

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101056890 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 09

(21) 申请号 200580038118. 2
 (22) 申请日 2005. 11. 10
 (30) 优先权数据
 60/626, 837 2004. 11. 10 US
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2007. 05. 08
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/US2005/040758 2005. 11. 10
 (87) PCT申请的公布数据
 W02006/053134 EN 2006. 05. 18
 (73) 专利权人 诺华疫苗和诊断公司
 地址 美国加利福尼亚州
 (72) 发明人 古谷健二 D·约翰逊-杰克逊
 D·T·鲁斯西奥
 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100
 代理人 范征

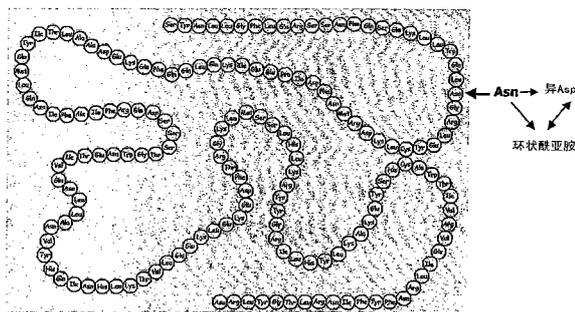
(51) Int. Cl.
C07K 14/565 (2006. 01)
A61P 25/28 (2006. 01)
A61K 38/19 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 WO 2004087753 A, 2004. 10. 14, 全文.
 审查员 吴永庆

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 14 页

(54) 发明名称
 脱酰胺基干扰素-β

(57) 摘要

按照天然干扰素-β 编号的 25 位天冬酰胺脱酰胺基的干扰素-β 类似物显示的天然人干扰素-β 生物学活性升高并且无需 HA 来稳定蛋白质。脱酰胺基产物适合于大规模生产,可用于掺入含 HA 或不含 HA 的治疗剂以治疗包括多发性硬化症在内的疾病。内切蛋白酶-C 肽图技术能利用酶学消化,然后采用 RP-HPLC 得到蛋白质指纹分布图,该技术也可作为脱酰胺基产物的 ID 和 / 或定量测定检验而用于质控。



1. 一种纯化和分离的合成人干扰素- β 蛋白质类似物,其中按照 SEQ ID NO :1 编号的第 17 位的半胱氨酸被丝氨酸残基取代,第 25 位的天冬酰胺被脱酰胺基,并且,所述蛋白质类似物显示天然人干扰素- β 的生物学活性。
2. 如权利要求 1 所述的合成蛋白质类似物,其特征在于,所述天冬酰胺残基被选自天冬氨酸、异天冬氨酸和环状酰亚胺的残基取代。
3. 如权利要求 2 所述的合成蛋白质类似物,其特征在于,所述蛋白质类似物未糖基化。
4. 如权利要求 3 所述的合成蛋白质类似物,其特征在于,所述蛋白质类似物具有 N- 末端甲硫氨酸缺失。
5. 如权利要求 4 所述的合成蛋白质类似物,其特征在于,所述蛋白质类似物的生物学活性高于 IFN- β_{ser17} 。
6. 一种具有 IFN- β 活性的治疗性组合物,其含有治疗有效量的权利要求 1 所述合成蛋白质类似物,该类似物与药学上可接受的载体介质混合。
7. 如权利要求 6 所述的组合物,其特征在于,至少 50% 的合成蛋白质类似物在按照 SEQ ID NO :1 编号的第 25 位脱酰胺基。
8. 如权利要求 6 所述的组合物,其特征在于,所有的合成蛋白质类似物在按照 SEQ ID NO :1 编号的第 25 位脱酰胺基。
9. 如权利要求 6 所述的组合物,其特征在于,所述组合物不含 HA。
10. 一种制备权利要求 1 所述脱酰胺基的 IFN- β 类似物的方法,包括:
在 25-60°C 的中至高温的合适条件下培育 IFN- β 蛋白质;
纯化和分离如下所述的脱酰胺基蛋白质,所述蛋白质按照 SEQ ID NO :1 编号第 25 位的天冬酰胺被脱酰胺基并且显示天然人干扰素- β 的生物学活性。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,包括:在 40°C 的温度培育 14 天。
12. 如权利要求 11 所述的方法,还包括在 pH 至少为 4 进行所述培育。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其特征在于,包括在 pH 7-14 培育。
14. 如权利要求 13 所述的方法,其特征在于,包括在 pH 8-9 培育 14 天。
15. 权利要求 1 所述合成蛋白质类似物用于制造治疗多发性硬化症的药物的用途。

脱酰胺基干扰素 - β

[0001] 背景

[0002] 1. 技术领域

[0003] 本发明总体处于生物学活性蛋白质化学领域。更具体地说,本发明涉及因半胱氨酸、天冬酰胺和其它残基的取代、缺失或修饰而不同于天然蛋白质的突变和化学改变的干扰素 β 类似物。

[0004] 2. 背景技术

[0005] 发现干扰素 β 能用于治疗人类疾病,包括多发性硬化症。多发性硬化症 (MS) 是在环绕神经纤维的保护性鞘破坏时发生的一种中枢神经系统慢性疾病,其往往致残。约 30% 的 MS 患者具有复发 - 缓解形式的该疾病,在该形式中症状在发作后可完全或部分消失,然后是持续数月或数年的稳定期。已证实给予 β 干扰素 (干扰素 - β 或 IFN- β) 能降低 MS 发作的频率。因此,干扰素 - β 药物成为控制和治疗 MS 的重要工具。

[0006] 已开发了重组 DNA (rDNA) 技术来促进大规模生产干扰素 - β 药物。这些技术特别需要解决的问题是人 β 干扰素 (其氨基酸序列见图 1 (SEQ ID NO :1)) 在 17、31 和 141 位含有半胱氨酸残基 (Gene, (1980), 10 :11-15 和 Nature, (1980), 285 :542-547), 这些残基中至少一些对其活性不重要,但能随意形成不希望的分子间或分子内连接。在采用 rDNA 技术进行 IFN- β 的微生物制备过程中,观察到在含有高浓度的 IFN- β 的提取物中因分子间连接而形成 IFN- β 的二聚体和寡聚体。形成这种多聚体使得 IFN- β 的纯化和分离费力费时,在纯化和分离过程中需要数个额外步骤,例如在纯化过程中还原蛋白质,再氧化使其恢复其原始构象,从而可能增加不正确二硫键的形成。此外,该多聚体与低特异性生物学活性相关。

[0007] 为解决此问题,开发了精细 rDNA 技术改变微生物产生的生物学活性 IFN- β 蛋白质类似物,所述技术对蛋白质类似物活性没有不利影响但能降低或消除它们形成分子间交联或分子内键从而使蛋白质采取不良四级结构 (例如,降低蛋白质活性的构象) 的能力。已成功地采用定向诱变技术来形成突变 (方式) 改变的生物学活性蛋白质类似物 (本文用“蛋白质类似物”指其中一个或多个氨基酸经遗传和 / 或化学修饰并保留母体蛋白质的生物学活性的合成蛋白质), 所述类似物保留了其母体蛋白质的所需活性但缺乏形成分子间交联或不良分子内二硫键的能力。发现 17 位的半胱氨酸残基缺失或被另一氨基酸取代的 IFN- β 生物学活性蛋白质的合成蛋白质类似物具有所需活性和特征。

[0008] 具体地说,干扰素 - β 1b (IFN- β 1b) 是 IFN- β 的一种合成重组蛋白质类似物,其是 17 位的半胱氨酸残基被丝氨酸残基取代的生物学活性蛋白质。作为微生物产生的蛋白质, IFN- β 1b 是非糖基化的。其也具有 N- 末端甲硫氨酸缺失。IFN- β 1b 已配制为显示能有效治疗和控制 MS 的成功药物,以 **Betaseron®** 投入市场。以下许多美国专利和申请描述了此蛋白质类似物、用于其制备的材料和技术、其作为治疗剂的制剂及其治疗 MS 的应用并要求了权益:1982 年 10 月 19 日提交的申请号 435, 154;1986 年 5 月 13 日授权的专利号 4, 588, 585;1988 年 4 月 12 日授权的专利号 4, 737, 462;和 1990 年 9 月 25 日授权的专利号 4, 959, 314;各份文献有关这些特征的内容纳入本文作为参考。

[0009] 也从哺乳动物来源,特别是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞进行了用作药物的 IFN- β 大规模生产。称为 IFN- β 1a 的此 IFN- β 类似物不具有 IFN- β 1b 的 Ser17 突变,而且是糖基化的。IFN- β 1a 配制为治疗性产品,以 Avonex® 和 Rebith® 投入市场。

[0010] 对于大多数治疗剂,不断需要鉴定和生产更有效的生物学活性药物。以 IFN- β 药物为例,需要生物学活性增加的 IFN- β 类似物。

[0011] 此外,一些 IFN- β 药物制剂(包括 Betaseron®)含有人白蛋白(HA 或 HSA),一种常规的蛋白质稳定剂。HA 是人血产品,其供应量日益下降。因此,近年来需要不含 HA 的药物制剂,最好是稳定和有效的不含 HA 的 IFN- β 制剂。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明通过使干扰素- β 脱酰胺基解决了这些需求。脱酰胺基 IFN- β 是其 25 位(根据天然干扰素- β 编号)的天冬酰胺脱酰胺基的人干扰素- β 蛋白质类似物。脱酰胺基产物显示的天然人干扰素- β 的生物学活性水平升高且无需 HA 来稳定蛋白质。

[0014] 在一具体的实施方案中,脱酰胺基 IFN- β 是合成的人干扰素- β 1b 蛋白质类似物,其 17 位(根据天然干扰素- β 编号)半胱氨酸缺失或为中性氨基酸,特别是丝氨酸取代,其 25 位天冬酰胺脱酰胺基从而形成环状酰亚胺、天冬氨酸或异天冬氨酸残基。与其 IFN- β 母体蛋白质相比,脱酰胺基的产物显示所需的天然人干扰素- β 的生物学活性(例如,细胞病变效应或抗增殖活性,例如显示与多发性硬化症发作频率降低相关)水平升高。此外,在该蛋白质类似物的不含 HA 制剂中观察到生物学活性升高。

[0015] 也提供了治疗性组合中活性蛋白质类似物化合物的制剂及制备和使用方法。

[0016] 此外,提供了内切蛋白酶-C 肽图技术,该技术在较低 pH 时对还原的蛋白质样品进行酶消化,然后层析分辨肽片段以得到蛋白质的指纹分布图,该技术可作为脱酰胺基产物的 ID 检验而用于质控。

[0017] 阅读以下发明详述结合附图可更全面地了解本发明的这些和其它目的及特征。

附图说明

[0018] 图 1 是 IFN- β 的氨基酸序列。

[0019] 图 2 是 IFN- β 1b 的氨基酸序列,其表明本发明脱酰胺基的位点和性质。

[0020] 图 3 参考本发明 IFN- β Asn25 脱酰胺基说明 Asn 脱酰胺基途径。

[0021] 图 4-11 显示了本发明一方面的各种不含 HA 的 IFN- β 稳定性药物和产品批次中脱酰胺基 IFN- β 1b 的效力与含量的图。

[0022] 图 12A 显示了本发明一方面的不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品的 Glu-C 肽图。

