



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년11월18일
 (11) 등록번호 10-1330626
 (24) 등록일자 2013년11월12일

- | | |
|---|---|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/565 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7011869
(22) 출원일자(국제) 2005년11월10일
심사청구일자 2010년08월27일
(85) 번역문제출일자 2007년05월25일
(65) 공개번호 10-2007-0084559
(43) 공개일자 2007년08월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/040758
(87) 국제공개번호 WO 2006/053134
국제공개일자 2006년05월18일
(30) 우선권주장
60/626,837 2004년11월10일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2004087753 A1
BBRC Vol.312:1082-1086 (2003) | (73) 특허권자
노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인코포레이티드
미합중국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560
(72) 발명자
후루야, 겐지
미국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560
존슨-잭슨, 드보라
미국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560
루시오, 다이애나 티에라
미국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼 스트리트 4560
(74) 대리인
송봉식, 정삼영 |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 14 항

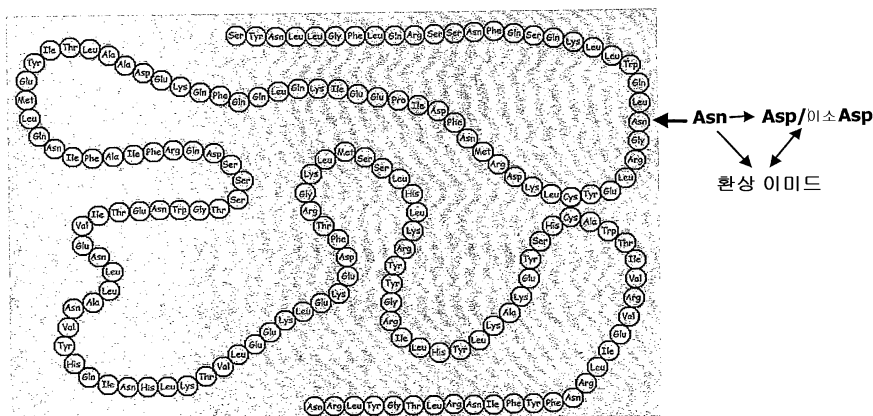
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **탈아미드화된 인터페론-베타**

(57) 요약

천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 25번 위치의 아스파라긴이 탈아미드화된 인터페론-β 단백질 유사체는 천연 사람 인터페론-β의 생물학적 활성을 증가된 수준으로 나타내고 단백질 안정화를 위하여 HA를 필요로 하지 않는다. 탈아미드화된 생성물은 다발성 경화증을 포함한 질환의 치료를 위한 HA-함유 또는 HA-무함유 치료제에 혼입하기 위한 대규모 제조에 적합하다. 또한, 효소에 의한 분해, 이어서 RP-HPLC를 사용하여 단백질의 핑거프린트 프로파일을 생산하는 엔도프로테이나제-C 펩티드 맵 기술은 탈아미드화된 생성물에 대한 ID 및/또는 정량 시험과 같은 품질 관리에 유용하다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체로서,
 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 25번 위치의 아스파라긴이 탈아미드화되고,
 상기 단백질 유사체는 천연 사람 인터페론-β의 생물학적 활성을 나타내는, 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 17번 위치의 시스테인이 결실되거나 중성 아미노산으로 대체되는 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 시스테인 잔기는 세린 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 아스파라긴 잔기는 아스파르테이트, 이소-아스파르테이트 및 환상 이미드로 구성된 군 중에서 선택된 잔기로 대체되는 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 단백질 유사체는 글리코실화되지 않는 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 단백질 유사체는 N-말단 메티오닌 결실을 가진 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 단백질 유사체는 인터페론-β_{ser17}보다 더 큰 생물학적 활성을 가진 것을 특징으로 하는 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체.

청구항 8

약학적으로 허용되는 담체 매개체와 혼합된 제 4 항의 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질 유사체의 치료적으로 유효한 양을 포함하는 인터페론-β 활성을 가진 다발성 경화증 치료용 치료 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제 8 항에 있어서, 조성물은 사람 알부민(HA)-무함유인 것을 특징으로 하는 다발성 경화증 치료용 치료 조성물.

청구항 12

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항의 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 단백질을 제조하는 방법

으로서,

인터페론- β 단백질을 25-60℃의 온도에서 적합한 조건 하에서 인큐베이션하는 단계; 및
탈아미드화된 단백질 유사체를 정제 및 분리하는 단계
를 포함하는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 40℃의 온도에서 14일 동안 인큐베이션하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 인큐베이션이 적어도 pH 4에서 수행되는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, pH 7-14에서 인큐베이션하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 인큐베이션은 pH 8-9에서 14일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생물학적 활성 단백질 화학의 일반적 영역에 있다. 더 구체적으로는 시스테인, 아스파라긴 및 다른 잔기의 치환, 결실 또는 변형에 의하여 천연 단백질과 상이한 돌연변이에 의하여 그리고 화학적으로 변형된 인터페론-β 유사체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인터페론-β는 사람 질환, 특히 다발성 경화증의 치료에 유용한 것으로 확인되었다. 다발성 경화증(MS)은 신경 섬유를 둘러싼 보호성 수초가 파괴될 때 발생하는 중추신경계 만성 질환으로서, 종종 불구를 야기하기도 한다. MS 환자의 약 30%는 그 증상이 재발(flare-up) 후 전체적으로 또는 부분적으로 사라지고, 몇 달이나 몇 년간 지속될 수 있는 안정기가 이어지는 재발-완화(relapsing-remitting) 형태의 질환을 경험한다. 베타 인터페론(인터페론-β 또는 IFN-β)의 투여는 MS 재발의 빈도를 감소시키는 것으로 증명되었다. 결과적으로, 인터페론-β 기제 약제는 MS의 관리 및 치료에 귀중한 도구가 되었다.

[0003] 재조합 DNA(rDNA) 기술은 인터페론-β 기제 약제의 대규모 제조를 촉진하도록 개발되었다. 특히 이들 기술에 의하여 다룰 필요가 있는 한 가지 문제는 그 아미노산 서열이 도 1(SEQ ID NO: 1)에 제공된 사람 베타 인터페론은 17, 31, 및 141번 위치에 있는 시스테인 잔기를 함유하고(Gene (1980) 10:11-15 및 Nature (1980) 285:542-547), 그것의 적어도 일부는 그것들의 활성에 필수적이지 않지만 자유롭게 바람직하지 않은 분자간 또는 분자내 연결을 형성한다는 것이었다. rDNA 기술에 의한 IFN-β의 미생물 제조의 과정에서, IFN-β의 다이머 및 올리고머가 분자간 연결 때문에 IFN-β의 고농도를 함유한 추출물에서 형성된다는 것이 관찰되었다. 이 멀티머 형성은 IFN-β의 정제 및 분리를 매우 어렵게 하고 시간 소모적이게 하며 정제 및 분리 과정에서의 몇 가지 추가 단계, 예를 들면 정제하는 동안 단백질을 감소시키는 단계 및 그것을 그것의 원래 형태로 회복하기 위하여 재산화시키는 단계, 그럼으로써 부정확한 이황화 결합 형성의 가능성을 증가시키는 단계를 동반한다. 게다가, 이 멀티머 형성은 낮은 특정 생물학적 활성과 연관되어 있다.

[0004] 이들 이슈를 다루기 위하여, 활성에 부정적인 영향을 미치지 않지만, 단백질이 바람직하지 않은 3차 구조(예를 들면, 단백질의 활성을 감소시키는 형태)를 형성하도록 하는 분자간 교차결합 또는 분자내 결합을 형성하는 능력을 감소시키거나 제거하는 방식으로, 미생물 생산된 생물학적 활성 IFN-β 단백질 유사체를 변형할 수 있는 정밀한 DNA 기술이 개발되었다. 지정 돌연변이유발 기술은 모 단백질의 원하는 활성을 보유하지만 분자간 결합 또는 바람직하지 않은 분자내 이황화 결합을 형성하는 능력이 결핍된 돌연변이에 의하여 변경된 생물학적 활성 단백질 유사체("단백질 유사체"는 본원에서 하나 이상의 아미노산이 유전학적 및/또는 화학적으로 변형되고 모 단백질의 생물학적 활성을 보유한 합성 단백질을 말한다)를 형성하는데 성공적으로 사용되었다. 17번 위치의 시스테인 잔기가 결실되거나 다른 아미노산으로 치환된 IFN-β 생물학적 활성 단백질의 합성 단백질 유사체는 바람직한 활성 및 특성을 가진 것으로 확인되었다.

[0005] 특히, IFN-β의 합성, 재조합 단백질 유사체인 인터페론-β 1b(IFN-β 1b)는 17번 위치의 시스테인 잔기가 세린 잔기로 대체된 생물학적 활성 단백질이다. 미생물 생산된 단백질이므로 IFN-β 1b는 글리코실화되지 않는다. 또한 그것은 N-말단 메티오닌 결실을 가진다. IFN-β 1b는 MS의 치료 및 관리에 효과적인 것으로 나타난 Betaseron®으로 상품화된 성공적인 약제로 제조되었다. 이 단백질 유사체, 이것의 제조를 위한 재료 및 기술, 치료제로서 그것의 제형 및 MS를 치료하는 그것의 사용은 특허출원 제435,154호(1982년 10월 19일 출원); 특허 제4,588,585호(1986년 5월 13일 발행); 특허 제4,737,462호(1988년 4월 12일 발행); 및 특허 제4,959,314호(1990년 9월 25일 발행)를 포함한 많은 미국 특허 및 특허출원에 설명되고, 청구범위로 청구되며, 이들 각각은 이들 특징에 관한 개시에 대하여 본원에 참고문헌으로 포함된다.

