., (1996) Chem & Biol. 3: 551], або створення додаткового сайту глікозилювання, являють собою інші альтернативи для модифікації C-кінця IFN- $\beta$ .

Глікан в IFN- $\beta$  також займає положення, яке дозволяє проводити подальшу модифікацію без зміни активності. Методи направленої доставки до цукрів, що використовуються як сайти для хімічної модифікації, також добре відомі і тому певно, що поліалкіленгліколь може бути безпосередньо і специфічно приєднаний до цукрів в IFN- $\beta$ , які був активовані шляхом окислення. Наприклад, можна отримати гідрозид поліетиленгліколю, який утворює відносно стійкі гідразонні зв'язки внаслідок конденсації з альдегідами і кетонами. Вказана властивість була використана для модифікації білків за допомогою окислених олігосахаридних зв'язків. [Див. публікацію Andresz, H. et al., (1978), Makromol. Chem. 179:301]. Зокрема, обробка карбоксиметилгідрозиду поліетиленгліколю нітритом дозволяє отримати карбоксиметилазид поліетиленгліколю, який являє собою електрофільно активну групу, взаємодіючи з аміногрупами. Вказану реакцію можна використати також для отримання білків, модифікованих поліалкіленгліколем. Див. патенти США №№ 4101380 і 4179337.

Хімічна структура, створена за допомогою тіолового лінкера, може далі полегшити перехресне зшиття білків. Вказану реакцію можна виконати шляхом створення реакційноздатних альдегідів у вуглеводневих частинах за допомогою періодату натрію, утворення кон'югатів цистаміну з використанням альдегідів і індукції перехресного зшиття за допомогою тіолових груп в цистамінах [див. Pepinsky, B. et al., (1991), J. Biol. Chem., 266: 18244-18249 and Chen, L.L. et al., (1991) J. Biol. Chem., 266: 18237-18243]. Тому передбачається,

що даний тип хімічної структури придатний для модифікації поліалкіленгліколями, якщо в цукор введений лінкер і поліалкіленгліколь приєднаний до вказаного лінкера. Хоч амініолові або гідрозинвісні лінкери придатні для додання однієї полімерної групи, структура лінкера може бути змінена з можливістю приєднання декількох полімерів і/або зміни просторової орієнтації полімеру відносно IFN- $\beta$ .

Типовими полімерами є водорозчинні полімери, такі як поліалкіленгліколь. Необмежувальний список таких полімерів включає інші гомополімери поліалкіленоксиду, такі як поліпропіленгліколі, поліоксіетиленовані поліолі, їх співполімери і блокспівполімери. Інші приклади головного ланцюга прийнятних водорозчинних і непептидних полімерів включають поліоксіетильований поліол, поліолефіновий спирт, полівінілпіролідон, полігідрокси-пропілметакриламід, полі- $\alpha$ -гідроксикислоту, полівініловий спирт, поліфосфазен, поліоксазолін, полі-N-акрилоїлморфолін і їх співполімери, потрійні співполімери і суміші. В одному варіанті здійснення винаходу полімерним кістком є поліетиленгліколь або монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ) із середньою молекулярною масою від близько 200Да до близько 400000Да. Повинно бути зрозуміло, що інші споріднені полімери також придатні для здійснення даного винаходу, і ПЕГ або поліетиленгліколь входить в перелік таких полімерів. Термін ПЕГ означає поліетиленгліколь в будь-яких формах, включаючи алкокси-ПЕГ, біфункціональний ПЕГ, ПЕГ з множинним розгалуженням, ПЕГ з роздвоєним ланцюгом, ПЕГ з розгалуженим ланцюгом, ПЕГ з бічними замісниками або ПЕГ із зв'язками, що розщеплюються.

В одному варіанті здійснення винаходу поліалкіленгліколеві залишки C1-C4 алкілполіалкіленгліколів, переважно поліетиленгліколю (ПЕГ), або поліоксіалкіленгліколеві залишки таких гліколів входять в представляючі інтерес полімерні системи. Таким чином, полімер, до якого приєднують блок, може бути гомополімером поліетиленгліколю (ПЕГ) або поліоксіетильованим поліолом, за умови, що у всіх випадках полімер розчиняється у воді при кімнатній температурі. Необмежувальні приклади таких полімерів включають гомополімери поліалкіленоксиду, такі як ПЕГ або поліпропіленгліколі, поліоксіетиленовані гліколі, їх співполімери і блокспівполімери, за умови збереження водорозчинності блокспівполімеру. Приклади поліоксіетильованих поліолів включають, наприклад, поліоксіетильований гліцерин, поліоксіетильований сорбіт, поліоксіетильовану глюкозу і тому подібні. Гліцериновий кістяк поліоксіетильованого гліцерину аналогічний природному кістяку, існуючому, наприклад, у тварин і людини в моно-, ди- і тригліцеридах. Тому таке розгалуження необов'язково повинно бути чужорідним для організму.

Як альтернатива поліалкіленоксидам можна використати декстран, полівінілпіролідони, поліакриламід, полівінілові спирти, вуглеводневі полімери і тому подібні. Фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що приведений вище список є ілюстративним і в об'єм винаходу входять всі полімери, що володіють описаними властивостями.

Полімер може мати будь-яку молекулярну масу, але переважна молекулярна маса знаходиться в межах від близько 300 до 100000, більш переважно від 10000 до 40000. Зокрема, молекулярна маса, що дорівнює 20000 або більше, краще усього дозволяє запобігти втраті білка внаслідок фільтрації в нирках.

Похідні сполуки поліалкіленгліколю володіють рядом властивостей, корисних для отримання кон'югатів полімер-IFN- $\beta$  при здійсненні даного винаходу, таких як: краща водорозчинність при одночасному збереженні антигенної або імуногенної реакції; висока міра біосумісності; відсутність біорозкладення похідних поліалкіленгліколю *in vivo* і більш легке виведення з живих організмів.

Крім того, іншим об'єктом даного винаходу є використання IFN- $\beta$ , ковалентно пов'язаного з полімером, причому в цьому випадку кон'югація досягається за рахунок ковалентних хімічних зв'язків, що розщеплюються. Така кон'югація дозволяє контролювати час, після закінчення якого полімер може бути відщеплений від IFN- $\beta$ . Ковалентний зв'язок між препаратом IFN- $\beta$  і полімером може бути розщепленим внаслідок хімічної або ферментативної реакції. Продукт, що являє собою IFN- $\beta$ -полімерний кон'югат, зберігає активність на прийнятному рівні. Одночасно з цим в кон'югуючому полімері присутні частини поліетиленгліколю, що надають IFN- $\beta$ -полімерному кон'югату високу водорозчинність і більш тривале збереження в кровотоці. Завдяки поліпшеним характеристикам IFN- $\beta$ -полімерного кон'югату даний винахід робить можливою парентеральну, назальну і пероральну доставку активного IFN- $\beta$ -полімерного кон'югату з подальшим гідролітичним розщепленням зв'язків, поліпшує біологічну доступність IFN- $\beta$  при застосуванні *in vivo*.

Взаємодію полімеру і IFN- $\beta$  з утворенням кон'югатів, наприклад, продуктів, кон'югованих біла N-кінця, можна легко здійснити за допомогою цілого ряду схем реакцій. Активність і стійкість кон'югатів IFN- $\beta$  можна змінювати різними способами, використовуючи полімери з різною молекулярною масою. Розчинність кон'югатів можна варіювати шляхом зміни пропорції і розміру фрагменту поліетиленгліколю, введенного в полімерну композицію.

В одному варіанті здійснення винаходу кон'югати згідно з даним винаходом отримують, здійснюючи взаємодію білка з активованою сполукою поліалкіленгліколю (PCG). Наприклад, IFN можна піддати взаємодії з ПЕГ-альдегідом в присутності відновника (наприклад, ціаноборогідриду натрію) за допомогою відновного алкілювання для отримання ПЕГ-білкового кон'югату, сполученого амідним зв'язком. Див., наприклад, європейський патент №0154316 B1 і заявку на міжнародний патент №PCT/US03/01559.

У деяких варіантах здійснення винаходу людський IFN- $\beta$  ПЕГ-модифікують з використанням наступних активованих поліалкіленгліколів: мПЕГ-О-2-метилпропіональдегід 20кДа, мПЕГ-О-п-метилфеніл-О-2-метилпропіональдегід 20кДа, мПЕГ-О-м-метилфеніл-О-2-метилпропіональдегід 20кДа, мПЕГ-О-п-фенілацетальдегід 20кДа, мПЕГ-

О-п-фенілпропіональдегід 20кДа і мПЕГ-О-м-фенілацетальдегід 20кДа, отримуючи при цьому IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-2-метилпропіональдегідом 20кДа, IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-п-метилфеніл-О-2-метилпропіональдегідом 20кДа, IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-м-метилфеніл-О-2-метилпропіональдегідом 20кДа, IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-п-фенілацетальдегідом 20кДа, IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-п-фенілпропіональдегідом 20кДа, і IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-м-фенілацетальдегідом 20кДа. Докладний опис отримання і дослідження людського IFN- $\beta$ , модифікованого мПЕГ-О-2-метилпропіональдегідом 20кДа і мПЕГ-О-п-фенілацетальдегідом 20кДа, наведений нижче, а також в заявці на міжнародний патент №PCT/US03/01559.

В одному варіанті здійснення винаходу пегільований IFN- $\beta$  отримують таким чином. IFN- $\beta$ , наприклад AVONEX® (нерозфасований проміжний продукт IFN- $\beta$ -1a, (клінічна партія нерозфасованого лікарського засобу, що пройшла всі випробування для використання при лікуванні людини) в кількості 250мкг/мл в 100мМ фосфату натрію, рН 7,2, 200мМ NaCl) розводять рівним об'ємом 100мМ MES, рН 5,0, і доводять показник рН до 5,0, додаючи HCl. Зразок вводять в колонку FF SP-Sepharose® (Pharmacia, Piscataway, NJ) при 6мг IFN- $\beta$ /мл смоли. Колонку промивають 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, і продукт елюють 30мМ фосфату натрію, рН 6,0, 600мМ NaCl. Елюйовані фракції аналізують, вимірюючи оптичну густину при 280нм, і на основі оптичної густини визначають концентрацію інтерферону в зразках, використовуючи коефіцієнт екстинкції, що дорівнює 1,51 для 1мг/мл розчину.

