(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1993139 B
(45)授权公告日 2011.02.16

(21)申请号 200580025725.5

(22)申请日 2005.05.27

(30)优先权数据
04076626.3 2004.06.01 EP
60/616,378 2004.10.06 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2007.01.29

(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2005/052414 2005.05.27

(87)PCT申请的公布数据
WO2005/117949 EN 2005.12.15

(73)专利权人 阿雷斯贸易股份有限公司
地址 瑞士欧博讷

(72)发明人 F·萨马利塔尼 A·德尔里奥

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 陈文青

(51)Int.Cl.
A61K 38/21(2006.01)

(56)对比文件
EP 1224940 A1,2002.07.24, 说明书第1,6-7,20-22,33段.
US 2002/0172661 A1,2002.11.21, 说明书第34段,第36-37段,第50段,第69段,第71-72段,第74段.
CN 1402640 A,2003.03.12, 权利要求2,23,说明书第5页第2段,第8页第4段,说明书第10页第4段,说明书第20页第2段.
EP 1250932 A1,2002.10.23, 说明书第3页到第4页.
US 5762923 A,1998.06.09, 说明书栏2倒数第2段.
Stuart D. Cook.Advancing treatment withinterferonbeta-1b(Betaferon/Betaseron) in the nextdacadeThinkingbeyond the standard dose.J Neurol250[suppl 4].2003,250[suppl 4] Ⅳ/15-Ⅳ/20.

审查员 廖文勇

权利要求书 1 页 说明书 20 页

(54)发明名称

稳定的干扰素液体制剂

(57)摘要

本发明描述了一种稳定的、无人血清白蛋白的液体药物组合物,它包含干扰素(IFN),其中所述的制剂是含有缓冲液、氨基酸和抗氧化剂的溶液。干扰素优选重组人干扰素-β。

CN 1993139 B

1. 一种组合物，它包含：

a) 88μg/mL 干扰素 -β 1a；

b) 27.3mg/mL 赖氨酸；

c) 0.12mg/mL 甲硫氨酸；

d) 0.5mg/mL 泊洛沙姆 188；和

e) 醋酸钠缓冲水溶液；

所述组合物的 pH 在 3.5-5.5 之间。

稳定的干扰素液体制剂

发明领域

[0001] 本发明涉及含干扰素、无人血清白蛋白 (HAS) 的药物组合物，更具体的是涉及含缓冲液、氨基酸和抗氧化剂的干扰素 -β 制剂。

[0002] 发明背景

[0003] 干扰素是一类细胞因子，即能在细胞之间传递信号的可溶性蛋白质，通过帮助摧毁引起感染的微生物和修复所导致的损伤而在免疫系统中发挥着重要作用。干扰素在自然情况下由受感染细胞分泌，于 1957 年第一次得到鉴定。其名字源于它们能“干扰”病毒的复制和繁殖。

[0004] 干扰素显示具有抗病毒和抗增殖活性。根据其生化及免疫学性能，将天然产生的人干扰素分为三个主要类型：干扰素 α（白细胞），干扰素 β（成纤维细胞）和干扰素 γ（免疫细胞）。干扰素 α 目前在美国和其他国家已批准用于治疗毛细胞白血病、性病疣、卡波济肉瘤（获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 病人常患的一种癌症），以及非甲非乙型慢性肝炎。

[0005] 另外，干扰素 (IFN) 是机体对病毒感染应答反应过程中产生的糖蛋白。它们能抑制病毒在受保护细胞中的繁殖。由低分子量蛋白质组成的 IFN 在其作用上无显著特异性，即一种病毒诱导产生的 IFN 对广泛范围的其他病毒也有效。然而它们是物种特异性的，即一种动物产生的 IFN 只能激发同种或密切相关种类动物的细胞产生抗病毒活性。IFN 是第一类发现的具有潜在抗肿瘤和抗病毒活性的细胞因子。

[0006] IFN 的三种主要类型称为干扰素 α，干扰素 β 和干扰素 γ。IFN 的这些主要类型最初是根据它们的细胞来源（白细胞，成纤维细胞或 T 细胞）分类的。然而现已清楚，一种细胞可产生几种类型的 IFN。因此，白细胞 IFN 现称为干扰素 α，成纤维 IFN 称为干扰素 β，T 细胞 IFN 称为干扰素 γ。还有第四类 IFN，即淋巴母细胞样干扰素，由“Namalwa”细胞系（衍生自伯基特淋巴瘤）产生，该细胞系似乎产生的是白细胞 IFN 和成纤维细胞 IFN 的混合物。

[0007] 干扰素单位或国际单位 (U 或 IU，国际单位)，据报告是用作 IFN 活性的衡量单位，其定义为保护 50％的细胞免遭病毒损害所必须的量。可用于检测其生物活性的试验是如 (Rubinstein，等 . 1981 ；Familletti，P.C.，等 .，1981) 所述的细胞病变作用抑制试验。在此干扰素抗病毒试验中，约 1U/ml 的干扰素是产生 50％细胞病变（抑制）作用所必需的量。其单位可用国立卫生研究院所提供的人 IFN-β 国际参考标准品来测定 (Pestka，S，1986)。

[0008] 每一类 IFN 都含有几种不同亚型。IFN-β 和 IFN-γ 各为单一基因的产物。

[0009] 分类为 IFN-α 的蛋白质是多样性最高的一类，包含约 15 个类型。IFN-α 基因簇位于第九号染色体上，包含至少 23 个成员，其中 15 个有活性且被转录。成熟的 IFN-α 是非糖基化的。

[0010] IFN-α 和 IFN-β 长度几乎相同 (165 或 166 个氨基酸)，具有相似的生物学活性。IFN-γ 长 146 个氨基酸，与 IFN-α 和 IFN-β 相似程度较低。只有 IFN-γ 能够激活巨噬细胞或诱导 T 杀伤细胞成熟。这些新型治疗剂有时称为生物反应调节剂 (BRM)，因为它们在机

体抗肿瘤反应中具有作用，可通过免疫调节影响识别。

[0011] 人成纤维细胞干扰素（IFN-β）具有抗病毒活性，也能刺激天然杀伤细胞对抗癌细胞。它是由病毒和双链 RNA 诱导产生的分子量约 20,000Da 的一种多肽。用重组 DNA 技术克隆了成纤维细胞干扰素基因的核苷酸序列（Derynk 等，1980），并推断出该蛋白的完整氨基酸序列。它的长度为 166 个氨基酸。

[0012] Shepard 等（1981）描述了消除其抗病毒活性的第 842 位碱基的突变（第 141 位半胱氨酸被取代为酪氨酸），和缺失了第 1119-1121 位核苷酸的变体克隆。

[0013] Mark 等（1984）通过在碱基 469 位用腺嘌呤（A）取代胸腺嘧啶（T）插入一个人造突变，导致该蛋白质的第 17 位氨基酸由半胱氨酸变为丝氨酸。据报道所产生的 IFN-β 与“天然的”IFN-β 具有相同的活性并且在长期储存（-70℃）中稳定。

[0014] 在干扰素疗法中近年开发的用于治疗多发性硬化症（MS）的 Rebif®（Serono 公司生产的重组人干扰素 -β）是 IFN-β-1a，由哺乳动物细胞系所产生。它的推荐的国际非专有名（International Non-proprietary Names forPharmaceutical Substance，INN）是“干扰素 -β-1a”。

[0015] 作为治疗剂，和所有的以蛋白质为基础的药物一样，IFN-β-1a 应用中必须克服的一个主要障碍是由于药物制剂中该蛋白质的不稳定性可能导致的药物利用度丧失。