[0023] 图 12B 显示了图 12A 的一部分的放大图。

[0024] 图 13 显示了不含 HA 的 IFN- β 对照样品的 RP-HPLC 分布情况(时间(分钟)与应答(mV))。

[0025] 图 14 显示了本发明一方面的不含 HA 的 IFN- β 1b 药物产品批次稳定性样品的 RP-HPLC 分布情况。

[0026] 图 15 是本发明一方面的不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品的 RP-HPLC 级分(fraction)的 CPE 活性图。

[0027] 图 16A 显示了本发明一方面的不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品的 RP-HPLC 级分对

Hs294T 的抗增殖活性结果。

[0028] 图 16B 显示了本发明一方面的不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品的 RP-HPLC 级分对 Daudi 的抗增殖活性结果。

[0029] 本发明具体实施方案描述

[0030] 现在将参考数个实施方案描述本发明的化合物、组合物、物质和相关的技术及应用。教材的结构中说明了所述实施方案的重要特性和特征。尽管结合这些实施方案描述了本发明,但应该知道本发明不限于这些实施方案。相反,应涵盖包含在附加的权利要求所确定的本发明构思和范围内的改变形式、改进形式和等价形式。为全面理解本发明,以下描述给出了许多具体细节。本发明的实施可不利用这些具体细节中的某些或全部。在其它情况中,未详细描述熟知的过程操作以免不必要地混淆本发明。

[0031] 引言

[0032] 本发明提供脱酰胺基干扰素- β 。脱酰胺基 IFN- β 是其中 25 位(根据天然干扰素- β 编号)的天冬酰胺脱酰胺基的人干扰素- β 蛋白质类似物。Asn 经环状酰亚胺中间体脱酰胺基为 Asp 或异-Asp。脱酰胺基产物显示的天然人干扰素- β 的生物学活性水平升高且无需 HA 来稳定蛋白质。也提供了治疗性组合物中的活性蛋白质类似物化合物的制剂及其制备和使用方法。

[0033] 本文用“蛋白质类似物”指合成蛋白质,其中一个或多个氨基酸经遗传和/或化学修饰并且保留了母体蛋白质的生物学活性,例如致细胞病变效应或抗增殖活性。这种生物学活性显示与特定生物学活性,例如多发性硬化症发作频率降低相关。

[0034] 在一具体实施方案中,脱酰胺基的 IFN- β 是纯化和分离的合成人干扰素- β 1b 蛋白质类似物,其中 17 位(根据天然干扰素- β 编号)的半胱氨酸缺失或被中性氨基酸,特别是丝氨酸取代,25 位的天冬酰胺脱酰胺基。在具体的实施方案中,Asn25 脱酰胺基为天冬氨酸、异天冬氨酸或环状酰亚胺残基(例如,分别是 IFN- β _{Ser17, asp25, β Ser17, 异-asp25}、或 IFN- β _{Ser17, 环状酰亚胺 25})。与 IFN- β 1b 相比,脱酰胺基产物显示的天然人干扰素- β 的生物学活性水平升高。此外,在蛋白质类似物的不含 HA 制剂中观察到生物学活性升高,从而能得到不含 HA 的 IFN- β 1b 治疗剂。

[0035] 在本发明的合成蛋白质类似物中,半胱氨酸 17 残基可能被丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或甲硫氨酸取代。在一具体的实施方案中,所述取代是丝氨酸 17。天冬酰胺 25 残基被天冬氨酸、异天冬氨酸或环状酰亚胺取代。图 2 说明了本发明的 IFN- β 1b 蛋白质类似物的一级(氨基酸序列(SEQ ID NO:2))和二级(折叠,交联)结构。在 25 位,天然 Asn 残基脱酰胺基。天冬酰胺经环状酰亚胺中间体发生脱酰胺基。此途径描述于图 3。如下文所详述的,Glu-C 肽图结果表明脱酰胺基的主要形式是异-Asp(IFN- β _{Ser17, -asp25})和环状酰亚胺(IFN- β _{Ser17, 环状酰亚胺 25})。

[0036] 可联用重组合成和化学修饰技术制备蛋白质类似物。如本申请以上“背景技术”部分引用的专利中所述,最初一般通过重组 DNA 定向诱变技术制备 IFN- β 1b 合成蛋白质类似物。定向诱变技术是熟知的,Lather, R. F. 和 Lecoq, J. P. 在《遗传工程》(Genetic Engineering), Academic Press, (1983), 第 31-50 页对其进行了总结。寡核苷酸-定向诱变具体由 Smith, M. 和 Gillam, S 综述于《遗传工程:原理和方法》(Genetic Engineering: Principles and Methods), Plenum Press (1981) 3:1-32。

[0037] 然后化学处理 IFN- β 1b 蛋白质类似物使 25 位的天冬酰胺残基脱酰胺基。许多可能的脱酰胺基技术有效且适合于大规模药物产生,可采用任何能实现脱酰胺基同时保留天然生物学活性(最好生物学活性升高)的技术。泛泛而言,取决于诸条件,可通过在中温至高温(例如,约 25-60°C)和低(例如,约 0-4)、中(例如,约 4-10)到高(例如,约 10-14)的各种 pH 下,以约 1 分钟到约 90 天或更长的反应时间培育来实现 IFN- β 蛋白质的脱酰胺基。例如,可通过在最高 60°C,或约 25 和 40°C 之间(例如 40°C),约 pH 4 时培育 IFN- β (例如, IFN- β 1a 或 IFN- β 1b)至少 24 小时(例如,最多 40 天)来实现脱酰胺基。通过升高 pH,例如升至约 7 到最高 14 的中性到碱性 pH,如约 8-12(如约 8.5)可缩短反应时间和/或降低反应温度。在一个实例中,在 pH 8.4, 2-8°C 处理 14 天后 IFN- β 1b 样品的生物学活性(CPE)升高至少两倍,达到约 4.5IU/mg。在中温(例如,室温)到高温(例如,37-40°C)处理 14-40 天也观察到活性有实质性升高。

[0038] 制备脱酰胺基 IFN- β 蛋白质类似物的技术可产生部分或基本上纯的产物。例如,产物中至少 25%、至少 50%、至少 75%或基本上所有合成蛋白质类似物在 25 位(按照天然干扰素- β 编号)脱酰胺基。然而,当不是基本上所有产物均脱酰胺基时,该产物仍显示生物学活性升高和不含 HA 的稳定性。在一些实例中,最好纯化和分离产物中的脱酰胺基蛋白质类似物。可通过阳离子交换 HPLC 实现此纯化和分离,例如采用以下条件:

[0039] 层析固定相:Pharmacia Mono S HR 5/5 或与之相当的固定相;

[0040] 洗脱剂缓冲液:含 0.5% Empigen 的 20mM Tris-HCl, pH 7.0;

[0041] 梯度:洗脱剂缓冲液中 NaCl 线性梯度最高达 200mM 或更高。可大规模实施此技术以进行生产。

[0042] 在一优选的实施方案中,当合成蛋白质由微生物产生时,其未糖基化。该蛋白质类似物也具有 N-末端甲硫氨酸缺失。在其它实施方案中,可在哺乳动物细胞中产生蛋白质类似物,因而是糖基化的。

[0043] 如下文所详述的,与它们的母体 IFN- β 蛋白质相比,各种活性试验证实脱酰胺基 IFN- β 1b 蛋白质类似物的生物学活性升高。利用不含 HA 的样品获得的稳定性结果表明本发明的脱酰胺基 IFN- β 蛋白质类似物适合于用作治疗剂的不含 HA 制剂。为制备治疗性组合物,可将上述部分或基本上纯的蛋白质类似物与药学上可接受的载体介质(例如此类型治疗性产品所熟知的)混合。

[0044] 虽然本发明组合物显示不含 HA 的稳定性是有利的特性,但也可对含 HA 的制剂脱酰胺基,这些情况不能排除在本发明范围以外。此外,虽然本文主要参考 IFN- β 1b 蛋白质类似物描述了本发明,但本发明也适用于其它 IFN- β 类似物,包括 IFN- β 1a 类似物。

[0045] 本发明的 IFN- β 蛋白质类似物和组合物能显示生物学活性提示其能在许多应用中用作治疗剂,包括调节患者的细胞生长、治疗患者的病毒性疾病和刺激患者的天然杀伤细胞活性。一种具体应用是治疗患者的多发性硬化症,特别是复发-缓解性 MS。就这点而言,本发明的治疗剂可用于治疗以降低多发性硬化症的发作频率。脱酰胺基 IFN- β 蛋白质类似物的生物学活性水平升高表明其作为治疗剂,例如用于治疗和控制 MS 的疗效升高。

[0046] 本发明的另一方面提供了内切蛋白酶-C(Glu-C) 肽图技术。肽图通过在较低 pH 进行还原型蛋白质样品的酶消化,然后采用液相层析(例如, RP-HPLC)分辨消化产物片段得到蛋白质的指纹分布图。制作肽图可作为本发明脱酰胺基 IFN- β 蛋白质类似物产物的

ID 检验而用于质控。它也是监测蛋白质在因氧化或脱酰胺基（而发生）的诸如剪接、突变和降解的情况中微小一级结构修饰的有利工具。

[0047] 已知脱酰胺基 IFN- β 的一种变体含有环状酰亚胺，脱酰胺基的中间体形式。发现在稳定性样品中此环状酰亚胺形式增加。用于 IFN- β 的常规肽图的大多数酶（包括 Lys-C 在内）在中性到高 pH 处消化蛋白质最佳。在中到高 pH，环状酰亚胺不稳定，进一步脱酰胺基被人工诱导。因此，监测样品中环状酰亚胺和其它脱酰胺基形式（Asp，异-Asp）的天然水平需要在还原和消化过程中将样品维持于低 pH 环境。

[0048] 内切蛋白酶-C(Glu-C) 肽图与在 pH 8 以下，例如约 3-8（如约 3、4、5、6、7 或 8 或介于其间的 pH）起作用的还原剂联用（couple）。合适的还原剂是三-(2-羧基乙基)膦（TCEP）。可利用在 pH 约 3-8 起作用的其它还原剂，例如二硫苏糖醇（DTT）、2-巯基乙醇、半胱氨酸、还原型谷胱甘肽、2-巯基乙醇和硫代乙醇酸。对于其酶活性，Glu-C 肽图具有两个最佳 pH，pH 7.8 和 pH 4.0。如上所述，已知 TCEP 在 pH 8.0 以下起作用。在一个实施方案中，新型 Glu-C 肽图所利用的样品制备包括通过 TCEP 还原和在 4.0 的低 pH 处消化，该 pH 在保留样品中脱酰胺基形式，例如环状酰亚胺的天然水平的最佳 pH 范围内。可利用该新型肽图技术来特征鉴定 IFN- β 样品中含脱酰胺基形式（包括环状酰亚胺）的消化产物片段。

