



(19) **RU** (11) **2 129 437** (13) **C1**
(51) МПК⁶ **A 61 K 38/21, G 01 N 33/68**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

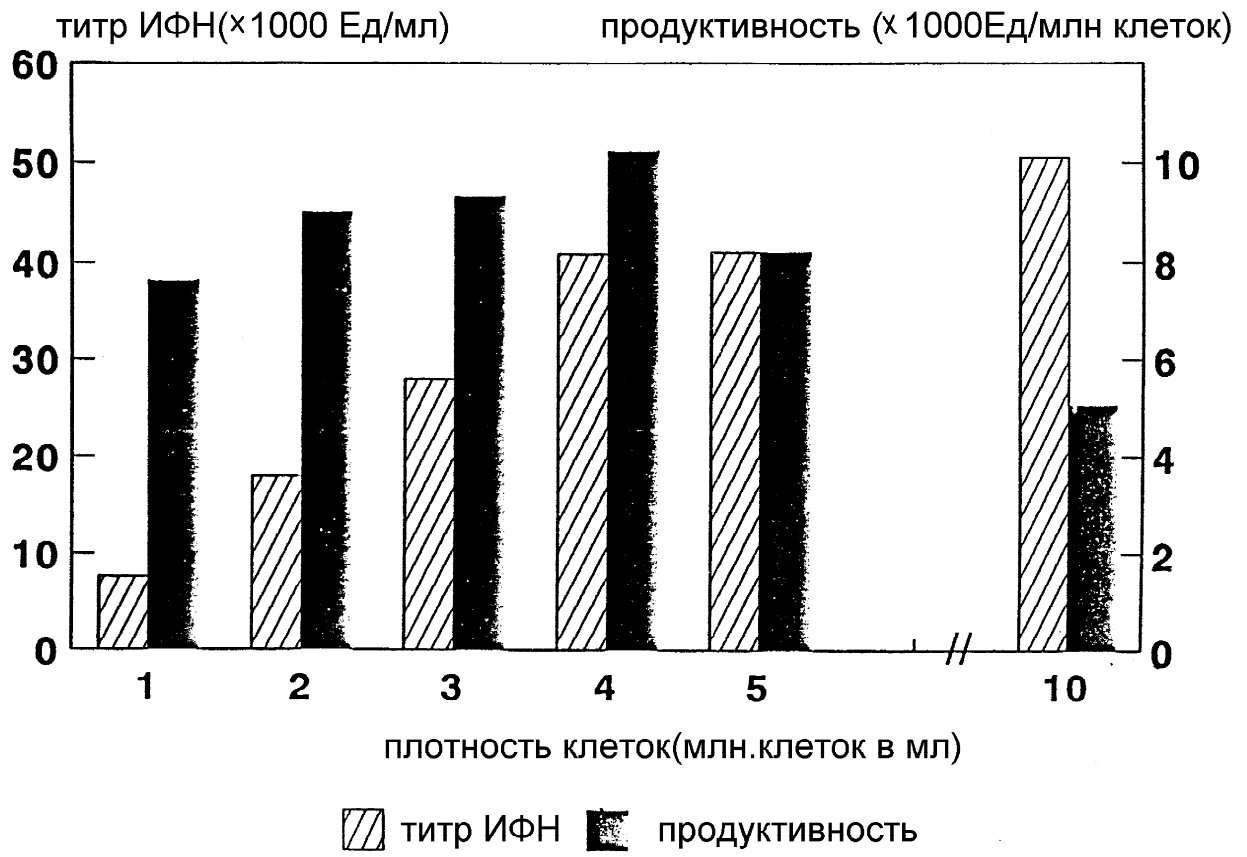
(21), (22) Заявка: **94045873/14, 09.02.1993**
(30) Приоритет: **10.02.1992 US 07/835.030**
(46) Опубликовано: **27.04.1999**
(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **EP 009702 C2, 07.12.83. JP B4 1-60780, 01.03.83. Машковский М.Д. Лекарственные средства. - Вильнюс: 1994, с.341 и 342.**
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **25.08.94**
(86) Заявка РСТ:
US 93/01135 (09.02.93)
(87) Публикация РСТ:
WO 93/16107 (19.08.93)
Адрес для переписки:
103104, Москва, Б.Палашевский пер., 3, офис 2, "Гоулинг, Страти и Хендерсон", Дементьеву В.Н.

(71) Заявитель(и):
Интерферон Сайнс Инк. (US)
(72) Автор(ы):
**Теста Дуглас (US),
Лиао Мэй-Джун (US),
Ференц-Биро Каталин (US),
Рашидбайджи Аббас (US),
Дипаоло Марио (US),
Падхи Маниша (US)**
(73) Патентообладатель(ли):
Интерферон Сайнс Инк. (US)

(54) КОМПОЗИЦИЯ АЛЬФА-ИНТЕРФЕРОНА И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:
Изобретение относится к новой улучшенной композиции альфа-интерферона, характеризующейся специфической активностью, чистотой свыше 95%, и которая при использовании для человека характеризуется значительным уменьшением побочных эффектов, обычно связанных с композициями альфа-интерферона. Описан также способ получения данной

композиции из лейкоцитов периферийной крови человека. Данная композиция альфа-интерферона может использоваться терапевтически при лечении раковых заболеваний, заболеваний иммунной системы и/или вирусной этиологии. Технический результат изобретения сводится к расширению арсенала средств нового поколения, обладающих противоопухолевой и иммуномодулирующей активностью. 3 с. и 6 з.п. ф-лы, 19 табл., 9 ил.



Фиг.1

RU 2129437 C1

RU 2129437 C1



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 129 437** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **A 61 K 38/21, G 01 N 33/68**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

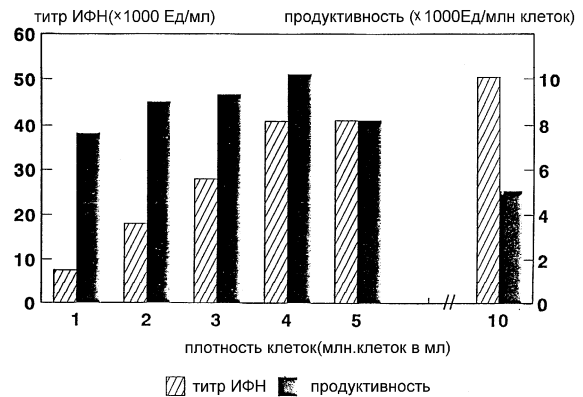
(21), (22) Application: **94045873/14, 09.02.1993**
(30) Priority: **10.02.1992 US 07/835.030**
(46) Date of publication: **27.04.1999**
(85) Commencement of national phase: **25.08.94**
(86) PCT application:
US 93/01135 (09.02.93)
(87) PCT publication:
WO 93/16107 (19.08.93)
Mail address:
103104, Moskva, B.Palasheskij per., 3, ofis
2, "Gouling, Strati i Khenderson", Dement'evu V.N.

(71) Applicant(s):
Interferon Sajns Ink. (US)
(72) Inventor(s):
Testa Douglas (US),
Liao Mehj-Dzhun (US),
Ferents-Biro Katalin (US),
Rashidbajdzhi Abbas (US),
Dipaolo Mario (US),
Padkhi Manisha (US)
(73) Proprietor(s):
Interferon Sajns Ink. (US)

(54) **ALPHA-INTERFERON COMPOSITION AND METHOD OF PREPARATION THEREOF FROM HUMAN BLOOD LEUKOCYTES**

(57) Abstract:

FIELD: clinical hematology. SUBSTANCE: composition is characterized by specific activity, purity above 95%, and, when applied on humans, by considerably reduced side effects usually associated with alpha-interferon compositions. Composition can be used therapeutically when treating cancer diseases, immune system diseases, and/or viral etiology. EFFECT: extended choice of antitumor and immunomodulating drugs. 9 cl, 9 dwg, 19 tbl, 8 ex



Фиг.1

RU 2 1 2 9 4 3 7 C 1

RU 2 1 2 9 4 3 7 C 1

В основном изобретение касается альфа (α)-интерфероновых композиций. В большей степени изобретение относится к улучшенной альфа-интерфероновой композиции, характеризующейся высокой специфической активностью и чистотой, превышающей 95%, и которая, будучи применена на людях, отличается соответствующей редукцией побочных эффектов, обычно ассоциированных с такого рода композициями. Кроме того, изобретение относится к крупномасштабному получению данной композиции с помощью лейкоцитов периферической крови человека

Альфа-интерфероны человека - это семейство более чем пятнадцати белков с антивирусной, антиростовой и иммунорегуляторной активностью [Pestka et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 56: 727 (1987)]. Терапевтическая активность альфа-интерферонов человека показана для раковых заболеваний и вирусных инфекций. Например, рекомбинантные интерфероны (ИНФ α - 2a, ИНФ α - 2b, ИНФ α - 2c), интерфероны, полученные с помощью клеточных линий (ИНФ α - n1) и лейкоцитов (ИНФ α - n3) в настоящее время используются для терапии заболеваний, вызываемых *Condyloma acuminata*, и гепатитов (Weck et al., *Am. J. Med.*, 85 (Suppl 2A): 159 (1988); Korenman et al., *Annal. Intern. Med.*; 114 : 629 (1991); Friedman - Kien et al., *JAMA*, 259 : 533 (1988)) для регрессии некоторых злокачественных новообразований [Baron et al., *JAMA*, 266 : 1375 (1991)], лечения связанной со СПИДОМ саркомы Капоши [Physicians Desk Reference, 47 th edit., eds. Medical Economics Data, Montvale, NJ, p.2194 и 2006 (1993)] и считаются перспективными препаратами для лечения синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) как самостоятельно, так и в сочетании с другими противовирусными агентами [Hirsch, *Am. J. Med.*, 85 (Suppl. 2A) : 182 (1988)].

Рекомбинантные интерфероны могут быть получены с помощью генно-инженерных технологий, например при крупномасштабном культивировании трансформированных *Escherichia coli* [Gocddel et al., *Nature*, 287 : 411 (1980); Streuli et al., *Science*, 209 : 1343 (1980)]. Однако генно-инженерные интерфероны представлены белками только одной определенной формы, которая не подвергается посттрансляционной модификации и не идентична природным интерферонам, что может ограничивать биологическую активность соответствующей композиции. Например, препараты Intron[®] A (ИНФ α - 2b) [Schering Plough], и Roferon[®] A (ИНФ α - 2a) [Hoffman - La Roche] представляют собой исключительно α -2- форму интерферона.

Интерфероны полученные с помощью природных источников, таких как лимфобластоидная клеточная линия человека Namalwa [Mizrahi, *Meth. Enzymol.*, 78 : 54 (1981); Phillips et al., *Meth. Enzymol.*, 119 : 35 (1986)] и лейкоциты периферической крови человека [Mogensen et al., *Pharmacol. Ther. Part C*, 1 : 369 (1977); Cantell et al., *Methods Enzymol.*, 78 : 29 (1981); Horowitz, *Methods Enzymol.*, 119 : 39 (1986)] представлены многими формами, каждая из которых имеет определенную структуру и биологическую активность.

Такие "природные" интерфероны по мнению некоторых исследователей способны обеспечить потенциально более лучший терапевтический эффект по сравнению с рекомбинантными белками. Например, природный альфа-интерферон может быть использован в четырехкратно меньшей дозе по сравнению с рекомбинантными для лечения заболеваний, вызываемых *Condyloma* [см., например, Physicians Desk Reference как указано выше, стр. 1879 и 2194]. Наиболее значительным преимуществом природного лейкоцитарного интерферона как терапевтического агента является его низкая иммуногенность при введении больным, нуждающимся в таком лечении. Показано, что у больных, получающих указанные выше рекомбинантные интерфероны и лимфобластоидный интерферон Wellferon[®] ИФН α - n1 [Burroughs Wellcome] образуются нейтрализующие антитела к интерферону [Loket et al., *Heratology*, 12 : 126 (1990). Jacobs et al., *J. Biol. Resp. Mod.*, 7 : 447 (1988). Weck et al., *J. Interferon Res.*, 1 (Suppl):37 (1989)]. Однако у больных, получающих лейкоцитарный интерферон (ИНФ α - n3 или частично очищенный интерферон Кэнтелла), в сыворотке крови не выявляются

антитела к интерферону [Von Wussow et al., Lancet, 2 : 635 (1987); Liao et al., J. Infect. Dis. , 165 : 757 - 760 (1992)]. Образование нейтрализующих антител к интерферону способно блокировать терапевтический эффект данных препаратов и поэтому может быть существенным фактором клинического применения интерферонов. Однако показано, что многие больные, резистентные к рекомбинантному α - интерферону, отвечают на лечение природным α - интерфероном.

Опубликованные методы получения α - интерферона из лейкоцитов периферической крови человека неэффективны и очень дороги [Mogensen et al., (1977); Cantell et al. , (1981); Horowitz, (1986), все работы указаны выше]. Метод получения природного альфа-интерферона с помощью лейкоцитов, описанный Кэнтеллом, приводит к получению относительно низкого титра интерферона (60000 ЦПДЕд/ мл) при сравнительно высокой клеточной плотности ($1 \cdot 10^7$ клеток/мл).

Известные методы очистки природного альфа-интерферона тоже имеют свои ограничения. Например, в результате использования последовательного метода преципитации достигается только частичная очистка лейкоцитарного интерферона человека при его получении в больших объемах (Cantell et al., Merh. Enzymol. , 78:499 (1981)). Полученный препарат обладает 1%-ной чистотой и состоит из многих типов интерфероновых белков.

Berg et al.[Meth.Enzymol., 78 : 487 (1981)] описали способ очистки лейкоцитарного интерферона человека с помощью моноклональных антител, конъюгированных с Сефарозой 4В. И наконец Horowitz (1986, см. выше) опубликован метод получения и очистки лейкоцитарного интерферона человека в больших объемах при использовании в качестве источника данного соединения лейкоцитов периферической крови. Исследователь применял способ преципитации Кэнтелла или аффинную хроматографию на основе антител NK2.

В настоящее время количество препаратов α - интерферона, который используется для лечения различных состояний, постоянно возрастает. Однако все препараты обладают многочисленными побочными эффектами. К ним относятся такие простудные реакции, как лихорадка, изменение формулы крови, желудочно-кишечные расстройства, например рвота и диарея, нарушение работы почек, легких, аллергические реакции, такие как спазм бронхов, анафилаксия или кожные высыпания, а также выпадение волос.

И хотя некоторые побочные эффекты сами по себе не очень серьезны, они могут вызвать существенные негативные реакции у больных, которые вынуждены принимать значительные дозы препаратов интерферона в течение длительного промежутка времени. Например, в некоторых случаях, скажем при лечении ассоциированной со СПИДом саркомой Капоши или симптоматического СПИДа, эффективная доза интерферона вызывает побочные эффекты, которые опаснее, чем проявление самого заболевания на определенной стадии. В клинических исследованиях по этим показателям больные были вынуждены отказаться от лечения из-за возникших побочных эффектов, несмотря на продолжительный положительный эффект.

Таким образом, остается потребность в разработке улучшенных α - интерфероновых композиций, которые характеризуются очень низкой токсичностью и высокой чистотой, а также вызывают минимальные побочные эффекты при соответствующей терапии.

Один аспект настоящего изобретения относится к практически чистым α -интерфероновым композициям, содержащим природную смесь α - интерферонов человека различных типов и подтипов. Более того, эта композиция характеризуется очень высокой специфической активностью, около $4 \cdot 10^8$ Ед/мг. Существенно, что такая композиция отличается способностью оказывать терапевтический эффект в отношении заболеваний человека при значительной редукции побочных эффектов, в норме ассоциированных с α -интерферонами.

Другим предметом изобретения является фармакологическая композиция, содержащая в качестве одного активного ингредиента эффективное количество α - интерфероновой

композиции, как описано выше, в сочетании с фармакологически приемлемым носителем. Фармакологическая композиция может содержать α -интерфероновую композицию в комплексе с каким-либо другим подходящим фармакологическим агентом, полезным для лечения данного заболевания или нарушения.

5 Другой аспект изобретения заключается в разработке нового метода получения описанной выше α -интерфероновой композиции с помощью лейкоцитов периферической крови. Метод отличается некоторыми оптимизированными подходами к индукции и очистке интерферона, которые позволяют эффективно и с минимальными затратами получать большие количества указанной композиции.

10 Еще одним аспектом настоящего изобретения является использование очищенной α -интерфероновой композиции, описанной выше, для лечения различных заболеваний или нарушений иммунной системы, терапии рака и/или вирусных инфекций. Эти методы лечения включают назначение заявленных фармакологических композиций как самостоятельно, так и в сочетании с другими лекарствами, соответствующим больным.

15 Другие аспекты и преимущества настоящего изобретения описаны ниже при более детальном изложении существа изобретения и предпочтительных вариантах его использования.

Фиг. 1 определяет титр интерферона и продуктивность лейкоцитов как функцию плотности клеток. Продуктивность выражается в интерфероновых ИРМА-единицах на 10^6 лейкоцитов (ИРМА - иммунорадиометрический анализ).

Фиг. 2 определяет титр интерферона как функцию индукции культурального объема 6-литровых плоскодонных флаконов.

Фиг. 3. Показан типичный профиль элюции ИФН α -п3а с хроматографической колонки, заполненной сефарозой.

25 Фиг. 4А. Показан типичный профиль элюции ИФН α -п3а с полупрепаративной C_4 -колонки (10x250 мм), полученный методом обратно-фазовой жидкостной хроматографии высокого разрешения (RP - HPLC от англ reverse - phase high performance liquid chromatography). Можно различить пики 1а, 1b и 2 - 6. На фиг. 4В для сравнения показан контрольный "беспиковый" профиль элюции, полученный тем же методом.

30 Фиг. 5 иллюстрирует взаимосвязь между биологической активностью и гидрофобностью белков в RP-HPLC - пиках.

Фиг. 6. Показана окрашенная Кумасси синим электрофореграмма, полученная при осуществлении электрофореза ИФН α -п3а в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS - PAGE) в невосстанавливающих условиях. Колонка А: положение предварительно окрашенных низкомолекулярных маркеров (Biorad). Колонка В: положение ИФН α -п3а (не фракционированного). Колонка С: RP - HPLC - пик 1а. Колонка D: RP - HPLC - пик 1b. Колонка E: RP - HPLC - пик 2. Колонка F: RP - HPLC - пик 3. Колонка G: RP - HPLC - пик 4. Колонка H: RP - HPLC - пик 5. Колонка I: RP - HPLC - пик 6.

40 Фиг. 7. Показана окрашенная Кумасси синим электрофореграмма ИФН α -п3а, полученная при осуществлении SPS-PAGE, в восстанавливающих условиях. Обозначения колонок те же, что и на фиг. 6.

Фиг. 8. Полученные с помощью иммуноокрашивания результаты Вестерн-блоттинга ИФН α -п3а в невосстанавливающих условиях. Обозначения колонок те же, что и на фиг. 6.

45 Фиг. 9. Полученные с помощью иммуноокрашивания результаты Вестерн-блоттинга ИФН α -п3а в восстанавливающих условиях. Обозначения колонок те же, что и на фиг. 6.

Настоящее изобретение относится к улучшенной α -интерфероновой композиции, которая состоит из ИФН α -п3а, способу получения данной композиции и фармацевтической композиции, содержащей ИФН α -п3а-композицию для лечения заболеваний, поддающихся терапии с помощью α -интерферона.

Композиция.

α -Интерфероновая композиция, согласно настоящему изобретению представляет

собой очищенную смесь природных α -интерферонов человека различных типов и субъединиц. Как подробно описано ниже, эта композиция отличается от других продуктов на основе природного α -интерферона, например ИФН α -п3а, более чем в два раза высокой антивирусной специфической активностью, по крайней мере в пять раз меньшей

5 загрязненностью и пирогенной активностью.
 Совокупность белков ИФН α -п3а содержит протеины различных аминокислотных последовательностей, которые могут быть определены на основе опубликованной нуклеотидной последовательности гена интерферона. Более точно, композиция на основе ИФН α -п3а состоит из смеси по крайней мере шести типов белков α -интерферона
 10 человека. На основании N-терминальной последовательности, описанной ниже, по крайней мере один тип интерферона выбирается из совокупности α 2b, α 2c или их комбинации. По крайней мере второй тип выбирается из совокупности α 4a, α 4b и/или α 1b или их комбинации. Соответственно, третий из шести типов интерферон выбирается
 15 из α 7a, α 7b и/или α 7c или их комбинации, четвертый - из совокупности α 8a, α 8b и/или α 8c или их комбинации. Пятый тип представляет собой ИФН α -10a и наконец шестой выбирается из совокупности α 17a, α 17b, α 17c, α 17d, α 21a и/или α 21b или их композиции. Последовательности всех указанных интерферонов могут быть определены на основе различных баз данных, в том числе базы данных фирмы Intel Genetics, Inc (Genbank[®] database, Intel Genetics, Inc., Mountain, View, Ca).
 20

Смесь α -п3а интерфероновых белков не содержит ИФН- α 14, ИФН α -2a и ИФН - α 1.