[0016] 药物制剂中危害多肽活性和药效的物理不稳定性包括：变性和可溶及不可溶凝聚体的形成。而化学不稳定性包括水解、生成亚胺、氧化、外消旋和脱酰胺。已知这些变化中的一些可能导致感兴趣蛋白质的药物活性丧失或降低。其他方面，这些变化的精确影响尚不知道，但所产生的降解产物由于具有潜在的不良副作用而认为在药学上是不可接受的。

[0017] 药物组合物中多肽的稳定性仍然是一个主要的麻烦和易失误问题（Wang(1999) Int. J. Pharm. 185：129-188 的综述；Wang 和 Hanson(1988) J. Parenteral Sci. Tech. 42：S3-S26）。可加入多肽药物制剂中提高其稳定性的辅料包括：缓冲剂、糖类、表面活性剂、氨基酸、聚乙二醇和聚合物，但是这些化学添加剂的稳定作用根据蛋白质而不同。

[0018] 在美国专利 2002/0172661 中，所述的干扰素 -β 制剂的特征在于离子强度低，以及 pH 值约为 3.0-5.0。

[0019] 目前的 INF-β 制剂采用 HAS 作为 IFN-β 的稳定增强剂。然而采用 HAS 有一些缺点。HAS 是人血产品，必须从人体收集。虽然已采取步骤来降低采用人血产品如 HAS 所带来的感染危险性，但仍可能引入人类病毒如 HIV 和 HCV。

[0020] 因此，需要一种含有生理上相容的稳定剂以提高此蛋白质的可溶性和稳定此蛋白质对抗凝聚体形成，从而提高它们的药物利用度的 IFN-β 药物组合物。

发明内容

[0021] 本发明涉及含有干扰素（IFN）的稳定的药物组合物及其制备方法。制备这些组合物时不用人血清白蛋白（HSA）。这些组合物本文称为“无 HSA”组合物。无 HAS 的干扰素药物组合物包含干扰素或其同工型（isoform）、突变蛋白、融合蛋白、功能性衍生物、活性片段或其盐，其中所述的组合物是含有缓冲剂、氨基酸和抗氧化剂的溶液。

[0022] 根据本发明的一实施方案，该组合物还含有抑菌剂。

[0023] 本文所用的“干扰素”或“IFN”包括文献中所定义的分子，这些分子包括，例如在

上述“发明背景”中所提到的任何类型的 IFN。具体说，上述定义包括 IFN-α，IFN-β 和 IFN-γ。IFN-β 是本发明的优选 IFN。根据本发明，合适的 IFN-β 可从市场上购得，如 Rebif® (Serono)、Avonex® (Biogen) 或 Betaferon® (Schering)。本发明也优选采用人源干扰素。本文所用的术语干扰素旨在涵盖其同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能性衍生物、活性片段或其盐。

[0024] 本文中的术语“干扰素 -β (IFN-beta 或 IFN-β)”包括成纤维细胞干扰素，特别是人源的，如从生物体液分离得到的、或用 DNA 重组技术从原核或真核宿主细胞得到的，及其盐、功能性衍生物、变体、类似物和活性片段。优选的 IFN-β 指干扰素 β-1a。

[0025] 术语“突变蛋白”本文用于指 IFN 的类似物，在该类似物中天然 IFN 的一个或多个氨基酸残基替换为不同的氨基酸残基，或缺失，或在 IFN 的天然序列中加入了一个或多个氨基酸残基，但所得产物的活性与野生型 IFN 相比无显著改变。这些突变蛋白可用已知的合成技术和 / 或定点诱变技术，或其他已知的合适技术制备。优选的突变蛋白包括如 Shepard 等 (1981) 或 Mark 等 (1984) 所述的突变蛋白。

[0026] 任何的这类突变蛋白优选具有与 IFN 充分相同的氨基酸序列，因而具有与 IFN 基本上相似甚至更加优良的活性。干扰素的生物学功能是该领域技术人员所熟知的，而且其生物学标准品已建立可从例如国立生物学标准品和控制研究所购买到 (http://immunology.org/links/NIBSC)。

[0027] IFN 活性测定的生物学试验已有描述。例如可按 Rubinstein 等，1981 所述进行 IFN 试验。因此，可通过常规实验测定某给定的突变蛋白是否具有与 IFN 基本上相似，或者甚至更优越的活性。

[0028] 可用于本发明的干扰素的突变蛋白或为其编码的核酸包括有限的相应序列作为取代肽类或多核苷酸，这可由所述领域的技术人员基于本文的教导和指示来进行，无需过度的实验。

[0029] 本发明突变蛋白的优选变化是称为“保守取代”的变化。本发明多肽或蛋白质的保守性氨基酸取代，可包括某一组内的同义氨基酸取代，由于同义氨基酸具有充分相似的理化性能，同组内成员之间的取代将保存使该分子的生物学功能。已清楚知道，也可在以上定义的序列中插入和缺失氨基酸而不改变其功能，特别是如果该插入或缺失只涉及少数的几个氨基酸，如 30 个以下，优选 10 个以下，而不去除或取代那些对功能结构起关键作用的氨基酸，如半胱氨酸残基。通过这种缺失和 / 或插入所产生的蛋白质和突变蛋白属于本发明的范围内。

[0030] 优选的同义氨基酸分组是表 1 中所定义的那些。更优选的同义氨基酸分组是表 2 中所定义的那些；最优选的同义氨基酸分组是表 3 所定义的那些。

[0031] 表 1

[0032] 优选的同义氨基酸分组

[0033]	氨基酸	同义组
[0034]	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
[0035]	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
[0036]	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
[0037]	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro

[0038] Thr Pro,Ser,Ala,Gly,His,Gln,Thr

[0039] Ala Gly,Thr,Pro,Ala

[0040] Val Met,Tyr,Phe,Ile,Leu,Val

[0041] Gly Ala,Thr,Pro,Ser,Gly

[0042] Ile Met,Tyr,Phe,Val,Leu,Ile

[0043] Phe Trp,Met,Tyr,Ile,Val,Leu,Phe

[0044] Tyr Trp,Met,Phe,Ile,Val,Leu,Tyr

[0045] Cys Ser,Thr,Cys

[0046] His Glu,Lys,Gln,Thr,Arg,His

[0047] Gln Glu,Lys,Asn,His,Thr,Arg,Gln

[0048] Asn Gln,Asp,Ser,Asn

[0049] Lys Glu,Gln,His,Arg,Lys

[0050] Asp Glu,Asn,Asp

[0051] Glu Asp,Lys,Asn,Gln,His,Arg,Glu

[0052] Met Phe,Ile,Val,Leu,Met

[0053] Trp Trp

[0054] 表 2

[0055] 更优选的同义氨基酸分组

[0056] 氨基酸 同义组

[0057] Ser Ser

[0058] Arg His,Lys,Arg

[0059] Leu Leu,Ile,Phe,Met

[0060] Pro Ala,Pro

[0061] Thr Thr

[0062] Ala Pro,Ala

[0063] Val Val,Met,Ile

[0064] Gly Gly

[0065] Ile Ile,Met,Phe,Val,Leu

[0066] Phe Met,Tyr,Ile,Leu,Phe

[0067] Tyr Phe,Tyr

[0068] Cys Cys,Ser

[0069] His His,Gln,Arg

[0070] Gln Glu,Gln,His

[0071] Asn Asp,Asn

[0072] Lys Lys,Arg

[0073] Asp Asp,Asn

[0074] Glu Glu,Gln

[0075] Met Met,Phe,Ile,Val,Leu

[0076] Trp Trp

[0077] 表 3

[0078] 最优选的同义氨基酸分组

[0079] 氨基酸 同义组

[0080] Ser Ser

[0081] Arg Arg

[0082] Leu Leu, Ile, Met

[0083] Pro Pro

[0084] Thr Thr

[0085] Ala Ala

[0086] Val Val

[0087] Gly Gly

[0088] Ile Ile, Met, Leu

[0089] Phe Phe

[0090] Tyr Tyr

[0091] Cys Cys, Ser

[0092] His His

[0093] Gln Gln

[0094] Ash Asn

[0095] Lys Lys

[0096] Asp Asp

[0097] Glu Glu

[0098] Met Met, Ile, Leu

[0099] Trp Met

[0100] 本发明中所使用的、可在蛋白质中产生氨基酸取代用于获得 IFN 突变蛋白的例子包括已知的方法步骤，如授于 Mark 等的美国专利 4,959,314，、4,588,585、和 4,737,462，授于 Koths 等的美国专利 5,116,943，授于 Namen 等的 4,965,195，授于 Chong 等的 4,879,111 和授于 Lee 等的 5,017,691 所述的方法，和美国专利 4,904,584(Shaw 等）所述的赖氨酸取代蛋白质。特异的 IFN-β 突变蛋白已有描述，例如见 Mark 等，1984。

