



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21), (22) Заявка: **2007121515/04**, **10.11.2005**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.11.2005(30) Конвенционный приоритет:
10.11.2004 US 60/626,837(43) Дата публикации заявки: **20.12.2008**(45) Опубликовано: **20.11.2010** Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2216345 C1**, **20.11.2003**. **WO 2004/087753**
A1, **14.10.2004**. **KAWASAKI HIROAKI ET AL:**
"A protein with antimicrobial activity in the
skin of Schlegel's green tree frog Rhacophorus
schlegelii (Rhacophoridae) identified as histone
H2B." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL
RESEARCH COMMUNICATIONS, 2003, vol.
312, no.4, pages 1082-1086.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: **13.06.2007**(86) Заявка РСТ:
US 2005/040758 (10.11.2005)(87) Публикация РСТ:
WO 2006/053134 (18.05.2006)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, пат.пов.
В.П.Квашнину, рег.№ 4

(72) Автор(ы):

ФУРУЯ Кенжи (US),
ДЖОНСОН-ДЖЕКсон Дебора (US),
РУСИО Диана Тьерра (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС ВЭКСИНС ЭНД
ДИАГНОСТИКС ИНК. (US)

(54) ДЕАМИДИРОВАННЫЙ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА

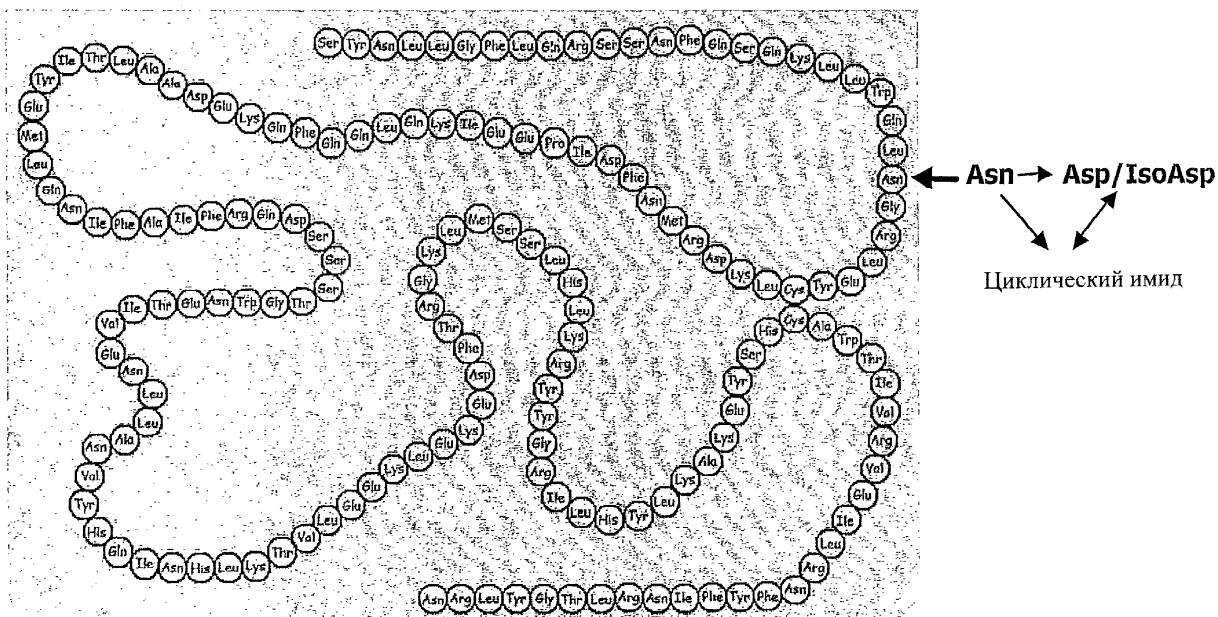
(57) Реферат:

Изобретение относится к протеиновым аналогам интерферона-β, в которых аспарагин в положении 25, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне-β, деамидирован, и цистеин в положении 17, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне-β, делетирован или замещен нейтральной аминокислотой, которые проявляют повышенные уровни биологической

активности нативного интерферона-β человека и не требуют НА для стабилизации протеина. Деамидированный продукт пригоден для крупномасштабного производства по введению в содержащие НА или не содержащие НА терапевтические средства для лечения заболеваний, включая рассеянный склероз. Также представлен способ пептидного картирования с помощью эндопротеиназы-С, которая дает хроматографический профиль

протеинов при использовании ферментативного расщепления с последующей RP-HPLC, пригодна для

качественного контроля в качестве ID и/или количественного теста деамидированных продуктов. 5 н. и 16 з.п. ф-лы, 18 ил., 6 табл.



Фиг. 2

RU 2 4 0 4 1 9 0 C 2

RU 2 4 0 4 1 9 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C07K 14/565 (2006.01)**A61K 38/19** (2006.01)**A61P 31/12** (2006.01)**A61P 25/00** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2007121515/04, 10.11.2005**(24) Effective date for property rights:
10.11.2005(30) Priority:
10.11.2004 US 60/626,837(43) Application published: **20.12.2008**(45) Date of publication: **20.11.2010 Bull. 32**(85) Commencement of national phase: **13.06.2007**(86) PCT application:
US 2005/040758 (10.11.2005)(87) PCT publication:
WO 2006/053134 (18.05.2006)Mail address:
**105064, Moskva, a/ja 88, pat.pov. V.P.Kvashninu,
reg.№ 4**

(72) Inventor(s):

**FURUJa Kenzhi (US),
DZhONSON-DZhEKSON Debora (US),
RUSIO Diana T'erra (US)**

(73) Proprietor(s):

**NOVARTIS VEhKSINS EhND DIAGNOSTIKS
INK. (US)****(54) DEAMIDATED BETA INTERFERON**

(57) Abstract:

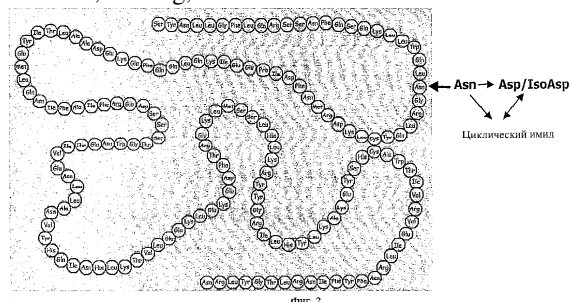
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to protein analogues of interferon- β , in which asparagine in position 25, in accordance with numeration of amino acids in native interferon- β , is deamidated, and cysteine in position 17, in accordance with numeration of amino acids in native interferon- β , is deleted or substituted with neutral amino acid, which demonstrate higher levels of biological activity of native human interferon- β and do not require HA for protein stabilisation. Deamidated product is suitable for wide-scale production for introduction into HA-containing or HA-non-containing therapeutic medications for treatment of diseases including disseminated sclerosis. Also claimed is method of

peptide mapping by means of endoproteinase-C, which gives chromatographic profile of proteins with use of enzymatic breakdown with further RP-HPLC, is suitable for quality control as ID and/or quantitative test of deamidated products.

EFFECT: improvement of biological properties.

21 cl, 16 dwg, 6 tbl



УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

1. Область техники

Данное изобретение относится к области общей химии биологически активных протеинов. Более конкретно оно относится к мутационно и химически измененным аналогам Интерферона- β , которые отличаются от нативного протеина замещениями, делениями или модификациями цистеиновых, аспарагиновых и других остатков.

2. Состояние уровня техники

Обнаружено, что Интерферон- β пригоден для лечения заболеваний человека, в частности рассеянного склероза. Рассеянный склероз (MS) представляет собой хроническое, часто инвалидизирующее заболевание центральной нервной системы, которое возникает, когда разрушается защитная оболочка, окружающая нервные волокна. Около тридцати процентов MS-пациентов страдают рецидивно-ремиттивной формой заболевания, при которой после обострения симптомы полностью или частично исчезают и затем следует период стабильности, который может длиться месяцы или годы. Было показано, что введение бета-интерферона (Интерферон- β или INF- β) уменьшает частоту обострений MS. Как результат, основанные на Интерфероне- β лекарственные средства стали ценным инструментом при ведении и лечении MS.

Для облегчения крупномасштабного производства основанных на Интерфероне- β лекарственных средств были разработаны методики рекомбинантных ДНК (рДНК). В частности, одна из проблем, вынуждающая использовать эти методики, заключалась в том, что человеческий бета-интерферон, аминокислотная последовательность которого представлена на Фиг.1 (SEQ ID NO:1), содержит цистеиновые остатки в положениях 17, 31 и 141 (Gene (1980) 10:11-15 и Nature (1980) 285:542-547), по крайней мере, некоторые из которых несут незначительную по своей активности, но которые свободны для образования нежелательных межмолекулярных и внутримолекулярных связей. В ходе микробного получения INF- β посредством методик рДНК было обнаружено, что в экстрактах, содержащих высокие концентрации INF- β , благодаря такому межмолекулярному связыванию образуются димеры и олигомеры INF- β . Это образование мультимеров делает очистку и выделение INF- β весьма трудоемкими и занимающими много времени и обуславливает необходимость в нескольких дополнительных стадиях очистки и выделения, таких как восстановление протеина во время его очистки и реоксидирования, чтобы восстановить его первоначальную конформацию, что приводит к увеличению возможности образования некорректных дисульфидных связей. Кроме того, такое образование мультимеров ассоциируется с низкой специфической биологической активностью.

Для решения этих вопросов были разработаны усовершенствованные методики рДНК, чтобы изменить получаемые с помощью микроорганизмов биологически активные протеиновые аналоги INF- β - таким образом, который не влиял бы неблагоприятно на их активность, но снижал бы или лишал их способности образовывать межмолекулярные сшивки или внутримолекулярные связи, которые являются причиной того, что протеин принимает нежелательную третичную структуру (напр., конформацию, которая уменьшает активность данного протеина). Для создания мутационно измененных биологически активных протеиновых аналогов («протеиновый аналог» означает здесь синтетический протеин, в котором один или более аминокислотных остатков генетически и/или химически модифицированы и который сохраняет биологическую активность родительского протеина), которые сохраняют желаемую активность их родительских протеинов, но у

которых отсутствует способность к образованию межмолекулярных связей или нежелательных внутримолекулярных дисульфидных связей. Было обнаружено, что синтетические аналоги биологически активного INF- β -протеина, у которых цистеиновый остаток в положении 17 делегирован или замещен другой

аминокислотой, обладают желаемой активностью и параметрами.

В частности, был получен Интерферон- β 1b (INF- β 1b), синтетический рекомбинантный протеиновый аналог INF- β , являющийся биологически активным протеином, в котором цистеиновый остаток в положении 17 замещен сериновым остатком. INF- β , как протеин, получаемый микробиологическим способом, является негликозилированным. Кроме того, он имеет делецию метионина на N-конце. INF- β 1b был размещен на рынке в составе успешного фармацевтического средства Betaseron[®], которое, как было показано, является эффективным при лечении и терапии MS. Этот протеиновый аналог, материалы и методики получения, технология его производства как терапевтического средства и использование для лечения MS описаны и заявлены в ряде US патентов и заявок на патент, включая заявку №435154, поданную 19 октября 1982 г.; патент №4588585, опубл. 13 мая 1986 г.; патент №4737462, опубл. 12 апреля 1988; и патент №4959314, опубл. 25 сентября 1990; каждый из этих документов включен здесь в качестве ссылки в отношении раскрытия упомянутых признаков.

Крупномасштабное производство INF- β для получения лекарственных средства также осуществляется из источников-млекопитающих, в частности из клеток яичников китайского хомячка (CHO). В этом аналоге INF- β , известном как INF- β 1a, отсутствует мутация Ser17, имеющаяся в INF- β 1b, и он гликозилирован. INF- β 1a входит в состав терапевтических продуктов, размещенных на рынке под марками Avonex[®] и Rebith[®].

В отношении большинства терапевтических средств имеется желание идентифицировать и производить более мощные биологически активные средства. В случае лекарственных препаратов, основанных на INF- β , было бы желательным иметь его аналог с увеличенной биологической активностью.

Кроме того, некоторые INF- β -фармацевтические препараты, включая Betaseron[®], содержат человеческий альбумин (НА или HAS), обычный стабилизатор протеинов. НА представляет собой продукт крови человека, и его поставки все более и более сокращаются. Соответственно, в последнее время возникло пожелание иметь лекарственные препараты, не содержащие НА, и были бы желательны стабильные и эффективные препараты INF- β , не содержащие НА.