Описанные выше типы и подтипы α -интерферона, содержащиеся в заявленной композиции, могут быть охарактеризованы с помощью обратно-фазовой жидкостной хроматографии высокого разрешения (RP - HPLC), которая разделяет типы интерферона с
 25 соответствию с их относительной гидрофобностью, как детально описано в примере 3. Композиция на основе ИФН α -п3а имеет гидрофобность, определяемую на RP-HPLC - колонке путем элюции 40 - 60%-ным ацетонитрилом. N- и C-терминальные последовательности указанных выше типов и подтипов α -интерферона, составляющих заявленную композицию, могут быть определены, как детально описано в примере 6
 30 (разделы B и D).

Кроме того, заявленная ИФН α -п3а - композиция характеризуется по своей активности в различных биологических системах. Как подробно раскрывается в примере 4A, антивирусная активность (см., например, Linnette et al., Cancer Therapy and Control, 1:109 - 120 (1990)) тестируется на клетках человека, быка и кролика/ Антивирусная
 35 специфическая активность ИФН α -п3а, определенная на клетках быка и человека, составляет $(1-10 \cdot 10^8)$ Ед/мг и в целом равна или превышает $2 \cdot 10^8$ Ед/мг). Единица активности интерферона в данном исследовании определяется как обратная величина разведения в 50%-ной конечной точке и корректируется в соответствии с контрольным
 40 стандартом Национального института здравоохранения (Международный референс-препарат лейкоцитарного интерферона, ба 23-902-530). Средняя специфическая антивирусная активность ИФН α -п3а на клетках человека HEp-2 составляет около $(4 \cdot 10^8)$ Ед/мг.

Показано, что ИФН- α 2, представленный подтипами α 2b и α 2c, обнаруживается в
 45 пиках 1a и 1b, и на его долю приходится около 50% общей белковой массы α -п3а. Однако при раздельном исследовании пиков (см. табл. 4) данный тип интерферона отвечает только за 25% всей антивирусной активности заявленной композиции. Более того, как детально показано в примере 8, ИФН α -п3а в 10-100 раз более эффективен, чем эквивалентное количество рекомбинантного интерферона α 2, при определении in vitro
 50 их специфической активности по отношению к вирусу СПИДа на моноцитах.

Кроме того, биологическая активность интерферона определялась и по его антипролиферативному действию на клетки человека, как описано в примере 4B [(см., например, Gillis et al., J. Immunol. 12 : 2027 (1978)]. Специфическая активность

составляла (1-10) $\bullet 10^8$ Ед/мг и в целом была равна или превышала $1 \bullet 10^8$ Ед/мг. Средняя специфическая антипролиферативная активность на клетках человека линии Daudi составляла около $1,5 \bullet 10^8$ Ед/мг. Единица активности интерферона в данном исследовании определялась как обратная величина разведения в 50%-ной конечной точке.

Биологическая активность ($\geq 99\%$) заявленной композиции, определяемая в 5 антивирусном исследовании, может быть нейтрализована поликлональной антисывороткой овцы (полученной к очищенному ИФН α -п3), специфической к лейкоцитарному интерферону человека, при осуществлении стандартного нейтрализующего теста [Y. Kawada, Meth. Enzymology, 119 : 558-573 (1986)].

10 Дополнительно в пирогенном тесте, который проводили на кроликах (Пирогеновый тест. USP XXII/NF XVII, Фармакопейная Конвенция США, с. 1515 (1990)) увеличение средней температуры тела кроликов на $0,2^\circ\text{C}$ свидетельствует о чрезвычайно низкой пирогенной активности заявленной композиции. Действительно, такой результат по крайней мере в 15 пять раз меньше, чем определяемый для ИФН α -п3.

Кроме того, были определены и физические свойства заявленной композиции на основе ИФН α -п3а. Например, она отличается значительной чистотой, а именно состоит более чем на 95% из α -интерфероновых белков человека. Менее чем 5% составляют примеси, такие как α -интерфероновые белки нечеловеческой природы, нуклеиновые кислоты или ферменты, липиды и тому подобное. Точнее, заявленная композиция на 98 или более 20 процентов состоит из α -интерфероновых белков человека, а наиболее предпочтительно - примерно на 99%.

Чистота композиции определяется электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS - PAGE) и Вестерн-блоттингом, как 25 подробно изложено в примере 5. В соответствии с методом получения, описанном ниже, чистота композиции увеличивается в 800 раз в сравнении с первой стадией очистки (аффинная хроматография с помощью антител N K2) и примерно в два раза по сравнению со второй стадией очистки с помощью суперозы. В целом, общая степень чистоты ИФН α -п3а 30 примерно в 12 000 раз выше по сравнению с сырым продуктом, полученным из лейкоцитов, как подробно описано ниже.

Анализ композиции с помощью Вестерн-блоттинга (фиг. 8 и 9) в невозстанавливающих и восстанавливающих условиях соответственно показывает, что все белковые полосы идентифицируются как интерфероны человека с уровнем загрязнения 35 нефракционированного препарата около 1% или менее. Последующее фракционирование с помощью RP - HPL C приводит к тому, что какое-либо загрязнение не определяется ни в одном пике.

Двумерный анализ в геле нефракционированного ИФН α -п3а показал, что во всех образцах выявляются многочисленные пятна, распознаваемые моноклональным антителом LIT-1 (см. пример 5, часть А), свидетельствуя о том, что эти пятна - 40 интерфероновые белки. Согласно методу SDS-PAGE, примерная мол. масса композиции составляет 16-27 кДа. Кроме того, композиция характеризуется изоэлектрической точкой в диапазоне 5,0 - 7,5, более точно в диапазоне 5,5 - 6,5. Количество "пятен" и мол.масса белков каждого пика приведены в примере 5, табл. 8.

Биохимические свойства интерфероновой композиции согласно настоящему изобретению, например определяемые методом аминокислотного анализа и амино- и карбокситерминального секвенирования, подробно описаны в примере 6. Амино- и карбокситерминальное секвенирование показывает, что интерфероновая композиция 45 содержит интактные молекулы интерферона, которые состоят примерно из 165-166 аминокислотных остатков на молекулу. Кроме того, в композиции обнаружены две дисульфидные связи. 50

Далее, композиция характеризуется содержанием углеводов, например сахаров, нейтральных сахаров и сиаловых кислот. Результаты таких исследований тоже подробно описаны в примере 6В. Предложенная композиция отличается О-связанным углеводным

гликозилированием, причем среди углеводов различают галактозамин (GalN), глюкозамин (GlcN), галактозу, глюкозу, маннозу и сиаловую кислоту. В среднем, композиция содержит ≤ 6 моль сахаров на моль интерфероновых белков, точнее 1-3 моль сахара/моль интерферона. Гликозилирование ИФН α -п3а должно происходить по другому сайту, нежели остаток Asn, который отвечает за N-связанное гликозилирование, поскольку ИФН α -п3а не содержит ИФН - α 14, единственного типа α - интерфероновых белков, отличающегося потенциальной возможностью N-гликозилирования по остатку Asn. Сайт O-связанного гликозилирования определяют путем ферментативного расщепления в процессе аминокислотного секвенирования. Результаты исследования показывают, что гликозилирование происходит по остатку треонина в положении 106 (пример 6В).

Другое биохимическое свойство заявленной ИФН α -п3а-композиции включает в себя наличие связанных сайтов для моноклональных антител N K 2 (Celltech, U.K.). Согласно сообщениям антитела N K2 распознают только одну подгруппу α - интерферона, а именно α 2 (a/b/c), α 8 (a/b/c), α 10a, α 17 (a/b/c/d), α 7 (a/b/c), α 6 и α 21 (a/b). Они не распознают интерфероны α 1, α 5, α 10b, α 14 и α -омега 1. Кроме того, ИФН α -п3а-композиция имеет рН-стабильность в интервале 2-9 и стабильна к нагреванию при 56°C в течение двух и более часов.

Заявленные композиции на основе ИФН α -п3а существенно отличаются от других α -интерферонов как природных, так и рекомбинантных, которые в настоящее время поступают на рынок и используются для клинических нужд. Наиболее существенное отличие - это гораздо меньшая токсичность ИФН α -п3а по сравнению с известными α -интерфероновыми композициями. В коммерческой и специальной литературе, посвященной ИФН α -п3, отмечается, что природные α -ИФН, полученные с помощью лейкоцитов периферической крови, при тестировании на большом количестве больных обладают характерными для α -интерферонов побочными эффектами.

Другие различия между заявленной композицией и известными природными α -интерферонами показаны выше. В сравнении с известным препаратом на основе ИФН α -п3, который используется в клинических исследованиях, новая ИФН α -п3а-композиция имеет в два раза большую специфическую противовирусную активность, равную примерно $4 \cdot 10^8$ Ед/мг. Заявленная композиция имеет уровень загрязнения около 2% по сравнению с 5-10% известных продуктов. Более того, заявленная композиция имеет очень низкую пирогенную активность, около 0,2°C, в сравнении с 1°C, что характерно для известных препаратов ИФН α -п3. Кроме того, различия затрагивают и метод получения заявленных и известных продуктов.

Различия в токсичности между заявленным и рекомбинантным интерферонами еще более значимы. В дополнении к тому обстоятельству, что данная композиция содержит смесь α -интерферонов в сравнении с одним типом белка рекомбинантного продукта, природный α -интерферон не получают с помощью бактерий как рекомбинантный и поэтому он не загрязнен бактериальными белками, которые у человека могут вызывать нежелательные побочные эффекты.

Для того, чтобы убедиться в отсутствии побочных эффектов заявленной согласно настоящему изобретению композиции, в примере 7 детально описаны результаты экспериментов по определению токсичности данной композиции, которые проводились в соответствии с методикой, утвержденной ВОЗ и описанной W.B. Abrams et al., Marcel Dekker, Inc., chap 10, pp. 195-216 (1984). Такие исследования токсичности, проведенные на больных, получавших заявленную композицию в качестве терапевтического средства, практически не обнаружили у нее побочных эффектов.

В действительности, в табл. 16 показаны различия в побочных эффектах, которыми обладают известные продукты на основе α -ИФН, в сравнении с результатами клинических испытаний композиции, заявленной согласно настоящему изобретению. Эти данные показывают, что новая композиция практически не обладает побочными эффектами, что

является большим преимуществом для ее применения на больных в течение продолжительного промежутка времени. Более того, могут быть применены и более высокие дозы заявленной композиции без риска побочных эффектов в сравнении с известными α - ИФН композициями.

5 Авторам в настоящее время неизвестно, почему заявленная композиция обнаруживает такую непредвиденно высокую степень редукции побочных эффектов. Не желая быть связанными теорией, авторы считают, что причины значительного снижения токсичности и побочного действия данной композиции и вследствие этого ее большей терапевтической эффективности, могут быть основаны на том, что различные типы α - интерферона

10 человека, составляющие композицию, связываются более, чем с одним эпитопом или рецептором на клетках больного, которому назначена данная композиция. Кроме того, одной из причин неожиданных свойств заявленной композиции может быть очень низкое содержание в ней примесей.

Далее, поскольку специфическая активность композиции в антивирусных и антипролиферативных исследованиях выше, чем для других α - интерферонов, для

15 лечения больных могут использоваться меньшие дозы полученного интерферона и эти малые дозы могут быть меньше, чем токсическая доза композиции, если она вообще обладает токсическим эффектом. Кроме того, посттрансляционное гликозилирование белков композиции может способствовать дезагрегации, приводя к ослаблению побочного

20 действия. Процессинг, в то же время, может уменьшить оксидацию и химическую модификацию аминокислотных остатков α - интерфероновых белков. Углеводы α - интерфероновых белков надежно защищаются в процессе получения заявленной композиции и поэтому сходны с природными α - интерферонами человеческого организма. Указанный процесс может приводить к тому, что в заявленной композиции главным

25 образом преобладают активные α - интерфероновые мономеры и образуется небольшое количество неактивных α - интерфероновых олигомеров.

2. Способ получения композиции.

В целом способ получения α - интерфероновой композиции согласно настоящему изобретению включает как процесс индукции, так и процесс чистки. Процесс индукции

30 детально описан в примере 1, а процедура очистки - в примере 2.

В процессе индукции ИФН α - n3a образуется индуцированной вирусом Сендай суспензией лейкоцитов периферической крови (ЛПК) человека. Основными факторами, которые значительным образом влияют на количество α - n3a интерферона, который

35 образуется ЛПК, являются следующие: плотность клеток в процессе индукции, концентрация бикарбоната натрия в индукционной среде, концентрация сыворотки крови человека, свободной от гамма-глобулинов, концентрация и тип праймера, кинетика индукции, объем культур во флаконах, скорость перемешивания культур, температура индукции, состав среды, а также концентрация и свойства вируса Сендай.

В соответствии с указанным процессом индукции кровь забирают у здоровых доноров и получают ЛПК, собирая лейкоцитарную пленку и лизируя эритроциты с помощью хлорида аммония, предпочтительно 0,83%-ной концентрации. Затем лейкоциты суспендируют в среде индукции до получения желаемой плотности клеток.

Плотность клеток варьирует в интервале $(1-10) \cdot 10^6$ кл/мл. Относительная

45 эффективность продукции α - интерферона может быть выражена как количество данного белка, которое образуется в расчете на клетку при определенной плотности клеток. Авторы определили, что при возрастающей продукции α - интерферона в соответствии с увеличением плотности клеток оптимальная продукция α - интерферона ЛПК человека происходит при клеточной плотности $4 \cdot 10^6$ кл/мл. Продуктивность может быть определена

50 путем иммунорадиометрического анализа (ИРМА) [Gelltech Ltd.] или по цитопатическому действию (ЦПД), как описано ниже. В этих исследованиях титры интерферона определяются в соответствии со стандартом и выражаются в Ед/мл (для ИРМА) и МЕд/мл (международные единицы на 1 мл для исследования ЦПД). В то время как максимальный

титр интерферона (около 50000 ИРМА Ед/мл, что эквивалентно ~100000 ЦПД Ед/мл) достигается при плотности клеток в процессе индукции $1 \cdot 10^7$ лейкоцитов/мл, наиболее высокая продукция интерферона (около 43000 ИРМА Ед/мл, что эквивалентно ~86000 ЦПД Ед/мл) отмечается при плотности $4 \cdot 10^6$ кл/мл. Таким образом, продуктивность клеток при плотности 10^7 кл/мл составляет примерно половину от таковой при клеточной плотности $4 \cdot 10^6$ кл/мл (см., например, фиг. 1).

Среда индукции представляет собой минимальную необходимую среду (МЕМ) желаемой концентрации 0,5X - 1,5X, содержащую солевой раствор Эрла, pH 7,4, дополненный L-глутамином, не необходимыми аминокислотами, трицином (4,46 мг/мл) и неомидин сульфатом (24 мкг/мл). Текущие данные показывают, что наиболее высокий индукционный титр наблюдается при концентрации МЕМ 0,85X - 1,15X, которая имеет осмолярность, максимально приближенную к осмолярности физиологических жидкостей организма.

Кроме того, необходимо, чтобы среда индукции содержала сыворотку крови человека, лишенную IgG, для обеспечения продукции α -интерферона. Эффективная концентрация сыворотки составляет 0,1 - 1,5 мг/мл, более предпочтительно, 0,1 - 1,0 мг/мл. Преимущественно используется концентрация 0,4 мг/мл.

Более высокая концентрация сыворотки неэффективна для продукции α -интерферона, возможно из-за присутствия ингибирующих факторов. Оптимальная концентрация сыворотки, найденная при осуществлении описанного здесь процесса индукции, намного ниже, чем рекомендуемая концентрация, равная 2,4 мг/мл, согласно методу Кэнтелла. Использование более низкой концентрации сыворотки во время индукции существенно уменьшает загрязненность α -интерферонов сывороточными белками во время нисходящих процессов их очистки.

Процесс индукции оптимизируется добавлением некоторых других компонентов в среду. Желательно, чтобы индукционная среда содержала высокую концентрацию бикарбоната натрия (NaHCO_3) в противоположность известным методам, которые предусматривают использование этого вещества в низкой концентрации или не предусматривают вообще. Увеличение концентрации NaHCO_3 в МЕМ оказывает значительный эффект на выход интерферона (например, в 3-4 раза). Предпочтительная концентрация NaHCO_3 составляет около 0,3 - 2,5 мг/мл, более предпочтительная - 1,7 - 2,2 мг/мл. Концентрация NaHCO_3 , составляющая 2,2 мг/мл, по крайней мере в два раза увеличивает титр интерферона, полученного в соответствии с настоящим изобретением.

Другим фактором, лимитирующим продукцию интерферона ЛПК, могут быть необходимые питательные компоненты, например редкие минералы, витамины или жирные кислоты. Добавление некоторых витаминов в индукционные культуры согласно настоящему изобретению способствует увеличению продукции интерферона. Добавление витаминов С и В₃ (ниацина) по отдельности в индукционные культуры увеличивает выход интерферона на 20-30% в сравнении с культурами, не получавшими указанных витаминов. Эффективная концентрация витамина С для увеличения образования интерферона составляет 0,0002 - 2 мг/мл. Более высокие концентрации витамина С (> 2 мг/мл) ингибируют образование интерферона ЛПК. Эффективная концентрация витамина В₃ для увеличения выхода интерферона составляет 0,5 - 1000 мкг/мл. Другие соединения, например сульфат железа, масляная кислота, токоферолфосфат, токоферол, глюкоза и холестерол, не оказывают воздействия на продукцию α -интерферона или ингибируют ее.

Настоящее изобретение относится и к способу получения интерферона в больших объемах. Объем индукционной среды во флаконах может варьировать от 150 мл до 6 л или более. Объем индукционной культуры может быть увеличен до полной вместимости флаконов (или уменьшен), не влияя на выход интерферона. Более того, поскольку флаконы могут быть заполнены полностью, способ согласно настоящему изобретению позволяет увеличить выход интерферона при минимальном количестве флаконов, таким образом уменьшая стоимость процесса и расход посуды. Крупномасштабная индукция в объемах до нескольких тысяч литров может быть достигнута при использовании многослойных больших флаконов или биореакторов в описанных согласно настоящему

изобретению условиях индукции.

Сырой или очищенный лейкоцитарный α - интерферон затем добавляют в качестве праймера к суспендированным в индукционной среде ЛПК. При использовании в качестве праймера сырого и очищенного природного лейкоцитарного α - интерферона индуцируется образование сходных количеств продукта лейкоцитами. Лейкоциты могут быть праймированы в количестве 1 - 100000 МЕд/мл, предпочтительно около 10 - 100 МЕд/мл сырого α - интерферонового супернатанта или очищенного α - интерферона. Под "сырым интерфероном" понимают неочищенный продукт, полученный излагаемым здесь способом индукции. Под "очищенным интерфероном" понимают ИФН α - п3а, полученный излагаемыми здесь методами индукции и очистки.

Понятно, что в качестве праймеров могут быть использованы другие интерфероны, например β - ИФН, γ - ИФН и, возможно, другие цитокины. Например, природный γ - ИФН человека в концентрации 100 - 1000 МЕд/мл может стимулировать продукцию α - интерферона, но приводит к более низкому выходу продукта, чем при использовании в качестве праймеров сырого или очищенного природного α - интерферона.

Найдено, что оптимальное время начала праймирования примерно составляет 2-3 ч до внесения вируса Сендай при 36°C. Изменение этого времени существенным образом изменяет количество интерферона, секретлируемого лейкоцитами. Праймирование лейкоцитов менее, чем за один час до внесения вируса, снижает выход интерферона, более чем за 3 часа - вообще не приводит к каким-либо ощутимым результатам. Предпочтительно, на стадии праймирования лейкоциты в количестве 10^7 кл/мл обрабатывают 20 МЕд/мл сырого интерферона примерно за 3 часа до внесения вируса Сендай.

После праймирования в суспензию лейкоцитов добавляют вирус Сендай, важнейший индуктор интерферонов. Выход интерферона существенным образом варьирует в зависимости от различий в препаратах вируса. Например, это может быть обусловлено присутствием различных количеств дефектных интерферирующих частиц вируса Сендай в некоторых препаратах. Высокие количества этих частиц могут оказать ингибирующее воздействие на выход интерферона.

В целом, адсорбция вируса Сейдай на лейкоцитах происходит наиболее эффективно при высокой плотности клеток, указанной выше, и определенной концентрации вируса. Оптимальная концентрация вируса, необходимая для максимально эффективной индукции интерферона, должна быть определена эмпирически и обычно составляет около 50 - 500 гемагглютинирующих (ГА) единиц/мл (конечная концентрация в тканевой культуральной жидкости). Более предпочтительно, когда концентрация вируса составляет 50 - 250 ГА единиц/мл.

Продукция интерферона может быть максимизирована применением метода абсорбции/разведения, при котором концентрированные клеточные культуры разбавляются. Согласно данному методу вирус Сендай в конечной концентрации около 375 ГА единиц/мл адсорбируется на лейкоцитах при плотности клеток 10^7 кл/мл примерно в течение 1 ч и 36°C. Предпочтительно, культуры разводят в 2,5 раза индукционной средой, содержащей сыворотку без γ - глобулинов, до конечной плотности клеток $4 \cdot 10^6$ кл/мл и концентрации вируса Сендай около 150 ГА Ед/мл. При любых условиях обнаружено, что метод адсорбции/разведения примерно на 10% увеличивает титр интерферона в сравнении с тем процессом, когда данный метод не используется. Среды разведения могут быть комнатной температуры или предварительно нагрета до 36°C и могут содержать либо не содержать праймеры.

