

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036509**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.11.18

(21) Номер заявки
201892671

(22) Дата подачи заявки
2017.06.16

(51) Int. Cl. *A61K 38/21* (2006.01)
C07K 14/56 (2006.01)

(54) **ПЕГИЛИРОВАННЫЙ СВИНОЙ ИНТЕРФЕРОН И СПОСОБЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/352,163**

(32) **2016.06.20**

(33) **US**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/US2017/037964**

(87) **WO 2017/222940 2017.12.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЭЛАНКО ЮЭС ИНК.; АМБРКС,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Кэннинг Питер Коннор, Кнудсен
Николас, Скидмор Лиллиан (US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Строкова О.В.,
Гизатуллин Ш.Ф., Гизатуллина Е.М.,
Лебедев В.В., Лыу Т.Н., Глухарёва
А.О. (RU)**

(56) **CN-A-104262480**

US-A1-2008132681

US-A1-2007237743

LEFEVRE F. ET AL.: "Molecular cloning and sequencing of a gene encoding biologically active porcine alpha-interferon", J. INTERFERON RES., vol. 6, no. 4, 1 August 1986 (1986-08-01), pages 349-360, XP055396551, abstract page 356; figure 5 page 357; table 1

(57) В документе раскрыты варианты свиного интерферона альфа (pIFN- α), содержащие синтетическую аминокислоту в выбранных местоположениях в pIFN- α и вставку одной или двух аминокислот на N-конце после удаления сигнального пептида. Варианты pIFN- α могут быть дополнительно пегилированными. Также предполагаются способы получения и введения этих соединений для лечения вирусных инфекций у свиней и составы, содержащие данные варианты.

B1

036509

036509

B1

Данное изобретение содержит перечень последовательностей, который был предоставлен в формате ASCII с использованием EFS-Web и который таким образом включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 15 июня 2017 г., имеет название 204257_0028_561478_SL_ST25.txt и размер 45280 байтов.

Введение интерферона альфа (IFN- α) имеет медицинские последствия, которые необходимо оценить и контролировать. Например, аутоиммунные реакции также могут индуцироваться у людей терапией хронического вирусного гепатита с использованием IFN- α . Таким образом, лечение людей, в целом, было ограничено пациентами, которые нуждались в терапии, поскольку терапия может усугублять ранее существующие аутоиммунные реакции, демаскировать скрытые аутоиммунные процессы или даже индуцировать аутоиммунные заболевания *de novo*. F.L. Dumoulin et al., "Autoimmunity induced by interferon- α therapy for chronic viral hepatitis", *Biomed. & Pharmacother.*, 53: 242-54 (1999). Также наблюдали, что интерферон- α оказался неспособен к лечению инфекций вирусом гепатита С у людей.

Также наблюдали, что интерферон оказался эффективным для лечения некоторых людей с вирусом гепатита С (HCV) в такой степени, что на данный момент клиническое применение у людей имеют две пегилированные формы интерферона альфа (IFN- α), т.е. пегинтерферон- α -2а и пегинтерферон- α -2b, также известные как PEGASYS® и PEGINTRON® соответственно. Пока остается неясным то, как IFN- α ингибирует репликацию HCV. Что более интересно, пегинтерферон- α -2а и пегинтерферон- α -2b характеризуются только 7% и 28% активностью, соответственно, по сравнению с их нативными формами (диким типом).

В процессе получения интерферона были созданы различные варианты для лечения человека с целью повышения биологической доступности и содействия продуцированию белка. Один пример приведен в патенте США № 8106160, в котором обсуждается добавление одного или нескольких аминокислотных остатков к N-концевому цистеину зрелого человеческого интерферона α -2b для снижения образования дисульфидных связей, не характерных для естественных условий, и, вследствие этого, снижения уровня структурных изоформ. Он включает добавление пролинового остатка на N-конце.

Способы введения не встречающихся в естественных условиях аминокислот, вставленных в сайты в белке, описаны, например, в международной заявке WO 2010/011735 и в международной заявке WO 2005/074650.

Свиной интерферон α -1 дикого типа имеет длину 189 аминокислот и находится под кодом доступа X57191 в GenBank.

Требуются формы интерферона- α для применения у животных и в животноводстве, в особенности в лечении популяций свиней, чувствительных к вирусным инфекциям, и еще более конкретно в лечении популяций свиней с активными и протекающими вирусными инфекциями для защиты стад свиней от патологии, ассоциированной с вирусной инфекцией. Будет благоприятно обнаружить вариант IFN- α для применения у животных-свиней, который имеет продолжительное действие и является полезным для ингибирования или снижения репликации вируса, патологии в стаде и гибели животных, связанной с вирусной инфекцией. Вариант свиного IFN- α будет сохранять биологическую активность, будет иметь более длительный период биологической доступности и будет иметь малое число изоформ, что обеспечивает возможность более простой очистки.

На фиг. 1 изображена плаزمида pKG0083 с rIFN- α -PS-E107amber, который включает в себя N-концевую вставку пролин-серина. Эта плаزمида управляет продукцией варианта белка с SEQ ID NO: 14 клеточной линией AXID2820.

На фиг. 2 изображены результаты выравнивания последовательностей и идентификаторы последовательностей для вариантов rIFN- α , имеющих синтетическую аминокислоту pAF, заменяющую остатки Q102, E103, E107, L112 и Y136. У всех последовательностей отсутствует сигнальная последовательность для rIFN- α . У последовательностей либо отсутствует (SEQ ID NO: 6, 9, 12, 15 и 18) дополнительная аминокислота на N-конце, либо они имеют пролин (SEQ ID NO: 7, 10, 13, 16 и 19) или пролин-серин, добавленные на N-конце (SEQ ID NO: 8, 11, 14, 17 и 20).

На фиг. 3 изображена последовательность мотива SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 является такой же, как SEQ ID NO: 1, но включает в себя N-концевой метионин, который обычно отщепляется при созревании зрелого варианта rIFN- α . SEQ ID NO: 3 включает в себя сигнальную последовательность, но у нее отсутствует вставка пролина, пролина-серина и/или метионина. SEQ ID NO: 4 представляет собой зрелый rIFN- α дикого типа. SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность дикого типа с метионином на N-конце.

На фиг. 4 в таблице изображены различные варианты rIFN- α с Q102, E103, E107, L112 и 136, либо не имеющие дополнительного остатка, либо имеющие пролин или пролин-серин, присоединенные на N-конце, как указано в положениях X_a и X_b. Под "abs" подразумевается отсутствие. SEQ ID NO: 1 приведена для сравнения.