КРАТКАЯ СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение упомянутой потребности посредством обеспечения деамидированного Интерферона- β . Деамидированный Интерферон- β представляет собой аналог человеческого протеина интерферон- β , в котором аспарагин в положении 25, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне- β деамидирован. Деамидированный продукт обнаруживает повышенный уровень биологической активности нативного человеческого интерферона- β и не требует НА для стабилизации протеина.

В конкретном выполнении деамидированный INF- β представляет собой аналог синтетического человеческого протеина интерферон- β 1b, в котором цистеин в положении 17, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне- β , делетирован или замещен нейтральной аминокислотой, в частности серином, и аспарагин в положении 25 деамидирован, так что он становится циклическим имидом, аспартатом или изо-аспартатным остатком. Деамидированный продукт обнаруживает желаемую биологическую активность нативного человеческого интерферона- β (напр.,

клеточные цитопатические эффекты или антипролиферативную активность, такую, которая, как было показано, коррелирует с уменьшением частоты обострений рассеянного склероза) более высокого уровня по сравнению с таковой родительского INF- β -протеина. Кроме того, повышенная биологическая активность
5 наблюдается в протеиновом аналоге, в составе которого отсутствует НА.

Препараты соединений активного протеинового аналога в терапевтических композициях и способы приготовления и применения также предлагаются.

Кроме того, предлагается методика составления пептидной карты с помощью
10 эндопротеиназы-С, которая дает хроматографический профиль протеинов, используя ферментативное расщепление образца восстановленного протеина при относительно низком рН с последующим хроматографическим разделением пептидных фрагментов, которая полезна для качественного контроля как ID-тест для деамидированных
15 продуктов.

Эти и другие цели и признаки данного изобретения станут более очевидными, когда следующее детальное описание изобретения будет читаться совместно с сопровождающими рисунками.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

20 На Фиг.1 изображена диаграмма аминокислотной последовательности INF- β .

На Фиг.2 изображена диаграмма аминокислотной последовательности INF- β 1b с указанием сайта и характера деамидирования в соответствии с настоящим изобретением.

25 На Фиг.3 показана диаграмма, иллюстрирующая путь деамидирования Asn со ссылкой на деамидирование INF- β Asn25 в соответствии с настоящим изобретением.

На Фиг.4-11 показаны графики величины активности в зависимости от количества деамидированного INF- β 1b в различных сериях не содержащего НА стабильного лекарственного вещества и продукта в соответствии с одним из аспектов изобретения.

30 На Фиг.12А показаны Glu-С-пептидные карты не содержащих НА стабильных образцов INF- β в соответствии с одним из аспектов изобретения.

На Фиг.12В показана часть карты по Фиг.12А в увеличении.

На Фиг.13 показан RP-HPLC профиль не содержащего НА контрольного образца INF- β (время (мин) относительно ответа (mV)).

35 На Фиг.14 показан RP-HPLC профиль стабильного не содержащего НА образца INF- β 1b лекарственного продукта в соответствии с одним из аспектов изобретения.

40 На Фиг.15 показан график СРЕ-активности для фракций RP-HPLC не содержащего НА стабильного образца INF- β в соответствии с одним из аспектов изобретения.

На Фиг.16А показан график результатов антипролиферативной активности по отношению к Hs294T для фракций RP-HPLC не содержащего НА стабильного образца INF- β в соответствии с одним из аспектов изобретения.

45 На Фиг.16В показан график результатов антипролиферативной активности по отношению к Daudi для фракций RP-HPLC не содержащего НА стабильного образца INF- β в соответствии с одним из аспектов изобретения.

ОПИСАНИЕ КОНКРЕТНЫХ ВАРИАНТОВ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

50 Соединения, композиции, материалы и связанные с ними методики и применения настоящего изобретения будут описаны ниже со ссылкой на несколько вариантов выполнения. Важные свойства и параметры описываемых вариантов иллюстрируются структурно в тексте. Хотя изобретение будет описано в связи с этими вариантами выполнения, следует понимать, что подразумевается, что данное изобретение не

ограничивается этими выполнениями. Напротив, имеется в виду, что оно охватывает альтернативы, модификации и эквиваленты, поскольку они могут соответствовать духу и объему изобретения, как оно определяется прилагаемыми пунктами притязаний. В последующем описании многочисленные конкретные детали
 5 представлены для того, чтобы обеспечить полное понимание настоящего изобретения. Настоящее изобретение может быть реализовано без некоторых или без всех этих конкретных деталей. В других примерах хорошо известные технологические операции не описываются в деталях, чтобы без необходимости не затенять сущность
 10 настоящего изобретения.

Введение

Настоящее изобретение предлагает деамидированный Интерферон- β . Деамидированный Интерферон- β представляет собой протеиновый аналог человеческого интерферона- β , в котором аспарагин в положении 25, в соответствии с
 15 нумерацией аминокислот в нативном интерфероне- β , деамидирован. Asn деамидируется в Asp или изо-Asp опосредованно через циклического имида. Деамидированный продукт обнаруживает биологическую активность нативного человеческого интерферона- β более высокого уровня и не требует НА для
 20 стабилизации протеина. Предлагаются также составы соединений активного протеинового аналога в терапевтических композициях и способы их приготовления и применения.

«Протеиновый аналог» означает здесь синтетический протеин, в котором одна или более аминокислот генетически и/или химически модифицированы и который
 25 сохраняет биологическую активность родительского протеина, такую как клеточные цитопатические эффекты или антипролиферативную активность. Было показано, что такая биологическая активность коррелирует с другими специфическими биологическими активностями, такой как уменьшение частоты обострений
 30 рассеянного склероза.

В конкретном варианте выполнения деамидированный INF- β является очищенным и выделенным синтетическим протеиновым аналогом человеческого интерферона-Д в котором цистеин в положении 17, в соответствии с нумерацией аминокислот в
 35 нативном интерфероне- β , делегирован или замещен нейтральной аминокислотой, в частности серином, а аспарагин в положении 25 деамидирован. В специфических вариантах выполнения Asn25 деамидирован в аспартат, изо-аспартат или остаток циклического имида (напр., INF- $\beta_{\text{Ser17,asp25}}$, INF- $\beta_{\text{Ser17,iso-asp25}}$ или INF- $\beta_{\text{Ser17,cyclic-imide25}}$, соответственно). Деамидированный продукт обнаруживает
 40 биологическую активность нативного человеческого интерферона- β более высокого уровня по сравнению с INF- β 1b. Кроме того, повышенная биологическая активность наблюдается в препаратах протеинового аналога, не содержащих НА, что дает возможность использовать INF- β 1b, не содержащий НА, в терапевтических средствах.

В синтетическом протеиновом аналоге согласно изобретению цистеиновый
 45 остаток 17 может быть замещен серином, треонином, глицином, аланином, валином, лейцином, изолейцином, гистидином, тирозином, фенилаланином, триптофаном или метионином. В конкретном варианте выполнения замещение представляет собой серин 17. Аспарагиновый остаток 25 замещен аспартатом, изо-аспартатом или
 50 циклическим имидом. Первичная (аминокислотная последовательность SEQ ID NO:2) и вторичная (складывание, поперечное сшивание) структуры протеинового аналога INF- β 1b в соответствии с изобретением иллюстрируются Фиг.2. Нативный остаток Asn в положении 25 деамидирован. Деамидирование аспарагина происходит

опосредованно через циклический имид. Этот путь иллюстрируется Фиг.3. Как описывается подробно далее, результаты полученной с помощью Glu-C пептидной карты указывают, что главными деамидированными формами являются изо-Asp (INF- $\beta_{\text{Ser17, iso-aspartate25}}$) и циклический имид (INF- $\beta_{\text{Ser17, cyclic-imide25}}$).

Протеиновый аналог может быть получен сочетанием методик рекомбинантной синтетической и химической модификации. Первоначально синтетический протеиновый аналог INF- β 1b обычно получают с помощью методики направленного мутагенеза рекомбинантной ДНК, как описано в патентах, на которые даны ссылки выше в разделе, относящемся к уровню техники заявленного изобретения. Методика направленного мутагенеза хорошо известна и по ней дан обзор Lather, R. F. и Lecoq, J. P. в Genetic Engineering Academic Press (1983), pp 31-50. Обзор конкретно по олигонуклеотид-направленному мутагенезу дан Smith, M. и Gillam, S. в Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press (1981) 3:1-32.

Затем протеиновый аналог INF- β 1b подвергают химической обработке, при которой аспарагиновый остаток в положении 25 деамидируется. Существует ряд возможных методик деамидирования, которые могут быть эффективными и подходящими для применения в крупномасштабном фармацевтическом производстве, и может быть использована любая методика, которая осуществляет деамидирование с сохранением нативной биологической активности, предпочтительно с увеличением биологической активности. Говоря в общем, деамидирование INF- β -протеинов может быть достигнуто инкубированием при температуре от умеренной до высокой (напр., примерно 25-60°C) и различном pH, от низкого (напр., примерно 0-4) или среднего (напр., примерно 4-10) до высокого (напр., примерно 10-14) с временем реакции от примерно 1 минуты до примерно 90 суток или более, в зависимости от условий. Например, деамидирование может быть выполнено инкубированием INF- β (напр., INF- β 1a или INF- β 1b) при температуре вплоть до 60°C; или между примерно 25 и 40°C, например, около 40°C, при pH 4 в течение, по меньшей мере, 24 часов, например, до 40 суток. Время реакции может быть уменьшено и/или температура реакции уменьшена при увеличении pH, например, до нейтрального или основного pH примерно от 7 до 14, например, примерно от 8 до 12, напр., около 8,5. В одном примере биологическая активность (CPE) образца INF- β 1b увеличивается почти в 2 раза после обработки при pH 8,4 и 2-8°C в течение 14 суток до 4,5 МЕ/мг. Существенные увеличения активности наблюдались также для обработки при температурах от умеренной (напр., комнатной температуры) до высокой (напр., 37-40°C) в течение 14-40 суток.

Методика получения деамидированного протеинового аналога INF- β позволяет производить продукт, который является частично или существенно чистым. Например, по меньшей мере, 25%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 75% или по существу весь синтетический протеиновый аналог в продукте может быть деамидирован в положении 25, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне- β . В тех случаях, когда по существу не весь продукт деамидирован, он, тем не менее, может показывать повышенную биологическую активность и стабильность при отсутствии НА. В некоторых случаях может быть желательным очистить и выделить деамидированный(-ые) протеиновый(-ые) аналог(-и) из продукта. Очистка и выделение могут быть достигнуты катион-обменной высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC), например, выполняя следующие условия:

Стационарная хроматографическая фаза: Pharmacia Mono S HR 5/5, или эквивалент.
Буфер для элюирования: 20 mM Tris-HCl, pH 7,0 с 0,5% Empigen.

Градиент: NaCl-линейный градиент до 200 мМ или выше в буфере для элюирования. В производственных целях данная методика может быть осуществлена в крупном масштабе.

В предпочтительном выполнении, когда синтетический протеиновый аналог получают микробиологическим путем, он не является гликозилированным. Кроме того, протеиновый аналог имеет деление метионина на N-конце. В других вариантах выполнения протеиновый аналог может быть получен в клетках млекопитающих и, таким образом, быть гликозилированным.

Как описывается подробно далее, различные анализы активности показывают, что деамидированные протеиновые аналоги INF- β 1b имеют увеличенную биоактивность по сравнению с их родительскими INF- β -протеинами. А результаты по стабильности, полученные на образцах, не содержащих НА, показывают, что деамидированные протеиновые аналоги INF- β согласно настоящему изобретению пригодны для препаратов, не содержащих НА, в качестве терапевтических средств. Для составления терапевтических композиций протеиновый аналог, частично или существенно чистый, как описано выше, может быть смешан с фармацевтически приемлемым носителем, таким, который хорошо известен для данного типа терапевтического продукта.

Хотя преимущественным свойством композиций согласно настоящему изобретению является именно то, что они обнаруживают стабильность при отсутствии НА, деамидирование может быть также проведено для содержащих НА препаратов, и они не исключаются из объема настоящего изобретения. Кроме того, хотя изобретение первоначально описано здесь применительно к протеиновым аналогам INF- β 1b, оно применимо также к другим аналогам INF- β , включая аналоги INF- β 1a.