Индукцию необязательно проводить при использовании метода адсорбции/разведения. В этом случае лейкоциты при определенной клеточной плотности ($(1-10) \cdot 10^6$ кл/мл) могут быть праймированы сырым интерфероном примерно за 3 часа до внесения вируса Сендай в установленных концентрациях. Затем культуры инкубируют в течение 15-16 ч и собирают интерферон аналогичным образом.

Температура инкубации лейкоцитарных культур при осуществлении заявленного способа получения α -интерферона составляет 35 - 37°C. Однако оптимальная температура инкубации составляет 36°C. Согласно методу Кэнтелла оптимальная температура инкубации для обеспечения продукции интерферона составляет 37,5°C [Mogense et al., (1977); Cantell et al., Methods Enzymology., (1981) и Horowitz (1986), все работы указаны выше]. Тем не менее, авторы обнаружили, что температура менее 37°C приводит к увеличению выхода интерферона. Результаты индукции в тройных 6-литровых флаконах при плотности клеток (4-5) $\bullet 10^6$ кл/мл, инкубированных при 35, 36 или 37°C во время процесса индукции, показали, что инкубация при 36°C на 20-50% увеличивает выход интерферона, по сравнению с температурой 35 или 37°C.

Скорость перемешивания индукционных культур с помощью магнитной мешалки тоже является важным фактором для поддержания оптимальной аэрации и необходимого перемешивания компонентов. При скорости вращения магнитной мешалки 72 rpm из 500-мл культуральных флаконов, содержащих 4 $\bullet 10^6$ кл/мл, получают 17 000 ИРМА Ед/мл интерферона. При увеличении скорости перемешивания до 170-250 rpm количество образующегося интерферона существенно увеличивается до 30000 ИРМА Ед/мл. Таким образом, скорость перемешивания между 100 и 300 rpm, предпочтительно около 170 rpm, необходима для обеспечения максимальной продукции интерферона в процессе индукции.

Общее время инкубации после добавления вируса Сендай составляет 1-48 ч, предпочтительно 15-22 ч. После соответствующего времени инкубации при 36°C суспензию центрифугируют примерно при 2500 rpm для удаления клеток и дебриса и собирают сырой α -интерферон.

В табл. 1 приведены суммарные различия заявленного способа индукции α -интерферона (А) и описанного Кэнтеллом [Cantell et al., (1981), см. выше] (Б).

Таблица 1.

Среда индукции

А. Среда Игла MEM с добавлением солей Эрла, L-глутамина, не необходимых аминокислот, 4,6 мг/мл трицина, 24 мкг/мл неомицина при pH 7,4.

Б. Среда Игла MEM без фосфата с добавлением 3 мг/мл трицина, 24 мкг/м неомицина при pH 7,4.

NaHCO₃, сыворотка крови человека без γ -глобулинов, добавки.

А. 0,1 - 2,5 мг/мл NaHCO₃, 0,1 - 1,5 мг/мл сыворотки и витамин С или витамин В (ниацин).

Б. Только 2,4 мг/мл сыворотки.

Объем флаконов.

А. 150 мл, 500 мл, 2 л и 6 л. Объем культуры может составлять 5 - 100% вместимости флаконов.

Б. 2 л или 6 л. Объем культуры составляет менее 50% вместимости флаконов.

Плотность клеток.

А. 10^7 кл/мл на стадии праймирования и адсорбции вируса с последующим разбавлением через 1 ч после добавления вируса до 4 $\bullet 10^6$ кл/мл. Или 4 $\bullet 10^6$ кл/мл на стадии праймирования и адсорбции вируса и в течение ночной инкубации.

Б. 10^7 кл/мл.

Праймер и условия праймирования.

А. Сырой супернатант α -интерферона или очищенный α -интерферон в количестве 10 - 50 МЕд/мл; праймирование 3 ч при 36°C.

Б. Сырой супернатант α -интерферона в количестве 100 - 200 МЕд/мл, праймирование 2 ч при 37,5°C.

Вирус Сендай.

А. 125 - 500 ГАЕд/мл на стадии адсорбции вируса с последующим разведением до 50 - 200 ГА Ед/мл.

Б. 100 - 150 ГА Ед/мл.

Скорость перемешивания и условия инкубации.

А. 130 - 250 rpm; 15 - 20 ч при 36°C.

Б. Не указано; 17 ч при 37,5°C.

После индукции титр интерферона определяют с помощью ИРМА [Celltech, Berkshire, UK] или в исследовании цитопатического действия (ИПД) вируса везикулярного стоматита (ВВС) (штамм Индиана ATCC # VR-158) на эпидермальные клетки человека HEp-2 (ATCC CCL 23) согласно опубликованной методике [Linette et al. , Cancer Therapy and Control, 1 : 109 - 120 (1990)]. Титр интерферона, определяемый с помощью ИРМА, выражают в ИРМА Ед/мл или Ед/мл, а титр, полученный методом ЦПД, - в МЕд/мл (международные единицы/мл) в сравнении с лейкоцитарным стандартом Национального Института здравоохранения США (G₂ 23-902-530). В методе ИРМА в качестве детекторных антител используют радиоактивно-меченные моноклональные антитела N KA.

Основываясь на специфическом узнавании эпитопов интерферона N KA-антителами, ИРМА-титр бывает значительно ниже, чем титр, определяемый по ЦПД. Обычно ИРМА-титр сырого интерферона после индукции составляет примерно половину ЦПД-титра.

Очистка сырого интерферона.

Сырой интерферон очищают с помощью методики, подробно описанной в примере 2. Кратко, методика состоит в следующем. Во-первых, лейкоцитарные культуры, содержащие сырой интерферон после индукции, центрифугируют примерно при 2900 g в течение 15 - 20 мин или фильтруют через соответствующие патронные фильтрационные системы. Эти системы состоят, например, из престерилизованного фильтра Polygard-CR высокой эффективности, патронных фильтров с размерами пор 0,1 мкм, последовательно соединенных с фильтрами Polysep-TP с размерами пор 0,5 мкм (Millipore Corporation, Bedford, MA).

Полученный в результате указанных процедур сырой α - интерфероновый супернатант затем концентрируют в 10 - 100 раз, в основном с помощью фильтрационных систем тангенциального потока. Предпочтительно концентрирование в 50 раз. Сконцентрированный супернатант затем можно отцентрифугировать примерно при 9000 g в течение 30 мин. Однако, если фильтрация осуществляется методом коллекции, дополнительного центрифугирования не требуется.

Полученный на данной стадии сырой сконцентрированный α - интерферон подвергают первой колоночной хроматографии (аффинная колонка с N K2-антителами). С колонки препарат элюируют при pH 2 после интенсивного отмывания. В результате антительной аффинной хроматографии удаляются сывороточные белки человека и другие загрязнители. Интерферон очищается в 8000 раз и восстанавливается примерно 80 - 90% ИРМА-активности интерферона. Чистота препарата на этой стадии обычно превышает 90%.

Элюированный α - интерферон подвергают кислотной инкубации в течение 5 дней при 4°C, затем нейтрализации, концентрированию и гель-фильтрации на хроматографической колонке (колонка с суперозой 12), в результате приводящей к получению заявленной согласно настоящему изобретению композиции. Гель-фильтрация удаляет высоко- и низкомолекулярные примеси, такие как мышинный IgG, вымываемый с N K2-колонки, IgG человека, олигомеры интерферона и продукты его деградации.

Обычный профиль элюции с гель-фильтрационной хроматографической колонки показан на фиг. 3, где основной пик поглощения соответствует элюату α - интерферона. В целом, после осуществления аффинной и гель-фильтрационной хроматографии восстанавливается до 60 - 70% ИРМА-активности интерферона, а степень очистки препарата повышается примерно в 12000 раз. Окончательная чистота препарата интерферона составляет около 99% при определении и Вестерн-блоттингом, противовирусная специфическая активность оценивается в $4 \cdot 10^8$ МЕд/мг (см. пример 4А).

3. Фармацевтическая композиция и методы ее применения

Полученный согласно настоящему изобретению очищенный α -п3а-интерферон может быть использован для лечения различных заболеваний иммунной системы, рака или

вирусных инфекций. К этим заболеваниям относятся, но не ограничиваются приведенным перечнем, следующие: болезнь, вызываемая *Condyloma acuminata*, гепатит В, гепатит С, волосатоклеточный лейкоз, СПИД, саркома Капоши, синдром хронической усталости, генитальный герпес, генитальные бородавки, цервикальная дисплазия, цервикальная карцинома и вагинальная кондилома. Кроме того, полученный согласно изобретению препарат может быть использован для лечения и других заболеваний, чувствительных к α -интерферону.

Заявленные фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество α -интерферона, полученного согласно настоящему изобретению, в комплексе с фармацевтически приемлемым носителем могут быть применены для лечения больных, чье состояние поддается терапии с помощью α -интерферона.

Таким образом, терапевтические и фармацевтические композиции, заявленные согласно настоящему изобретению, содержат терапевтически эффективное количество ИФН α -п3а в смеси с фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтические композиции, имеющие антивирусную, антираковую или иммуномодулирующую активность, могут быть использованы в соответствующей форме, например в виде растворов, сиропов, эмульсий, препаратов для инъекций, таблеток, капсул, суппозиторий или препаратов для наружного применения.

Подходящие носители хорошо известны специалистам, работающим в фармакологии (см. например Практическую фармакологию Ремингтона). В качестве примеров могут служить стерильный физиологический раствор и сахара, такие как ксилитол, глицерол, лактоза и сахароза. К другим носителям относятся фосфат кальция, желатин, декстрин, агар, целлюлоза, гидроксипропилцеллюлоза (для препаратов наружного применения), нефтяной гель, полиэтиленгликоль, пектин, арахисовое масло, оливковое масло, сезамовое масло, сквален и вода.

Дополнительно, носитель или разбавитель может относиться к растворяющемуся с течением времени материалу, например глицеролмоностеарату, или глицеролдистеарату, или их смеси. Кроме этого, подходящие химические стабилизаторы могут быть использованы для повышения стабильности фармацевтического препарата.

Соответствующие химические стабилизаторы хорошо известны специалистам в данной области исследований и включают, например, лимонную кислоту и другие агенты доведения pH, хелатирующие или секвестрирующие агенты и антиоксиданты.

Состав фармацевтической композиции, содержащей ИФН α -п3а, может относиться к единичной дозе и быть приготовлен любым подходящим способом. Альтернативно, композиция может быть приготовлена в лекарственной форме, из которой активное начало медленно высвобождается *in vivo*, как известно из уровня техники. Все методы получения композиции подразумевают соединение активного ингредиента с носителем, который может состоять из одного или более вспомогательных ингредиентов.

Количество очищенного продукта, которое будет эффективно для лечения определенного заболевания или состояния, зависит от его природы и может быть определено стандартными клиническими методами. Согласно настоящему изобретению желательно определить *in vitro* цитотоксичность подлежащей лечению опухоли, а затем и на подходящей модельной системе на животных, прежде чем тестировать и использовать интерферон для терапии человека.

Методы введения препарата включают, но не ограничиваются указанными, следующие: внутрикожный, внутримышечный, интраперитонеальный, внутривенный, подкожный, оральнй, интраназальный и наружный.

Более того, может возникнуть необходимость применения заявленной фармацевтической композиции локально на каком-либо участке, нуждающемся в лечении. Это может быть достигнуто методом локальной инфузии во время хирургической операции, путем инъекции, при использовании катетеров или имплантатов (пористых, непористых, состоящих из желатиноподобного материала, в том числе мембран, например сиалястичных, или волокон). Методы локальной терапии не ограничиваются

перечисленными.

Изобретение также относится к фармацевтическим композициям на основе ИФН α - β , которые применяют в составе липосом, микрочастиц или микрокапсул. В различных вариантах изобретения использование таких лекарственных форм может оказаться полезным для обеспечения постепенного высвобождения составляющих композиции. В особом случае желательно использовать липосомы, связанные с антителами к специфическим опухолевым антигенам (например, к поверхностным клеточным антигенам нейробластомы или SCLC) [Leonetti et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2448 - 2451 (1990); Renneisen et al., J. Biol. Chem., 265: 16337 - 16342 (1990)].

Полученный согласно настоящему изобретению α -интерферон также может быть использован в соответствии с методами и в составе композиций, заявленных авторами, как самостоятельным образом, так и в комплексе с другими терапевтическими или диагностическими агентами, полезными для направленной или дополнительной терапии некоторых типов раковых заболеваний, иммунных нарушений или вирусных инфекций.

Ожидается, что ИФН α - β может быть использован в комбинации с другими агентами, например антималярийными, алкилирующими агентами, алкалоидами барвинка, антинеопластическими антибиотиками, производными платины, заменителями мочевины, адренокортикотропными стероидами, цитокинами, интерлейкинами, АЗТ, ddI, ddc, другими интерферонами, другими антивирусными или противоопухолевыми агентами или антителами.

Режим приема и дозировка эффективного количества ИФН α - β , применяемого для лечения описанных выше заболеваний, будет определяться наблюдающим врачом при учете различных факторов, которые изменяют действие лекарств, например, таких как природа заболевания, вес тела, пол, питание больного, тяжесть опухоли, продолжительность приема препарата и другие клинические факторы. Доза заявленной композиции, используемой для лечения специфических болезненных состояний, описанных выше, может варьировать в зависимости от характера болезни и ее стадии. Например, при бородавках ожидаемая доза композиции составляет 0,25 млн МЕд/бородавку ИФН α - β или менее того. Для лечения СПИДа или других заболеваний, требующих более жесткой терапии, подходящая доза может быть существенно меньше чем 30 - 36 МЕд, что установлено для принятого к использованию рекомбинантного α -интерферона. Более того, ожидаемая доза интерферона α - β для лечения таких состояний составляет примерно 1 - 15 млн. Ед.

В целом, препарат можно применять 3 раза в неделю. Другие дозы и схемы приема препарата могут быть определены одним из известных методов специалистом в данной области исследований.

Помимо терапии описанных выше заболеваний человека указанные методы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы для ветеринарных целей, в частности для лечения рака, иммунных заболеваний или вирусных инфекций лошадей, свиней, рогатого скота, собак, кошек и домашней птицы. Для лечения этих заболеваний могут быть использованы те же самые дозы интерферона, которые были указаны ранее, когда речь шла о терапии заболеваний человека.

Следующие примеры приведены лишь в целях иллюстрации и ни в каком аспекте не ограничивают заявленного изобретения.

Пример 1. Метод получения ИФН α - β , стадия индукции.

Для получения лейкоцитарной пленки используют кровь из специальных центров (утвержденных FDA), содержащую 500 единиц ЛПК человека. Эритроциты лизируют с помощью хлорида аммония (0,83%) согласно методике Кэнтелла с соавт. (Cantell et al., 1981, см. выше).

Обработанную хлоридом аммония лейкоцитарную пленку ресуспендируют в IX среде Игла MEM, содержащей соли Игла (Gibco 410 - 1500), L-глутамин, не необходимые аминокислоты, 4,46 мг/мл Трицина (Aldrich), pH 7,4, 2,2 мг/мл бикарбоната натрия (Fisher), 24 мкг/мл неомицинсульфата и 0,4 мг/мл сыворотки крови человека без γ -

глобулинов (NAB1).

Лейкоциты (10^7 кл/мл) суспендируют в среде 1 ч MEM и в качестве праймера добавляют 20 Ед/мл сырого α -интерферона. Сырой α -интерферон - это продукт, получаемый в результате процесса индукции, как здесь описано, но не подвергаемый очистке и
5 обработке HCl до pH 2 в течение пяти дней с целью инактивации каких-либо посторонних агентов или потенциальных вирусных контаминантов.

Полученную суспензию инкубируют в 6-литровых стерильных стеклянных флаконах. Лейкоциты праймируют в течение 3 ч при 36°C, а затем добавляют вирус Сендай (штамм Кэнтелла, полученный из SPA FAS Storr, CT) до конечной концентрации 150 ГА Ед/мл.

10 После одного часа инкубации для прикрепления вируса лейкоциты разводят до $4 \cdot 10^6$ кл/мл (в 2,5 раза) той же средой, содержащей сыворотку крови человека без γ -глобулинов, бикарбонат натрия, но не содержащей праймера. Затем культуры инкубируют 15 ч при 36°C, удаляют клетки и дебрис центрифугированием при 2 500 об/мин (центрифуга Векман модель J6-B) и определяют титр интерферона с помощью ИРМА или метода ЦПД, как указано выше.

Пример 2. Метод получения ИФН α -п3а, стадия очистки.

Все процедуры очистки проводят при 2 - 8°C, если не указано другой.

А. Сбор/концентрирование сырого интерферона.

20 После инкубации в течение 15 - 20 ч лейкоциты удаляют из индукционных культур, полученных как описано в примере 1, центрифугированием примерно при 2,900 g в течение 15 - 20 мин. Супернатант (сырой раствор интерферона) сохраняют, а лейкоциты отбрасывают. Если это не осуществляют немедленно, то супернатант хранят в стерилизованных контейнерах при 4°C.

25 Сырой раствор интерферона концентрируют в 50 раз, используя фильтрующую систему с тангенциальным потоком, через которую проходят соединения с мол. массой 10000 Да и менее. Концентрированный интерферон центрифугируют примерно при 9000 g около 30 мин и затем хранят при -70°C.

Б. Аффинная очистка.

30 1. Приготовление хроматографической колонки.

35 Данный метод очистки предусматривает использование моноклональных антител, специфичных к α -интерферонам человека, например антител N K2, производимых фирмой Celltech Limited (Slough, Englan). Моноклональные антитела соединяют с активированной CNBr Сефарозой 4В (например Reselute NK2) и хранят при 4°C. Размер аффинной колонки зависит от связывающей емкости аффинного геля для интерферона, которую определяют для каждого препарата. Аффинные колонки готовят, наполняя соответствующим количеством сефарозного геля, связанного с антителами, подходящие стеклянные колонки. Колонку с моноклональными антителами промывают примерно пятью объемами (имеется в виду объем колонки) фосфатного буферного раствора и затем тремя объемами раствора, содержащего 0,1 М лимонной кислоты и 0,3 М хлорида натрия при pH 2. После этого pH колонки нейтрализуют до 7,4, промывая ее тремя объемами фосфатного буферного раствора (PBS). Описанный цикл может быть повторен еще два раза.

2. Приготовление концентрированного сырого ИФН.

45 Концентрированный сырой интерферон очищают центрифугированием примерно при 17700 g в течение 60 мин и затем фильтруют через подходящий фильтровальный патрон с размерами пор 0,22 или 0,45 мкм до нанесения на колонку с моноклональными антителами.

Аффинная хроматография.

50 Примерно 150 млн единиц сырого отфильтрованного интерферона наносят на 1 мл аффинного геля. Количество единиц интерферона определяют путем ИРМА (Celltech Ltd.). Колонку промывают примерно 1,5 объемами фосфатного буферного раствора, а затем 10 объемами 20 мМ фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 50% (по объему) этиленгликоля и 1,5 М хлорида натрия. Окончательно колонку промывают 10 - 30 объемами фосфатного буферного раствора. Интерферон элюируют с аффинной колонки раствором,

содержащем 0,1 М лимонной кислоты и 0,3 М хлорида натрия (pH 2).

Восстановление аффинной колонки.

Колонку с моноклональными антителами отмывают 3 - 5 объемами фосфатного буферного раствора пока pH элюата не станет нейтральным. Для сохранения колонки ее промывают 3 - 5 объемами фосфатного буферного раствора, содержащего 0,1% азида натрия.

В. Кислотная инкубация и нейтрализация.

Элюируемый с аффинной колонки раствор интерферона (pH ~2) инкубируют при 4°C минимум в течение 5 дней. Эта стадия кислотной инкубации необходима для инактивации любых возможных посторонних агентов, таких как ВИЧ-1. После пяти дней инкубации pH раствора доводят до 7,4 - ,0 Трис-HCl (гидрокси метиламинометан). Интерфероновые белки в растворе сконцентрированы примерно до 1 - 3 мг/мл.

Г. Гель-фильтрация.

Для гель-фильтрации используют препаративную гранулированную сефарозу 12 (Pharmacia, Piscataway, NJ). Концентрированный интерферон в количестве 5% от объема колонки наносят на колонку и проводят элюцию фосфатным буферным раствором. Все фракции, содержащие основной пик с интерфероном, отбирают в стерильных условиях. Очищенный интерферон пропускают через фильтр с размером пор 0,2 мкм или менее и хранят при -70°C.

Д. Результаты.

Результаты обычной процедуры очистки показаны в табл. 2, где приведены данные об этапах очистки, общем объеме и массе белков, общей активности, которую определяют как число единиц интерферона, снятых с колонки, умноженное на 10^9 , выходе интерферона в процентах (общее число единиц ИРМА, возвращаемое на каждой стадии), специфической активности, измеряемой в миллионах единиц на 1 мг, и степени очистки. Активность интерферона определяют с помощью иммунорадиометрического анализа (Celltech, Ltd), в котором в качестве детектирующих антител используют радиоактивно-меченные антитела N K2.