На фиг. 5 изображены результаты выравнивания последовательностей для трех дополнительных вариантов rIFN- α , в которых pAF заменяет H7, R34 и H40. Эти последовательности либо не имеют про-

лина или пролин-серина на N-конце, либо они не имеют N-концевого метионина. Сайты мутации изображены в рамке в последовательности рIFN- α WT над таблицей, и в таблице они изображены в виде "X" в рамке. X_a и X_b являются такими, как определено в таблице. Под "abs" подразумевается отсутствие.

На фиг. 6 изображены дополнительные синтезированные мутации в E107, в которых серии (SEQ ID NO: 24), серин-глицин (SEQ ID NO: 25) и гистидин (SEQ ID NO: 26) добавлены на аминоконце варианта рIFN- α , имеющего рAF, заменяющую E107 (представленный как "X" в рамке). X_a и X_b являются такими, как определено в таблице. Под "abs" подразумевается отсутствие.

В данном документе представлены варианты свиного интерферона- α (рIFN- α) и способы их применения, которые можно применять у животных, которые не являются вакцинированными, таких как невакцинированные новорожденные поросята, а также животные с угнетенным иммунитетом, т.е. беременные свиньи (беременные свиноматки или молодые свиньи); у животных, которым вакцинация предоставляет недостаточную защиту; у животных, чувствительных к инфекции вирусом, для которого нет доступной эффективной вакцины; и у животных, инфицированных в настоящее время. Эти композиции и способы применения будут предупреждать инфекцию в случае вспышки вирусной инфекции. Композиции также можно применять для снижения тяжести заболевания у инфицированной свиньи. В целом, введение осуществляют по схеме дозирования с введением одной дозы. В качестве альтернативы и если это необходимо, дозы могут быть обеспечены с интервалом примерно 1-3 или 2 недели, причем, необязательно, вводят только одну-две дозы.

Свиной интерферон- α (рIFN- α) дикого типа, который включает в себя сигнальную последовательность из 23 остатков, представляет собой:

maptsaflta lvllscaic slgcdlpqth slahtralrl laqmrrisfp scldhrrdfg
 spheafggnq vqkaqamalv hemlqqtflq fstegsaaaw nesllhqfct gldqqldle
 acvmqeagle gtplleedsi lavrkyfhrl tlylqeksys pcaweivrae vmrsfsssrn
 lqdrllrkke (SEQ ID NO: 3).

Выделенная двойным подчеркиванием часть представляет собой сигнальную последовательность, которая не присутствует в зрелой форме рIFN- α дикого типа.

В данном документе представлен вариант (рIFN- α). В варианте пропущена сигнальная последовательность из 23 аминокислот. Вариант может иметь метиониновый остаток на аминоконце, который может быть отщеплен в зрелой форме белка. Этот метионин не присутствует в форме рIFN- α дикого типа. Вариант рIFN- α дополнительно имеет вставку одной или двух аминокислот между метионином сигнальной последовательности и N-концевым цистеином. Вставка представляет собой либо пролин, либо пролин-серин. Последовательность представлена ниже

MX_aX_bCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAM
ALVHEMLQQTFLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLL
EEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLLRKKE (SEQ ID
NO: 2).

X_b (положение 3 в SEQ ID NO: 2) либо представляет собой любой из пролина, серина, либо отсутствует. X_a (положение 2 в SEQ ID NO: 2) либо отсутствует, либо представляет собой пролин. Если X_b отсутствует, X_a отсутствует, если X_b представляет собой пролин, X_a отсутствует, и если X_b представляет собой серин, X_a представляет собой пролин. Выделенный жирным шрифтом остаток глутаминовой кислоты E располагается ниже X_a по направлению транскрипции, и X_b представляет собой сайт замены синтетической аминокислотой, т.е. рAF.

Вариант рIFN- α дополнительно имеет синтетическую аминокислоту, параацетилфенилаланин (рAF), заменяющую одно из 5 местоположений в SEQ ID NO: 1: остаток E103 (SEQ ID NO: 9-11 соответственно), E107 (SEQ ID NO: 12-14 соответственно), L112 (SEQ ID NO: 15-17 соответственно), Y136 (SEQ ID NO: 18-20) или Q102 (SEQ ID NO: 6-8 соответственно) (нумерация в соответствии с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4, без N-концевого Met).

Вариант рIFN- α может быть дополнительно пегилирован на рAF. Вариант рIFN- α может быть пегилирован с использованием PEG с молекулярной массой от приблизительно 5 до приблизительно 40 кДа или PEG с молекулярной массой 30 кДа. Вариант рIFN- α может быть пегилирован с использованием линейного оксиамино-PEG с молекулярной массой 30 кДа. Активированная оксиаминогруппа хемоселективно реагирует с ацетильной боковой цепью, присутствующей на синтетической аминокислоте, такой как параацетилфенилаланин. Вариант рIFN- α имеет линейный PEG с молекулярной массой 30 кДа, ковалентно связанный с рAF, заменяющей E107 (SEQ ID NO: 12-14) (нумерация в соответствии со зрелой последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4). Вариант рIFN- α с E107 может дополнитель-

но иметь пролин или пролин и серии на N-конце, что отражено в SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно.

Варианты рIFN- α могут быть включены в составы. Состав, содержащий варианты рIFN- α , может содержать 20 мМ ацетат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 5% глицерин при pH 5,0 с титром свиного IFN- α , составляющим от 2,0 до 6,0 г/л.

Составы могут быть получены с помощью способа, предусматривающего стадии:

- (a) очистка рIFN- α ;
- (b) растворение указанного очищенного варианта рIFN- α в 50 мМ Tris, 6М гуанидине при pH 8;
- (c) инкубирование растворенного варианта рIFN- α при комнатной температуре в течение 16-24 ч в 20 мМ Tris, 1М аргинине, 10 мМ метионине (met), 1 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) при pH 8,0 для обеспечения возможности рефолдинга белка;
- (d) удаление оставшихся ацетилированных вариантов с помощью хроматографического разделения на сильной анионообменной смоле;
- (e) конъюгирование варианта рIFN- α с PEG при соотношении PEG к белку, составляющем от 1:1 до 1:8 или от 1:1 до 1:2; и
- (f) очистка пегилированного варианта рIFN- α .

Варианты рIFN- α и составы с ними можно применять для лечения вирусной инфекции. Способ лечения вирусной инфекции у свиньи предусматривает подкожное введение варианта рIFN- α свинье в количестве любого из вариантов свиного интерферона- α (рIFN- α), составляющем от 25 до 150 мкг/кг массы животного. Способ может дополнительно предусматривать второе введение варианта рIFN- α в количестве от приблизительно 25 до приблизительно 150 мкг/кг массы животного. Если способ включает второе введение, второе введение может происходить приблизительно через 7, 14 или 21 сутки после первого введения.

Способ лечения вирусной инфекции можно применять для лечения вирусной инфекции, выбранной из группы, состоящей из вируса свиного репродуктивного и респираторного заболевания, вируса ящура, вируса свиного гриппа, свиного цирковируса, свиного вируса эпизоотической диареи и вируса трансмиссивного гастроэнтерита. Способ можно применять для лечения новорожденного поросенка или беременной свиньи.

