[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
A61K 47/18
A61K 38/21
A61K 9/08
A61K 31/12

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97181499.6

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1222315C

[22] 申请日 1997.12.23 [21] 申请号 97181499.6
[30] 优先权
[32] 1996.12.24 [33] US [31] 60/034,353
[86] 国际申请 PCT/US1997/023817 1997.12.23
[87] 国际公布 WO1998/028007 英 1998.7.2
[85] 进入国家阶段日期 1999.7.21
[71] 专利权人 拜奥根有限公司
地址 美国马萨诸塞州
[72] 发明人 M·D·迪比西 M·斯泰普斯
李文莉 E·沙林
审查员 张 伟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 李华英

权利要求书 5 页 说明书 30 页 附图 3 页

[54] 发明名称 稳定的液体干扰素制剂

[57] 摘要

描述了 pH 在 4.0 与 7.2 之间的液体干扰素组合物。该组合物包含 β－干扰素和约 0.3 至 5 重量%的一种稳定剂，该稳定剂是氨基酸，其选自酸性氨基酸、精氨酸和甘氨酸。如果需要的话，加入盐以提供足够的离子强度。该液体组合物预先不经过冻干，预先也不被空化。该液体优选包含在一个容器中，该容器具有至少一个与该液体接触的表面，该表面涂有一种对 β－干扰素的吸附作用显惰性的材料。也描述了一种用于液体干扰素制剂胃肠外给药的试剂盒和一种用于稳定液体干扰素组合物的方法。

ISSN1008-4274

1.一种液体组合物，其中所述组合物包含干扰素和选自酸性氨基酸、精氨酸和甘氨酸的氨基酸稳定剂，并包含有机酸或磷酸盐缓冲液以维持其 pH 在 4.0 至 7.2 之间；其中所述氨基酸稳定剂存在的量为 0.3%-5%重量/体积；并且其中该液体组合物没有从冷冻干燥的干扰素重构，并且该液体组合物不被进一步冷冻干燥。

2.权利要求 1 的液体组合物，其中氨基酸稳定剂选自精氨酸和甘氨酸，并且其中液体组合物不含有血清白蛋白。

3.权利要求 1 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，该容器至少一个与液体组合物接触的表面涂有对干扰素显惰性的材料。

4.权利要求 1 的液体组合物，其中的干扰素是β-干扰素或重组生成的干扰素。

5.权利要求 1 的液体组合物，其中所述组合物的 pH 为 4.8 至 5.2。

6.权利要求 5 的液体组合物，其中所述组合物的 pH 为 5.0。

7.权利要求 5 的液体组合物，其中的酸性氨基酸是谷氨酸。

8.权利要求 1 的液体组合物，其中的精氨酸是精氨酸-HCl。

9.权利要求 1 的液体组合物，其中所述组合物的干扰素浓度在 6 MIU 和 50 MIU 之间。

10.权利要求 1 的液体组合物，其中所述组合物的干扰素浓度在每剂量 6MIU 和 50MIU 之间。

11.权利要求 1 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，该容器至少一个与液体组合物接触的表面涂有对干扰素显惰性的材料，其中所述的容器的至少一个表面涂有一种选自聚硅氧烷和聚四氟乙烯的材料。

12.权利要求 1 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，该容器至少一个与液体组合物接触的表面涂有对干扰素显惰性的材料，其中所述的容器的至少一个表面涂有一种选自聚硅氧烷

和聚四氟乙烯的材料，其中的容器是注射器。

13.权利要求 1 的液体组合物，其中所述缓冲液 pH 为 5.0，所述干扰素为β-干扰素，所述氨基酸稳定剂为 170mM L-谷氨酸。

14.权利要求 1 的液体组合物，进一步包含一种盐，其中的氨基酸稳定剂为甘氨酸。

15.权利要求 13 的液体组合物，进一步包含至少一种选自 15mg/ml 人血清白蛋白和 0.1%重量/体积普流罗尼 F-68 的成分。

16.权利要求 1 的液体组合物，其中的缓冲液是 pH 7.2 的 20mM 磷酸盐缓冲液；其中所述干扰素为β-干扰素，氨基酸稳定剂选自：(a) 140mM 精氨酸；和(b) 100mM 氯化钠与 70mM 甘氨酸的混合液。

17.权利要求 16 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，其中该容器的至少一个与该液体组合物接触的表面涂有一种选自聚硅氧烷和聚四氟乙烯的材料。

18.权利要求 17 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，其中该容器的至少一个与该液体组合物接触的表面涂有一种选自聚硅氧烷和聚四氟乙烯的材料，其中的容器是注射器。

19.权利要求 1 的液体组合物，其中的缓冲液是 pH 在 4.0 至 6.0 范围内的缓冲液，其中的干扰素为β-干扰素，该液体组合物适合于对哺乳动物的胃肠外给药。

20.权利要求 19 的液体组合物，所述液体组合物被包含在一个容器中，该容器至少一个与液体组合物接触的表面涂有对干扰素显惰性的材料。

21.权利要求 20 的液体组合物，其中该贮存容器没有含氧/液体界面。

22.权利要求 20 的液体组合物，其中所述β-干扰素在包装在容器中之前和包含在容器中的过程中不接受空化作用。

23.权利要求 19 的液体组合物，其中的缓冲液是一种有机酸缓冲液，其选自柠檬酸盐、琥珀酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、草酸盐、乳酸盐和乙酸盐缓冲液。

24.权利要求 19 的液体组合物，其中该液体组合物的 pH 在 4.5 至 5.5 的范围内。

25.权利要求 19 的液体组合物，其中该液体组合物的 pH 为 5.0。

26.权利要求 19 的液体组合物，其中所述组合物是无菌的。

27.权利要求 19 的液体组合物，其中所述组合物是等渗于血液的。

28.权利要求 19 的液体组合物，其中的β-干扰素是人重组β-干扰素。

29.权利要求 28 的液体组合物，其中该人重组β-干扰素的活性在 6 至 50 MIU 的范围内。

30.权利要求 1 的液体组合物，其中的氨基酸稳定剂存在的量为 0.3 至 3.13%重量/体积，其中该液体组合物是被冷冻的。

31.一种液体药物组合物，包含（a）干扰素，（b）乙酸盐缓冲液，和（c）精氨酸；其中组合物的 pH 为 4.0-6.0；其中组合物不含有血清白蛋白；并且其中该组合物没有从冷冻干燥的干扰素重构，并且该液体组合物不被进一步冷冻干燥。

32.权利要求 31 的液体药物组合物，其中的精氨酸为精氨酸-HCl。

33.权利要求 31 或 32 的液体药物组合物，其中的干扰素为β-干扰素。

34.权利要求 33 的液体药物组合物，其中的干扰素浓度为 6MIU-50MIU。

35.权利要求 33 的液体药物组合物，其中的干扰素浓度为每剂量 6MIU-50MIU。

36.权利要求 31-35 任一项的液体药物组合物，其中乙酸盐缓冲液浓度为 20mM。

37.权利要求 31-35 任一项的液体药物组合物，其中精氨酸或精氨酸-HCl 的浓度为 0.3%-5% 重量/体积。

38.权利要求 31-35 任一项的液体药物组合物，其中进一步包含表面活性剂。

39.权利要求 38 的液体药物组合物，其中的表面活性剂为 0.1%

重量/体积的普流罗尼 F-68。

40.权利要求 31-35 任一项的液体药物组合物，其中所述液体组合物具有的溶解氧的水平低于 30%空气平衡水平。

41.权利要求 40 的液体药物组合物，其中所述液体组合物具有的溶解氧的水平低于或等于 10%空气平衡水平。

42.一种在液体药物组合物中稳定干扰素的方法，该方法包括将：a)干扰素；b)用于将 pH 维持在 4.0 至 7.2 之间的有机酸或缓冲液；和 c)一种选自酸性氨基酸、精氨酸和甘氨酸的氨基酸稳定剂混合，其中所述氨基酸稳定剂的浓度为 0.3%-5% 重量/体积；并且其中该液体药物组合物没有从冷冻干燥的干扰素重构，并且该液体药物组合物不被进一步冷冻干燥。

43.权利要求 42 的方法，其中氨基酸稳定剂选自精氨酸和甘氨酸，并且其中该方法不涉及与血清白蛋白混合。

44.权利要求 42 的方法，所述液体药物组合物被包含在一个容器中，该容器至少一个与液体药物组合物接触的表面涂有对干扰素显惰性的材料。

45.权利要求 42 的方法，其中所述液体药物组合物被包含在一个容器中，其中干扰素在与容器接触之前或接触过程中不被空化。

46.权利要求 42 的方法，其中的干扰素是β-干扰素或重组生成的干扰素。

47.权利要求 42 的方法，其中缓冲液的 pH 为 4.8-5.2。

48.权利要求 47 的方法，其中缓冲液的 pH 为 5.0。

49.权利要求 42 的方法，其中的精氨酸是精氨酸-HCl。

50.权利要求 42 的方法，其中所述组合物的干扰素浓度在 6 MIU 和 50 MIU 之间。

51.权利要求 44 的方法，其中所述的容器的至少一个表面涂有一种选自聚硅氧烷和聚四氟乙烯的材料。

52.权利要求 51 的方法，其中的容器是注射器。

53.权利要求 42 的方法，其中的液体组合物中进一步包含 pH7.2

的 20mM 磷酸盐缓冲液，其中的氨基酸稳定剂选自（a）140mM 精氨酸，和（b）100mM 氯化钠与 70mM 甘氨酸的混合液。

54.权利要求 53 的方法，所述液体药物组合物被包含在一个容器中，其中该容器的至少一个与该液体组合物接触的表面涂有一种选自聚硅氧烷和聚四氟乙烯的材料。

55.权利要求 54 的方法，其中的容器是注射器。

56.一种在液体药物组合物中稳定干扰素的方法，该方法包括将：（a）干扰素，（b）用于将 pH 维持在 4.0-6.0 之间的乙酸盐缓冲液，和（c）精氨酸混合；其中组合物的 pH 在 4.0-6.0 之间，该液体药物组合物没有从冷冻干燥的干扰素重构，并且该液体药物组合物不被进一步冷冻干燥。