[0101] 术语“融合蛋白”指含有与另一蛋白相融合的 IFN 或其突变蛋白的多肽，例如在体液中该融合蛋白具有延长的存留时间。因此可将 IFN 与另一蛋白质、多肽等，如免疫球蛋白或其片段融合。

[0102] 本文使用的“功能性衍生物”涵盖了可用本领域已知方法，从残基侧链基团或 N 端或 C 端基团等功能性基团制备的 IFN 衍生物、它们的突变蛋白和融合蛋白，这些包括在本发明中，只要它们仍然是药学上可接受的，即不会破坏与 IFN 活性基本上相似的蛋白质的活性，不会使含有它的组合物具有毒性。这些衍生物例如，可包含能掩蔽抗原位点和延长 IFN 在体液中存留时间的聚乙二醇侧链。其他的衍生物包括：羧基的脂肪族酯，羧基与氨、或与伯胺或仲胺反应产生的酰胺，氨基酸残基的游离氨基与酰基部分（如烷酰基或碳环芳酰基）形成的 N- 酰基衍生物，或游离羟基（如丝氨酰或苏氨酰残基的游离羟基）与酰基部分形成的 O- 酰基衍生物。

[0103] IFN 或其变异蛋白及融合蛋白的“活性片段”，本发明涵盖了该蛋白质分子多肽链的片段或前体本身，或与其结合的分子或与之连接的残基，如糖基或磷酸残基，或该蛋白质分子或糖残基本身的凝聚体，只要所述组分与相应的 IFN 相比活性不显著降低。

[0104] 本文中的术语“盐”，指上述蛋白质或其类似物的羧基的盐和氨基的酸加成盐。可用本领域已知方法形成的羧基的盐包括：无机盐，例如钠盐、钙盐、铵盐、铁盐或锌盐等，以及与有机碱形成的盐，例如与胺，诸如三乙醇胺，精氨酸或赖氨酸，哌啶，普鲁卡因等形成的盐。酸加成盐包括，无机酸盐如盐酸或硫酸盐，以及有机酸盐如乙酸或草酸盐。当然，这些盐必须保持本发明相关蛋白质 (IFN) 的生物学活性，即能够与相应受体结合和启动受体信号传导。

[0105] 根据本发明，特别优选采用重组人 IFN-β 作为本发明的化合物。

[0106] 近年报导了一类特定的干扰素变体，即所谓“共有序列干扰素 (consensus interferons)”，是一种非天然产生的 IFN 变体（美国专利 US6,013,253）。根据本发明的优选实施方案，本发明的化合物可与共有序列干扰素联合使用。

[0107] 如本文所用，共有序列人干扰素 (IFN-con) 指一种非天然产生的多肽，该多肽主要包括绝大多数天然产生的人白细胞干扰素亚型序列的代表性 IFN-α 亚组共同具有的那些氨基酸残基，该多肽的一个或多个位置上含有所有亚型不共同含有的氨基酸，主要出现在该位置上的氨基酸是至少一种天然产生的 IFN 亚型在该位置上不存在的氨基酸残基。IFN-con 包括但不限于美国专利 4,695,623、4,897,471 和 5,541,293 中所述的命名为 IFN-con1、IFN-con2 和 IFN-con3 的氨基酸序列。编码 IFN-con 的 DNA 序列可按上述专利所述或用其他标准方法制备。

[0108] 在另一优选实施方案中，所述融合蛋白包含 Ig 融合。可直接、或通过一个长度短至 1-3 个氨基酸残基或更长，如长 13 个氨基酸残基的短接头肽融合。例如所述接头可以是具有 E-F-M(Glu-Phe-Met) 序列的三肽，或含 Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met 的 13 个氨基酸的接头序列，将其加入到 IFN 序列和免疫球蛋白序列之间。所产生的融合蛋白可具有改进的性能，如在体液中存留时间（半衰期）延长、特异性活性提高、表达水平提高、或有利于该融合蛋白的纯化。

[0109] 在另一优选实施方案中，将 IFN 与 Ig 分子的恒定区融合在一起。优选与重链区，如人 IgG1 的 CH2 和 CH3 结构域融合。Ig 分子的其他同种型，如同种型 IgG_2，IgG_3 或 IgG_4，或者其他类 Ig，如 IgM 或 IgA，，也适用于产生融合蛋白。融合蛋白可以是单体或多聚体，异质或同质多聚体蛋白。

[0110] 在另一优选实施方案中，所述功能性衍生物包含至少一种连接于一个或多个氨基酸残基侧链的一个或多个基团的分子。优选所述分子为聚乙二醇 (PEG) 组分。聚乙二醇化可用例如专利 WO99/55377 中描述的已知方法来实现。

[0111] 个体的给药剂量，无论是单剂量或多剂量，根据各种因素而不同，包括药代动力学特性、给药途径、病人的状况和特征（性别、年龄、体重、健康状况、高矮）、症状范围、同时进行的治疗、治疗的频率和希望的效果。

[0112] 本发明治疗复发－缓解型多发性硬化症 (MS) 的干扰素－β 的剂量取决于所用干扰素－β 的类型。

[0113] 根据本发明，当所述 IFN 是大肠杆菌产生的重组 IFN-β 1b 时，市场上可购得的商

品名为Betaseron®，其优选皮下注射给药，隔日一次，剂量每人约 250--300μg（微克）或 8--9.6MIU（百万国际单位）。

[0114] 根据本发明，当所述 IFN 是中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）产生的重组 IFN-β1a 时，市场上可购得的商品名为Avonex®，其优选肌肉注射给药，每周一次，剂量每人约 30--33μg 或 6--6.6MIU。

[0115] 根据本发明，当所述 IFN 是中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）产生的重组 IFN-β1a 时，市场上可购得的商品名为 Rebif®，其优选皮下注射给药，每周三次（TIW），剂量每人约 22--44μg 或 6--12MIU。

[0116] 本发明活性成分的给药途径可以是：静脉内、肌肉内或皮下注射。干扰素优选的给药途径是皮下注射，更优选的给药途径是每周一次肌肉注射。

[0117] 干扰素可以每日或隔日给药，甚至更少。IFN 优选每周给药 1、2 或 3 次。

[0118] 术语“稳定性”指本发明干扰素制剂的物理、化学和结构稳定性（包括生物效能的维持）。蛋白制剂的不稳定可能由于蛋白质分子化学降解或凝聚形成更高等级聚合体、脱糖基、糖基化修饰、氧化或其他结构修饰引起，从而导致本发明所包含干扰素多肽的至少一种生物活性降低。