Также предполагается применение любого из вариантов рIFN- α (или состава, содержащего вариант) в терапии у свиньи для лечения вирусной инфекции, причем инфекция может быть вызвана любым из вирусов, обсуждаемых в данном документе.

Также описывается применение варианта рIFN- α для применения в производстве лекарственного средства для лечения вирусной инфекции у свиньи. Свинья может представлять собой новорожденного поросенка или беременную свинью.

Под "введением" подразумевается инъекция терапевтически эффективного количества соединений и композиций, содержащих указанные раскрытые соединения.

Введение может быть внутримышечным (i.m.) или подкожным (s.c). Количество вводимого варианта рIFN- α будут устанавливать на основании массы животного, например, при этом беременные свиньи получают большее количество, чем новорожденные поросята.

Составы, раскрытые в данном документе, также могут быть помещены во флакон с одной дозой или многодозовый флакон.

Свинья, подвергающаяся лечению с помощью способов, описанных в данном документе, будет представлять собой новорожденного поросенка или беременную свинью (беременную молодую свинью или свиноматку).

Под терминами "лечить", "осуществлять лечение" или "лечение" подразумевается снижение или ослабление одного или нескольких симптомов, ассоциированных с инфекцией одним из вирусов, упомянутых в данном документе. Композицию можно дополнительно применять в производстве лекарственного средства для лечения вирусной инфекции у свиньи. Композицию или лекарственное средство можно применять для лечения свиньи. Свинья может представлять собой новорожденного поросенка или беременную свинью.

Будут подробно обсуждаться соединения, составы с указанными соединениями, способы получения составов и способы применения соединений и составов для лечения свиней (подсвинков или хряков), имеющих вирусную инфекцию.

В контексте данного документа и пунктов приложенной формулы изобретения формы единственного числа включают в себя соответствующие формы множественного числа, если контекст явно не указывает иное, и использование форм множественного числа, в свою очередь, также может охватывать использование в единственном числе.

"Синтетическая аминокислота" относится к аминокислоте, которая не является одной из 20 распространенных аминокислот, или пирролизинном, или селеноцистеином. Примеры таких синтетических аминокислот включают в себя, без ограничения, парацетилфенилаланин (pAF), ацетилглюкозаминил-L-серин и N-ацетилглюкозаминил-L-треонин. Для дополнительных подробностей относительно таких синтетических аминокислот и их включения и модификации, см. международные заявки WO 2010/011735 и

WO 2005/074650.

Термин "субъект" в контексте данного документа относится к свинье, в особенности к домашней свинье (*Sus scrofa domesticus* или *Sus domesticus*), и может включать в себя карликовых свиней, а также их породы, которые разводят для получения мяса. Предполагается, что термины "свинья", "хряк" или "подсвинок" включают в себя все породы свиней.

Используемый термин "эффективное количество" относится к такому количеству варианта рIFN- α , которое при введении будет обеспечивать предупреждение, лечение или снижение переноса свиного вируса от инфицированного животного к неинфицированному животному или будет обеспечивать предупреждение, лечение или снижение симптома заболевания, вызванного инфекцией свиным вирусом. В данном документе раскрыты варианты свиного интерферона альфа (рIFN- α). Эти варианты имеют синтетические аминокислоты, заменяющие различные положения в последовательности свиного IFN- α . Ген рIFN- α *Sus scrofa domestica* (GenBank X57191), в котором подчеркнутая лидерная последовательность (остатки 1-23 в SEQ ID NO: 3) удалена, как представлено ниже (в ориентации от amino- к карбоксиконцу)

MAPTSAFLTALVLLSCNAICSLGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFG
 SPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLR
 DLEACVMQEAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFS
 SSRNLQDRLRKKE. (SEQ ID NO:3).

Зрелая последовательность представляет собой

CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV
 EMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLLEEDS
 IRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ ID NO:

4). Подчеркнутая сигнальная последовательность на N-конце SEQ ID NO: 3 может быть заменена на другую сигнальную последовательность или даже на один метиониновый остаток, например, для транскрипции in vitro, что приводит в результате к следующей последовательности:

MCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQA
 MALVHEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTP
 LLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ
 ID NO: 5)

или она может включать в себя остатки пролина или пролин-серина между N-концевым метионином и цистеином (см. SEQ ID NO: 2). Можно применять другие родственные свиные последовательности.

Варианты рIFN- α имеют синтетические аминокислоты, введенные в одно из следующих местоположений на *Sus scrofa domestica* (при использовании нумерации, соответствующей зрелой последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4): Q102 (SEQ ID NO: 6), E103 (SEQ ID NO:9), E107 (SEQ ID NO: 12), L112 (SEQ ID NO: 15) и Y136 (SEQ ID NO: 18) (которые выделены жирным шрифтом и подчеркиванием в последовательности выше), а также изображены на фиг. 2-4. У зрелого рIFN- α N-концевой метиониновый остаток (например, остаток 1 в SEQ ID NO: 5) может отщепляться при созревании.

Синтетические аминокислоты и их включение являются такими, как обсуждается, например, в международной заявке WO 2010/011735. Синтетические аминокислоты можно применять у *Escherichia coli* (*E. coli*) (например, L. Wang, et al., (2001), Science 292: 498-500) и у эукариота *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (например, J. Chin et al., Science 301: 964-7 (2003)), которые обеспечивают возможность включения синтетических аминокислот в белки in vivo.

Из пяти (5) перечисленных вариантов с заменой на синтетическую аминокислоту, характеризующихся биологической активностью (замены на рAF в одном из пяти остатков E103, E107, L112, Y136 или Q102, которые выделены подчеркиванием в последовательности ниже), эти варианты могут быть дополнительно модифицированы посредством вставки аминокислот на N-конце молекулы. Например, пролин (Pro) или пролин-серин (Pro-Ser) могут быть вставлены между N-концевым Met и Cys.

В зрелой форме вариантов будет исключен N-концевой метионин.

В данном документе описываются способы получения полипептида рIFN- α , связанного с водорастворимым полимером. Подразумевается, что термины "пегилирование" и "пегилированный" относятся к ковалентному связыванию определенной синтетической аминокислоты с молекулой полиэтиленгликоля (PEG). Способ может предусматривать приведение в контакт выделенного полипептида рIFN- α , содержащего синтетическую аминокислоту, с водорастворимым полимером, содержащим фрагмент, который реагирует с синтетической аминокислотой.