[0049] 可通过 Glu-C 肽图检验 IFN- β 样品来鉴定脱酰胺基位点及其形式（例如，Asp、异 Asp、环状酰亚胺）。可利用 TCEP 还原缓冲制剂中的蛋白质样品（例如 2-500mM（或在一些情况中是 50-100mM）盐缓冲液的制剂缓冲液配制的浓度为 0.1-10，如 0.5mg/ml 的 0.5ml 蛋白质样品），例如蛋白质与 TCEP 的摩尔比为 1 : 2-1 : 30，如 1 : 3、1 : 4、1 : 5、1 : 10 或 1 : 20，如 1 : 10，所述盐是，例如天冬氨酸盐、碳酸氢盐（如，碳酸氢铵）、碳酸盐（如碳酸铵）、乙酸盐（如乙酸铵）、磷酸盐（如磷酸钠）、柠檬酸盐、甲酸盐、琥珀酸盐、MES、PIPES、ACES、MOPS、MOPSO、HEPES、TES、TRIS-HCl、BIS-TRIS、BIS-TRIS 丙烷、ADA、BES、DIPSO、TAPSO、HEPPSO、POPSO、EPPS、TEA 等，本领域技术人员知道为所需的 pH 而合适地选择和利用这些盐（例如，2mM 天冬氨酸，pH 4）。培育样品，例如在约 30-40°C（如 37°C）直至样品物质被还原。取决于样品的不稳定性，合适的培育时间可以从约 5 分钟-24 小时，例如 3 小时。然后用（例如）1-10，如 4mg/ml Glu-C 消化还原的物质，在约 30-40°C（如 37°C）培育直至样品物质被消化，其中蛋白质与 Glu-C 的质量比是 1 : 1-20 : 1（或任何合适的中间比例，包括 2 : 1、3 : 1、4 : 1、10 : 1 等），例如 5 : 1。取决于样品的不稳定性，合适的消化时间可以从约 5 分钟-24 小时，例如 4 小时。可采用液相层析，例如 RP-HPLC 分辨肽片段。

[0050] 以下实施例章节描述了具体的肽图实验及其结果。

实施例

[0051] 以下实施例描述了本发明的各方面，但不是以任何方式限制本发明。在各种这些实施例中，对显示效力升高的两种主要的可识别种类：环状酰亚胺和其它脱酰胺基形式（Asp 和异 Asp）进行了区分。所有的形式都是脱酰胺基形式，但当要区别环状酰亚胺和其它脱酰胺基形式（Asp 和异 Asp）时，有时将前者称为“环状酰亚胺”，而有时将后者称为“脱酰胺基的”或“脱酰胺基”，特别是在附图标记中。

[0052] 实施例 1：不含 HA 的 IFN- β 1b 稳定性样品的效力升高

[0053] 概述

[0054] 在不含 HA 的 IFN- β 1b 稳定性样品中观察到效力升高。致细胞病变效应 (CPE) 生物试验显示在不含 HA 的 IFN- β 25 $^{\circ}$ C 稳定性样品中效力随时间 (T = 0-6 个月) 升高。在 25 $^{\circ}$ C 稳定性样品中也观察到最终脱酰胺基产物及其中间体, 环状酰亚胺增加。

[0055] 制作 Glu-C 肽图鉴定了位于 Asn25 的脱酰胺基位点, 该肽图显示不含 HA 的 IFN- β 1b 稳定性样品中脱酰胺基的主要形式是异-Asp 和环状酰亚胺类似物, 而 Asp 形式略有增加。

[0056] 从 RP-HPLC 方法获得的结果表明不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品中脱酰胺基形式 (环状酰亚胺、Asp 和异 Asp) 明显增加。

[0057] CPE 和抗增殖试验显示不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品中的脱酰胺基形式的生物学活性高于母体 (酰化) IFN- β 。

[0058] 根据这些发现, 认为脱酰胺基 (形成 Asp、异 Asp 和环状酰亚胺类似物) 提高了不含 HA 的 IFN- β 的生物学活性。因此, 可制备 IFN- β 的脱酰胺基形式来提高 IFN- β 治疗剂的生物学活性, 既可以不含 HA 也可以含 HA。可通过在中温至高温和 / 或在低、中或高 pH 培育 IFN- β 溶液 (既可以不含 HA 也可以含 HA) 来制备脱酰胺基类似物。本发明的脱酰胺基产物可降低所需的临床剂量, 增加室温下液体 IFN- β 制剂的稳定性。降低临床剂量可减少发生不利免疫反应 (例如, 中和抗体) 的患者比例。

[0059] 以下提供了从各种稳定性研究和 IFN- β 1b 制品分析得到的证实本发明的数据:

[0060] 1. 不含 HA 的 IFN- β 稳定性数据

[0061] 如下表 1 (药物物质: 2mM 天冬氨酸, pH 4.0 配制) 和表 2 (药物产品: 2mM 天冬氨酸, pH 4.0, 9% 海藻糖配制) 所示, 致细胞病变效应 (CPE) 生物试验显示不含 HA 的 IFN- β 1b 25 $^{\circ}$ C 稳定性样品的效力随时间增加 (T = 0-6 个月):

[0062] 表 1 不含 HA 的干扰素 - β 1b 药物物质的 CPE 生物试验稳定性数据

[0063]

分析方法: CPE 试验						
接受标准: $1.3-5.1 \times 10^7$ IU/mg						
批号	检验运行	TA2040	TA2085	检验运行	TA2040	TA2085
描述:	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml
研究编号:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
保存:	5 $^{\circ}$ C	5 $^{\circ}$ C	5 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C /60%RH	25 $^{\circ}$ C /60%RH	25 $^{\circ}$ C /60%RH
方向:	正放 (upright)	正放	正放	正放	正放	正放
月	IU/mg \times 10^7	IU/mg \times 10^7	IU/mg \times 10^7	IU/mg \times 10^7	IU/mg \times 10^7	IU/mg \times 10^7
0	2.8	2.8	2.9	2.8	2.8	2.9
1.5	ND	ND	ND	4.2	3.5	3.6
3	3.0	2.9	2.8	4.6	4.2	4.1
4.5	ND	ND	ND	5.7	4.9	5.0
6	3.3	3.1	2.9	6.3	5.4	4.8
ND: 未做; RH: 相对湿度						

[0064] 表 2 不含 HA 的干扰素 - β 1b 药物产品的 CPE 生物试验稳定性数据

[0065]

批号	14159-49 (非临床)	25FEB03 (检验运行)	TA2158	TA2451
描述:	1.2ml; 0.25mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml
研究编号:	1335	1438	1442	1444
保存:	25°C /60% RH	25°C /60% RH	25°C /60% RH	25°C /60% RH
方向:	倒置 (inverted)	倒置	倒置	倒置
月	IU/mg×10 ⁷	IU/mg×10 ⁷	IU/mg×10 ⁷	IU/mg×10 ⁷
0	2.8	2.7	2.7	2.6
1.5	3.2	3.7	3.5	3.6
3	4.3	4.4	4.4	4.2
4.5	4.1	4.8	4.6	4.6
6	4.6	5.3	5.5	5.4

[0066] 如下表 3 和 4 所示,阳离子交换 (CEX)-HPLC 证实药物物质和药物产品的 25°C 样品的稳定性数据也分别显示脱酰胺基作用增加 (D-IFN-β):

[0067] 表 3 不含 HA 的干扰素-β 1b 药物物质的 CEX-HPLC 稳定性数据

[0068]

分析方法: CEX HPLC						
接受标准: 报道%脱酰胺基作用						
批号	检验运行	TA2040	TA2085	检验运行	TA2040	TA2085
描述:	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml	6ml; 2mg/ml
研究编号:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
保存:	5°C	5°C	5°C	25°C /60%RH	25°C /60%RH	25°C /60%RH
方向:	正放	正放	正放	正放	正放	正放
月	脱酰胺基 %	脱酰胺基 %	脱酰胺基 %	脱酰胺基 %	脱酰胺基 %	脱酰胺基 %
0	6	6	6	6	6	6
1.5	ND	ND	ND	10	10	9
3	7	6	7	14	14	13
4.5	ND	ND	ND	20	20	18
6	5	6	6	22	22	20
ND: 未做						

[0069] 表 4 不含 HA 的干扰素-β 1b 药物产品的 CEX-HPLC 稳定性数据

[0070]

批号	14159-49 (非临床)	25FEB03 (检验运行)	TA2158	TA2451
描述:	1.2ml; 0.25mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml	1.2ml; 1.0mg/ml
研究编号:	1335	1438	1442	1444
保存:	25°C/60%RH	25°C/60%RH	25°C/60%RH	25°C/60%RH
方向:	倒置	倒置	倒置	倒置
月	脱酰胺基%	脱酰胺基%	脱酰胺基%	脱酰胺基%
0	4	7	7	7
1.5	7	11	13	12
3	12	18	18	17
4.5	16	24	24	22
6	18	37 ¹	35 ¹	40 ¹
10	结束	IP	IP	IP
	结束			

[0071] 下表 5 和 6 显示利用反相 (RP)-HPLC 技术分别在药物物质和药物产品的 25°C 样品中也观察到峰 D (代表脱酰胺基的环状酰亚胺中间体形式) 随时间增加:

[0072] 表 5 不含 HA 的干扰素-β 1b 药物物质的 RP-HPLC 稳定性数据

[0073]

分析方法: RP HPLC															
接受标准: 报道%峰面积															
批号	检验运行					TA2040					TA2085				
描述:	6ml; 2mg/ml					6ml; 2mg/ml					6ml; 2mg/ml				
研究编号:	1403					1412					1415				
保存:	25°C/60%RH					25°C/60%RH					25°C/60%RH				
方向:	正放					正放					正放				
月	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它
0	2	96	12	85	2	2	96	11	85	2	2	96	11	86	2
1.5	2	95	17	78	3	2	96	17	79	2	2	96	16	80	3
3	1	93	20	73	6	1	92	19	73	7	1	92	19	73	7
4.5	2	91	24	67	7	2	90	24	66	8	1	91	23	68	8
6	2	93	26	67	5	1	93	25	68	5	1	94	23	68	5

[0074] 表 6 不含 HA 的干扰素-β 1b 药物产品的 RP-HPLC 稳定性数据

分析方法: RP HPLC															
接受标准: 报道%峰面积															
批号	25FEB03 (检验运行)					TA2158					TA2451				
描述:	1.2ml; 1.0mg/ml					1.2ml; 1.0mg/ml					1.2ml; 1.0mg/ml				
研究 编号:	1438					1442					1444				
保存:	25°C/60%RH					25°C/60%RH					25°C/60%RH				
方向:	倒置					倒置					倒置				
月	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它	峰 A	主峰 (D+B)	峰 D	峰 B	其它
0	1	93	12	81	6	1	93	11	82	6	1	93	12	81	6
1.5	1	92	16	76	6	1	92	17	74	7	1	91	17	75	8
3	2	90	22	68	8	2	91	21	69	8	2	91	21	70	7
4.5	2	94	23	71	5	1	94	22	72	5	1	94	22	72	4
6	1	94	24	70	5	1	94	24	71	5	1	95	24	71	4
结束															

[0076] 图 4-11 显示了本发明一方面的各种不含 HA 的 IFN- β 稳定性药物物质和产物批次中脱酰胺基的 IFN- β 1b (“D-IFN%”或“峰 D%”) 的效力与含量。这些数据证实效力升高与不含 HA 的 IFN- β 的脱酰胺基水平相关。