[0006] 약제용 IFN-β의 대규모 제조는 또한 포유동물 공급원, 특히 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서도 수행된다. 이 IFN-β 유사체는 IFN-β 1a이라 불리는데, IFN-β의 Ser17 돌연변이가 결핍되고 글리코실화된다. IFN-β 1a는

Avonex® 및 Rebith®로 상품화된 치료제 제품으로 제조된다.

- [0007] 대부분의 치료제에서와 같이, 더 강력한 생물학적 활성제를 확인하고 제조하려는 지속적인 요구가 있다. IFN-β 기제 약제의 경우, 증가된 생물학적 활성을 가진 IFN-β의 경우가 바람직할 것이다.
- [0008] 게다가, Betaseron®을 포함한 일부 IFN-β 제약 제형(formulation)은 사람 알부민(HA 또는 HSA)을 공통 단백질 안정제로서 함유한다. HA는 사람 혈액 산물이며, 점점더 적게 공급되고 있다. 따라서, 더 최근에는 HA-무함유 약물 제형에 대한 요구가 있었으며, 안정하고 효과적인 HA-무함유 IFN-β 제형이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

- [0009] **발명의 개요**
- [0010] 본 발명은 탈아미드화된 인터페론-β를 제공함으로써 이러한 필요들을 다룬다. 탈아미드화된 IFN-β는 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 25번 위치의 아스파라긴이 탈아미드화된 사람 인터페론-β 단백질 유사체이다. 탈아미드화된 생성물은 증가된 수준의 천연 사람 인터페론-β의 생물학적 활성을 나타내고, 단백질 안정화를 위하여 HA를 필요로 하지 않는다.
- [0011] 특정 구체예에서, 탈아미드화된 IFN-β는 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 17번 위치의 시스테인이 결실되거나, 중성 아미노산, 특히 세린으로 대체되며, 25번 위치의 아스파라긴은 그것이 환상 이미드, 아스파르테이트 또는 이소아스파르테이트 잔기가 되도록 탈아미드화된 합성 사람 인터페론-β 1b 단백질 유사체이다. 탈아미드화된 생성물은 IFN-β 모 단백질에 비해서 증가된 수준으로 천연 사람 인터페론-β의 바람직한 생물학적 활성을 나타낸다(예를 들면, 다발성 경화증 재발의 빈도 감소와 관련된 것으로 보이는 것 등의, 세포의 세포변성 효과 또는 항증식성 효과). 게다가, 향상된 생물학적 활성은 단백질 유사체의 HA-무함유 제형에서도 관찰된다.
- [0012] 치료 조성물 중의 활성 단백질 유사체 화합물의 제형과 제조방법 및 사용방법이 또한 제공된다.
- [0013] 게다가, 탈아미드화된 생성물에 대한 ID 시험으로서 품질관리에 유용한, 상대적으로 낮은 pH에서 환원된 단백질 샘플의 효소 분해(digest)와 그에 이어서 펩티드 단편의 크로마토그래피 분석을 사용하여 단백질의 핑거프린트 프로파일을 생산하는 엔도프로테이나제-C 펩티드 맵 기술이 제공된다.
- [0014] 본 발명의 이들과 다른 목적 및 특징은 본 발명의 다음 상세한 설명을 첨부된 도면과 연계하여 읽을 때 더 완전하게 명백해질 것이다.

실시예

- [0049] 다음 실시예는 본 발명의 양태를 설명하는 것이며, 본 발명을 어떤 방식으로 제한하려는 것은 아니다. 다양한 이들 실시예에서, 효능의 증가를 나타낸 두 주요 구별가능한 종인 환상 이미드와 다른 탈아미드화된 형태(Asp 및 이소-Asp)가 구별된다. 전부 탈아미드화된 형태이지만, 환상 이미드와 다른 탈아미드화된 형태(Asp 와 이소-Asp)를 구별하는 경우, 특히 도면 표지에서 전자는 종종 "환상 이미드"라고 언급되는 한편, 후자는 종종 "탈아미드화된" 또는 "탈아미드화"라고 언급된다.
- [0050] **실시예 1: HA-무함유 IFN-β 1b 안정성 샘플에서의 효능 증가**
- [0051] 요약
- [0052] 효능 증가가 HA-무함유 IFN-β 1b 안정성 샘플에서 관찰되었다. 세포변성 효과(CPE) 생물분석은 시간의 경과에 따라(T=0-6 개월) HA-무함유 IFN-β 25°C 안정성 샘플에서 효능 증가를 나타냈다. 최종 탈아미드화 생성물과 그것의 중간체인 환상 이미드는 25°C 안정성 샘플에서 증가되는 것으로 관찰되었다.
- [0053] Glu-C 펩티드 맵핑에 의해 Asn25에 탈아미드화 부위가 확인되었고, HA-무함유 IFN-β 1b 안정성 샘플 중의 탈아미드화의 주요 형태는 이소-Asp 및 환상 이미드 유사체라는 것이 드러났으며, 한편 Asp 형태는 약간 증가된다.
- [0054] RP-HPLC 방법에서 얻어진 결과는 탈아미드화된 형태(환상 이미드, Asp 및 이소-Asp)가 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플에서 현저히 증가했다는 것을 나타냈다.
- [0055] HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플에서 탈아미드화된 형태는 CPE 및 항증식 분석에 의하면 모(아미드화된) IFN-β 보다 더 높은 생물학적 활성을 나타냈다.
- [0056] 이들 발견에 기초하여, 탈아미드화(Asp, 이소-Asp 및 환상 이미드 유사체를 형성하는)는 HA-무함유 IFN-β의 생

물학적 활성을 증대시키는 것으로 생각된다. 따라서, IFN-β의 탈아미드화된 형태가 IFN-β-기체 치료제의 생물학적 활성을 향상시키기 위해 HA-무함유 또는 HA-함유 형태로 제조될 수 있다. 탈아미드화된 유사체는 중간 내지 높은 온도 및/또는 낮은, 중간, 또는 높은 pH에서 IFN-β 용액(HA-무함유 또는 HA-함유)을 인큐베이션함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 탈아미드화된 생성물은 필요한 임상 투여량을 감소시키고, 실온에서 액체 IFN-β 제형의 안정성을 증가시킬 것이다. 임상 투여량을 낮춤으로써 역 면역반응(예를 들면, 항체 중화)을 경험하는 환자의 비율이 감소된다.

[0057] IFN-β 제제의 다양한 안정성 연구 및 분석에서 얻어진 본 발명을 입증하는 데이터가 아래에 제공된다:

[0058] 1. HA-무함유 IFN-β 안정성 데이터

[0059] 하기 표 1(약물 물질: 2 mM 아스파르트산 중, pH 4.0) 및 표 2(약물 물질: 2 mM 아스파르트산 중, pH 4.0, 9% 트레할로스)에 나타낸 바와 같이, 세포변성 효과 (CPE) 생물분석은 시간의 경과에 따라(T=0-6 개월) HA-무함유 IFN-β 1b 25°C 안정성 샘플에서 효능의 증가를 나타냈다:

표 1

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 물질에 대한 CPE 생물분석 안정성 데이터

분석방법: CPE 생물분석						
승인 기준: 1.3-5.1 x 10 ⁷ IU/mg						
로트 번호:	시험 러닝	TA2040	TA2085	시험 러닝	TA2040	TA2085
설명:	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml
연구 번호:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
보관:	5°C	5°C	5°C	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH
방향:	수직	수직	수직	수직	수직	수직
개월	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 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: 수행하지 않음 RH: 상대습도						

[0060]

표 2

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 제품에 대한 CPE 생물분석 안정성 데이터

로트 번호:	14159-49 (비-임상적)	25FEB03 (시험 러닝)	TA2158	TA2451
설명:	1.2ml; 0.25mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml
연구 번호:	1335	1438	1442	1444
보관:	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH
방향:	역방향	역방향	역방향	역방향
개월	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 10 ⁷	IU/mg x 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

[0061]

[0062]

하기 표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 양이온 교환(CEX)-HPLC는 약물 물질과 약물 제품의 25°C 샘플에 대한 안정성 데이터가 각각 역시 탈아미드화(D-IFN-β)의 증가를 나타냈다는 것을 증명한다:

표 3

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 물질에 대한 CEX-HPLC 안정성 데이터

분석방법: CEX HPLC						
승인 기준: 탈아미드화 % 기록						
로트 번호:	시험 러닝	TA2040	TA2085	시험 러닝	TA2040	TA2085
설명:	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml	6ml; 2 mg/ml
연구 번호:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
보관:	5°C	5°C	5°C	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH
방향:	수직	수직	수직	수직	수직	수직
개월	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %
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: 수행하지 않음						

[0063]

표 4

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 제품에 대한 CEX-HPLC 안정성 데이터

로트 번호:	14159-49 (비-임상적)	25FEB03 (시험 러닝)	TA2158	TA2451
설명:	1.2ml; 0.25mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml	1.2ml, 1.0mg/ml
연구 번호:	1335	1438	1442	1444
보관:	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH	25°C / 60% RH
방향:	역방향	역방향	역방향	역방향
개월	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %	탈아미드화 %
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	END	IP	IP	IP
종료				

[0064]

[0065]

하기 표 5 및 6은 탈아미드화의 환상 이미드 중간체 형태를 나타내는 피크 D의 증가가 약물 물질과 약물 제품의 25°C 샘플에 각각 역상(RP)-HPLC 기술을 사용함으로써 시간의 경과에 따라 관찰되었다는 것을 보여준다:

표 5

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 물질에 대한 RP-HPLC 안정성 데이터

분석방법: RP HPLC															
승인 기준: 피크 면적 % 기록															
로트 번호:	시험 러닝					TA2040					TA2085				
설명:	6ml; 2 mg/ml					6ml; 2 mg/ml					6ml; 2 mg/ml				
연구 번호:	1403					1412					1415				
보관:	25°C / 60% RH					25°C / 60% RH					25°C / 60% RH				
방향:	수직					수직					수직				
개월	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타
	0	2	96	12	85	2	2	96	11	85	2	2	96	11	86
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	25	68	5

[0066]

표 6

HA-무함유 인터페론 베타 1b 약물 제품에 대한 RP-HPLC 안정성 데이터

분석방법: RP HPLC															
승인 기준: 피크 면적 % 기록															
로트 번호:	25FEB03 (시험 러닝)					TA2158					TA2451				
설명:	1.2ml, 1.0mg/ml					1.2ml, 1.0mg/ml					1.2ml, 1.0mg/ml				
연구 번호:	1438					1442					1444				
보관:	25°C / 60% RH					25°C / 60% RH					25°C / 60% RH				
개월	역방향					역방향					역방향				
	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타	Pk A	주요부 (D+B)	Pk D	Pk B	기타
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
종료															

[0067]

[0068]

표 4 내지 11은 본 발명의 한 양태에 따른 다양한 HA-무함유 IFN-β 안정성 약물 물질과 제품 로트들에 대한 효능 대 탈아미드화된 IFN-β 1b("D-IFN %" 또는 "피크 D %")의 양의 플롯을 나타낸다. 이들 데이터는 효능 증가와 HA-무함유 IFN-β의 탈아미드화의 수준 간에 상호관련이 있다는 것을 나타낸다.

[0069]

2. HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 특성확인

[0070]

IFN-β의 주 서열이 도 3에 도시된다. 탈아미드화는 Asn25에서 일어나는 것으로 확인되었다. 탈아미드화의 성질 및 탈아미드화된 생성물의 특성이 하기에 설명되는 분석에서 조사되었다:

[0071]

2.1. Glu-C 펩티드 맵

[0072]

펩티드 맵은 효소 분해와 그에 이어서 RP-HPLC를 사용하여 단백질의 핑거프린트 프로파일을 생성한다. 펩티드 맵핑은 ID 시험으로서 품질관리에 흔히 이용될 수 있다. 또한, 그것은 산화 또는 탈아미드화로 인한 클리핑, 돌연변이 및 변성과 같은 사건에 의한 단백질의 부수적인 1차 구조 변형을 모니터링할 수 있는 강력한 도구이다. HA-무함유 IFN-β는 탈아미드화의 중간체 형태인 환상 이미드를 함유하는 것으로 알려져 있다. 이 환상 이미드는 HA-무함유 IFN-β에서 핵심적 변성 변이체이며, 안정성 샘플에서 증가된 양으로 발견된다. HA-무함유 IFN-β에 대한 현재 펩티드 맵에서 사용되는 Lys-C를 포함한 대부분의 효소는 중성 내지 높은 pH에서 단백질을 최적으로 분해한다. 중성 내지 높은 pH에서 환상 이미드는 불안정하며, 탈아미드화가 인공적으로 유도된다. 따라서, 환원 및 분해 동안에 낮은 pH 환경에서 샘플을 유지하는 것이 샘플 중의 환상 이미드의 천연 수준 및 탈아미드화를 모니터링하는데 필요하다.

[0073]

HA-무함유 IFN-β에서 환상 이미드를 포함한 탈아미드화된 형태를 함유한 단편을 특성화하기 위하여 환원제로서 트리스-(2-카르복시에틸) 포스핀(TCEP)과 결합된 새로운 엔도프로테이나제-C(Glu-C) 펩티드 맵이 개발되었다. Glu-C 펩티드 맵은 그것의 효소 활성에 대하여 두 최적 pH, 즉 pH 7.8 및 pH 4.0을 가진 것으로 알려져 있다. TCEP는 pH 8.0 이하에서 기능하는 것으로 알려져 있다. 새로운 Glu-C 펩티드 맵은 pH 4.0의 낮은 pH에서의 환원 및 분해를 모두 포함하는 샘플 제제를 사용하여 개발되며, 이것은 샘플 중에 탈아미드화된 형태, 예를 들면 환상 이미드의 천연 수준을 보존하기 위한 최적의 pH 범위이다. 본원에서 개발된 펩티드 맵은 낮은 pH 샘플 제제를 사용하기 때문에, HA-무함유 IFN-β 중의 탈아미드화된 형태의 천연 수준의 정확한 모니터링이 성공적으로 이루어진다.

[0074]

탈아미드화 부위 및 그 형태(예를 들면, Asp, 이소-Asp, 환상 이미드)를 확인하기 위해, Glu-C 펩티드 맵에 의해 HA-무함유 IFN-β 1b 약물 제품 로트 TA2451의 안정성 샘플(25°C에서 3, 6, 및 9 개월)을 시험하였다. 2 mM 아스파르트산, pH 4.0의 제형 완충액 중의 0.5 mg/ml의 농도의 단백질 샘플 각 0.5 ml를 TCEP를 사용하여 환원시켰다. 단백질 대 TCEP를 1:10 몰비로 사용하여, 샘플을 37°C에서 3 시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 환

원된 물질을 단백질 대 Glu-C를 5:1 질량비로 하여 4 mg/ml Glu-C를 사용하여 분해하고, 37°C에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 펩티드 단편을 유속 1.0 ml/분 및 칼럼 온도 38°C에서 용리 완충액인 0.1% 트리플루오로아세트산 중의 아세토니트릴 구배를 사용하여, RP-HPLC 크로마토그래피(ThermoHypersil BioBasic C18, 150x4.6 mm, 5 µm)에 의하여 분석하였다.

[0075] 도 12A는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 Glu-C 펩티드 맵을 나타낸다. 도 12B는 도 12A의 맵의 22-26분 RT 부분의 확대도를 나타낸다.

[0076] 도면에 나타난 바와 같이, 단편 E1의 피크는 시간이 지남에 따라 감소하는 한편, 이소-Asp, 환상 이미드, 및 Asp를 나타내는 피크는 증가하였다. 이들 피크들은 단편 E1의 25번 위치에서 Asn가 탈아미드화된 형태이다. 이 피크 특성화는 질량분석 및 E1-관련 단편의 리실 엔도펩티다제 분해에 의해 얻어진 E1 하위단편의 에드만 시퀀싱에 의하여 수행되었다. Asn25 잔기는 글리신이 뒤따르는 아미노산 서열을 가진다. 이 Asn-Gly 서열은 빠른 속도로 탈아미드화하는 것으로 알려져 있다.

[0077] 이 Glu-C 펩티드 맵 결과에 기초하여, HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플 중에서 탈아미드화의 주 형태는 이소-Asp 및 환상 이미드라는 것이 확인되었다. 또한, Asp 형태의 수준에도 약간의 증가가 있었다.

[0078] 2.2. RP-HPLC

[0079] RP-HPLC는 소수성에 기초하여 화합물을 분리한다. HA-무함유 IFN-β 1b 샘플을 IFN-β 1b 변이체(예를 들면, Asp, 이소-Asp, 환상 이미드)를 특성화하기 위해 RP-HPLC 방법에 의하여 시험하였다. 시험 샘플을 Zorbax 300SB-CN, 150x4.6mm, 3.5 µm 입자 크기, 크로마토그래피 칼럼 상에 주입하고, IFN-β 1b 변이체를 0.1% 트리플루오로아세트산 용리 완충액 중의 아세토니트릴 구배를 사용하여 분리하였다. 대조군 샘플 결과를 도 13에 나타낸다.

[0080] 도면에 나타난 피크 확인은 온라인 LC/질량 분광 분석(RP-HPLC/Q-TOF/ESI-MS)에 의하여 수행되었다. HPLC 흐름은 약 1:20으로 분할되었고, 약 50 µl/분으로 질량분광기의 이온 공급원으로 보내졌다. 질량분광기는 전기분사 이온 공급원이 있는 Micromass Q-TOF2 기기였다. 이온 전압은 3200로 설정하였고, 원추 전압은 50으로 설정하였다. 데이터는 m/z 300과 2500 사이에서 비행시간(TOF) 분석기로 수집되었다. 온라인 LC/질량 데이터는 RP-HPLC 피크의 일부에서 동시 용출되는 하나 이상의 단백질 변이체가 있다는 것을 밝힌다.

[0081] 도 14는 HA-무함유 IFN-β 1b 약물 제품 로트의 안정성 샘플(25°C에서 약 10 개월)의 RP-HPLC 프로파일을 나타낸다. 도면에 나타난 바와 같이, 프로파일은 대조군 샘플(도 13)과 상이하며, 환상 이미드(피크 D) 및 탈아미드화(Asp 및/또는 이소-Asp)(중간 피크)가 HA-무함유 IFN-β 1b에서 현저히 증가되었다. 다수의 부수적인 다른 탈아미드화 및 환상 이미드 변이체가 관찰된다. 이들은 추가의 구조적 및 화학적 변형을 가진 탈아미드화된 변이체 및 환상 이미드 변이체로서, 상이한 소수성 특성으로 인하여 분리된다.

[0082] 2.3. CPE 생물분석

[0083] IFN-β는 어떤 바이러스 유형의 복제 및 세포의 세포변성 효과(CPE)의 유도가 억제되는, 포유동물 세포의 항바이러스 상태를 유도한다. A549 사람 폐 암종 세포 및 무린 뇌척수심근염 바이러스가 HA-무함유 IFN-β 1b 약물 생성물 로트의 안정성 샘플(25°C에서 약 10 개월)에서 얻어진 RP-HPLC 분획의 생물학적 활성을 평가하는데 사용되었다.