Молекула поли(этиленгликоля) может характеризоваться молекулярной массой, составляющей от приблизительно 0,1 до приблизительно 100 кДа. Молекула поли(этиленгликоля) может характеризоваться молекулярной массой, составляющей от 0,1 до 50 кДа, от 20 до 40 кДа и любое значение в виде целого числа от 25 до 35 кДа. Молекула поли(этиленгликоля) может характеризоваться молекулярной массой,

составляющей приблизительно 30 кДа. Молекула поли(этиленгликоля) может представлять собой линейную молекулу, характеризующуюся молекулярной массой, составляющей от 0,1 до 50 кДа, от 20 до 40 кДа и любое значение в виде целого числа от 25 до 35 кДа. Молекула поли(этиленгликоля) может представлять собой линейную молекулу, характеризующуюся молекулярной массой, составляющей 30 кДа. Молекула поли(этиленгликоля) может иметь аминоксигруппу, способную к реакции с ацетильной группой на синтетической аминокислоте. Молекула поли(этиленгликоля) может представлять собой линейный PEG молекулярной массой 30 кДа с активированной аминоксигруппой, способный к образованию оксимной связи с ацетильной боковой цепью параацетилфенилаланина.

Один rIFN- α имеет линейный PEG, который характеризуется молекулярной массой приблизительно 30 кДа, прикрепленный к остатку rAF.

Варианты, которые обсуждались выше и которые обсуждаются далее по тексту, могут быть дополнительно смешаны в составе с различными вспомогательными веществами, стабилизаторами, буферами и другими компонентами для введения животным. Идентификация подходящих составов в отношении стабильности, введения животным и активности не является простой задачей. Наоборот, состав должен быть адаптирован для каждого соединения, исходя из требований к очистке этого соединения, стабилизатора, необходимого для сохранения соединения, и различных других компонентов состава.

Подходящие соли для включения в состав включают в себя хлорид натрия, хлорид калия или хлорид кальция.

Ацетат натрия можно применять в качестве буферного средства и/или стабилизирующего средства.

Подходящие буферы могут включать в себя фосфатно-цитратный буфер, фосфатный буфер, цитратный буфер, L-гистидин, L-аргинина гидрохлорид, бикарбонатный буфер, сукцинатный буфер, цитратный буфер и TRIS буфер либо отдельно, либо в комбинации.

Состав также может включать в себя криопротектор. Криопротекторы могут включать в себя криопротектор, выбранный из группы, состоящей из гидроксипропил- β -циклодекстрина (HPBCD), сукралозы и поливинилпирролидона 4000 (PVP 4000).

Состав, необязательно, может включать в себя поверхностно-активное вещество. Подходящие поверхностно-активные вещества включают в себя полисорбаты (например, полисорбат 80), додецилсульфат (SDS), лецитин либо отдельно, либо в комбинации.

Состав может представлять собой водную композицию, или он может иметь форму восстановленной жидкой композиции или присутствовать в виде порошка. Кроме того, состав можно хранить во флаконе или картридже или в предварительно заполненном стерильном шприце, готовом для введения субъекту.

pH состава может находиться в диапазоне от 4,0 до 7,0 или от 4,5 до 6,5, когда состав имеет форму жидкости.

Подходящие вирусные инфекции, лечение которых можно осуществлять, включают в себя, без ограничения, коронавирусы, пестивирусы (вирус чумы свиней или классической чумы свиней, CSF), коронавирусы, вызывающий трансмиссивный гастроэнтерит (TGEV), свиной артеривирус (PoAV), вирус свиного репродуктивного и респираторного синдрома (PRRSV), свиной цирковирус (PCV), вирус свиной эпизотической диареи (PEDV), вирус ящура (FMDV), свиной коронавирусы, такой как свиной дельтакоронавирус (PDCoV), и вирус свиного гриппа (SIV).

Введение варианта или состава, содержащего вариант, может представлять собой введение единственной дозы или за введением одной дозы следует введение второй дозы через 7-21 сутки после первой дозы, например приблизительно через 14 суток после первой дозы. Животному вводят вариант в количестве, составляющем от приблизительно 25 до приблизительно 150 мкг/кг варианта на 1 кг массы животного. Другой диапазон эффективных количеств варианта rIFN- α составляет от приблизительно 50 мкг/кг до приблизительно 100 мкг/кг массы животного. Вариант можно вводить в составе или сам по себе. Вариант можно вводить однократно, например, перед вспышкой заболевания. Вариант также можно вводить после вспышки вирусной инфекции стаду с целью предотвращения дальнейших потерь в стаде. Вариант или состав с ним можно вводить во второй раз. Второе введение можно назначать после периода от приблизительно 7 до приблизительно 21 суток после первого введения, например через 14 суток после первого введения. Дополнительные введения могут предполагаться, если они необходимы для снижения или предупреждения заболевания, ассоциированного с вирусными инфекциями.

Специалисту в данной области техники будет очевидно, что различные модификации и изменения могут быть выполнены без отступления от идеи или объема композиций, соединений и способов, раскрытых в данном документе. Таким образом, предполагается, что настоящим изобретением покрываются модификации и варианты настоящего изобретения при условии, что они попадают в объем пунктов прилагаемой формулы изобретения и их эквивалентов.

Примеры

Пример 1. Варианты с rAF.

Одиннадцать (11) вариантов с rAF создают и сравнивают относительно rIFN- α дикого типа (wt). Из них три варианта rIFN- α исключают из продолжающегося исследования вследствие плохой экспрессии

белка/проблем с продуцированием в случае синтетических аминокислот, замещенных в различных точках в рIFN- α .

AXID2820 имеет плазмиду рKG0083 с рIFN- α -E107amber и N-концевой вставкой пролин-серина (фиг. 1). Нумерация остатков была стандартизирована для обеспечения соответствия последовательности рIFN- α дикого типа (SEQ ID NO: 4). Аминокислотную последовательность свиного интерферона- α -1 дикого типа получают из GenBank (номер доступа X57191). Соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты синтезируют и клонируют в вектор экспрессии. Стоп-кодон "янтарь" (TAG) вставляют в кодон глутаминовой кислоты, соответствующий положению аминокислоты 107 (или другим положениям, которые указаны) в кодирующем участке зрелой последовательности дикого типа. Нуклеиновые кислоты, кодирующие Pro-Ser, вставляют на аминоконец после иницирующего метионинового кодона (AUG). Для подтверждения того, что клонирование и последующий мутагенез протекали, как ожидается, без включения нежелательной(нежелательных) мутации(мутаций), полную последовательность плазмидной ДНК рKG0083 подвергают секвенированию.

