

[19]中华人民共和国专利局

[11] 授权公告号 CN 1033035C



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 91103687.3

[51]Int.Cl⁶

[45]授权公告日 1996 年 10 月 16 日

C07K 14 / 56

[24]颁证日 96.7.12

[21]申请号 91103687.3

[22]申请日 91.6.4

[30]优先权

[32]90.6.4 [33]US[31]533,225

[73]专利权人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 保罗·赖歇特

杰拉尔德·S·哈蒙德 洪·V·李

A61K 38 / 21

塔坦纳哈里·L·纳加布胡山

保罗·P·特罗塔

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 姜建成 曹恒兴

权利要求书 0.5 页 说明书 3.5 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 制备干扰素 α -2晶体的方法

[57]摘要

公开了一种制备干扰素 α -2晶体的方法及其在贮库制剂中的应用。

权利要求书

1.一种制备结晶干扰素 α -2的方法,该方法包括:在能使干扰素 α -2溶液变得更浓从而形成干扰素 α -2结晶的条件下,使含有干扰素 α -2的第一硫酸铵溶液与一种抗衡硫酸铵溶液平衡,其中第一溶液中硫酸铵的初始浓度为约10%,首次形成结晶时第一溶液中干扰素 α -2的浓度为10-约80mg/ml;抗衡溶液中硫酸铵的初始浓度为约20%饱和度;第一溶液和抗衡溶液的pH均为约8.0;结晶过程在15°-37℃范围的温度下进行。

2.权利要求1的方法,其特征在于,干扰素 α -2的硫酸铵溶液含有缓冲剂。

3.权利要求2的方法,其特征在于,缓冲剂为磷酸钠。

4.权利要求3的方法,其特征在于,形成干扰素 α -2结晶时,干扰素 α -2溶液中硫酸铵的浓度为约12%-30%饱和度。

5.权利要求3的方法,其特征在于,形成干扰素 α -2结晶时,干扰素 α -2溶液中硫酸铵的浓度为约15%-25%饱和度。

人干扰素 α 是一类至少包含24个亚种的蛋白(Zoon K.C.,Interferon 9:1-12,1987,Gresser I.编.Academic Press,New York)。它们原来被描述为能够在细胞内诱导抗病毒状态的药剂,但现在被称为影响免疫系统许多功能的多效性淋巴激活素(Opdenakker等,Experimentia 45:513-520,1989)。除了其体外生物活性外,人干扰素 α 目前用于几种重要的指征,例如毛细胞性白血病、卡波济肉瘤、尖锐湿疣等,并正在研究将其用于其他几种指征(Intron A(干扰素 α -2b)Clinica l Status(1989))。这是从1989年9月在英国伦敦召开的第五届欧洲临床肿瘤学大会的一个附属讨论会上得来的进展。对结构的阐明及各种剂型的配制来说,最为重要的是要得到高度纯化的结晶态干扰素 α ,尤其是重组型 α -2b。

现已报道了两种形式的结晶人干扰素 α -2(Miller等,Science 215:689-690,1982;Kung等,美国专利4,672,108;Weissmann,“干扰素的克隆及其它错误”,Interferon 1981,Ion Gresser编,

Academic Press,New York,101-134;Weissmann,Phil. Trans. R. Soc. Lond., B299:7-28,1982;Nagabhusan等,“遗传工程 α -2干扰素的定性鉴定”,Interferon: Research, Clinical Application and Regulatory Consideration, Zoon等编,Elsevier,New York 79-88,1982)。这些出版物叙述了在低温下从聚乙二醇中结晶干扰素 α -2的方法,或者通过调节pH或温度而从磷酸盐缓冲液中结晶干扰素 α -2的方法。通常用这些方法得到的针状结晶,用X射线衍射技术难以准确鉴定其特性。Miller等人的文章还提到了“棱状”结晶干扰素 α -2。

一般来说,对干扰素这样的蛋白质进行结晶的方法是无法预言的。例如,Kung等人的美国专利4,672,108(1987)在第1栏第52-64行特别指出:

“现已建立了多种蛋白质结晶技术,但尚未发现通用的方法,因此许多蛋白质仍未结晶出来。所以,蛋白质的结晶是一门无法预言的技术,需要对许多可供选择的可能方法作反复试验。

应用最为广泛的方法之一,涉及在蛋白质溶液中加入一种结晶剂,通常是一种盐(例如硫酸铵或柠檬酸铵)或一种有机溶剂(例如乙醇或2-乙基-2,4-戊二醇)。但这些方法并未提供生产人白细胞干扰素结晶的合适手段。”(加了着重号)。

我们现已意外地发现了一种即使在室温下也能有效地产生高质量结晶干扰素 α -2的方法,该方法包括:使干扰素 α -2的溶液与一种硫酸盐溶液平衡,使干扰素 α -2溶液变得更浓,从而形成干扰素 α -2结晶。最好利用超滤法或透析法,或采用液滴(如悬滴或夹滴)来实现平衡。

干扰素 α -2的溶液最好含有一种硫酸盐,并且该溶液最好与浓度更高的硫酸盐溶液平衡。该硫酸盐优选铵盐、钙盐、镉盐、钾盐、铊盐、镁盐或钠盐,更为优选的是硫酸铵。开始形成结晶时硫酸盐在结晶干扰素 α -2溶液中的浓度最好为约12%至30%饱和,更为优选的是浓度为约15%至25%饱和的硫酸铵。如下面所指出的,平衡步骤开始时硫酸盐的浓度较低,即约2%至18%饱和。

优选的干扰素 α -2为干扰素 α -2b,更为优选的是人的重组结晶干扰素 α -2b。在一个实施方案中,结晶物为具有如下所示氨基酸顺序的干扰素 α -2b:

1 Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Ser Arg
 13 Arg Thr Leu Met Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile
 25 Ser leu Phe Ser Cys Leu Lys Asp Arg His Asp Phe
 37 Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Gly Asn Gln Phe Gln
 49 Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile
 61 Gln Gln Ile Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser
 73 Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe
 85 Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu
 97 Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr
 109 Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala Val Arg
 121 Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu
 133 Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg
 145 Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn
 157 Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser Lys Glu

也可采用干扰素 α -2a。干扰素 α -2a 的一级氨基酸顺序与上述干扰素 α -2b 顺序的不同之处在于, 23 位残基处由赖氨酸置换了精氨酸。

干扰素 α -2 的硫酸盐溶液最好含有一种缓冲液, 其 pH 为 6.5 至 8.5, 较为优选的是 7.3 至 8.0, 例如磷酸钠缓冲液。

由上述方法制得的结晶干扰素 α -2 可作为晶种而用于制备另一批结晶干扰素 α -2。

如前面所指出的, 本发明的方法包括: 使干扰素 α -2 的硫酸盐溶液与一种硫酸盐溶液平衡, 使结晶干扰素 α -2 溶液变得更浓, 从而形成干扰素 α -2 结晶。可以采用任何适宜的干扰素 α -2, 例如干扰素 α -2a 和干扰素 α -2b, 更为优选的是人的重组干扰素 α -2a (r-h-干扰素 α -2a) 或干扰素 α -2b (r-h-干扰素 α -2b)。商品 α -2 干扰素制剂可从 Hoffmann-La Roche 公司 (Roferon[®]) 和先灵公司 (Intron[®]A) 得到。含有各种 α -2 干扰素的纯净干扰素混合物可从 Burroughs-Wellcome 公司 (Wellferon[®]) 得到。鉴于人干扰素 α 中有高度的顺序同源性, 本发明的方法应对每一亚种都适用。

人干扰素 α -2 各亚种可通过重组 DNA 技术来制取, 也可以从天然来源 (如人外周血淋巴细胞、人类淋巴瘤细胞系) 纯化, 例如如 Pestka 等人所述 (Ann.Rev.Biochem.,56:727-777, 1987)。优选的干扰素 α -2 是具有上述氨基酸顺序的 r-h-干扰素 α -2b。

