

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 47/40

A61K 38/21



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02813121.5

[43] 公开日 2004年8月18日

[11] 公开号 CN 1522159A

[22] 申请日 2002.6.28 [21] 申请号 02813121.5

[30] 优先权

[32] 2001.6.29 [33] DK [31] PA200101040

[32] 2001.8.30 [33] DK [31] PA200101277

[32] 2002.2.19 [33] DK [31] PA200200257

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000444 2002.6.28

[87] 国际公布 WO2003/002152 英 2003.1.9

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.29

[71] 申请人 马克西根公司

地址 丹麦赫斯霍尔姆

共同申请人 马克西根控股公司

[72] 发明人 乔恩·德鲁斯特拉普

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书5页 说明书69页 序列表4页

[54] 发明名称 干扰素配制品

[57] 摘要

本发明涉及诸如药用干扰素组合物的干扰素组合物及其制备方法。具体地说本发明涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定组合物。

ISSN 1008-4274

1. 一种稳定化的组合物，它含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物。
- 5 2. 根据权利要求1的组合物，其中该干扰素多肽是在贮存期间表现出聚集形成和/或生物活性损失的多肽。
3. 根据权利要求1或2的组合物，其中该干扰素多肽是人野生型干扰素多肽或其变体。
4. 根据权利要求3的组合物，其中该干扰素多肽是选自干扰素 α ，干扰素 β ，干扰素 ω ，干扰素 τ ，干扰素 ϵ ，和干扰素 γ 的人野生型干扰素多肽，或其变体。
- 10 5. 根据权利要求1-4任一项的组合物，其中该干扰素多肽被非多肽半分子衍生化。
6. 根据权利要求5的组合物，其中该干扰素多肽被糖基化和/或PEG化。
- 15 7. 根据权利要求1-6任一项的组合物，其中该干扰素多肽是野生型人干扰素 β 。
8. 根据权利要求5-6任一项的组合物，其中该干扰素多肽是含有干扰素 β 多肽的偶联物，该干扰素 β 多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于导入了至少一个糖基化位点，该偶联物还含有与导入的糖基化位点连接的至少一个糖类半分子。
- 20 9. 根据权利要求8的组合物，其中至少一个导入的糖基化位点是处在选自下列的位置的N-糖基化位点：S2N+N4S/T，L6S/T，L5N+G7S/T，F8N+Q10S/T，L9N+R11S/T，R11N，R11N+S13T，S12N+N14S/T，F15N+C17S/T，Q16N+Q18S/T，Q18N+L20S/T，K19N+L21S/T，25 W22N+L24S/T，Q23N+H25S/T，G26N+L28S/T，R27N+E29S/T，L28S+Y30S/T，Y30N+L32S/T，L32N+D34S/T，K33N+R35S/T，R35N+N37S/T，M36N+F38S/T，D39S/T，D39N+P41S/T，E42N+I44S/T，Q43N+K45S/T，K45N+L47S/T，Q46N+Q48S/T，L47N+Q49T/S，Q48N+F50S/T，Q49N+Q51S/T，Q51N+E53S/T，K52N+D54S/T，L57N+I59S/T，Q64N+I66S/T，30 A68N+F70S/T，R71N+D73S/T，Q72N，Q72N+S74T，D73N，D73N+S75T，S75N+T77S，S75N，S76N+G78S/T，E81N+I83S/T，T82N+V84S/T，

E85N+L87S/T, L88S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T, Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T, L98S/T, H97N+K99S/T, K99N+V101S/T, T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, K105N+E107S/T, E107N+E109S/T, K108N+D110S/T, E109N+F111S/T, D110N+T112S, D110N, F111N+R113S/T,
 5 R113N+K115S/T, G114N+L116S/T, K115N+M117S/T, L116N, L116N+S118T, S119N+H212S/T, L120N+L122S/T, H121N+K123S/T, K123N+Y125S/T, R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, R128N+L130S/T, L130N+Y132S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+E137S/T, K136N+Y138S/T, E137N, Y138N+H140S/T, H140N+A142S/T, V148N+I150S/T,
 10 R152N+F154S/T, Y155N+I157S/T, L160S/T, R159N+T161S, R159N, G162N+L164S/T, 和 Y163N+R165S/T, 所述取代相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列来表示。

10. 根据权利要求 1-9 任一项的组合物, 其中该干扰素多肽是还含有 C17S 突变的干扰素 β 多肽, 所述取代相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人
 15 干扰素 β 的氨基酸序列来表示。

11. 根据权利要求 1-3, 5, 6, 8-9 中任一项的组合物, 其中该干扰素 β 多肽选自

- Q49N+Q51T;
 F111N+R113T;
 20 Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 C17S+Q49N+Q51T+L98P+F111N+R113T;
 S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T ;
 S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T+F111N+R113T;
 C17S+Q49N+Q51T+F111N+R113T;
 25 C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;
 C17S+Q48F+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;
 C17S+Q48Y+Q49N+Q51T+D110Y+F111N+R113T;
 K19R+K45R+K123R;
 K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;
 30 C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;
 C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;

C17S+K19R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;

C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R;

C17S+K19R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R;

S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+K123R;

5 C17S+K19R+K45R+Q48F+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R;

S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+D110F+F111N+R113T+K123R;

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T;

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R;