57.权利要求 56 的方法，其中的精氨酸是精氨酸-HCl。

58.权利要求 56 或 57 的方法，其中所述干扰素为β-干扰素。

59.权利要求 58 的方法，其中所述组合物的干扰素浓度在 6 MIU 和 50 MIU 之间。

60.权利要求 58 的方法，其中所述组合物的干扰素浓度在每剂量 6MIU 和 50MIU 之间。

61.权利要求 56 或 57 的方法，其中乙酸盐缓冲液的浓度为 20mM。

62.权利要求 56 或 57 的方法，其中精氨酸或精氨酸-HCl 的浓度为 0.3%-5% 重量/体积。

63.权利要求 56 或 57 的方法，进一步包括与表面活性剂混合。

64.权利要求 63 的方法，其中的表面活性剂为 0.1% 重量/体积的普流罗尼 F-68。

65.权利要求 56 或 57 的方法，所述方法不包括与血清白蛋白混合。

66.权利要求 56 或 57 的方法，其中所述液体组合物被包含在一个容器中，其中干扰素在与容器接触之前或接触过程中不被空化。

67.权利要求 56 或 57 的方法，其中所述液体组合物被包含在一个容器中，并且在液体药物组合物与容器之间没有含氧液面。

稳定的液体干扰素制剂

发明领域

本发明涉及稳定人β-干扰素的方法和稳定的β-干扰素液体制剂。

发明背景

干扰素是具有多种生物活性的蛋白质，其中某些具有抗病毒、免疫调节和抗增生作用。它们是相对较小的、种特异性的单链多肽，在多种诱因作用下由哺乳动物细胞产生，例如病毒、多肽、促细胞分裂剂等等。干扰素保护动物组织和细胞不受病毒攻击，是一种重要的宿主防御机制。在大多数情况下，与其他类型的组织和细胞相比，干扰素对产生它们的组织和细胞种类提供更好的保护作用，这说明来源于人的干扰素在治疗人的疾病时应当比来自其他物种的干扰素更为有效。

人干扰素有几种不同类型，一般分为白细胞（α-干扰素）、成纤维细胞（β-干扰素）和免疫细胞（γ-干扰素），以及它们的大量变体。在各种教科书和专刊中可以找到有关干扰素的一般性讨论，包括：《干扰素系统》(W. E. Stewart, II, Springer-Verlag, N. Y. 1979)；和《干扰素疗法》（世界卫生组织技术报告丛书 676，世界卫生组织，日内瓦 1982），结合在此作为参考。

干扰素的给药方法是这种重要治疗剂的临床应用中的一个重要因素。通过静脉内、肌内或皮下注射而进行的全身性干扰素给药使用最为频繁，在一些疾患的治疗中取得了一定成功，例如多毛细胞白血病、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和相关的卡波济氏肉瘤。不过已知这类蛋白质的纯净形式尤其对降解敏感。对β-干扰素来说，溶液中干扰素降解的主要机制是聚集作用和脱酰胺作用。干扰素溶

液及其他产品在稳定性上的缺陷因此就限制了它的应用。

临床用的药物干扰素组合物通常含有干扰素的冻干（即冷冻干燥）制剂以及复合有机赋形剂和稳定剂，例如非离子型表面活性试剂（即表面活性剂）、各种糖类、有机多元醇和/或人血清白蛋白。冻干制剂具有需要复合包装的缺点，这是由于需要单独提供无菌的注射用水的缘故。而且，冻干制剂在使用前还需要若干操作，这就增加了在注射剂制备过程中被针刺伤和滴落成分的可能性。这些操作对肌肉无力和协调作用差的患者人群来说尤其是成问题的，例如患多发性硬化(MS)的人。MS 患者可以将干扰素自我给药，以使比目前的冻干产品更易于给药的剂型给患者人群目标带来重要的可利用价值。为了避免在使用冻干制剂时所必需的再制备操作，迫切需要干扰素的简单液体制剂。

含有干扰素的液体非冻干型制剂也可以含有复合载体，例如人血清白蛋白、多元醇、糖类和阴离子型表面活性稳定剂。例如参见 WO 89/10756（Hara 等，含有多元醇和对羟基苯甲酸酯）。

发明概述

本发明已经解决了上述问题，因为发现，人β-干扰素在置于 pH 约为 4 和 7.2 之间的缓冲溶液中时是可以被稳定的，该溶液含有氨基酸作为稳定剂，在某些情况下还含有盐（如果该氨基酸不含有一条带电侧链）。β-干扰素不是冻干的，而是一旦利用普通技术人员已知的方法从来源中制得，就直接包括在本发明的制剂中。

因此，本发明的一个方面是一种液体组合物，该组合物含有干扰素和约 0.3 至 5 重量%的稳定剂，该稳定剂是氨基酸，选自由酸性氨基酸、精氨酸和甘氨酸组成的组。液体组合物预先不经过冻干。在一个实施方案中，所述液体组合物是被冷冻的。而且，优选将该液体组合物包含在一种容器中，例如注射器，其中在该容器与液体接触的表面涂一层对干扰素呈惰性的材料，例如硅氧烷或聚四氟乙烯。优选的组合物包括在 pH 约为 4.0 至 7.2 的缓冲液中的β-干扰素或重组生成的干扰素，优选缓冲液 pH 为 4.8-5.2。本发明其他的制剂包括：

(1) pH 5.0 的 20mM 乙酸盐缓冲液，该缓冲液预先不经过冻干，其中该缓冲液包括β-干扰素加选自下列的成分：(a) 150mM 精氨酸-HCl；(b) 100mM 氯化钠和 70mM 甘氨酸；(c) 150mM 精氨酸-HCl 和 15mg/ml 人血清白蛋白；(d) 150mM 精氨酸-HCl 和 0.1%普流罗尼(Pluronic) F-68；(e) 140mM 氯化钠；(f) 140mM 氯化钠和 15mg/ml 人血清白蛋白；和(g) 140mM 氯化钠和 0.1% Pluronic F-68；

(2) pH 5.0 的液体，该液体包括β-干扰素、170mM L-谷氨酸和 150mM 氢氧化钠，该液体预先不经过冻干；

(3) pH 7.2 的 20mM 磷酸盐缓冲液，该缓冲液预先不经过冻干，其中该缓冲液包括β-干扰素加选自下列的成分：(a) 140mM 精氨酸-HCl；和(b) 100mM 氯化钠和 70mM 甘氨酸。

本发明的另一个实施方式是用于液体干扰素制剂胃肠外给药的试剂盒。该试剂盒包含一个含有 pH 为 4 至 6 的液体制剂的容器，该液体含有预先不经过冻干的药学有效量的β-干扰素，和大约或少于 5 重量%的氨基酸稳定剂；和使用说明书。

本发明还有一种实施方式是适用于对哺乳动物胃肠外给药的液体药物组合物，该组合物基本上由预先不经过冻干的有效量的β-干扰素和一种具有适当离子强度的氨基酸稳定剂组成，所述β-干扰素存在于 pH 保持在 4.0 至 6.0 范围内的缓冲液中。将该组合物包含在一种贮存容器中，例如注射器。优选地，该贮存容器没有含氧/液体界面（也就是说，干扰素溶液在制备和贮存过程中不受含氧气体影响）。β-干扰素在约 2 摄氏度至约 25 摄氏度之间的温度下贮存至少 3 个月的过程中，基本上保持了它的抗病毒活性。

在液体药物组合物中稳定β-干扰素的本发明方法使干扰素在约 2 摄氏度至约 25 摄氏度之间的温度下贮存至少 3 个月的过程中基本上保持了它的物质稳定性，该方法包括将：a)有效量的β-干扰素；b)保持 pH 在 4.0 至 7.2 范围内和适当离子强度的缓冲液，优选缓冲液 pH 为 4.8-5.2；和 c)一种氨基酸稳定剂混合，其中该液体预先不经过冻干，并且在制备和贮存过程中不受含氧气体的影响。

本发明的液体制剂比冻干制剂具有很多优点。这些优点包括:(i)液体制剂所需的较小注射体积比大体积引起较少不适;(ii)用简单的氨基酸类代替复杂的赋形剂,使更密切地监测最终产品质量成为可能;(iii)由于不需要单独提供注射用水(WFI)和单独的注射器与小瓶,包装大大简化;(iv)由于几乎没有液体转移,剂量精度得以提高;和(v)提高了产品的安全性,因为更为简便的给药方式减少了在注射剂的制备过程中被针刺伤和滴落成分的机会。

因此,本发明的一个目的是提供一种具有生物学活性的稳定的β-干扰素液体制剂,用于注射的用途。

本发明的另一个目的是提供一种制剂,该制剂不需要预先对β-干扰素组合物进行冻干。

本发明的另一个目的是防止β-干扰素液体制剂的稳定性降低,是通过:a)在液体组合物的制备过程中避免空化作用和/或液上空间的形成,或b)用所述液上空间保存液体制剂,该液上空间由一种惰性气体组成,例如氧或氮。

本发明还有另一个目的是提供一种可以以液体状态长时间贮存的液体制剂,有利于给药前的贮存和运输。本发明的另一个目的是提供一种易于制备和给药的液体制剂,并且不需要冻干和再制备步骤。

本发明进一步的目的是利用简单的氨基酸类代替常用的血清白蛋白作为稳定剂,使监测产品质量更为容易。

本发明还有另一个目的是提供一种含有非冻干β-干扰素的药物组合物,该组合物的生产成本低廉。

本发明的其他优点一部分阐述在下面的说明中,另一部分将通过该说明书而显而易见,或者可以通过实施本发明而获知。结合在本说明书中的附图构成了本说明书的一部分,用来举例说明,和本说明书一起起到解释本发明原理的作用。

附图的简要说明

图 1 表示保留在散装加工液体中的β-干扰素单体百分比，它是该液体中溶解氧的百分比的函数。

图 2 表示液体制剂 BG9589-1 以原料为标准，经标准化处理后的蛋白质浓度对时间的百分比。标为“4℃”的样本（实心正方形）在 2-8℃下恒温。其他样本在 25℃（实心圓）、33℃（实心三角形）和 40℃（实心菱形）下恒温。