天然人干扰素 α 已从若干细胞来源中纯化出来, 其中包括从全血中分离出的白细胞、新生成纤

维细胞、类淋巴母细胞及各种白血病细胞系。首先应用于临床的人白细胞干扰素制剂是由芬兰的 K.Cantell 及其同事研制的, 他们的方法是: 将取自正常供血者的血液离心后注入干扰素, 加入仙台病毒进行诱导并离心。所得上清液用硫氰酸钾沉淀, 用乙醇提取, 经 pH 沉淀后对磷酸盐缓冲液透析 (K.E.Morgensen, L.Gantell, Pharmacol. Ther. 1: 369-381, 1977)。

重组干扰素 α 已由几个研究小组克隆出来并在大肠杆菌中表达 (例如 C.Weissmann 等, Science 209:1343-1349, 1980)。有几个研究小组描述了纯化重组 α -2 干扰素的方法, 该方法配合使用了一些层析步骤, 例如硫酸铵沉淀、染料亲和层析、离子交换和凝胶过滤, 例如如 Weissmann, C. 所述 (Phil.R.Soc.(Lond), b 299:7-28, 1982)。另一种纯化重组干扰素 α 的方法采用了免疫亲和层析法和固定化抗体 (P.P.Trotta 等, Developments in Industrial Microbiology, 72:53-64, Elsevier, Amsterdam)。有关用于重组 α 干扰素的现有纯化方案的综述, 参见 T.L.Nagabhushan 和 P.P.Trotta, 《Ullmann 工业化学大全》, A14, VCH, Weinheim (联邦德国), 372-374, 1989)。所用的干扰素 α -2b 最好用该综述所述的常规纯化方法纯化, 然后进行反相高效层析。

适宜的平衡方法包括透析、超滤, 例如透析, 或者利用液滴, 例如悬滴或夹滴。可以用浓度高于干扰素 α -2 的硫酸盐溶液的另一种硫酸盐溶液实现平衡。一种特别优选的方法是使 r-h-干扰素 α -2 的溶液与使用磷酸盐缓冲液的硫酸盐溶液平衡。平衡过程最好缓慢进行, 例如长达 2-30 天。

大规模的结晶可以用相当于蒸气扩散的方法来进行, 即利用透析和超滤。在临床制备过程中, 可以利用大规模结晶作为纯化或浓缩步骤。此外, 在这种操作中可以用其它常用硫酸盐代替硫酸铵。

结晶时, 即首次出现结晶时, 干扰素 α -2 在硫酸盐溶液中的终浓度可为约 10-80 毫克/毫升。更为优选的是, 干扰素 α -2 的浓度为约 30-50 毫克/毫升。干扰素 α -2 的起始浓度最好为约 20 毫克/毫升。

在结晶步骤开始前的起始阶段, 干扰素 α -2

溶液中硫酸盐的浓度可为约 2%-18% 饱和, 即, 硫酸盐的浓度为溶液达 100% 饱和时浓度的 2-18%。更为优选的是, 干扰素 α -2 溶液中硫酸盐的浓度为约 7%-15% 饱和。结晶步骤开始时抗衡溶液中硫酸盐的浓度为约 12-30% 饱和, 更为优选的是约 15-25% 饱和。

干扰素 α -2 溶液和抗衡硫酸盐溶液的 pH 最好控制在约 6.5-8.5 的范围, 更优选的是约 7.3-8.0, 为此可采用任何合适的缓冲剂。例如可以采用磷酸钠、三(羟甲基)氨基甲烷盐酸盐或 N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)缓冲剂。

结晶过程最好在控温条件下进行。温度最好在约 15℃-37℃ 的范围内, 更为优选的是约 18℃-25℃。

由于本发明意外地在室温下产生结晶干扰素 α -2, 所以与在 4℃ 下用聚乙二醇得到的晶体相比具有突出的优点。现在已经有可能在室温下贮存和配制人干扰素 α -2 晶体。用加有 0.15M 氯化钠的 20mM 磷酸钠 (pH7.5) 缓冲液透析可以使该晶体溶解。此外, 由于硫酸盐溶液比聚乙二醇更容易用透析等方法除去, 可以在重新溶解后用本发明的方法得到更纯的干扰素 α -2 结晶。