Восемь (8) вариантов рIFN- α в табл. 1 были способны экспрессироваться в виде белка. Эти восемь вариантов также пегилируют с использованием линейного PEG молекулярной массой 30 кДа с активированной аминокислотной группой. Пегилирование вариантов осуществляют посредством доведения раствора белка (при концентрации белка, составляющей примерно 20 мг/мл или более) до pH 4,0 с использованием 10% ледяной уксусной кислоты. Гидразид уксусной кислоты добавляют до конечной концентрации 100 мМ и оксамино-PEG добавляют в молярном отношении от 1:1 до 2:1 или вплоть до приблизительно 8:1 относительно варианта рIFN α . Реакции позволяют протекать в течение 1-3 суток при 28-30°C в темноте. Реакцию гасят посредством 5-кратного разведения реакционной смеси 30 мМ ацетатом натрия, pH 5,0. Эти 8 пегилированных вариантов анализируют с использованием гель-хроматографии (SEC), как показано в табл. 1. Варианты рIFN- α являются такими же, как рIFN- α дикого типа, за исключением замены на рAF в указанном остатке, например His7 заменяли на рAF, Arg34 заменяли на рAF и так далее. Концентрация белка указана в мг/мл. "RP" обозначает обращенную фазу (т.е. обращенно-фазовую хроматографию или RP-HPLC).

Таблица 1

Получение пегилированных вариантов рIFN α

Образец	Конц. белка (мг/мл)	% от главного пика согласно RP	% мономера согласно SEC
рIFN- α wt SEQ ID NO: 4	1,5	69,4	99,5
рIFN α -H7-PEG30 SEQ ID NO: 21	2,6	67,0	94,7
рIFN α -R34-PEG30 SEQ ID NO: 22	2,2	73,8	99,6
рIFN α -Q102-PEG30 SEQ ID NO: 6	1,9	68,1	97,7
рIFN α -E103-PEG30 SEQ ID NO: 9	2,1	58,2	96,3
рIFN α -E107-PEG30 SEQ ID NO: 12	1,9	60,2	98,2
рIFN α -L112-PEG30 SEQ ID NO: 15	3,4	60,1	98,3
рIFN α -Y136-PEG30 SEQ ID NO: 18	2,1	51,9	99,1
рIFN α -H40-PEG30 SEQ ID NO: 23	1,9	52,1	98,7

SEC выполняют с использованием системы для HPLC, способной к детекции при нескольких длинах волны (Agilent 1100 или 1200 или эквивалент). Подвижная фаза представляет собой 200 мМ фосфат калия, 250 мМ хлорид калия, pH 6,0, 10% изопропанол (IPA).

Эти 8 вариантов исследуют в *in vitro* анализе биологической активности. Коммерчески доступный набор для анализа интерферона iLite™ huIFN α от Pestka Biomedical Laboratories, Inc. (Пискатауэй, Нью-Джерси, США) используют для исследования биологической активности рIFN- α . Кратность потери активности у вариантов PEG рассчитывают относительно белка Ambrx WT следующим образом:

$$\text{Кратность потери активности PEG-варианта} = \frac{\text{EC50 PEG-варианта}}{\text{EC50 Ambrx WT}}$$

Как показано в табл. 2, из восьми исследуемых вариантов три варианта рIFN- α характеризовались значительно меньшей активностью, чем непегелированный рIFN- α дикого типа.

Таблица 2

Порядок по рангу	Исследуемый образец	Кратность потери активности по сравнению с рIFN α WT	EC50 [нг/мл] Исследуемый образец	EC50 [нг/мл] Ambrx рIFN α WT
1	рIFN α E103-PEG30K	8x	184	22
2	рIFN α L112-PEG30K	15x	475	32
3	рIFN α E107-PEG30K	23x	731	32
4	рIFN α Y136-PEG30K	26x	874	33
5	рIFN α Q102-PEG30K	32x	693	22
6	рIFN α H40-PEG30K	171x	5662	33
7	рIFN α H7-PEG30K	387x	8761	23
нет активности	рIFN α R34-PEG30K	нет активности	нет активности	23

У контрольного рIFN- α дикого типа отсутствует сигнальный пептид, нет вставленных N-концевых аминокислот (метионин, пролин или серин), нет замены любой аминокислоты на рAF, и он не является пегелированным (SEQ ID NO: 4).

В результате этих экспериментов пегелированные варианты рIFN- α , имеющие замену на рAF в H40 (SEQ ID NO: 23), H7 (SEQ ID NO: 21) и R34 (SEQ ID NO: 22), считаются бесполезными вариантами рIFN- α для лечения вирусной инфекции у свиней вследствие низких уровней их активности по сравнению с диким типом в анализе iLite™ huIFN α .

В анализе методом RP-HPLC и пегелированных, и непегелированных вариантов для результатов в табл. 2 используется подвижная фаза А (0,05% TFA/вода) и подвижная фаза В (0,05% TFA/ACN).

Пример 2. Исследование *in vivo*.

Восемнадцать крыс линии Спраг-Дуули (n=3 в группе) получают дозу 0,2 мг/кг каждого из 6 исследуемых образцов (ресуспендированных в 20 мМ ацетате натрия, pH 5,0, 100 мМ NaCl и 5% глицерине) подкожно в заднюю часть шеи, отдаленную от катетера: (1) рIFN α -E103-PEG30K (пегелированная SEQ ID NO: 9), (2) рIFN α -L112-PEG30K (пегелированная SEQ ID NO: 15), (3) рIFN α -E107-PEG30K (пегелированная SEQ ID NO: 12), (4) рIFN α -Y136-PEG30K (пегелированная SEQ ID NO: 18) и (5) рIFN α -a-Q102-PEG30K (пегелированная SEQ ID NO: 6).

Варианты рIFN- α растворяют в 20 мМ ацетате натрия с pH 5,0, 100 мМ NaCl и 5% глицерине. Каждому животному вводят инъекцией подкожно (т.е. в заднюю часть шеи) один из 5 вариантов или рIFN- α дикого типа (такого же, как используется в примере 1) с образованием, таким образом, 6 тестовых групп, по 3 крысы в каждой.

Забор образцов осуществляют в следующие моменты времени: перед введением дозы и после введения дозы через 1 ч, 6 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 144 ч, 192 ч и 240 ч после введения дозы. Образцы крови получают через катетер в яремной вене, или через боковую хвостовую вену, или в момент завершения эксперимента посредством прокола сердца и их подвергают обработке, позволяя крови свернуться и удаляя образующуюся в результате сыворотку. Концентрации каждого пегелированного варианта рIFN- α определяют с помощью анализа связывания лиганда при использовании моноклонального антитела к PEG для захвата и козьего поликлонального антитела к свиному IFN- α для выявления. AUC_{last} , C_{max} , T_{max} рассчитывают посредством анализа необработанных данных с использованием программного обеспечения WINNONLIN® для моделирования PK (фармакокинетических) свойств (Pharsight Corporation, сейчас Certara USA, Inc.). Воздействие (AUC_{last}) для пегелированных вариантов делили на воздействие для рIFN дикого типа (рIFN WT) с получением кратности различий. Результаты для пегелированных вариантов представлены ниже в табл. 3.