До IFN- $\beta$ , отриманому з елюату SP, в кількості 1мг/мл розчину, додають 0,5мМ фосфату натрію, рН 6,0, до 50мМ, ціаноборогідрид натрію (Aldrich, Milwaukee, WI) до 5мМ і ПЕГ-альдегід з молекулярною масою 20000 (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) до 5мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 20 годин. Пегільований інтерферон очищають від продуктів реакції, виконуючи послідовні стадії хроматографії в сортувальній колонці 6 FPLC Superose® (Pharmacia) з використанням 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 150мМ NaCl як рухомої фази і SP-Sepharose® FF. У сортувальній колонці відбувається розділення модифікованого і немодифікованого IFN- $\beta$ . Елюат, що містить пегільований бета-інтерферон, зібраний після гель-фільтрації, розводять водою у відношенні 1:1 і вводять в кількості 2мг бета-інтерферону/мл смоли в колонку SP-Sepharose®. Колонку промивають 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 75мМ NaCl, після чого пегільований бета-інтерферон елюють з колонки 5мМ фосфату натрію, рН 5,5, 800мМ NaCl. Елюйовані фракції аналізують відносно вмісту білка на основі оптичної густини при 280нм. Концентрація пегільованого інтерферону вказана в еквівалентах інтерферону, оскільки ПЕГ не впливає на оптичну густину при 280нм. Вказаний метод і дослідження пегільованого IFN- $\beta$  описані в заявці WO

00/23114. Кон'югація IFN- $\beta$  з ПЕГ, мабуть, не змінює антивірусну активність. Крім того, питома активність пегільованого IFN- $\beta$  значно вище (приблизно в 10 разів), ніж у IFN- $\beta$ , не модифікованого поліетиленгліколем (WO 00/23114).

IFN- $\beta$  можна також модифікувати ПЕГ-альдегідною частиною з молекулярною масою 5000, що виробляється, наприклад, компанією Fluka, Inc (№ за каталогом 75936, Ronkonkoman, NY), відповідно до способу, наведеного вище для ПЕГ-альдегіду з молекулярною масою 20000.

IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-2-метилпропіональдегідом 20кДа, можна отримати таким чином. 10мл AVONEX<sup>®</sup> (нерозфасований проміжний продукт IFN- $\beta$ -1a, (клінічна партія нерозфасованого лікарського засобу, що пройшла всі випробування для використання при лікуванні людини) в кількості 250мкг/мл в 100мМ фосфату натрію, pH 7,2, 200мМ NaCl) розводять 12мл 165мМ MES, pH 5,0, і 50мкл 5н розчину HCl. Зразок вводять в 300мкл колонку FF SP Sepharose (Pharmacia). Колонку тричі промивають 300мкл 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 75мМ NaCl і елюють білок 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 600мМ NaCl. Елюйовані фракції аналізують відносно оптичної густини при 280нм і визначають концентрацію IFN- $\beta$  в зразках, використовуючи коефіцієнт екстинкції, що дорівнює 1,51 для 1мг/мл розчину. Відповідні піку фракції збирають, отримуючи при цьому IFN- $\beta$  в концентрації 3,66мг/мл, який потім розбавляють водою до 1,2мг/мл.

До 0,8мл IFN- $\beta$ , отриманого з розбавленого елюату з колонки SP-Sepharose, додають 0,5М фосфату натрію, pH 6,0 до 50мМ, ціаноборогідрид натрію (Aldrich) до 5мМ і мПЕГ-О-2-метилпропіональдегід 20кДа до 5мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 16 годин в темряві. Пегільований IFN- $\beta$  очищають від реакційної суміші в 0,5мл колонці FF SP-Sepharose таким чином: 0,6мл реакційної суміші розбавляють 2,4мл 20мМ MES, pH 5,0, і вводять в колонку SP-Sepharose. Колонку промивають фосфатом натрію, pH 5,5, 75мМ NaCl, після чого пегільований IFN- $\beta$  елюють з колонки 25мМ MES, pH 6,4, 400мМ NaCl. Пегільований IFN- $\beta$  потім очищають в сортувальній колонці Superose 6 HR 10/30 FPLC, використовуючи 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 150мМ NaCl як рухому фазу. Очищення в сортувальній колонці (25мл) здійснюють з швидкістю 20мл/година і збирають 0,5мл фракції. Елюйовані фракції аналізують відносно вмісту білка на основі оптичної густини при 280нм, збирають і визначають концентрацію білка в зібраному елюаті. Концентрація пегільованого IFN- $\beta$  вказана в еквівалентах IFN, оскільки ПЕГ не впливає на оптичну густину при 280нм. Відбирають зразки для аналізу і іншу частину елюату розводять до 30мкг/мл HAS-вмісним буфером, відбирають аліквати в кількості 0,25мл/пробірка і зберігають при -70°C.

IFN- $\beta$ , модифікований мПЕГ-О-п-фенілацетальдегідом 20кДа, можна отримати таким чином. 20мл AVONEX<sup>®</sup> (нерозфасований проміжний продукт IFN- $\beta$ , клінічна партія нерозфасованого лікарського засобу, що пройшла всі випробування для використання при лікуванні лю-

дини, в кількості 250мкг/мл в 100мМ фосфату натрію, pH 7,2, 200мМ NaCl) розводять 24мл 165мМ MES, pH 5,0, 100мкл 5н розчину HCl і 24мл води. Зразок вводять в 600мкл колонку FF SP-Sepharose (Pharmacia). Колонку двічі промивають 900мкл 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 75мМ NaCl і елюють білок 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 600мМ NaCl. Елюйовані фракції аналізують відносно оптичної густини при 280нм і визначають концентрацію IFN- $\beta$  в зразках, використовуючи коефіцієнт екстинкції, що дорівнює 1,51 для 1мг/мл розчину. Відповідні піку фракції збирають, отримуючи при цьому IFN- $\beta$  в концентрації 2,3мг/мл. До 1,2мл IFN- $\beta$ -1a, отриманого з елюату, зібраного з колонки SP-Sepharose, додають 0,5М фосфату натрію, pH 6,0, до 50мМ, ціаноборогідрид натрію (Aldrich) до 5мМ і мПЕГ-О-п-фенілацетальдегід 20кДа до 10мг/мл. Зразок інкубують при кімнатній температурі протягом 18 годин в темряві. Пегільований IFN- $\beta$  можна очистити від реакційної суміші в 0,75мл колонці FF SP-Sepharose таким чином: 1,5мл реакційної суміші розводять 7,5мл 20мМ MES, pH 5,0, 7,5мл води і 5мкл 5н розчину HCl і вводять в колонку SP-Sepharose. Колонку промивають фосфатом натрію, pH 5,5, 75мМ NaCl, після чого пегільований IFN- $\beta$  елюють з колонки 20мМ MES, pH 6,0, 600мМ NaCl. Потім пегільований IFN- $\beta$  очищають в сортувальній колонці Superose 6 HR 10/30 FPLC, використовуючи 5мМ фосфату натрію, pH 5,5, 150мМ NaCl як рухому фазу. Очищення в сортувальній колонці (25мл) виконують з швидкістю 20мл/година і збирають 0,5мл фракції. Елюйовані фракції аналізують відносно вмісту білка на основі оптичної густини при 280нм, збирають і визначають концентрацію білка в елюаті. Концентрація пегільованого IFN- $\beta$  вказана в еквівалентах IFN після внесення поправки на ПЕГ (мПЕГ-О-п-фенілацетальдегід 20кДа має коефіцієнт екстинкції при 280нм, що дорівнює 0,5 для 1мг/мл розчину) в оптичну густину при 280нм, використовуючи коефіцієнт екстинкції, що дорівнює 2 для 1мг/мл розчину пегільованого IFN- $\beta$ . Відбирають зразки для аналізу і іншу частину зібраного продукту розводять до 30мкг/мл HAS-вмісним буфером, відбирають аліквати в кількості 0,25мл/пробірка і зберігають при -70°C.

Глікозилований IFN- $\beta$ , пов'язаний з штучним полімером, можна використати при здійсненні способів згідно з даним винаходом. Полімер може містити поліалкіленгліколеву частину. Поліалкіленова частина може бути зв'язана з бета-інтерфероном за допомогою групи, вибраної з альдегідної групи, малеїмідної групи, вінілсульфонової групи, галогенацетатної групи, декількох залишків гістидину, гідразинової групи і аміноіолової групи. IFN- $\beta$  може бути зв'язаний з поліетиленгліковою частиною, причому IFN- $\beta$  зв'язують з поліетиленгліковою частиною за допомогою нестійкого зв'язку, який розщеплюється в результаті біохімічного гідролізу і/або протеолізу. Полімер може мати молекулярну масу від близько 5 до близько 40кДальтон. Інший IFN- $\beta$ , який можна використати, є фізіологічно активним бета-інтерфероном композиції, що включає фізіологічно активний глікозилований бета-інтерферон, N-

кінець якого зв'язаний з полімером, що містить поліалкіленгліколеву частину, при цьому фізіологічно активний бета-інтерферон і поліалкіленгліколева частина розташовані так, що фізіологічно активний бета-інтерферон, що входить до складу композиції, володіє по суті такою ж активністю, що і фізіологічно активний бета-інтерферон, який не має вказаної частини, про що свідчать результати вимірювання методом антивірусного аналізу.

Гетерологічні поліпептиди або інші молекули можуть бути ковалентно або нековалентно зв'язані з білком IFN- $\beta$  або його варіантом. Термін «ковалентно зв'язаний» означає, що різні частини молекули згідно з даним винаходом ковалентно зв'язані одна з одною прямим зв'язком або ковалентно зв'язані одна з одною посереднім зв'язком за допомогою однієї або декількох проміжних частин, таких як місток, спейсер, одна або декілька лінкерних частин. Одну або декілька проміжних частин іменують «зв'язуючою групою». Термін «кон'югований» має взаємозамінне значення з терміном «ковалентно зв'язаний».

Бета-інтерферони, призначені для використання в даному винаході, можуть бути глікозильованими або неглікозильованими. Неглікозильовані IFN- $\beta$  можна продукувати в прокаріотичній клітині-хазяїні.

Білки IFN- $\beta$  і їх варіанти можна також модифікувати, приєднуючи полісахариди, які звичайно відсутні в IFN- $\beta$ .

### 3. Методи отримання препаратів IFN- $\beta$

Препарати IFN- $\beta$  згідно з даним винаходом можна отримати будь-якими прийнятними методами, які включають отримання нуклеїнової кислоти, що кодує препарат IFN- $\beta$ , і експресію вказаної нуклеїнової кислоти в прийнятному трансформованому хазяїні. За допомогою такого методу можна отримати препарати рекомбінантного IFN- $\beta$ . Препарати IFN- $\beta$  можна також отримати хімічним синтезом або комбінацією хімічного синтезу і методів рекомбінантних ДНК.

В одному варіанті здійснення винаходу нуклеїнову кислоту, що кодує препарат IFN- $\beta$ , отримують шляхом виділення або синтезу послідовності ДНК, що кодує IFN- $\beta$  або його варіант. Наприклад, злитий білок IFN- $\beta$  можна отримати методом, розглянутим в даному описі винаходу. Природну нуклеїнову кислоту IFN- $\beta$  можна отримати методами, добре відомими в даній галузі. Наприклад, нуклеїнову кислоту можна виділити за допомогою полімеразної реакції синтезу ланцюга із зворотною транскриптазою (RT-PCR), використовуючи РНК, отриману з клітини, яка, як відомо, експресує IFN- $\beta$ , наприклад лейкоцита, і затравки на основі послідовності гена IFN- $\beta$ , наприклад, SEQ ID NO:1. Нуклеїнові кислоти, що кодують білки IFN- $\beta$ , можна також отримати внаслідок скринінгу бібліотек, наприклад, бібліотек кДНК, створених з клітин, що експресують IFN- $\beta$ , за допомогою зонда, наприклад, олігонуклеотиду, який містить частину послідовності IFN- $\beta$ .