[0084] 세포를 96-웰 플레이트에서 성장시키고 바이러스의 첨가 전에 하룻밤 IFN-β 1b의 순차적 희석물로 처리하였다. 그 다음, 배양물을 적합한 시간 동안 인큐베이션하여 바이러스 복제를 허용하였다. 충분한 IFN-β 1b로 처리된 세포는 바이러스 시험감염으로부터 보호되어 생존하였다. 보호되지 않은 세포들은 세포변성 변화를 거쳐 사멸하였다. 인터페론 투여량 의존적 CPE를 염색 기술 및 세포 생존력(광학밀도 측정) 대 IFN-β 농도의 플롯으로부터 작성된 투여량 반응 곡선을 사용하여 정량하였다. IFN-β 활성은 반(半) 최대 세포 보호에 필요한 농도(ED₅₀ 농도)로서 계산되었다.

[0085] 도 15에 도시된 바와 같이, 탈아미드화된 분획(중간 피크, 분획 16)에서 CPE 활성은 모 IFN-β 1b 분획(피크 B, 분획 18)에서보다 현저히 더 높다. 환상 이미드 분획(피크 D, 분획 15)은 또한 모 IFN-β 1b 분획보다 더 높은 CPE 활성을 나타낸다.

[0086] 2.4. 항증식 분석

[0087] IFN-β는 사람 종양으로부터 확립된 많은 세포주에 대한 항증식 활성을 나타낸다. 두 세포주, Hs294T-a 사람 흑

색종 세포주 및 버킷 림프종에서 유래된 다우디-사람 B 림프아세포주가 HA-무함유 IFN-β 1b 약물 제품 로트의 안정성 샘플(25°C에서 약 10 개월)에서 얻어진 RP-HPLC 분획의 생물학적 활성을 평가하는데 사용되었다.

[0088] IFN-β 테스트 샘플의 순차적 회석이 96-웰 플레이트에서 수행되었다. 조직 배양 배지에서 반응 세포를 준비하고 분석 플레이트에 첨가하였다. 3일 인큐베이션 후, 알라마르 블루로 세포를 염색하거나 또는 콜터 계수기로 계수하여 성장 반응을 측정하였다. 세포 성장이 투여량 의존적 방식으로 IFN-β에 반응하여 억제되었다. 투여량 반응 곡선은 세포수(광학밀도 측정) 대 IFN-β 농도의 플롯으로부터 작성되었다. IFN-β 활성은 반 최대 세포 성장에 필요한 농도(ED₅₀ 농도)로서 계산되었다.

[0089] 도 16A(Hs294T) 및 16B(다우디)에 도시된 바와 같이, 탈아미드화 분획(중간 피크, 분획 16) 및 환상 이미드 분획(피크 D, 분획 15)에서 항증식 활성은 모 IFN-β 분획(피크 B, 분획 18)에서보다 현저히 더 높다.

[0090] 3. 결론

[0091] 전술한 연구에서 얻어진 안정성 데이터 및 결과에 기초하여, 탈아미드화(25번 위치에서 Asn을 대체하는 Asp, 이소-Asp 및 환상 이미드)는 IFN-β의 생물학적 활성을 향상시킨다. 따라서, IFN-β, 예를 들면 IFN-β 1b의 탈아미드화된 형태는 화합물의 생물학적 활성을 향상시키기 위하여 계획적으로 제조될 수 있다. 탈아미드화된 형태는 IFN-β를 중간 내지 높은 온도, 또는 낮은, 중간 또는 높은 pH 환경에서 인큐베이션함으로써 제조될 수 있다. 본 발명의 탈아미드화된 생성물은 필요한 임상 투여량을 감소시키고 실온에서 HA-무함유 및 HA-함유 IFN-β 제형을 포함한 액체 IFN-β 제형의 안정성을 증가시킨다. 임상 투여량을 낮춤으로써, 역면역반응(예를 들면, 항체 중화)을 경험하는 환자의 비율이 감소된다.

[0092] 실시예 2: 제조가능성 데이터

[0093] 전술한 바와 같이 다양한 탈아미드화 기술을 증명하기 위하여 실험을 수행하였다. CPE 생물분석에서 얻어진 데이터는 탈아미드화된 IFN-β가 대규모 제약 생산에 적합한 과정에 의하여 용이하게 제조된다는 것을 증명한다. 특히, 현저한 생물활성 증가가 14-40일 동안 중간(예를 들면, 실온) 내지 높은(예를 들면, 37-40°C) 온도에서 인큐베이션된 의약품제조관리기준(GMP) 하에 제조된 다양한 샘플에서 관찰되었으며, 실온, pH 8.8에서 약 1 시간 동안 그리고 2-8°C, pH 8.4에서 약 14일 동안 GMP 샘플을 인큐베이션함으로써 거의 2배의 생물활성 증가가 일어났다.

[0094] CPE 생물분석 결과

시험 1

샘플명	IU/mg
TR090602 벌크	2.79E+07
TR090602 안정 RT ¹ 20 일	3.87E+07
TR090602 안정 37C 20 일	4.11E+07
스트레스받은 HA 무함유 대조군	2.95E+07
스트레스받은 HA 무함유 염기 pH ¹	4.52E+07
스트레스받은 HA 무함유 40C 30일	5.06E+07
IFN CPE 분석 대조군	2.94E+07

[0095]

시험 2

샘플명	IU/mg
TR090602 벌크	3.62E+07
TR090602 안정 RT 40 일	6.52E+07
TR090602 안정 37C 40 일	1.56E+08
GMP#1 벌크	2.67E+07
GMP#1 벌크 안정 37C 40 일	3.51E+07
GMP#1 벌크 pH8.8 ³	4.79E+07
스트레스받은 HA 무함유 대조군	2.26E+07
스트레스받은 HA 무함유 40C 14일	3.44E+07
스트레스받은 HA 무함유 40C 30일	4.05E+07
IFN CPE 분석 대조군	2.93E+07

¹⁾ 실온

²⁾ 샘플을 14일 동안 pH 8.4, 2-8°C에서 인큐베이션하였다.

³⁾ 샘플을 1 시간 동안 pH 8.8, RT에서 인큐베이션하였다.

[0096]

[0097] 결론

[0098] 앞서 말한 발명은 이해의 명확성을 위하여 다소 상세하게 설명되었지만, 어떤 변화 및 변형이 첨부된 청구범위의 범주 내에서 이루어질 수 있다는 것은 명백할 것이다. 본 발명의 과정 및 조성물을 실시하는 많은 대안적 방법이 있다는 것을 주의해야 한다. 따라서, 본 구체예는 제한하려는 것이 아니라 설명하는 것으로 간주되며, 본 발명은 본원에 제시된 상세한 내용에 제한되지 않지만, 첨부된 청구범위의 범주 및 균등물 내에서 변형될 수 있다.

[0099] 본원에 인용된 모든 문헌은 모든 목적을 위하여 전부 본원에 참고문헌으로 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 IFN-β의 아미노산 서열의 도해이다.
- [0016] 도 2는 본 발명에 따른 탈아미드화의 부위 및 성질을 나타내는 IFN-β의 아미노산 서열의 도해이다.
- [0017] 도 3은 본 발명에 따른 IFN-β Asn25 탈아미드화에 관한 Asn 탈아미드화 경로를 설명하는 도해이다.
- [0018] 도 4 내지 11은 본 발명의 한 양태에 따라서 다양한 HA-무함유 IFN-β 안정성 약물 물질 및 제품 로트들에 대한 효능 대 탈아미드화된 IFN-β 1b 양의 플롯을 도시한다.
- [0019] 도 12A는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 Glu-C 펩티드 맵을 도시한다.
- [0020] 도 12B는 도 12A의 맵의 일부의 확대도를 도시한다.
- [0021] 도 13은 HA-무함유 IFN-β 대조군 샘플의 RP-HPLC 프로파일을 도시한다(시간(분) 대 반응(mV)).
- [0022] 도 14는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 1b 약물 제품 로트의 안정성 샘플의 RP-HPLC 프로파일을 도시한다.
- [0023] 도 15는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 RP-HPLC 분석의 CPE 활성의 플롯을 도시한다.
- [0024] 도 16A는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 RP-HPLC 분석의 Hs294T에 대한 항증식 활성의 결과의 플롯을 도시한다.
- [0025] 도 16B는 본 발명의 한 양태에 따른 HA-무함유 IFN-β 안정성 샘플의 RP-HPLC 분석의 다우디에 대한 항증식 활성의 결과의 플롯을 도시한다.

발명의 상세한 설명

[0027] 본 발명의 화합물, 조성물, 물질 및 관련 기술 및 사용은 이제 몇 가지 구체예를 참조하여 설명될 것이다. 설명된 구체예의 중요한 특징 및 특성은 본문의 구조에서 설명된다. 본 발명이 이들 구체예와 관련하여 설명되는 동안, 본 발명은 이들 구체예에 한정하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 그와 반대로, 첨부된 청구범위에 의하여 한정되는 본 발명의 사상과 범주 내에 포함될 수 있는 대안, 변형, 및 균등물을 포괄하려는 의도이다. 하기 설명에서, 많은 구체적 상세는 본 발명의 철저한 이해를 돕기 위하여 제시된다. 본 발명은 이들 구체적 상세의 일부 또는 전부 없이도 실시될 수 있다. 다른 예에서, 주어진 과정 실시는 본 발명을 불필요하게 흐리지 않도록 상세하게 설명되지 않았다.