[0119] “稳定的”溶液或制剂，是溶液中的蛋白质降解、修饰、凝聚、生物学活性丧失等的程度可接受和控制，不会随时间变化而增加变得不可接受。优选本发明的制剂在 12--24 个月内，保留了所述干扰素至少约 60％，更佳至少 70％，最佳至少 80％的活性。本发明的稳定的不含 HAS 的干扰素组合物在 2-8℃贮藏时的半衰期，优选至少约 6 个月、12 个月、18 个月、更优选至少 20 个月、还要优选至少约 22 个月、最优优选至少 24 个月。

[0120] 监测本发明不含 HAS 的干扰素的药物组合物稳定性的方法是本领域已有的，包括本文实施例中所述的那些方法。因此，通过测定溶液中可溶性 IFN 随时间推移发生的变化，不难确定在本发明液体药物组合物贮存期间形成的 IFN 凝聚体。有许多适合检测 IFN 的分析试验方法可定量测定溶液中可溶性多肽的量。这些试验包括例如以下实施例中所述的反相高效液相层析（RP-HPLC）和紫外线（UV）吸收光谱法。

[0121] 测定液体制剂贮存期间可溶和不可溶性凝聚体例如可采用以下实施例中提到的分析型超离心法，来鉴别作为可溶性凝聚体存在的可溶性多肽部分与作为非凝聚体生物学活性分子存在的部分。此外，速率超离心能定性和定量测定非共价和共价寡聚体。同样，一种新型的分子大小排阻（SE）高效液相色谱（SE-HPLC）法（见以下实施例描述），本文称为“NEW SEC”，也能定性和定量检测共价和非共价寡聚体。

[0122] 术语“多剂量使用”指使用装有干扰素制剂的单个小药瓶、安瓿或药筒作一次以上注射，例如 2、3、4、5、6 或更多次注射。注射间隔时间优选至少约 12 小时、24 小时、48 小时等，优选持续约 12 天。可按时间间隔注射，例如，间隔 6、12、24、48 或 72 小时。

[0123] 术语“氨基酸”指一种氨基酸或氨基酸的组合物，当采用某给定的氨基酸时，可以是其游离碱或盐形式。当采用氨基酸组合物时，所有的氨基酸可以是其游离碱形式，也可以是其盐形式，或一些氨基酸是其游离碱形式而其他氨基酸是其盐形式。本发明方法和制剂的优选氨基酸是侧链携带电荷的氨基酸，本文称为“侧链带电荷的氨基酸”，例如精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。更优选该氨基酸是赖氨酸。本发明的方法和制剂中可采用特定氨基酸的任何立体异构体，或这些立体异构体的组合物，只要该特定氨基酸以其游离碱或

其盐形式存在。优选采用 L- 立体异构体。本发明的制剂中也可采用这些优选氨基酸的类似物。术语“氨基酸类似物”指天然产生的氨基酸的衍生物。适合的精氨酸类似物包括 :例如氨基胍和 N- 单乙基 L- 精氨酸。与优选的氨基酸相同,本发明的制剂中可采用这些氨基酸类似物的游离碱或盐形式。本文中氨基酸也称为稳定剂。

[0124] 本发明制剂中采用的氨基酸能保护该治疗活性多肽对抗各种应力的作用,从而提高或 / 和维持干扰素 -β 制剂的稳定性。本文中,术语“应力”包括但不限于 :热、冷冻、pH、光、搅拌、氧化、脱水、表面剪切力、冷冻 / 解冻、压力、重金属、酚类化合物、变性剂等。术语“应力”包括能调节 (即降低、维持或提高) 含干扰素 β 制剂的稳定性的任何因素。加入氨基酸来提高和 / 或维持稳定性是浓度依赖性的。即当本发明的含干扰素 β 制剂中不存氨基酸通常会形成凝聚体或寡聚体时,提高氨基酸的浓度将导致提高和 / 或维持该制剂剂的稳定性。可采用本领域技术人员通常知道的方法无须过多实验,不难确定在本发明制剂中为了减少寡聚体或凝聚体形成,从而提高单体蛋白质稳定性所采用的特定氨基酸的量。

[0125] 术语“缓冲液”或“生理学上可接受的缓冲液”指已知可安全地应用于药学或兽医学制剂中、具有维持或控制该制剂的 pH 在所需范围的化合物溶液。能控制 pH 在温和酸性 pH 至温和碱性 pH 范围的可接受的缓冲液包括但不限于 :磷酸、乙酸、柠檬酸、精氨酸、Tris 和组氨酸这类化合物 (“TRIS”指 2- 氨基 -2- 羟甲基 -1,3- 丙二醇),和它们的药学上可接受的盐。优选的缓冲剂是乙酸缓冲盐水或可接受的盐。

[0126] “等渗剂”指生理学上可耐受的化合物,该化合物可以赋予本发明制剂适宜的渗透张力避免水份跨越接触该制剂的细胞膜净流动。如甘油等化合物常以已知浓度用于此目的。其他合适的等渗剂包括但不限于 :甘露醇、氨基酸或蛋白质 (如甘氨酸或白蛋白),盐类 (如氯化钠) 以及糖类 (如葡萄糖、甘露醇、蔗糖和乳糖)。

[0127] 术语“抗氧化剂”指可防止氧或氧产生的自由基与其它物质相互反应的化合物。抗氧化剂是一种辅料,常加入到药物系统中以提高其物理和化学稳定性。加入抗氧化剂是为了最大程度减小或阻滞在药物或辅料接触氧或存在自由基时所发生的氧化过程。这些氧化过程常常受到光、温度、高浓度氢、存在的微量金属或过氧化物所催化。亚硫酸盐、亚硫酸氢盐、硫脲、甲硫氨酸、乙二胺四乙酸盐 (EDTA)、丁基羟基甲苯 (BHT) 和丁基羟基茴香醚 (BHA) 常用作药物中的抗氧化剂。已发现 EDTA 钠可通过与催化氧化反应的金属离子螯合而增强抗氧化剂的活性。最优选的抗氧化剂是甲硫氨酸。抗氧化剂本文也称为稳定剂。

[0128] 甲硫氨酸可以其游离碱形式或盐形式存在。只要甲硫氨酸以其游离碱或其盐形式存在,在本发明的方法中或本发明的制剂中可采用甲硫氨酸的任何一种立体异构体 (如 L, D 或 DL 异构体)。优选采用 L 型立体异构体。也可在本发明的制剂中采用甲硫氨酸的类似物。术语“甲硫氨酸类似物”指自然产生的甲硫氨酸衍生物。甲硫氨酸类似物可以其游离碱形式或其盐形式用于本发明制剂中。

[0129] 加入抗氧化剂 (如甲硫氨酸) 来提高或者维持稳定性是浓度依赖性的。即在本发明含干扰素 -β 的制剂中不存在抗氧化剂而发生氧化、形成凝聚体 / 寡聚体时,提高抗氧化剂的浓度将导致提高和 / 或维持本发明含干扰素 -β 制剂的稳定性。可采用本领域技术人员通常知道的方法无须过多实验,不难确定本发明制剂中为了减少氧化或凝聚体 / 寡聚体形成所采用的氧化剂 (如甲硫氨酸) 的量。

[0130] 术语“抑菌剂”指作为抗菌剂加入到制剂中的化合物或组合物。抑菌剂的例子包

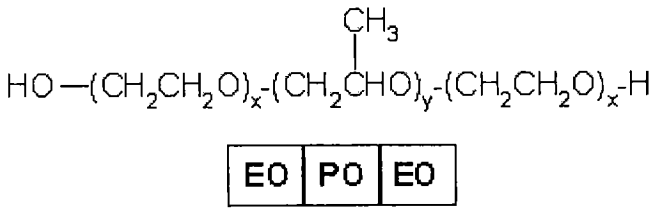
括苯酚、间－甲酚、对－甲酚、邻－甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷酯（甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等）、氯化苯甲烃铵，氯化苄乙氧胺，脱氢乙酸钠和硫柳汞。优选的抑菌剂是苯甲醇。