Протеиновые аналоги INF- β и композиции согласно настоящему изобретению обнаруживают биологическую активность, которая предполагает полезность в терапевтических средствах в ряде применений, включая регулирование роста клеток у пациента, лечение пациента при вирусном заболевании и стимулирование природных клеток-киллеров у пациента. Одним из конкретных применений является применение для лечения рассеянного склероза у пациента, в частности рецидивно-ремиттивного MS. В этом аспекте, терапевтические средства в соответствии с настоящим изобретением применима для лечения, направленное на снижение частоты обострений рассеянного склероза. Повышенный уровень биологической активности деамидированных протеиновых аналогов INF- β означает их усиленное действие как терапевтических средств, например, в лечении и ведении MS.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предлагается методика составления пептидной карты с помощью эндопротеиназы-C (Glu-C). Пептидная карта дает хроматографический профиль протеинов, используя ферментативное расщепление образца восстановленного протеина при относительно низком pH, за которым следует разделение с помощью жидкостной хроматографии (напр., RP-HPLC) расщепленных фрагментов. Пептидное картирование может быть использовано при качественном контроле в качестве ID-теста для деамидированного продукта протеинового аналога INF- β в соответствии с данным изобретением. Оно также является мощным инструментом отслеживания побочных модификаций первичной структуры в протеине от таких событий, как вырезание, мутация и деградация вследствие окислирования или деамидирования.

Известно, что один вариант деамидированного INF- β содержит циклический имид, промежуточную форму деамидирования. Этот циклический имид обнаруживается в стабильных образцах в повышенных количествах. Большинство ферментов,

включая Lys-C, которые используются в обычных пептидных картах INF-β, оптимально расщепляют протеины при pH от нейтрального до высокого. При pH от нейтрального до высокого циклический имид нестабилен и далее деамидирование индуцируется искусственно. Поэтому, сохраняя образец в среде с низким pH во время

восстановления и расщепления, в нем необходимо отслеживать нативный уровень как циклического имида, так и других деамидированных форм (Asp, изо-Asp).
Полученную с помощью эндопротеиназы-C (Glu-C) пептидную карту объединяют с восстанавливающим агентом, который является функциональным при pH ниже 8, напр., в интервале примерно 3-8, например, около 3, 4, 5, 6, 7 или 8, либо при промежуточных значениях pH. Подходящим восстанавливающим агентом является трис-(2-карбоксиэтил) фосфин (ТСЕР). Могут использоваться другие восстанавливающие агенты, функциональные при pH примерно 3-8, такие как дитиотреитол (ДТТ), 2-меркаптоэтанол, цистеин, восстановленный глутатион, 2-меркаптоэтиламин и тиогликолевая кислота. Glu-C-пептидная карта имеет два оптимальных pH: pH 7,8 и pH 4,0 для своей ферментативной активности. Как отмечено выше, известно, что ТСЕР является функциональным при pH ниже 8,0. В одном варианте выполнения для новой Glu-C-пептидной карты используется приготовление образцов, включающее как восстановление посредством (ТСЕР), так и расщепление при низком pH 4,0, который является оптимальным значением pH для сохранения нативного уровня деамидированных форм, напр., циклического имида, в образце. Эта новая методика картирования может быть использована для описания фрагментов расщепления, содержащих деамидированные формы, включая циклический имид, в INF-β-образцах.

INF-β-образцы можно тестировать Glu-C-пептидной картой для идентификации сайта деамидирования и его формы (напр., Asp, изо-Asp, циклический имид). Протеиновые образцы в буферных растворах (напр., 0,5 мл протеинового образца при концентрации от 0,1 до 10, напр., 0,5 мг/мл в составе от 2 до 500 мМ буфера, или в некоторых случаях 50-100 мМ, соли, такой как аспартат, бикарбонат (напр., бикарбонат аммония), карбонат (напр., карбонат аммония), ацетат (напр., ацетат аммония), фосфат (напр., фосфат натрия), цитрат, формиат, сукцинат, MES, PIPES, ACES, MOPS, MOPSO, HEPES, TES, TRIS-C1, BIS-TRIS, BIS-TRIS пропан, ADA, BES, DIPSO, TAPSO, NEPPSO, POPSO, EPPS, TEA и др. подходящие составы, использование которых хорошо известно специалистам в данной области техники, для желаемого pH (напр., 2 мМ аспарагиновой кислоты, pH 4)) могут быть восстановлены с использованием ТСЕР, например, используя молярное отношение протеина к ТСЕР 1: 2-1:30, напр., 1:3, 1:4, 1:5, 1:10 или 1:20, в частности, такое как 1:10. Образец инкубируют, например, при примерно 30-40°C (напр., 37°C) до тех пор, пока материал образца не восстановится. Подходящее время инкубирования может быть от примерно 5 минут до 24 часов в зависимости от лабильности образца, например 3 часа. Восстановленный материал последовательно расщепляют Glu-C, например, от 1 до 10, напр., 4 мг/мл, при 1:1-20:1 (или любое подходящее промежуточное соотношение, включая 2:1, 3:1, 4:1, 10:1, и т.д.), напр., при массовом отношении протеина к Glu-C 5:1, и инкубируют, напр., при примерно 30-40°C (напр., 37°C), до тех пор, пока материал образца не будет расщеплен. Подходящее время расщепления может составлять от примерно 5 минут до 24 часов в зависимости от лабильности образца, например 4 часа. Пептидные фрагменты могут быть разделены, напр., жидкостной, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (RP-HPLC).

Конкретный эксперимент по пептидной карте и его результаты описываются ниже в разделе Примеры.

Примеры

Следующие примеры иллюстрируют аспекты настоящего изобретения, но 5 подразумевается, что они никоим образом не ограничивают данное изобретение. В разных примерах делается различие между циклическим имидом и другими деамидированными формами (Asp и изо-Asp), двумя главными различающимися 10 видами, которые показывают увеличенную активность. Для всех деамидированных форм, кроме случаев, когда различие между циклическим имидом и другими деамидированными формами (Asp и изо-Asp) очевидно, в частности в обозначениях на фигурах, первый из них иногда конкретно упоминается как «циклический имид», а 15 второй вид иногда упоминается как «деамидированный» или «деамидирование».

Пример 1: Увеличение активности в не содержащем НА стабильном образце INF-β 1b. 15

Резюме

Увеличение активности наблюдалось в не содержащих НА стабильных образцах INF-β 1b. Анализ цитопатических эффектов (CPE) показал увеличение 20 активности в не содержащих НА стабильных при 25°C образцах INF-β с течением времени (T=0-6 месяцев). Конечный продукт деамидирования и его промежуточная форма, циклический имид, также наблюдались в увеличенных количествах в стабильных при 25°C образцах.

Glu-C-пептидное картирование показало сайт деамидирования при Asn25 и 25 обнаружило, что главными формами деамидирования в не содержащих НА стабильных образцах INF-β 1b являются аналоги в формах изо-Asp и циклического имида, в то время как содержание Asp-формы увеличилось незначительно.

Результаты, полученные при использовании RP-HPLC -метода, показали, что 30 содержание деамидированных форм (циклического имида. Asp и изо-Asp) значительно увеличено в не содержащем НА стабильном образце INF-β.

Деамидированные формы в не содержащем НА стабильном образце INF-β показали более высокую биологическую активность, чем родительский (амидированный) INF-β, по CPE и антипролиферативному анализу. 35

Основываясь на этих открытиях, деамидирование (образование Asp-, изо-Asp- и циклоимидных аналогов) следует рассматривать как усиление биологической активности не содержащего НА INF-β. Следовательно, деамидированная форма INF-β может быть приготовлена для того, чтобы увеличить биологическую активность 40 основанных на INF-β терапевтических средств, либо содержащих, либо не содержащих НА. Деамидированные аналоги можно приготовить инкубированием раствора INF-β (либо содержащего, либо не содержащего НА) при температуре от умеренной до высокой и/или при низком, среднем или высоком pH. Деамидированные продукты согласно данному изобретению уменьшают необходимую клиническую дозу и 45 увеличивают стабильность жидких препаратов INF-β при комнатной температуре. С понижением клинической дозы доля пациентов, испытывающих побочную иммунную реакцию (напр., нейтрализацию антител), уменьшается.

Данные, подтверждающие изобретение, полученные из различных исследований и 50 анализов препаратов INF-β 1b по стабильности, приводятся ниже:

1. Данные о стабильности INF-β, не содержащего НА

Как показано ниже в Таблице 1 (лекарственное вещество: в 2 мМ аспарагиновой кислоты, pH 4,0) и Таблице 2 (лекарственный продукт: в 2 мМ аспарагиновой

кислоты, pH 4,0, 9% трегалозы), биоанализ цитопатических эффектов (CPE) показал увеличение активности в стабильных образцах INF-β 1b, не содержащих НА, при 25°C с течением времени (T=0-6 месяцев).

Таблица 1. Данные стабильности биоанализа CPE для лекарственного вещества интерферон-бета 1b, не содержащего НА

Аналитический метод: Биоанализ CPE						
Критерий приемлемости: $1,3 - 5,1 \times 10^7$ МЕ/мг						
Серия №:	Контроль	TA2040	TA2085	Контроль	TA2040	TA2085
Описание:	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл
№ исслед.:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
Хранение при:	5°C	5°C	5°C	25°C/60% RH	25°C/60% RH	25°C/60% RH
Ориентация:	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая
Месяцы	МЕ/мг х 10^7	МЕ/мг х 10^7	МЕ/мг х 10^7	МЕ/мг х 10^7	МЕ/мг х 10^7	МЕ/мг х 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: не выполнялся RH: относительная влажность						

Таблица 2. Данные стабильности биоанализа CPE для лекарственного продукта интерферон-бета 1b, не содержащего НА				
Серия №:	14159-49 (не клинический)	25FEB03 (Контроль)	TA2158	TA2451
Описание:	1,2 мл; 0,25 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл
№ исслед.:	1335	1438	1442	1444
Хранение при:	25°C /60% RH	25°C /60% RH	25°C /60% RH	25°C /60% RH
Ориентация:	Обращенная	Обращенная	Обращенная	Обращенная
Месяцы	МЕ/мг $\times 10^7$	МЕ/мг $\times 10^7$	МЕ/мг $\times 10^7$	МЕ/мг $\times 10^7$
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

Как показано ниже в Таблицах 3 и 4, катион-обменная хроматография ((СЕХ)-

HPLC) демонстрирует, что данные стабильности при 25°C для образцов лекарственного вещества и лекарственного продукта, соответственно, также показали увеличение при деамидировании (D-INF-β).

Таблица 3. Данные стабильности CEX-HPLC для лекарственного вещества интерферон-бета 1b, не содержащего НА

Аналитический метод: CEX HPLC						
Критерий приемлемости: % деамидирования						
Серия №:	Контроль	ТА2040	ТА2085	Контроль	ТА2040	ТА2085
Описание:	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл	6 мл; 2 мг/мл
№ исслед.:	1402	1411	1414	1403	1412	1415
Хранение при:	5°C	5°C	5°C	25°C/60% RH	25°C/60% RH	25°C/60% RH
Ориентация:	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая	Прямая
Месяцы	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования
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: не выполнялся						

Таблица 4. Данные стабильности CEX-HPLC для лекарственного продукта интерферон-бета 1b, не содержащего НА				
Серия №:	14159-49 (не клинический)	25FEB03 (Контроль)	ТА2158	ТА2451
Описание:	1,2 мл; 0,25 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл	1,2 мл; 1,0 мг/мл
№ исслед.:	1335	1438	1442	1444
Хранение при:	25°C/60% RH	25°C/60% RH	25°C/60% RH	25°C/60% RH
Ориентация:	Обращенная	Обращенная	Обращенная	Обращенная
Месяцы	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования	% деамидирования
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	ОКОНЧАНИЕ	IP	IP	IP
ОКОНЧАНИЕ				

Таблицы 5 и 6, ниже, показывают, что увеличение пика D, который представляет циклический имид промежуточную форму деамидирования, также наблюдалось с течением времени при использовании методики реверсивной фазы (RP)-HPLC при 25°C для образцов лекарственного вещества и лекарственного продукта, соответственно:

Таблица 5. Данные стабильности RP-HPLC для лекарственного вещества интерферон-бета 1b, не содержащего НА

Аналитический метод: RP HPLC															
Критерий приемлемости: % площадей пиков															
Серия №:	Контроль					TA2040					TA2085				
Описание:	6 мл; 2 мг/мл					6 мл; 2 мг/мл					6 мл; 2 мг/мл				
№ исслед.:	1403					1412					1415				
Хранение при:	25°C / 60% RH					25°C / 60% RH					25°C / 60% RH				
Ориентация:	Прямая					Прямая					Прямая				
Месяцы	п и к А	глав ный D+B	п и к D	п и к B	др у- ги е	п и к А	глав ный D+B	п и к D	п и к B	др у- ги е	п и к А	глав ный D+B	п и к D	п и к B	др у- ги е
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	25	68	5

Таблица 6. Данные стабильности RP-HPLC для лекарственного продукта интерферон-бета 1b, не содержащего НА

5	Аналитический метод: RP HPLC															
	Критерий приемлемости: % площадей пиков															
	Серия №:	25FEB03				TA2158				TA2451						
10		(Контроль)														
	Описание:	1,2 мл; 1,0 мг/мл				1,2 мл; 1,0 мг/мл				1,2 мл; 1,0 мг/мл						
	№ исслед.:	1438				1442				1444						
15	Хранение при:	25°C / 60% RH				25°C / 60% RH				25°C / 60% RH						
	Ориентация:	Обращенная				Обращенная				Обращенная						
20	Месяцы	п	глав	п	п	др	п	глав	п	п	др	п	глав	п	п	др
		и	ный	и	и	у-	и	ный	и	и	у-	и	ный	и	и	у-
		к		к	к	ги	к		к	к	ги	к		к	к	ги
		А	D+B	D	B	е	А	D+B	D	B	е	А	D+B	D	B	е
25	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
30	6	1	94	24	70	5	1	94	24	71	5	1	95	24	71	4
	Окончание															

35 На Фиг.4-11 показаны графики зависимости активности от количества деамидированного INF-β 1b («% D-INF» или «% пика D») в различных сериях не содержащих НА INF-β стабильных лекарственных веществ и продуктов в соответствии с одним аспектом изобретения. Эти данные показывают, что между увеличением активности и уровнем деамидирования не содержащего НА INF-β
40 существует корреляция.