Альтернативно, повну амінокислотну послідовність можна використати для створення гена, трансльованого в зворотному напрямі. Можна синтезувати олігомер ДНК, що містить нуклеотидну

послідовність, яка кодує препарат IFN- $\beta$ . Наприклад, можна синтезувати декілька невеликих олігонуклеотидів, що кодують частини необхідного поліпептиду, і потім лігувати їх один з одним. Окремі олігонуклеотиди звичайно містять 5'- або 3'-кінцеві виступи для комплементарної зборки.

В нуклеїнові кислоти, що кодують білки IFN- $\beta$ , можна внести зміни методами, добре відомими в даній галузі. Наприклад, можна здійснити зміни за допомогою сайт-специфічного мутагенезу, описаного, наприклад, в [публікації Mark et al. «Site-specific Mutagenesis Of the Human Fibroblast Interferon Gene», Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 5662-66 (1984)] і патенті США №4588585.

Іншим методом створення нуклеїнової кислоти, що кодує препарат IFN- $\beta$ , є хімічний синтез. Наприклад, ген, який кодує необхідний препарат IFN- $\beta$ , можна синтезувати хімічним шляхом в синтезаторі олігонуклеотидів. Такі олігонуклеотиди створюють на основі амінокислотної послідовності необхідного препарату IFN- $\beta$ .

При виборі нуклеїнової кислоти для експресії в експресуючій системі бажано вибрати такі кодони, які сприятливі для клітини-хазяїна або експресуючої системи, в якій буде продукований препарат рекомбінантного IFN- $\beta$ . Відомо, наприклад, що певні кодони більш переважно експресуються в прокаріотичних клітинах в порівнянні з іншими («перевага кодонів»).

Послідовність ДНК, що кодує препарат IFN- $\beta$ , може включати або не включати послідовність ДНК, що кодує сигнальну послідовність. Така сигнальна послідовність, у разі її наявності, є послідовністю, пізнаваною кліткою, вибраною для експресії препарату IFN- $\beta$ . Сигнальна послідовність може бути прокаріотичною, еукаріотичною або комбінацією обох послідовностей. Сигнальні послідовності добре відомі в даній галузі, де описано декілька різних послідовностей. Сигнальна послідовність може бути послідовністю нативного (тобто природного) IFN- $\beta$ . Введення сигнальної послідовності залежить від бажання секретувати препарат IFN- $\beta$  в рекомбінантних клітинах, в яких він продукований. Якщо вибрані клітини є прокаріотичними, звичайно бажано, щоб послідовність ДНК не кодувала сигнальну послідовність. Якщо вибрані клітини є еукаріотичними, звичайно бажано мати кодовану сигнальну послідовність і особливо переважно використати сигнальну послідовність IFN- $\beta$  дикого типу.

Після збирання (шляхом синтезу, сайт-направленого мутагенезу або іншим методом) нуклеїнову кислоту, що кодує препарат IFN- $\beta$ , вводять в експресуючий вектор, в якому вона функціонально пов'язана з експресуючою регулярною послідовністю, придатною для експресії препарату IFN- $\beta$  в необхідному трансформованому хазяїні. Правильність збирання може бути підтверджена секвенуванням нуклеїнової кислоти, рестрикційним картуванням і експресією біологічно активного поліпептиду в прийнятному хазяїні або клітині-хазяїні. Як відомо в даній галузі, для досягнення високих рівнів експресії трансфікованого гена в хазяїні або клітині-хазяїні вказаний ген повинен бути функціонально пов'язаний з експресуючими

регулярними послідовностями транскрипції і трансляції, що функціонують у вибраному експресуючому хазяїні.

Вибір експресуючої регулярної послідовності і експресуючого вектора залежить від вибору клітини-хазяїна. Можна використати різні комбінації експресуючого хазяїна/вектора. Прийнятними експресуючими векторами для еукаріотичних хазяїв, наприклад, еукаріотичних клітин-хазяїв, є вектори, що містять експресуючі регулярні послідовності, виділені з SV40, вірусу папіломи великої рогатої худоби, аденовірусу і цитомегаловірусу, зокрема, нижченаведені вектори: pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo і pHyg. Альтернативно, для тимчасової експресії білків в еукаріотичних клітинах можна використати похідні вірусів, таких як вірус папіломи великої рогатої худоби (BPV-1) або вірус Епштейна-Барра (pHEBo, виділений з pREP і p205). У даній галузі відомі різні методи отримання плазмід і трансформації організмів-хазяїв. Для ознайомлення з іншими експресуючими системами [див. публікацію Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989), Chapters 16 and 17].

Прийнятні експресуючі вектори для бактерійних хазяїв включають відомі бактерійні плазмиди, зокрема, плазмиди, отримані з *E. coli*, що включають col E1, pCR1, pBR322, pMB9 і їх похідні, плазмиди з більш широким спектром хазяїв, такі як RP4, фагові ДНК, наприклад, численні похідні лямбда-фага, такі як NM989, і інші ДНК-вмісні фаги, такі як M13 і нитчасті одноланцюгові ДНК-вмісні фаги. Прийнятні експресуючі вектори для дріжджових клітин включають плазмиду 2.mu. і її похідні. Прийнятні вектори для клітин комах включають pVL 941. [Див. також публікацію Gate et al., «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, у вказаних векторах можна використати різні експресуючі регулярні послідовності. Придатні експресуючі регулярні послідовності включають експресуючі регулярні послідовності, зв'язані зі структурними генами вищезгаданих експресуючих векторів. Приклади прийнятних експресуючих регулярних послідовностей включають, наприклад, ранні і пізні промотори SV-40 або аденовірусу, lac-системи, trp-системи, систему TAC або TRC, головні операторні і промоторні ділянки лямбда-фага, наприклад PL, контрольні ділянки білка оболонки вірусу fd, промотор 3-фосфогліцераткінази або інші гліколітичні ферменти, промотори кислоти фосфатази, наприклад, P<sub>ho5</sub>, промотори системи альфа-спаровування дріжджів і інші послідовності, які, як відомо, контролюють експресію генів прокариотичних або еукаріотичних клітин або їх вірусів і різних їх комбінацій.

Для продукування препаратів IFN- $\beta$  можна використати будь-якого прийнятного хазяїна, включаючи бактерії, гриби (в тому числі дріжджі), рослини клітини, клітини комах, клітини ссавців і інші відповідні тваринні клітини або лінії клітин, а також трансгенних тварин або рослини. Типовими хазя-

ями є штами *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, грибні клітини, дріжджові клітини, клітини комах, таких як *Spodoptera frugiperda* (SF9), тваринні клітини, такі як клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини мишей, такі як NS/O, клітини африканської зеленої мавпи, такі як COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 і BMT 10, і клітини людини, а також рослинні клітини в культурі тканини. Такі клітини можна отримати з Американської колекції типових культур (ATCC). Переважні клітини-хазяї для експресії в тваринних клітинах включають культивовані клітини CHO і COS 7 і особливу лінію клітин CHO-DDUKY- $\beta$ 1.

Повинно бути зрозуміло, що не всі вектори і експресуючі регулярні послідовності однаково добре експресують послідовності ДНК, розглянуті в даному описі винаходу. Точно так само не всі хазяї однаково добре підходять для однієї і тієї ж експресуючої системи. Однак фахівець в даній галузі може вибрати необхідні вектори, експресуючі регулярні послідовності і хазяїв без зайвого експериментування. При цьому необхідно також врахувати число піків вектора, здатність контролювати дане число піків і експресію будь-яких інших білків, кодованих даним вектором, таких як маркер стійкості до антибіотиків. Наприклад, переважні вектори для даного винаходу включають вектори, що дозволяють ампліфікувати ДНК, що кодує препарат IFN- $\beta$ , у вигляді декількох піків. Такі ампліфіковані вектори добре відомі в даній галузі. До таких векторів відносяться, наприклад, вектори, які можна ампліфікувати методом ампліфікації DHFR [див., наприклад, Kaufman, патент США №4470461, публікацію 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 опубліковану заявку на європейський патент №338841).

При виборі експресуючої регулярної послідовності необхідно взяти до уваги ряд чинників. Такі чинники включають, наприклад, відносну міцність послідовності, її регульованість і сумісність з даною послідовністю ДНК, що кодує препарат IFN- $\beta$ , зокрема, відносно можливих вторинних структур. При виборі хазяїв необхідно враховувати їх сумісність з вибраним вектором, токсичність продукту, кодованого послідовностями ДНК згідно з даним винаходом, характеристики секреції, здатність здійснювати правильне укладання поліпептидних ланцюгів, вимоги, що пред'являються до ферментації або культури, і простоту очищення продуктів, кодованих послідовностями ДНК.

З урахуванням вищезгаданих параметрів фахівець в даній галузі може вибрати різні комбінації вектора/експресуючої регулярної послідовності/хазяїна, які будуть експресувати необхідні послідовності ДНК в ферментаційній або великомаштабній тваринній культурі, наприклад, з використанням клітин CHO або COS 7. Використання лінії клітин CHO, такої як CHO-KUKX-B1 DHFR sup, для експресії варіантів IFN- $\beta$  детально описано в патенті США №6127332.

Препарат IFN- $\beta$  можна також продукувати в системі in vitro, наприклад, системі трансляції, та-



кій як клітинний лізат, зокрема, лізат ретикулоцитів. Термін «система трансляції *in vitro*», що має взаємозамінне значення з терміном «безклітинна система трансляції», означає систему трансляції, яка являє собою безклітинний екстракт, що містить щонайменше мінімум елементів, необхідних для трансляції молекули РНК в білок. Системи трансляції *in vitro* звичайно включають макромолекули, такі як ферменти, фактори трансляції, ініціації і елонгації, хімічні реагенти і рибосоми. Наприклад, система трансляції *in vitro* може містити щонайменше рибосоми, тРНК, що ініціює метіоніл-тРНК<sup>Met</sup>, білки або комплекси, що беруть участь в трансляції, наприклад, eIF<sub>2</sub>, eIF<sub>3</sub>, кеп-зв'язувальний (СВ) комплекс, що включає кеп-зв'язувальний білок (СВР) і еукаріотичний фактор ініціації 4F (eIF<sub>4F</sub>). У даній галузі добре відомі різні системи трансляції *in vitro*, які включають комерційно доступні набори. Прикладами систем трансляції *in vitro* є лізати еукаріотичних клітин, такі як лізати ретикулоцитів кролика, лізати ооцитів кролика, лізати клітин людини, лізати клітин комах і екстракти паростків пшениці. Лізати виробляються на комерційній основі такими компаніями як Promega Corp, Madison, Wis; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, 111.; і GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. РНК, що використовується в системах трансляції *in vitro*, можна продукувати *in vitro*, наприклад, за допомогою промоторів SP6 або T7 методами, відомими в даній галузі.

Відповідно до іншого способу препарат IFN-β експресують з ендегенного гена в клітині-хазяїні. Даний спосіб може включати введення гетерологічного промотору вгорі від кодувчої області гена IFN-β, наприклад, промотору, що індукується, експресуючого ендегенний ген IFN-β, і виділення продукowanego IFN-β. Гетерологічний промотор можна ввести в клітини шляхом «забиття» методами, відомими в даній галузі, або альтернативно шляхом введення промотору в ген IFN-β.