[0131] 术语“表面活性剂”指能降低液体表面张力或者降低两液体间或液体与固体间界面张力的化合物，表面张力是作用于液体表面，趋向于最大程度减小表面面积的力。有时在药物制剂中采用表面活性剂目的包括输送低分子量药物和多肽以改进该药物的吸收或将其输送给靶组织。熟知的表面活性剂包括聚山梨酸酯 (polysorbates)（聚氧乙烯衍生物；Tween）及 Pluronic。

[0132] 根据本发明的一优选实施方案，已发现采用选自 Pluronic® F77，Pluronic F87、Pluronic F88 和 Pluronic® F68，特别优选 Pluronic F68(BASF，也称为泊洛沙姆 188) 的表面活性剂配制干扰素，获得的稳定制剂可将吸附于小瓶和／或输送装置（注射器、泵、导管等）表面所造成的活性成分丧失减至最少。还发现，采用选自 Pluronic® F77、Pluronic F87、Pluronic F88 和 Pluronic® F68，特别优选 Pluronic F68(BASF，也称为泊洛沙姆 188) 表面活性剂配制干扰素，获得的稳定制剂抗氧化和蛋白质凝聚体形成更强。

[0133] Pluronic 表面活性剂是环氧乙烷 (EO) 和环氧丙烷 (PO) 的嵌段共聚物。环氧丙烷 (PO) 嵌段夹在两个环氧乙烷 (EO) 之间。

[0134]



[0135] Pluronic 表面活性剂用两步法合成：

[0136] 1. 通过将环氧丙烷可控地加成到丙二醇的两个羟基产生所需分子量的疏水物；和

[0137] 2. 加入环氧乙烷，将该疏水物夹在亲水基团之间。

[0138] 在 Pluronic® F77 中，聚氧乙烯（亲水）占 70％，疏水物（聚氧丙烯）的分子量约为 2306 道尔顿。

[0139] 在 Pluronic F87 中，聚氧乙烯（亲水）占 70％，疏水物（聚氧丙烯）的分子量约为 2644 道尔顿。

[0140] 在 Pluronic F88 中，聚氧乙烯（亲水）占 80％，疏水物（聚氧丙烯）的分子量约为 2644 道尔顿。

[0141] 在 Pluronic F68 中，聚氧乙烯（亲水）占 80％，疏水物（聚氧丙烯）的分子量约为 1967 道尔顿。

[0142] Pluronic F77 的典型性能列于以下：

[0143] 平均分子量：6600；

[0144] 熔点／流动点：48℃；

[0145] 20℃的物理形态@：固体；

[0146] 粘度（布氏法）cps：480〔25℃下液体；60℃下糊状；77℃下固体〕

[0147] 表面张力，dynes/cm@，25℃：

[0148] 0.1％浓度：47.0

[0149] 0.01％浓度：49.3

[0150] 0.001％浓度：52.8

[0151] 界面张力，dynes/cm@，25℃时与医用润滑油（Nujol）对比；

[0152] 0.1％浓度：17.7

[0153] 0.01％浓度：20.8

[0154] 0.01％浓度：25.5

[0155] Draves 湿润，秒，25℃

[0156] 1.0％浓度：＞ 360

[0157] 0.1％浓度：＞ 360

[0158] 泡沫高度

[0159] Ross Miles 法，0.1％，mm@，50℃：100

[0160] Ross Miles 法，0.1％，mm@，26℃：47

[0161] 动力学，0.1％，mm@，400ml/min：＞ 600

[0162] 水溶液的浊点，℃

[0163] 1％浓度：＞ 100

[0164] 10％浓度：＞ 100

[0165] HLB（亲水－亲脂平衡值）：25

[0166] Pluronic F87 的典型性能列于以下：

[0167] 平均分子量：7700；

[0168] 熔点／流动点：49℃；

[0169] 20℃时的物理形态@：固体；

[0170] 粘度（布氏法）cps：700〔25℃下液体；60℃下糊状；77℃下固体〕

[0171] 表面张力，dynes/cm@，25℃；

[0172] 0.1％浓度：44.0

[0173] 0.01％浓度：47.0

[0174] 0.001％浓度：50.2

[0175] 界面张力，dynes/cm@，25℃时与医用润滑油对比；

[0176] 0.1％浓度：17.4

[0177] 0.01％浓度：20.3

[0178] 0.01％浓度：23.3

[0179] Draves 湿润，秒，25℃

[0180] 1.0％浓度：＞ 360

[0181] 0.1％浓度：＞ 360

[0182] 泡沫高度

[0183] Ross Miles 法，0.1％，mm@，50℃：80

[0184] Ross Miles 法，0.1％，mm@，26℃：37

[0185] 动力学，0.1％，mm@，400ml/min：＞ 600

[0186] 水溶液的浊点，℃

[0187] 1％浓度：＞ 100

[0188] 10％浓度：＞ 100

[0189] HLB（亲水亲油平衡值）：24

[0190] Pluronic F88 的典型性能列于以下：

[0191] 平均分子量：11400

[0192] 熔点 / 流动点：54℃

[0193] 20℃时的物理形态 @：固体

[0194] 粘度（布氏法）cps：2300〔25℃下液体；60℃下糊状；77℃下固体〕

[0195] 表面张力，dynes/cm，25℃时；

[0196] 0.1％浓度：48.5

[0197] 0.01％浓度：52.6

[0198] 0.001％浓度：55.7

[0199] 界面张力，dynes/cm@，25℃时与医用润滑油对比；

[0200] 0.1％浓度：20.5

[0201] 0.01％浓度：23.3

[0202] 0.01％浓度：27.0

[0203] Drsves 湿润，秒，25℃

[0204] 1.0％浓度：＞ 360

[0205] 0.1％浓度：＞ 360

[0206] 泡沫高度

[0207] Ross Miles 法，0.1％，mm@，50℃：80

[0208] Ross Miles 法，0.1％，mm@，26℃：37

[0209] 动力学，0.1％，mm@，400ml/min：＞ 600

[0210] 水溶液的浊点，℃

[0211] 1％浓度：＞ 100

[0212] 10％浓度：＞ 100

[0213] HLB（亲水亲油平衡值）：28

[0214] Pluronic F68 的典型性能列于以下：

[0215] 平均分子量：8400

[0216] 熔点 / 流动点：52℃

[0217] 在 20℃时的物理形态：固体

[0218] 粘度（布氏法）cps：1000〔25℃下液体；60℃下糊状；77℃下固体〕

[0219] 表面张力，dynes/cm@，25℃

[0220] 0.1％浓度：50.3

[0221] 0.01％浓度：51.2

[0222] 0.001％浓度：53.6

[0223] 界面张力，dynes/cm@，25℃时与医用润滑油对比；

[0224] 0.1％浓度：19.8

[0225] 0.01％浓度：24.0

[0226] 0.01%浓度:26.0

[0227] Draves Wetting,秒,25℃

[0228] 1.0%浓度:＞360

[0229] 0.1%浓度:＞360

[0230] 泡沫高度

[0231] Ross Miles法,0.1%,mm@,50℃:35

[0232] Ross Miles法,0.1%,mm@,26℃:40

[0233] 动力学的,0.1%,mm@,400ml/min:＞600

[0234] 水溶液的浊点,℃

[0235] 1%浓度:＞100

[0236] 10%浓度:＞100

[0237] HLB(亲水亲油平衡值):29

[0238] 性能与上述所列聚合物相似的其他聚合物也可用于本发明的制剂中。优选的表面活性剂是Pluronic F68,和具有相似性能的表面活性剂。

[0239] Pluronic,尤其是Pluronic F68,存在的浓度以能充分维持干扰素在所需的贮存时间(如12-24个月)内稳定为宜,该该浓度也应能充分防止蛋白质因吸附于小瓶、安瓿、药筒或注射器而丧失。