Пример 3. Обратная фазовая жидкостная хроматография высокого разрешения (RP-HPLC).

В этом примере показывается, как различные формы α - интерферона в композиции разделяются в соответствии с их относительной гидрофобностью с помощью RP-HPLC [Janssen et al., J. Chromatographic. Sci., 22: 234 (1984), Stone et al., J. Chrom., 359; 203 (1986)]. Разделение достигается постепенным увеличением концентрации ацетонитрила. Менее гидрофобные молекулы интерферона элюируются в ранних пиках, а более гидрофобные молекулы - позднее.

Типичный профиль RP-HPLC-элюции получают с полупрепаративной колонки (см. фиг. 4), как описано ниже. Около 1-2 мг очищенного интерферона α -п3а фракционируют на полупрепаративной обратно-фазовой HPLC-колонке Vydac C4 (10 • 250 мм). Градиент элюции, используемый для полупрепаративных RP-HPLC-колонок C4 приведен в табл. 3. Градиент линейный и создается следующими буферами: А : 90% H₂O/10% ACN/0,1% TFA (объем/объем/вес Б : 90% ACN/10% H₂O/0,1% TFA (объем/объем/вес).

Очищенный интерферон фракционируют в виде семи пиков: 1а, 1б, 2, 3, 4, 5 и 6. Первый пик подразделяется на два частично перекрывающихся пика, т.е. 1а и 1б. Эти два пика во всех анализах характеризуют отдельно. Белки каждого пика выделяют отдельно.

В табл. 4 приведены относительные пропорции каждого пика в типичном RP-HPLC-профиле элюции.

Как показано выше, пики 2 и 4 содержат небольшое количество белка. Пик 2 в дальнейшем не был исследован на аминокислотный состав и содержание углеводов. Пик 4 в дальнейшем не был охарактеризован на содержание аминокислот с помощью HCl-гидролиза.

После лиофилизации, интерферон в каждом пике был восстановлен 25 мМ Трис-HCl-буфером при 7,0. Восстановленный материал затем собирают со всех колонок для

дальнейшего исследования.

Пример 4. Биологические исследования.

Антивирусная активность.

Исследование антивирусной активности осуществляют при использовании трех
 5 различных клеточных линий: 1) линии HEp-2 клеток человека [ATCC CCL 23], 2) клеток
 быка MDBK [ATCC CRL 6071] и 3) клеток кролика RK-13 [ATCC CCL 37]. Интерферон
 последовательно разводят в два раза в 96-луночных платах, затем добавляют клетки в
 количестве 30000 кл/лунку. После инкубации в течение ночи клетки инфицируют вирусом
 10 вирикулярного стоматита (VBS, штамм Индиана ATCC # VR-158), затем платы инкубируют в
 течение ночи еще раз. Цитопатическое действие (ЦПД) определяют с помощью микроскопа
 на фоне контроля вируса, контроля клеток и клеток, обработанных препаратом
 стандартного интерферона. Клетки окрашивают кристаллическим фиолетовым, когда в
 лунках, содержащих препарат стандартного интерферона, обнаруживается выраженное
 ЦПД. Для всех образцов 50%-ное ЦПД определяют визуально, а титр интерферона
 15 вычисляют в сравнении с лабораторными стандартами, которые были предварительно
 стандартизированы против референс-интерферона, рекомендованного Национальным
 институтом здравоохранения (Ga 23-902-530). Результаты исследований приведены в табл.
 5.

Б. Исследования по ингибированию пролиферации.

20 Исследования по ингибированию пролиферации проводили на лимфобластоидных
 клетках человека линии Daudi. В 96-луночных платах готовили последовательные
 пятикратные разведения интерферонов (100 мкл на лунку) и затем к ним добавляли
 10⁴ клеток линии Daudi на лунку (в объеме 100 мкл). После 40-часовой инкубации клетки
 обрабатывали 1,5 мкК/лунку (в объеме 25 мкл) ³H-тимидина в течение 7 ч. Поглощение
 25 тимидина определяли, собирая и отмывая клетки водой на фильтрах из стеклянного
 волокна и затем снимая показания поглощенной радиоактивности с помощью
 сцинтилляционного счетчика. Титры интерферона рассчитывали и корректировали в
 соответствии с лабораторными стандартами.

В. Результаты исследований.

30 Антивирусная и антипролиферативная активность нефракционированного ИФН α n3a и
 в составе RP-HPLC-пиков приведены в табл. 5.
 Специфическую биологическую активность определяют как число биологических единиц
 интерферона на 1 мг общей белковой фракции. Результаты, приведенные в табл. 5,
 показывают, что специфическая ЦПД-активность на человеческих клетках HEp-2 и клетках
 35 быка МДВК в каждом пике примерно одинаково. Специфическая антипролиферативная
 активность на клетках Daudi примерно в 2 раза меньше, чем антивирусная активность в
 каждом пике. При исследовании ЦПД-активности на клетках почки кролика (RK-13)
 обнаружено очень незначительное биологическое действие. Специфическая активность на
 клетках RK-13 по крайней мере в 100-1000 раз меньше, чем на клетках человека или
 40 быка. Интересно, что интерферон в составе третьего пика обладает наибольшей
 специфической активностью на клетках RK-13.

Кроме того, сведения, приведенные в табл.5, показывают, что интерферон в составе
 первых пиков элюции, таких как 1a и 1b, обнаруживает более низкую специфическую
 45 активность на клетках HEp-2, МДВК и Daudi. В данных исследованиях в пиках 1a и 1b
 выявляется только около 25%-ной всей тотальной антивирусной активности композиции
 ИФН α - n3a. Последний шестой пик элюции обнаруживает наиболее высокую
 специфическую активность. Действительно, при построении графика зависимости
 специфической активности интерферона от процентного содержания ацетонитрила в
 50 градиенте элюции (фиг. 5) обнаруживается прямая связь между увеличением
 специфической активности и относительным увеличением гидрофобности α -
 интерфероновых белков. Чем большей гидрофобностью обладает интерферон, тем
 большую специфическую активность он проявляет. Можно предположить, что более
 гидрофобные подтипы интерферона способны связываться и интерфероновыми

рецепторами с более высокой аффинностью или инициировать клеточные процессы более эффективно и вследствие этого обладать более высокой специфической активностью.

Пример 5. Физические свойства ИФН α - п3а.

Интерфероновые белки в составе семи пиков, фракционированных методом обратно-
5 фазовой жидкостной хроматографии высокого разрешения (RP-HPLC), характеризуют с помощью SDS-PAGE.

А. Одномерный SDS-PAGE.

1. Методы.

Одномерный SDS-PAGE осуществляют по методике, сходной с той, что описана Лэммли
10 [Laemmli, Nature, 277 : 680 (1970)] . ИФН α - п3а анализируют в 14,5%-ном полиакриламидном геле как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях. Полосы белка выявляют визуально путем окрашивания Кумасса синим. Вестерн-блоттинг дубликатов SDS - геля окрашивают с помощью мышиных моноклональных антител LIT-1, специфичных по отношению к α - ИФН человека и исследуют, как описано Towbin et al.,
15 Proc. Natl. Sci (USA) 76: 4350 (1979) и Haid et al., Meth. Enzymol, 96 : 192 (1983).

2. Результаты.

Данные по анализу профилей элюции с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и
восстанавливающих условиях суммированы в табл. 6 и 7 соответственно. Кроме того, на
20 фиг. 6 и 7 показаны соответствующие SDS-PAGE - профили, полученные в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, окрашенные Кумасси синим.

Данные, приведенные в табл. 6 и 7, показывают гетерогенность (наличие более одной
белковой полосы) большинства пиков. При использовании описанного метода
исследований только в восстанавливающих условиях пик 6, по-видимому, содержит одну
25 белковую полосу. Пики 1а и 1b содержат белки сходных мол. масс при исследовании как в восстанавливающих, так и в не восстанавливающих условиях. Кроме того, эти два пика, 1а и 1b, содержат один и тот же основной тип интерферона, ИФН α - 2b, как показывает частичное аминокислотное секвенирование.

Относительное количество полос интерфероновых белков в каждом пике определяют с
30 помощью лазерной денситометрии. Относительную мол. массу рассчитывают в сравнении с маркерами мол. массы.

Результаты Вестерн-блоттинга приведены на фиг. 8 и 9 для невосстанавливающих и
восстанавливающих условий соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том,
что каждая белковая полоса, выявляемая Кумасси синим, распознается моноклональными
35 антителами LIT-1. Это показывает, что все белковые полосы в каждом пике идентифицируются как α - интерфероны человека. Уровень загрязнений нефракционированного интерферона составляет около 1%. После фракционирования с помощью RP - HPLC ни в одном из пиков этот низкий уровень загрязненности не обнаруживается.

Свойства интерферона продолжают исследовать с помощью двумерного анализа в геле.

Б. Двумерный SDS-PAGE.

1. Методы.

Двумерный гель-электрофорез включает в себя изоэлектрическое фокусирование в
первом направлении и SDS-PAGE во втором направлении. В первом исследовании 50 - 10
45 мкг интерферона из каждого RP - HPLC-пика наносят на гель, состоящий из акриламида и мочевины и залитый в стеклянные трубки (2 • 180 мм). Затем белки разгоняют при постоянном напряжении 400 В в течение 16 ч, а после при 800 В в течение 1 ч. Для изоэлектрофокусирования используют амфолины (Millipore) с диапазоном pH 3 - 10. Гель из трубок выдавливают, уравнивают в буфере для образцов, содержащем SDS, и наносят на пластину 15%-ного SDS-полиакриламидного геля для анализа во втором
50 направлении. SDS-PAGE осуществляют в трис-глициновом буфере при pH 8,3 и постоянной силе тока 35 мА. Белки в гелях, исследованных с помощью двумерного SDS-PAGE, выявляют визуально путем окрашивания серебром. Интерфероновые белки

идентифицируют иммуноокрашиванием с помощью моноклональных антител LIT-1.

2. Результаты.

Результаты двумерного гель-электрофореза нефракционированного ИФН α -п3а и белков каждого RP-HPLC C-пика показывают, что во всех образцах обнаруживаются многочисленные "пятна". В образцах нефракционированного ИФН выявляется примерно 30 пятен. Все пятна распознаются моноклональными антителами LIT-1. Это свидетельствует о том, что эти пятна представляют собой интерфероновые белки. Число пятен и мол. масса белков в каждом пике суммированы в табл. 8. Изоэлектрические точки всех белков ИФН α -п3а находятся в интервале 5,0 - 7,5.

Результаты исследований, полученные с помощью двумерного SDS-PAGE для пиков 1a и 1b, очень схожи. Обнаружены незначительные различия в размере молекул и заряде. Пики могут быть элюированы по отдельности с помощью RP-HPLC благодаря некоторым, не связанным с зарядом модификациям белков. Результаты исследований остальных пиков с помощью двумерного SDS-PAGE существенно различаются между собой. Профиль каждого пика имеет свои индивидуальные особенности. В каждом пике обнаруживаются многочисленные пятна, свидетельствуя о гетерогенности популяции белков. Эта гетерогенность может быть обусловлена различиями в трансляции и/или пост-трансляционными модификациями белков.

Пример 6. Биохимические свойства ИФН α -п3а.

А. Аминокислотный состав.

Интерфероновые белки гидролизуют с помощью бн. HCl при 104°C в течение 24 ч в нагревающем устройстве Pico-Tag. Гидролизаты высушивают под вакуумом и обрабатывают 10%-ным фенилизотиоцианатом (ФИТЦ) в растворе, содержащем 70% этанола, 10% воды и 10% триэтиламина. Полученные в результате описанной процедуры ФТЦ-аминокислоты разделяют путем жидкостной хроматографии высокого разрешения на клоне Pico-Tag C18. Элюцию ФТЦ-аминокислот осуществляют при использовании 0-60%-ного линейного градиента ацетонитрила в воде, содержащей 140 мМ ацетата натрия (pH 6,4) и 0,05% триэтиламина. Поглощение ФТЦ-аминокислот измеряют при 269 нм. Данные поглощения, полученные в каждом исследовании, выражают в числовой форме и хранят в микрокомпьютере. Цистеиновый и триптофановый аминокислотные остатки не модифицируются ФИТЦ в данной реакции и поэтому не дают сигнала поглощения. Данные, заложенные в компьютере, затем анализируют на состав и количественное содержание аминокислот, используя программное обеспечение фирмы Water's Expert.

Результаты исследований аминокислотного состава α -интерферона и отдельных RP-HPLC-пиков представлены в табл. 9. Данные таблицы показывают, что в целом аминокислотный состав индивидуальных пиков сходен с таковым нефракционированного интерферона и теми типами интерферона, которые распознаются моноклональными антителами NK2. При сравнении состава каждого пика с теоретическим составом специфических подтипов α -интерферона, идентифицированных с помощью N-терминального секвенирования, выявлялось совпадение в пределах одной аминокислоты. Эти данные строго подтверждают идентичность основных подтипов интерферона, выявляемых N-терминальным секвенированием.

Б. N-терминальное аминокислотное секвенирование.

Процедуру N-терминального аминокислотного секвенирования осуществляют методами, сходными с известными [Edman, Acta. Chem. Scand. 4: 283 (1950); Edman et al., Eur. J. Biochem., 1: 80 (1967)].

Примерно 500 пмоль белка каждого пика наносят на прециклизованный фильтр и секвенируют в течение 30-35 циклов. Процедуру проводят при использовании секвенатора Applied Biosystems ABI - 470A, оснащенного последовательным фенилгидантионным аминокислотным анализатором. Методика секвенирования основана на процессе деградации, разработанном Эдманом.

N-терминальное секвенирование по Эдману высокоэффективно в целях идентификации и количественного определения остатков аминокислот в относительно коротких пептидных

последовательностях (то есть, менее 20). Однако для длинных последовательностей (более 30 аминокислот) идентификация аминокислотных остатков, близких с С-концу белка или полипептида, становится недостоверной. Такое увеличение неточности анализа обусловлено повторным выходом, который намного меньше 95% и поэтому приводит к кумулятивной потере сигнала в каждом дополнительном цикле.

По этой причине белки в пиках 1а и 1b расщепляют гидролизом по метиониновому остатку с помощью CNBr для подтверждения их принадлежности к подтипам ИФН- α 2. Расщепление осуществляют путем растворения белков ИФН- α 2 в 70%-ной муравьиной кислоте и последующего добавления CNBr до концентрации 1М, и затем инкубируя смесь при 4°C в течение 24 ч. Реакцию расщепления останавливают скоростной лиофилизацией под вакуумом, что удаляет из реакционной пробирки все растворители, включая CNBr. Высушенные CNBr-фрагменты белков растворяют в 10%-ной трифторуксусной кислоте (TFA) и наносят на колонку C18 (0,2 • 25 см, Phenomenex). Элюцию фрагментов осуществляют в многоступенчатом градиенте 0,1% TFA/H₂O (растворитель А) и 0,1% TFA/ацетонитрил (раствор Б) при скорости потока 0,2 мл/мин. Многоступенчатые линейные градиенты используют, как описано ниже: 1) 0-40%-ный растворитель Б в течение 60 мин; 2) 40-60%-ный растворитель Б в течение 50 мин; 3) 60-100%-ный растворитель Б в течение 13 мин и 4) постоянно 100%-ный растворитель Б в течение дополнительных 5 мин. Элюируемые фрагменты выявляют при постоянном наблюдении величины поглощения при 214 нм. Распавшиеся фрагменты секвенируют, как описано выше.

Расщепление приводит к образованию шести фрагментов, которые распадаются при осуществлении RP - HPLC. Пик, элюируемый в интервале 75-80 мин, секвенируют и в нем обнаруживаются две последовательности. Одна последовательность может быть линейаризована с CNBr-фрагментом NK2, состоящим из аминокислот в положениях 22-59 ИФН α - 2b, в то время как вторая последовательность может быть линейаризована с CNBr-фрагментом N 5, состоящим из аминокислот в положениях 112-148 ИФН- α 2b.

3. Результаты.

N-терминальные аминокислотные последовательности нефракционированного ИФН α - n3a и фракционированных RP-HPLC-пиков представлены в табл. 10. Результаты исследований показывают, что нефракционированный α - ИФН так же, как индивидуальные пики, содержит многочисленные последовательности. Все они могут быть идентифицированы как определенные типы α - интерфероновых белков человека. Основные последовательности каждого пика показаны в табл. 11.

Как свидетельствуют результаты N-терминального секвенирования, обнаружено 18 потенциально возможных подтипов ИФН α - n3a. Выявленные последовательности соответствуют подтипам интерферона, распознаваемым моноклональными антителами NK2, как показано фирмой Celltech, Ltd. ИФН- α 2b и α 8 (a/b/c) - это основные подтипы, выявляемые в ИФН α - n3a. ИФН - α 2b преимущественно обнаруживается в пиках 1а и 1b и в небольших количествах - в пике 2 ИФН α - 2с в следовых количествах выявляется в пике 1а. ИФН - α 8 (a/b/c) преимущественно обнаруживается в пиках 4 и 6.

Другие подтипы интерферона, которые присутствуют в меньших количествах, - это интерфероны α 4 (a/b) и/или α 16, выявляемые в пике 2. Подтип α 10a обнаруживается в пике 3, α 16 в следовых количествах - в пике 2. Подтипы α 17 (a/b/c) и α 21 (a/b) преимущественно обнаруживаются в пике 5 и в следовых количествах - в пике 4. Интерфероны α 7 (a/b/c) преимущественно выявляются в пике 5. Поскольку аминокислотный анализ осуществляется в течение 30-45 циклов, трудно различить некоторые подтипы интерферона, которые в этих 30-35 циклах имеют идентичные последовательности. Опубликованные данные по N-терминальному секвенированию всех подтипов α - ИФН человека показывают, что ИФН - α 21 (a/b) и α 17 (a/b/c) имеют сходные N-терминальные последовательности до аминокислоты в положении 33), α 4 (a/b) и α 16 - тоже до аминокислоты в положении 33, а ИФН- α / 2b сравним с α 2с. Таким образом, некоторые минорные подтипы ИФН не могли быть выявлены из-за ограничений

аминокислотного анализа.

Небольшие различия, которые обнаруживаются в аминокислотных последовательностях индивидуальных интерфероновых белков, могут быть обусловлены различиями белковых молекул подтипов α -ИФН или аллельностью генов. Последнее может привести к

5 появлению сходных белков с аминокислотными модификациями в определенном участке.

Полученный интерфероновый продукт далее анализируют на содержание подтипов ИФН - α 2. Как сообщалось предварительно, известны три подтипа ИФН - α 2, а именно ИФН - α 2a, ИФН α - 2b ИФН - α 2c.

10 Различия в N-терминальных последовательностях этих трех подтипов ИФН - α 2 выявляются в циклах 23 и 34 и представлены в табл. 12.

Данные по секвенированию интактных белков и CNBr-фрагмента # 2 для пиков 1a и 1b до 35 цикла (табл. 9) показывают, что ИФН - α 2b - это основной компонент, обнаруживаемый в RP - HPLC-пиках 1a и 1b. Аминокислоты, высвобождаемые в циклах 23 и 34, представляют собой аргинин (Arg) и гистидин (His) соответственно, что

15 согласуется с известными данными о последовательности ИФН α - 2b. Не обнаружено заметного высвобождение лизина (Lys) в цикле 23, свидетельствуя о том, что ИФН - α 2a не выявляется в пиках 1a и 1b или в каком-либо другом RP - HPLC-пике ИФН α - n3a.

Полученные результаты верифицируют пептидным картированием и N-терминальным секвенированием белковых последовательностей, высвобождаемых в результате

20 расщепления CNBr. Более того, для выявления ИФН - α 2c CNBr-фрагмент, расположенный между Arg в положении 22 и Met в положении 60, изолируют и расщепляют трипсином. Полученные пептиды разделяют путем RP - HPLC и секвенируют. Количественный анализ последовательностей показывает, что более чем 90% ИФН- α 2 в ИФН α - n3a

25 представляет собой ИФН - α 2b. ИФН - α 2c может содержаться в полученном препарате, однако его концентрация ниже определяемого уровня.

В. Содержание углеводов.

Образец интерферонового белка (150 мкг) диализуют в соотношении 2 log против 0,1 M уксусной кислоты и его объем уменьшается до 300 мкл. Сконцентрированный образец

30 разделяют на три равные аликвоты и упаривают досуха. Полученные образцы затем гидролизуют следующим образом: 1) в 2M трифторуксусной кислоты (TFA) при 100°C в течение 4 ч для определения нейтральных сахаров, 2) в 6 н. HCl при 100°C в течение 4 ч для определения аминсахаров или 3) в 0,1 н. HCl при 80°C в течение 1 ч для

35 определения сиаловых кислот. Гидролизаты упаривают досуха, добавляют к воде, которая предназначена для использования в HPLC, и быстро прогревают до 80-100°C для облегчения растворения.