Препарат IFN-β, отриманий способом згідно з даним винаходом, може бути глікозильованим або неглікозильованим в залежності від організму-хазяїна, використаного для продукування даного препарату. Якщо як хазяїн були вибрані бактерії, продукований препарат IFN-β буде неглікозильованим. Еукаріотичні клітини, з іншого боку, глікозильовують препарати IFN-β.

Препарат IFN-β, продукований трансформованим хазяїном, можна очистити будь-яким прийнятним способом. Відомі різні способи очищення IFN-β. Див., наприклад, патенти США №№ 4289689, 4359389, 4172071, 4551271, 5244655, 4485017, 4257938, 4541952 і 6127332. У переважному варіанті здійснення винаходу препарат IFN-β очищають за допомогою імуноафінної хроматографії, описаної, наприклад, в [публікації Okamura et al., «Human Fibroblastoid Interferon: Immunosorbent Column Chromatography and N-Terminal Amino Acid Sequence». Biochem, 19, pp. 3831-35 (1980)].

Наприклад, білки IFN-β і їх варіанти можна виділити і очистити відомими методами, такими як екстракція, преципітація, хроматографія, афінна хроматографія, електрофорез або подібними. На-

приклад, білки і фрагменти інтерферону можна очистити, пропускаючи розчин через колонку, що містить іммобілізований рецептор інтерферону (див. патент США №4725669). Зв'язану молекулу інтерферону потім можна елювати, проводячи обробку хаотропною сіллю або водним розчином оцтової кислоти. Злиті білки імуноглобуліну можна очистити, пропускаючи розчин, що містить злитий білок, через колонку, заповнену білком А або білком G, який вибірково зв'язується з Fc-частиною злилого білка. [Див., наприклад, публікацію Reis, K.J. et al., J. Immunol. 132:3098-3102 (1984); заявку РСТ, публікація №WO 87/00329]. Химерне антитіло можна потім елювати, проводячи обробку хаотропною сіллю, або водним розчином оцтової кислоти.

Альтернативно білки інтерферону і молекули, злиті з імуноглобуліном, можна очистити в колонках з антитілом проти інтерферону або в колонках з антитілом проти імуноглобуліну, отримавши при цьому по суті чистий білок. Термін «по суті чистий» означає, що білок не містить забруднюючих речовин, які пов'язані з ним в природних умовах. Про істотну чистоту свідчить одна смуга, отримана при виконанні електрофорезу.

Продукований і очищений IFN-β можна дослідити методом пептидного картування. Наприклад, зразок препарату IFN-β можна гідролізувати ендопротеїназою Lys-C і дослідити методом ВЕРХ із оберненою фазою відповідно до опису, приведенного в патенті США №6127332.

У переважному варіанті здійснення винаходу препарат IFN-β по суті не містить інший клітинний матеріал, наприклад, білки. Термін «по суті чистий» або «очищені препарати IFN-β» означає препарат IFN-β, що містить менше приблизно 20% (в перерахунку на суху масу) забруднюючих клітинних матеріалів, наприклад, нуклеїнових кислот, білків і ліпідів, і переважно містить менше приблизно 5% забруднюючого клітинного матеріалу. Переважні препарати IFN-β містять менше за приблизно 2% забруднюючих клітинних матеріалів; ще переважніше, менше за приблизно 1% забруднюючих клітинних матеріалів і, найбільш переважно, менше за приблизно 0,5, 0,2, 0,1, 0,01, 0,001% забруднюючих клітинних матеріалів.

Переважні композиції на основі препарату IFN-β також по суті не містять інших клітинних білків (що визначаються також як «забруднюючі білки»), тобто вказані композиції містять менше приблизно 20% (в перерахунку на суху масу) забруднюючих білків і, переважно, містять менше приблизно 5% забруднюючих білків. Переважні препарати поліпептидів згідно з даним винаходом містять менше приблизно 2% забруднюючих білків; ще переважніше, менше приблизно 1% забруднюючих білків і, найбільш переважно, менше приблизно 0,5, 0,2, 0,1, 0,01, 0,001% забруднюючих білків.

Чистоту і концентрацію препаратів IFN-β можна визначити методами, відомими в даній галузі, наприклад за допомогою гель-електрофорезу, і методами, описаними в [публікації Robert K. Scopes, Protein Purification, Principles and Practice, Third Ed., Springer Verlag New York, 1993 і в посиланнях, приведених в даній публікації].

Біологічну активність препаратів IFN- $\beta$  можна дослідити будь-яким прийнятним методом, відомим в даній галузі, наприклад, шляхом нейтралізації антитілом антивірусної активності, індукції активності протеїнази, олігоаденілат-2,5-А-синтетази або фосфодіестерази, відповідно до опису, приведенного в заявках EP-B1-41313 і WO 00/23472. Такі аналізи включають також імуномодуляторні аналізи (див., наприклад, патент США №4753795), аналізи методом гальмування росту і вимірювання зв'язування з клітинами, експресуючими рецептори інтерферону. Типові антивірусні аналізи описані в патенті США №6127332 і заявці WO 00/23472.

Придатність препаратів IFN- $\beta$  для лікування гломерулонефриту можна також оцінити з використанням тваринних моделей, наприклад, описаних в прикладах і далі в даному описі винаходу. Дослідження може бути здійснено відповідно до опису, приведенного в прикладах.

Препарати IFN- $\beta$  можна також придбати комерційним шляхом під наступними торговими назвами: AVONEX<sup>®</sup> (IFN- $\beta$ -1a) (Biogen, Inc., Cambridge, MA); REBIF<sup>®</sup> (IFN- $\beta$ -1a) (Serono, S.A., Geneva, Switzerland) і BETA FERON<sup>®</sup> (IFN-(B-1b) (Schering Aktiengesellschaft, Berlin, Germany), який також представлений на ринку під назвою BETASERON<sup>®</sup> (Berlex, Montville, NJ; IFN- $\beta$ -1b). AVONEX<sup>®</sup> і REBIF<sup>®</sup> являють собою рекомбінантний глікозилізований людський IFN- $\beta$  дикого типу, продукований в клітинах яєчника китайського хом'ячка. BETA FERON<sup>®</sup> продукований в бактеріях.

#### 4. Способи лікування препаратами IFN- $\beta$

Даний винахід відноситься до способів лікування і профілактики невротатії у потребуєчого суб'єкта, що включають введення вказаному суб'єкту терапевтично ефективної кількості препарату IFN- $\beta$  необов'язково як допоміжний засіб при лікуванні іншим препаратом. В одному варіанті здійснення винаходу невротатія є демієлінізуючою невротатією, такою як хронічна демієлінізуюча невротатія. Приклади хронічної демієлінізуючої невротатії включають CIDP і багатоосередкову рухову невротатію. У переважному варіанті здійснення винаходу невротатія є CIDP.

Потребуєчим суб'єктом може бути суб'єкт, у якого виявлена невротатія. Невротатія може бути діагностована у суб'єкта методами, відомими в даній галузі. Зокрема, CIDP може бути діагностована методами, відомими в даній галузі, які більш детально описані нижче. Лікування суб'єкта з діагнозом невротатії може бути розпочате препаратом IFN- $\beta$  в будь-який час. Крім того, лікуванню може бути підданий суб'єкт, у якого не виявлена невротатія, але, мабуть, може виникнути. Такі суб'єкти можуть бути виявлені генетичними методами обстеження. Суб'єкти, в яких може виникнути невротатія, є також суб'єктами, у яких виявлені деякі, але не всі симптоми, характерні для невротатії, тому в деяких випадках може бути неясно, чи дійсно у суб'єкта може виникнути невротатія. Лікування може проводитися протягом щонайменше близько 1 місяця, щонайменше близько 3 місяців, щонайменше близько 6 місяців, щонайменше бли-

зько 1 року, щонайменше близько 3 років, щонайменше близько 5 років або довше.

Потребуєчим суб'єктом може бути тварина, зокрема, ссавець. Приклади ссавців включають людей, велику рогату худобу, овець, свиней, коней, собак, кішок, приматів, крім людини, мишей і щурів.

У деяких варіантах здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять потребуєчому суб'єкту у вигляді додаткової терапії, тобто при одночасному проведенні іншого лікування. Наприклад, суб'єкт, страждаючий CIDP, може пройти курс лікування IVIg; стероїдами, такими як преднізолон; імунодепресантом, таким як азотіоприн, циклоспорин або циклофосфамід; або плазмаферезом крім введення препарату IFN- $\beta$ . Комбінована терапія з використанням препарату IFN- $\beta$  може звести до мінімуму застосування інших лікарських засобів, які можуть бути більш шкідливими (наприклад стероїди), більш дорогими (наприклад, IVIg) або менш зручними (заміна плазми). Тому в деяких варіантах здійснення винаходу введення суб'єкту препарату IFN- $\beta$  дозволяє зменшити дозу і/або частоту введення іншого лікарського засобу. Наприклад, дозу і/або частоту введення можна зменшити щонайменше приблизно на 10%, 30%, 50%, 75%, 100% (тобто в два рази), п'ять разів, 10 разів або більше. Нижче наведені діючі нормативи лікування CIDP.

Один варіант здійснення винаходу відноситься до способу лікування хронічної демієлінізуючої невротатії, наприклад CIDP, у суб'єкта, що проходить основний курс лікування CIDP, вибраний з групи, що складається з введення стероїду, введення протизапального засобу, введення IVIg і проведення плазмаферезу, який крім основного лікування CIDP включає введення суб'єкту препарату IFN- $\beta$  в кількості, достатній для значного зменшення дози або частоти проведення основного лікування CIDP, для досягнення ефективного ослаблення симптомів CIDP.

У цей час для лікування CIDP використовують імунодепресанти. Наприклад, встановлено, що стероїди надають сприятливий ефект при лікуванні CIDP. Позитивна реакція звичайно спостерігається через 4 тижні. Звичайно стероїдом, що використовується є преднізон (дельтазон, оразон, метикортен). Преднізон є пероральним кортико-стероїдом, який придушує запальну і імунну реакції і, як вважають, змінює функцію медіатора на сайті придушення запальних і імунних реакцій при захворюванні CIDP. Хоча дози, що вводяться, можуть бути різними, більшість дорослих суб'єктів починають з дози 0,5-1мг/кг/доба при пероральному введенні (PO) (від близько 30-40 до 60-80мг/добу). Поліпшення може спостерігатися протягом наступних 2 місяців. Потім вказану дозу можна вводити через день з подальшим зменшенням дози до досягнення найменшої ефективної дози, що дозволяє підтримувати у суб'єкта стан ремісії.

Іншим імунодепресантом, який був визнаний ефективним для лікування CIDP, є азотіоприн (імуран), аналог пурину, що зменшує метаболізм пуринів і інгібуючий синтез ДНК і РНК. Вважається, що азотіоприн підвищує працездатність і ослабляє симптоми CIDP, придушуючи імуноопосередковане ураження нервів. Початкова доза складає бли-

зько 50мг при пероральному введенні на добу (щодня протягом місяця), яку поступово збільшують до загальної добової дози, яка дорівнює 2-3мг/кг/доба при пероральному введенні. Хоча терапевтичні дози азатіоприну важко визначити для кожного суб'єкта, деякі дані дозволяють передбачити, що показником терапевтичної дози є підвищення еритроцитів (MCV). Реакція на лікування може бути отримана більш ніж через 6 місяців.