2. Исследование не содержащих НА стабильных образцов INF-β

Первичная последовательность INF-β 1b показана на Фиг.3. Было обнаружено, что деамидирование происходит у Asn25. Природа этого деамидирования и свойства
45 деамидированных продуктов были исследованы в описанных ниже анализах:

2.1. Glu-C пептидная карта

Пептидная карта дает хроматографический профиль протеинов посредством использования ферментативного расщепления, после которого делается RP-HPLC. Пептидное картирование обычно используется в качественном контроле как ID-тест.
50 Оно также является мощным инструментом отслеживания побочных модификаций первичной структуры в протеине, происходящих в результате таких событий, как вырезание, мутация и деградация из-за окислирования или деамидирования. Как известно, INF-β без НА содержит циклический имид, промежуточную форму

деамидирования. Этот циклический имид является основным деградированным вариантам в не содержащем НА INF- β и обнаруживается в стабильных образцах в увеличенных количествах. Большинство ферментов, включая Lys-C, которые используются в настоящих пептидных картах для INF- β , не содержащих НА, оптимально расщепляют протеины при pH от нейтрального до высокого. При pH от нейтрального до высокого циклический имид нестабилен и далее деамидирование индуцируется искусственно. Поэтому сохраняя образец в среде с низким pH во время восстановления и расщепления, в нем необходимо отслеживать нативный уровень циклического имида и деамидирования.

Новая пептидная карта, полученная с помощью эндопротеиназы-C (Glu-C) и связанная с трис-(2-карбоксиэтил) фосфина (ТСЕР) в качестве восстанавливающего агента была создана для характеристики фрагмента, содержащего деамидированные формы, включая циклический имид, в не содержащем НА INF- β . Известно, что Glu-C пептидная карта имеет два оптимальных pH: pH 7,8 и pH 4,0 для своей ферментативной активности. Известно, что ТСЕР является функциональным при pH ниже 8,0. Новая Glu-C пептидная карта была получена путем приготовления образцов, включая как восстановление, так и расщепление при низком pH 4,0, который является оптимальным диапазоном для сохранения нативного уровня деамидированных форм, напр., циклического имида, в образце. Поскольку полученная пептидная карта предполагает приготовление образцов при низком pH, успешно достигается точное отслеживание нативного уровня деамидированных форм в INF- β , не содержащих НА.

Стабильные образцы серии TA2451 (3, 6 и 9 месяцев при 25°C) лекарственного продукта INF- β , не содержащего НА, были протестированы Glu-C пептидной картой для идентификации сайта деамидирования и его форм (напр., Asp, изо-Asp, циклического имида). Каждый образец протеина в количестве 0,5 мл при концентрации 0,5 мг/мл в буферном растворе 2 мМ аспарагиновой кислоты, pH 4,0, восстанавливали, используя ТСЕР. При молярном отношении протеина к ТСЕР 1:10 образец инкубировали при 37°C в течение 3 часов. Восстановленный материал последовательно расщепляли 4 мг/мл Glu-C при массовом отношении протеина к Glu-C 5:1 и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Пептидные фрагменты разделяли RP-HPCL-хроматографией (ТермоГиперсил BioBasic C 18, 150×4,6 мм, 5 мкм), используя ацетонитриловый градиент в 0,1% трифторуксусной кислоты в качестве буфера для элюирования, при скорости промывания 1,0 мл/мин и температуре колонки 38°C.

На Фиг.12А показаны Glu-C пептидные карты стабильных образцов INF- β , не содержащих НА, в соответствии с одним аспектом изобретения. Фиг.12 В показывает увеличенное изображение RT-части в интервале 22-26 минут пептидной карты на Фиг.12А.

Как видно на чертежах, пик фрагмента E1 уменьшился со временем, в то время как пики, представляющие изо-Asp, циклический имид и Asp, увеличились. Эти пики представляют деамидированные формы Asn в положении 25 во фрагменте E1. Данное исследование пиков было выполнено с помощью спектрометрии и секвенирования по Эдману субфрагментов E1, полученных расщеплением посредством Lysyl-эндопептидазы E1-связанных фрагментов. За остатком Asn₂₅ в аминокислотной последовательности расположен глицин. Известно, что эта последовательность Asn-Gly обладает высокой скоростью деамидирования.

На основании результатов этой Glu-C пептидной карты главные формы деамидирования стабильных образцов INF- β , не содержащих НА, были идентифицированы как изо-Asp и циклический имид. Имело место также небольшое

увеличение уровня Asp-формы.

2.2. RP-HPLC

RP-HPLC разделяет соединения на основании их гидрофобности. Образцы INF- β 1b, не содержащие НА, тестировали методом RP-HPLC для описания вариантов INF- β 1b (напр., Asp, изо-Asp, циклический имид). Эти тестируемые образцы наносили на хроматографическую колонку Zorbax 300SB-CN, 150×4,6 мм, размер частиц 3,5 мкм, и разделяли варианты INF- β 1b, используя ацетонитриловый градиент в буфере для элюирования 0,1%-ной трифторуксусной кислоты. Результат контрольного образца показан на Фиг.13.

Идентификация пиков, показанная на фиг.13, выполнялась с помощью он-лайн LC/масс-спектрометрического анализа (RP-HPLC/Q-TOF/ESI-MS). HPLC-поток расщепляли в отношении приблизительно 1:20 и со скоростью около 50 мкл/мин направляли к источнику ионов масс-спектрометра. Масс-спектрометр представлял собой прибор Micromass Q-TOF2 с электрораспыляющим источником ионов. Ионное напряжение было установлено в 3200, а напряжение на конусе - 50. Данные собирали с помощью времяпролетного (TOF) анализатора между m/z 300 и 2500. Данные он-лайн-LC/масс-спектрометрии показывают, что имеется не более одного протеинового варианта, ко-элюирующего при нескольких RP-HPLC-пиках.

На Фиг.14 показан RP-HPLC-профиль серии стабильного образца лекарственного продукта INF- β 1b, не содержащего НА (около 10 месяцев при 25°C). Как показано на фиг.14, этот профиль отличается от профиля контрольного образца (Фиг.13) и профиля циклического имида (пик D), и деамидирование (Asp и/или изо-Asp) в не содержащем НА INF- β 1b значительно увеличено. Наблюдались многочисленные другие побочные варианты деамидирования и циклического имида. Они представляют собой деамидированные варианты и варианты циклического имида с дополнительными структурными и химическими модификациями, которые разделяются благодаря их различным гидрофобным свойствам.

2.3. Биоанализ CPE

INF- β индуцирует антивирусное состояние клеток млекопитающих, в которых некоторые типы вирусов ингибируются в результате репликации и вызывают клеточные цитопатические эффекты (CPE). Для оценки биологической активности фракций RP-HPLC, полученных из серии стабильного образца лекарственного продукта, не содержащего НА INF- β 1b (около 10 месяцев при 25°C), были использованы клетки A549 карциномы легких человека и муринового вируса энцефаломиокардита (ЕМС).

Клетки выращивали на 96-луночных планшетах и обрабатывали серийными разбавлениями INF- β 1b в течение ночи перед добавлением вируса. Затем культуры инкубировали в течение подходящего периода времени, чтобы дать возможность вирусу реплицироваться. Клетки, обработанные достаточным количеством INF- β 1b, были защищены от вирусной атаки и оставались живыми. Незащищенные клетки подвергались цитопатическим изменениям и погибали. Зависимая от дозы интерферона CPE оценивалась количественно, используя методики окрашивания, а кривая доз ответа получена из графика стабильности клеток (измерение оптической плотности) в зависимости от концентрации INF- β . Активность INF- β вычислялась как концентрация, необходимая для защиты максимально половины клеток (концентрация ED₅₀).

Как показано на Фиг.15, CPE-активность в деамидированной фракции (средний пик, фракция 16) значительно выше, чем таковая во фракции родительского INF- β 1b

(пик В, фракция 18). Фракция циклического имида (пик D, фракция 15) также показывает более высокую СРЕ-активность, чем родительская фракция INF- β 1 b.

2.4. Анализ антипролиферативной активности

INF- β демонстрирует антипролиферативную активность против ряда клеточных линий, выделенных из опухолей человека. Для оценки биологической активности RP-HPLC-фракций, полученных из серии стабильного образца лекарственного продукта INF- β 1b, не содержащего НА (около 10 месяцев при 25°C), были использованы две клеточные линии - клеточная линия меланомы человека Hs294T и линия лимфобластов В человека Daudi, происходящая из лимфомы Буркитта.

Серийное разведение тестируемых образцов INF- β осуществлялось в 96-луночных планшетах. Иммунореактивные клетки готовили в среде тканевой культуры и добавляли в анализируемые планшеты. По истечении 3 дней инкубации клетки окрашивали Аламаром Синим (Alamar Blue) либо для измерения реакции роста использовали подсчет с помощью счетчика Коултера. Рост клеток ингибировался в ответ на INF- β в зависимости от дозы. Кривая реакции на дозу была получена из графика количества клеток (измерением оптической плотности) относительно концентрации INF- β . Активность INF- β вычисляли как концентрацию, необходимую для роста клеток вдвое меньше от максимального (ED₅₀-концентрация).

Как показано на Фиг.16А (Hs294T) и 16 В (Daudi), антипролиферативная активность в деамидированной фракции (средний пик, фракция 16) и фракции циклического имида (пик D, фракция 15) значительно выше, чем таковая в родительской фракции INF- β (пик В, фракция 18).

3. Заключение

На основании данных о стабильности и результатов, полученных из описанных выше исследований, можно сделать вывод, что деамидирование (Asp, изо-Asp и циклический имид при замещении Asn в положении 25) увеличивает биологическую активность INF- β . Поэтому деамидированная форма INF- β , напр., INF- β 1b, может быть подготовлена специально для того, чтобы повысить биологическую активность соединения. Деамидированную форму можно приготовить инкубированием INF- β при температуре от умеренной до высокой и при низком, умеренном или высоком pH среды. Деамидированные продукты согласно данному изобретению уменьшают необходимую клиническую дозу и увеличивают стабильность жидких препаратов INF- β , включая препараты INF- β , содержащие или не содержащие НА, при комнатной температуре. При снижении клинической дозы доля пациентов, у которых проявляется побочная иммунная реакция (напр., нейтрализация антител), уменьшается.

Пример 2: Сведения по промышленному производству

Чтобы продемонстрировать различные технологии деамидирования, которые описаны выше, были проведены исследования. Данные, полученные из СРЕ-биоанализа, свидетельствуют о том, что деамидированный INF- β легко получается способами, пригодными для крупномасштабного фармацевтического производства. В частности, значительные увеличения биоактивности наблюдались в различных образцах, произведенных по правилам организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP), инкубированных при температурах от умеренной (напр., комнатной температуры) до высокой (напр., 37-40°C) в течение 14-40 суток, при этом увеличения биоактивности почти в 2 раза были получены при инкубировании GMP-образцов при комнатной температуре и pH 8,8 в течение примерно 1 часа и при 2-8°C при pH 8,4 в течение примерно 14 суток.