图 3 表示液体制剂 BG9589-3 以原料为标准经标准化处理后的蛋白质浓度对时间的百分比。标为“4℃”的样本在 2-8℃下恒温。其他样本在 25℃（实心圓）、33℃（实心三角形）和 40℃（实心菱形）下恒温。

发明的详细说明

本发明克服了目前策略和设计中的问题和不足，提供了一种稳定干扰素的简单方法和一种提高了贮存稳定性的简单干扰素制剂。本发明是部分地基于我们的发现而作出的，即：

a) β-干扰素特别不稳定，在与氧接触时发生聚集作用，氧既可以是活跃地通入液体中的气泡，也可以静止地存在于液上空间中与之接触；

b) 缺少载体、如人血清白蛋白的β-干扰素液体制剂对玻璃表面的吸收（即化学反应或物理结合）特别敏感；和

c) β-干扰素以较低的离子强度聚集，需要一个为含水状态提供稳定性的离子环境。

本发明因此涉及稳定人β-干扰素的方法，避免了这些不利因素，还涉及所得被稳定了的β-干扰素的液体制剂。

A、定义

“缓冲液”一词指一种弱酸及含有该酸阴离子的盐的溶液，或一种弱碱及其盐的溶液。特别是本说明书所用的“乙酸盐”一词（又见下表 I）指一种优选含有乙酸钠和乙酸的缓冲系统，“磷酸盐”一词指优选分别含有磷酸氢二钠与磷酸二氢钠的七与一水合物的缓冲

系统。而且，表 II（见下）中那些含有酸性氨基酸以及氢氧化钠的溶液尽管作为本领域已知的术语在习惯上是不被认为是缓冲液的，然而也包括在此处的定义中。

“赋形剂”一词指在加工和/或贮存过程中向液体制剂中加入的任意化合物，其作用是改变体积性质、提高稳定性和/或调节重量摩尔渗透压浓度。

“稳定剂”一词指一种提高或者增强稳定性的赋形剂。

“稳定性”一词必然具有功能定义，指干扰素活性、如抗病毒活性和/或干扰素结构的相对暂时恒定性。

“空化的”一词指由于压力改变或物理搅拌作用，至少在制备和贮存过程中与含氧气泡（例如空气）接触了的任意液体干扰素制剂。“空化作用”一词也指在液体干扰素制剂的制备、贮存和使用过程中某时间点形成含氧气体/液体界面。“空化的”一词也指在至少在制备和贮存过程中一般会遇到的温度下，液体干扰素制剂中的溶氧水平超过大气压平衡值大约 10%。

此处所用的“胃肠外”一词包括皮下、静脉内、肌内、胸骨内、腹膜内、眼或脊柱内注射或输液技术。

“药学上可接受的盐”这一表达方式指任何有机或无机加成盐，该加成盐在发挥出有效活性的浓度下对患者是相对无毒和无害的，以使可归因于该盐的副作用不会损害干扰素的治疗作用。

化合物的“有效量”是能够对所治疗的具体疾病产生结果或发挥影响的量。“有效量”也指在抗病毒活性的 CPE 试验中产生阳性结果（即发挥抗病毒作用）的量。

此处所用的干扰素的“药学上的有效量”指医学和药学领域中已知的、安全有效治疗具体疾病的药剂百分浓度。

“与血液等渗”（可互换使用“等渗性”）指具有足够成分浓度的液体干扰素组合物，以使它的渗透行为基本上等同于血液，也就是说，与制剂接触的细胞基本上将保持其形状，并且基本上不会由于渗透压的作用而发生水的净转运。

“聚离子种类”（可互换使用“聚合电解质种类”）指一种高分子量的物质，它是一种电解质，当被用于本发明制剂中时，对给定的重量摩尔渗透压浓度来说，产生最大化的离子强度。该定义是基于我们的发现而作出的，我们发现，高离子强度使β-干扰素稳定，但是溶液与血液等渗的必要性限制了总离子强度（见实施例 7）。对给定的重量摩尔渗透压浓度来说，一种优选的最大化离子强度的方法是使用一种聚离子种类的赋形剂。

“对干扰素呈惰性”的物质指该物质至少具有与干扰素不发生物理和/或化学反应的性质。

B、制备干扰素

一般来说，本发明适用于所有类型的干扰素，包括天然干扰素、由重组 DNA 技术生产的干扰素和由化学合成或改性生产的干扰素。本发明也可以用在来自人或任意其他物种的成纤维细胞、白细胞、淋巴细胞或任意其他含干扰素或产生干扰素的组织的粗品、半精制和精制干扰素。本发明最优选适用于人成纤维细胞干扰素（β-干扰素）。

最优选的β-干扰素是重组体形式，用于生成包括各种干扰素在内的蛋白质的重组 DNA 方法是已知的，无论如何不是用来限制本发明的。例如参见美国专利 4399216、5149636、5179017（Axel 等）；4470461（Kaufman 等）。β-干扰素的重组形式已经被制备出来了。例如参见欧洲专利 041313（Fiers—β-干扰素的表达）；美国专利 4966843（McMormick 等—干扰素在 CHO 细胞中的表达）；美国专利 5326859（Sugano 等—DNA 编码的β-干扰素）。也可以利用重组方法或化学方法对β-干扰素进行改性，并且可以在含血清或不含血清的介质中生成。β-干扰素的形式可以包括变体，例如排除了半胱氨酸的突变体（美国专利 4588585 和 4737462: Mark 等）和排除了甲硫氨酸的突变体（EP 260350-Wang 等）。用糖部分进行衍生作用（糖基化作用）或其他附加分子可以增大蛋白质的基本氨基酸序列。通过宿主细胞的转译后处理系统，可以进行其他改性处理。链中个别

氨基酸残基可以进一步通过氧化、还原或其他衍生作用进行改性，蛋白质也可以被裂解得到活性片段。因此，具体重组β-干扰素的确切化学结构取决于若干因素，也不是用来限制本发明的范围。所有这些包含在本文所述制剂中的β-干扰素蛋白质当被置于适当的环境条件下时，将保持它们的生物活性。

一种重组β-干扰素的制备方法是培养用人β-干扰素基因转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。在含有牛胎血清的混悬液培养基中成批生长起来的 CHO 细胞分泌出重组β-干扰素。细胞可以在旋转烧瓶中生长，旋转烧瓶(spinner flask)置于约 35 摄氏度（以下称为“℃”）下的 CO_2 恒温箱中（5% CO_2）。如果需要按比例扩大培养的话，可以汇集多个旋转烧瓶，并将正在增加的面积接种在发酵器中。在给定的发酵器中生长大约六天，此间活性β-干扰素产物积聚在培养基中。然后可以收获培养物，并通过诸如正切流动式过滤等方法从含有产物的培养基上除去细胞。

C、精制干扰素

干扰素的精制流程有详细描述，对本领域的普通技术人员来说也是可以获知的。这些方法包括涉及各种色谱分离步骤的一步或多步程序。例如参见美国专利 5015730（Friesen 等—亲合色谱法和 HPLC）；4541952（Hosoi 等—螯合色谱法）。

一种例举性的方法涉及利用β-干扰素分子非同寻常的疏水性和相对碱性，以及它与金属离子结合的强烈的亲合性。例如参见 Knight 和 Fahey，“人成纤维细胞干扰素——一种改进的精制方法”，《生物化学杂志》256: 3609-3611 (1981)，和 Edy 等，“锌螯合色谱法精制人成纤维细胞干扰素”，《生物化学杂志》232: 5934-5935 (1981)，二者均结合在此作为参考。

简单地说，收集和精制步骤涉及将β-干扰素与一系列琼脂糖 Sepharose®柱（由 Pharmacia Biotech 制造）结合，用盐和多元醇洗脱。一旦将最终的琼脂糖洗脱液稀释并调低 pH，其中的β-干扰素将与 SPSepharose®(Pharmacia Biotech)结合。大多数剩余的柱中

所载带的蛋白质碱性强于单体β-干扰素，比干扰素更紧密地与柱结合。在该柱上 DNA 和病毒与β-干扰素分离开来。然后用一系列含有氯化钠的缓冲液洗涤柱子。

现在，干扰素产物已经结合在预先装载有锌的螯合琼脂糖 Sepharose® (Pharmacia Biotech)柱子上了。参见 Edy 等，出处同上。该柱子在无氧气氛下操作，以保护分子中的自由巯基，所有后续步骤也是如此。将精制了的干扰素酸化，并保持在低 pH 下，使任何残留的病毒失活。中和后，利用交叉流过滤法浓缩干扰素，然后换一种中性缓冲溶液进行缓冲。缓冲液交换的过程降低了锌和有机化合物的浓度。随后，散装干扰素在配制步骤前可以贮存在-70℃下。

D、配制干扰素

在上述例举性的精制方法中的第一次缓冲液交换过程之后，用一种 pH 在 4 与 7.2 之间的缓冲溶液代替中性缓冲溶液，进行第二次缓冲液交换的过程，这种缓冲液含有一种稳定剂，下文将有详细描述。所得含干扰素制剂被称为“加工中间体”，可以冷冻贮存。另见实施例 7。

如果以冷冻状态贮存(在一种惰性气体的气氛下，例如氩或氮)，然后可以将其解冻，并通过 0.22 微米滤器泵入称重容器中，优选为不锈钢制，加工中间体在此与预先经过滤器除菌的稀释液混合，直至达到所需的终产物重量。稀释液由第二次缓冲液交换过程所用相同的缓冲液组成。然后在无菌程序下利用诸如连续的两个 0.22 微米滤器对液体终产物进行除菌过滤，灌入优选为不锈钢制的密封容器中，该容器含有一个惰性气体入口、一个脱气阀/滤器联合、和一个流入/流出浸渍管。终产物通过浸管泵入密封容器中。利用惰性气体、如氮，将终产物压力转移至能够无菌灌装灭菌注射器的装置的泵压头。