Ще одним імунодепресантом, який використовується в цей час для лікування CIDP, є мікофенолят (CellCept), який є проліками для такого імунодепресанту як мікофенольна кислота. Вважається, що мікофенолят інгібує синтез пурину в лімфоцитах, придушуючи фермент інозинмонофосфатдегідрогеназу. Типова доза для дорослої людини складає від 250мг до 3г/добу з можливістю зміни дози в залежності від клінічного ефекту.

Циклоспорин (сандимун, неорал), який є циклічним поліпептидом, що містить 11 амінокислот, можна також використати для лікування CIDP. Циклоспорин інгібує першу фазу активації Т-клітин і не впливає на гуморальний імунітет. Вважається, що, придушуючи Т-клітини, циклоспорин може інгібувати клітинно-опосередковане ураження нервів на сайті запальної/імунної реакції. Циклоспорин починають вводити в дозі 5мг/кг/доба при пероральному введенні (два рази на день протягом місяця) і збільшують дозу в залежності від реакції. Необхідно контролювати мінімальні і максимальні рівні для визначення ефективності і щоб уникнути токсичності; хоча спеціально для CIDP не був визначений необхідний мінімальний рівень, при імунологічних порушеннях нижня межа звичайно дорівнює 100-250.

Іншим імунодепресантом є циклофосфамід (цитоксан), який являє собою антинеопластичний агент, що не надає специфічного впливу на певну фазу клітинного циклу, і імунодепресант, діючий як алкілюючий агент. Доза вказаного препарату звичайно становить 1-2мг/кг/доба при пероральному введенні.

Іншим стандартним методом лікування хворих CIDP є внутрішньовенне введення імуноглобуліну (IVIg). Розчин для внутрішньовенного вливання звичайно в основному містить гетерологічний IgG, а також невеликі кількості IgA і IgM. У деяких варіантах здійснення винаходу розчин для внутрішньовенного введення є гетерогенним по відношенню до епітопів, які упізнаються антитілами, наприклад, такий розчин не є препаратом антитіла, отриманим внаслідок імунізації тварини певним антигеном. Передбачуваний механізм дії такого препарату оснований на тому, що IVIg містить довільні набори антитіл, нейтралізуючих імунні фактори, що спричиняють ураження периферичного нерва у випадку CIDP. У середньому поліпшення спостерігається на 10-й день і продовжується до 42-го дня. Напівперіод існування вказаного препарату в сироватці становить приблизно 21-29 днів. Потребуючі суб'єкти звичайно повинні пройти повторні курси лікування через кожні декілька тижнів або місяців для збереження ремісії або лікування рецидивів. Звичайна доза складає від 0,4 до 2г/кг, яку ділять на 5 добових доз по 400мг/кг. Лікування може бути почате з

більш високої дози, що дорівнює, наприклад, 2г/кг, яку поступово знижують до 0,5-1г/кг. Частота введення вказаних доз може бути різною, причому більшість суб'єктів приймають вказані дози кожні 2-8 тижнів. Наприклад, IVIG можна вводити в дозі від 0,4г/кг протягом декількох днів до 1-2г/кг кожні 1-4 тижня.

Іншим визнаним методом лікування CIDP є плазмаферез (або заміна плазми). Вважається, що вказаний метод лікування дозволяє видалити антитіла і компоненти, відповідальні за імуноопосередковане ураження периферичних нервів. Плазму видаляють з крові методом, подібним до діалізу.

Ефективність даного методу, мабуть, аналогічна ефективності IVIg при лікуванні CIDP. Потребуючим суб'єктам звичайно замінюють плазму три рази на тиждень протягом перших двох тижнів; потім частоту лікування визначають по клінічній реакції.

Препарат IFN- $\beta$  можна вводити суб'єкту разом з введенням імунодепресанту, наприклад стероїду, введенням IVIg і/або виконанням плазмаферезу. Препарат IFN- $\beta$  і допоміжний засіб можна вводити одночасно або послідовно. При послідовному введенні допоміжний засіб можна вводити в той же день або в інші дні. При об'єднанні лікування препаратом IFN- $\beta$  з плазмаферезом препарат IFN- $\beta$  вводять після виконання плазмаферезу, щоб уникнути виведення препарату IFN- $\beta$  з організму в процесі виконання плазмаферезу. При об'єднанні лікування препаратом IFN- $\beta$  з лікуванням IVIg два різних лікарських засоби переважно вводять роздільно з проміжком часу, що дорівнює щонайменше одній або двом годинам.

В іншому варіанті здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять суб'єктам, не сприйнятливим до інших описаних вище методів лікування CIDP. В інших ситуаціях препарат IFN- $\beta$  вводять суб'єктам, в яких не виявлена несприйнятливості до інших методів лікування CIDP. Наприклад, препарат IFN- $\beta$  можна вводити суб'єктам, які сприйнятливі до одного або декількох інших методів лікування. В інших варіантах здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять суб'єктам, які раніше не зазнавали ніякого лікування CIDP. Якщо суб'єкт раніше не зазнавав лікування CIDP, методи лікування препаратом IFN- $\beta$  можуть спочатку включати виявлення у суб'єкта CIDP або імовірність захворювання CIDP.

Лікування може являти собою наступне: препарат IFN- $\beta$  вводять суб'єкту, що проходить основний курс лікування CIDP, наприклад, препаратом IVIG, при цьому комбіноване лікування продовжують протягом певного періоду часу, після закінчення якого основне лікування CIDP припиняють. Основне лікування CIDP може бути припинене поступово, наприклад, шляхом зменшення дози і/або частоти проведення основного лікування CIDP. В ілюстративному варіанті здійснення винаходу суб'єкту вводять IVIG один раз кожні два тижні або один раз кожні чотири тижні. Потім суб'єкт разом з лікуванням IVIg проходить курс лікування IFN, який включає введення препарату IFN- $\beta$  один раз на тиждень або на два тижні. Комбіноване лі-

кування може бути продовжене протягом приблизно 10-20 тижнів, наприклад, протягом приблизно 16 тижнів. Під час комбінованого лікування препаратом IVIg і IFN- $\beta$  бажано вводити з проміжком часу, що дорівнює щонайменше 1-3 годинам, наприклад, приблизно 2 годинам. Приблизно через 16 тижнів основне лікування CIDP припиняють або скорочують. Наприклад, суб'єкту потім вводять менші дози IVIg або попередні дози, але набагато рідше. Якщо у суб'єктів не спостерігається поліпшення після припинення або скорочення основного лікування CIDP, можна відновити основне лікування CIDP і продовжити лікування препаратом IFN- $\beta$ .

Препарати IFN- $\beta$  можна вводити будь-яким способом. Наприклад, препарати IFN- $\beta$  можна застосовувати місцево у вигляді ін'єкції або наносити безпосередньо на уражену тканину або системно, наприклад, парентерально або перорально. Місцеве застосування включає, наприклад, введення безпосередньо в уражений м'яз. Парентеральне введення включає аерозолі, підшкірні, внутрішньовенні, внутрішньом'язові, внутрішньосуглобні, внутрішньочеревинні, внутрішньогрудинні, підоболонкові, внутрішньопечінкові, внутрішньосередкові і внутрішньочерепні ін'єкції або вливання. Можна періодично ін'єкувати ударні дози препарату IFN- $\beta$  або проводити більш тривале внутрішньовенне або внутрішньочеревинне введення із зовнішнього резервуара (наприклад балона для внутрішньовенного вливання) або внутрішнього резервуара (наприклад, біорозкладального імплантату або імплантованого насоса).

Препарати IFN- $\beta$  переважно вводять у вигляді стерильної фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій. Термін «носій» в значенні, що використовується тут, означає прийнятні ад'юванти і наповнювачі.

Фармацевтично прийнятні носії, які можуть бути використані в фармацевтичних композиціях згідно з даним винаходом, включають, не обмежуючись ними, іонообмінники, оксид алюмінію, стеарат алюмінію, лецитин, сироваткові білки, такі як сироватковий альбумін людини, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінова кислота, сорбат калію, суміші неповного гліцериду насичених рослинних жирних кислот, вода, солі або електроліти, такі як сульфат проламіну, динатрійгідрофосфат, калійгідрофосфат, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний кремнезем, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, речовини на целюлозній основі, поліетиленгліколь, натрійкарбоксиметилцелюлозу, поліакрилати, віск, блокспівполімери поліетилену і поліоксипропілену, поліетиленгліколь, ланолін, декстрозу, гліцерин, етанол і тому подібні або їх комбінації. Препарати IFN- $\beta$  можна отримати у вигляді композиції, що містить один або декілька інших білків, що використовуються, наприклад для стабілізації препарату IFN- $\beta$ . Наприклад, препарати IFN- $\beta$  можуть бути змішані з альбуміном.

При парентеральному введенні препарату IFN- $\beta$  частину композиції переважно складає водний розчин. Вказаний розчин повинен бути фізіологічно прийнятним, щоб не впливати шкідливим чином на електролітний і/або об'ємний баланс при

доставці необхідного препарату IFN- $\beta$  в організм потребуючого суб'єкта. Так, водне середовище для препарату IFN- $\beta$  може містити нормальний фізіологічний розчин (наприклад, 0,9% NaCl, 0,15M, pH 7-7,4). Прийнятні розчини для парентерального введення можна отримати будь-якими методами, добре відомими в фармацевтичній галузі, які описані, наприклад, в [публікації Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990].

Фармацевтичні композиції можуть бути в формі стерильного препарату для ін'єкцій, наприклад, стерильної ін'єкційної водної або масляної суспензії. Вказана суспензія може бути отримана методами, відомими в даній галузі, з використанням прийнятних диспергуючих або змочувальних агентів і суспендуючих агентів. Стерильний препарат для ін'єкцій може також являти собою стерильний ін'єкційний розчин або суспензію в нетоксичному придатному для парентерального введення розріджувачі або розчиннику, наприклад, розчин в 1,3-бутандіолі. Прийнятними наповнювачами і розчинниками, які можуть бути використані в даному винаході, є вода, розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлориду натрію. Крім того, як розчинник або суспендує середовище звичайно використовують стерильні нелеткі масла. Для вказаної мети можна використати будь-яке м'яке нелетке масло, включаючи синтетичні моно- і дигліцериди. Для отримання препаратів для ін'єкцій можна використати жирні кислоти, такі як олеїнова кислота і її гліцеридні похідні, а також природні фармацевтично прийнятні масла, такі як оливкова олія або касторова олія, зокрема, їх поліоксіетилювані форми. Вказані масляні розчини або суспензії можуть також містити довголанцюговий спиртовий розріджувач або диспергатор.