[0240] Pluronic,尤其是Pluronic F68在液体制剂中的浓度,优选约为0.01mg/ml--10mg/ml,更优选约为0.05mg/ml--5mg/ml,特别优选约为0.1mg/ml--2mg/ml,最优选约为0.5mg/ml。

[0241] 制剂中IFN-β1a的优选浓度约为10μg/ml--800μg/ml,更优选约20μg/ml--500μg/ml,特别优选约30μg/ml--300ug/ml,最优选约为22、44、88μg/ml或264μg/ml。

[0242] 本发明的制剂pH值优选约3.5--5.5之间,更优选约4.7。优选的缓冲液是醋酸盐缓冲液,优选钠或钾离子。醋酸盐缓冲液是本技术领域熟知的。在总溶液中缓冲液的浓度可有所不同,范围是5mM、9.5mM、10mM、50mM、100mM、200mM、250mM和500mM,缓冲液的优选浓度约为10mM。特别优选10mM、pH4.7±0.2的醋酸盐离子缓冲液。

[0243] 本发明的组合物中优选存在抗氧化剂,如甲硫氨酸,其浓度约为0.01--5.0mg/ml,更优选约为0.05--0.3mg/ml,最优选约为0.12mg/ml。

[0244] 本发明的组合物中优选存在氨基酸,如赖氨酸,其浓度约为1--100mg/ml,更优选约为10--50mg/ml,最优选约为27.3mg/ml。

[0245] 本发明包括液体制剂,其优选的溶剂是注射用水。

[0246] 液体制剂可以是单剂量,也可以是多剂量制剂。本发明的液体干扰素制剂是用于多剂量给药的制剂,优选地含有抑菌剂如苯酚、间-甲酚、对-甲酚、邻-甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷酯(甲酯、乙酯、丙酯、丁酯等)、氯化苯甲烃铵、氯化苄乙氧铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞。特别优选的抑菌剂是苯酚、苯甲醇和间-甲酚,更优选苯甲醇。抑菌剂的用量是其浓度能有效维持该制剂在多剂量注射期间基本无菌(适合注射)。所述注射期时可以是约12或24小时至约12天,优选约6--12天,抑菌剂的浓度优选约0.1%--2.0%(抑菌剂量/溶剂量),更优选约0.2%--1.0%。苯甲醇特别优选的浓度是0.2%或0.3%。

[0247] 然而，采用防腐剂如苯甲醇不限于多剂量制剂，也可用于单剂量制剂。本发明的一个具体实施方案包括含苯甲醇的单剂量制剂。

[0248] 在本发明制剂的另一实施方案中，在室温或 2-8℃下采用下述沉降速率分析法测定时，干扰素 β 的单体形式为至少约 96％或至少约 98％（凝聚体少于 4％，更优选少于 2％）。

[0249] 优选的制剂含有干扰素 -β 1a、苯甲醇、赖氨酸、甲硫氨酸、PluronicF-68 和醋酸盐缓冲液，优选将 pH 调至 3.7--4.7。

[0250] 本发明制剂中干扰素的含量范围包括重建后所产生的浓度约为 1.0μg/ml--50mg/ml，虽然也可采用较低或较高的浓度，这取决于输送的媒介，如用于透皮贴剂、经肺给药、经粘膜给药、渗透或微型泵法给药等的不同溶液制剂。干扰素的优选浓度约为 5.0μg/ml--2mg/ml，更优选约 10μg/ml- 到约 1mg/ml、最优选约 30μg/ml- 到约 100μg/ml。

[0251] 本发明的制剂优选在包装的 24 个月内能保留干扰素的活性至少约 60％，更优选保留至少约 70％的活性，最优选保留至少 80％的活性。

[0252] 在一较佳实施方案中，本发明提供了制造上述液体药物组合物的方法。

[0253] 在另一个较佳实施方案中，本发明提供生产包装的药物组合物的方法，此组合物包括含有上述活性成分和赋形剂的溶液。

[0254] 在又一个较佳实施方案中，本发明提供人用药物的生产方法，包括装有上述药物组合物的小瓶和书写材料，此材料说明此溶液可在第一次使用后保存约 24 小时或更长时间。优选的是，书面材料说明此溶液可保存约 12 天。

[0255] 在多剂量制剂第一次使用后可保存至少约 24 小时，优选可保存至少约 4、5 或 6 天，更优选可保存最多达 12 天。在第一次使用后该制剂宜贮存在低于室温（即低于约 25℃）下，低于约 10℃更佳，优选在约 2--8℃，最优选贮存在约 4--6℃。

[0256] 本发明的制剂可经以下步骤制备：先将计算好量的辅料加入到缓冲溶液中，再加入干扰素。

[0257] 将产生的溶液装入小瓶、安瓿或药筒中。本领域普通技术人员知道此步骤可变化。例如诸成分加入的顺序、是否采用其它添加剂、制剂制备时的温度和 pH 值，所有这些因素都可视所用浓度和给药方法优化。

[0258] 就多剂量使用制剂而言，可在含有活性成分（干扰素）的溶液中加入抑菌剂，或者将二者装在不同的小瓶或药筒中，使用时混合成为含有活性成分的溶液。

[0259] 本发明的制剂可以用已知的装置给药。例子包括输送溶液的自动注射器或笔式注射器如 Rebiject®等小瓶系统。

[0260] 本发明的产品包括包装材料。此包装材料除提供管理当局所要求的信息外还提供产品使用的条件。本发明的包装材料向病人提供使用方法，说明需要时怎样从 2 个小瓶湿 / 干产品制备最终溶液，以及在 24 小时或更长时间内使用此最终溶液。单个小瓶的溶液产品上，贴的标签说明此溶液可在 24 小时或更长时间内使用。权利要求书中所述的产品可用于人用药物制品。

[0261] 向病人提供的稳定的已防腐的制剂是一种澄清溶液。该溶液可以一次使用，也可以多次重复使用，可以满足病人的一个周期或多个周期治疗，因此比目前可购得的药物提

供了更方便的治疗方案。

[0262] 本文所述的本发明稳定或防腐的制剂或溶液中的干扰素，可通过各种给药途径给药，包括皮下注射和肌肉内注射；经皮、经肺、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微型泵、口服或其它本领域技术人员熟知的方法给药。

[0263] 术语“小瓶”广义指可盛放灭菌状态固体或液体形式干扰素的合适贮存器。本文所用小瓶的例子包括可通过注射器、泵（包括渗透泵）、导管、透皮贴片、经肺或粘膜喷雾给予病人干扰素的安瓿、药筒、塑料泡衬垫包装或其它适合的贮存器。该领域熟知适合包装经胃肠道外、经肺、经粘膜或经皮给药产品的小瓶。

[0264] 术语“治疗”在本发明的上下文中指对疾病进展的有益作用，包括疾病发作后病理发展的缓解、减轻、降低或消失。

[0265] 含有干扰素或其同工型、突变蛋白、融合蛋白、功能性衍生物、活性片段或盐的本发明药物组合物，可用于诊断、预防和治疗（局部或全身）对此多肽治疗有反应的临床适应症。这些临床适应症包括，例如中枢神经系统(CNS)、脑和/或脊髓的紊乱或疾病，包括多发性硬化症；自身免疫性疾病，包括风湿性关节炎、牛皮癣、节段性回肠炎；和癌症，包括乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、肾癌和结肠癌。