Результаты СРЕ-биоанализа

Тест 1

	Наименование образца	МЕ/мг
	TR090602 суммарный	2,79E+07
5	TR090602 Стаб. RT ¹ 20 суток	3,87E+07
	TR090602 Стаб. 37C 20 суток	4,11E+07
	Нагруженный не содержащий НА контроль	2,95E+07
	Нагруженный не содержащий НА основной pH ²	4,52E+07
	Нагруженный не содержащий НА 40C 30 суток	5,06E+07
10	IFN CPE-анализ контроль	2,94E+07

Тест 2

	Наименование образца	МЕ/мг
	TR090602 суммарный	3,62E+07
15	TR090602 Стаб. RT 40 суток	6,52E+07
	TR090602 Стаб. 37C 40 суток	1,56E+07
	GMP#1 суммарный	2,67E+07
	GMP#1 суммарный Стаб. 37C 40 суток	3,51E+07
	GMP#1 суммарный pH8,8 ³	4,79E+07
20	Нагруженный не содержащий НА контроль	2,26E+07
	Нагруженный не содержащий НА 40C 14 суток	3,44E+07
	Нагруженный не содержащий НА 40C 30 суток	4,05E+07
	IFN CPE-анализ контроль	2,93E+07
25	¹⁾ комнатная температура ²⁾ образец инкубировали при pH 8,4 и 2-8C в течение 14 суток. ³⁾ образец инкубировали при pH 8,8 и RT в течение 1 часа.	

Заключение

Несмотря на то, что, с целью ясности понимания, вышеизложенное изобретение описано довольно детально, является очевидным, что в пределах объема прилагаемых пунктов притязаний могут быть произведены определенные изменения и модификации. Следует отметить, что имеется много альтернативных путей реализации как способа, так и композиций согласно настоящему изобретению. Соответственно, представленные воплощения должны рассматриваться как иллюстративные и не ограничивающие объем, и изобретение не ограничивается приведенными в них подробностями, а может быть модифицировано в объеме прилагаемых пунктов притязаний и их эквивалентов.

Все цитированные выше документы включены здесь в качестве ссылки во всей их полноте и для всех целей.

Формула изобретения

1. Очищенный и выделенный синтетический протеиновый аналог интерферона-β человека, в котором аспарагин в положении 25, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне-β, деамидирован, цистеин в положении 17, в соответствии с нумерацией аминокислот в нативном интерфероне-β, делетирован или замещен нейтральной аминокислотой и упомянутый протеиновый аналог проявляет биологическую активность нативного интерферона-β человека.

2. Синтетический протеиновый аналог по п.1, в котором указанный цистеиновый остаток замещен сериновым остатком.

3. Синтетический протеиновый аналог по п.2, в котором указанный аспарагиновый остаток замещен остатком, выбранным из группы, состоящей из аспартата,

изоаспартата и циклического имида.

4. Синтетический протеиновый аналог по п.3, в котором протеиновый аналог не гликозилирован.

5. Синтетический протеиновый аналог по п.4, в котором протеиновый аналог имеет на N-конце делецию метионина.

6. Синтетический протеиновый аналог по п.3, в котором протеиновый аналог имеет биологическую активность большую, чем $\text{INF-}\beta_{\text{ser17}}$.

7. Терапевтическая композиция, имеющая активность $\text{INF-}\beta$, включающая терапевтически эффективное количество синтетического протеинового аналога по п.3, смешанная с фармацевтически приемлемым носителем.

8. Композиция по п.7, где композиция не содержит НА.

9. Способ получения деамидированного аналога $\text{INF-}\beta$ по п.1, включающий: инкубирование протеина $\text{INF-}\beta$ при пригодных условиях, при температуре от умеренной до высокой, примерно 25-60°C;

очистку и выделение деамидированного протеинового аналога.

10. Способ по п.9, включающий инкубирование при температуре около 40°C в течение 14 суток.

11. Способ по п.10, дополнительно включающий проведение инкубирования при pH, по меньшей мере, 4.

12. Способ по п.11, включающий инкубирование при pH 7-14.

13. Способ по п.12, в котором инкубирование проводят при pH 8-9 в течение примерно 14 суток.

14. Применение композиции по п.7 для лечения рассеянного склероза.

15. Применение по п.14, в котором лечение включает уменьшение частоты обострений рассеянного склероза.

16. Применение по п.15, в котором упомянутый рассеянный склероз относится к рецидивирующе-ремиттивному типу.

17. Способ пептидного картирования, включающий: инкубирование образца синтетического протеинового аналога по п.1 в буферном растворе с pH ниже 8, содержащем восстанавливающий агент; расщепление инкубированного образца эндопротеиназой-C и разделение пептидных фрагментов расщепления жидкостной хроматографией.

18. Способ по п.17, в котором восстанавливающим агентом является трис-(2-карбоксиэтил) фосфин (ТСЕР).

19. Способ по п.18, в котором инкубирование проводят при pH около 4.

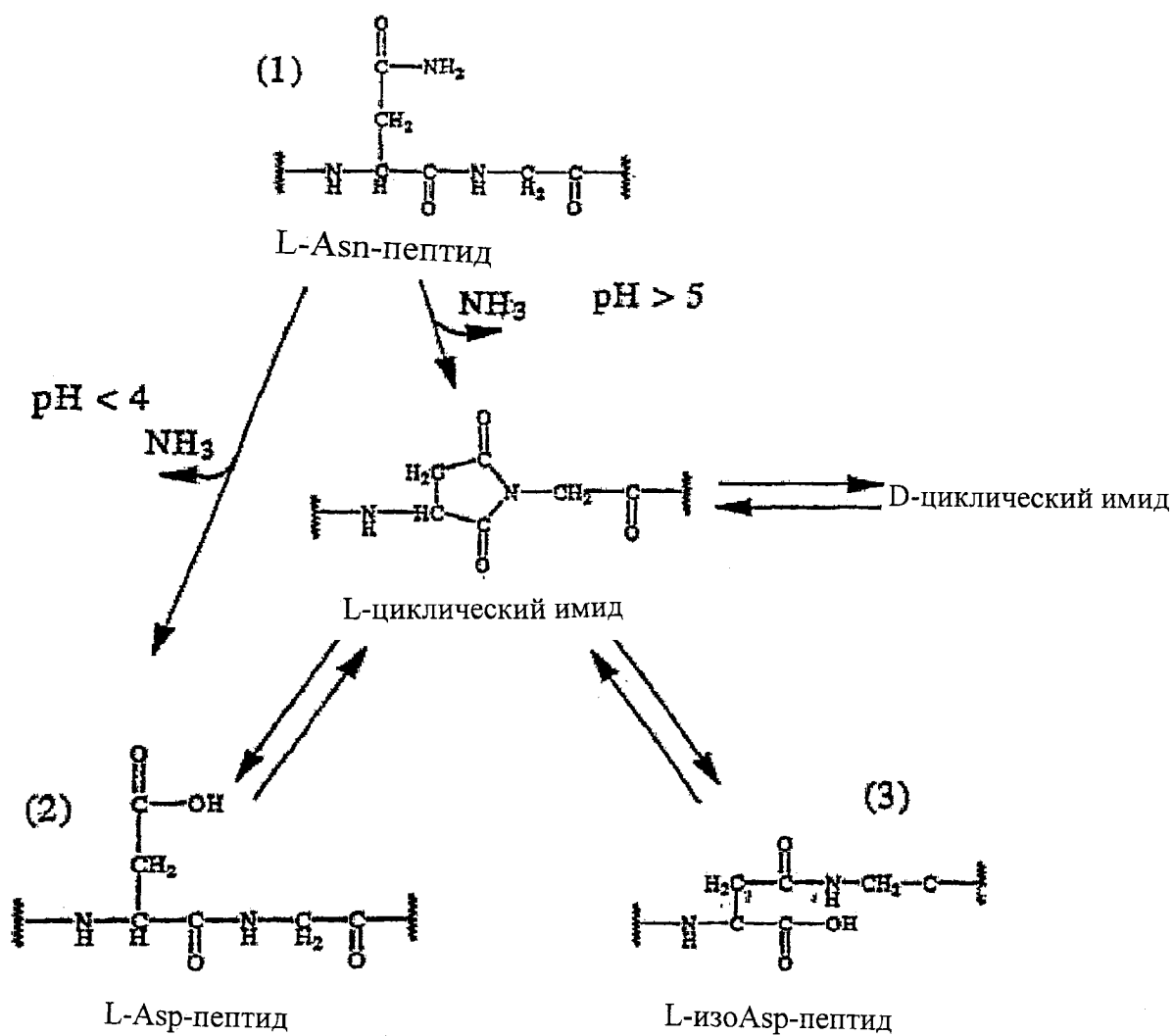
20. Способ по п.19, в котором жидкостная хроматография представляет собой обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (RP-HPLC).

21. Способ по п.20, в котором образец протеина является деамидированным $\text{INF-}\beta$.

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	LeuArgAsnPheTyr	PheIleAsnArgLeu
165	170	175	180
ThrGlyTyrLeuArg	Asn---		