Растворы моносахаридов, а именно углеводные стандарты, содержащие 2,5 мкг/мл глюкозы, галактозы, глюкозамина, галактозамина, фукозы и маннозы, приготавливают на

40 HPLC-воде. Для разделения моносахаридов используют систему Dionex® HPLC, оснащенную анионообменной колонкой CarboPac® HA1. Пульсовой амперометрический детектор уравнивают 19 mM NaOH при скорости потока 1 мл/мин и затем постколоночным стабилизатором (post column stabiiizer) 0,5 M NaOH при скорости потока 0,5 мл/мин в течение 2 ч 90 мкл стандарта или образца вводят в систему посредством

45 автоматического инъектора и сахара элюируют в равновесных условиях с помощью 19 mM NaOH.

Стандартный раствор сиаловых кислот в концентрации 2,5 мкг/мл готовят на HPLC-воде. Сиаловые кислоты элюируют при использовании той же самой системы Dionex® HPLC, как описано выше. Пульсовой амперометрический детектор уравнивают 250 mM NaOH. 90

50 мкл стандарта или образца гидролизата вводят в систему и элюируют в равновесных условиях с помощью 250 mM NaOH.

Содержание углеводов вычисляют как отношение молей сахара к молям α -интерферонового белка.

Результаты исследований по содержанию углеводов для аминсахаров, нейтральных

сахаров и сиаловых кислот приведены в табл. 13.

Для нефракционированного ИФН α - п3а так же, как и для всех индивидуальных пиков, содержание углеводов составляет 1-3 моль сахара на моль интерферона. Пики 1а и 1b содержат наибольшее количество углеводов по сравнению с пиками поздней элюции. Пик 6, иными словами ИФН - α 8 (a/b/c) содержит наименьшее количество углеводов. В поздних пиках с 3 по 6 не определяется содержание маннозы или сиаловых кислот. Это обстоятельство связано с гидрофобностью белков. Низкое содержание углеводов приводит к их более высокой гидрофобности и поэтому такие белки элюируются на поздних этапах RP - HPLC. Для белков второго пика данные не получены из-за низкого содержания в них исследуемого материала.

В другом эксперименте для определения сайта гликозилирования примерно 100 мкг белка пиков 1а и 1b денатурируют, восстанавливают и алкилируют. Затем препарат переваривают с помощью эндопептидазы V8, расщепляющей белки в месте расположения глутаминовой кислоты, при соотношении 1:100 (энзим:субстрат). Полученные V8-фрагменты разделяют с помощью HPLC и собирают фракции, которые затем гидролизуют для высвобождения углеводов и анализируют на их содержание. Основное количество углеводов содержат фракции 52-53. Соответственно эти фракции подвергают N-терминальному секвенированию.

Секвенирование позволяет установить, что на N-терминальном участке пептида ИФН - α 2 приблизительно в положении 97-110 расположена последовательность AXVIQGVGVXETP [SEQ ID N 0:1], где первый X возможно соответствует С, а второй - Т. Эту последовательность получают расщеплением ИФН α - 2b по сайту E96 с помощью эндопептидазы V8. Потеря сигнала, соответствующего Т в положении 106, в то время как Т в положении 108 явным образом обнаруживается, свидетельствует о том, что Т в положении 106 может быть модифицирован в результате О-связывания углеводов. Таким образом, треонин 106 идентифицируется как сайт гликозилирования ИФН - α 2 (b/c).

Г. Карбокситерминальные аминокислотные последовательности.

Белки пиков 1а и 1b анализируют методом секвенирования для определения карбокситерминальных последовательностей при использовании карбоксипептидазы Р. Карбоксипептидаза Р гидролизует белки более быстро и практически не отдает предпочтение какой-либо аминокислоте. Интерференовые белки пиков 2-6 не анализируют из-за низкого содержания исследуемого материала.

Образец белка (10-30 мкг) диализуют против 50 мМ ацетата натрия при pH 5,5. Карбоксипептидазу Р добавляют в соотношении энзим:протеин 1:100 (по весу). Полученную смесь инкубируют при 37°C и отбирают аликвоты через 0,5, 1,2, 5, 10 и 60 мин. Каждую процедуру переваривания и анализа повторяют по меньшей мере дважды.

Высвобождаемые на каждом временном промежутке аминокислоты обрабатывают О-фатальдегидом (ОФА) в растворе, содержащем 2% SDS/0,4 М бората лития, в течение 30 с. Производные аминокислот разделяют на обратно-фазовой колонке Pico-Tag C18, используя метаноловый градиент против водного буфера, содержащего ацетат натрия и тетрагидрофуран. Идентификацию и количественное определение высвобождаемых аминокислот проводят в сравнении с HPLC-профилем ОФА-производных стандартных аминокислот.

Результаты С-терминального секвенирования ИФН α - п3а, RP - HPLC-пиков и подтипов α - ИФН суммированы в табл. 14.

Последовательности идентифицируют на основе порядка появления и расположения отдельных аминокислотных остатков. Например, глутаминовая кислота появляется и располагается раньше, чем другие и, следовательно, она является первым аминокислотным остатком С-конца. В других циклах последовательности выявляются по аналогичному принципу. В случае нефракционированного α - ИФН, основная С-терминальная последовательность определяется как Leu-Arg-(Ser/Arg)-Lys-Glu [SEQ ID NO: 2].

Для сравнения теоретически ожидаемые последовательности подтипов α - ИФН тоже представлены в табл. 14. Результаты исследований показывают, что основная С-концевая последовательность для пиков 1а и 1b так же, как и для нефракционированного интерферона, сходна с таковой ИФН - α 2b. Это свидетельствует о том, что нефракционированный интерферон и белки пиков 1а и 1b содержат интактную карбокситерминальную последовательность. Используемый здесь метод С-терминального секвенирования значительно менее чувствителен, чем N-терминальное секвенирование. Какие-либо минимальные различия в последовательностях могут быть и не обнаружены. Например, С-терминальная последовательность ИФН α - 8 (Leu-Lys-Ser-Lys-Glu [SEQ ID NO:3] не выявляется в присутствии основной С-терминальной последовательности ИФН - α 2b (Leu-Arg-Ser-Lys-Glu) [SEQ ID NO:4] при том, что эти две последовательности различаются только в цикле -4. Присутствие минорных интерфероновых компонентов с редуцированными С-концами не выявляется, если содержание этих компонентов составляет менее 20%.

Пример 7. Стадия 1 исследований токсичности.

Первую стадию исследований токсичности ИФН α - п3а проводят на 20 добровольцах с асимптоматической ВИЧ-инфекцией, в крови которых содержание CD4⁺ Т-клеток составляет $\geq 400/\text{мм}^3$. Композиция ИФН α - п3а до соответствующего дозированного разведения содержит 5 МЕд/мл ИФН α - п3а в 3,3 мг фенола, 1 мг альбумина человека, PBS, pH 7, 8,0 мг/мл NaCl, 1,74 мг/мл двухосновного фосфата натрия, 0,2 мг/мл моноосновного фосфата калия и 0,2 мг/мл хлорида калия.

Эту композицию применяют подкожно 3 раза в неделю (понедельник, среда и пятница) в течение 3-6 месяцев в следующих дозах: 5 человек по 1 млн. МЕд/дозу, 10 человек по 2,5 млн. МЕд/дозу в течение первой недели и затем 5 млн. МЕд/дозу и 5-и больным вводят их максимально толерантную дозу. Больных наблюдают в клинике в течение первой недели проведения лекарственной терапии.

Результаты исследований приведены ниже в табл. 15. ИФН α - п3а обладает хорошей толерантностью при дозах $\leq 17,5$ млн. Ед. По-существу, не наблюдалось лихорадки или простудоподобных симптомов, признаков желудочно-кишечных заболеваний, а также кожных высыпаний. Лабораторные исследования общего количества лейкоцитов, гранулоцитов и тромбоцитов показали результаты, лежащие в пределах нормы, в соответствии с требованиями ВОЗ. У большинства больных обнаруживались дополнительные маркеры α -интерфероновой активности (увеличенная экспрессия антигенов главного комплекса гистосовместимости класса 1 на поверхности лейкоцитов крови, индуцирования α - ИФН экспрессия генов).

Частота возникновения побочных эффектов и аномалии лабораторных исследований, о которых сообщалось в отношении рекомбинантного α - интерферона, не наблюдались для эквивалентных доз заявленной согласно настоящему изобретению композиции. Эта необходимая безопасность и толерогенность в сочетании с убедительным доказательством *in vitro* антивирусной активности менее очищенного продукта, ранее используемого в клинических исследованиях и описанного как ИФН α - п3 [см. Alferon A, вкладыш, прилагаемый к упаковке, Interferon Sciences, Inc., New Jersey], свидетельствует о возможности использования в терапии заявленной композиции как эффективного и в достаточной степени безопасного антивирусного средства.

Для того, чтобы показать поразительные преимущества заявленной композиции (ее чрезвычайно низкую токсичность) над другими известными α - интерфероновыми композициями, результаты экспериментов по исследованию токсичности в сравнении со многими другими описанными препаратами ИФН - α (природными, рекомбинантными и полученными с помощью клеток) приведены в табл. 16. Для облегчения сравнения ИФН α - п3а сравнивают с несколькими α - ИФН, так же как и с β - и γ - интерферонами, описанными по отдельности в ниже приведенных источниках информации. В табл. 16 номера ссылок соответствуют следующему списку:

1. G.M. Scott et al., British Medical Journal, 282: 1345 (1981).
2. S.L.Sacks et al., Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 21: 9 (1982).
3. J.H.Schiller et al., J. Clinical Investigation, 86: 1211 (1990).
4. S. Ingimarsson et al., J. Infection Disease, 140: 560 (1979).
- 5 5. H.C.Lane et al., Annals of Internal Medicine, 112: 805 (199).
6. R.Kurzrock et al., J. Clinical Oncology, 4: 1101 (1986).
7. R.J.Spiegel, Clinical Overview of alfa-ИФН, page 627 (1987).
8. T.Taguchi, Cancer, 57: 1705 (1986).
9. R.M.Bukowski et al., Cancer Research, 51: 836 (1991).
- 10 10. H.G.Klingemann et al., Blood, 78: 3306 (1991).
11. Roferon® A, PDR 2006 (1993).
12. Intron® A PDR 2194 (1993).
13. R.J. Wells et al., J. Interferon Res., 8: 309 (1988).
14. G.J.Jones et al., Canser, 57: 1709 (1986).
- 15 15. Alferon® N Injection, Package Insert.

Пример 8. Активность интерферона α - п3а в отношении ВИЧ-1.

Известно, что интерфероны как *in vivo*, так и *in vitro* обладают антивирусной активностью. Типы ИФН α - п3а тестируют на антивирусную активность в серии экспериментов с вирусом иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1). Относительную активность ИФН α - п3а сравнивают с активностью двух рекомбинантных форм альфа-интерферона (ИФН α -/ 2а и ИФН α - 2b).

А. Клеточная культура и исследования обратной транскриптазы.

Клетки, используемые в этих исследованиях, представляют собой нормальные моноциты человека, полученные из фракции мононуклеарных периферических клеток, серонегативных в отношении ВИЧ и вируса гепатит В доноров. Клетки получают в результате забора лейкоцитов, очистки и подсчета мононуклеаров из обогащенной лейкоцитами фракции клеток крови с помощью проточной центрифуги, оснащенной элютриатором. В клеточной суспензии обнаруживается более 98% моноцитов, которые культивируют в виде прикрепленного монослоя ($1,5 \cdot 10^5$ кл/мл) в среде DMEM (Gibco, Grand Island, N J) с добавлением 10%-ной инактивированной нагреванием сыворотки крови человека, содержащей альбумин, 50 мкг/мл гентамицина и 1000 Ед/мл высокоочищенного рекомбинантного макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF, FAP-809, Cetus Corp., Emeryville, CA). Во всех компонентах культуральной среды при тестировании не обнаружена контаминация эндотоксинами.

Прикрепившиеся моноциты культивируют в течение 7 дней в отсутствие интерферона до внесения тропного по отношению к этим клеткам ВИЧ-1 штамма АДА. Инфицированные клетки инкубируют до четырех недель в отсутствие или при добавлении интерферона. Культуральную среду наполовину заменяют каждые 2 - 3 дня.

Интерферон, используемый в этих экспериментах, имеет различное происхождение и, следовательно, его предварительно титруют против других вирусов, а именно вируса везикулярного стоматита (VBS), методом ЦПД с помощью клеток MDBK. При этом для описываемых исследований титр интерферона в антивирусных единицах должен соответствовать титру интерферона в единицах на мл культуры.

Когда ИФН добавляют в одно время с вирусом или непосредственно перед ним, обнаруживается дозозависимое ингибирование продукции ВИЧ под влиянием интерферона.

В указанных экспериментах для количественного определения уровня вирусной экспрессии используется обратная транскриптаза ВИЧ-1 из реплицирующихся клеточных культур. Жидкие пробы культуральной среды собирают в различные временные промежутки и затем добавляют в реакционную смесь, состоящую из 0,05%-ного Нонидета Р-40 (Sigma Chemical Co), 10 мкл/мл поли(А), 0,25 ЕД/мл одного (dТ (Pharmacia, Piscataway, NJ), 5 мМ дитиотреитола (Pharmacia), 150 мМ КССl, 15 мМ MgCl₂ и ³H-dТТР (2 Ки/ммоль Amersham Corp., Arlington) в трис-НССl-буфере (рН 7,9) и оставляют на 24 ч

при 37°C. Поглощенную радиоактивность преципитируют холодной трихлоруксусной кислотой, отмывают и собирают с автоматического харвестера клеток (Skatron Inc., Sterling, VA на стеклянные фильтровальные диски. Уровень радиоактивности измеряют на жидкостном сцинтилляционном счетчике.

5 Б. Сравнительное действие интерферонов на ВИЧ-1 ADA, которым инфицированы культуры моноцитов.

Дозависимые эффекты ИФН α - п3а исследуют *in vitro* на ВИЧ-1-инфицированных моноцитах в сравнении с двумя другими известными препаратами, а именно рекомбинантным ИФН α - 2а (Roferon® A, Hoffman-La Roche, Nutley) и рекомбинантным ИФН α - 2b (Intron® A, Schering Plough, Kenilworth, NJ). Возрастающие дозы интерферона (0 - 500 Ед/мл) добавляют к моноцитам, инфицированным ВИЧ-1_{ADA} (множественность заражения составляет 0,01) и инкубируют в течение 12 дней. Результаты исследований представлены в табл. 17. Они представляют собой усредненные данные трех экспериментов и показывают, что от дозы к дозе ИФН α - п3а увеличивает свою ингибирующую активность в отношении ВИЧ-1-инфицированных моноцитов по сравнению с двумя другими препаратами рекомбинантного интерферона.

Эти эксперименты повторяли много раз для получения достоверных результатов. Полученные данные суммированы в табл. 18.

20 Приведенные результаты свидетельствуют о том, что ИФН α - п3а в 10 раз более эффективен, чем ИФН α - 2b, и примерно в 100 раз более эффективен, чем ИФН α - 2а, в данных исследованиях. Это наблюдается даже после приведения относительной концентрации интерферонов каждого препарата к тому же самому титру, который был определен в исследованиях ЦПД, как описано выше.

25 В. Исследование активности ИФН α - п3а в отношении ВИЧ-1.

В качестве препаратов ИФН α - п3а, обладающих повышенной активностью в отношении инфицированных ВИЧ-1 культур моноцитов, используют фракционированные пики ИФН α - п3а, полученные с помощью обратно-фазовой HPLC. ИФН α - п3а фракционируют на RP-HPLC-колонке, как описано выше, и каждый пик, содержащий активность ИФН, титруют на антивирусную активность (по отношению к ВВС) в исследовании ЦПД на клетках MDBK для приведения к тому же самому титру, прежде чем используют в описываемых экспериментах. После стандартизации ЦПД-титра исследуют пики (а + b), 2, 3, 4, 5 и 6. В каждом исследовании используют 100 МЕд/мл ИФН активности при множественности заражения ВИЧ-1 $\leq 0,02$. Полученные результаты представлены в табл. 19.

35 Приведенные результаты показывают, что основная активность в отношении ВИЧ-1 ассоциирована с типами ИФН, которые содержатся в RP-HPLC-пиках 2 и 6, причем пики 3, 4, 5 имеют достаточно сильную но все-таки меньшую активность. Интересно и неожиданно обнаружение того факта, что типы ИФН в пике 1 имеют наименьшую активность в отношении ретровирусов среди всех типов ИФН α - п3а. В этом пике типы интерферона относятся к ИФН α - 2 (b/c). Этим объясняется низкая активность в отношении ВИЧ-1 как ИФН α - 2а, так и ИФН α - 2b, что описано выше.

45 В то время как здесь подробно описаны некоторые возможные пути осуществления изобретения, специалистам в данной области исследования предельно ясно, что могут существовать многочисленные варианты и модификации предложенных технических решений. Таким образом, предложенное изобретение не ограничивается каким-либо детально описанным вариантом его осуществления и определяется не только приведенной ниже совокупностью существенных признаков.

Описание последовательностей

(1) Основная информация:

50 (i) Заявитель:

Testa, Douglas

Liao, Mei-June

Ferencz-Biro, Katalin

Rashidbaigi, Abbas

Di Paola, Mario

Padhye, Manisha

(ii) Название изобретения: Улучшенные альфа-интерфероновые композиции и способ их
5 получения с помощью лейкоцитов периферической крови человека

(iii) Количество последовательностей : 22

(iv) Адрес для переписки:

(A) Адресат: Howson and Howson

(Б) Улица: Spring House Corporate Center P.O. Box 457

10 (В) Город: Спрингхаус

(Г) Штат: Пенсильвания

(Д) Страна: США

(Е) Почтовый код: 19477

(v) Форма для компьютерной обработки:

15 (А) Носитель информации: гибкий диск

(Б) Компьютер: IBM-совместимый

(В) Операционная система: PC-DOS/MS-DOS

(Г) Программа: Patent In Release 1, версия 1,25

(vi) Текущие данные заявки:

20 (А) Номер заявки:

(Б) Дата подачи заявки:

(В) Классификация:

(vii) Предшествующие данные заявки:

(А) Номер заявки: VS 07/835,030

25 (Б) Дата подачи заявки: 10.02.92

(viii) Информация о патентном поверенном:

(А) Имя: Вак, Мару Е.