[0077] 2. 不含 HA 的 IFN- β 稳定性样品的特征鉴定

[0078] 图 3 显示了 IFN- β 1b 的一级序列。发现脱酰胺基发生在 Asn25。下述试验研究了该脱酰胺基作用的性质和脱酰胺基产物的特性：

[0079] 2.1Glu-C 肽图

[0080] 肽图利用酶消化, 然后采用 RP-HPLC 得到蛋白质的指纹分布图。制作肽图可作为 ID 检验而通常用于质控。它也是监测蛋白质因氧化或脱酰胺基(而发生)的诸如剪接、突变和降解的情况中微小一级结构修饰的有利工具。已知不含 HA 的 IFN- β 含有环状酰亚胺, 脱酰胺基的中间体形式。此环状酰亚胺是不含 HA 的 IFN- β 的关键降解变体, 发现它在稳定性样品中含量增加。目前不含 HA 的 IFN- β 肽图所用的大多数酶(包括 Lys-C)在中高 pH 消化蛋白质最佳。环状酰亚胺在中高 pH 不稳定, 可人工诱导脱酰胺基。因此, 监测样品中环状酰亚胺和脱酰胺基作用需要在还原和消化过程中将样品维持在低 pH 环境中。

[0081] 开发了与作为还原剂的三-(2-羧基乙基)膦(TCEP)联用的新型内切蛋白酶-C(Glu-C)肽图来特征鉴定不含 HA 的 IFN- β 中含有脱酰胺基形式(包括环状酰亚胺)的片段。已知 Glu-C 肽图具有两个对其酶活性最佳的 pH, pH 7.8 和 pH 4.0。已知 TCEP 在 pH 8.0 以下起作用。开发了能利用样品制品的新型 Glu-C 肽图, 该样品制品包括还原和在 4.0 的低 pH 处消化, 该 pH 在保留样品中脱酰胺基形式, 例如环状酰亚胺的天然水平的最佳 pH 范围内。由于本文开发的肽图利用低 pH 样品制品, 因而能成功地精确监测不含 HA 的 IFN- β 中脱酰胺基形式的天然水平。

[0082] 采用 Glu-C 肽图检验了不含 HA 的 IFN- β 1b 药物产品批次 TA2451 的稳定性样品(25°C, 3、6 和 9 个月)来鉴定脱酰胺基位点及其形式(例如, Asp、异 Asp、环状酰亚胺)。利用 TCEP 还原用 2mM 天冬氨酸, pH 4.0 的制剂缓冲液配制的浓度为 0.5mg/ml 的各 0.5ml 蛋白质样品。37°C 培育样品与 TCEP 3 小时, 蛋白质和 TCEP 的摩尔比为 1 : 10。然后用 4mg/

ml Glu-C 消化还原的物质（蛋白质和 Glu-C 的质量摩尔比为 5 : 1），37℃ 培育 4 小时。采用 RP-HPLC 层析（ThermoHypersil BioBasic C18, 150×4.6mm, 5 μm），利用 0.1% 三氟乙酸配制的乙腈梯度作为洗脱缓冲液，流速为 1.0ml/ 分钟和柱温为 38℃ 来分辨肽片段。

[0083] 图 12A 显示了本发明一方面的不含 HA 的 IFN-β 稳定性样品的 Glu-C 肽图。图 12B 显示了图 12A 所述肽图中 22-26 分钟 RT 部分的放大图。

[0084] 如附图所示，片段 E1 的峰随时间降低，而代表异 -Asp、环状酰亚胺和 Asp 的峰升高。那些峰是片段 E1 中 25 位 Asn 的脱酰胺基形式。对通过赖氨酰内切肽酶消化 E1 相关片段得到的 E1 亚片段进行质谱和 Edman 测序来特征鉴定该峰。在氨基酸序列中 Asn25 残基后是甘氨酸。已知此 Asn-Gly 序列的脱酰胺基速率快。

[0085] 根据此 Glu-C 肽图结果，不含 HA 的 IFN-β 稳定性样品中脱酰胺基的主要形式鉴定为异 -Asp 和环状酰亚胺。Asp 形式的水平也略有升高。

[0086] 2. 2RP-HPLC

[0087] RP-HPLC 根据疏水性分离这些化合物。通过 RP-HPLC 方法检验不含 HA 的 IFN-β 1b 样品来特征鉴定 IFN-β 1b 变体（例如，Asp、异 -Asp、环状酰亚胺）。将检验样品注射到 Zorbax 300SB-CN, 150×4.6mm, 3.5 μm 粒径的层析柱上，利用 0.1% 三氟乙酸洗脱缓冲液配制的乙腈梯度分离 IFN-β 1b 变体。对照样品的结果见图 13。

[0088] 通过在线 LC/ 质谱分析（RP-HPLC/Q-TOF/ESI-MS）进行附图所示的峰鉴定。分出 HPLC 流出液的约 1 : 20，以约 50ul/ 分引入质谱仪的离子源。所述质谱仪是装有电喷雾离子源的 Micromass Q-TOF2 仪器。离子电压设置在 3200，锥孔电压设置在 50。利用飞行时间（TOF）分析仪收集 m/z 300 和 2500 之间的数据。在线 LC/ 质量数据显示在一些 RP-HPLC 峰中有多种蛋白质变体共同洗脱。

[0089] 图 14 显示不含 HA 的 IFN-β 1b 药物产品批次稳定性样品（25℃ 约 10 个月）的 RP-HPLC 分布图。如图所示，该分布图不同于对照样品（图 13），不含 HA 的 IFN-β 1b 中环状酰亚胺（峰 D）和脱酰胺基形式（Asp 和 / 或异 -Asp）（中峰）显著增加。观察到多种次要的其它脱酰胺基和环状酰亚胺变体。这些变体是因其不同的疏水特性而得到分离的具有其它结构和化学修饰的脱酰胺基和环状酰亚胺变体。

[0090] 2. 3CPE 生物试验

[0091] IFN-β 能在哺乳动物细胞中诱导抗病毒状态，其中抑制了一些病毒类型的复制和导致细胞的致细胞病变效应（CPE）。利用 A549 人肺癌细胞和鼠脑心肌炎（EMC）病毒评估从不含 HA 的 IFN-β 1b 药物产品批次的稳定性样品（25℃ 约 10 个月）获得的 RP-HPLC 级分的生物学活性。

[0092] 将细胞培养在 96-孔板中，利用 IFN-β 1b 的连续稀释液处理过夜，再加入病毒。然后培育培养液合适的时间以使病毒复制。用充足的 IFN-β 1b 处理的细胞受到保护免遭病毒攻击，保持存活。未受保护的细胞发生致细胞病变改变，死亡。采用染色技术和从细胞活力（光密度检测）与 IFN-β 浓度图制作的剂量反应曲线定量测定干扰素剂量依赖性 CPE。IFN-β 活性计算为半最大细胞保护所需的浓度（EC₅₀ 浓度）。

[0093] 如图 15 所示，脱酰胺基级分（中峰，级分 16）中 CPE 活性明显高于母体 IFN-β 1b 级分（峰 B，级分 18）。环状酰亚胺级分（峰 D，级分 15）也显示 CPE 活性高于母体 IFN-β 1b 级分。

[0094] 2.4 抗增殖试验

[0095] IFN- β 显示对从人肿瘤开发的许多细胞系有抗增殖活性。利用两种细胞系 (Hs294T- 人黑色素瘤细胞系和 Daudi- 衍生自伯基特淋巴瘤的人 B 成淋巴细胞系) 评估从不含 HA 的 IFN- β 1b 药物产品批次的稳定性样品 (25°C 约 10 个月) 获得的 RP-HPLC 级分的生物学活性。

[0096] 在 96- 孔板中连续稀释 IFN- β 测试样品。在组织培养基中制备效应细胞, 将其加入试验平板。培育 3 天后, 用 Alamar 蓝染色细胞或用 Coulter 计数器计数来检测生长反应。细胞生长以剂量依赖性方式对 IFN- β 起反应而受到抑制。从细胞数目 (光密度检测) 与 IFN- β 浓度图制作剂量反应曲线。IFN- β 活性计算为半最大细胞生长所需的浓度 (ED_{50} 浓度)。

[0097] 如图 16A (Hs294T) 和 16B (Daudi) 所示, 脱酰胺基级分 (中峰, 级分 16) 和环状酰亚胺级分 (峰 D, 级分 15) 中的抗增殖活性明显高于母体 IFN- β 级分 (峰 B, 级分 18)。

[0098] 3. 结论

[0099] 根据上述研究获得的稳定性数据和结果, 脱酰胺基作用 (Asp、异 Asp 和环状酰亚胺取代 25 位的 Asn) 提高了 IFN- β 的生物学活性。因此, 可有意制备 IFN- β 例如 IFN- β 1b 的脱酰胺基形式, 来提高该化合物的生物学活性。可在中高温或在低、中或高 pH 环境中通过培育 IFN- β 来制备脱酰胺基形式。本发明的脱酰胺基产物可降低所需的临床剂量, 增加室温下液体 IFN- β 制剂 (包括不含 HA 和含 HA 的 IFN- β 制剂) 的稳定性。降低临床剂量可减少发生不利免疫反应 (例如, 中和抗体) 的患者比例。

[0100] 实施例 2 : 可制造性数据

[0101] 如上所述, 进行了各实验来证实各种脱酰胺基技术。从 CPE 生物试验获得的数据证明采用适合于大规模药物生产的方法不难制备脱酰胺基 IFN- β 。具体地说, 在中 (例如, 室温) 到高 (例如, 37-40°C) 温度下培育 14-40 天的按照优质生产规范 (GMP) 生产的各种样品中观察到生物活性明显升高; 在室温和 pH 8.8 培育 GMP 样品约 1 小时, 和在 2-8°C pH 8.4 培育约 14 天使得生物活性几乎增加两倍。

[0102] CPE 生物试验结果

[0103] 测试 1

[0104]

样品名称	IU/mg
TR090602 散装 (Bulk)	2.79E+07
TR090602 稳定性室温 ¹ 20 天	3.87E+07
TR090602 稳定性 37°C 20 天	4.11E+07
受应力 (Stressed), 不含 HA, 对照	2.95E+07
受应力, 不含 HA, 碱 pH ²	4.52E+07

受应力, 不含 HA, 40°C, 30 天	5.06E+07
IFN CPE 试验对照	2.94E+07

[0105] 测试 2

[0106]

样品名称	IU/mg
TR090602 散装	3.62E+07
TR090602, 稳定性, 室温, 40 天	6.52E+07
TR090602, 稳定性, 37°C, 40 天	1.56E+08
GMP1# 散装	2.67E+07
GMP1# 散装, 稳定性, 37°C, 40 天	3.51E+07
GMP1# 散装, pH8.8 ³	4.79E+07
受应力, 不含 HA, 对照	2.26E+07
受应力, 不含 HA, 40°C, 14 天	3.44E+07
受应力, 不含 HA, 40°C, 30 天	4.05E+07
IFN CPE 试验对照	2.93E+07

[0107] 1) 室温

[0108] 2) 样品在 pH 8.4, 2-8°C 培育 14 天

[0109] 3) 样品在 pH 8.8, 室温培育 1 小时

[0110] 结论

[0111] 虽然为清晰理解的目的详细描述了上述发明, 但应知道可在附加的权利要求范围内实施某些改变和改进。应该注意有许多备选方式可执行本发明方法和组合物。因此, 应认为本发明的实施方案是说明性而非限制性, 本发明不限于本文给予的这些细节, 而可在附加的权利要求的范围和等价体内加以改进。