有若干无菌灌装灭菌注射器的方法是可以获知的，所用的具体方法不是用来限制本发明范围的。一种例举性的方法涉及使用 HYPAK®

可进行高压灭菌的注射滤器(Becton Dickinson Pharmaceutical Systems, Franklin Lakes, NJ)。注射器在适当位置盖上顶盖后进行高压灭菌。一般来说，这种类型的装置具有一个真空室，它将装有干扰素制剂的注射器包含其中。真空室被置于无菌环境。每支注射器均垂直排列在真空室中，使其开口端与活塞相对，活塞能够插入注射管的开口端。活塞被设计成是可以插入注射管堵住液体的塞子。插入后在注射器内留有一小部分液上空间。将真空室抽空，用一种惰性的无氧气体（例如氩、氮）反冲若干次，在达到最终的真空状态时，利用机械作用将活塞推进开口的注射管内一小段距离，塞子自动地插入各自的注射器。然后对真空室内通入过滤空气，使真空室内压力恢复到大气压水平。真空度决定了含有惰性气体的液上空间大小。

在我们所用的具体系统中，注射器是垂直取向的，并被旋转盘上的链轮固定在适当位置。注射器首先被定位在一支针头下方，针头插入注射器。用一种惰性气体（例如氩、氮）通过针头冲洗注射器内部。针头然后从注射器中收回。然后将注射器定位在第二支针头下方，针头插入注射器。该针头连接在泵上，将产物分装在注射器中。第二支针头然后从注射器中收回。然后将注射器定位在第三支针头下方，针头插入注射器。用一种惰性的无氧气体（例如氮、氩）将活塞（预先经过高压灭菌）吹入注射器，然后针头从注射器中收回。固定活塞，使液体上表面和活塞底面之间留有惰性气体的液上空间。

1、赋形剂

赋形剂优选为聚离子种类的，对给定的重量摩尔渗透压浓度可以产生最大离子强度，例如一种聚合电解质，可以包括肝素或其他聚合物。正如实施例 4 中的讨论，高离子强度可稳定β-干扰素，不过溶液与血液等渗的必要性限制了总离子强度。因此对给定的重量摩尔渗透压浓度产生最大离子强度的一种优选方法是使用聚离子种类的赋形剂。本发明的β-干扰素溶液对血液是等渗的（约 290 毫渗摩

尔/千克）。

本发明最优选的稳定剂是一种氨基酸，可以包括下列之一：任意的酸性氨基酸（例如谷氨酸、天门冬氨酸）或一种选自精氨酸和甘氨酸的氨基酸。最优选地，氨基酸稳定剂是以其在 pH 5.0 溶液中的酸性形式加入的精氨酸（精氨酸-HCL）。一种优选的酸性氨基酸是 L-谷氨酸。希望不受任何理论的局限，聚离子赋形剂是优选的这一事实很可能是为什么精氨酸与赖氨酸（具有 3 个带电荷基团）稳定干扰素的效果好于甘氨酸（具有 2 个带电荷基团）的原因，同样其稳定效果也好于任何不带电荷的供试物。

如果赋形剂是精氨酸-HCl，其浓度将在 0.5%(w/v)至 5%的范围内，最优选为 3.13%（相当于 150mM 精氨酸-HCl）。如果赋形剂是甘氨酸，其浓度将在 0.50%(w/v)至 2.0%的范围内，最优选为 0.52%（相当于 66.7mM 至 266.4mM，最优选为 70mM）。如果赋形剂是谷氨酸，其浓度将在 100mM 至 200mM 的范围内，最优选为 170mM（相当于 1.47%至 2.94%的 w/v 百分比范围，最优选为 2.5%）。

我们使用 50mM 乙酸钠与冰醋酸以及 100mM 氯化钠的 pH 5.0 缓冲系统分析了用作β-干扰素液体制剂稳定剂的不同赋形剂。液体干扰素样本或者在 37℃下恒温 1 至 3 周进行热压处理，或者置于旋转装置上 1 至 3 天进行机械压力处理。利用实施例 1 所述的方法评价经过处理后的样本的β-干扰素稳定性。正如实施例 7 中更为详细的描述，用含有一种氨基酸赋形剂（可选还含有氯化钠）的乙酸钠以 pH 5.0 缓冲的制剂显示出最好的稳定性。

2、干扰素

优选的干扰素是成纤维细胞β-干扰素，最优选为由哺乳动物细胞产生的重组人β-干扰素。重组人β-干扰素可以含有一个游离的巯基和至少一条二硫键。一种特别优选的分子是每分子在 17 位含有一个游离的巯基，并在 31 位与 141 位之间含有一条二硫键。正如在天然人β-IFN 的情况下所已知的那样，在 Asn-80 预期发生 N-糖基化作用。本发明液体制剂的浓度范围为约 30μg/ml 至约 250μg/ml。一

个优选的浓度范围是48μg/ml至78μg/ml，最优选的浓度是约60μg/ml。根据国际标准值，已用WHO有关干扰素的国际标准Natural#Gb-23-902-531对生源性内标进行了标准化处理，因此浓度范围以IU表示(对0.5ml注射体积来说)为大约6 IMU至50 IMU，最优选的浓度是12 IMU。

3、缓冲液

用在本发明中的有机酸与磷酸盐缓冲液保持了pH在约4.0至7.2的范围内，优选为约4.5至约5.5，最优选为5.0，该缓冲液可以是常规的有机酸及其盐的缓冲液，例如柠檬酸盐缓冲液（例如柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等）、琥珀酸盐缓冲液（例如琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等）、酒石酸盐缓冲液（例如酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等）、富马酸盐缓冲液（富马酸-富马酸一钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸一钠-富马酸二钠混合物等）、葡萄糖酸盐缓冲液（例如葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等）、草酸盐缓冲液（例如草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等）、乳酸盐缓冲液（例如乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等）、磷酸盐缓冲液（磷酸二氢钠/磷酸氢二钠）和乙酸盐缓冲液（例如乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等）。

在下述实施例中，我们使用磷酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠、碳酸钠和乙酸钠的不同缓冲浓度和不同pH，以鉴别出最适当的缓冲液。β-干扰素样本或者在37℃下放置6天至2周，或者置于旋转装置上7至9小时，以加速降解过程。然后测定样本的化学性质。分析样本的光密度、作肽图、体积排阻HPLC、还原性与非还原性SDS-PAGE/蛋白质印迹和等电聚焦/蛋白质印迹(IEF)，全部内容描述在下列实施例1中。将全部试验用β-干扰素样本与起始β-干扰素原料或置于

2至8℃之间的β-干扰素样本进行比较。我们的数据说明，pH是决定我们的β-干扰素样本稳定性的主要因素，在pH4.0与5.0之间的样本比pH7.0或以上的样本更稳定。见实施例2。尽管如此，我们也能够研制出若干在生理pH (pH 7.2)下的β-干扰素制剂。见实施例6。

4、空化作用

在高pH条件(pH>8.0)下，β-干扰素中最自由的巯基发生氧化反应，在此pH下二硫键发生重排。通过体积排阻色谱法、非还原性SDS-PAGE和激光散射，我们在散装中间体中已经检测到β-干扰素一定程度的聚集作用。随后我们发现，聚集了的β-干扰素的形成可依赖于所溶解的氧的浓度。为了确保液体β-干扰素制剂不发生空化作用，我们研究出来的标准过程包括：(a)如果可能的话，在制备和贮存过程中不应当存在含氧气体/液体界面；和/或(b)在制备和贮存过程中不应当有气泡生成；和/或(c)在制备和贮存温度下，制剂中溶解的氧的浓度应当保持在大气平衡的10%以下。见实施例3。

5、干扰素到表面的吸附作用

我们也测定了干扰素将吸附到某些表面上，其在玻璃容器中的贮存需要至少一个与干扰素接触的容器表面涂有或者覆盖一种材料，该材料防止或基本上消除吸附作用。该表面对吸附作用可以是化学惰性或物理惰性的。用于该目的例举性材料是本领域的普通技术人员所已知的，例如可以包括喷淋或烘焙的聚硅氧烷、聚丙烯或聚四氟乙烯(PTFE)。我们采用所优选的60μg/ml液体制剂（BG9589-1、2、3和4：总结在下表1中），灌装在1ml长的I型玻璃注射器和0.75ml的I型玻璃小瓶中，该注射器涂有喷淋的聚硅氧烷(Beckon Dickinson)。然后用反相HPLC (rpHPLC)对样本进行分析，以测定蛋白质浓度。数据表明，与涂有聚硅氧烷的预灌装样本的注射器相比，灌装在玻璃小瓶中的样本溶液中的蛋白质量更少。见实施例5。

6、优选的制剂

我们利用四种液体制剂进行了蛋白质稳定性的动力学分析，它们

的最终浓度如下表1所示，每种制剂均含有60μg/ml β-干扰素。表2中给出的是供交替使用的制剂，其中一部分含有表面活性剂，例如Pluronic F68（由BASF制造）。

表1：优选的制剂

pH系统	赋形剂	最终的pH
20mM乙酸盐	150mM精氨酸-HCl	5.0（"BG9589-1"）
20mM乙酸盐	70mM甘氨酸 100mM氯化钠	5.0（"BG9589-2"）
20mM磷酸盐	140mM精氨酸-HCl	7.2（"BG9589-3"）
20mM磷酸盐	70mM甘氨酸 100mM氯化钠	7.2（"BG9589-4"）

所有制剂的组分均为USP级原料。详细组成为：

BG9589-1

成分（以原料计）	量
精氨酸-HCl，USP	15.8mg
冰醋酸，USP	0.167mg
乙酸钠三水合物，USP	0.972mg
β-干扰素	30ugm
注射用水，USP	0.5ml

BG9589-2

成分（以原料计）	量
甘氨酸，USP	2.628mg
冰醋酸，USP	0.185mg
乙酸钠三水合物，USP	0.932mg
β-1a干扰素	30ugm
注射用水，USP	0.5ml
氯化钠	2.922mg

BG9589-3

成分（以原料计）	量

精氨酸-HCl，USP	14.725mg
磷酸氢二钠-7H_2O	2.332mg
磷酸二氢钠-1H_2O	0.359
β-1a 干扰素	30ug
注射用水，USP	0.5ml

BG9589-4

成分（以原料计）	量
磷酸氢二钠-7H_2O	1.984mg
磷酸二氢钠-1H_2O	0.359mg
β-1a 干扰素	30ug
甘氨酸	2.628mg
氯化钠	2.922mg
注射用水，USP	0.5ml