Фармацевтичні композиції, що містять препарати IFN- $\beta$ , можна також вводити перорально. Наприклад, їх можна вводити у вигляді будь-яких дозованих лікарських форм, прийнятних для перорального введення, які включають, не обмежуючись ними, капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. У випадку таблеток для перорального введення носії, що використовуються, звичайно включають лактозу і сухий кукурудзяний крохмаль. Крім того, до складу таблеток звичайно додають мастильні агенти, такі як стеарат магнію. Прийнятні розріджувачі, що використовуються для перорального введення у вигляді капсул, звичайно включають лактозу і сухий кукурудзяний крохмаль. Якщо необхідно отримати водні суспензії для перорального введення, активний інгредієнт об'єднують з емульгуючими і суспендуючими агентами. При бажанні можуть бути також додані певні підсолоджувачі, ароматизатори або барвники. Крім того, можна також використати черезшкірні пластири для місцевого застосування.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можна також вводити у вигляді аерозолів або інгаляції в ніс за допомогою розпилювача, інгалятора сухого порошку або дозуючого інгалятора. Такі композиції отримують методами, добре відомими в фармацевтичній галузі, у вигляді розчинів в фізіологічному розчині, з використанням бензилового спирту або інших прийнятних консер-

вантів, стимуляторів абсорбції, що посилюють біологічну доступність, фторвуглеців і/або інших відомих солюбілізуючих або диспергуючих агентів.

Препарати IFN- $\beta$  можна вводити у вигляді ліпосомних систем доставки, таких як дрібні одношарові пухирці, великі одношарові або багатошарові пухирці. Ліпосоми можуть бути утворені з різних фосфоліпідів, що містять холестерин, стеариламін або фосфатидилхоліні. У деяких варіантах здійснення винаходу плівку ліпідних компонентів гідратують водним розчином лікарського засобу для утворення ліпідного шару, що інкапсулює лікарський засіб, як це описано в патенті США №5262564. Ліпосоми можуть містити поверхневі молекули, які направляють їх в певні клітини або тканини. Такі модифіковані ліпосоми можна отримати методами, відомими в даній галузі.

IFN- $\beta$  або їх варіанти можуть бути також пов'язані з розчинними полімерами, що використовуються як носії лікарського засобу, що направлено доставляється. Такі полімери можуть включати полівінілпіролідон, співполімер пірану, полігідроксипропілметакриламідифенол, полігідроксietиласпанамідифенол або поліетиленоксидполілізин, заміщений пальмітоїльними залишками. IFN- $\beta$  або їх варіанти можуть бути також пов'язані з білками, такими як, наприклад, рецепторні білки і альбумін. Крім того, IFN- $\beta$  і їх варіанти можуть бути пов'язані з біорозкладальними полімерами, що використовуються для регульованого вивільнення лікарського засобу, такими як, полімер молочної кислоти, поліепсилон-капролактон, полігідроксимасляна кислота, поліортоєфіри, поліацеталі, полідигідропірани, поліціаноакрилати і перехресно зшиті або амфіпатичні блокспівполімери гідрогелів.

Препарат IFN- $\beta$  може бути також отриманий у вигляді рідкої композиції, що містить стабілізуючий агент. Стабілізуючий агент може бути присутнім в кількості від близько 0,3% до 5мас.% препарату IFN- $\beta$ . Як стабілізуючий агент можна використати амінокислоту, таку як кисла амінокислота (наприклад, глутамінова кислота або аспарагінова кислота), аргінін або гліцин. Якщо стабілізуючим агентом є аргінін-HCl, його концентрація, переважно, знаходиться в межах від 0,5% (мас/об.) до 5% і, найбільш переважно дорівнює 3,13% (що еквівалентно 150мМ аргінін-HCl). Якщо стабілізуючим агентом є гліцин, його концентрація переважно знаходиться в межах від 0,5% (мас/об.) до 2,0% і найбільш переважно дорівнює 0,52% (що еквівалентно 66,7мМ-266,4мМ і найбільш переважно 70мМ). Якщо стабілізуючим агентом є глутамінова кислота, її концентрація переважно знаходиться в межах від 100мМ до 200мМ і найбільш переважно дорівнює 170мМ (що еквівалентно 1,47%-2,94% (мас/об.) і найбільш переважно дорівнює 2,5%). У деяких варіантах здійснення винаходу концентрації препаратів IFN- $\beta$  в рідких складах знаходяться в межах від близько 30мкг/мл до близько 250мкг/мл, зокрема дорівнює 48-78мкг/мл, наприклад, близько 60мкг/мл. Вказана кількість залежить, наприклад, від питомої активності конкретного препарату IFN- $\beta$ . Дозування звичайно знаходиться в межах від близько 1 мільйона міжнародних одиниць (ММО) до близько 50 ММО,

наприклад, близько 3, 6, 9 або 12 ММО в одній дозі.

В одному варіанті здійснення винаходу амінокислотним стабілізуючим агентом є аргінін, який вводять в кислій формі (аргінін-HCl) в розчинах з рН близько 5,0. У цьому випадку переважними є полііонні наповнювачі. Рідка композиція може знаходитися в посудині, такий як шприц, в якому поверхня контактування з рідиною покрита матеріалом, інертним до IFN- $\beta$ , наприклад, силіконом або політетрафторетиленом. Переважні композиції мають значення рН від 4,0 до 7,2. У деяких варіантах здійснення винаходу розчин, що містить стабілізуючий агент, не ліофілізують і/або не піддають впливу кисневмісного газу під час отримання і зберігання.

Буфери з органічними кислотами і фосфатні буфери, призначені для використання в даному винаході для збереження показника рН в межах від близько 4,0 до близько 7,2, зокрема, від близько 4,5 до близько 5,5, наприклад 5,0, можуть бути прийнятними буферами, що отримуються з органічних кислот і їх солей, такими як цитратні буфери (наприклад, суміш моонатрійцитрату і динатрійцитрату, суміш лимонної кислоти і тринатрійцитрату), суміші лимонної кислоти і моонатрійцитрату), сукцинатні буфери (наприклад, суміш янтарної кислоти і моонатрійсукцинату, суміш янтарної кислоти і гідроксиду натрію, суміш янтарної кислоти і динатрійсукцинату), тарtratні буфери, фумаратні буфери, глюконатні буфери, оксалатні буфери, лактатні буфери, фосфатні буфери і ацетатні буфери, описані в заявці WO 98/28007.

Типові склади, які можуть бути отримані способами, описаними в заявці WO 98/38007, містять:

(i) 20мМ ацетатного буфера з рН 5,0, який переважно не був заздалегідь ліофілізований і містить IFN- $\beta$  і щонайменше один інгредієнт, вибраний з (a) 150мМ аргінін-HCl; (b) 100мМ хлориду натрію і 70мМ гліцину; (c) 150мМ аргінін-HCl і 15мг/мл сироваткового альбуміну людини; (d) 150мМ аргінін-HCl і 0,1% плуронік F-68; (e) 140мМ хлориду натрію; (f) 140мМ хлориду натрію і 15мг/мл сироваткового альбуміну людини і (g) 140мМ хлориду натрію і 0,1% плуронік F-68;

(ii) рідина з рН 5,0, яка включає IFN- $\beta$  або його варіант, 170мМ L-глутамінової кислоти і 150мМ гідроксиду натрію, причому вказана рідина переважно не була заздалегідь ліофілізована; і

(iii) 20мМ фосфатного буфера з рН 7,2, який переважно не був заздалегідь ліофілізований і містить IFN- $\beta$  і щонайменше один інгредієнт, вибраний з: (a) 140мМ аргінін-HCl і (b) 100мМ хлориду натрію і 70мМ гліцину.

Переважні композиції містять також полісорбат, наприклад, 0,005% (мас/об.) полісорбату 20.

IFN- $\beta$  або його варіант можна також вводити разом з розчинним рецептором IFN типу I або його частиною, такою як IFN-зв'язувальний ланцюг рецептора, способом, описаним в патенті США №6372207. Як вказано в даному патенті, введення IFN типу I у вигляді комплексу з IFN-зв'язувальним ланцюгом рецептора поліпшує стійкість IFN і посилює дію IFN. Вказаний комплекс може бути комплексом, з'єднаним нековалентним або ковалентним зв'язком.

Препарати IFN- $\beta$  можна отримати у вигляді сухого порошку, який може бути солюбілізований або суспендований, а також не солюбілізований або суспендований до введення потребуючому суб'єкту. Зокрема встановлено, що препарати IFN- $\beta$ , кон'юговані з полімером, наприклад, ПЕГ, є особливо стійкими в сухій формі (див., наприклад, заявки WO 00/23114 і PCT/US/95/06008).

Отримані композиції можуть містити терапевтично ефективні кількості препарату IFN- $\beta$ , тобто вони можуть містити препарат IFN- $\beta$  в таких кількостях, які забезпечують відповідні концентрації препарату IFN- $\beta$  в м'язових або інших тканинах протягом періоду часу, достатнього для запобігання, придушення, сповільнення або ослабленню постійної або прогресуючої втрати м'язової функції або надання іншої терапевтичної дії. Фахівцям в даній галузі повинно бути зрозуміло, що концентрація препаратів IFN- $\beta$  в лікарській композиції може змінюватися в залежності від ряду факторів, що включають біологічну ефективність вибраного препарату IFN- $\beta$ , хімічні властивості (наприклад гідрофобність) використовуваного препарату IFN- $\beta$ , застосованих наповнювачів, спосіб введення і передбачуваний спосіб лікування, наприклад, введення препарату IFN- $\beta$  безпосередньо в тканину або системне введення. Переважна доза може також залежати від таких змінних факторів, як стан тканин суб'єкта, міра втрати м'язової функції і загальний стан здоров'я конкретного суб'єкта. Доза може також залежати від віку, маси тіла, статі, загального стану здоров'я, обміну речовин суб'єкта, а також від сприйнятливості суб'єкта до побічних ефектів і введення препарату IFN- $\beta$  спільно з іншими лікарськими засобами. Лікуючий лікар або ветеринар може легко визначити і призначити ефективну кількість препарату IFN- $\beta$ , необхідну для запобігання, протидії або сповільнення розвитку захворювання.

Призначені дози можна вводити постійно або щодня, але в цей час вказані дози переважно вводять один, два або три рази на тиждень протягом всього часу збереження задовільної реакції (що вимірюється, наприклад на основі стабілізації і/або ослаблення симптомів захворювання за допомогою відповідних медичних маркерів і/або індексів якості життя). Дози препарату можна вводити ще рідше, наприклад, один раз на місяць. Щоб полегшити переносимість частих впливів, можна поради імплантувати напівпостійний стент (наприклад, внутрішньовенний, внутрішньочеревинний або внутрішньокапсульний).

Будь-які вищезгадані фармацевтичні композиції можуть містити 0,1-99%, 1-70% або, переважно, 1-50% препарату IFN- $\beta$  як активний інгредієнт.

При будь-якому способі введення можна використати розділені або однократні дози. Наприклад, препарати IFN- $\beta$  можна вводити один раз на день або на тиждень у вигляді однократної дози, або загальну дозу можна розділити на дві, три або чотири дози.