[0112] 本文引用的所有文献出于所有目的全文纳入本文作为参考。

5	10	15	20
MetSerTyrAsnLeu	LeuGlyPheLeuGln	ArgSerSerAsnPhe	GlnCysGlnLysLeu
25	30	35	40
LeuTrpGlnLeuAsn	GlyArgLeuGluTyr	CysLeuLysAspArg	MetAsnPheAspIle
45	50	55	60
ProGluGluIleLys	GlnLeuGlnGlnPhe	GlnLysGluAspAla	AlaLeuThrIleTyr
65	70	75	80
GluMetLeuGlnAsn	IlePheAlaIlePhe	ArgGlnAspSerSer	SerThrGlyTyrAsn
85	90	95	100
GluThrIleValGlu	AsnLeuLeuAlaAsn	ValTyrHisGlnIle	AsnHisLeuLysThr
105	110	115	120
ValLeuGluGluLys	LeuGluLysGluAsp	PheThrArgGlyLys	LeuMetSerSerLeu
125	130	135	140
HisLeuLysArgTyr	TyrGlyArgIleLeu	HisTyrLeuLysAla	LysGluTyrSerHis
145	150	155	160
CysAlaTrpThrIle	ValArgValGluIle	LeuArgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu
165	170	175	180
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---		