(Б) Регистрационный номер: 31,215

(В) Номер для ссылки: NPO92USA

30 (ix) Информация о каналах связи:

(А) Телефон: 215-540-9206

(Б) Телефакс: 215-540-5818

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO: 1:

(i) Характеристика последовательности:

35 (А) Длина: 13 аминокислот

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

(В) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярная природа: протеин

40 (ix) Особенности:

(А) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 2

(В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Cys)

(ix) Особенности:

45 (А) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 10

(В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Thr)

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 1:

Ala Xaa Val Ile Gln Gly Val Gly Val Xaa Gly Thr Pro

50 1

5

10

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 02:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 5 аминокислот

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

- (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярная природа: протеин
 (ix) Особенности:
- 5 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 3
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Arg)
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 2:
Leu Arg Ser Lys Glu
1 5
- 10 (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 3:
 (i) Характеристика последовательности:
 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: линейная
 (ii) Молекулярная природа: протеин
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 3:
Leu Lys Ser Lys Glu
1 5
- 15 (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 4:
 (i) Характеристика последовательности:
 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярная природа: протеин
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 4:
Leu Arg Ser Lys Glu
1 5
- 20 (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 5:
 (i) Характеристика последовательности:
 (А) Длина: 34 аминокислоты
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярная природа: протеин
 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 1
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Cys)
 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 11
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Ser)
- 25 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 14
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Thr)
- 30 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 16
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Met)
 (ix) Особенности:
- 35 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 16
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Met)
 (ix) Особенности:
- 40 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 16
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Met)
 (ix) Особенности:
- 45 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 16
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Met)
 (ix) Особенности:
- 50 (ix) Особенности:
 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 16
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Met)
 (ix) Особенности:

- (A) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 19
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Gly)
 (ix) Особенности:

- 5 (A) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 22
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Gly)
 (ix) Особенности:

- 10 (A) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 27
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Pro)
 (ix) Особенности:

- (A) Ключевое слово: участок
 (Б) расположение: 29
 15 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Cys)
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 5:

```

Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1           5           10
Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
      15           20           25
20 Pro Phe Ser Xaa Xaa Xaa Asp Arg His
      30
  
```

- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO6:

- (i) Характеристика последовательности:

- 25 (A) Длина: 34 аминокислоты
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна

- (ii) Молекулярный тип: протеин

- (xi) Структура последовательности SEQ ID NO6:

```

30 Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg
 1           5           10
Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Leu
      15           20           25
Pro Xaa Xaa Leu Xaa Asp Arg His
      30
  
```

- 35 (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 7:

- (ii) Характеристика последовательности:

- 40 (A) Длина: 34 аминокислоты
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна

- (ii) Молекулярный тип: протеин

- (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 7:

```

45 Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg Arg
 1           5           10
Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Xaa
      15           20           25
Leu Pro Ser Xaa Leu Lys Asp Arg His
      30
  
```

- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 8:

- (ii) Характеристика последовательности:

- 50 (A) Длина: 34 аминокислоты
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярный тип: протеин

(ix) Особенности:

(A) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 11

5 (E) Другая информация: (note = эта аминокислота может также быть Ser)

(ix) Особенности:

(A) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 22

(B) Другая информация: (note = эта аминокислота может также быть Arg)

10 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 8:

```

Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1           5           10
Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser His
 15           20           25
Phe Ser Xaa Leu Xaa Asp Arg His
15           30
    
```

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 9:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 34 аминокислоты

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

20 (B) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 9:

```

Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1           5           10
Ala Leu Ile Leu Leu Gly Gln Met Gly Arg Xaa Xaa Xaa
 15           20           25
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
25           30/
    
```

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 10:

30 (i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 34 аминокислоты

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

(B) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

35 (ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Особенности:

(A) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 22

(B) Другая информация: (note = эта аминокислота может быть Gly)

40 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 10:

```

Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1           5           10
Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser
 15           20           25
Pro Ser Xaa Leu Lys Asp Arg His
45           30
    
```

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 11:

(i) Характеристика последовательности:

(A) Длина: 34 аминокислоты

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

50 (B) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ix) Особенности:

(A) Ключевое слово: участок

(Б) Расположение: 10

(В) Другая информация: (note = эта аминокислота может также быть Arg

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 11:

5 Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1 5 10
 Ala Leu Ile Leu Leu Ala Gln Met Gly Arg Ile Ser Pro
 15 20 25
 Phe Ser Xaa Leu Xaa Asp Arg His
 30

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 12:

10 (i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 34 аминокислоты

(Б) Тип: аминокислотная последовательность

(В) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

15 (ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 12:

Xaa Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg
 1 5 10
 Ala Leu Ile Leu Leu Ala Xaa Met Arg Arg Ile Ser Pro
 15 20 25
 Phe Ser Xaa Leu Lys Asp Arg His
 30

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 13:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 5 аминокислот

25 (Б) Тип: аминокислотная последовательность

(В) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 13:

30 Leu Arg Arg Lys Asp
 1 5

(А) Информация о последовательности SEQ ID NO 14:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 5 аминокислот

35 (Б) Тип: аминокислотная последовательность

(В) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 14:

40 Leu Arg Ser Lys Glu
 1 5

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 15:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 5 аминокислот

45 (Б) Тип: аминокислотная последовательность

(В) Количество цепей: неизвестно

(Г) Топология: неизвестна

(ii) Молекулярный тип: протеин

(xi) Структура последовательности SEQ ID NO 15:

50 Leu Lys Ser Lys Glu
 1 5

(2) Информация о последовательности SEQ ID NO 16:

(i) Характеристика последовательности:

(А) Длина: 5 аминокислот

- (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
- 5 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 16:
Leu Arg Arg Lys Asp
 1 5
- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 17:
 (i) Характеристика последовательности:
 10 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
- 15 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 17:
Leu Arg Arg Lys Asp
 1 5
- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 18:
 (i) Характеристика последовательности:
 20 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
- 25 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 18:
Leu Arg Arg Lys Glu
 1 5
- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 19:
 (i) Характеристика последовательности:
 30 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
- 35 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 19:
Leu Arg Arg Lys Asp
 1 5
- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 20:
 (i) Характеристика последовательности:
 40 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
 (ix) Особенности:
- 45 (А) Ключевое слово: участок
 (Б) Расположение: 3
 (В) Другая информация: (note = эта аминокислота также может быть Arg)
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 20:
Leu Arg Ser Lys Glu
 1 5
- 50 (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 21:
 (i) Характеристика последовательности:
 (А) Длина: 5 аминокислот
 (Б) Тип: аминокислотная последовательность

- (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 21:

5 Leu Arg Ser Lys Glu
 1 5

- (2) Информация о последовательности SEQ ID NO 22:

(i) Характеристика последовательности:

- (А) Длина: 5 аминокислот
 10 (Б) Тип: аминокислотная последовательность
 (В) Количество цепей: неизвестно
 (Г) Топология: неизвестна
 (ii) Молекулярный тип: протеин
 (xi) Структура последовательности SEQ ID NO 22:

15 Leu Arg Ser Lys Glu (
 1 5

Формула изобретения

1. Композиция альфа-интерферона, получаемая из лейкоцитов периферической крови человека, отличающаяся тем, что в основном состоит из смеси интерферона типов $\alpha 2$ и $8\alpha 8$ и их аллелей и по крайней мере одного типа интерферона, выбранного из группы, включающей $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, $\alpha 16$, $\alpha 17$ и $\alpha 21$ и их аллели, а также факультативного фармакологически приемлемого носителя, причем указанная композиция характеризуется уровнем токсичности по отношению к больным людям, который существенно снижен по сравнению с другими композициями, содержащими индивидуальные типы интерферона или смеси других типов интерферона.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что имеет содержание углеводов в диапазоне 1 - 6 моль сахара на 1 моль интерферонового белка, по крайней мере чистоту интерфероновых белков человека 95%, приблизительную молекулярную массу 1600 - 27000 дальтон и по крайней мере одну N-терминальную последовательность из приведенных в табл.10, и по крайней мере одну из C-терминальных последовательностей, приведенных в табл.14.

3. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что характеризуется гидрофобностью, которую измеряют путем элюирования в 0,1%-ной ТГА из обратнофазовой HPLC (C4)-колонки в линейном градиенте 40 - 60%-ной концентрации ацетонитрилового растворителя с получением профиля элюции при OH_{280} , показанного на фиг. 4, и относительного процентного содержания семи HPLC-пиков от общего профиля элюции, которое указано в табл.4, причем указанная композиция имеет содержание углеводов в диапазоне 1 - 6 моль сахара на 1 моль интерферонового белка, специфическую активность около $(1 - 10) \times 10^8$ Мед/мг, определяемую в антивирусном исследовании *in vitro* с помощью клеток человека и быка, N-терминальные последовательности, приведенные в табл.10, и C-терминальные последовательности, приведенные в табл.14.

4. Природная альфа-интерфероновая композиция, получаемая из лейкоцитов периферической крови человека, отличающаяся тем, что в основном состоит из альфа-интерферона белка, который выбирают из группы, включающей типы интерферона $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\alpha 10$, $\alpha 16$, $\alpha 17$ и $\alpha 21$ и их аллели, а также их комбинации, и фармакологически приемлемого носителя, причем указанная композиция, по существу, не содержит $\alpha 2$ - типов интерферона и характеризуется антивирусной активностью *in vitro*, превосходящей таковую $\alpha 2$ -интерферона и/или его аллелей.

5. Композиция по п.4, отличающаяся тем, что указанный альфа-интерфероновый белок выбирают из $\alpha 8$ -интерферона и его аллелей.

6. Композиция по п.4 ил 5, отличающаяся тем, что она предназначена для приготовления фармакологической композиции для лечения вирусной инфекции человека.

7. Способ получения композиции альфа-интерферона, включающий получение лейкоцитов периферической крови человека, отличающийся тем, что собирают лейкоцитарную пленку после лизиса эритроцитов, суспендируют лейкоциты до плотности (1 - 10) x 10⁶ клеток/мл в подходящей индукционной среде при pH около 7,4, обогащенной L-глутамином, бикарбонатом натрия, 0,1 - 1,5 мг/мл сыворотки крови человека, не содержащей гамма-глобулинов, факультативными витаминами B₃ и/или C и факультативными подходящими агентами, способными ингибировать рост микроорганизмов, добавляют сырой или очищенный интерферон в качестве праймера к лейкоцитам, суспендированным в индукционной среде, ингибируют суспензию достаточное время при температуре около 36°C при перемешивании, добавляют к суспензии 50 - 500 ГА Ед/мл вируса Сендай, снова ингибируют достаточное время при температуре около 35°C при перемешивании, центрифугируют для удаления клеток и клеточных остатков, собирают сырой альфа-интерферон в качестве продукта без разделения одних типов альфа-интерферона от других, присутствующих в альфа-интерфероновой смеси.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что включает дальнейшую стадию разведения лейкоцитарной суспензии после повторного инкубирования при температуре около 36°C до конечной концентрации около (1 - 5) x 10⁶ клеток на 1 мл в индукционной среде.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что он дополнительно включает концентрирование смеси сырого интерферона в 10 - 100 раз, удаление примесей, содержащихся в сыром интерфероне, путем осуществления антительной иммуноаффинной хроматографии концентрированной смеси, инкубирование аффинно-очищенного интерферона в кислоте по крайней мере 2 дня при 4°C и дальнейшую очистку аффинно-очищенного интерферона гель-фильтрационной хроматографией.

Таблица 2.

Выход очищенного интерферона в стандартном эксперименте

Стадия очистки	Белок		Активность интерферона			
	Общий объем, л	Количество, мг	Общая	Выход, %	Специфическая активность, МЕд/мг.	Степень очистки
Сырой ИФН	212,4	$8,5 \times 10^4$	4,6	100	0,054	1
Концентрирование:	5,15	$7,1 \times 10^4$	4,5	99	0,064	1
Аффинная хроматография <i>NK2</i>	0,073	9,4	4,0	87	430	7,990
Нейтрализация						
Концентрирование	0,0073	7,3	3,4	74	470	8,740
Хроматография с помощью сефарозы	0,045	4,8	3,2	70	660	12,200

Таблица 3

Время, мин	Скорость потока, мл/мин	A, %	B, %
Начальное	5,0	95	5
15	5,0	60	40
59	5,0	50	50
60	5,0	10	90
65	5,0	10	90
66	5,0	95	5
76	5,0	95	5
79	0,04	95	5

Таблица 4

Процентное содержание <u>RP-HPLC</u> -пиков ИФН <u>d-n3a</u>	
Пик	Процент от общего профиля
1a	13
1b	36
2	4
3	15
4	5
5	10
6	17

Таблица 5.

Специфическая активность нефракционированного ИФН d-n3a
и в составе RP-HPLC -пиков,

Пик	МЕд/мг ИФН			
	ЦЩ	АП ¹⁾		
	Нер-2	МДВК	РК-13	<i>Saudi</i>
1a	252,0	262,9	0,08	86,9
1b	195,6	265,0	0,17	109,4
2	269,8	278,1	0,77	127,5
3	377,3	316,8	7,09	175,7
4	589,9	345,1	2,63	216,4
5	298,6	362,7	1,56	205,5
6	884,1	447,7	0,59	237,9

1) АП - антипролиферативная активность

Таблица 6.

Результаты *SDS - PAGE* (невосстанавливающие условия).

Относительная мол.масса и относительная площадь пиков, %

Относительная площадь пиков, %

Мол.масса (кДа)	Нефракционированный ИФН	RP - HPLC - пики интерферона							
		1a	1b	2	3	4	5	6	
19,3	17,1	-	-	17,8	-	36,5	1,6	29,8	
19,0	27,4	-	-	-	-	-	1,2	70,2	
18,5	26,3	93,8	93,1	-	-	-	-	-	
18,0	6,5	6,2	4,8	-	-	-	-	-	
17,8	-	-	2,1	18,3	17,1	52,0	21,0	-	
17,7	19,2	-	-	-	82,9	-	-	-	
17,5	3,4	-	-	57,2	-	11,6	76,2	-	
17,2	-	-	-	6,8	-	-	-	-	

Таблица 7.

Результаты *SDS - PAGE* (восстанавливающие условия)

Относительная мол.масса и относительная площадь пиков, %

Относительная площадь пиков, %

Мол.масса (кДа)	Нефракционированный ИФН	RP - HPLC - пики интерферона							
		1a	1b	2	3	4	5	6	
27,7	-	-	-	-	-	-	2,3	-	
27,5	-	-	-	0,9	-	-	-	-	
27,0	23,8	-	-	-	-	34,3	-	100	
22,3	-	-	-	-	16,8	-	-	-	
21,7	58,1	-	-	-	83,2	17,6	-	-	
21,5	-	92,4	80,8	73,4	-	-	40,8	-	
20,8	9,4	7,6	13,2	-	-	41,7	-	-	
20,0	4,1	-	2,8	-	-	6,4	56,9	-	
19,4	1,3	-	3,2	-	-	-	-	-	
19,0	1,5	-	-	-	-	-	-	-	
18,6	1,7	-	-	22,4	-	-	-	-	
13,0	-	-	-	3,3	-	-	-	-	

Таблица 8.

Анализ гелей, полученных с помощью двумерного SDS-PAGE.

Пик ИФН ²⁾	Число пятен ¹⁾	Мос.масса (кДа)
1а	30-35	17,7-27,7
1б	8-10	20,6-22,8
1в	8-11	18,9-22,8
2	3-4	22,8
3	4-5	21,9-22,8
4	6-9	21,9-27,8
5	5-7	21,9-22,8
6	1 (размазано)	27,8

1) Окрашивание серебром и иммуноокрашивание.

2) Нефракционированный.

Таблица 9

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ИОН α -ИЗ и R P-HP L C-ПИКОВ

№ КО-ЛО-НКИ	АМИНО-КИСЛОТ-НЫЕ ОСТАТКИ	ИОН α 2		ИОН α 8		ИОН α 10		ИОН α 4		ИОН α 17		ИОН α 7		ИОН α 16		ИОН α 21						
		2а	2б	2с	8а	8б	8с	10а	10б	4а	4б	17а	17б	17с	17д	7а	7б	7с	16а	16б	21а	21б
1	Asx	12	12	12	16	15	16	14	13	13	14	14	14	14	14	12	12	12	14	13	13	13
2	Glx	26	26	26	28	28	27	29	29	28	29	29	29	29	29	29	30	29	26	29	29	29
3	Ser	14	14	14	15	16	15	14	14	14	14	14	14	13	13	13	13	13	13	13	14	14
4	Gly	5	5	5	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	4	4	4	5	5
5	Hsb	3	3	3	3	3	3	3	5	5	2	3	3	3	3	4	4	4	4	3	3	3
6	Arg	9	10	11	10	10	9	13	11	11	10	10	11	11	11	12	13	12	15	10	10	10
7	Thr	11	11	11	6	6	6	7	8	9	9	9	9	9	8	8	8	9	8	8	8	8
8	Ala	8	8	8	9	9	9	9	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	9	9	9
9	Pro	5	5	5	4	4	4	5	4	4	6	5	5	6	5	5	5	5	4	5	5	5
10	Tyr	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	3	3	3
11	Val	7	7	7	7	7	7	7	7	8	6	6	6	6	7	7	7	7	9	8	8	8
12	Met	5	5	5	4	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	4	6	5	4	4
13	Cys	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
14	Ile	8	8	8	10	10	10	10	11	8	9	9	8	8	8	8	8	8	6	6	9	9
15	Leu	21	21	21	22	22	21	20	20	20	21	21	21	21	21	19	19	19	20	18	19	19
16	Phe	10	10	10	10	10	10	9	10	10	9	9	9	9	9	12	12	12	9	11	11	11
17	Lys	11	10	10	10	10	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	10	10
18	Dep	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2

Продолжение Таблицы 9

Аминокислотный состав ИФН α -п3а и РР-НРЛС-пиков

№ ко- ло- нок	Нефракцио- нированный ИФН α -п3а	РР - НРЛС - пики						
		1а	1б	2	3	4	5	6
1	12	11.6	10.3	NA	13.4	13.7	7.7	14.8
2	25.2	23.5	22.1	NA	27.8	23.9	24.2	27.8
3	14.1	14.7	14.7	NA	13.0	14.6	15.4	14.2
4	4.7	5.5	5.7	NA	5.3	4.2	ND	2.5
5	2.8	3.1	2.6	NA	2.7	2.8	3.0	3.0
6	10.4	10.4	10.6	NA	11.9	11.0	11.3	10.2
7	8.9	10.7	10.7	NA	6.3	6.8	8.9	5.6
8	9.3	8.8	8.7	NA	8.7	8.5	9.7	9.0
9	9.1	4.9	6.0	NA	8.3	ND	4.5	5.0
10	4.4	5.0	5.8	NA	4.0	4.0	5.1	5.4
11	6.0	6.1	6.2	NA	5.4	5.4	5.5	5.4
12	4.8	5.4	5.5	NA	3.9	5.0	5.4	5.2
13	ND	ND	ND	NA	ND	ND	ND	
14	7.6	7.7	8.7	NA	8.4	7.8	9.8	9.5
15	19.5	16.8	16.8	NA	20.3	23.8	18.3	17.7
16	9.6	10.7	11.0	NA	9.2	10.4	12.1	10.4
17	9.1	11.0	11.1	NA	7.3	9.2	9.9	10.4
18								

Примечание: NA - не определялось

ND - данные не получены

Таблица 10а.

Результаты N -терминального секвенирования ИОН d -п3а и
 RP - HPLC-пиков

Номер цикла	ИОН d -п3а	Пик 1а	Пик 1б	Пик 2	Пик 3
1	ND (cys)	ND	ND	ND	ND
2	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp
3	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
4	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
5	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
6	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
7	His	His	His	His	His
8	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
9	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
10	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
11	Asn, Ser	Ser	Ser	Asn, Ser	Asn
12	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
13	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
14	Ala, Thr	Thr	Thr	Ala	Ala
15	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
16	Ile, Met	Met	Met	Ile	Ile
17	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
18	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
19	Ala Gly	Ala	Ala	Ala	Gly
20	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
21	Met	Met	Met	Met	Met
22	Arg, Gly	Arg	Arg	Gly, Arg	Gly
23	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg

Продолжение Таблицы IOa

24	Ile	Ile	Ile	Ile	ND
25	Ser	Ser	ND	Ser	ND
26	Pro	Leu	Leu	His	ND
27	Phe, Pro	Pro	Pro	Phe	ND
28	Ser	ND	Ser	Ser	ND
29	ND (Cys)	ND	ND	ND	ND
30	ND	Leu	Leu	Leu	ND
31	ND	ND	Lys	ND	ND
32	Asp	Asp	Asp	Asp	ND
33	Arg	Arg	Arg	Arg	ND
34	His	His	His	His	ND
Последова- тельность	5	6	7	8	9
ID NO:					

Таблица 106,

Результаты N -терминального секвенирования ИОН α -п3а и
 R P - HPL C-пиков.

Номер цикла	Пик 4	Пик 5	Пик 6
1	ND	ND	ND
2	Asp	Asp	Asp
3	Leu	Leu	Leu
4	Pro	Pro	Pro
5	Gln	Gln	Gln
6	Thr	Thr	Thr
7	His	His	His
8	Ser	Ser	Ser
9	Leu	Leu	Leu
10	Gly	Gly, Arg	Gly
11	Asn	Asn	Asn
12	Arg	Arg	Arg
13	Arg	Arg	Arg
14	Ala	Ala	Ala
15	Leu	Leu	Leu
16	Ile	Ile	Ile
17	Leu	Leu	Leu
18	Leu	Leu	Leu
19	Ala	Ala	Ala
20	Gln	Gln	Gln
21	Met	Met	Met
22	Arg, Gly	Gly	Arg

Номер цикла	Пик 4	Пик 5	Пик 6
23	Arg	Arg	Arg
24	Ile	Ile	Ile
25	Ser	Ser	Ser
26	Pro	Pro	Pro
27	Phe	Phe	Phe
28	Ser	Ser	Ser
29	ND	ND	ND
30	Leu	Leu	Leu
31	Lys	ND	Lys
32	Asp	Asp	Asp
33	Arg	Arg	Arg
34	His	His	His
<hr/>			
Последовательность ID NO:	10	11	12

Примечание: ND - не определялось

Таблица 11,

Основные типы интерферона, выявленные на основе

N - терминального секвенирования,

Номер пика	Основные типы интерферона
1a	$L_2 (a/c)$
1b	$L_2 (b/c)$
2	$L_4 (a/b); L_{16}$
3	L_{10a}
4	$L_8 (a/b/c); L_{21} (a/b);$ $L_{17} (a/b/c/)$
5	$L_{17} (a/b/c/d); L_{21} (a/b);$ $L_7 (a/b/c)$
6	$L_8 (a/b/c)$

Таблица 12,

Различия в последовательностях подтипов ИФН - L_2 .

<u>Цикл</u>	<u>L_{2a}</u>	<u>L_{2b}</u>	<u>L_{2c}</u>
23	Lys	Arg	Arg
34	His	His	His

Таблица 13,

Содержание углеводов и сиаловых кислот в препаратах
ИФН L-13a и RP-HP/C-пиках

Пики	GalN	GlcN	Gal	Glc	Man	Sial	Общее
Нефракц. ИФН	0,39	0,31	0,48	0,65	0,20	0,61	2,64
1a	0,49	0,67	1,51	0,36	0,00	0,33	3,36
1b	0,41	0,34	1,15	0,35	0,07	0,44	3,26
2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	0,33	0,00	0,37	1,22	0,00	0,00	1,92
4	0,00 ¹⁾	0,05 ¹⁾	0,84	2,03	0,00	0,00	2,92
5	0,27	0,17	0,29	0,68	0,00	0,00	1,41
6	0,08	0,00	0,34	0,41	0,00	0,00	0,83

Примечание: NA - данные анализа не получены

1) - определялось для TFA-гидролизованых образцов

Таблица 14,

Результаты С-терминального секвенирования подтипов α -ИОН,
ИОН α - п3а и РР - НР/С-пиков,

Подтипы ИОН- α	Ц и к л ы				
	-5	-4	-3	-2	-1
Совпадение [SEQ ID № 0:13]	Leu	Arg	Arg	Lys	Asp
α 2 (a/c) [SEQ ID № 0:14]	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu
α 8 (a/c) [SEQ ID № 0:15]	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu
α 4 (a/c) [SEQ ID № 0:16]	Leu	Arg	Arg	Lys	Asp
α 10a [SEQ ID № 0:17]	Leu	Arg	Arg	Lys	Asp
α 21 (a/c) [SEQ ID № 0:18]	Leu	Arg	Arg	Lys	Glu
α 7 (a/c) [SEQ ID № 0:19]	Leu	Arg	Arg	Lys	Asp
ИОН α - п3а [SEQ ID № 0:20]	Leu	Arg	Ser(Arg)	Lys	Glu
Пик 1 а [SEQ ID № 0:21]	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu
Пик 1 б [SEQ ID № 0:21]	Leu	Arg	Ser	Lys	Glu

Таблица 15.