Биологическая доступность пегилированных вариантов IFN- α

Соединение	Животное №	AUC _{last}	Кратность различия в сравнении с rIFN WT	C _{max} (нг/мл)	T _{max} час	Оцен. T _{1/2} час
		(нг*час/мл)				
PEG Q102 rIFN α	Среднее значение	12500	133	339	24	16,3
	SD	686				
PEG E107 rIFN α	Среднее значение	9420	100	246	24	17,6
	SD	2590				
PEG L112 rIFN α	Среднее значение	6000	64	165	24	12,7
	SD	510				
PEG E103 rIFN α	Среднее значение	5210	55	147	18	11,7
	SD	365				
PEG Y136 rIFN α	Среднее значение	5140	55	141	24	12,4
	SD	788				
WT rIFN α SEQ ID NO: 4	Среднее значение	94,2	1	81	1	NC
	SD	49,3				

"DN" обозначает "нормализованный к дозе"; единицы для DN AUC_{last} представляют собой (нг·ч/мл)/(мг/кг), а для DN C_{max} представляют собой (нг/мл)/(мг/кг). C_{max} используют для расчета периода полужизни. Тем не менее, пегилированный по E107 вариант rIFN- α характеризовался наибольшим периодом полужизни из пяти (5) вариантов. "NC" означает "не поддающийся расчету", поскольку концентрации подавались измерению только в два момента времени.

Подтверждено, что воздействие (по показателю AUC_{last}) является наивысшим для PEG30K-Q102 и PEG30K-E107, и они представлены в таблице в порядке убывания воздействия. Все из пяти исследуемых вариантов rIFN- α характеризуются большим воздействием для rIFN- α , чем форма rIFN- α дикого типа (SEQ ID NO: 4). T_{max} обычно наблюдают через 24 ч после введения дозы для пегилированных вариантов rIFN- α по сравнению с 1 ч после введения дозы для rIFN- α дикого типа. В случае этого эксперимента C_{max} включают в расчет периода полужизни вследствие несоответствующих точек данных в окончательной фазе. Поскольку время в момент C_{max} не представляет истинную фазу выведения, оценки периода полужизни следует рассматривать как приближенную величину.

Следует заметить, что гетерологичность молекулы не оказывает влияния в этом типе исследования.

Пример 3. Характеристика связанных с продуктом загрязняющих примесей для rIFN α -E107pAF.

Исходя из результатов масс-спектропии (MS) rIFN- α -E107 (SEQ ID NO: 12), присутствуют ацетилированные формы, 58 Да форма и образующиеся в результате окисления загрязняющие примеси. Вариант становится ацетилированным в ходе биосинтеза внутри продуцирующего штамма *E. coli*. Таким образом, один вариант для продуцирования rIFN- α -E107 заключается в добавлении ацетилтрансфераз в соответствующий момент в ходе продуцирования или в использовании нокаутной ацетилтрансферазы аланина рибосомального белка (ribosomal-protein-alanine acetyltransferase) (RimJ) (N-концевая ацетилтрансфераза). Кроме того, для очистки можно использовать мелко- и крупномасштабную хроматографию. В качестве альтернативы и как показано в данном документе, последовательность N-конца может быть дополнительно модифицирована для предотвращения ацетилирования на варианте в целом.

В случае хроматографических методов один способ заключается в применении CAPTO Adhere Impres (GE Healthcare Lifesciences), которая представляет собой сильную анионообменную среду (смола) для мультимодальной хроматографии с использованием технологии BIOPROCESS. В этом способе используется подвижная фаза из 25 mM ацетата аммония (при pH 6,5), загрузка немодифицированного (т.е. непегилированного) варианта rIFN- α до концентрации 1-5 мг/мл смолы. Колонку промывают 5 объемами колонки (CV) 25 mM ацетата аммония при pH 6,5. Элюирование варианта rIFN- α осуществляется с использованием линейного градиента к 100% буферу для элюирования (5 mM уксусная кислота) и 0-100% B за 40 CV (объем колонки), при помощи чего удаляют пики, соответствующие окисленному rIFN- α . Пик один имеет N-конец rIFN- α без ацетилирования цистеина, в то время как пик 2 содержал ацетилированную форму (+42 Да), +58 Да форму, +58+1 Ох форму (вероятно, ацетилированные и однократно окисленные молекулы) и +58 Да+2 Ох форму (вероятно, ацетилированная форма по меньшей мере с двумя окисленными остатками).

Исходя из результатов пролин вставляли на аминоконце rIFN- α для предотвращения образования ацетилированных форм. Таким образом, создали Pro-rIFN α -E107pAF (SEQ ID NO: 13). Для наглядности,

нумерация положений аминокислот всегда начинается с N-концевого цистеина (C1). Добавленный пролин становится остатком -1, и N-концевой метионин (если он присутствует) становится остатком -2. Также можно выполнить вставку Pro-Ser, при этом пептид содержит серин в положении -1, пролин в положении -2 и, возможно, метионин в положении -3 относительно N-концевого цистеина. Добавление пролина удаляло другие пики, наблюдаемые для предыдущего варианта при анализе посредством масс-спектрологии.

В табл. 4 ниже Pro-pIFN α -E107pAF имеет пролин на N-конце и замену на pAF в E107. Активность варианта Pro-pIFN α -E107pAF сравнивают с активностью варианта, лишённого добавления пролина на N-конце, pIFN α -E107pAF. Вариант, имеющий добавленный пролин, имеет меньшее число ацетилированных и окисленных вариантов. Стоит заметить, что эти варианты не являются пегилированными и они не включают в себя метионин сигнальной последовательности.

Таблица 4

	Pro-pIFN α -E107pAF EC50, нг/мл	pIFN α -E107pAF EC50, нг/мл
Прогон 1	6,46	8,08
Прогон 2	4,55	7,01

Пример 4. Другие варианты N-концов.

С учетом успеха с добавлением пролина на N-конец pIFN α -E107pAF также оценивали другие варианты N-концов, включающие добавление серина (Ser, S), добавление Pro-Ser (PS), добавление His (H) и добавление Ser-Gly (SG) к pIFN α -E107pAR Эти варианты N-концов не являются пегилированными. Активность этих вариантов N-концов (все они являются вариантами с E107-pAF) затем оценивали в биологическом *in vitro* анализе с использованием набора iLite™ huIFN α kit от Pestka Biomedical Laboratories, описанного выше, и результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Мутация	EC50 (нг/мл)
Pro-pIFN α SEQ ID NO: 13	18,3
S (-1) pIFN α SEQ ID NO: 24	34,2
SG (-2/-1) pIFN α SEQ ID NO: 25	69,1
PS (-2/-1) pIFN α SEQ ID NO: 14	28,7
H (-1) pIFN α SEQ ID NO: 26	25,4

Pro-pIFN α представляет собой вариант, имеющий пролин, добавленный на аминоконце между метионином (в незрелом пептиде) и цистеином.