Препарати IFN- $\beta$  можна вводити в кількості від близько 0,001 до близько 100мг/кг маси тіла з розрахунку на одну дозу, наприклад, від близько 0,1 до близько 50мг/кг маси тіла, від близько 0,1мг/кг

маси тіла до близько 20мг/кг маси тіла або від близько 1мг/кг маси тіла до близько 3мг/кг маси тіла. Вказані дози можна вводити з інтервалами в 1-14 днів, наприклад, кожний день, через день, кожний третій день, кожний п'ятий день, один раз на тиждень або один раз на два тижні. У залежності від питомої активності препарату IFN- $\beta$  його можна також вводити в дозі від близько 10 до близько 100мг/доза, зокрема, від близько 20 до близько 50мг/доза, наприклад, близько 30мг/доза.

При обчисленні в міжнародних одиницях препарат IFN- $\beta$  можна вводити в дозі від близько 1 до 30 ММО/доза, зокрема, від 3 до 20 ММО/доза, наприклад, від 3 до 12 ММО. Переважні дози містять близько 3 ММО, 6 ММО і 12 ММО з розрахунку на одну дозу. Такі дози переважно вводять приблизно один або два рази на тиждень. Дозу, що вводиться, можна оптимізувати, наприклад шляхом введення препарату IFN- $\beta$  з подальшим визначенням концентрації препарату IFN- $\beta$  в кровотоці або локальній концентрації.

У деяких варіантах здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять у вигляді підшкірної ін'єкції, що забезпечує доставку 0,01-100мг/кг або, більш переважно, 0,01-10мг/кг IFN- $\beta$ , наприклад, пегільованого IFN- $\beta$ , протягом одного тижня, причому дві ін'єкції в дозі 0,005-50мг/кг або, більш переважно, 0,005-5мг/кг можна вводити в 0-й період часу і через 72 години. Крім того, одним способом парентерального введення є імплантація системи з повільним або відстроченим вивільненням лікарського засобу, забезпечуючої підтримку постійного рівня дози, яка описана в патенті США № 3710795.

Дози для перорального введення згідно з даним винаходом, переважно для препаратів пегільованого IFN- $\beta$ , знаходяться в межах близько 0,01-100мг/кг/доба при пероральному введенні або, більш переважно, 0,01-10мг/кг/доба при пероральному введенні. Композиції переважно отримують в формі рифлених таблеток, що містять 0,5-5000мг або, більш переважно, 0,5-500мг препарату IFN- $\beta$ . У переважному варіанті здійснення винаходу суб'єкту, страждаючому невропатією, наприклад CIDP, препарат IFN- $\beta$  вводять у вигляді внутрішньом'язових ін'єкцій. Препарат IFN- $\beta$  можна вводити один раз на тиждень. У більш переважному варіанті здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять суб'єкту один раз на тиждень в дозі близько 6 ММО. В інших варіантах здійснення винаходу потребуючому суб'єкту один раз на тиждень вводять близько 6 ММО препарату IFN- $\beta$ , причому введення необов'язково є внутрішньом'язовим.

У деяких варіантах здійснення винаходу препарат IFN- $\beta$  вводять відповідно до однієї схеми протягом певного періоду часу і потім відповідно до іншої схеми. Наприклад, суб'єкт може приймати препарат IFN- $\beta$  один раз на тиждень протягом двох місяців і потім два рази на тиждень протягом подальших місяців. Препарат можна спочатку вводити підшкірно і потім внутрішньом'язово. Відповідно до інших схем лікування дозу, спосіб введення або препарат IFN- $\beta$  змінюють при кожному подальшому введенні.

У найбільш переважному варіанті здійснення винаходу IFN- $\beta$  є препаратом AVONEX<sup>®</sup>. AVONEX<sup>®</sup> представлений на ринку у вигляді ліофілізованого порошку, що має наступний склад:

Склад з розрахунку на 1мл дозу:  
30мкг інтерферону-b-1a (6 мільйонів міжнародних одиниць (ММО))

50мМ фосфату натрію

100мМ хлориду натрію

15мг сироваткового альбуміну людини

pH 7,2

Питома активність інтерферону AVONEX<sup>®</sup> становить  $2 \times 10^8$  одиниць/мг, тобто 200 ММО антивірусної активності на міліграм білка IFN-b-1a. Потребуючий суб'єкт відновлює порошок стерильною водою до виконання внутрішньом'язової ін'єкції в 1мл дозі один раз на тиждень. AVONEX<sup>®</sup> може бути також отриманий у вигляді рідкого препарату, що має наступний склад:

Склад з розрахунку на 0,5мл дозу:

30мкг IFN-b-1a (6 мільйонів міжнародних одиниць (ММО))

20мМ ацетату (ацетат натрію і оцтова кислота)

150мМ аргінін-HCl

0,005% (мас/об.) полісорбату 20

вода для ін'єкцій

pH 4,8

Препарат може бути упакований в заздалегідь наповнений шприц. Потребуючий суб'єкт може використати шприц вручну або за допомогою автоінжектора. Препарат вводять в кількості 6 ММО (тобто 30мкг) внутрішньом'язово один раз на тиждень.

В іншому варіанті здійснення винаходу IFN- $\beta$  є препаратом REBIF<sup>®</sup>, який отримують у вигляді ліофілізованого порошку або рідкого препарату. Ліофілізований порошок має наступний склад:

Склад з розрахунку на 2,0мл дозу:

IFN-b-1a в кількості 3 ММО

маніт

сироватковий альбумін людини (HSA)

ацетат натрію

pH 5,5

Питома активність інтерферону REBIF<sup>®</sup> становить  $2,7 \times 10^8$  одиниць/мг, тобто 270 ММО антивірусної активності на міліграм білка IFN-b-1a. Потребуючий суб'єкт відновлює порошок розчином хлориду натрію (0,9% NaCl) до виконання підшкірних ін'єкцій три рази на тиждень. Рідкий препарат RELIF має наступний склад:

Склад з розрахунку на 0,5мл дозу:

6 або 12 ММО IFN-b-1a

4 або 2мг сироваткового альбуміну людини (HSA)

27,3мг маніту

0,4мг ацетату натрію

вода для ін'єкцій

Рідкий препарат, упакований в заздалегідь наповнений шприц, вводять підшкірно за допомогою автоінжектора (Rebirect) або без нього (6 або 12 ММО, що відповідає 66мкг/тиждень або 132мкг/тиждень) 3 рази на тиждень.

В іншому варіанті здійснення винаходу IFN- $\beta$  є препаратом BETASERON<sup>®</sup> (компанії Berlex), в якому IFN- $\beta$ , що має мутацію із заміною cys-17 на

ser, продукують в E. coli. Вказаний неглікозильований IFN- $\beta$  є менш активним, ніж AVONEX<sup>®</sup> або REBIF<sup>®</sup>, які продукують в клітинах CHO. Вказані препарати продають в 250мкг (8 ММО) дозах у вигляді ліофілізованих і рідких препаратів, призначених для підшкірних ін'єкцій, що вводяться через день. BETAIFERON<sup>®</sup> є ще одним комерційно доступним препаратом IFN- $\beta$ , який можна вводити підшкірно відповідно до інструкцій виробника.

Крім препарату IFN-бета і необов'язково іншого лікарського засобу потребуючим суб'єктам можуть бути також призначені лікарські засоби від невропатичних болів, наприклад антиепілептичні засоби. Двома лікарськими засобами, що найчастіше використовуються, є габапентин (нейронтин) і карбамазепін (тегретол). Альтернативно, для лікування невропатичних болів можна також використати трициклічні антидепресанти, наприклад, амітриптилін (елавіл).

Протікання хвороби і реакцію на лікарські засоби можна контролювати за допомогою клінічних досліджень і лабораторних аналізів. Ефективність лікування згідно з даним винаходом визначають за ослабленням раніше описаних ознак і симптомів захворювання і по усуненню або значному зменшенню природних побічних ефектів інтерферону (тобто симптомів, що нагадують грип, таких як лихоманка, головний біль, озноб, міалгія, втома і т.д., і симптомів, що відносяться до центральної нервової системи, таких як депресія, парестезія, порушення концентрації уваги і т.д.).

Даний винахід далі проілюстрований нижченаведеними прикладами, які не обмежують об'єм винаходу. Зміст всіх приведених посилань (включаючи наукові публікації, видані патенти, опубліковані заявки на патент) включений в даний опис винаходу як посилання.

При здійсненні даного винаходу можна використати, за винятком особливо обумовлених випадків, звичайні методи, що застосовуються в біології клітини, культивуванні клітин, молекулярній біології, трансгенній біології, мікробіології, генній інженерії і імунології, які відомі в даній галузі. Такі методи всебічно описані в науковій літературі. [Див., наприклад, нижченаведені публікації: Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> 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. патент США №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 and 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 and C.C. Blackwell, eds., 1986);

Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)].

Приклади

Приклад 1. Лікування хворих CIDP препаратом IFN- $\beta$ -1a

Хворих CIDP, що проходять курс лікування IVIg, переводять на лікування препаратом IFN- $\beta$  наступним чином.

Суб'єктів з встановленим діагнозом CIDP, що проходять курс лікування, який включає постійне введення IVIg один раз на два тижні або один раз на чотири тижні, переводять на одну з нижченаведених схем введення IFN- $\beta$ -1a за допомогою внутрішньом'язових ін'єкцій: 30мкг (6 ММО) AVONEX® один раз на тиждень; 30мкг (6 ММО) AVONEX® два рази на тиждень; 60мкг (12 ММО) AVONEX® один раз на тиждень або 60мкг (12 ММО) AVONEX® два рази на тиждень. При введенні IVIg і IFN- $\beta$ -1a в один і той же день обидва препарати вводять з проміжком часу, що дорівнює щонайменше двом годинам. Суб'єкти проходять даний курс

комбінованого лікування протягом 16 тижнів, і протягом вказаного періоду часу у них оцінюють розвиток хвороби приблизно через кожні чотири тижні. У кінці 16-й тижня хворим припиняють вводити IVIg і продовжують лікування препаратом IFN- $\beta$ -1a відповідно до схеми лікування, що раніше застосовувалася.

У випробуваних суб'єктів продовжують контролювати розвиток хвороби. Якщо суб'єкти відчували себе краще при комбінованому лікуванні, поновлюють курс лікування IVIg. Потім можна поступово зменшувати введення IVIg, скорочуючи кількість або частоту введення IVIg.

Еквіваленти

Фахівці в даній галузі повинні визнати або встановити внаслідок звичайного експериментування наявність багатьох варіантів, еквівалентних конкретним варіантам здійснення винаходу, розглянутим в даному описі винаходу. Всі такі еквіваленти входять в наведену нижче формулу винаходу.