用本发明方法制得的结晶干扰素 α -2 将构成各种药物制剂的基础。例如, 该结晶干扰素可应用于缓释制剂。例如能够以相当于 0.1-1.0 微克/千克体重的日剂量释放的贮库制剂。采用用本发明方法制得的晶体的贮库制剂, 其溶解速度应大大低于含有在 4℃ 下制得的晶体的制剂。特别是, 室温 (22℃) 晶体的温度敏感性应低于要求较低结晶温度的晶体。

此外, 可以使人干扰素 α -2 与金属形成配合物, 然后再用本发明的方法结晶。这样一种配合物的结晶同样可以用于缓释制剂。用于缓释制剂中的金属离子-蛋白配合物的例子在先有技术中已有描述。转让给 Novo Terapeutisk Laboratorium A/S 的美国专利 2, 882, 203, 描述了将氯化锌加入无菌胰岛素溶液中而制得的锌和胰岛素的配合物。这种配合物的结晶悬浮液的作用时间比非结晶制剂长 4-6 倍 (《Remington 药理学》, Gennaro, A.R. 编, Mack Publishing Co., Easton, Penn. 17:975-976, 1985)。许多制造厂

家以不同的形式销售锌-胰岛素配合物, 例如: 长效胰岛素 (Squibb)、超长效胰岛素 (Lilly) 和超长效胰岛素/超缓 (Squibb-Novo)(出处同上)。鱼精蛋白锌胰岛素是胰岛素 (锌-胰岛素) 和一种碱性蛋白 (Salmiridin) 的结晶产物。该产物以几个不同的商品名制造: NPN-Iletin (Lilly)、Insulated (Leo) 和 Novolin N (Squibb-Novo) (《制药大全》, Sittig, M. 编, 1: 820-822, 1988)。可以用美国专利 2, 882, 203 所述的方法形成锌-干扰素 α -2 配合物。可用本发明的方法使干扰素 α -2-锌配合物结晶。用适当的添加剂 (如对羟基苯甲酸甲酯、氯化钠和乙酸钠) 配成的结晶悬浮液 (含有大小均匀的晶体) 可用于皮下注射。

用本发明的方法制备的结晶干扰素 α -2, 可以按与现有的干扰素 α -2 材料用于药物制剂时的方式大体相同的方式使用, 例如制成干扰素 α -2 的贮库制剂, 这种制剂可设计成结晶干扰素 α -2 的日剂量为约 0.1-1.0 微克/千克。这种制剂含有生理有效量的结晶干扰素 α -2 及常规药用载体。

这里所公开的发明用下列实施例来举例说明, 但不应误认为是限制发明范围。本发明范围内的另一些方法对本领域技术人员来说也将是显而易见的。

所采用的干扰素 α -2 为如 Weissmann 等人所述 (Science 209:1343, 1980) 在大肠杆菌中表达的重组人干扰素 α -2b。按照 Leibowitz, P. 等人的美国专利 4, 315, 852 (1982) 以前所报道的方法对细胞进行培养、收集和提取。所得到的提取液用一系列常规纯化步骤进行纯化: 乙醇提取、基质凝胶蓝色配体亲和层析、离子交换和凝胶过滤层析。所得到的纯化干扰素 α -2b 制备物用反相 HPLC 法用 Rainin Auto Prep 层析系统进一步纯化。纯化出的干扰素 α -2b (50 毫克) 在 Rainin (4.1 × 250 厘米) C₄300 埃柱上进行层析, 该柱已顶先用 27% 乙腈、0.1% 三氟乙酸 (TFA) 平衡。用 27%-72% 乙腈、0.1% TFA 的线性梯度以 40 毫升/分洗脱 30 分钟, 从柱中洗脱出干扰素 α -2b。用一台串联的 Knauer 紫外检测器在 280 纳米处进行检测, 根据所得出的光吸收曲线收集洗脱出的各部分。