Экспериментальная частота развития побочных эффектов при
лечении интерфероном,

Инъекции (*Alferon* А)

Ранняя ВИЧ-инфекция

Схема введения препарата и доза (млн.Ед)	1 млн. Ед 3 раза в неделю	2,5/5 млн.Ед 3 раза в неделю
Число больных	№ = 5	№ = 10
Лихорадка	0	0
Головная боль	0	0
Миалгия	0	0
Усталость	0	0
Озноб	0	0
Артралгия	0	0
Головокружение	0	0
Диарея	0	0
Анорексия (отсутствие аппетита)	0	0
Тошнота	0	0
Облысение	0	0

Таблица 16

Номер ссылки	1	1	2	3	3	3
Интерферон	РИФН α	НК2 ИФН α	РИФН α	ИФН- β ser	ИФН- β ser	рекомб- γ
Доза	1,3 МЕД/ м ²	1,12 МЕД/ м ²	2+20 МЕД/ дозу 1+2х/день	3 МЕД	30 МЕД	3 МЕД
<i>N</i>	9	9	38, 113	10	11	10
Простудоподобные симптомы:						
Лихорадка	78	67	40			
Усталость	67	67	29	10	45	10
Миалгия	56	56	24	0	36	0
Головная боль	100	89		20	45	20
Озноб, дрожь	67	67		0	9	0
Недомогание	89	78	31			
Инфекция верхних дыхательных путей						

Таблица I6

Номер ссылки	1	2	3	3	3
Интерферон	РИФН α	РИФН α	РИФН α	РИФН β sec	РИФН β sec
Доза	1, 3 МЕД/ м ²	1, 12 МЕД/ м ²	2+20 МЕД/ ДОЗУ 1+2х/день	3 МЕД	30 МЕД
<i>N</i>	9	9	38, 113	10	10
Заболевания ЦНС и периф. НС (ПНС):					
Депрессия					2
Головокружение					
Парезтезия					
Потеря чувствитель- ности					
Временная импотенция					
Дрожание	33				33
Трудности в концентри- ровании внимания					

Таблица I6

Номер ссылки	1	2	3	3	3
Интерферон	РИФН α	РИФН α	ИФН- β ser	ИФН- β ser	реКИФН- γ
Доза	1, 3 МЕД/ м ²	1, 12 МЕД/ м ²	2+20 МЕД/ дозу	3 МЕД	3 МЕД
<i>N</i>	9	9	38, 113	11	10
Заболевания			1+2х/день		
ЦНС и ПНС					
Бессонница					
Желудочно-кишеч- ные расстройства:					
Потеря аппетита	22	33	0	18	0
Тошнота	33	33	0	18	0
Диарея					
Рвота					
Диспепсия/изжога					

Таблица 16

Номер ссылки	1	2	3	3	3
Интерферон	ИФН α	ИФН α	ИФН- β ser	ИФН- β ser	ИФН- β ser
Доза	1,3 МЕД/ м ²	1,12 МЕД/ м ²	3 МЕД	3 МЕД	3 МЕД
N	9	9	10	11	10
Заболевания крови:		2+20 МЕД/ дозу 1+2х/день			
Тромбоцитопения ($\times 10^3/\text{мм}^3$)		38, 113	-12,3	-7,6	+2,2
Гематокрит/анемия (мл/дцл)			20,1	-1,5	+0,5
Нейтрализ. антитела					
Другие заболевания:					
Беспокойство					

Таблица 16

Номер ссылки	1	2	3	3	3
Интерферон	РИФН α	РИФН α	ИФН- β ser	ИФН- β ser	рекиФН- γ
Доза	1,3 МЕД/ м ²	1, 12 МЕД/ м ²	3 МЕД	3 МЕД	3 МЕД
N	9	9	10	11	10

Другие заболевания:

Сухость или воспа-

ление глотки

Потеря веса

Изменения в восприя-

тии вкуса

Почечная интоксикация

Реактивация гениталь-

ного герпеса

Боли внизу спины

II

44

56

Таблица I6

Номер ссылки	1	1	2	3	3	3
Интерферон	РИФН α	НК2 ИФН α	РИФН α	ИФН- β <i>ser</i>	ИФН- β <i>ser</i>	рекиФН- β
Доза	1,3 МЕД/ м ²	1,12 МЕД/ м ²	2+20 МЕД/ дозу	3 МЕД	30 МЕД	3 МЕД
<i>N</i>	9	9	1+2х/день 38, 113	10	11	10
Другие заболевания:						
Боли в суставах/ артралгия	33	56				
Печёночная инток- сикация						
Локальная боль						
Насморк						
Слабость						
Сильное потоотде- ление/испарина						
Ригидность						

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН ↙ РИФН ↙	рекиФОН-α2β	рекиФОН-γ	рекиФОН-α2β	рекиФОН-α2β	рекиФОН-β
Доза	3 МЕД/д 29	35 МЕД/д 11	20 МЕД/м ² /д разл. ?	?	36 МЕД 4	34
Простудоподобные симптомы:						75
Лихорадка	62	100	100	98	100	
Усталость		100	100	98	50	
Миалгия		100	100	98		
Головная боль	10	100	84	98	25	
Озноб, дрожь	38	100	70	98	50	
Недомогание		100		98		
Инфекция верхних дыхательных путей						73

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН α РИФН α	рекИФН- $\alpha 2\beta$	рекИФН- δ	рекИФН- $\alpha 2\beta$	рекИФН- $\alpha 2\beta$	рекИФН- $\alpha 2\beta$ Природный ИФН- β
Доза	3 МЕД/д	35 МЕД/д	20 МЕД/м ² /д	разл.	36 МЕД	
N	29	II	?	?	4	34
Заболевания ЦНС и ПНС:						
Депрессия		27				
Головокружение					34	
Парезтезия					34	
Потеря чувствитель- ности					34	
Временная импотенция					34	
Дрожание					34	
Трудности в концентри- ровании внимания		45				0

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН α РИФН α	рекиФОН $\alpha 226$	рекиФОН γ	рекиФОН $\alpha 226$	рекиФОН $\alpha 226$	рекиФОН- β Природный ИФН- β
Доза	3 МЕД/д 29	35 МЕД/д 11	20 МЕД/м ² /д ?	разл. ?	36 МЕД 4	34
Заболевания ЦНС и ПНС:						
Бессонница						44
Желудочно-кишеч- ные расстройства:						
Потеря аппетита		27		27	25	
Тошнота			36	50	75	
Диарея		73	7	27		
Рвота				27		
Диспепсия/изжога				27		

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН-д РИФН-д	рекиФН-д/26	рекиФН-д	рекиФН-д/26	рекиФН-д/26	рекиФН-д/26 Природный ИФН-β
Доза	3 МЕД/д	35 МЕД/д	20 МЕД/м ² /д	разл.	36 МЕД	
N	29	11	?	?	4	34
Заболевания кожи:						
Сыпь		27		12		
Сухость кожи/зуд	17			12		
Частичное облысение	28	45		4		
Заболевания крови:						
Лейкопения (х10 ³ /мм ³)				75%		
Нейтропения (х10 ³ /мм ³)		55		25		9
Лимфопения (х10 ³ /мм ³)						

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН δ РИФН δ	рекиФОН- $\delta 26$	рекиФОН- γ	рекиФОН- $\delta 26$	рекиФОН- $\delta 26$	рекиФОН- $\delta 26$ Природный ИФН- β
Доза	3 МЕД/д 29	35 МЕД/д II	20 МЕД/м ² /д ?	разл. ?	36 МЕД 4	34
<i>N</i>						
Заболевания крови:						
Тромбоцитопения ($\times 10^3/\text{мм}^3$)				25%		
Гематокрит/анемия (мл/дцл)						38%
Нейтрализ. антитела			0			
Другие заболевания:						
Беспокойство						27

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН α РИФН α	рекиФН- $\alpha 2\beta$	рекиФН- δ	рекиФН- $\alpha 2\beta$	рекиФН- $\alpha 2\beta$	Природный ИФН- β
Доза	3 МЕД/д 29	35 МЕД/д 11	20 МЕД/м ² /д ?	разл. ??	36 МЕД 4	34
Другие заболевания:						
Сухость или воспале- ние глотки						
Потеря веса					4	
Изменения в восприя- тии вкуса						
Почечная интоксикация		27	42			
Реактивация гениталь- ного герпеса						
Боли внизу спины						

Таблица 16

Номер ссылки	4	5	6	7	8	9
Интерферон	СИФН α РИФН α	рекиФН- $\alpha 2b$	рекиФН- β	рекиФН- $\alpha 2b$	рекиФН- $\alpha 2b$	рекиФН- β Природный ИФН- β
Доза	3 МЕД/д	35 МЕД/д	20 МЕД/м ² /д	разл.	36 МЕД	
N	29	11	?	?	4	34
Другие заболевания:						
Боли в суставах/ артралгия						
Печёночная интоксикация		45	91		32	
Локальная боль	38					
Насморк	14					
Слабость	10					
Сильное потоотделение/испарение	10					
Ригидность	10					

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН-226	рекиФН-22a	рекиФН-226	ИФН-2n1	рекиФН-22a	ИФН-2n3
Доза	1,5 МЕД/М ²	3 МЕД/д	2 МЕД/М ²	разл.	разл.	1,25 МЕД/инъекцию
<i>Л</i>	4	?	145	12	1019	104
Простудоподобные симптомы:			37			
Лихорадка	0	98	68	83	86	40
Усталость	75	89	61	25	90	14
Миалгия	0	73	39		57	45
Головная боль	0	71	39		47	31
Озноб, дрожь		64	46	83	62	14
Н-домогание						9
Инфекция верхних дыхательных путей						

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН -226	рекиФН -22a	рекиФН -226	ИФН -221	рекиФН -22a	ИФН -223
Доза	1,5 МЕД/м ²	3 МЕД/д	2 МЕД/м ²	разл.	разл.	1,25 МЕД/инЪЕКЦИЮ
N	4	?	145	12	1019	104
Заболевания ЦНС и ПНС:						
Депрессия		23	6		6,5	2
Головокружение		21	12			9
Парестезия		6	6		7	
Потеря чувствительности		6				
Временная импотенция		6				
Дрожание		3				
Трудности в концентрации внимания		3	5			12

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН-α2b	рекиФН-α2a	рекиФН-α2b	ИФН-αn1	рекиФН-α2a	ИФН-αn3
Доза	1,5 МЕД/м ²	3 МЕД/д	2 МЕД/м ²	разл.	разл.	1,25 МЕД/ инъекцию
N	4	?	145	12	1019	104
Заболевания ЦНС и ПНС:						
Бессонница						2
Желудочно-кишечные расстройства:						
Потеря аппетита	50		19		68	
Тошнота	25		21	58	53	4
Диарея			18		34	2
Рвота			6		30	3
Диспепсия/изжога						3

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН-226	рекиФН-22a	рекиФН-226	ИФН-2n1	рекиФН-22a	ИФН-2n3
Доза	1,5 МЕД/М ²	3 МЕД/д	2 МЕД/М ²	разл.	разл.	1,25 МЕД,
<i>N</i>	4	?	145	2,5-15 МЕД/М ²	3-72 МЕД	ИНЪЕКЦИЮ
Заболевания кожи:					1019	104
Сыпь		18			7	
Сухость кожи/зуд		13				2
Частичное облысение		8			10	

Заболевания крови:
 Лейкопения ($\times 10^3/\text{мм}^3$) 50%
 Нейтропения ($\times 10^3/\text{мм}^3$)
 Лимфопения ($\times 10^3/\text{мм}^3$)

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН- $\alpha 2b$	рекиФН- $\alpha 2a$	рекиФН- $\alpha 2b$	ИФН- $\alpha n 1$	рекиФН- $\alpha 2a$	ИФН- $\alpha n 3$
Доза	1,5 МЕД/м ²	3 МЕД/д	2 МЕД/м ²	разл. 2,5-15 МЕД/м ²	разл. 3-72 МЕД	1,25 МЕД/ инъекцию
N	4	?	145	?	1019	104
Заболевания крови:						
Тромбоцитопения ($\times 10^3 / \text{мм}^3$)	75%					
Гематокрит/анемия (мл/дцл)	75%					
Нейтрализ. антитела						27,4
Другие заболевания:						
Беспокойство						

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекИФН- <i>d26</i>	рекИФН- <i>d2a</i>	рекИФН- <i>d2b</i>	ИФН- <i>d111</i>	рекИФН- <i>d2a</i>	ИФН- <i>d113</i>
Доза	1,5 МЕД/м ²	3 МЕД/д	2 МЕД/м ²	разл. 2,5-15 МЕД/м ²	разл. 3-72 МЕД	1, 25 МЕД/ ИНЪЕКЦИЮ
<i>N</i>	4	?	145	12	1019	104
Другие заболевания:						
Сухость или воспале- ние глотки		16			5	
Потеря веса	50	14			13	
Изменения в восприя- тии вкуса		13				
Почечная интоксикация	0					
Реактивация гениталь- ного герпеса		8			5	
Боли внизу спины			19			4

Таблица 16

Номер ссылки	10	11	12	13	14	15
Интерферон	рекиФН-226	рекиФН-22a	рекиФН-226	ИФН-2n1	рекиФН-22a	ИФН-2n3
Доза	1,5 МЕД/м ²	3 МЕД/д	2 МЕД/м ²	разл. 2,5-15 МЕД/м ²	разл. 3-72 МЕД	1,25 МЕД/ ИНЪЕКЦИЮ
<i>N</i>	4	?	145	12	1019	104
Другие заболевания:						
Боли в суставах/ артралгия		5	8		12	5
Печёночная интоксикация	75			25		
Локальная боль				44		
Насморк						
Слабость						
Сильное потоотделение/испарина		8	8			2
Ригидность						

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИН - <i>днза</i>	рекИФН - <i>дда</i>	рекИФН - <i>л</i>	рекИФН - <i>ддс</i>
Доза	1-5 МЕД/ инЪекцию	8-18 МЕД/ инЪекцию	1 МЕД/м ²	~ 2 МЕД/инЪекцию
<i>л</i>	15	15	16	21
Простудоподобные				
симптомы:				
Лихорадка	0%	33	19	> 50
Усталость	< 10%	41	6	27
Миалгия	< 10%	13	6	
Головная боль	< 10%		19	14
Озноб/дрожь	0%	0		
Недомогание	< 10%		6	0
Инфекция верхних дыхательных путей	0%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИН-2n3a	рекиФОН-22a	рекиФОН-γ	рекиФОН-22c
Доза	1-5 МЕД/ инЪекцию	8-18 МЕД/ инЪекцию	1 МЕД/м ²	~ 2 МЕД/инЪекцию
N	15	15	16	21
Заболевания ЦНС и ПНС:				
Депрессия				
Головокружение	0%			
Парезтезия	0%			
Потеря чувствитель- ности	0%			
Временная импотенция	< 10%			
Дрожание	0%			
Трудности в концентри- ровании внимания	< 10%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИФН- α 1за	рекиФН- α 2а	рекиФН- γ	рекиФН- α 2с
Доза	1-5 МЕД/ инЪекцию	8-18 МЕД/ инЪекцию	1 МЕД/м ²	2 МЕД/инЪекцию
<i>N</i>	15	15	16	21
Заболевания ЦНС и ПНС:				
Бессонница	0%			
Желудочно-кишечные расстройства:				
Потеря аппетита	0%	6		
Тошнота	0%	13	13	0
Диарея	0%	0		
Рвота	0%		13	
Диспепсия/изжога	0%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИНФ- α 12a	рекиФН- α 2a	рекиФН- γ	рекиФН- α 2c
Доза	1-5 МЕД/ инъекцию	8-18 МЕД/ инъекцию	1 МЕД/м ²	2 МЕД/инъекцию
N	15	15	16	21
Заболевания кожи:				
Сыпь	< 10%			18
Сухость кожи/зуд	< 10%			
Частичное облысение	0%			
Заболевания крови:				
Лейкопения ($\times 10^3$ /мм ³)	0%		13%	
Нейтропения ($\times 10^3$ /мм ³)	0%			
Лимфопения ($\times 10^3$ /мм ³)	0%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИФН- α 13a	рекиФН- α 2a	рекиФН- γ	рекиФН- α 2c
Доза	1-5 МЕД/ инЪекцию	8-18 МЕД/ инЪекцию	1 МЕД/м ²	2 МЕД/инЪекцию
N	15	15	16	21
Заболевания крови:				
Тромбоцитопения ($\times 10^3/\text{мм}^3$)	0%			
Гематокрит/анемия (мл/дцл)	0%			
Нейтрализ., антитела				
Другие заболевания:				
Беспокойство	< 10%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИФН- <i>α</i> ₁ <i>3а</i>	рекиФОН- <i>α</i> ₂ <i>а</i>	рекиФОН- <i>γ</i>	рекиФОН- <i>α</i> ₂ <i>с</i>
Доза	1-5 МЕД/ инъекцию	8-18 МЕД/ инъекцию	1 МЕД/ <i>м</i> ²	2 МЕД/инъекцию
<i>л</i>	15	15	16	21
Другие заболевания:				
Сухость или воспали- ние глотки	0%			
Потеря веса	0%			
Изменения в восприя- тии вкуса	0%			
Почечная интоксикация	0%			
Реактивация гениталь- ного герпеса	0%			
Боли внизу спины	0%			

Таблица 16

Номер ссылки	16	17	18	19
Интерферон	ИФН-днза	рекИФН-ддза	рекИФН-г	рекИФН-дс
Доза	1-5 МЕД/ ИНЪЕКЦИЮ	8-18 МЕД/ ИНЪЕКЦИЮ	1 МЕД/М ²	2 МЕД/ИНЪЕКЦИЮ
<i>N</i>	15	15	16	21
Другие заболевания:				
Боли в суставах/ артралгия	< 10%			
Печёночная интоксикация	< 10%			
Локальная боль	0%			
Насморк	0%			
Слабость	0%			
Сильное потоотделение/испарина	0%			
Ригидность	0%			

Таблица 17,

Активность обратной транскриптазы ($CPM \times 10^{-5}$) как функция концентрации интерферона

Используемый ИФН	ИФН (МЕд/мл)						
	0,1	1	5	10	50	100	500
ИФН α -2a	253	300	355	327	212	60	50
ИФН α -2b	253	286	226	180	88	42	32
ИФН α -3a	253	230	138	58	58	21	18