表 2：其它制剂

pH 系统	赋形剂	最终的 pH
20mM 乙酸盐	150mM 精氨酸-HCl 和 15mg/ml 人血清白蛋白	5.0
20mM 乙酸盐	150mM 精氨酸-HCl 和 0.1% Pluronic F68	5.0
20mM 乙酸盐	140mM 氯化钠	5.0
20mM 乙酸盐	15mg/ml 人血清白蛋白 140mM 氯化钠	5.0
20mM 乙酸盐	0.1% Pluronic F68 140mM 氯化钠	5.0
170mM L-谷氨酸，150mM 氢氧化钠	15mg/ml 人血清白蛋白	5.0
170mM L-谷氨酸，150mM 氢氧化钠	0.1% Pluronic F68	5.0

其他原料也可以结合在本发明的制剂中。它们可以包括下列防腐

剂，其中所有优选的百分比均为 w/v：苯酚(约 0.2%)；对羟基苯甲酸甲酯(0.08%)；对羟基苯甲酸丙酯(0.008%)；间甲酚(0.1%)；氯丁醇(0.25%)；苯甲醇(0.1%)；和硫柳汞(0.1%)。在对蛋白质聚集作用和脱酰胺作用进行测定分析的基础上（数据没有列出），最优选的防腐剂是氯丁醇和苯甲醇。

7、用于胃肠外给药的试剂盒

本发明优选的实施方式包括用于本发明液体制剂胃肠外给药的成套试剂盒。包装内可以包括预先灌装有本发明液体制剂的注射器、若干乙醇拭子、至少一支针头、一条或几条胶粘绷带和使用说明书。不言而喻，本发明的液体制剂也可以用在常规的无针-注射系统。

E、使用干扰素

本发明的干扰素制剂具有抗病毒活性。见实施例 7。对临床使用来说，决定干扰素在任意具体情况下的给药量以及给药频率的因素例如所用干扰素的类型、所治疗的疾病和患者对干扰素治疗的反应。

本发明液体组合物的一种优选用途是用于治疗复发的多发性硬化。天然β-干扰素与重组β-干扰素的冻干（即制备）液体制剂已用于对患有复发的多发性硬化的患者给药。见 Jacobs 等《神经病学记事》39:285-294（1996 年三月）及其引用的参考文献，Jacobs 和 Munschauer，“用干扰素治疗多发性硬化”，载于《多发性硬化的治疗：试验设计、结果和未来展望》pp. 223-250（R. A. Rudnick 等编），London: Springer, 1992。使用本文所述的液体制剂治疗多发性硬化，是按照上面 Jacobs 等人的文献中所述相同的方案进行的，并测量相同的主要结果变量。

一种评价本液体制剂用途的方法是进行毒理学研究和进行与液体制剂给药有关的组织刺激反应的评价。我们已经进行了本液体制剂在兔子体内的毒理学研究。见实施例 8。

提供下列实施例用以阐述本发明的实施方式，但是不应视为对本

发明范围的限制。

实施例 1: 试验方法

使用若干被充分特征化描述的方法来测定我们的液体制剂中β-干扰素的物理化学性质,这些方法还可用于检测其它干扰素的性质。

通过测量 320nm 下的吸光度和 580nm 下的透光度，来检测不溶性聚集物的有/无。通过测量 278-280nm 下的吸光度（消光系数为 1.5），或者通过反相高效液相色谱法(HPLC)并使用制剂缓冲液中β-干扰素的已知峰浓度作为标准，来测定可溶性蛋白质的浓度。试验前对液体制剂样本进行离心处理。通过在 TSK-Gel®G2000SWXL 柱(Toso Haas, Montgomeryville, PA)上进行体积排阻色谱法，以从β-干扰素单体中分离聚集物，来测定可溶性聚集物的百分比。在 280nm 下检测到的峰面积用来计算可溶性聚集物百分比。

通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)来确定肽主链的稳定性。在十二烷基硫酸钠的存在下，用巯基乙醇还原β-干扰素，然后在 10-20%梯度凝胶(MiniPlus Sepragel®，综合分离系统，Natick, MA)上进行电泳。然后利用电泳法将蛋白质转移至硝基纤维素膜上，使用抗β-干扰素抗体和与辣根过氧化酶偶联的山羊抗小鼠抗体进行免疫检测，使其显色。例如参见《蛋白质的凝胶电泳，一种实用的方法》第 2 版，B. D. Hames 和 D. Rickwood, IRL Press。

通过在一种聚丙烯酰胺凝胶（IEF 3-10 MiniPlus Sepragel®，综合分离系统）上进行等电聚焦，来检测由脱酰胺作用和其他化学变化引起的净表面电荷的改变。见《蛋白质的凝胶电泳，一种实用的方法》，著者同上。

通过作肽图也可以检测甲硫氨酸的氧化作用、天冬酰胺的脱酰胺作用和其他可能的化学变化。在二硫苏糖醇的存在下，用内蛋白酶 Lys-C（Wako Pure Chemicals 公司）消化β-干扰素，所得肽的片段通过反相 HPLC 分离。一般见 Kalgahtgi, K., & Horvath, C. “通过高效液相色谱法实现快速作肽图”，《色谱学杂志》443, 343-354

(1988)。

使用 Glyko, Inc. (Novato, CA)的荧光团辅助碳水化合物电泳(FACE®)系统测定 N-连接的低聚糖简要分析。使用肽 N-糖苷酶 F,从糖蛋白中释放天冬酰胺连接(N-连接)的低聚糖,然后通过还原性胺化作用在还原末端用荧光团标记,分离,然后在聚丙烯酰胺凝胶上定量。

有大量方法可测定干扰素的抗病毒活性,例如在 W. E. Stewart II《干扰素系统》Springer-Verlag(1981 年第 2 版)中有更详细的描述。细胞病变作用抑制分析法(CPE)特别适用于测定干扰素的抗病毒活性。我们所优选的方法记载在 WHO 技术报告丛书 725 附录 1(1985)中,结合在此作为参考。简单地说,该 CPE 方法是先制备标准β-干扰素的储备溶液,并预先用 WHO 参考标准进行校准。该储备溶液在 D-MEM+培养基中制得,浓度为 10000 单位(U)每 ml,培养基含有 10%胎牛血清和 4mM L-谷氨酰胺。在进行分析当天,标准、对照和样本用三种单独的稀释系列稀释在 D-MEM+中: a)以 32U/ml 开始,随后以 2 倍稀释; b)以 12U/ml 开始,随后以 1.5 倍稀释; 和 c)以 6U/ml 开始,随后以 1.2 倍稀释。向 96 孔微量滴定盘的小孔中一列一列地加入五十微升稀释液,每种稀释系列加入一个盘中。下一步,向每个小孔中以 5×10^5 个细胞/ml、50 微升每孔加入在 D-MEM+中的 A549 细胞(ATCC 目录编号 CCL-185, Rockville, MD),对细胞和β-干扰素进行两倍稀释。细胞和干扰素在 37℃下、5%二氧化碳中培养 15 至 20 小时。振摇盘中内容物,使其进入漂洗桶中,向每孔中加入适当稀释在培养基中的 100 微升 EMC(脑心肌炎病毒)。病毒和细胞在 37℃下、5%二氧化碳中培养 30 小时。振摇盘中内容物,使其进入漂洗桶中,向盘中加入 0.75%结晶紫染料。5 至 10 分钟后,盘用蒸馏水洗涤,并干燥。每只分析盘包括既不含干扰素也不含 EMC 的细胞生长对照孔、含有 EMC 与细胞但不含干扰素的病毒对照孔和不同稀释系列的标准干扰素。用肉眼观察盘子,以确定每列的最后一孔中含有存活的细胞(>25%融合的紫色染色)。检出限

决定为标准的最低浓度，该浓度防止了病毒的细胞毒作用。通过用于标准测定的检出限和在样本中得到干扰素活性(MU/ml)的样本稀释因子，将最后一个阳性孔中的样本稀释液复复几次。将由每只盘得到的结果转换为对数单位，用于测定几何平均值和计算 95%置信区间。

实施例 2: 缓冲系统的选择

我们制备了三组缓冲液，每组含有九至十种不同的组分。第 I 组含有 pH 在 4.0 与 7.2 之间的一系列磷酸钠和/或 100mM 氯化钠溶液。第 II 组含有 pH 在 4.0 与 7.0 之间的另一系列柠檬酸钠缓冲液。第 III 组含有琥珀酸钠、乙酸钠和碳酸钠缓冲溶液，均结合有 100mM 氯化钠，pH 值范围为 4.0 至 7.2。另两种溶液用 50mM 硫酸钠代替氯化钠，pH 为 4.0 和 7.2。

在 2-8℃下，将解冻的散装β-干扰素透析入不同的缓冲液中过夜，其间至少进行两次缓冲液交换，然后无菌过滤，备用。通过 278nm 下的吸光度测定蛋白质浓度（消光系数为 1.5$mg^{-1}ml.cm^{-1}$），全部样本含有 140ug/ml 或 150ug/ml β-干扰素。样本过滤，分成四组，部分地灌装在 2.2ml eppendorf 试管中。一组置于 2-8℃下；一组置于 37℃下 6 天至两周；另一组置于旋转装置上 7 至 9 小时；最后一组用作零时间对照。用在各种处理过程中的蛋白质浓度损失除以起始浓度，计算由不溶性聚集物引起的蛋白质损失的百分比。

结果:

用蛋白质浓度的损失除以起始蛋白质浓度，计算由不溶性聚集物引起的百分蛋白质损失。所有数据的统计学分析说明，在 pH4.0 与 5.0 的缓冲液中的干扰素样本由聚集作用引起的蛋白质的百分损失低于高 pH 者。在 37℃下恒温、且 pH 为 4.0 和 5.0 的干扰素样本因聚集作用损失了大约 10%和 15%。在 pH 值超过 6.0 的条件下，损失升高至 40-50%。我们也测定了在 pH 值超过 6.0 的条件下，干扰素样本具有更多的可溶性聚集物。而且，我们利用作肽图测定了随着 pH 从 4.0 升高至 7.2，去酰胺化的干扰素的量基本上呈线性增加；