图 1

Asn 脱酰胺基途径

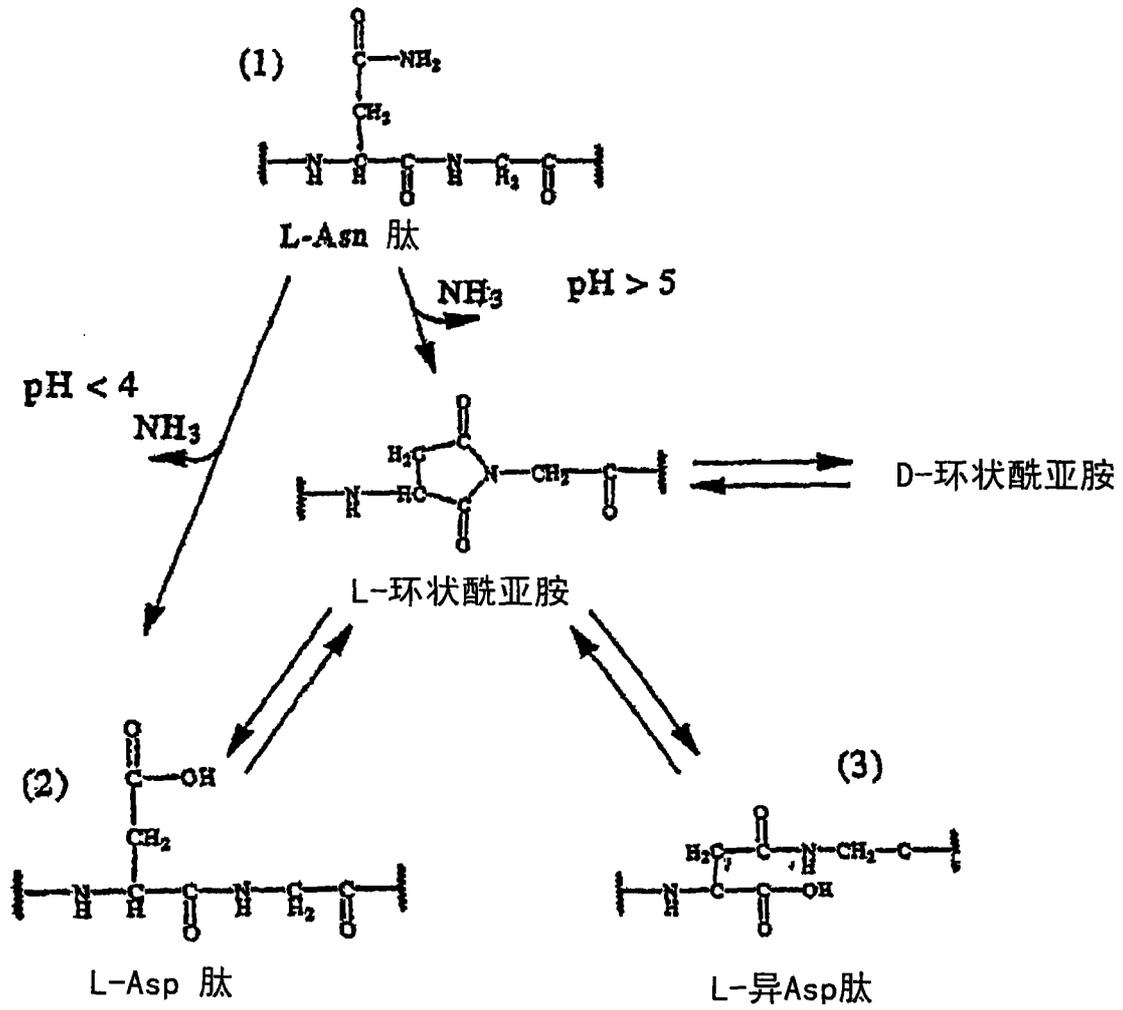


图 3

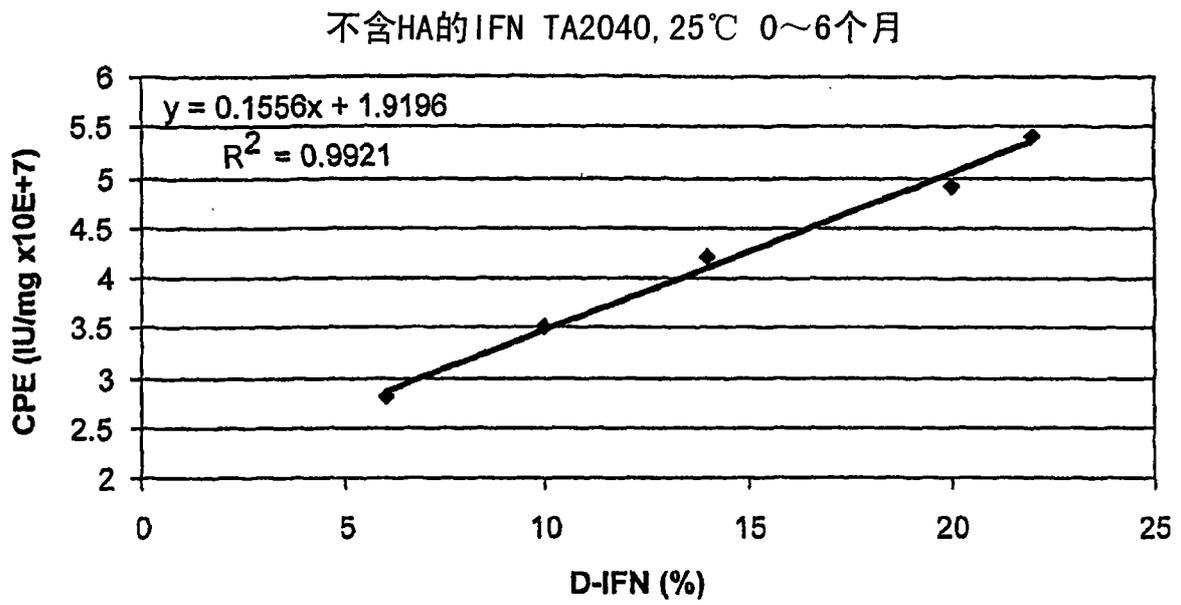


图 4

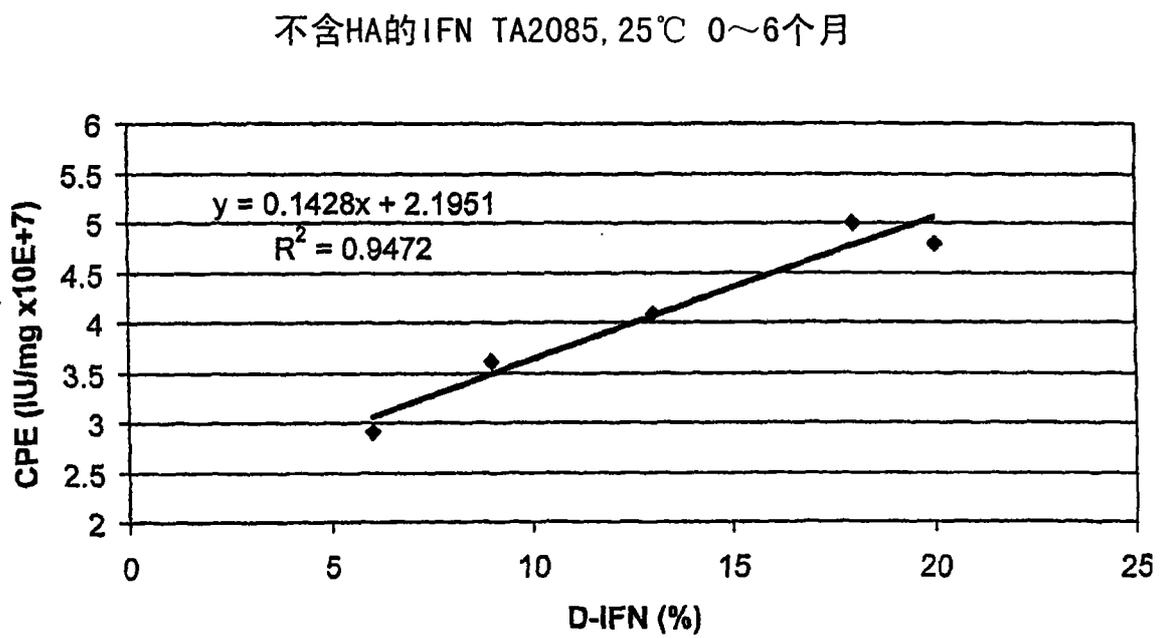


图 5

不含HA的IFN TA2158, 25°C 0~4.5个月

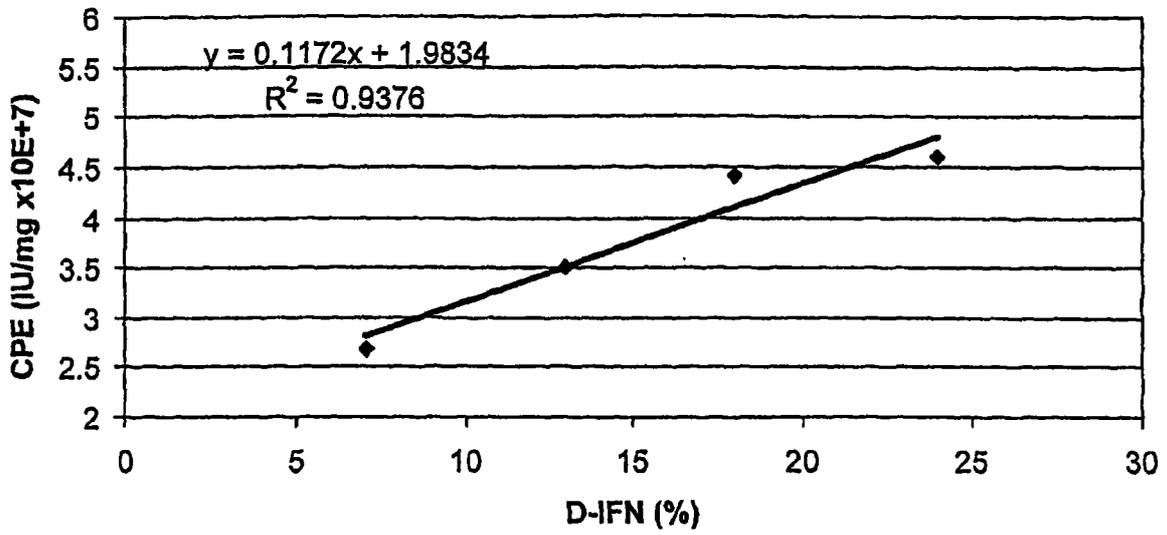


图 6

不含HA的IFN TA2451, 25°C 0~4.5个月

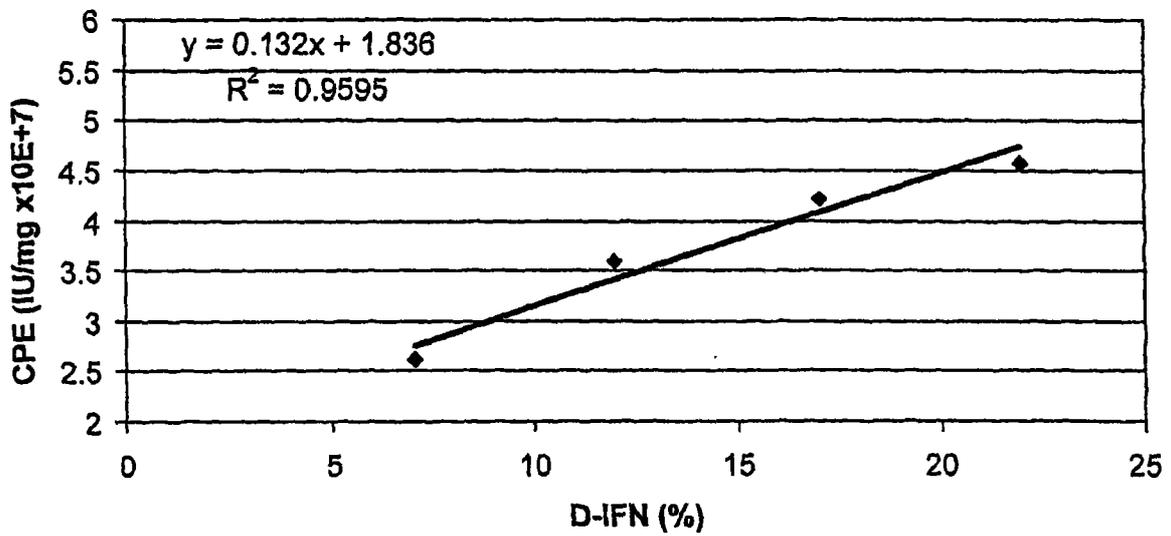


图 7