Таблица 18,

Относительная ингибирующая активность различных форм ИФН

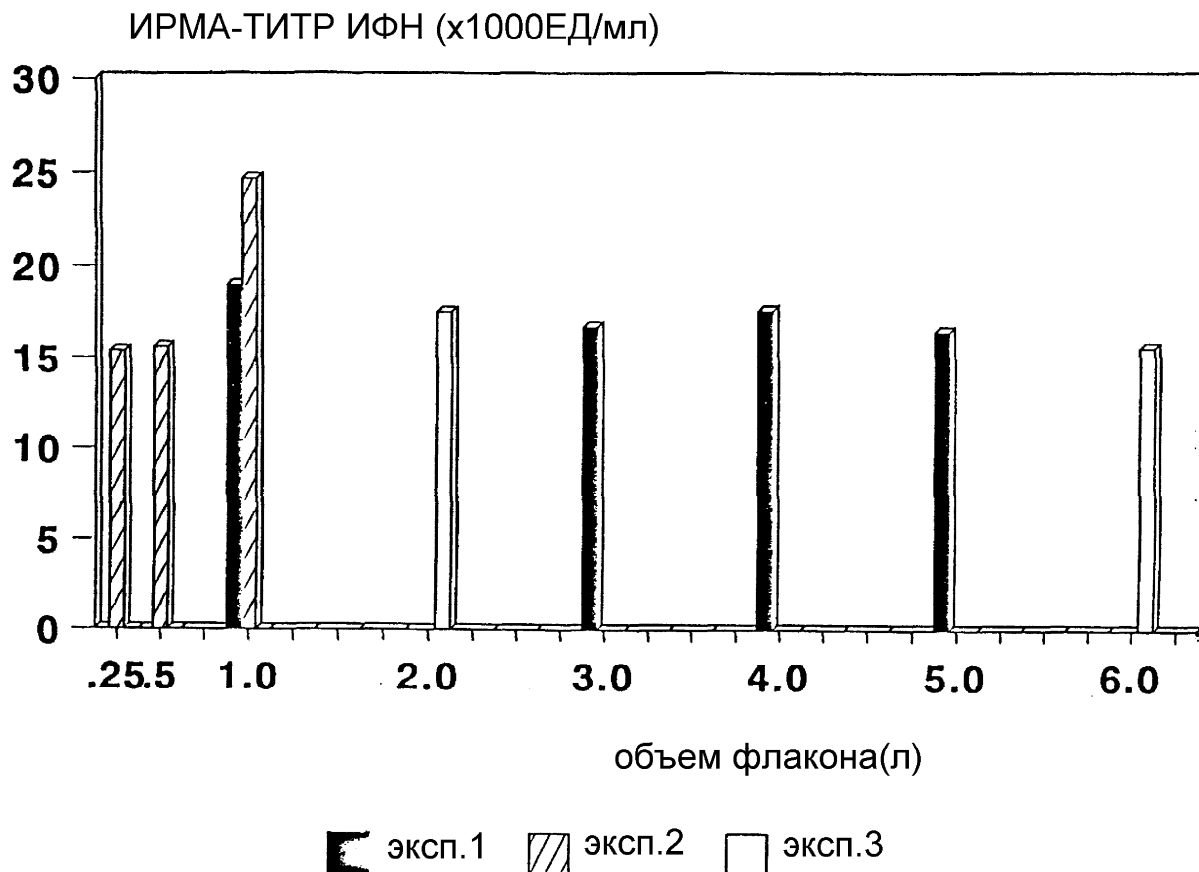
Используемый ИФН	Число экспериментов	$ID_{50} (+SEM)$
ИФН α -2a	2	95,0 (25,0)
ИФН α -2b	8	13,7 (1,1)
ИФН α -3a	6	1,2 (0,2)

ID_{50} - 50%-ная ингибирующая доза

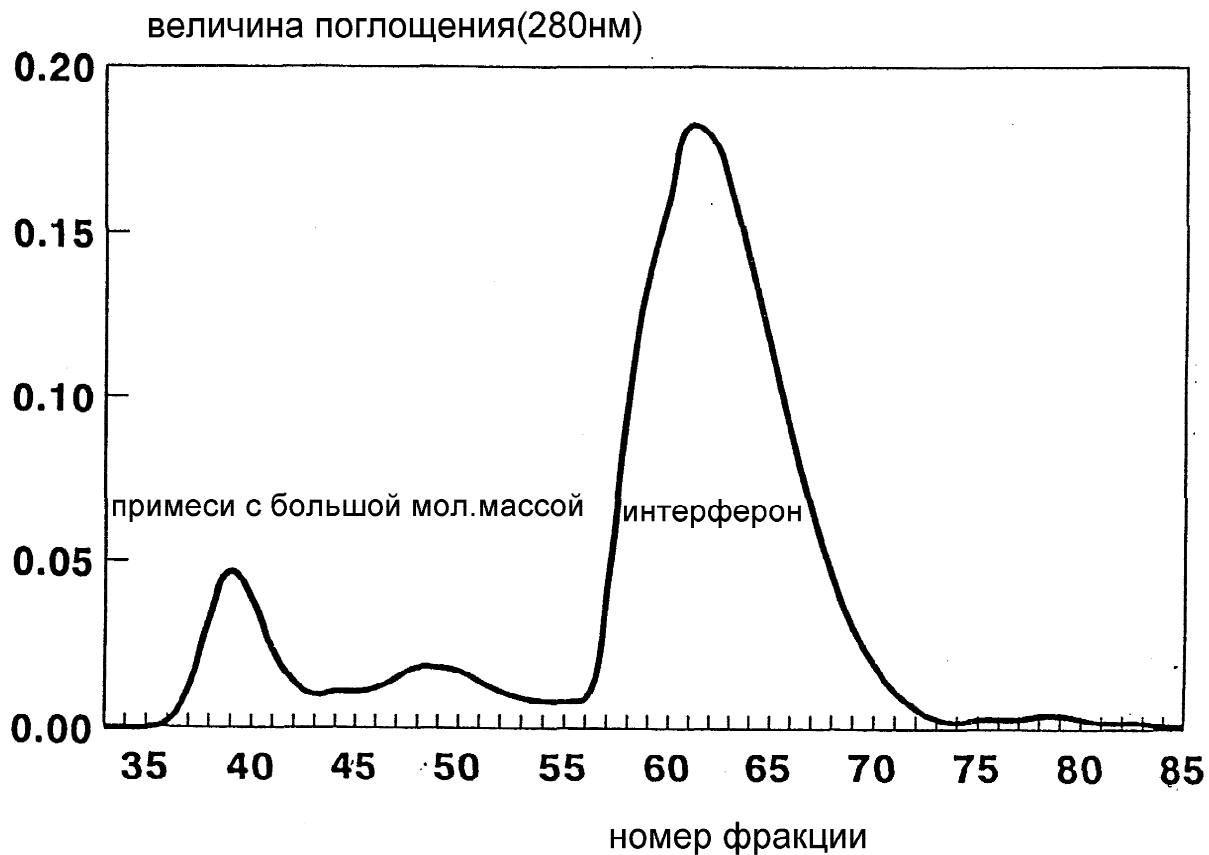
Таблица 19,

Относительная активность R P - NP₂ C-пиков ИФН α -3a в отношении ВИЧ-1

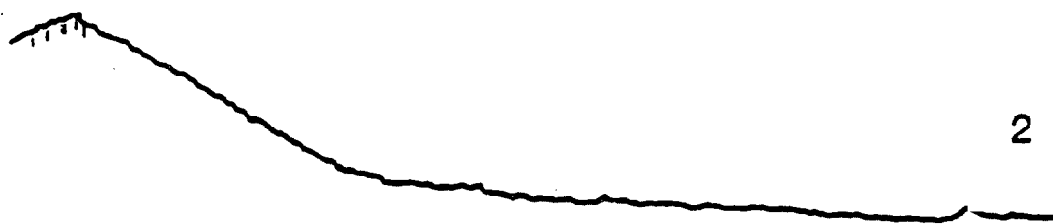
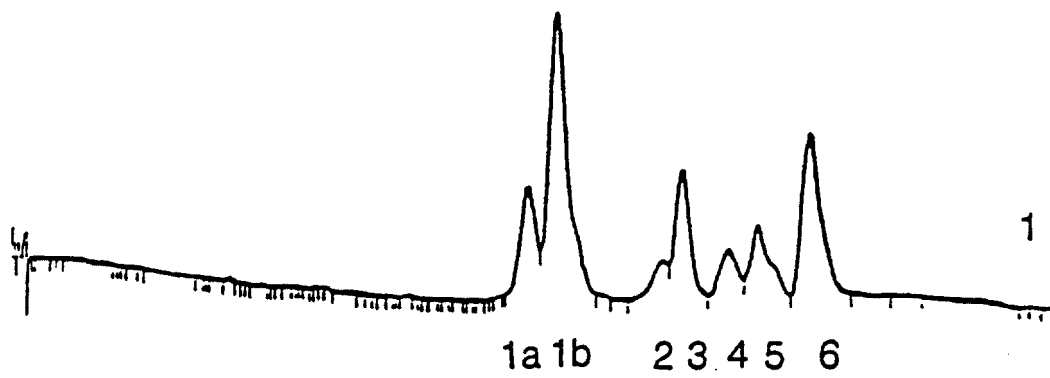
Добавляемый ИФН (100 МЕд/мл)	Пик 1 a+b	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5	Пик 6	
Ингибирующая активность в отношении ВИЧ-1, %	0	26	95	75	87	88	98



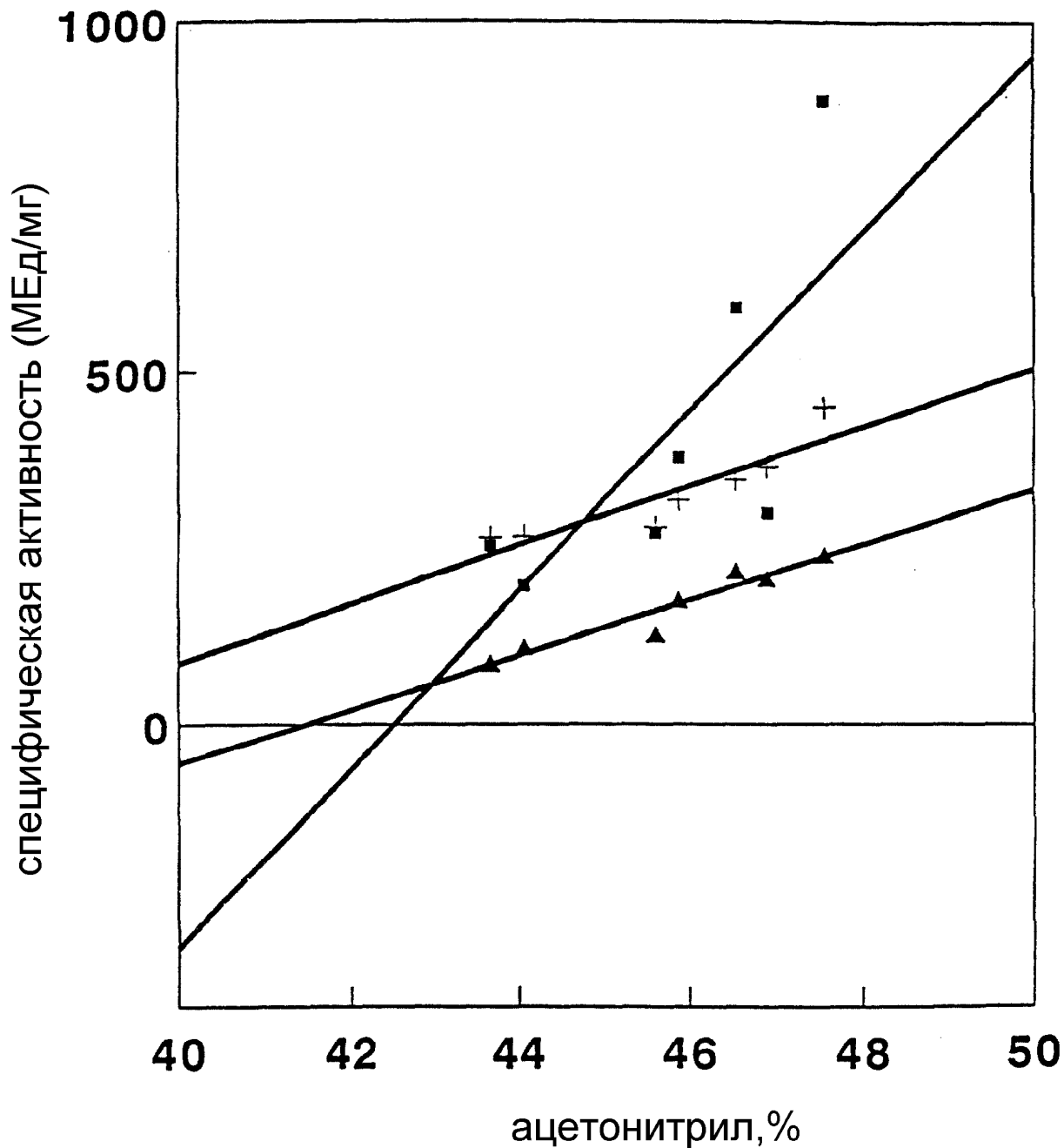
Фиг. 2



Фиг. 3



ФИГ.4

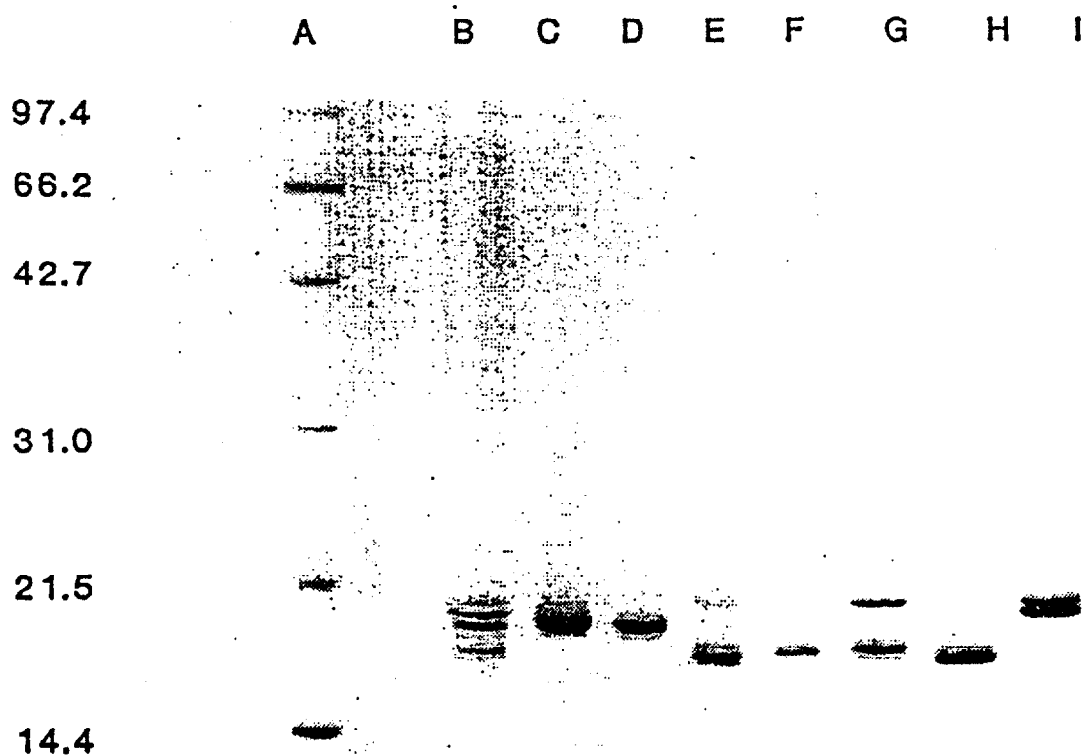


▲ AP, DAUDI ⊕ CPE, MDBK ■ CPE, HEp2

Фиг.5

СРЕДНЯЯ МОЛ. МАССА

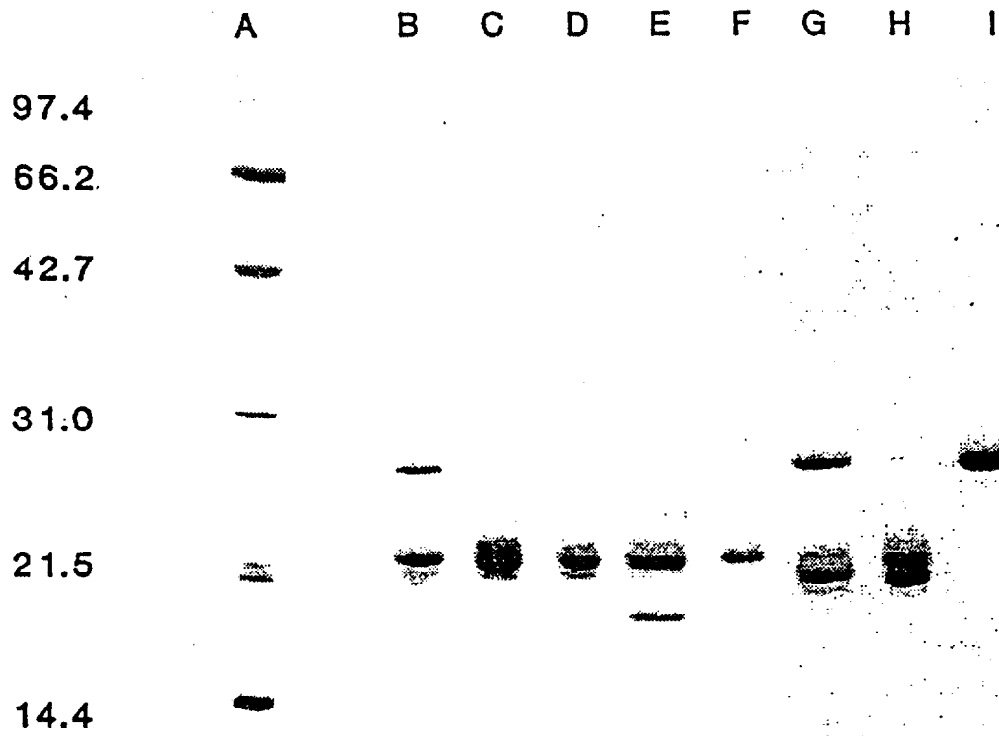
(кДа)



НЕВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ УСЛОВИЯ

Фиг.6

СРЕДНЯЯ МОЛ. МАССА
(кДа)

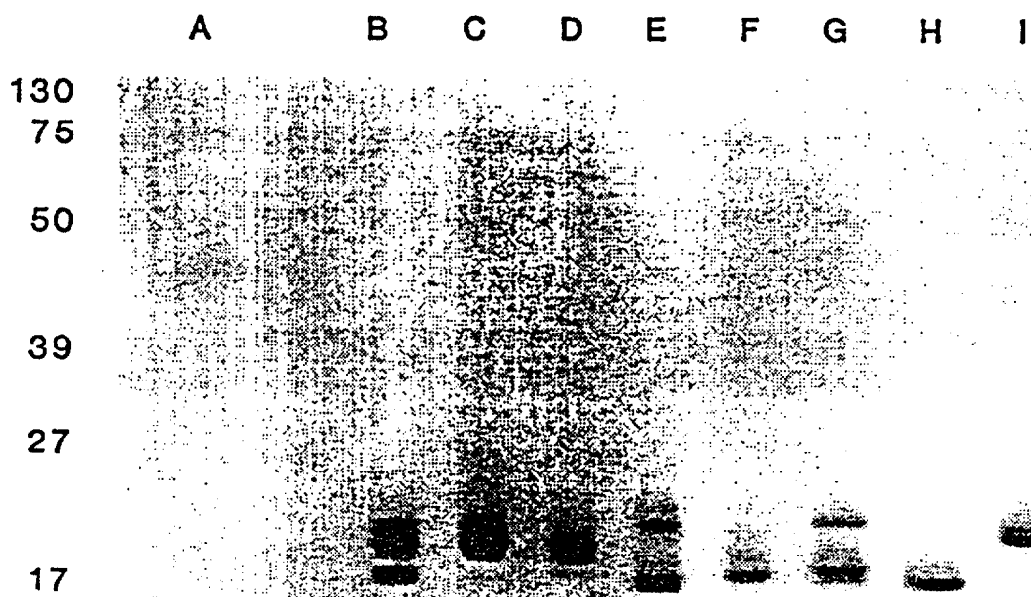


ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ УСЛОВИЯ

Фиг.7

СРЕДНЯЯ МОЛ. МАССА

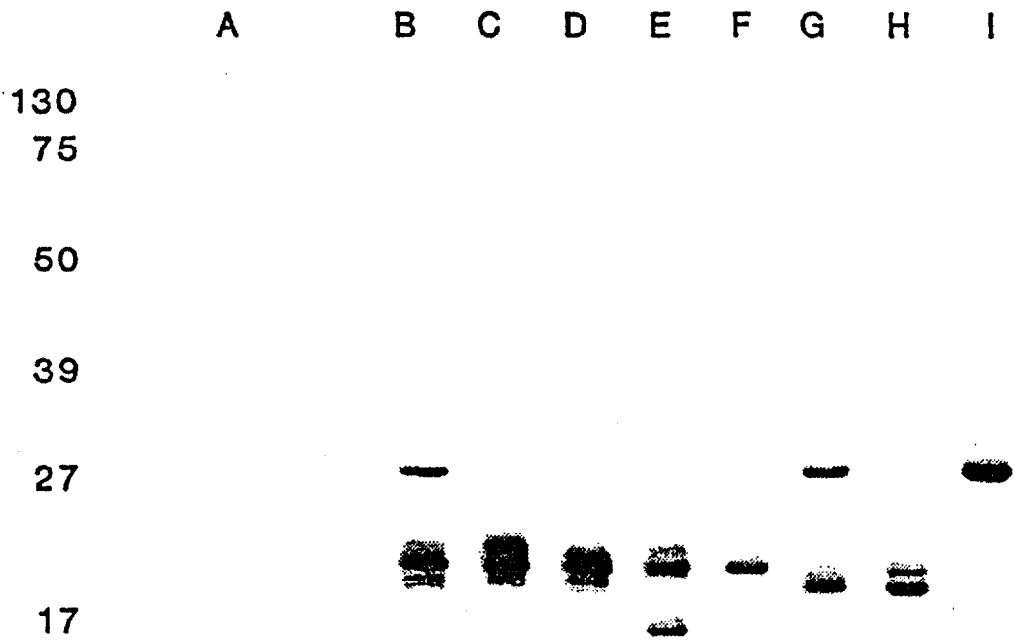
(кДа)



НЕВОСТАНА ВЛИВАЮЩИЕ УСЛОВИЯ

Фиг.8

СРЕДНЯЯ МОЛ. МАССА
(кДа)



ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ УСЛОВИЯ

Фиг.9