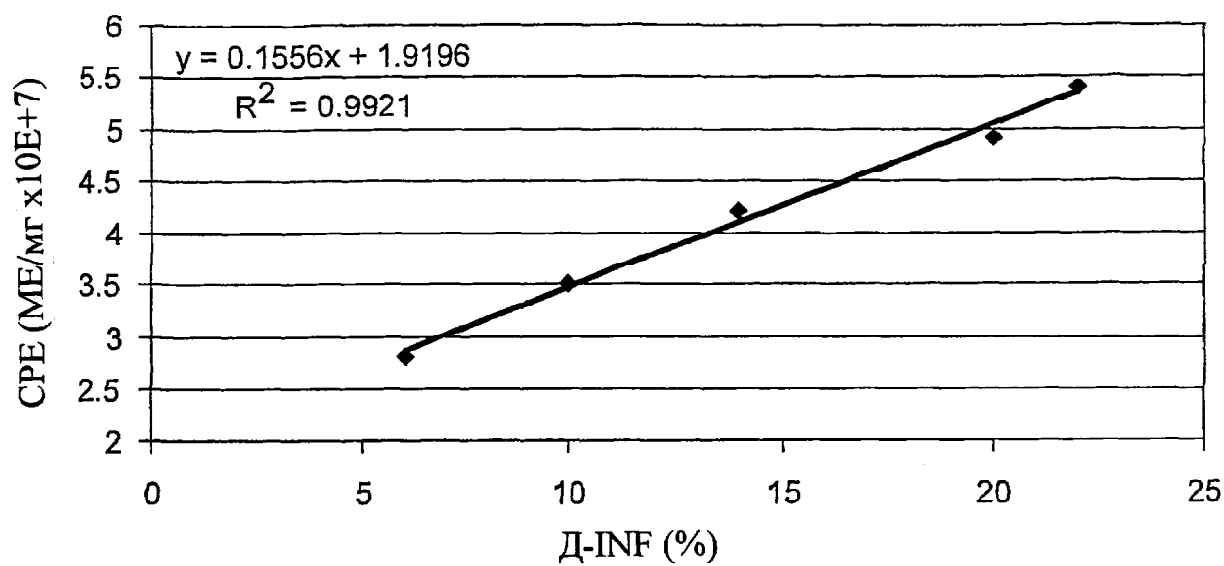
Фиг. 1

Путь деамидирования Asn



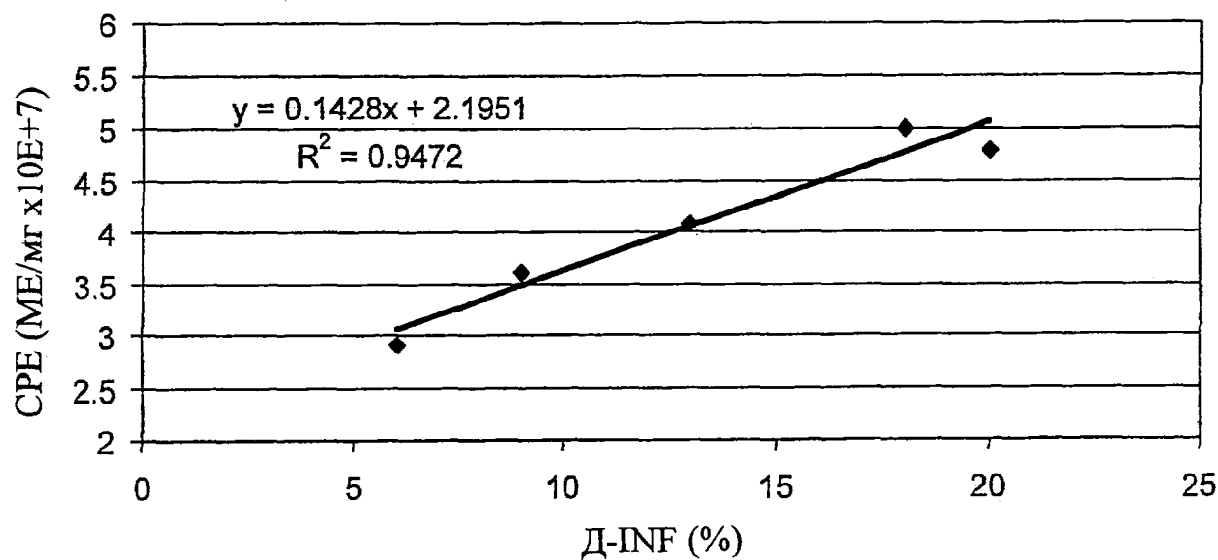
Фиг. 3

Не содержащий НА INF TA2040, 25С, 0-6 месяцев



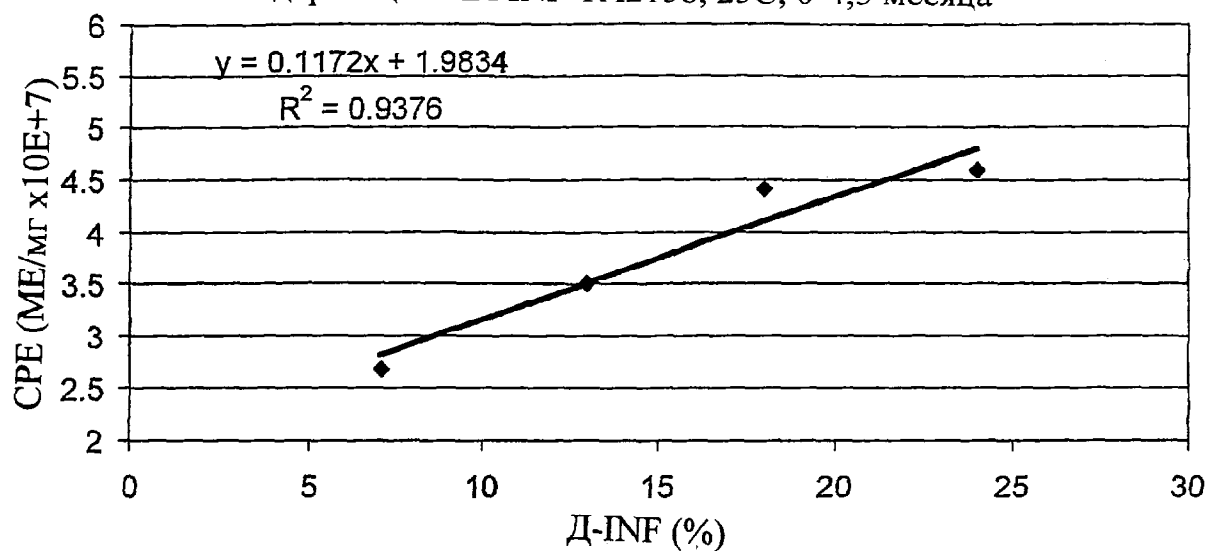
Фиг. 4

Не содержащий НА INF TA2085, 25С, 0-6 месяцев



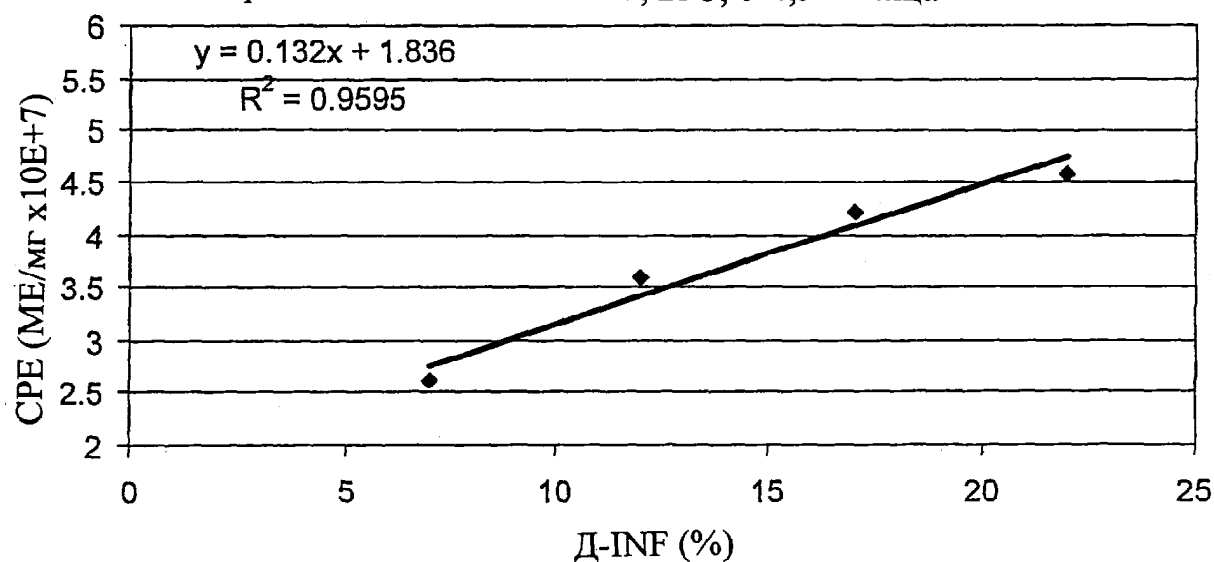
Фиг. 5

Не содержащий НА INF TA2158, 25С, 0-4,5 месяца



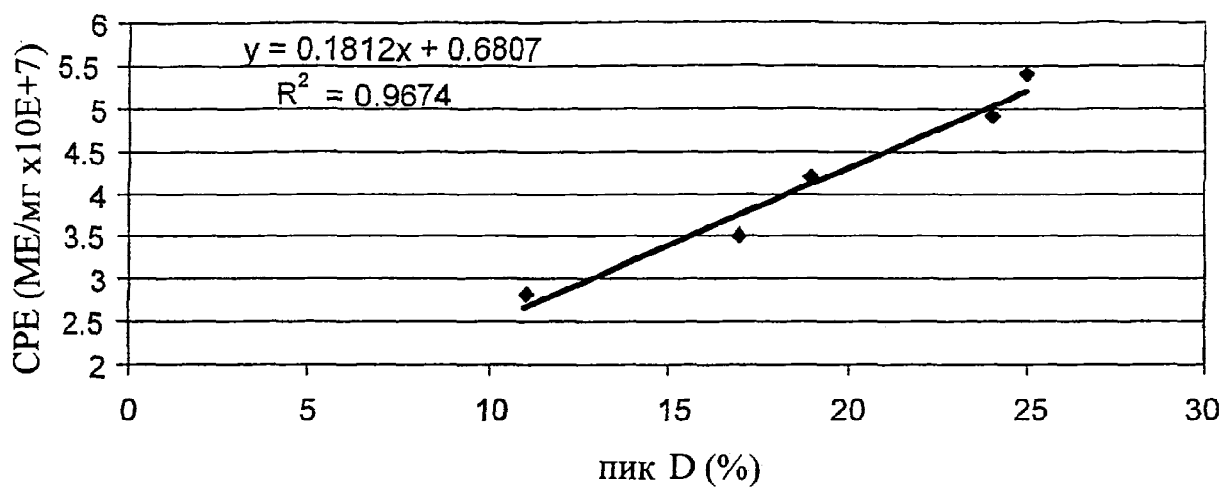
Фиг. 6

Не содержащий НА INF TA2451, 25С, 0-4,5 месяца