[0028] 서론

[0029] 본 발명은 탈아미드화된 IFN-β를 제공한다. 탈아미드화된 IFN-β는 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 25번 위치의 아스파라긴이 탈아미드화된 사람 인터페론-β 단백질 유사체이다. Asn은 환상 이미드 중간체를 통하여 Asp 또는 이소-Asp로 탈아미드화한다. 탈아미드화된 생성물은 천연 사람 인터페론-β의 생물학적 활성을 증가된 수준으로 나타내고 단백질 안정화를 위하여 HA를 필요로 하지 않는다. 치료 조성물 중의 활성 단백질 유사체 화합물의 제형과 제조방법 및 사용방법이 또한 제공된다.

[0030] "단백질 유사체"는 본원에서 하나 이상의 아미노산이 유전학적 및/또는 화학적으로 변형되고 세포의 세포변성 효과 또는 항증식성 활성과 같은 모 단백질의 생물학적 활성을 보유하는 합성 단백질을 나타낸다. 이러한 생물학적 활성은 다발성 경화증 재발의 빈도의 감소와 같은 다른 특정 생물학적 활성과 서로 관련된 것으로 나타났다.

[0031] 특정 구체예에서, 탈아미드화된 IFN-β는 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 17번의 시스테인이 결실되거나

또는 중성 아미노산, 특히 세린에 의하여 대체되고 25번 위치의 아스파라긴이 탈아미드화된 정제되고 분리된 합성 사람 인터페론-β 1b 단백질 유사체이다. 특정 구체예에서, Asn25는 아스파르테이트, 이소-아스파르테이트 또는 환상 이미드 잔기로 탈아미드화된(예를 들면, 각각 IFN-β_{ser17,asp25}, IFN-β_{ser17,이소-asp25}, 또는 IFN-β_{ser17,환상-이미드25}). 탈아미드화된 생성물은 천연 사람 인터페론-β의 생물학적 활성을 IFN-β 1b에 비해서 증가된 수준으로 나타낸다. 게다가, 향상된 생물학적 활성은 HA-무함유 IFN-β 1b 치료를 가능케 하는 단백질 유사체의 HA-무함유 제형에서도 관찰된다.

[0032] 본 발명의 합성 단백질 유사체에서, 시스테인 17 잔기는 세린, 트레오닌, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 히스티딘, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판 또는 메티오닌으로 대체될 수 있다. 특정 구체예에서, 치환은 세린 17이다. 아스파라긴 25 잔기는 아스파르테이트, 이소-아스파르테이트 또는 환상 이미드로 대체되었다. 도 2와 관련하여, 본 발명에 따른 IFN-β 1b 단백질 유사체의 1차(아미노산 서열(SEQ ID NO:2)) 및 2차(접합, 교차-결합) 구조가 도시된다. 25번 위치에서, 천연 Asn 잔기는 탈아미드화된다. 아스파라긴의 탈아미드화는 환상 이미드 중간체를 통하여 일어난다. 이 경로는 도 3에 도시된다. 하기에 더 상세하게 설명되는 바와 같이, Glu-C 펩티드 맵 결과는 탈아미드화의 주요 형태가 이소-Asp(IFN-β_{ser17,이소-asp25}) 및 환상 이미드(IFN-β_{ser17,환상-이미드25})라는 것을 나타낸다.

[0033] 단백질 유사체는 제조합 합성과 화학 변형 기술의 조합에 의해 제조될 수 있다. 먼저, IFN-β 1b 합성 단백질 유사체는 전형적으로 출원서의 배경기술 부분에서 앞에서 참조한 특허에 설명된 바와 같이 제조합 DNA 지정 돌연변이유발 기술에 의해 제조된다. 지정 돌연변이유발 기술은 주지되어 있으며, 문헌(Lather, R.F. 및 Lecoq, J.P. in Genetic Engineering Academic Press (1983) pp 31-50)에서 검토되었다. 올리고뉴클레오티드-지정 돌연변이유발은 문헌(Smith, M. and Gillam, S. in Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) 3:1-32)에서 구체적으로 검토된다.

[0034] 그 다음, IFN-β 단백질 유사체에 25번 위치의 아스파라긴 잔기를 탈아미드화하는 화학적 처리를 행한다. 대규모 제약 제조에서 채용하기에 효과적이고 적합할 수 있는 많은 가능한 탈아미드화 기술이 있으며, 천연 생물학적 활성, 바람직하게는 증가된 생물학적 활성을 보유하면서 탈아미드화를 달성하는 어떤 기술이라도 사용될 수 있다. 폭넓게 말하면, IFN-β 단백질의 탈아미드화는 조건에 따라 약 1분 내지 약 90일 또는 그 이상의 반응 시간에서, 중간 내지 높은 온도(예를 들면, 약 25-60°C)와 낮은 pH(예를 들면, 약 0-4), 중간 pH(예를 들면, 약 4-10) 내지 높은 pH(예를 들면, 약 10-14)의 다양한 pH에서 인큐베이션함으로써 이루어질 수 있다. 예를 들면, 탈아미드화는 적어도 24 시간 동안, 예를 들면 40일까지 약 pH 4에서 60°C 이하, 또는 약 25 내지 40°C, 예를 들면 약 40°C에서 IFN-β(예를 들면, IFN-β 1a 또는 IFN-β 1b)를 인큐베이션함으로써 이루어질 수 있다. 반응 시간은 pH를, 예를 들면 약 7에서 14까지, 예를 들면 약 8-12, 예를 들면 약 8.5의 중성 내지 염기성 pH로 상승 시킴으로써 반응 시간이 감소될 수 있고/있거나 반응 온도가 감소될 수 있다. 한 예에서, IFN-β 1b 샘플의 생물학적 활성(CPE)은 약 14일 동안 pH 8.4, 2-8°C에서 처리한 후 4.5 IU/mg까지 거의 2배 증가한다. 또한, 14-40일 동안 중간(예를 들면, 실온) 내지 높은(예를 들면, 37-40°C) 온도에서 처리하는 동안에도 실질적인 활성이 관찰되었다.

[0035] 탈아미드화된 IFN-β 단백질 유사체를 제조하기 위한 기술은 부분적으로 또는 실질적으로 순수한 생성물을 생성할 수 있다. 예를 들면, 생성물 중의 합성 단백질 유사체의 적어도 25%, 적어도 50%, 적어도 75%, 또는 실질적으로 전부는 천연 인터페론-β에 따라서 넘버링된 25번 위치에서 탈아미드화될 수 있다. 생성물의 실질적 전부 미만이 탈아미드화되는 경우, 생성물은 그럼에도 불구하고 증가된 생물학적 활성 및 HA-무함유 안정성을 나타낼 수 있다. 일부 예에서, 생성물 중의 탈아미드화된 단백질 유사체(들)를 정제하고 분리하는 것이 바람직할 수 있다. 이 정제 및 분리는, 예를 들면 다음 조건을 사용하여 양이온 교환 HPLC에 의하여 수행될 수 있다:

[0036] 크로마토그래피 정지상: Pharmacia 모노 S HR 5/5, 또는 균등물;

[0037] 용리 완충액: 20 mM Tris-HCL, pH 7.0, 0.5% 엔피젠 첨가;

[0038] 농도구배: 용리 완충액에서 200 mM 또는 그 이상까지 NaCl 선형 농도구배.

[0039] 제조의 경우, 이 기술은 대규모에서 수행될 수 있다.

[0040] 바람직한 구체예에서, 합성 단백질 유사체가 미생물 합성될 때, 이것은 글리코실화되지 않는다. 또한, 단백질 유사체는 N-말단 메티오닌 결실을 가진다. 다른 구체예에서, 단백질 유사체는 포유동물 세포에서 생성될 수 있으며, 따라서 글리코실화될 수 있다.