Пример 5. Конъюгирование варианта pIFN- α с PEG.

Вариант pIFN α -PS-E107 (SEQ ID NO: 14) получают из пула, собранных с помощью хроматографии по методу Сарто после применения хроматографии по методу Сарто в соответствии с инструкциями производителя, и 0,2М глицин добавляют к очищенной форме. pH смеси доводят до 4,0 с использованием уксусной кислоты. Вариант pIFN- α затем концентрируют до 8,2 мг/мл с использованием фильтрующей центрифуги Amicon Ultra в соответствии с инструкциями производителя. После концентрирования линейный PEG с молекулярной массой 30 кДа (PEG может быть коммерчески приобретен, например, у NOF America Corporation или EMD Merck) добавляют при молярном отношении pEG:вариант pIFN α , составляющем 8:1. Смесь PEG/вариант pIFN- α затем инкубируют при 28°C в течение приблизительно 18 ч. Этот способ приводит в результате к тому, что >95% варианта pIFN- α конъюгируются с PEG после 18 ч инкубирования.

Пегилированный вариант (pIFN α -PS-E107-PEG30K) затем может быть очищен следующим образом. Колонку Tosoh SP650S объемом 143 мл можно применять для очистки пегилированного варианта при использовании следующей подвижной фазы:

A: 30 мМ ацетат натрия, pH 5,0,

В: 30 мМ ацетат натрия, 5% этиленгликоль, pH 5,0 от 0 до 100% В за 20 объемов колонки.

Пример 6. Сравнительное исследование вариантов с различными N-концами.

Анализ активности проводят для нескольких вариантов как в их пегелированных (линейным PEG с молекулярной массой 30 кДа), так и непегелированных формах для оценки воздействия пегелирования на варианты, имеющие замену на рAF в E107 и имеющие пролин-серин на аминоконце (SEQ ID NO: 14). Результаты представлены ниже в таблице 6. Концентрация белка, значения SEC, RP и EC50 определены, как обсуждалось выше. рIFN α -P-E107-рAF используют в качестве сравнительного образца, чтобы отразить результаты для белка без аминоконцевого удлинения.

Таблица 6

Образец	Конц. белка (мг/мл)	SEC, % мономера	RP, % от главного пика	EC50 (нг/мл)
рIFN α -PS-E107-рAF	8,2	99,8	84,8	5,96
рIFN α -PS-E107-30KPEG	7,3	99,0	98,2	409,7
рIFN α -P-E107-рAF				4,27
рIFN α -P-E107-30KPEG	3,3	99,3	99,7	641,2

При исследовании для характеристики вариантов наблюдали ошибочное включение норлейцина. Известно, что норлейцин ошибочно включается в положении аминокислоты метионина при ферментации с использованием *E. coli* при высокой плотности. Это наблюдалось при проведении экспериментов по ферментации. Включение норлейцина снижалось при использовании одной или нескольких из следующих стадий: подача растворов с метионином, ферментация с использованием комплексных сред вместо определенной среды (комплексные среды имеют один или несколько неопределенных компонентов в своем составе, в том числе, без ограничения, глицерин, соли, аминокислоты, витамины, дрожжевые экстракты, растительные и животные гидролизаты, пептоны и триптоны) и/или снижение температуры реакционной смеси после продуцирования. L-метионин добавляют в партию среды в концентрации 1,2 мМ, а также непрерывно подают через питательный раствор, который содержит 20 мМ L-метионин.

Варианты рIFN- α находятся под контролем промотора T7. Добавление арабинозы (индуктор) к среде ферментации приводит в результате к каскаду, который обеспечивает возможность продуцирования вариантов. Таким образом, после индукции означает после добавления индуктора, в данном случае арабинозы.

Пример 7. Влияние замораживания-оттаивания на пегелированные и непегелированные варианты.

Образцы подвергали замораживанию и оттаиванию в течение пяти циклов посредством замораживания до 0°C в пробирках объемом 1,5 мл и оттаивания на водяной бане комнатной температуры. Не наблюдали какого-либо значительного воздействия в случае профиля белка с высокой молекулярной массой (HMW) в течение пяти циклов замораживания-оттаивания, что подтверждается ниже в табл. 7.

Таблица 7

Цикл замораживания/оттаивания	рIFN α -PS-E107рAF		рIFN α -PS-E107-30KPEG	
	% от главного пика	% HMW	% от главного пика	% HMW
0	99,8	0,2	99,0	0,7
1	99,8	0,2	99,0	0,8
3	99,8	0,2	99,0	0,9
5	99,8	0,2	99,0	0,9

В табл. 7 отражены различия между пегелированными и непегелированными вариантами, имеющими пролин-серин на N-конце, а также замену на рAF в E107, причем вариант имеет вставку пролин-серина на аминоконце (рIFN α -PS-E107-30), т.е. в виде остатков -2 и -1.

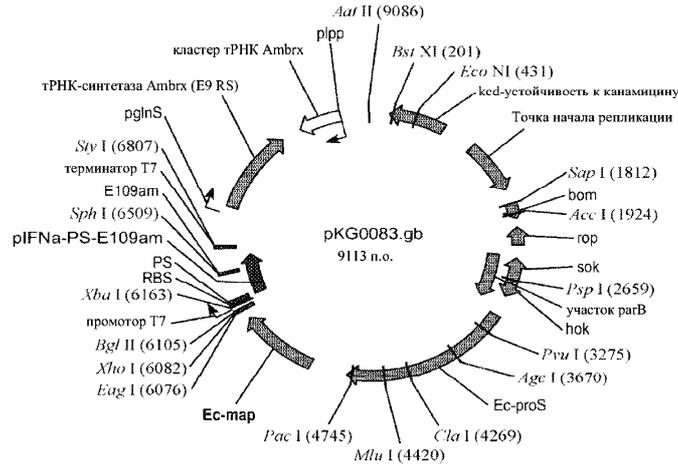
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вариант свиного интерферона- α (рIFN- α), содержащий
 $X_a X_b$ CDLPQTHSLANTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALV
 HEMLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGLEGTPLEEDSIR
 AVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSRNLDRLRKKE (SEQ ID NO: 1), причем остаток E103, E107, L112, Y136 или Q102 (нумерация относительно SEQ ID NO: 4) заменен на синтетическую аминокислоту.

2. Вариант рIFN- α по п.1, причем синтетическая аминокислота представляет собой параацетилфе-

нилаланин (pAF).

3. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 7.
4. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 10.
5. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 13.
6. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 16.
7. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 19.
8. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 8.
9. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 11.
10. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 14.
11. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 17.
12. Вариант pIFN- α по п.1, причем вариант представляет собой SEQ ID NO: 20.
13. Вариант pIFN- α по любому из пп.1-12, причем синтетическая аминокислота является пегилированной.
14. Вариант pIFN- α по п.13, причем пегилированный вариант pIFN- α пегилирован с использованием PEG с молекулярной массой приблизительно от 5 до 40 кДа.
15. Вариант pIFN- α по п.14, причем PEG представляет собой PEG с молекулярной массой 30 кДа.
16. Вариант свиного интерферона- α (pIFN- α), состоящий из
PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRI SPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHE
MLQQTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAGL-pAF-GTPLLEEDSIRAVR
KYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE (SEQ ID NO: 14), причем остаток, соответствующий E107 (нумерация относительно SEQ ID NO: 4), заменен на параацетилфенилаланин (pAF), и указанный остаток pAF пегилирован с использованием линейного PEG с молекулярной массой 30 кДа.
17. Состав для предупреждения или лечения вирусной инфекции, содержащий вариант pIFN- α по любому из пп.1-16, содержащий 20 мМ ацетат натрия, 100 мМ хлорид натрия, 5% глицерин при pH 5,0 с титром варианта pIFN- α от приблизительно 2,0 до приблизительно 6,0 г/л.
18. Способ получения состава варианта pIFN- α по п.1, предусматривающий стадии:
 - (a) очистка pIFN- α ;
 - (b) растворение указанного очищенного варианта pIFN- α в 50 мМ Tris, 6М гуанидине при pH 8;
 - (c) инкубирование растворенного варианта pIFN- α при комнатной температуре в течение 16-24 ч в 20 мМ Tris, 1М аргинине, 10 мМ метионине (met), 1 мМ EDTA при pH 8,0;
 - (d) удаление оставшихся ацетилированных вариантов;
 - (e) конъюгирование варианта pIFN- α с PEG при отношении PEG к белку, составляющем от 1:1 до 1:2; и
 - (f) очистка пегилированного варианта pIFN- α .
19. Способ предупреждения или лечения вирусной инфекции у свиньи, предусматривающий подкожное введение указанной свинье, нуждающейся в этом, варианта pIFN- α по любому из пп.1-16.
20. Способ по п.19, причем вариант pIFN- α вводят в количестве от 25 до 150 мкг/кг массы животного.
21. Способ по п.20, предусматривающий второе введение указанного варианта pIFN- α в количестве от 25 до 150 мкг/кг массы животного.
22. Способ по п.21, причем второе введение осуществляют через 7-14 суток после первого введения.
23. Способ по п.19, причем вирусная инфекция выбрана из группы, состоящей из вируса свиного репродуктивного и респираторного заболевания, вируса ящура, вируса свиного гриппа, свиного цирковируса, вируса свиной эпизоотической диареи и вируса трансмиссивного гастроэнтерита.
24. Способ по любому из пп.19-23, причем свинья представляет собой новорожденного поросенка, или свинья представляет собой беременную свинью.
25. Многодозовый флакон, содержащий состав по п.17.
26. Применение варианта pIFN- α по любому из пп.1-16 в терапии у свиньи для лечения вирусной инфекции.
27. Применение варианта pIFN- α по любому из пп.1-16 для предупреждения или лечения вирусной инфекции.
28. Применение состава по п.17 или варианта pIFN- α по любому из пп.1-16 для лечения вирусной инфекции у свиньи.
29. Применение состава по п.17 или варианта pIFN- α по любому из пп.1-16 в производстве лекарственного средства для лечения вирусной инфекции у свиньи.
30. Применение по одному из пп.28 или 29, причем свинья представляет собой новорожденного поросенка или беременную свинью.



Фиг. 1

Сайт рAF	Последовательность	SEQ ID NO:	χ=
Q102	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	6	102
Q102	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	7	103
Q102	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	8	104
E105	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	9	103
E103	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	10	104
E105	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	11	105
E107	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	12	107
E107	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	13	108
E107	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	14	109
L112	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	15	112
L112	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	16	113
L112	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	17	114
Y136	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	18	136
Y136	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	19	137
Y136	PSCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKAQAMALVHEMLQQTFLQFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTLYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	20	138

Фиг. 2

Последовательность		SIN	Длина	Примечание
X_aX_b	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	1	168	Свиной интерферон-α-1 дикого типа (с N-концевыми добавлениями) <i>Sus scrofa domestica</i> pIFN-α (GenBank X57191)
MX_aX_b	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	2	169	Такой же как SIN 1, но с N-концевым M (который обычно отщепляется в зрелом полипептиде)
MAPTSAF	LTALVLLSCNATCSLGCGLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	3	189	<i>Sus scrofa domestica</i> pIFN-α (GenBank X57191) с сигнальным пептидом
CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE		4	166	<i>Sus scrofa domestica</i> pIFN-α (GenBank X57191) зрелая последовательность
MCDDLQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE		5	167	<i>Sus scrofa domestica</i> pIFN-α (GenBank X57191) зрелая последовательность с добавленным N-концевым Met

Фиг. 3

X _a	X _b	Сайт pAF	Последовательность	SIN	Длина	χ=
abs	abs	Q102	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	6	166	102
abs	P ^{ro}	Q102	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	7	167	103
P ^{ro}	Ser	Q102	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	8	168	104
abs	abs	E103	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	9	166	103
abs	P ^{ro}	E103	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	10	167	104
P ^{ro}	Ser	E103	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	11	168	105
abs	abs	E107	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	12	166	107
abs	P ^{ro}	E107	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	13	167	108
P ^{ro}	Ser	E107	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	14	168	109
abs	abs	L112	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	15	166	112
abs	P ^{ro}	L112	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	16	167	113
P ^{ro}	Ser	L112	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	17	168	114
abs	abs	Y136	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	18	166	136
abs	P ^{ro}	Y136	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	19	167	137
P ^{ro}	Ser	Y136	PCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	20	168	138

Фиг. 4

Последовательность «pIFN-альфа WT» из 166 остатков

1 CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE

X _a	X _b	Сайт pAF	Последовательность	SIN	Длина	χ=
abs	abs	H7	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	21	166	7
abs	abs	R34	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	22	166	34
abs	abs	H40	CDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	23	166	40

Фиг. 5

X _a	X _b	Сайт pAF	Последовательность	SIN	Длина	χ=
Отсутствует	Ser	E107	SCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	24	167	108
Ser	Gly	E107	SGCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	25	168	109
Отсутствует	His	E107	HCDLPQTHSLAHTRALRLLAQMRRISPFSCLDHRRDFGSPHEAFGGNQVQKADAMALVHEMLQOTFQLFSTEGSAAAWNESLLHQFYTGLDQQLRDLEACVMQEAAGLEGTPLLEEDSIRAVRKYFHRLTYLQEKSYSPCAWEIVRAEVMRSFSSSRNLQDRLRKKE	26	167	108

Фиг. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2