在 pH 为 7.0 及更高的条件下，超过 85%的干扰素在研究过程中发生去酰胺作用。我们用 IEF/蛋白质印迹法测量了样本中蛋白质种类的等电点(pI)（也就是蛋白质在电场中不发生移动和蛋白质上的平均电荷为零时的 pH），该印迹显示，柠檬酸钠中的样本具有额外的 pI 带，琥珀酸钠中的样本带强度发生移位。磷酸盐在 pH 5.0 下没有缓冲能力。乙酸钠加氯化钠在 pH 5.0 下对带型或强度没有改变。

实施例 3: 空化作用

在实施例 2 所述的 pH 筛选试验过程中，我们发现，贮存试管的液上空间对某些样本的蛋白质损失起到关键作用。在 2.2ml 体积试管中的 1.5ml 样本没有观察到蛋白质的损失。相反，1.2ml 样本出现聚集物显著增加的情况。这与我们的观察结果是一致的，因为我们观察到，在精制过程的病毒灭活步骤中，聚集的β-干扰素的形成取决于在该步骤中所溶解的氧的水平。

简单地说，病毒灭活步骤涉及用 15%磷酸将螯合琼脂糖洗出液（见 C 部分）的 pH 从 7.85+/-0.25 调至 2.5 与 3.5 之间，保持酸化的洗出液 120-135 分钟，然后用 0.5N 氢氧化钠回调至 pH 6.7+/-0.7。所有步骤均在 2-8℃下进行。我们设计了一项研究，以测定在β-干扰素聚集物的形成与所溶解的氧的量之间是否存在某种关系。

材料和方法

将来自螯合琼脂糖柱的洗出液分成 50ml 或 100ml 的等分试样，置于 100ml 旋转烧瓶中。向每只烧瓶中加入 1ml 用氩气吹洗过的(argon-sparged) 15%磷酸。然后将烧瓶轻微搅拌约 2 分钟，并在 2-8℃下不搅拌地保持约 2 小时。在此阶段之后，加入 6.5ml 用氩气吹洗过的氢氧化钠，在不同时间用体积排阻色谱法进行样本分析。在加入碱的同时，用氧探针(Orion, 860 型)连续测量液体内溶解的氧并记录。对于所溶解的氧的水平等于或小于 10%的样本来说，氩气在反应容器的液上空间中被冲走了。

结果:

数据列在表 1 中，这些数据揭示了在加入氢氧化钠的同时所溶解的氧的量与在病毒灭活步骤中β-干扰素单体的产出之间存在一种明确的关系。所溶解的氧浓度小于或等于 10%的所得产出值明显不同于所有其他氧浓度下的产出值。我们也对聚集物进行了特征化描述（数据在这里没有列出），并测定了其特异性活性比散装中间体降低了 30-40 倍。我们还测定了在非还原性条件下，超过大约 90%的聚集物具有抗 SDS 变性作用，提示了聚集物内存在着共价交联方式。在还原性条件下（2%β-巯基乙醇），聚集物崩解为单体，提示了该交联涉及二硫键。

实施例 4: 赋形剂的选择

在优选的 pH 5.0 缓冲液中制得含有不同赋形剂的一系列β-干扰素(60ug/ml)制剂，缓冲液中含有 50mM 乙酸钠和 100mM 氯化钠。赋形剂包括甘氨酸、精氨酸-HCl、赖氨酸-HCl、蔗糖、甘油、PEG3350、谷胱甘肽和 Pluronic F-68。在 pH5.0、2-8℃下，使β-干扰素散装中间体透析进入 50mM 乙酸钠和 100mM 氯化钠中过夜，其间至少进行两次缓冲液交换，然后过滤备用。减去背景，由 278nm 下的吸光度测定β-干扰素浓度。将所有样本稀释至最终干扰素浓度约为 60ug/ml。所有制得的样本过滤，取两毫升转移至 4ml 玻璃小瓶（未经聚硅氧烷处理）中，用氩气对液上空间吹洗，然后将小瓶密封。将几组样本置于 2-8℃和 37℃下两周。其他样本通过在室温下旋转 3 天，对其施以机械压力。

按照实施例 1 的程序对样本进行分析。另外，用 Ciba-Corning 248 型血液气体分析仪测量制剂中所溶解的氧的百分比。“试验”值是样本的氧分压(mmHg)减去氮吹洗过的缓冲液空白的氧分压，“对照”值是在室温下贮存的缓冲液空白中的氧分压减去氮吹洗过的缓冲液空白的氧分压。百分溶解氧（“试验”/“对照”）总是小于 30%。

结果:

在 37℃下恒温了两周的样本的 IEF/蛋白质印迹和 SDS-PAGE/蛋白质印迹显示，在含有 PEG3350 和谷胱甘肽的样本中，谱带发生漂

移，强度降低，以及有干扰素多聚体存在。再在37℃下恒温一周后，在我们的印迹中，甘油赋形剂显示出额外的一条带。蔗糖赋形剂表现为带强度降低。该最初的筛选程序使我们考虑用精氨酸-HCl、甘氨酸、氯化钠和甘露糖醇进行进一步研究。

实施例 5: 干扰素的吸附

在 2-8℃下，将解冻的散装β-干扰素透析至 BG9589-1、2、3 和 4 (见表 1)过夜，其间至少进行两次缓冲液交换，然后过滤备用。通过 280nm 下的吸光度测定蛋白质浓度(消光系数为 $1.5mg^{-1}ml.cm^{-1}$)。所有样本稀释至最终浓度大约为 60ug/ml。稀释了的样本过滤，在三支 1.0ml 长的喷有聚硅氧烷的 BD 注射器（I 型玻璃）中各灌装 0.5ml，液上空间用氮冲洗，或者在三支 0.75ml 的 I 型玻璃小瓶中各灌装 0.75ml，液上空间用氩冲洗。用反相 HPLC 测定蛋白质浓度（实施例 1）。

结果:

下表 3 列出了用反相 HPLC 测定的蛋白质浓度。数据显示，与涂有聚硅氧烷的预灌装的注射器相比，灌装在玻璃小瓶中的样本含有较少的蛋白质。因此，使用经聚硅氧烷处理的注射器作为β-干扰素液体制剂的包装。

表 3:

	玻璃小瓶(ug/ml) (S.D)	经聚硅氧烷处理的注射器(ug/ml) (S.D)
BG9589-1	59.3 (2.6)	63.3 (2.5)
BG9589-2	58.3 (0.7)	61.7 (0.1)
BG9589-3	56.4 (0.4)	58.8 (1.1)
BG9589-4	55.5 (0.7)	59.3 (0.5)

实施例 6: 生理 pH 下的制剂

离子强度/磷酸盐。我们对具有各种缓冲组分浓度的磷酸盐/氯化钠的 pH 7.2 缓冲系统进行了初步研究，其中磷酸盐浓度为 10、50 和 75mM 不等，离子强度（由 $I = \Sigma c_I z_I^2$ 定义，其中 c_I 和 z_I 分别

是离子种类 I 的摩尔浓度和价电荷）为 0.2、0.4 和 0.6，这是通过加入氯化钠来调节的。

我们对磷酸盐浓度(10、50 和 75mM)和离子强度(I = 0.2、0.4 和 0.6)变量使用了完整的析因设计。使用经过 Ellis 和 Morrison 改写的棋盘式分布表计算磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠（用以达到所需的离子强度）在缓冲液中的组成，见“用于研究 pH 依赖过程的恒定离子强度的缓冲液”，《酶学方法》87:405-426 (1982)。等式可以测定特定 pH 所需的每种缓冲组分量、磷酸盐浓度和离子强度。使β-干扰素散装中间体通过 Pharmacia PD-10 脱盐柱进行缓冲液交换，由此得到析因实验所用的九种溶液。所得溶液的 pH 均为 7.20 +/- 0.15。通过 280nm 下的吸光度测定浓度，然后用适当缓冲液稀释至β-干扰素浓度为 150ug/ml。所得溶液在氩环境下通过 0.22 微米滤器进行无菌过滤，将每 1.3ml 等分试样灌装在 5ml 玻璃小瓶中，液上空间为氩。样本在 37℃下恒温 6 天，并重复进行三次。通过 580nm 下的百分透光度、百分蛋白质回收率和 IEF-PAGE/蛋白质印迹，对样本进行分析。

结果:

不同离子强度下的百分透光度分析表明，随着离子强度的增加，透光度也有增加的趋势（也就是说，不溶性蛋白质聚集物的浓度降低了）。百分蛋白质回收率数据也显示具有与之相似的趋势，不过 IEF-PAGE/蛋白质印迹显示脱酰胺作用与不同离子强度之间没有什么关系，以致全部样本都被同样地脱酰胺了。因此，在 37℃下贮存六天后，随着磷酸盐浓度降低和离子强度增加，样本发生聚集作用的趋势减弱。百分透光度和作为不同磷酸盐浓度（这里没有列出）的一个函数的百分回收率的试验结果显示，随着磷酸盐浓度的增加，%透光度有微弱降低的趋势，但是方差分析显示不同磷酸盐浓度的样本之间没有显著差异。百分回收率数据显示磷酸盐浓度越低，蛋白质回收率越高（94%置信水平下有显著差异）。IEF-PAGE/蛋白质印迹显示，不同磷酸盐浓度对脱酰胺作用没有明显影响。

赋形剂/盐的比例。初步研究（没有表示出来）说明，某些赋形剂可能需要盐（例如氯化钠）的帮助，才能保持较高离子强度和在pH 7.2下表现出稳定作用。我们利用赋形剂（甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、蔗糖和甘露糖醇）和对等渗性有贡献的氯化钠部分（$f_{盐}$ = 0、0.25、0.75和1.0）设计了析因研究。该部分的计算方法为：$f_{盐} = O_{盐}/(O_{盐} + O_{赋形剂})$，其中$O_{盐}$和$O_{赋形剂}$分别是溶液中氯化钠和赋形剂的重量摩尔渗透压浓度，以mOsm/kg表示。盐部分提供了将盐的作用与不同赋形剂进行对比的方法。由于赋形剂:盐的比例（如$f_{盐}$所定义）不同，全部样本都含有添加剂，使其为等渗。