不含HA的IFN TA2040, 25°C 0~6个月

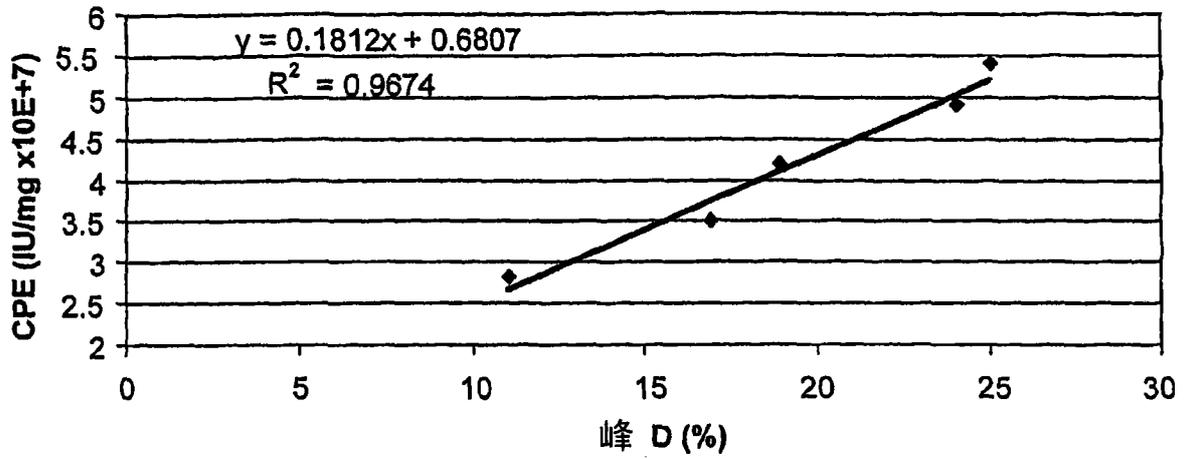


图 8

不含HA的IFN TA2085, 25°C 0~6个月

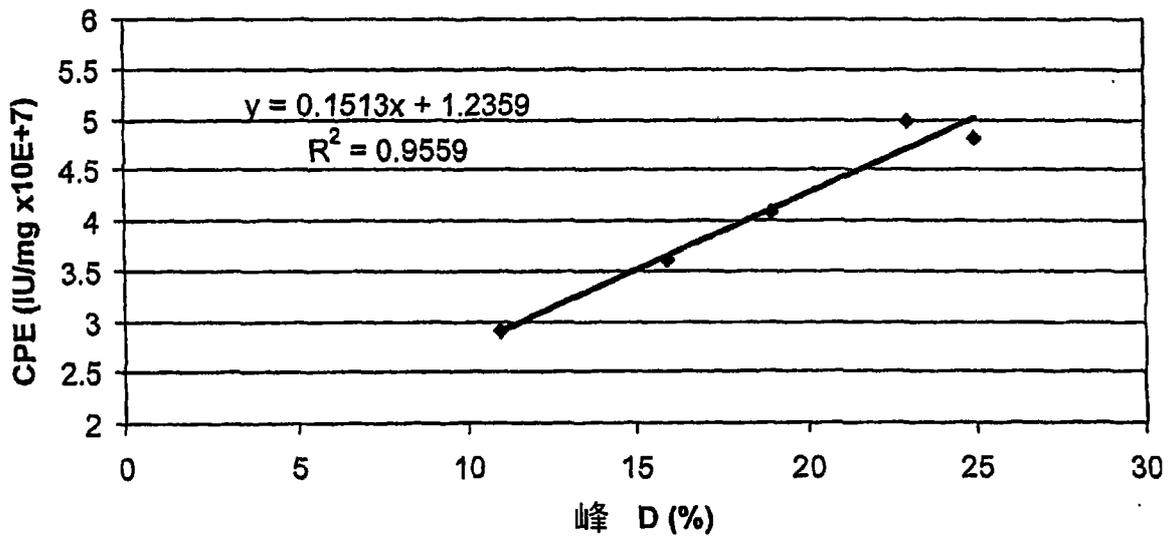


图 9

不含HA的IFN TA2158, 25°C 0~6个月

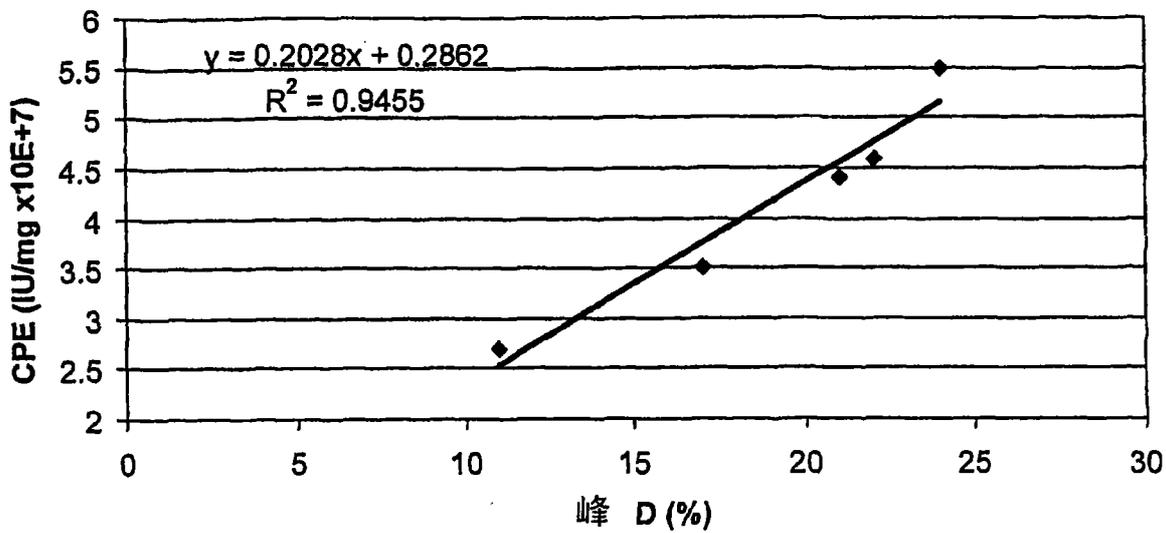


图 10

不含HA的IFN TA2451, 25°C 0~6个月

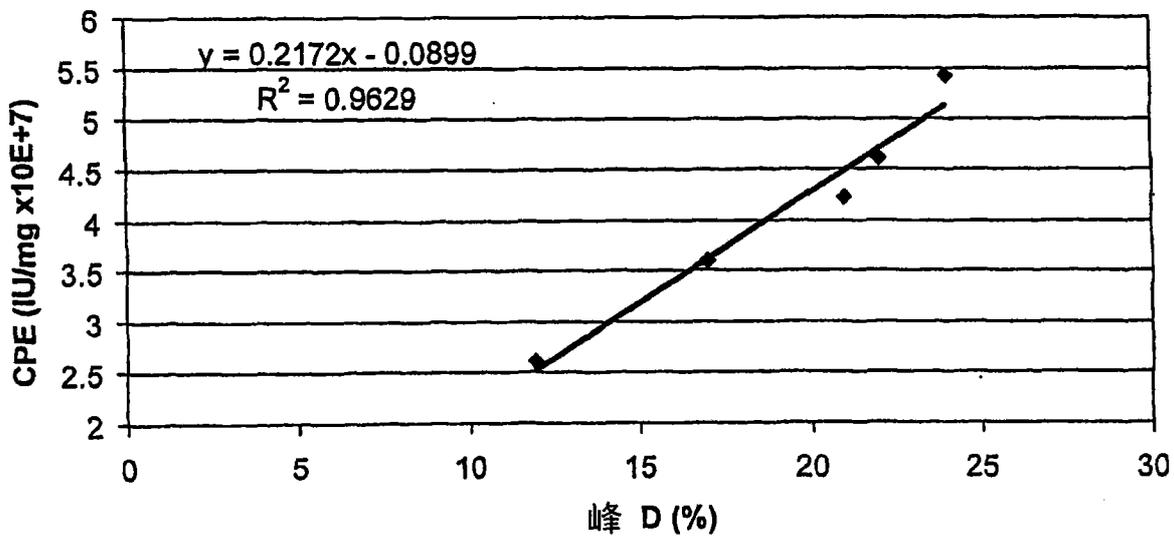


图 11