- [0041] 하기에 더 상세하게 설명되는 바와 같이, 다양한 활성 분석은 탈아미드화된 IFN-β 1b 단백질 유사체가 그것의 모 IFN-β 단백질에 비해서 증가된 생물활성을 가진다는 것을 증명한다. 그리고, 안정성 결과가 HA-무함유 샘플에서 얻어졌는데, 이는 본 발명의 탈아미드화된 IFN-β 단백질 유사체가 치료제로서 HA-무함유 제형에 적합하다는 것을 나타낸다. 치료 조성물을 형성하기 위해, 전술한 바와 같이 부분적으로 또는 실질적으로 순수한 단백질 유사체가 이런 유형의 치료제 제품에 대하여 주어진 것과 같은 약학적으로 허용되는 담체 매개체와 혼합될 수 있다.
- [0042] HA-무함유 안정성을 나타내는 것은 본 발명의 조성물의 유리한 특성이지만, 탈아미드화는 HA-함유 제형에 대해서도 수행될 수 있으며, 그것은 본 발명의 범주에서 배제되지 않는다. 게다가, 본 발명은 본원에서 IFN-β 1b 단백질 유사체에 관해서 주로 설명되지만, 본 발명은 IFN-β 1a 유사체를 포함한 다른 IFN-β 유사체에도 적용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 IFN-β 단백질 유사체 및 조성물은, 환자에서 세포 성장의 조절, 바이러스 질환이 있는 환자의 치료, 및 환자에서 자연 살해 세포 활성의 자극을 포함한 많은 용도에서 치료제로서 유용성을 시사하는 생물학적 활성을 나타낸다. 한 구체적 사용은 환자에서 다발성 경화증, 특히 재발-완화형 MS를 치료하기 위한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명에 따른 치료제는 다발성 경화증 재발의 빈도를 감소시키기 위한 치료에 유용하다. 탈아미드화된 IFN-β 단백질 유사체의 생물학적 활성의 증가된 수준은, 예를 들면 MS의 치료 및 관리에서 치료제로서 향상된 효과를 나타낸다.
- [0044] 본 발명의 다른 양태에 따라서, 엔도프로테이나제-C(Glu-C) 펩티드 맵 기술이 제공된다. 펩티드 맵은 상대적으로 낮은 pH에서 환원된 단백질 샘플의 효소 분해와 이어서 분해 단편의 액체 크로마토그래피(예를 들면, RP-HPLC) 분석을 사용하여 단백질의 핑거프린트 프로파일을 생성한다. 펩티드 맵핑은 본 발명에 따라서 탈아미드화된 IFN-β 단백질 유사체 생성물을 위한 ID 시험으로서 품질관리에 사용될 수 있다. 또한, 이것은 산화 또는 탈아미드화로 인한 클리핑, 돌연변이 및 변성과 같은 사건에 의한 단백질의 부수적인 1차 구조 변형을 모니터링할 수 있는 강력한 도구이다.
- [0045] 탈아미드화된 IFN-β의 한 변이체는 탈아미드화의 중간체 형태인 환상 이미드를 함유하는 것으로 알려져 있다. 이 환상 이미드 형태는 안정성 샘플에서 증가된 양으로 발견된다. IFN-β에 대한 종래 펩티드 맵에서 사용되는 Lys-C를 포함한 대부분의 효소는 중성 내지 높은 pH에서 단백질을 최적으로 분해한다. 중성 내지 높은 pH에서, 환상 이미드는 불안정하며, 추가의 탈아미드화가 인공적으로 유도된다. 따라서, 환원 및 분해 동안에 낮은 pH 환경에 샘플을 유지하는 것이 샘플 중의 환상 이미드 및 다른 탈아미드화 형태(Asp, 이소-Asp)의 모두의 천연 수준을 모니터링하기 위하여 필요하다.
- [0046] 엔도프로테이나제-C(Glu-C) 펩티드 맵은 8 이하의 pH, 예를 들면 약 pH 3-8의 범위, 예를 들면 약 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8 또는 이들의 중간 pH에서 기능하는 환원제와 결합된다. 적합한 환원제는 트리스-(2-카르복시에틸) 포스핀(TCEP)이다. 디티오테이올(DTT), 2-머캅토에탄올, 시스테인, 환원된 글루타티온, 2-머캅토에틸아민 및 티오글리콜산과 같은 약 3-8의 pH에서 기능하는 다른 환원제들도 사용될 수 있다. Glu-C 펩티드 맵은 그것의 효소적 활성에 대해 두 최적 pH, 즉 pH 7.8 및 pH 4.0을 가진다. 상기 주어진 바와 같이, TCEP는 pH 8.0 이하에서 기능하는 것으로 알려져 있다. 한 구체예에서, 새로운 Glu-C 펩티드 맵은 TCEP에 의한 환원과 샘플 중의 탈아미드화된 형태, 예를 들면 환상 이미드의 천연 수준을 보존하는 최적 pH 범위인 pH 4.0의 낮은 pH에서의 분해를 둘 다 포함하는 샘플 제제를 사용한다. 이 새로운 맵 기술은 IFN-β 샘플 중의 환상 이미드를 포함한 탈아미드화된 형태를 함유하는 분해 단편의 특성을 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0047] IFN-β 샘플은 탈아미드화 부위 및 그것의 형태(예를 들면, Asp, 이소-Asp, 환상 이미드)를 확인하기 위해 Glu-C 펩티드 맵에 의하여 시험될 수 있다. 완충된 제형 중의 단백질 샘플(예를 들면, 0.1 내지 10의 농도의 단백질 샘플 0.5 ml, 예를 들면 2 내지 500 mM 완충액의 제형 완충액 중의 0.5 mg/ml, 또는 일부 경우 50 내지 100 mM의 염, 예를 들면 아스파르트레이트, 중탄산염(예를 들면, 중탄산암모늄), 탄산염(예를 들면, 탄산암모늄), 아세트산염(예를 들면, 아세트산암모늄), 인산염(예를 들면, 인산나트륨), 시트르산염, 포름산염, 숙신산염, MES, PIPES, ACES, MOPS, MOPSO, HEPES, TES, TRIS-HCl, BIS-TRIS, BIS-TRIS 프로판, ADA, BES, DIPSO, TAPSO, HEPPSO, POPSO, EPPS, TEA 등, 이들의 적합한 선택 및 사용은 원하는 pH에 따라서 당업자에게 공지될 것이다(예를 들면, 2 mM 아스파르트산, pH 4)이 TCEP를 사용하여, 예를 들면 1:2 내지 1:30, 예를 들면 1:3, 1:4, 1:5, 1:10 또는 1:20 몰비의 단백질 대 TCEP, 예를 들면 1:10의 비를 사용하여 환원될 수 있다. 샘플 물질이 환원될 때까지 샘플을, 예를 들면 약 30-40°C(예를 들면 37°C)에서 인큐베이션한다. 적합한 인큐베이션 시간은 샘플의 성질에 따라서 약 5 분 내지 24 시간, 예를 들면 3 시간일 수 있다. 환원된 물질은 이어서 1:1 내지 20:1(또는

2:1, 3:1, 4:1, 10:1 등을 포함한 어떤 적합한 중간 비율), 예를 들면 5:1 질량비의 단백질 대 Glu-C로, 예를 들면 1 내지 10, 예를 들면 4 mg/ml의 Glu-C를 사용하여 분해되고, 샘플 물질이 분해될 때까지, 예를 들면 약 30-40°C(예를 들면, 37°C)에서 인큐베이션된다. 적합한 분해 시간은 샘플의 성질에 따라서 약 5분 내지 24 시간, 예를 들면 4 시간일 수 있다. 펩티드 단편은 액체, 예를 들면 RP-HPLC 크로마토그래피에 의하여 분석될 수 있다.

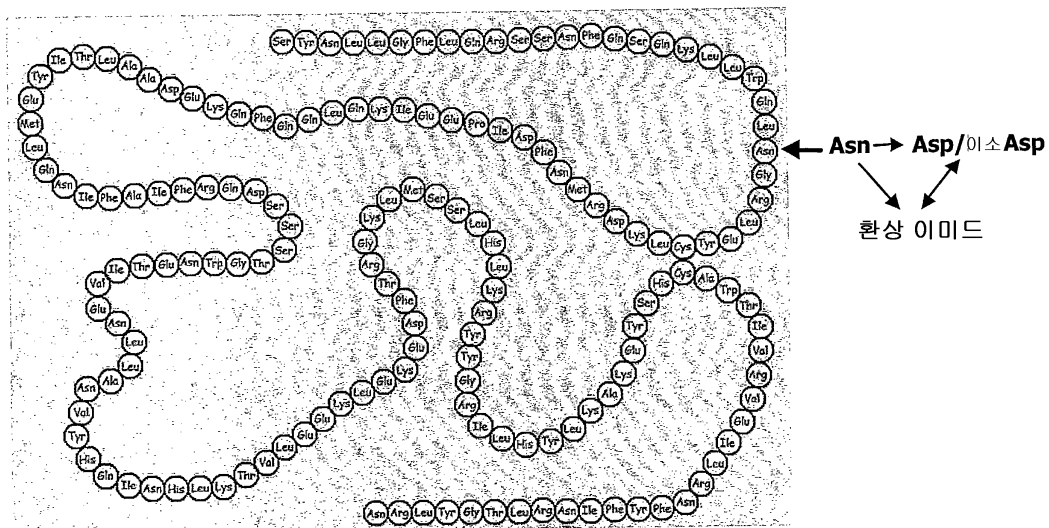
[0048] 구체적 펩티드 맵 실험 및 그것의 결과는 하기 실시예 부분에서 설명된다.

도면

도면1

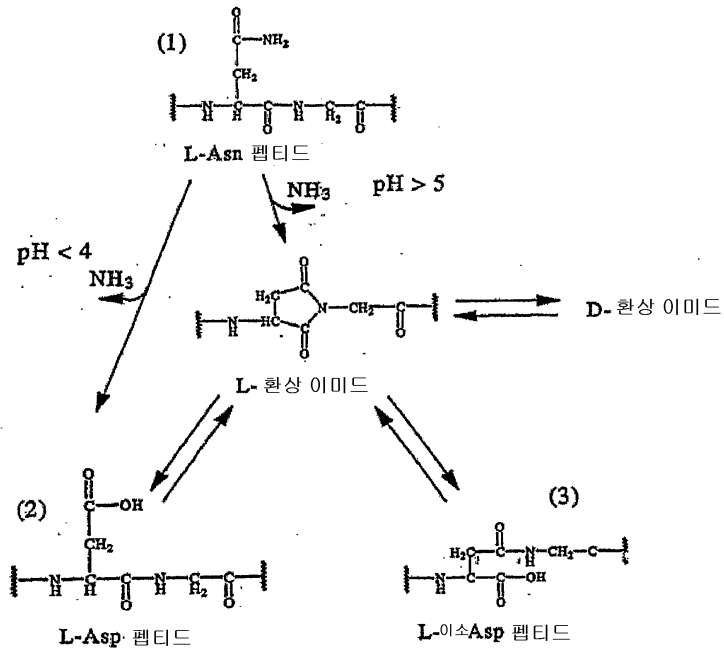
	5	10	15	20
MetSerTyrAsnLeu	LeuGlyPheLeuGln	ArgSerSerAsnPhe	GlnCysGlnLysLeu	
25	30	35	40	
LeuTrpGlnLeuAsn	GlyArgLeuGluTyr	CysLeuLysAspArg	MetAsnPheAspIle	
45	50	55	60	
ProGluGluIleLys	GlnLeuGlnGlnPhe	GlnLysGluAspAla	AlaLeuThrIleTyr	
65	70	75	80	
GluMetLeuGlnAsn	IlePheAlaIlePhe	ArgGlnAspSerSer	SerThrGlyTrpAsn	
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	LeuAgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu	
165	170	175	180	
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---			