制备每种赋形剂在20mM磷酸盐中的、pH为7.2的10%(w/v)储备溶液，脱气，并用氩气吹洗。制备250mM氯化钠、20mM磷酸盐、pH为7.2的储备溶液，脱气，并用氩气吹洗。将散装β-干扰素中间体对用氩气吹洗过的、pH为7.2的20mM磷酸盐缓冲液进行透析。通过280nm下的吸光度测定所得溶液的β-干扰素浓度，用磷酸盐缓冲液和各赋形剂和盐的储备溶液稀释至β-干扰素浓度为60ug/ml，并达到所需最终的盐和赋形剂条件。所得样本无菌过滤（0.22微米），灌装在1.0ml Becton Dickinson聚硅氧烷喷涂的I型玻璃注射器中（灌装体积为0.5ml），液上空间为氮。样本在40℃下贮存。

6天后，分别在通过0.22微米滤器过滤的前后测定320nm和280nm下的吸光度，对甘氨酸和蔗糖样本进行分析。2周后，对精氨酸、赖氨酸和甘露糖醇进行类似分析，同时进行IEF-PAGE、还原性SDS-PAGE和非还原性SDS-PAGE。对照样本在2至8℃间贮存，也进行类似分析。

结果:

随着蔗糖和甘露糖醇的$f_{盐}$升高，β-1a干扰素的回收率（为对照的百分比）也升高了，在$f_{盐}$ = 1（130mM氯化钠）时回收率达到最大。对精氨酸和赖氨酸来说，随着$f_{盐}$升高，回收率降低。在大约$f_{盐}$ = 0.75下，pH 7.2的甘氨酸制剂达到了最大回收率。

使用含有不同赋形剂、如甘氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘露糖醇和蔗糖等的等渗 pH 7.2 磷酸盐缓冲液进行的赋形剂筛选研究显示，所有不带电荷的赋形剂的回收率都很低。例如，还原性和非还原性 SDS/PAGE 说明全部制剂中的非糖基化类的β-干扰素都减少了，单独的等渗氯化钠和甘露糖醇的多聚体带都加强了。总的来说，在这些生理 pH 下的缓冲系统中，赋形剂的离子特征与其抗β-干扰素聚集的稳定能力之间存在明显的关系。蔗糖和甘露糖醇等非离子性添加剂似乎不提供保护作用，或者实际上可能在生理 pH 下加速蛋白质的损失。每个可溶性种类(species)带一个单电荷的氯化钠的作用优于甘露糖醇或蔗糖。在生理 pH 下，每分子氨基酸含有两个电荷。如果是甘氨酸的话，分子本身的两性离子性质似乎不足以稳定β-干扰素。每分子精氨酸和赖氨酸都含有三个电荷，对β-干扰素的稳定作用要好于单用氯化钠或甘氨酸/氯化钠制剂。

实施例 7: 稳定性和动力学研究

在惰性气氛下，将制剂无菌灌装在注射器中，将注射器在一定温度范围内恒温不同的时间阶段，对注射器内容物进行分析。简单地说，在 2 - 8℃下，将解冻的散装β-干扰素透析至 BG9589-1、-2、-3 和-4 过夜，其间至少进行两次缓冲液交换。通过 280nm 下的吸光度测定蛋白质浓度，消光系数为 1.5ml/mg/cm。全部样本稀释至β-1a 干扰素的最终浓度约为 60ug/ml。将表 1 的四种β-1a 干扰素制剂过滤，取 0.5ml 分配在 1.0ml 长的 Becton Dickinson (BD)注射器中，注射器的内表面涂有烘焙的聚硅氧烷或喷雾的聚硅氧烷。利用 OD、体积排阻 HPLC (SEC)、等电聚焦凝胶电泳(IEF)/蛋白质印迹、还原的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)/蛋白质印迹、作肽图、荧光团辅助碳水化合物电泳(FACE)和 CPE 生物测定对样本进行分析。注射器的液上空间为氮气。注射器在 2 - 8℃、25℃、33℃和 40℃下恒温达九十天。按照实施例 1 的方法分析样本。

结果:

我们分析了样本的蛋白质浓度，并利用在不同温度下恒温九十天

的原料样本进行过标准化处理。图 2 说明，在从 2－8℃（平均 4℃）至 25℃的温度范围内恒温三个月后，BG9589-1 显示出完美的蛋白质稳定性（没有蛋白质损失）。在接近体温的温度（33℃）下贮存，有大约 18％的蛋白质降解。在超过体温的温度（40℃）下贮存，3 个月后有大约百分之三十的蛋白质降解。BG9589-2 基本上也得到相同的结果（没有显示）。图 3 说明对 BG9589-3 进行 2 个月贮存试验的结果。蛋白质在 4 至 25℃下的降解作用最小，但在较高温度下快速降解。BG9589-4 的结果基本上与图 2 和图 3 相同。这些数据使用还原的 SDS-PAGE/蛋白质印迹得到了证实。

在“烘焙”的注射器中，在本研究的时间阶段内，没有检测到可溶性聚集物的存在。蛋白质浓度、CPE 测定、百分氧化的 AP6 和碳水化合物简要分析中没有观察到明显改变。还原性 SDS-PAGE/蛋白质印迹和 IEF/蛋白质印迹可以看到，样本中没有可观察到的改变。与起始时间点相比，百分脱酰胺作用有一定提高。不过，用于灌装这些注射器的散装中间体具有 37％的脱酰胺作用，高于灌装入注射器后的 33.8％。后者这一低值可能是由测定变异性引起的。在“喷雾”的注射器中，在本研究的时间阶段内，也没有检测到可溶性聚集物的存在。蛋白质浓度、CPE 测定、百分脱酰胺作用、百分氧化的 AP6 和碳水化合物简要分析中没有观察到明显改变。还原性 SDS-PAGE/蛋白质印迹和 IEF/蛋白质印迹可以看到，样本中没有可观察到的改变。简言之，迄今为止的结果已经显示，终产物 BG9589-1 在“烘焙聚硅氧烷”注射器中、在 2－8℃下 3 个月是稳定的，在“喷雾聚硅氧烷”注射器中、在 2－8℃下 6 个月是稳定的。

在注射器进行无菌灌装后，我们对 BG9589-1 和 BG9589-2 制剂进行了抗病毒 CPE 测定（见表 1）。所报告的 BG9589-1 和 BG9589-2 的活性值均为 12.0MU/ml。样本在 2－8℃下贮存 3 个月后，重复抗病毒 CPE 测定。所报告的 BG9589-1 的活性值为 11.6MU/ml (n=8)，10.2-13.3MU/ml 的置信区间为 95％。

我们也测量了 BG9589-1 的散装中间体原料在 2－8℃下 5 个月和

-70℃下6个月的稳定性。用实施例1的方法分析小规模渗滤研究后得到的BG9589-1样本。迄今为止的结果已经显示，BG9589-1的半成品原料在2-8℃下5个月、和在-70℃下6个月是稳定的。

在这项特别研究的时间阶段内，没有检测到可溶性聚集物的存在。百分脱酰胺作用和碳水化合物简要分析没有观察到明显改变(百分脱酰胺作用中的差异是在测定变异性范围内)。还原性SDS-PAGE/蛋白质印迹和IEF/蛋白质印迹可以看到，样本中没有可观察到的改变。蛋白质浓度有轻微降低。-70℃下蛋白质浓度的降低可能是由样本经过一次冷冻/解冻周期所引起的。蛋白质浓度的降低仍然在最初浓度的15%内。

实施例8: 临床前研究

进行兔的单次肌内(IM)剂量局部耐受性研究，来评价以几种新制剂给药的干扰素的局部毒性。由本发明液体制剂或冻干并再制备干扰素制剂给药所引起的注射部位的反应可与生理盐水给药后所引起的现象比较。

1、四种β-干扰素制剂的单剂量IM给药后的兔刺激反应/生物利用度研究

二十只雄性新西兰白兔每只均接受单次30ug β-1a干扰素的五种制剂之一的肌内(IM)注射: BG9589-1(pH 5.0，乙酸盐缓冲液，精氨酸稳定剂，0.5ml/剂)；BG9589-2(pH 5.0，乙酸盐缓冲液，甘氨酸/氯化钠稳定剂，0.5ml/剂)；BG9589-3(pH 7.2，磷酸盐缓冲液，精氨酸稳定剂，0.5ml/剂)；BG9589-4(pH 7.2，磷酸盐缓冲液，甘氨酸/氯化钠稳定剂，0.5ml/剂)；和一种pH 7.2的冻干β-干扰素制剂，含有1.5%HSA，1.0ml/剂(见Jacobs等，出处同上)。

每四只动物接受一种治疗。接受BG9589-1或冻干制剂的动物还接受等体积生理盐水的对侧部位注射，作为阴性对照。给药后72小时内采集血样，进行血清β-干扰素活性分析。在给药后6、12、24、48和72小时用肉眼观察皮肤，以评价红斑、瘢痕形成和水肿情况。

72 小时给药后血液采集之后，将动物处死，用肉眼检查注射部位的组织损伤表现，然后固定在 10% 中性缓冲的福尔马林中。用显微镜检查肌肉样本（三份/注射部位）的炎症、坏死、出血和损害。

结果:

用基本刺激反应指数分（EPA 皮肤分类系统）评分后发现，上述液体制剂经测定对皮肤的刺激反应均没有超过轻微程度。有一只动物的 BG9589-4 注射部位用肉眼检查发现有轻微的刺激反应（出血）；不过显微检查发现没有出血表现，肉眼观察结果经确定是人为现象。简言之，显微检查揭示了液体制剂试样注射部位反应恒为最小程度，反应的严重性均没有超过由冻干制剂或生理盐水给药所诱发的刺激反应。