[0266] 本文所引用的所有参考文献包括杂志文章或摘要、公开的或未公开的美国或外国的专利申请、已出版的美国或外国专利或其它文献，其内容都引入作为参考，包括所引用参考文献中的所有数据、表格、图例和文字。另外，本文所引用的参考文献的整个内容也纳入本文作为参考。

[0267] 参考已知的方法步骤、常规方法步骤、已知方法或常规方法不以任何方式承认本发明的任何方面、描述或实施方案已在相关技术领域内公开、说明或提出。

[0268] 以下所述的具体实施方案将全面地阐述本发明的通用性质，其它人可应用本领域的知识（包括本文所引用的参考文献内容），无须过多实验，不难对具体实施方案的各种应用作出变更和/或修改，但这不脱离本发明的基本概念。因此，这些变更和修改仍属于根据本文提供的说明和指南所公开的实施方案的等同范围之内。应理解，本文中的措辞或术语是为了说明目的而不是限制，本说明书的术语和措辞可由本领域技术人员按照本文所提供的说明和指南结合本领域普通技术人员的知识来解释。

[0269] 实施例

[0270] 实施例 1- 分析方法

[0271] 采用分子大小排阻(SE)-HPLC，本文也称为“新型 SE-HPLC”或“NEW SEC”，和速率超离心分析(AUC)来测定重组人干扰素-β1a(r-hIFN-beta 1a 或 r-hβIFN-1a)的凝聚体和寡聚体水平。以下提供的 SE-HPLC 和 AUC 方法能定性和定量测定共价和非共价寡聚物。

[0272] a. SE-HPLC- 纯度试验

[0273] 在 TSK G2000SWXL 柱(TosoHaas)或 BioSuite 柱(Waters)上测定凝聚体总含量：用 50mM 醋酸钠缓冲液、50mM NaCl pH3.8，以等到渗方式洗脱，流速 0.5mL/min；波长设定 215nm。运行时间 30 分钟。

[0274] 注入 100μl、88mcg/mL 的样品进行分析。

[0275] b. 沉降速率分析 -AUC

[0276] 方法描述

[0277] 将样品液加载到含 2 通道 - 木炭环氧树脂中间部分带有 12mm 光通道的加样小室中。用洗涤剂清洗该中间部分和兰宝石窗口，然后在水中浸泡以尽可能得到最清洁的表面。将对应的安慰剂加载到参比通道中（该仪器的功能类似于双光束分光光度计）。然后将那些已加样的小室放入 AN-50Ti 分析型转头中，装入 Beckman Optima XL-I 分析离心机中，20℃。转头加速到 3000rpm 时，扫描样品 (280nm 吸收峰)，证实加样小室载量合适。然后将转头加速至最终转速 50000rpm。记录各样品在此转速时的 50 次扫描结果。

[0278] 用 Peter Schuck 在 N.I.H(国立卫生研究院) 开发的和在他的分析程序 SEDFIT 中实施的 c(s) 方法 (8.7 版 ;Schuck, P.(2000). 通过超速离心分析法和 Lamn 等式模拟法分析大分子的体积分布，生物物理学，J.78,1606-1619) 分析数据。

[0279] 在此方法中，直接拟合许多原始数据产生沉降系数分布曲线，同时模拟扩散对数据的影响以提高分辨率。根据所有的物质具有相同的总体水动力学形状 (overall hydrodynamic shape)(由摩擦系数与球体的摩擦系数相对比值 f/f_0 定义的形状) 的假设，该方法通过为各沉降系数值赋予一个扩散系数。然后改变 f/f_0 值以发现各样品数据的最佳总体拟合值。用 0.51 最大熵校平法方法计算分布。

[0280] 1. 分析参数

[0281] - 转子类型 8 孔转子

[0282] - 转子速度 50k rpm

[0283] - 中心部分 木炭 - 环氧树脂 (charcoal epon)

[0284] - 通道长度 12mm

[0285] -AUC 运行时的温度 20℃

[0286] - 检测波长 280nm

[0287] - 样品体积 432mcl

[0288] - 参比品体积 442mcl

[0289] 2. 设备和软件

[0290] 分析型超速离心机 XL-I 型 (Beckman Coulter)

[0291] SEDFIT 与 8.70b 软件 (Peter Schuck- 国立卫生研究院)

[0292] Origin 与 6.03 软件 (Beckman Coulter)

[0293] Proteome 实验室 XL-A/XL-I 与 5.0 软件 (Beckman Coulter)

[0294] c. 用 RP-HPLC-QUANT-HPLC 定量测定 IFN-β-1a-

[0295] 下述反相法能定量样品中的 IFN-β-1a 量。

[0296] 在 C4、大孔丁基 5μm、4.6×250mm 柱 (Baker) 上进行蛋白质定量测定 ;波长设定 214nm，流速 1ml/min ;用以下流动相和梯度液洗脱 :A = 水 /0.1% 三氟乙酸，B = 乙腈 /0.1% 三氟醋酸，C = 乙腈。

[0297] 注入 50μL 样品进行分析 (88mcg/mL 的样品)。

[0298] 表 4

[0299]

时间 (分)	%洗脱液 A	%洗脱液 B	%洗脱液 C
0	70	30	0

5.0	70	30	0
6.0	58	42	0
15.0	57	43	0
30.0	46	54	0
35.0	45	55	0
40.0	40	60	0
40.1	20	80	0
45.0	20	80	0
45.1	0	0	100
50.0	0	0	100
50.1	70	30	0
65.0	70	30	0

[0300] 运行时间＝ 65min

[0301] 与参比标准物质制备的范围 0.0125mg/mL-0.2mg/mL 标准曲线对照，定量样品。

[0302] d. 通过反向 (RP)-HPLC-DEG/OX 的纯度

[0303] 下述反相法能检测 1FN-β-1a 的氧化形式，该氧化形式的洗脱与完整分子不同。

[0304] 在 C4、Supelcosil LC-304 柱 (Supelco) 上定量测定该氧化形式，40℃恒温；波长设定 208nm；流速 1ml/min；用以下流动相和梯度液洗脱：A ＝ 60％水 /40％乙腈 /0.14％七氟丁酸，B ＝ 20％水 /80％乙腈 /0.14％七氟丁酸，C ＝ 20％水 /80％乙腈 /0.1％三氟乙酸梯度液；

[0305] 表 5

[0306]

0’	70％ A	30％ B	0％ C	
5’	70％ A	30％ B	0％ C	
58’	62％ A	38％ B	0％ C	曲线 6
63’	0％ A	100％ B	0％ C	曲线 1
68’	0％ A	0％ B	100％ C	曲线 1

69’	70％ A	30％ B	0％ C	曲线 6

[0307] 运行时间 :96 分钟 (70 分钟 +26 分钟平衡)

[0308] 注入 200μL 样品进行分析 (88mcg/mL 的样品)。

[0309] e. 细胞病变作用抑制生物学试验 -CPE

[0310] 生物效能 (抗病毒活性)

[0311] IFN-β-1a 的抗病毒活性用细胞病变作用 (CPE) 抑制生物学试验测定。生物学活性用 IFN-β 诱导的保护细胞 (WISH 细胞 - 人羊膜组织) 对抗病毒 (水疱性口炎病毒) 的细胞病变作用的抗病毒试验检测。

[0312] 干扰素生物学试验的原理在于许多病毒如水疱性口炎病毒 (VSV) 引的起细胞死亡可用活细胞染色方法观测。

[0313] 细胞病变作用可用于定量测定干扰素的细胞保护效果。该试验通过评估活细胞摄取染料四唑盐 MTT(二甲基硫代四唑) 的量间接测定细胞的死亡。该方法采用自动化分光光度仪测定受保护细胞的百分比和三点平行线试验对滴度作统计评价。