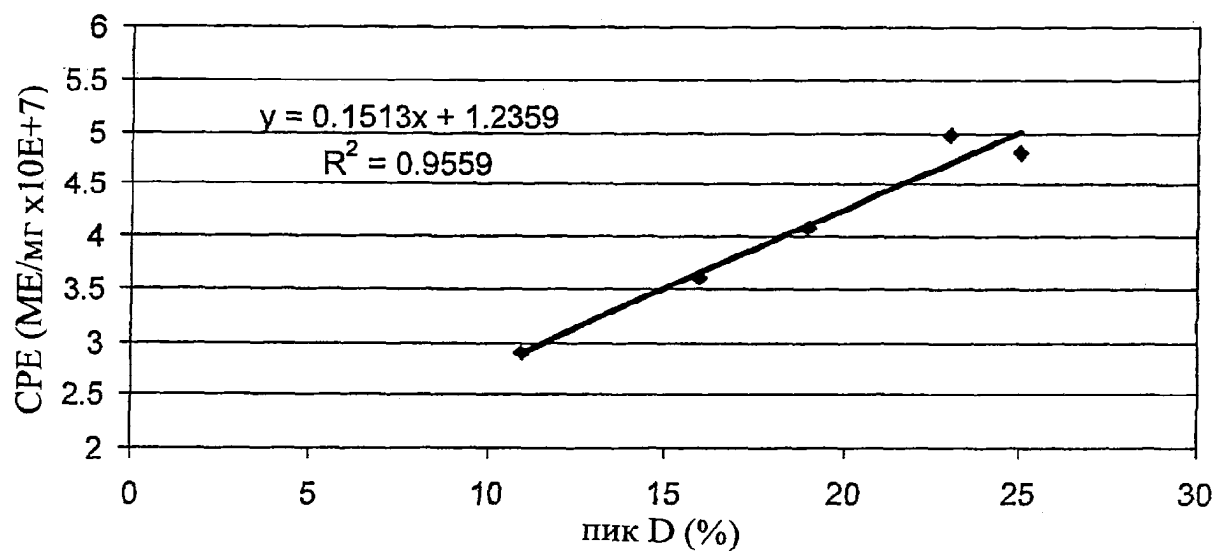
Фиг. 7

Не содержащий НА INF TA2040, 25С, 0-6 месяцев



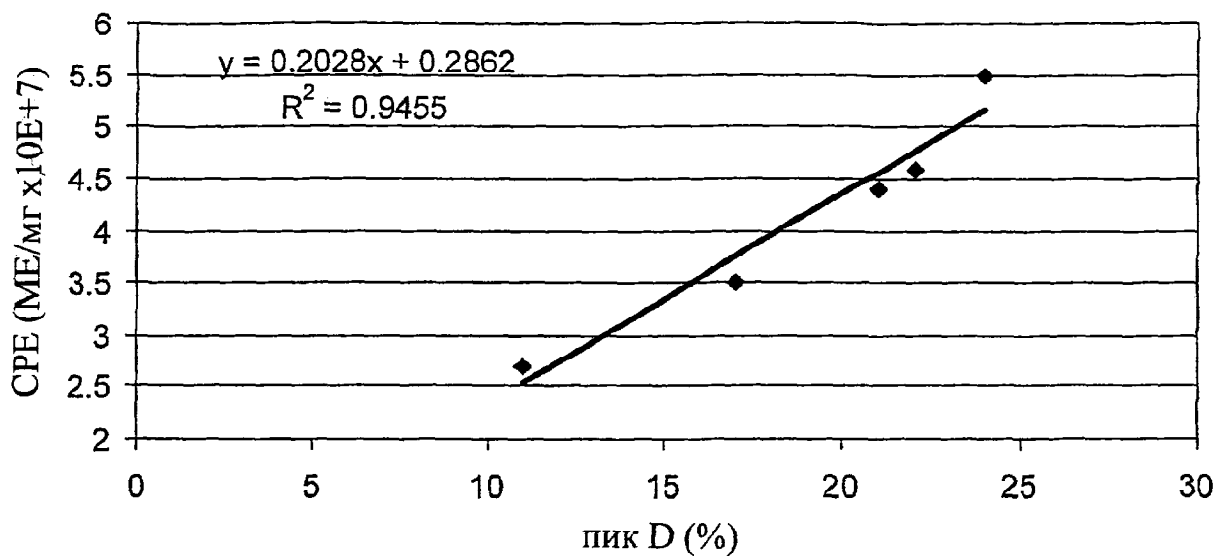
Фиг. 8

Не содержащий НА INF TA2085, 25С, 0-6 месяцев



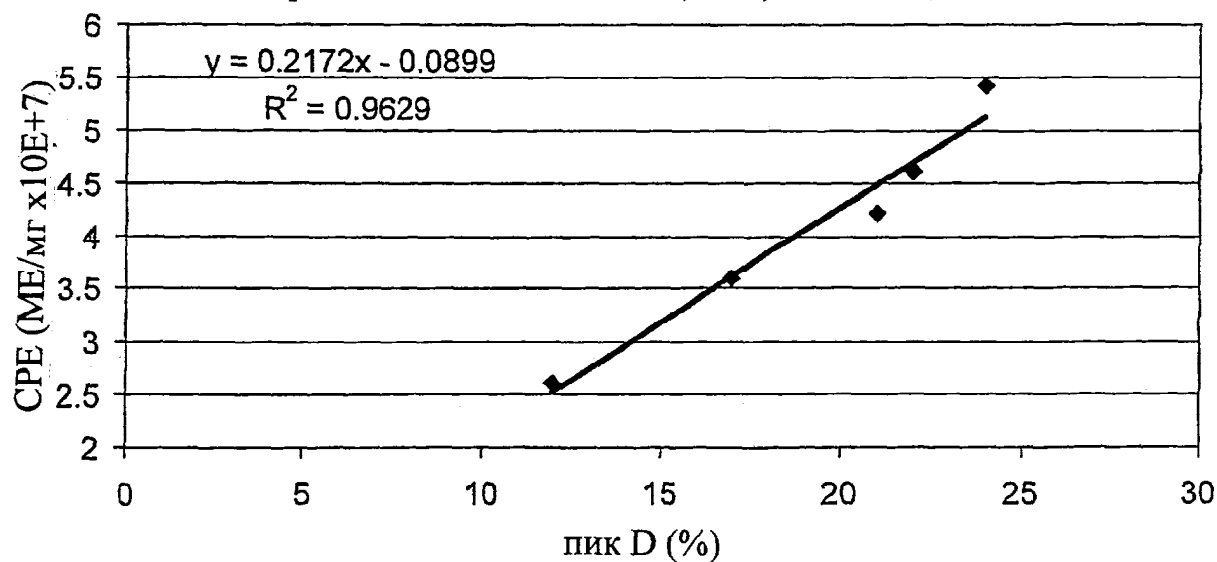
Фиг. 9

Не содержащий НА INF TA2158, 25С, 0-6 месяцев

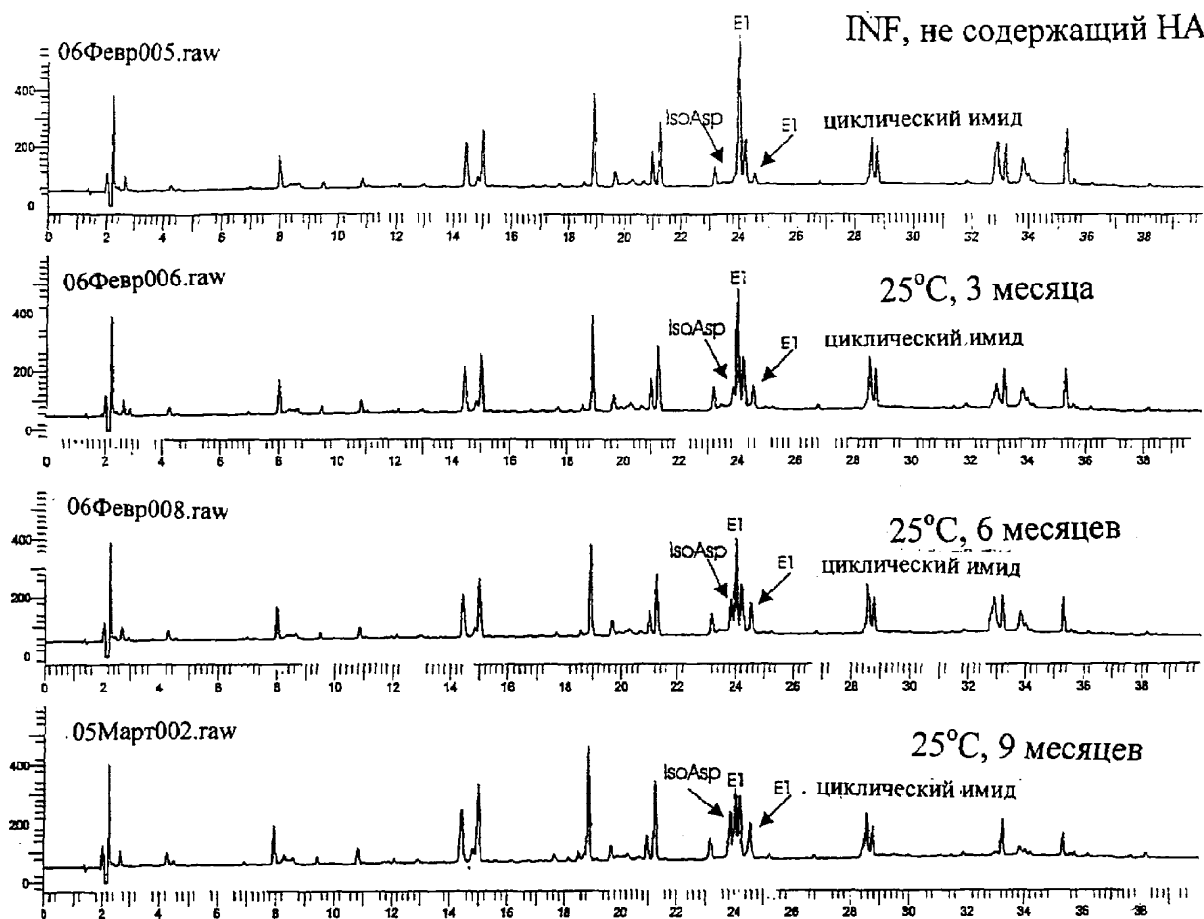


Фиг. 10

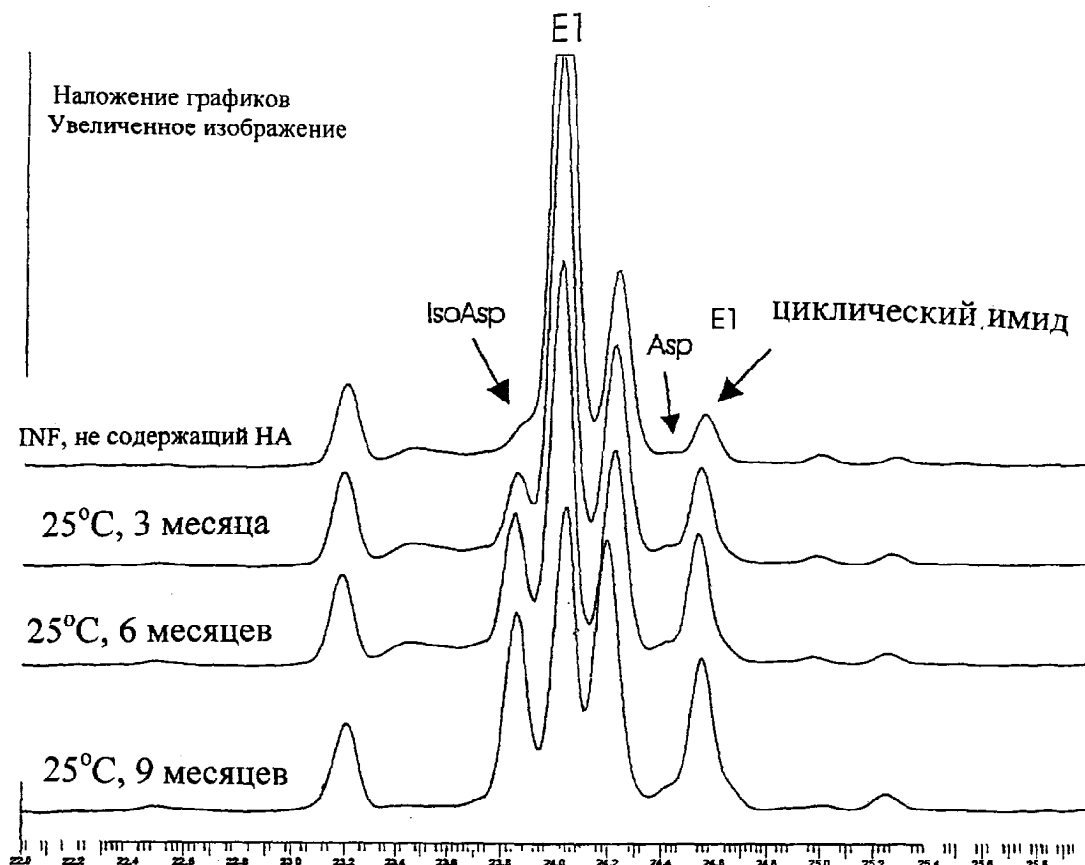
Не содержащий НА INF TA2451, 25С, 0-6 месяцев