另外，利用多组兔子可以容易地试验液体制剂反复 IM 给药后的兔皮肤刺激反应，动物将每隔一天接受液体制剂或生理盐水的肌内注射，持续八天（共给药五次）。给药部位选定为每只动物背部，以使暴露在试样下的局部面积最大。每治疗组在每次给药后 4－6 小时和最后一次给药后 24 小时，用肉眼进行皮肤评价。在每次皮肤评价时进行每日的大体观察。给药后肉眼检查的 24 小时之后，将动物处死，检查注射部位的组织损伤表现，然后将组织固定在 10% 中性缓冲的福尔马林中。用显微镜检查防腐组织的炎症、坏死、出血和损害。还在最初的试样给药之前和处死时立即采集血样，进行血液学和血清化学评价。

实施例 9: 临床研究

本发明的液体制剂与以前的干扰素制剂有显著区别。对任何临床适应征来说，在对人给药后，干扰素的药动学和药效学特性有可能发生改变。不幸的是，β-干扰素活性是高度种特异性的，最相关的药理学信息来自对培养的人细胞、对人、以及在较小程度上对恒河猴的研究结果。如果有药理学改变的话，试验其改变的优选方法是进行人生物等价试验。

使用细胞病理学作用(CPE)生物测定法可以定量分析血清中β-

干扰素的抗病毒水平，方法例如实施例 1 所述。用任意数量的液体与冻干干扰素制剂可以进行人生物等价研究。通过对血清、曲线下面积(AUC)和 C_{MAX} 活性参数的分析，普通技术人员能够确定冻干制剂和液体制剂是否是生物等价的。作为唯一的生物等价研究方案例子，我们简要地描述了一种双盲的、单剂量的、交叉研究，用以证明在健康志愿者身上，本发明的液体制剂和冻干的β-干扰素产品是生物等价的。

方案

在双盲、两阶段的交叉试验中，每位受试者接受相同剂量（例如 60ug/12MU）的β-干扰素制剂（表 4）。受试者年龄在 18 至 45 岁之间，对不同的身高和体格来说，体重都在相应的正常体重范围的 15 % 内，包括 15%。在每次给药前和在各次给药时间后立即抽取血样，用于血液学、化学、血清β-干扰素活性和药效学简要分析，直至给药后 144 小时。还进行了注射疼痛和注射部位反应的评估。

研究指导

为了预防与干扰素有关的流感并发症，全部受试者将在给药阶段前立即接受对乙酰氨基酚，在整个给药阶段中也是如此。

药动学

血清β-干扰素测定。用(CPE)测定法测量血清水平，作为抗病毒活性的单位。分析血清抗病毒水平的 AUC、C_{max} 和 T_{max}。AUC 值将从给药时间计算到最后可检测水平的时间(AUC_{0-T})，并一直到给药后 144 小时(AUC_{0-144})。使用 SAS (6.08 版, SAS Institute, Cary, North Carolina)进行治疗数据的标准描述分析。

表 5

示范研究的给药方案

给药组	途径	剂量(MU)	治疗阶段 1	治疗阶段 2
1	IM	12	冻干(60mcg)	液体(60mcg)
2	IM	12	液体(60mcg)	冻干(60mcg)

药效学

对生物标记物新蝶呤进行了特征化描述，这是一种干扰素诱导的GTP环水解酶产物，它反映巨噬细胞和T细胞的活化作用（C. Huber等《实验医学杂志》1984；160：310-314；1996年9月20日；D. Fuchs等《今日免疫学》9：150-155，1988）。在重组人β-干扰素的非临床研究和临床研究中，新蝶呤的诱导产生与各种重组人β-干扰素给药治疗后的血清活性水平有相互关系。

通过标准实验室程序测量新蝶呤。通过三个血清新蝶呤参数的计算，以定量方式描述了β-干扰素的药效学概况。第一个参数E_{AUC}是新蝶呤－时间曲线下面积，曲线用基线水平作过规范化。第二个参数是E_{MAX}；该参数是所观察到的峰新蝶呤水平与基线新蝶呤水平之间的差异。第三个参数是诱导比IR；该参数是用峰新蝶呤水平除以基线新蝶呤水平计算得到的。

统计学

对AUC使用Wilcoxon-Mann-Whitney双、单侧试验程序，以测定等价性。为了估计液体制剂中的干扰素相对于冻干制剂中的干扰素的相对生物利用度及其90％置信限，将AUC进行对数变换后再进行方差分析(ANOVA)。通过“个体间差异”将顺序和性别分离开来。通过“个体内差异”将不同阶段和治疗的组成部分分离开来。

等价形式

通过考虑说明书和实施这里所公开的发明，本发明的其他实施方式和用途对本领域的技术人员来说将是显而易见的。说明书和实施例应被理解为仅供举例说明之用，而权利要求书才指出了本发明的真实范围和精神。

图 1

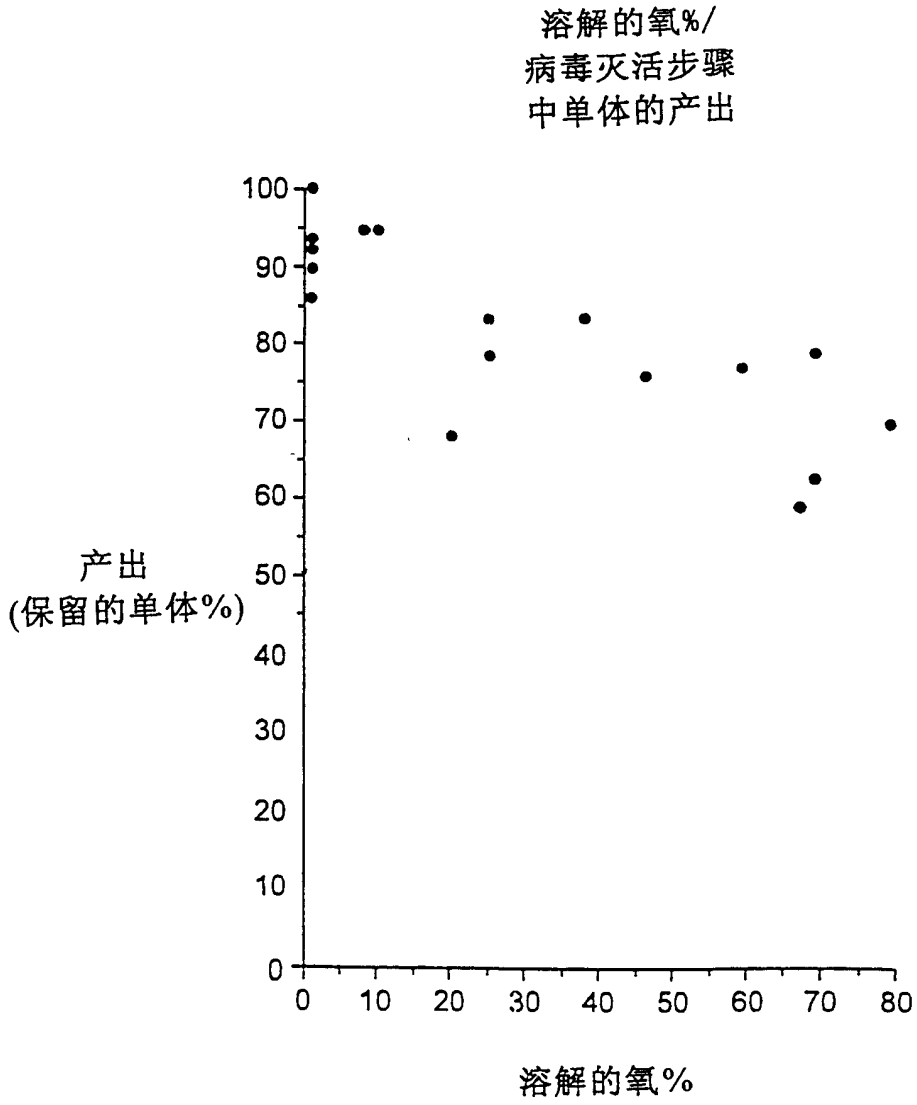

溶解的氧%/
病毒灭活步骤
中单体的产出
产出
(保留的单体%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
溶解的氧%

图 2

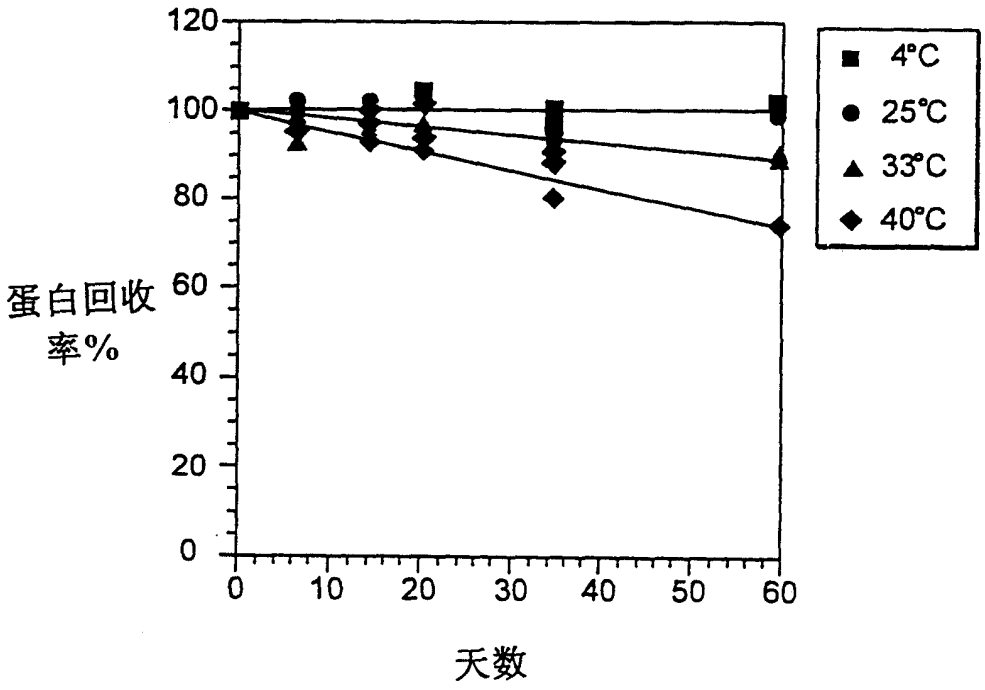


图 3