[0314] 步骤

[0315] 在微量滴定板中进行该试验盘。

[0316] a. 将 50μl 细胞培养液 (MEM/5％ FBS) 加入到各孔中。

[0317] b. 将 100μI IFN-β-1a 样品或标准溶液 (60-100IU hIFN-β/ml) 加入到各孔中，在板中逐行进行 3 次 1 ： 1.5 分步稀释。

[0318] c. 将 50μl WISH 细胞悬浮液 (0.78-0.82×10^6cells/ml) 加入各孔中，在 5％ CO_2 潮湿培育箱中 37℃培育微孔板 18-20 小时。

[0319] d. 将 VSV 悬液加入各孔中，除细胞对照孔加入 MEM/2.5％ FBS 外。

[0320] e. 在 5％ CO_2 潮湿培育箱中 37℃培育微孔板 24 个小时。

[0321] f. 用倒置显微镜验证以下情况 ：

[0322] (1)VSV 对照行孔中至少 80％细胞损伤，和

[0323] (2) 在 IFN-β 标准品存在时，不稀释的标准品保护百分比平均值为 84％;1 ： 1.5 稀释时为 45％，而 1 ： 3 稀释时为 27％。

[0324] 然后用特异性染料 MTT 染色培养的细胞。

[0325] g. 用自动化分光光度仪测定染色强度，读取 592nm 值。

[0326] h. 用计算机程序 (Colombo 软件) 分析 OD 读取值，定量测定 IFN-β-1a 的活性。

[0327] 实施例 2- 不含 HAS 的干扰素 -β1a 制剂的稳定化

[0328] 进行以下实验来验证制剂中含氨基酸 (即赖氨酸) 和抗氧化剂 (即甲硫氨酸) 时对不同温度 (2-8℃、25℃和 40℃) 贮藏的重组人 IFN-β1a 制剂的保护效果。以下所用的分析实验和方法处在发展中 (见实施例 1) ：

[0329] - 生物学活性 (体外生物试验)

[0330] - 试验 (RP-HPLC 法)

[0331] - 氧化产物 (Deg-ox 法)

[0332] - 二聚体 / 凝聚体 (NEW SEC-HPLC 和 AUC，两种方法都能检出共价和非共价寡聚体)

[0333] -RP-HPLC 定量方法 (Quant-HPLC)

[0334] -pH 值（电势测定法）

[0335] 结果见表 6-8 所示。

[0336] 1. 步骤：

[0337] a. 用 2-8℃贮存 / 运输的半成品液生产该制剂。半成品液中重组人 IFN-β 1a 浓度约为 0.5mg/mL。

[0338] a. 用载体液稀释干扰素至最终浓度（重组人 IFN-β 1a 的浓度为 88mcg/mL）产生含赖氨酸的制剂（如第 2 点所示）。

[0339] b. 用 0.2 微米尼龙膜无菌过滤该化合物溶液，收集到无菌容器中；用灌装机将 0.5mL 溶液装入注射器内。

[0340] c. 然后将样品恒温贮存于 2-8℃、25℃和 40℃，并按稳定性实验要求在 2 个月贮藏期用不同方法 / 试验测试（样品在 40℃贮存 1-3 周）。

[0341] 2. 制剂的组成：

[0342] a. 0.088mg/mL 重组人干扰素 -β 1a

[0343] b. 27.3mg/mL L- 赖氨酸盐酸盐（编号 1.05701，Merck））

[0344] c. 0.12mg/mL L- 甲硫氨酸 (1.05707，Merck)

[0345] d. 0.5mg/mL Pluronic F-68(Lutrol F68 DAC，USP/NF，Basf)，5163315

[0346] e. 10mM pH4.7 醋酸钠溶液

[0347] 3. 结果：

[0348] 表 62-8℃贮存

[0349]

2-8°C				
	T=0	4 周	6 周	8 周
定量-HPLC （微克/注射器）	39.0	38.2	39.8	39.2
Deg-ox HPLC （氧化物%）	1.3	1.5	1.5	1.5
AUC （单体%）	98.7	-	98.8	-
New-SEC （单体%）	100.0	100.0	100.0	100.0
pH 值	4.7	4.7	-	4.7
生物学试验（MIU/毫升）	24.1	24.6	-	-
渗透性（OSM/kg）	0.303	-	-	-

[0350] 表 725℃贮存

[0351]

25°C					
	T=0	2 周	4 周	6 周	8 周
定量-HPLC （微克/注射器）	39.0	42.8	38.0	39.4	37.8
Deg-ox HPLC（氧化物%）	1.3	1.5	1.4	2.3	2.3
AUC （单体%）	98.7	99.0	-	98.2	-
New-SEC （单体%）	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
pH 值	4.7	4.7	4.7	-	4.7
生物学试验（毫国际单位/毫升）	24.1	-	24.0	-	-

[0352] 表 840℃贮存

[0353]

40°C			
	T=0	1 周	3 周
定量-HPLC （微克/注射器）	39.0	37.8	34.9
Deg-ox HPLC （氧化物%）	1.3	1.9	3.4
AUC（单体%）	98.7	99.6	-
New-SEC （单体%）	100.0	100.0	100.0
pH 值	4.7	4.7	4.6

[0354] 1. 结论：

[0355] 贮存研究表明，含赖氨酸、甲硫氨酸和 pluronic F-68 的制剂或组合物在 2-8℃和 25℃下最多达 8 个星期内仍很稳定。40℃下最多达三个星期内单体百分比水平保持稳定（单体百分比一直高于 98%）。两种不同方法 (AUC 和 NEW-SE-HPLC) 证实了这些结果。因此，本发明制剂优选含有氨基酸和抗氧化物的组合。优选在该组合物中再加入表面活性剂。

[0356] 优选的氨基酸是赖氨酸，抗氧化剂是甲硫氨酸，表面活性剂宜选自 tween（例如 tween 20）、Pluronic® F77、Pluronic F87、Pluronic F88 和 PluronicF68。表面活性剂更优选 Pluronic F68。

[0357] 该制剂的 pH 值优选为 3.5-- 到 5.5，更优选 pH 值为 4.7。

[0358] 赖氨酸的浓度优选约为 1mg/ml--100mg/ml，赖氨酸更优选的浓度约为 27.3mg/ml。表面活性剂的浓度优选约为 0.01mg/ml--10mg/ml，表面活性剂更优选的浓度约为 0.5mg/ml。抗氧化剂的浓度优选约为 0.01--5.0mg/ml，抗氧化剂更优选的浓度约为 0.12mg/ml。干扰素优选的浓度约为 10μg/ml--800μg/ml，干扰素更优选的浓度约为 88μg/ml。

[0359] 参考文献

[0360] 1. Derynk R. 等，自然 (Nature) 1980；285，542-547；

[0361] 2. Familletti，P. C.，Rubinstein，S.，和 Pestka，S. 1981 “干扰素的一种方便快速的细胞病变作用抑制试验，” 酶学中的方法 (Methods inEnzymology)，第 78 卷 (S. Pestka

编辑），Academic Press，纽约，387-394；

[0362] 3. Mark D.F. 等，Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.，81(18)5662-5666(1984)；

[0363] 4. Pestka，S.(1986)" 干扰素的标准品和通用缩写"酶学中的方法 (Methods in Enzymology)(S. Pestka，编辑），Academic Press，纽约 119，14-23.

[0364] 5. Rubinstein，S.，Familletti，P.C.，和 Pestka，S.，干扰素的常规分析，J. Virol 1981；37，755-758.

[0365] 6. Shepard H.M. 等，自然 (Nature)1981；294，563-565.