## Список последовательностей

<110> Биоген, Інк  
 Сандрок, Альфред  
 <120> Лікування хронічної запальної демієлінізуючої поліневропатії з  
 використанням  $\beta$ -інтерферону  
 <130> ВІІ-002.25  
 <140> РСТ/US03/30532  
 <141>  
 <150> 60/414,307  
 <151> 27 вересня 2002 р  
 <160> 21  
 <170> PatentIn, версія 3 2  
 <210> 1  
 <211> 840  
 <212> ДНК  
 <213>  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (76) .. (639)  
 <400> 1  
 acattctaac tgcaaccttt cgaagccttt gctctggcac aacaggtagt aggcgacact 60  
 gtctcgtgttg tcaac atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg 111  
 Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu  
 1 5 10  
 ttg tgc ttc tcc act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga 159  
 Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly  
 15 20 25  
 ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa 207  
 Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln  
 30 35 40  
 ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac 255  
 Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp  
 45 50 55 60  
 atc cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc 303  
 Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala  
 65 70 75  
 gca ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga 351  
 Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg  
 80 85 90

51	86749	52	
caa gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc			399
Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu			
95	100	105	
ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa			447
Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu			
110	115	120	
gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt			495
Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser			
125	130	135	140
ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc			543
Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala			
	145	150	155
aag gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta			591
Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu			
	160	165	170
agg aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga			639
Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn			
175	180	185	
agatctccta gctgtgctt ctgggactgg acaattgctt caagcattct tcaaccagca			699
gatgctgttt aagtgactga tggctaattgt actgcatatg aaaggacact agaagatttt			759
gaaattttta ttaaattatg agttattttt atttatttaa attttatttt ggaaaaataaa			819
ttatttttgg tgcaaaagtc a			840

<210> 2

<211> 187

<212> Білок

<213> Людина (homo sapiens)

<400> 2

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
20 25 30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
50 55 60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
65 70 75 80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

53	86749	54
Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val		
100	105	110
Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu		
115	120	125
Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys		
130	135	140
Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser		
145	150	155
His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr		
165	170	175
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn		
180	185	

<210> 3  
 <211> 501  
 <212> ДНК  
 <213> Людина (homo sapiens)

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (501)

<400> 3	
atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag	48
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln	
1 5 10 15	
tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc	96
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu	
20 25 30	
aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg cag	144
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln	
35 40 45	
cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc cag	192
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln	
50 55 60	
aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg aat	240
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn	
65 70 75 80	
gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac	288
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn	
85 90 95	
cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc	336
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr	
100 105 110	

55	86749	56	
agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac 'ctg aaa aga tat tat ggg agg			384
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg			
115	120	125	
att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt cac tgt gcc tgg acc			432
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr			
130	135	140	
ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga ctt			480
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu			
145	150	155	160
aca ggt tac ctc cga aac tga			501
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn			
165			

<210> 4  
 <211> 166  
 <212> Блок  
 <213> Людина (homo sapiens)

<400> 4	
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln	
1	15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu	
20	30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln	
35	45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln	
50	60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn	
65	80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn	
85	95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr	
100	110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg	
115	125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr	
130	140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu	
145	160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn	
165	

57	86749	58
<p>&lt;210&gt; 5          &lt;211&gt; 15          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; Опис штучної послідовності: синтетичний          &lt;223&gt; ілюстративний олігонуклеотид</p> <p>&lt;400&gt; 5          ggcgggtggtg gcagc</p>		
		15
<p>&lt;210&gt; 6          &lt;211&gt; 5          &lt;212&gt; Білок          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt; Опис штучної послідовності: синтетичний          &lt;223&gt; лінкерний пептид</p> <p>&lt;400&gt; 6          Gly Gly Gly Gly Ser              1                    5</p>		
<p>&lt;210&gt; 7          &lt;211&gt; 15          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Опис штучної послідовності:                    синтетичний ілюстративний олігонуклеотид</p> <p>&lt;400&gt; 7          gacgatgatg acaag</p>		
		15
<p>&lt;210&gt; 8          &lt;211&gt; 5          &lt;212&gt; Білок          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Опис штучної послідовності: синтетичний сайт                    впізнання ентерокинази</p> <p>&lt;400&gt; 8          Asp Asp Asp Asp Lys            1                    5</p>		
<p>&lt;210&gt; 9          &lt;211&gt; 24          &lt;212&gt; ДНК          &lt;213&gt; Штучна послідовність</p>		

59
86749
60

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний ілюстративний олігонуклеотид

<400> 9  
 agctccggag acgatgatga caag 24

<210> 10  
 <211> 8  
 <212> Блок  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності:  
 Синтетичний лінкерний пептид

<400> 10  
 Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

<210> 11  
 <211> 1257  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Опис штучної послідовності:  
 Послідовність синтетичної нуклеотидної конструкції

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (1254)

<400> 11  
 atg cct ggg aag atg gtc gtg atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg 48  
 Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp  
 1 5 10 15

ata atg ttt gca gct tct caa gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc 96  
 Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe  
 20 25 30

cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg 144  
 Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu  
 35 40 45

aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc 192  
 Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile  
 50 55 60

cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca 240  
 Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala  
 65 70 75 80

61	86749	62	
ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa			288
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln			
	85	90	95
gat tca tot agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg			336
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu			
	100	105	110
gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa			384
Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu			
	115	120	125
aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg			432
Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu			
	130	135	140
cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag			480
His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys			
	145	150	155
gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg			528
Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg			
	165	170	175
aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac gtc gac			576
Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp			
	180	185	190
aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga			624
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
	195	200	205
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc			672
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	210	215	220
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa			720
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	225	230	235
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat			768
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
	245	250	255
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt			816
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
	260	265	270
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag			864
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
	275	280	285
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag			912
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	290	295	300

63	86749	64	
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac			960
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
305	310	315	320
acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg			1008
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
	325	330	335
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg			1056
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
	340	345	350
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg			1104
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
	355	360	365
ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac			1152
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	370	375	380
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat			1200
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
385	390	395	400
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccc			1248
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
	405	410	415
ggg aaa tga			1257
Gly Lys			

<210> 12

<211> 418

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

Послідовність синтетичного злитого білка

<400> 12

Met	Pro	Gly	Lys	Met	Val	Val	Ile	Leu	Gly	Ala	Ser	Asn	Ile	Leu	Trp
1				5					10					15	

Ile	Met	Phe	Ala	Ala	Ser	Gln	Ala	Met	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Gly	Phe
			20					25					30		

Leu	Gln	Arg	Ser	Ser	Asn	Phe	Gln	Cys	Gln	Lys	Leu	Leu	Trp	Gln	Leu
		35				40						45			

Asn	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Cys	Leu	Lys	Asp	Arg	Met	Asn	Phe	Asp	Ile
	50					55				60					

Pro	Glu	Glu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Gln	Phe	Gln	Lys	Glu	Asp	Ala	Ala
65					70					75				80	



65	86749	66
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln		
85	90	95
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu		
100	105	110
Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu		
115	120	125
Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu		
130	135	140
His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys		
145	150	155
Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg		
165	170	175
Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp		
180	185	190
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
195	200	205
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
210	215	220
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
225	230	235
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
245	250	255
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
260	265	270
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
275	280	285
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
290	295	300
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
305	310	315
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
325	330	335
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
340	345	350
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
355	360	365
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
370	375	380

67	86749	68
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
385	390	395 400
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	405	410 415

Gly Lys

<210> 13

<211> 1272

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:  
послідовність синтетичної нуклеотидної конструкції

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1269)

<400> 13

atg cct ggg aag atg gtc gtg atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg	48
Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp	
1 5 10 15	
ata atg ttt gca gct tct caa gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc	96
Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe	
20 25 30	
cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg	144
Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu	
35 40 45	
aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc	192
Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile	
50 55 60	
cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca	240
Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa	288
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln	
85 90 95	
gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg	336
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu	
100 105 110	
gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa	384
Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu	
115 120 125	
aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg	432
Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu	
130 135 140	

69	86749	70	
cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys 145 150 155 160			480
gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg 165 170 175			528
aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac ggc ggt Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly 180 185 190			576
ggg ggc agc gtc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 195 200 205			624
gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 210 215 220			672
gac acc ctc atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 225 230 235 240			720
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 245 250 255			768
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg ccg gag gag cag tac Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 260 265 270			816
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 275 280 285			864
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 290 295 300			912
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 305 310 315 320			960
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag ctg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys 325 330 335			1008
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 340 345 350			1056
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 355 360 365			1104

71	86749	72
acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc		1152
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
370 375 380		
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca		1200
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
385 390 395 400		
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc		1248
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
405 410 415		
ctc tcc ctg tct ccc ggg aaa tga		1272
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
420		

<210> 14

<211> 423

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності:

Послідовність синтетичного злитого білка

<400> 14

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

73	86749	74
Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg 165 170 175		
Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly 180 185 190		
Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 195 200 205		
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 210 215 220		
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 225 230 235 240		
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp 245 250 255		
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr 260 265 270		
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 275 280 285		
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu 290 295 300		
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 305 310 315 320		
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys 325 330 335		
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 340 345 350		
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 355 360 365		
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 370 375 380		
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser 385 390 395 400		
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 405 410 415		
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 420		

<210> 15  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний олігонуклеотид

&lt;400&gt; 15

catcatcatc atcatcat

18

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; Білок

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетична мітка 6X-His

&lt;400&gt; 16

His His His His His His  
1 5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний олігонуклеотид

&lt;400&gt; 17

tccggggggc atcatcatca tcatcat

27

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; Білок

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид

&lt;400&gt; 18

Ser Gly Gly His His His His His His  
1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Штучна послідовність

&lt;220&gt;

<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний олігонуклеотид

77 86749 78

<400> 19  
tccggggggcc atcatcatca tcatcatagc tccggagacg atgatgacaa g 51

<210> 20  
<211> 17  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид

<400> 20  
Ser Gly Gly His His His His His Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp  
1 5 10 15

Lys

<210> 21  
<211> 8  
<212> Білок  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Опис штучної послідовності:  
Синтетичний пептид

<400> 21  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

Відкрита рамка зчитування конструкції IFN- $\beta$  G162C-Ig, отриманої внаслідок прямого злиття

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

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

121 TGTCAAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG 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 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCTCTAGC 300  
L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S

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

361 CATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTACCCAGGGGAAAACTC 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. 1А

1 ATGCCTGGGAAGATGGTCTGATCCTTGGAGCCTCAAATATACTTTGGATAATGTTTGCA 60  
 M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A  
 61 GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAG 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 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCA 240  
 N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A  
 241 TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCTCTAGC 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 CATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTCACCAGGGGAAAACTC 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

## Fig. 1B

961 ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTC 1020  
 T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V  
 1021 AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC 1080  
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N  
 1081 AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAG 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 GAGGCTCTGCACAAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA 1257  
 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K \*

## Fig. 1C



Відкрита рамка зчитування конструкції IFN- $\beta$  G162C-Ig, отриманої внаслідок злиття за допомогою лінкера G4S

```

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

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

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

181 AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCA 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 ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360
  T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N

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

```

Фіг. 2А

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480  
 M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K  
 481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACCTTTACTTC 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 ACATGCCACCGTGCACAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC 660  
 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P  
 661 CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG 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 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGC 840  
 H N A K T. K P R E E Q Y N S T Y R V V S  
 841 GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTSCAAGGTCTCC 900  
 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S  
 901 AACAAAGCCCTCCCGAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGSCAAAGGGCAGCCCCGA 960  
 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

85	86749	86
961	GAACCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC	1020
	E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S	
1021	CTGACCTGCGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT	1080
	L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N	
1081	GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTC	1140
	G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F	
1141	TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA	1200
	F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S	
1201	TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAGAGCCTCTCCCTGTCT	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 *	

Фіг. 2С