采用悬滴、落滴或夹滴技术, 用蒸气扩散法实现结晶。悬滴蒸气扩散实验在 24 孔组织培养皿

(Becton Dickinson 公司, Lincoln park, NJ)中进行。夹滴实验在蛋白质结晶皿 Crystalplate (Flow Laboratories, McLean, VA)中进行。落滴蒸气扩散实验在 MVD/24 多室蒸气扩散皿 (Crychem 公司, Riverside, CA)中进行。

进行悬滴实验时, 取 10 微升含有 20 毫克/毫升蛋白质、10%水饱和的硫酸铵、40mM 磷酸钠 (pH8.0) 的液滴, 使其从扣在 Linbro 组织培养皿上的硅化盖玻片上悬下。使这些液滴与 1 毫升 20%饱和的硫酸铵、40mM 磷酸钠 (pH8.0) 平衡。在 22℃下保温 4-15 天后出现棱状大单斜晶 (0.5×0.5×0.5 毫米)。用类似的溶液和实验条件进行落滴和夹滴实验。这些晶体在进行 X 射线衍射分析时很稳定, 衍射分辨率为 6Å。用不同批次的晶体进行 X 射线分析得到一致的形态学结果。这是首次报道干扰素 α -2 的 X 射线衍射图案。

进行 X 射线研究时, 把晶体装在玻璃毛细管中, 在 22℃下用回摆相机利用由 Rigaku RU-300 旋转阳极发生器发出的 $\text{CuK}\alpha$ 辐射进行拍照。阳极发生器的操作电压为 40KV, 电流为 100mA。在 Nicolet X-100A 特定范围放射线检测器上用相同的辐射源读取原始数据。

定性鉴定

1. 生物测定

用注射器从悬滴中吸出分散的结晶, 然后在 22℃下重新悬浮于 100 微升由 35%饱和的硫酸铵、40mM 磷酸钠 (pH8.0) 组成的洗涤液中。将该悬浮液离心, 用巴氏吸管吸出洗涤液。将洗涤过的结晶在 22℃下重新溶解于 100 微升 20mM 磷酸钠 (pH7.5)、0.15M 氯化钠中。

用经过修改的 Bradford 测定法测定蛋白质, 用纯净的人干扰素 α -2b 作参考标准。用细胞病抑制测定法, 利用人包皮二倍体成纤维细胞和脑心肌炎病毒 (ATCC-VR-129) 测定抗病毒活性。该测定法的详细叙述见 S.Rubinstein、P.C.Familletti 和 S.pestka, J.Virol.37:755-758, 1981。重新溶解后得到的溶液的比活为 2.0×10^8 国际单位/毫克。此数值在该测定法的误差范围内与对结晶前的原始干扰素 α -2b 制备物所预计的数值相同 (一般在 1×10^8 - 3×10^8 国际单位/毫克范围内)。

2. HPLC

对一个重新溶解的干扰素晶体样品进行分析高

效液相层析 (HPLC) (Waters Ass.Milford, MA)。将样品加到 Rainin Dynamax C₄300 埃柱 (4.6×250 毫米) 上, 然后用含 0.1% 三氟乙酸的 27-72%乙腈线性梯度洗脱 30 分钟。用灵敏度为 0.02 吸收单位的 Gilson 可变波长检测器在 280 纳米处监测流出液。重新溶解的晶体溶液和结晶前的原始干扰素 α -2b 制备物的保留时间和层析图谱都相同。

3. SDS-PAGE 分析

用 Laemmli, U.K. (Nature 227:680, 1970) 所述的单向 15%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (SDS-PAGE), 对结晶前后的干扰素 α -2b 进行比较。当样品在同一凝胶上的平行泳道中进行比较时, 相对迁移率没有变化。

由以上的 1、2 和 3 可以明显看出, 没有任何理由认为蛋白质在结晶或再生过程中发生了任何化学变化或任何变性。

虽然已结合上述具体实施方案叙述了本发明, 但许多变换、修改和变动对本领域普通技术人员来说都将是显而易见的。所有这些变换、修改和变动都将落在本发明的要旨和范围内。