도면2



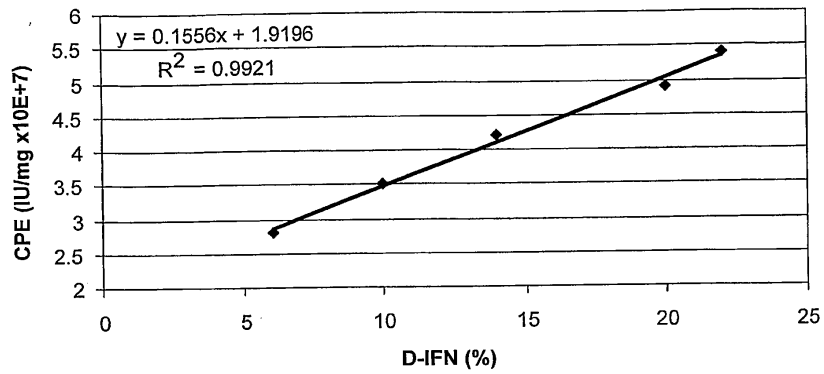
도면3

Asn 탈아미드화 경로

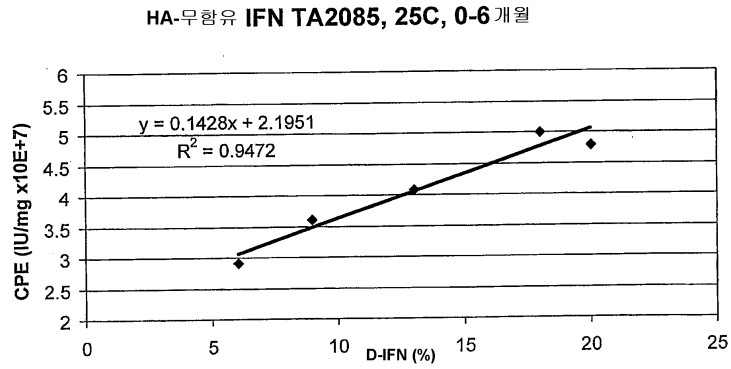


도면4

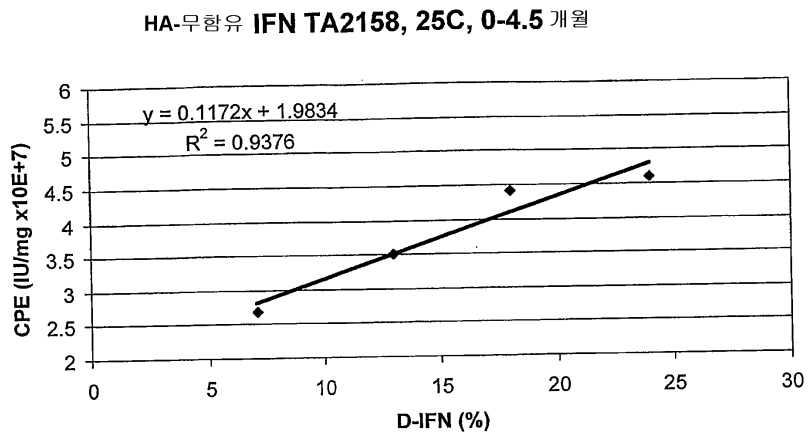
HA-무함유 IFN TA2040, 25C, 0-6개월



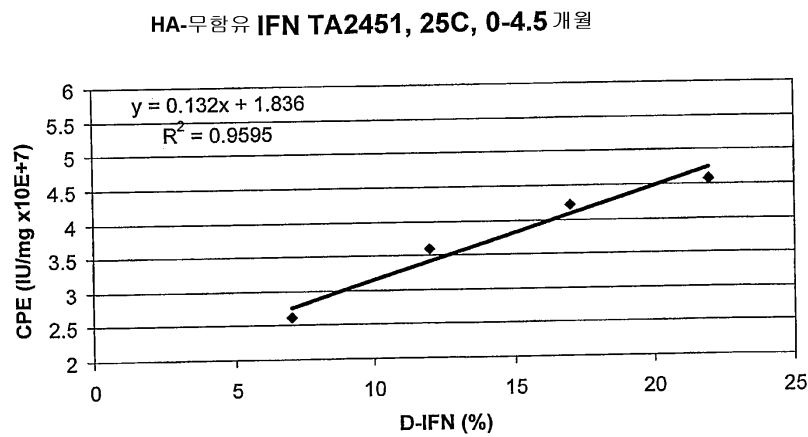
도면5



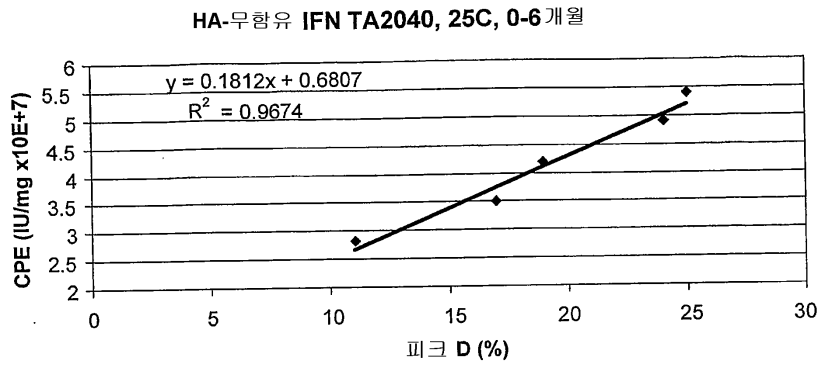
도면6



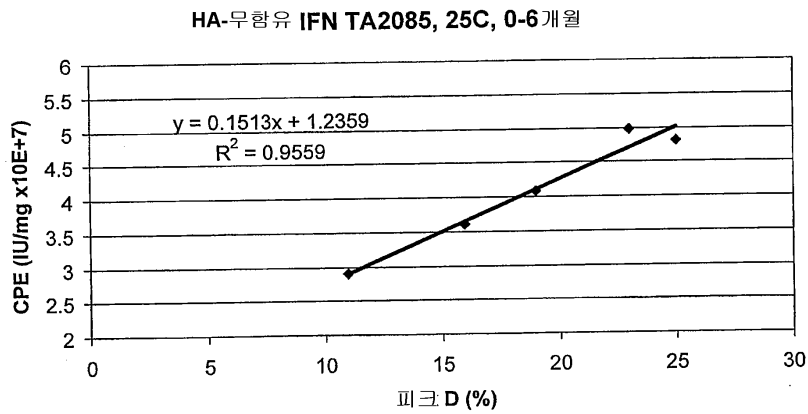
도면7



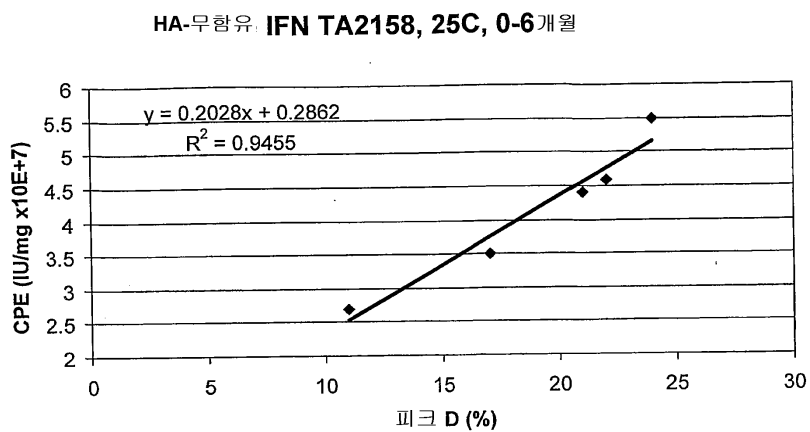
도면8



도면9