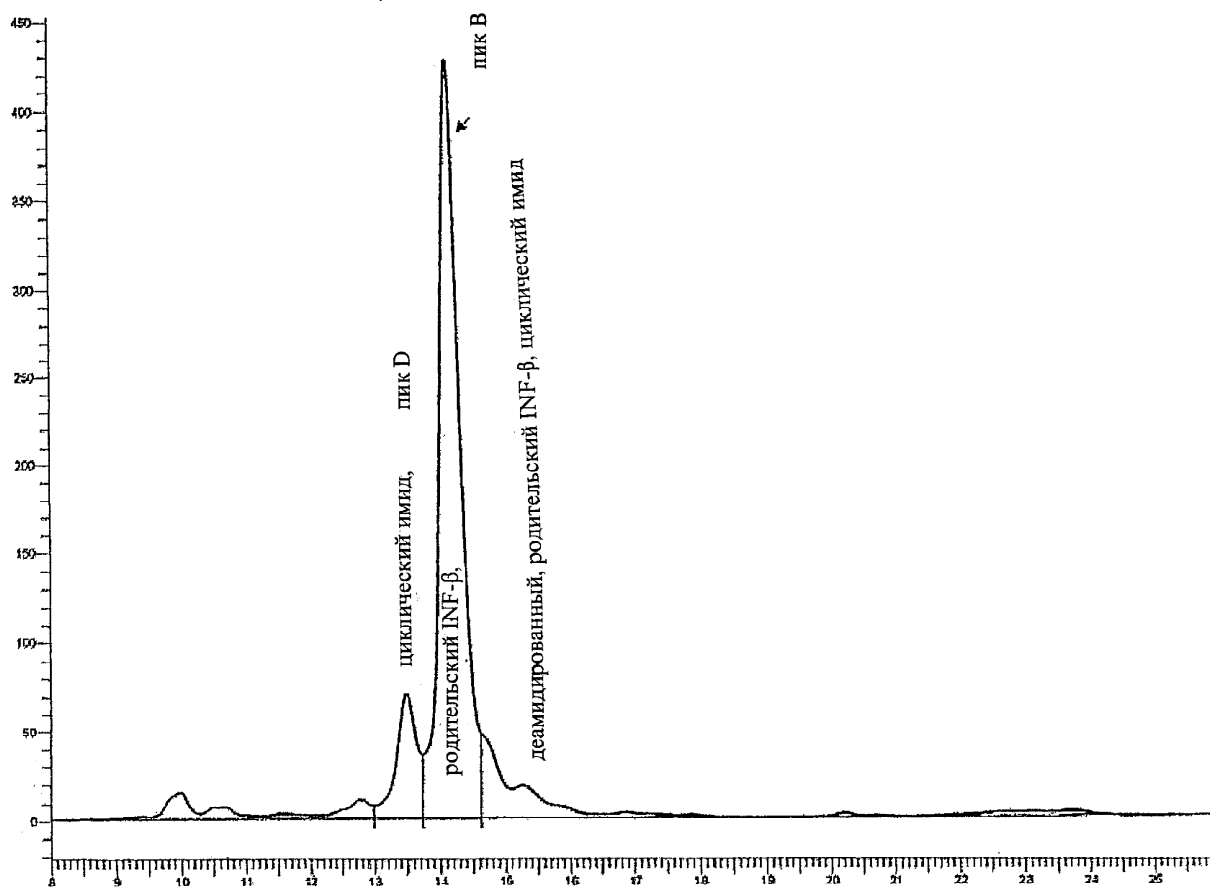
Фиг. 11



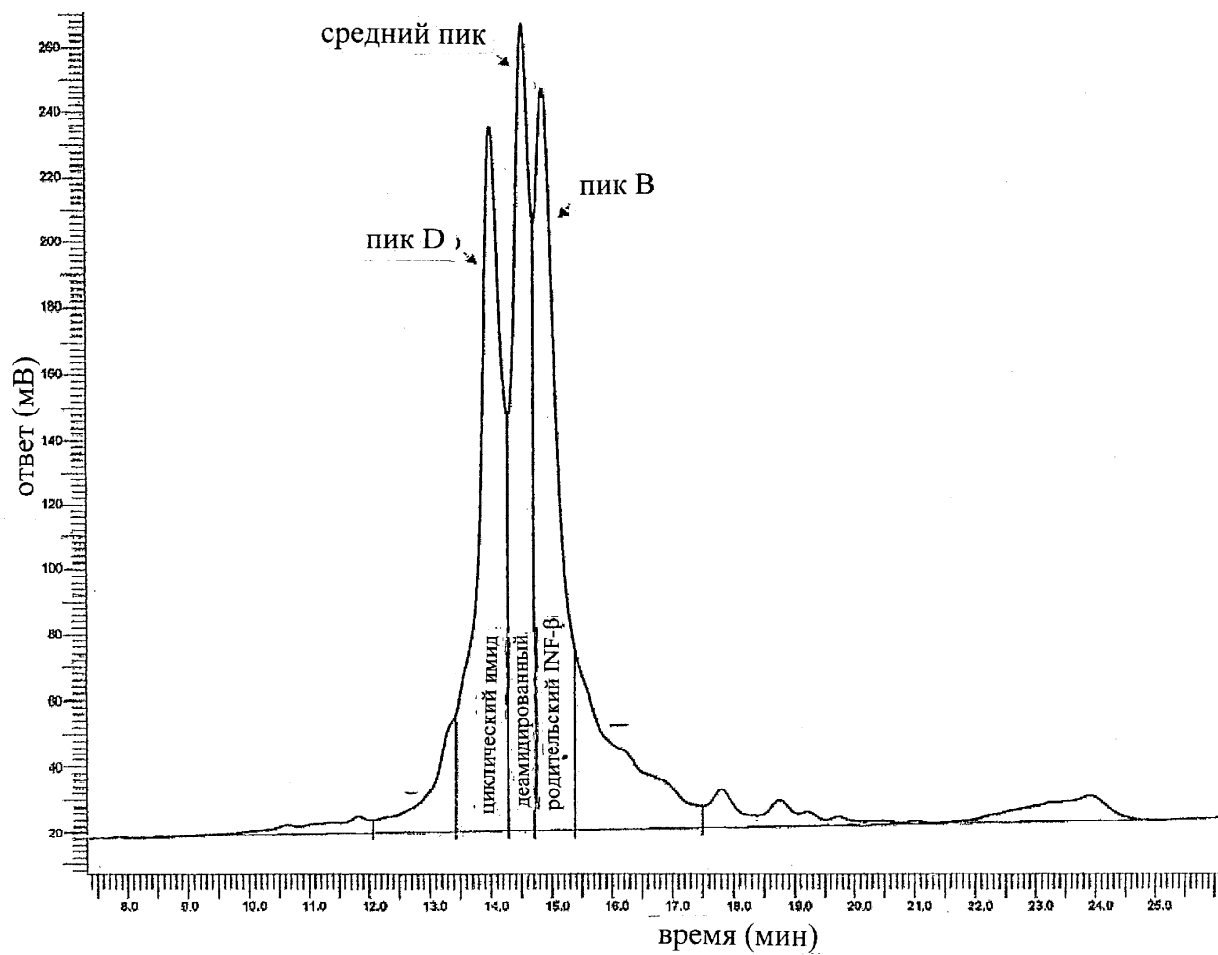
Фиг. 12А



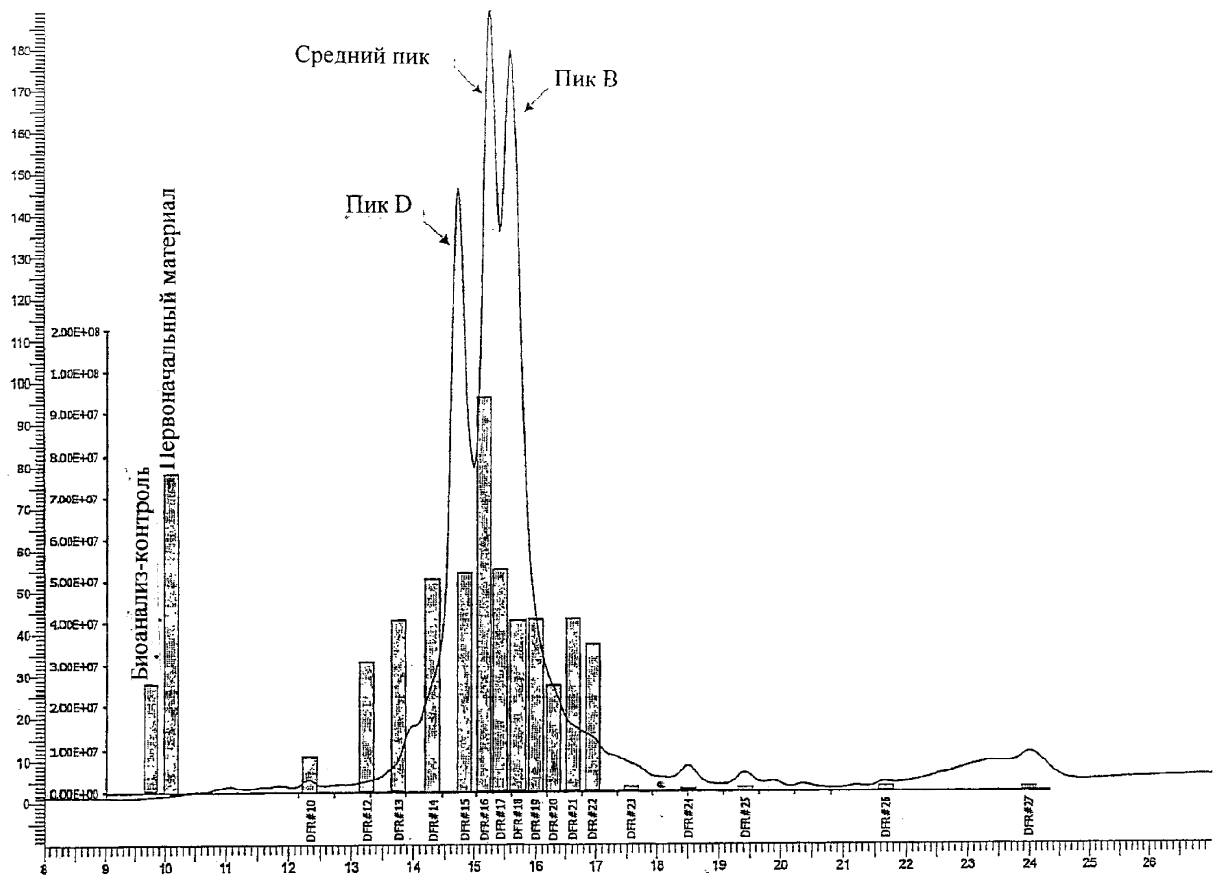
Фиг. 12В



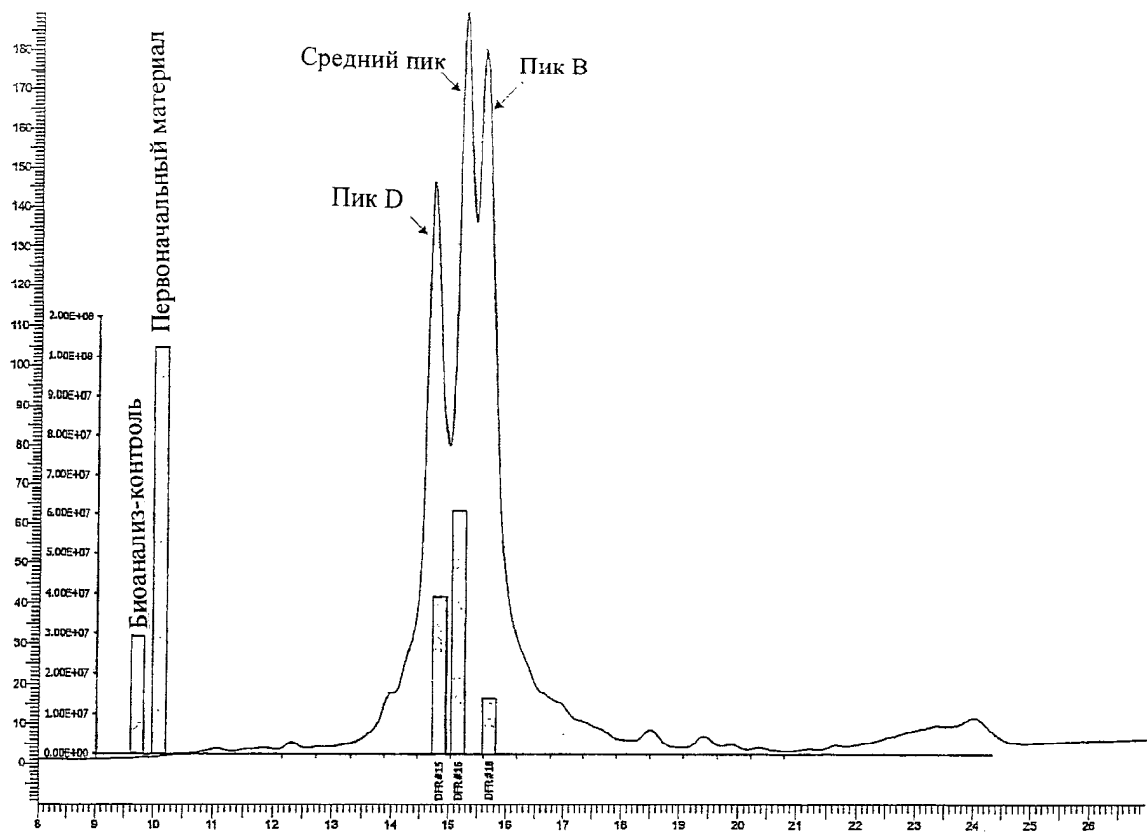
Фиг. 13



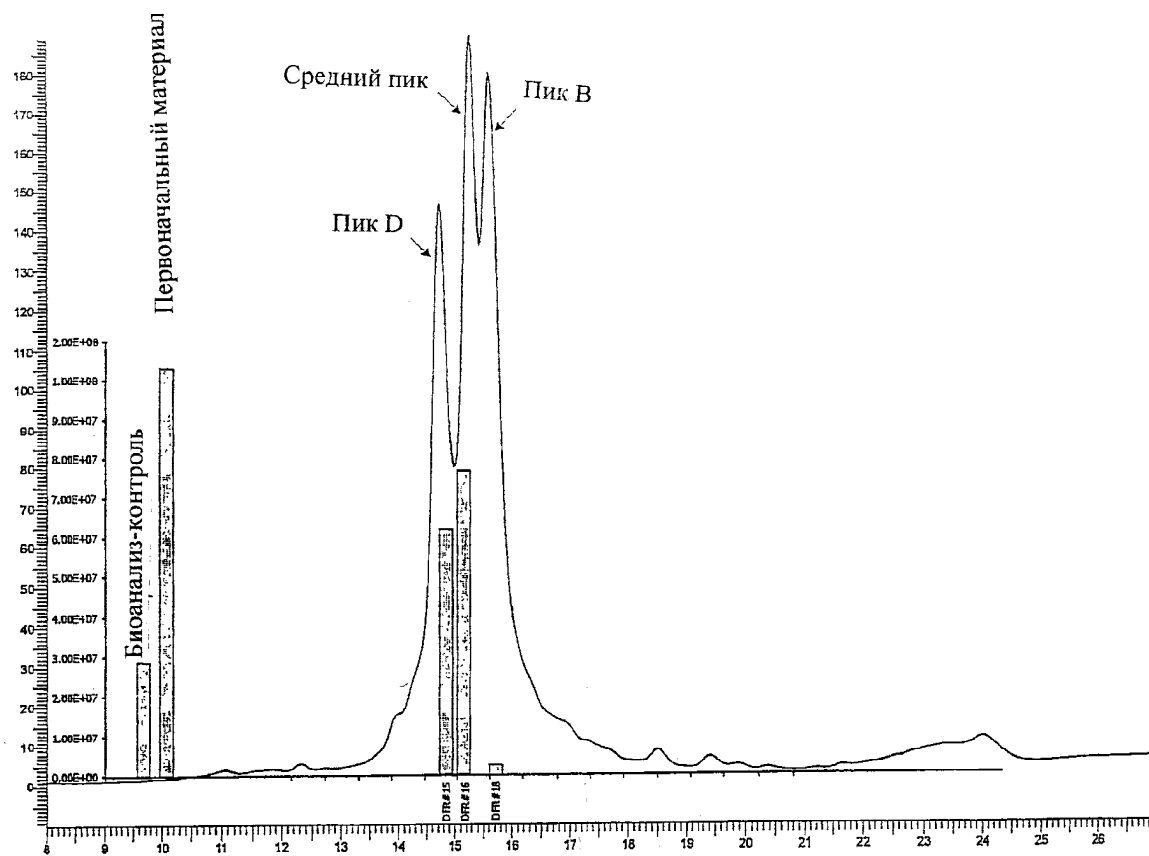
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16А



Фиг. 16В