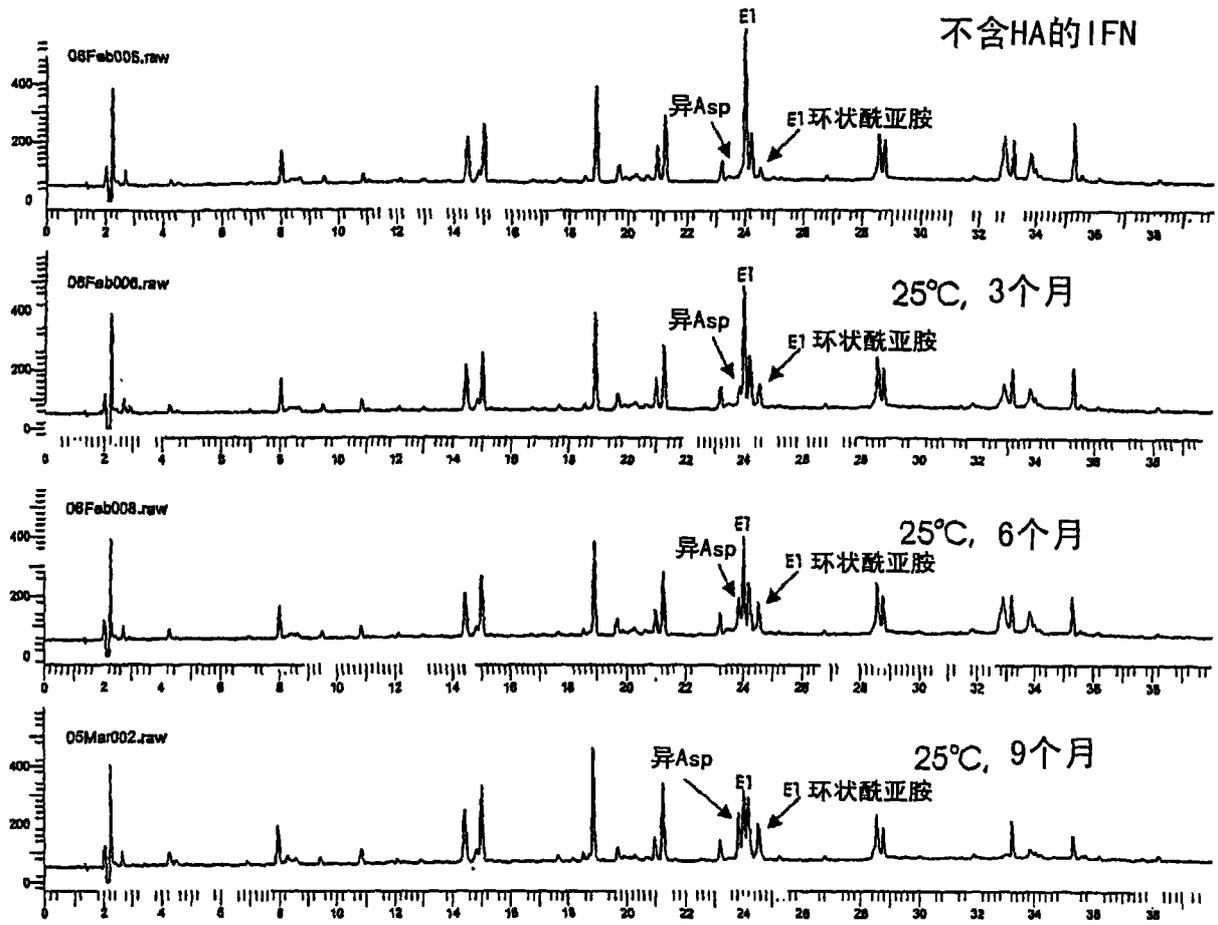


图 12A

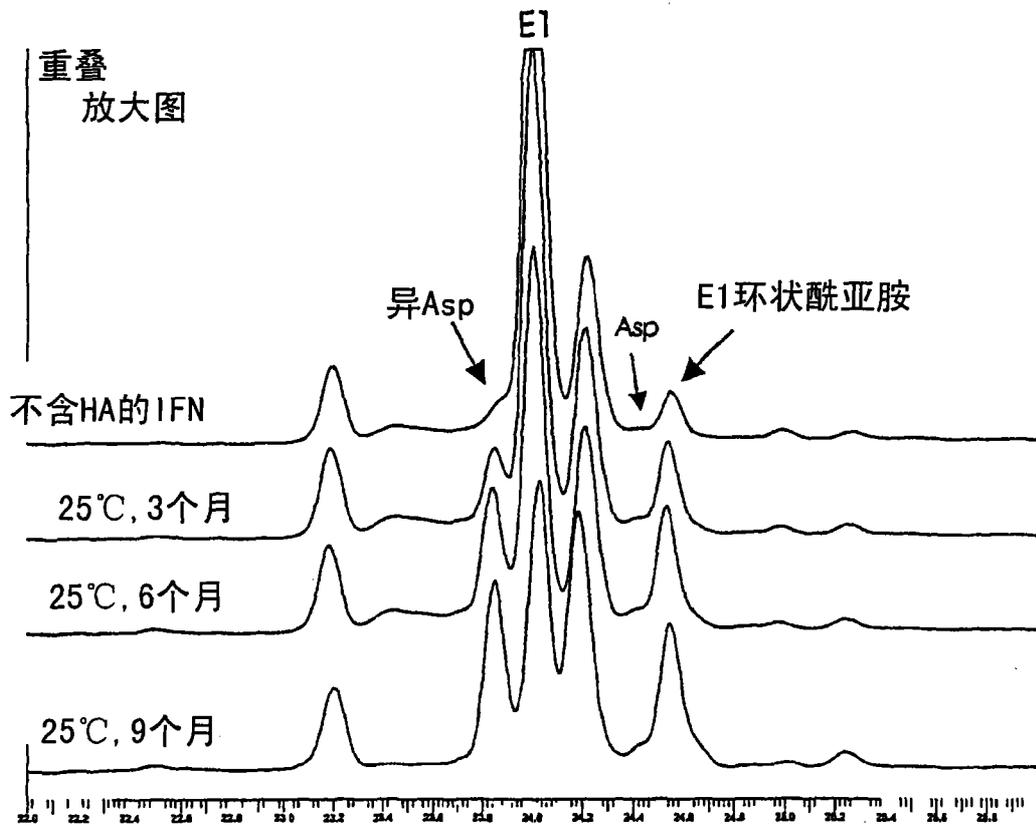


图 12B

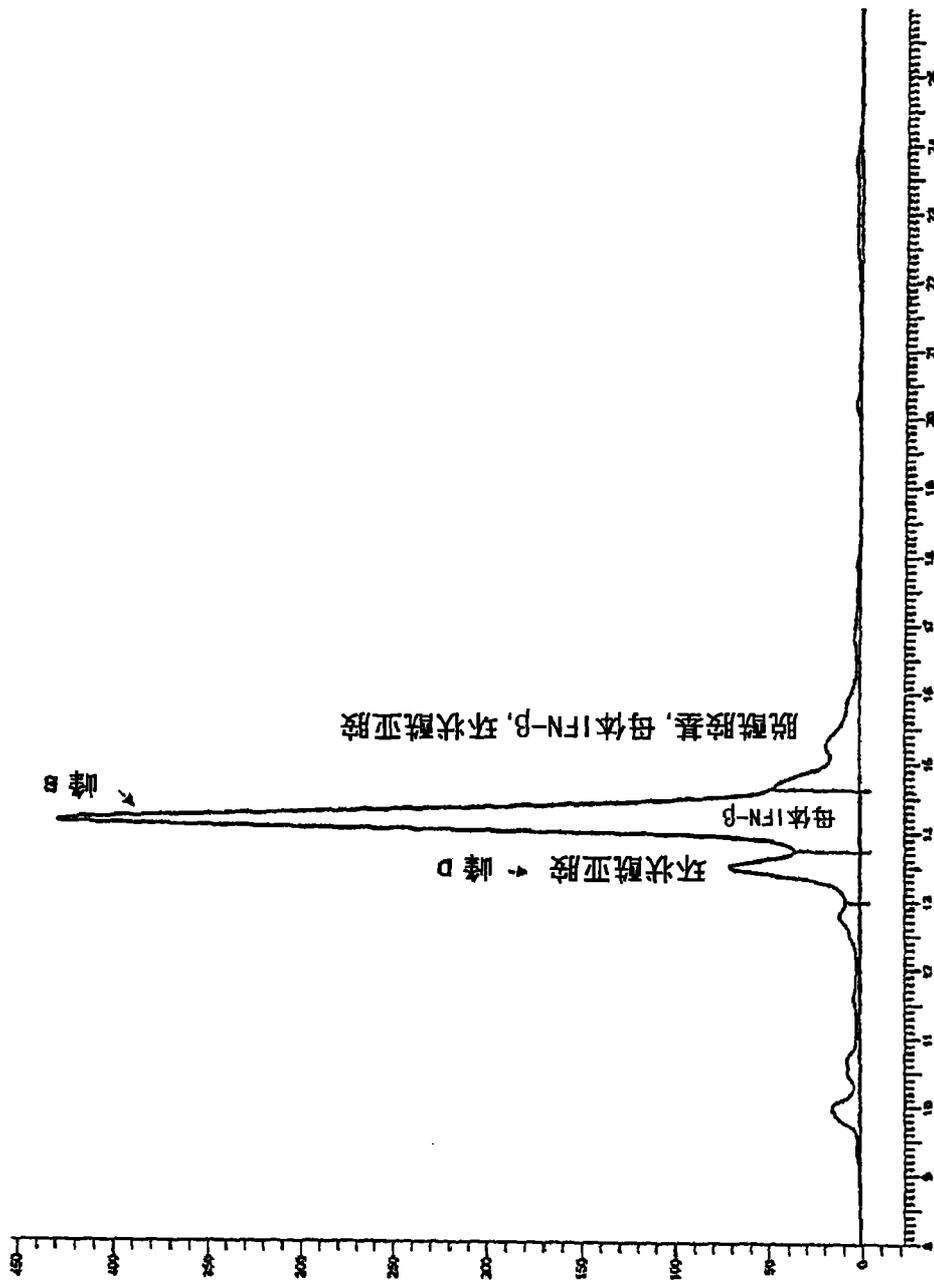


图 13

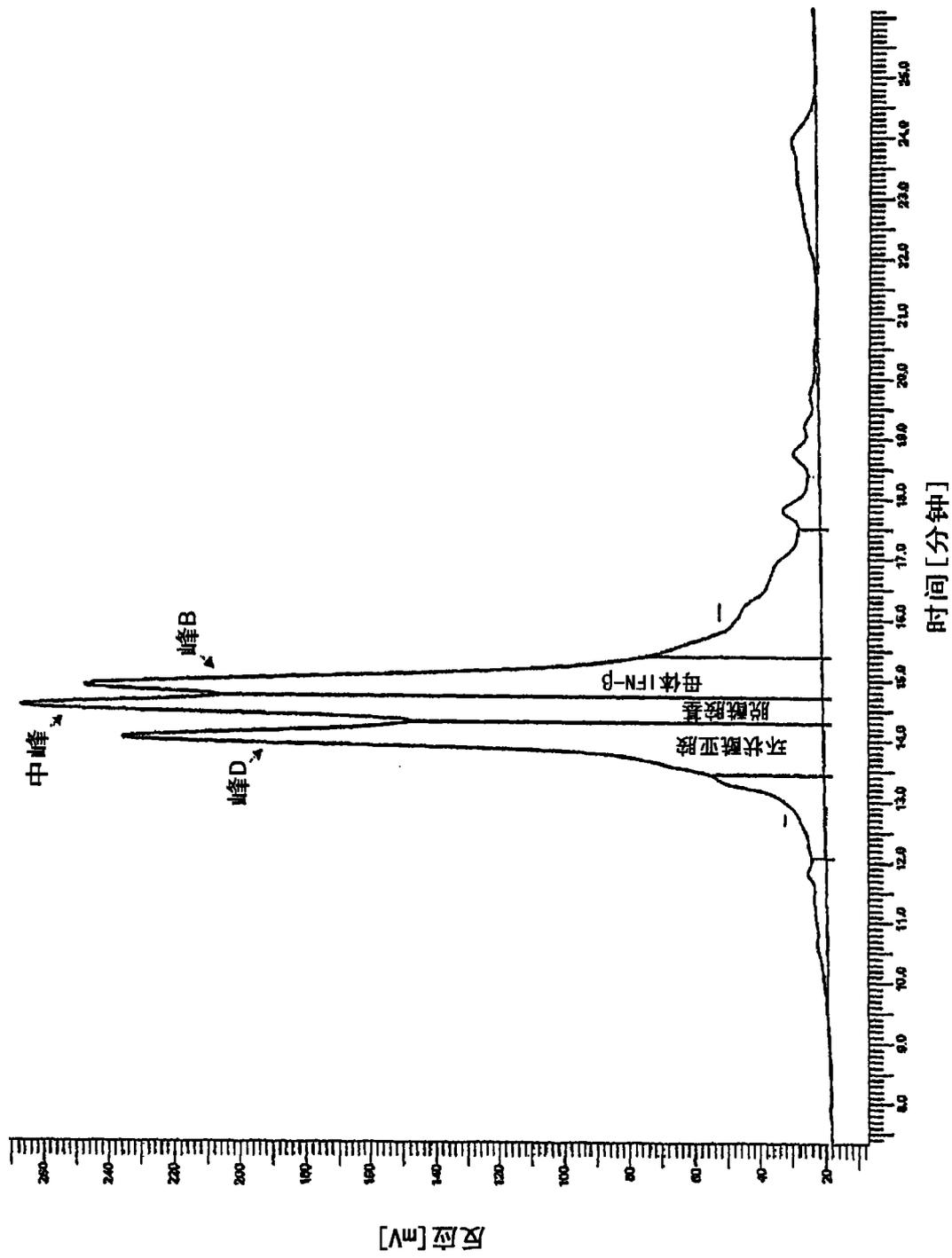


图 14

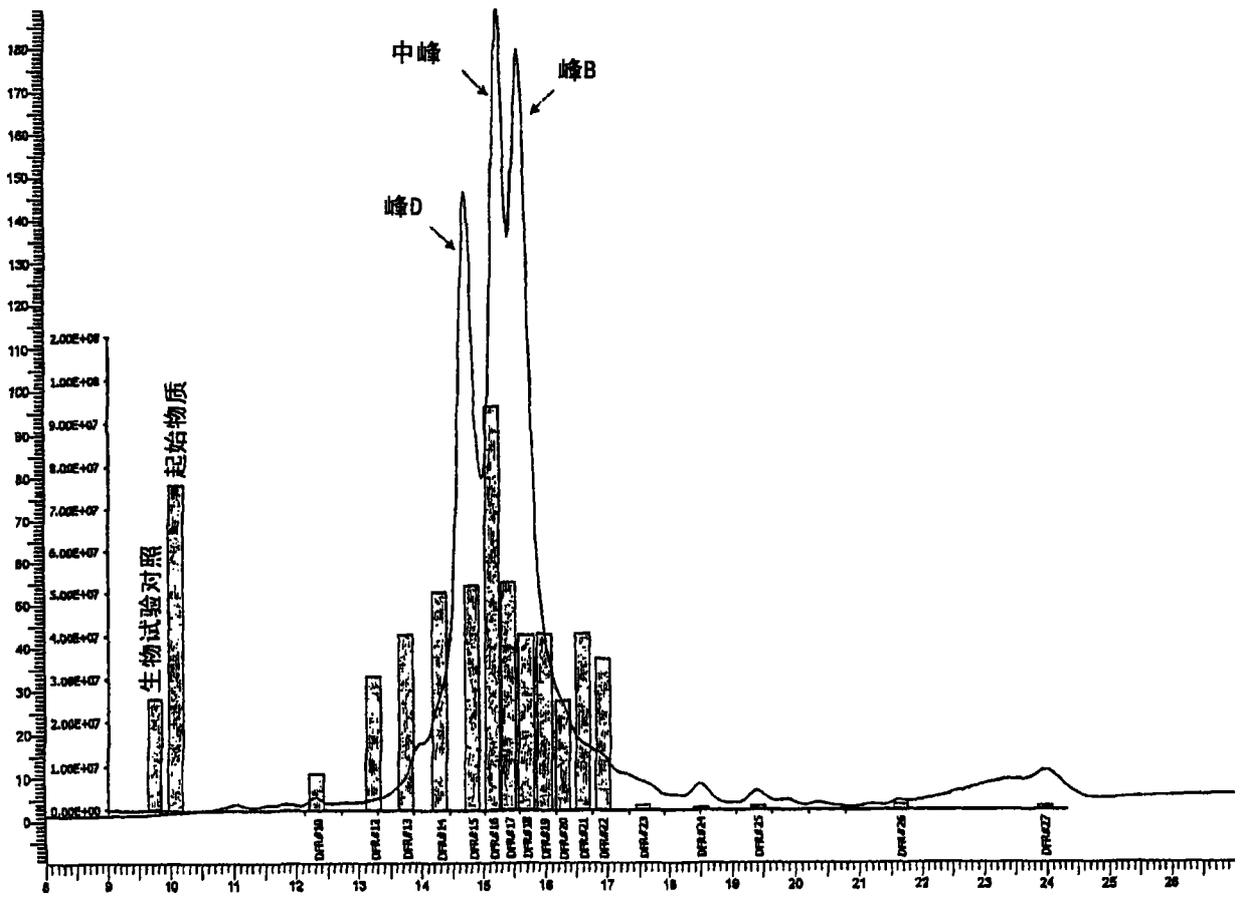


图 15

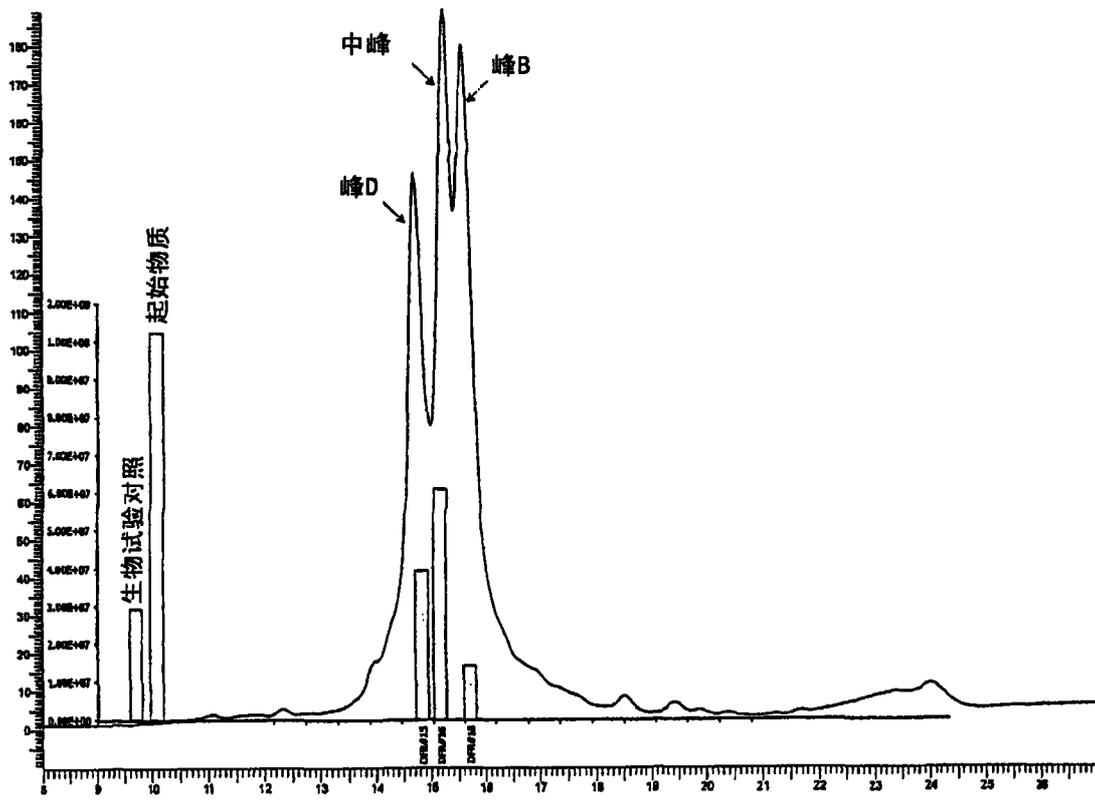


图 16A

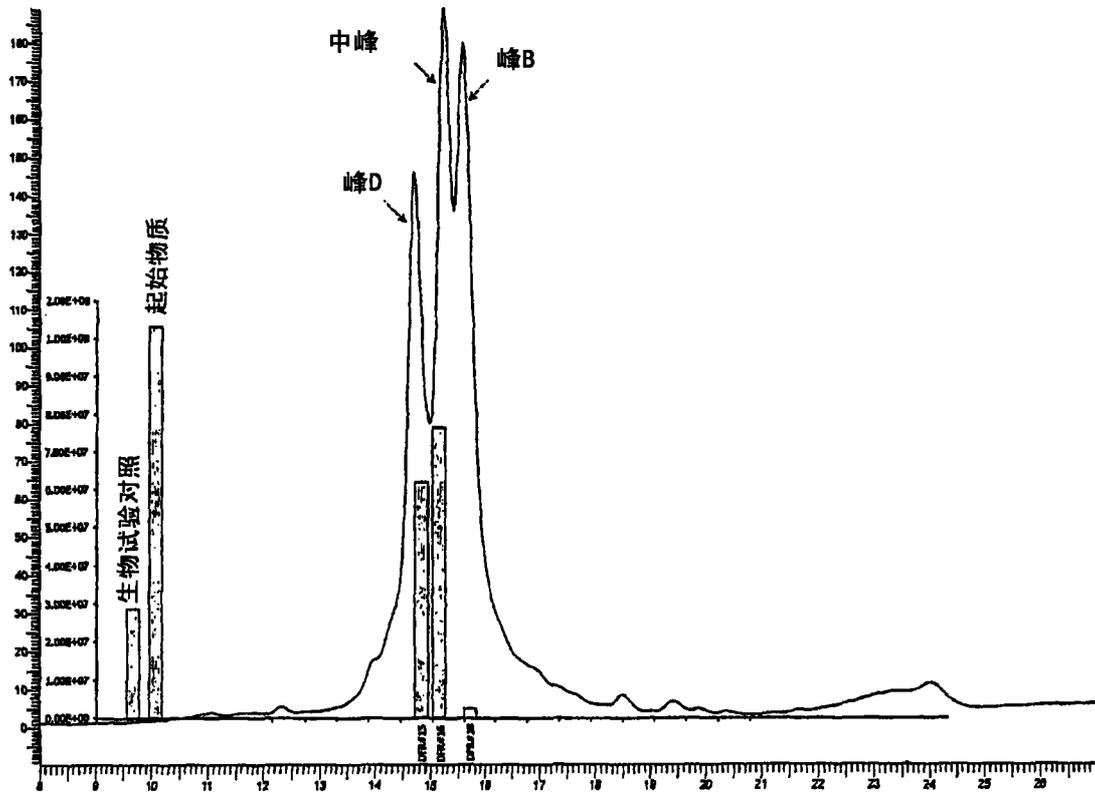


图 16B