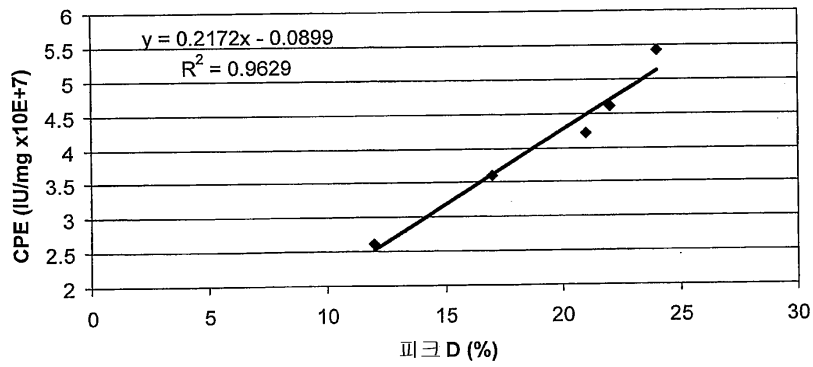


도면10



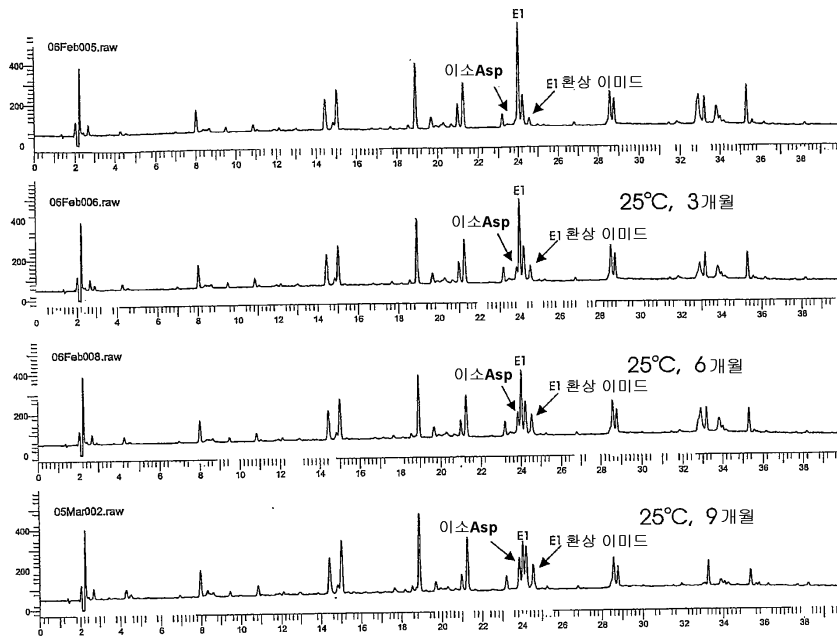
도면11

HA-무함유 IFN TA2451, 25C, 0-6 개월

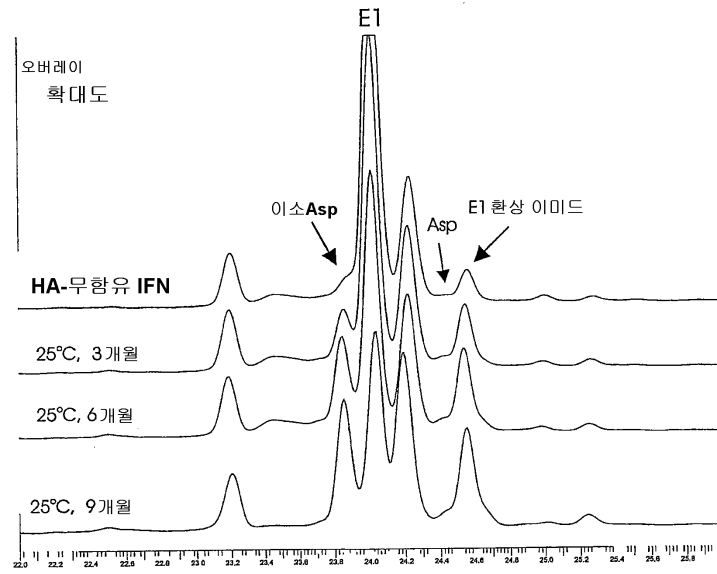


도면12A

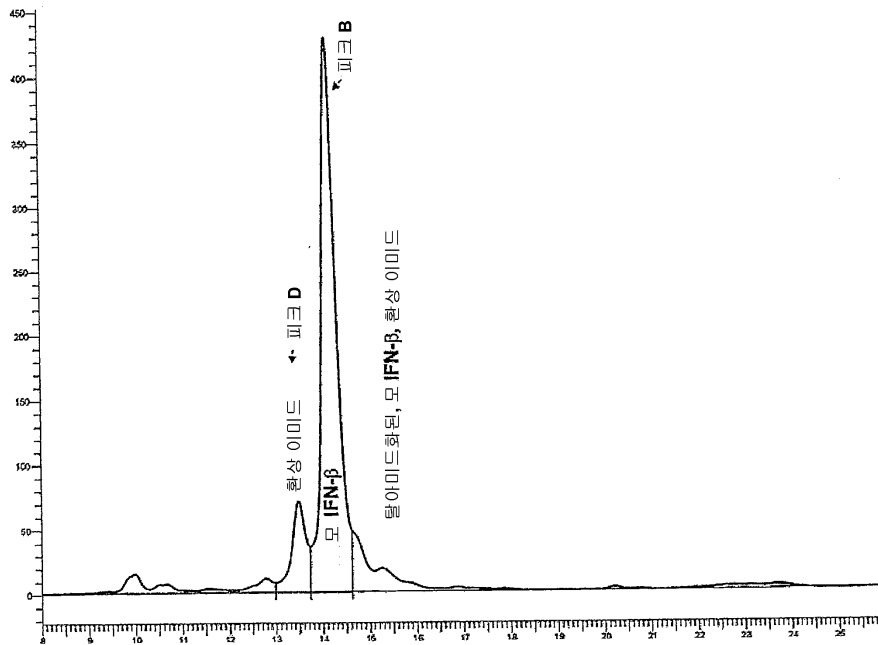
HA-무함유 IFN



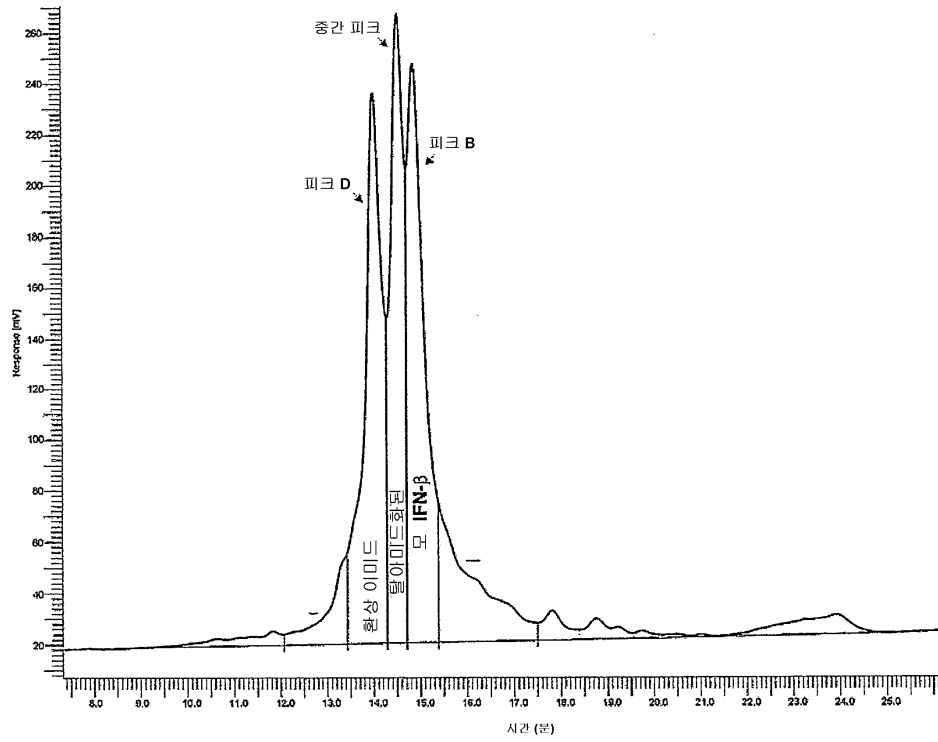
도면12B



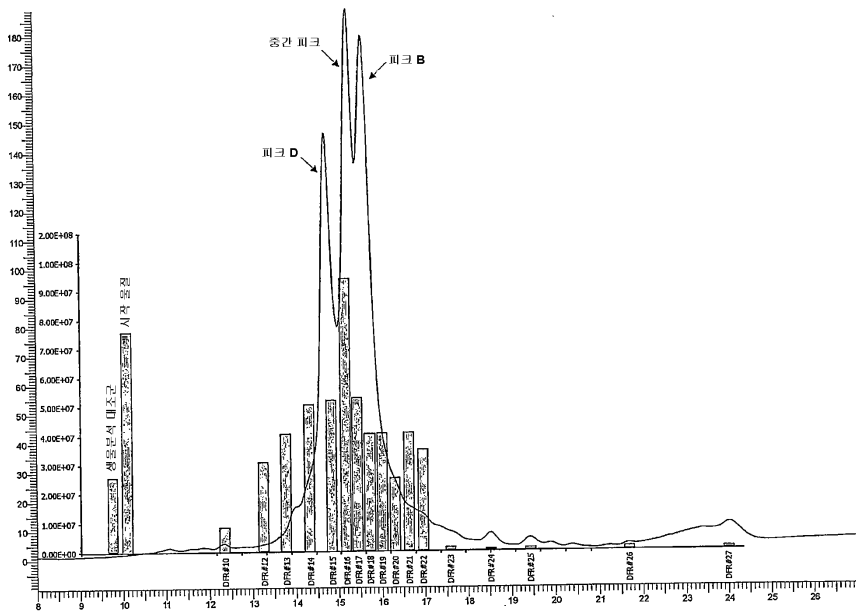
도면13



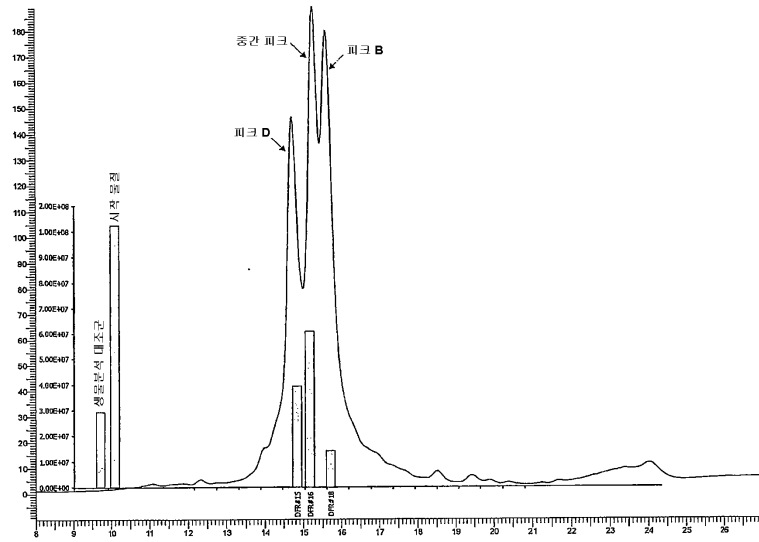
도면14



도면15



도면16A



도면16B