C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T; 和

10 C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;

所述取代相对于 SEQ ID NO 1 所示野生型人干扰素 β 的氨基酸序列来表示。

12. 根据权利要求 1-6 任一项的组合物, 其中该干扰素多肽是干扰素 γ 多肽。

13. 根据权利要求 12 的组合物, 其中该干扰素 γ 多肽是野生型人干扰素 γ 或其变体。

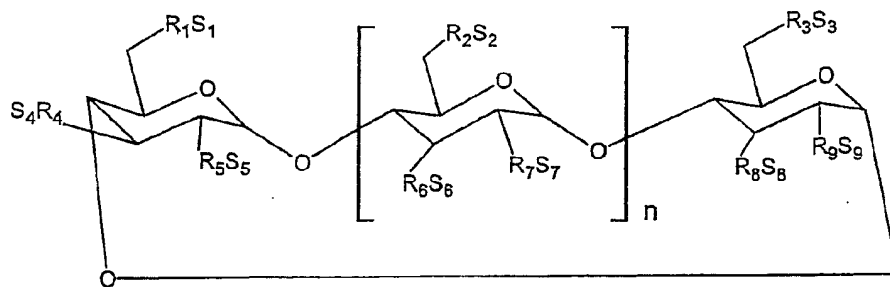
14. 根据权利要求 13 的组合物, 其中该干扰素 γ 多肽是人野生型干扰素 γ 的含有取代 S99T 的变体, 该取代相对于 SEQ ID NO 2 所示的野生型人干扰素 γ 的氨基酸序列表示。

15. 根据权利要求 14 的组合物, 其中该变体还含有取代 E38N+S40T, 该取代相对于 SEQ ID NO 2 所示的野生型人干扰素 γ 的氨基酸序列表示。

16. 根据权利要求 12-15 任一项的组合物, 其中该干扰素 γ 多肽在 C-末端截短了 1-15 个氨基酸残基。

17. 根据权利要求 1-16 任一项的组合物, 其中该磺基烷基醚环糊精衍生物是式(I)的化合物:

25



30 其中

n 是 4, 5 或 6,

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8,$ 和 R_9 分别独立地是, $-O-$ 或 $-O-(C_2-C_6$ 亚烷基)- SO_3- 基团, 其中 R_1 和 R_2 中至少一个独立地是 $-O-(C_2-C_6$ 亚烷基)- SO_3- 基团, 且

$S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8$ 和 S_9 分别独立地是可药用的阳离子。

5 18. 根据权利要求 17 的组合物, 其中该磺基烷基醚环糊精是 β 环糊精磺基丁基醚, 例如其盐形式, 例如其钠盐, 优选 Captisol®。

19. 根据权利要求 1-18 任一项的组合物, 其中所述的磺基烷基醚环糊精衍生物以从 1 mg/ml 至 150 mg/ml 的浓度存在。

10 20. 根据权利要求 1-19 任一项的组合物, 其中所述的干扰素多肽以相应于 1-100 MIU/ml, 例如 1-50 MIU/ml 的液体配制品, 或者 1-100 MIU/剂, 例如 1-50 MIU/剂的固体配制品的量存在。

21. 根据权利要求 1-20 任一项的组合物, 其中所述的组合物的 pH 范围为 4-8, 优选 pH 5-8, 或另选 4-7。

22. 根据权利要求 1-21 任一项的组合物, 它还含有一种缓冲剂。

15 23. 根据权利要求 22 的组合物, 其中所述的缓冲剂以高达 100 mM 的浓度存在。

24. 根据权利要求 1-23 任一项的组合物, 其中所述的组合物是一种液体等渗溶液且具有大约 240-360 mOsmol/kg 的摩尔渗透压浓度。

25. 根据权利要求 1-24 任一项的组合物, 它还含有一种张度剂。

20 26. 根据权利要求 1-23 任一项的组合物, 它是干燥形式或液体配制品, 例如水溶液或悬液。

27. 根据权利要求 1-26 任一项的组合物, 它是液体溶液, 例如水溶液。

28. 根据权利要求 26 的组合物, 它是冷冻的液体配制品, 喷雾干燥, 或者冷冻干燥的配制品形式。

25 29. 根据上述权利要求任一项的组合物, 它适合于肠胃外, 鼻或肺给药。

30. 根据权利要求 29 的组合物, 它适合于静脉内, 肌肉内或皮下给药。

31. 根据权利要求 1-30 任一项的组合物, 它还包含另一种赋形剂。

32. 根据权利要求 1-31 任一项的组合物, 它还包含能够减少干扰素多肽的聚集和/或化学降解的第二种稳定剂。

30 33. 根据权利要求 1-32 任一项的组合物, 它还含有一种保存剂和/或增粘剂。

34. 根据权利要求 1-32 任一项的组合物, 它不含保存剂。
35. 根据权利要求 1-34 任一项的组合物, 它还含有 HSA。
36. 根据权利要求 1-34 任一项的组合物, 它不含 HSA。
37. 根据权利要求 1-36 任一项的组合物, 它还含有一种表面活性剂,
5 例如非离子表面活性剂。
38. 根据权利要求 1-36 任一项的组合物, 它不含表面活性剂, 特别是非离子表面活性剂。
39. 根据权利要求 1-38 任一项的组合物, 其中该干扰素多肽在 a)37°C 的温度下贮存至少 1 周和/或 b)25°C 的温度下贮存至少 4 周期间基本上保留
10 其抗病毒活性。
40. 根据权利要求 7-39 任一项的组合物, 其中该干扰素多肽还包含多聚体分子, 例如聚乙二醇。
41. 根据权利要求 40 的组合物, 其中该多聚体分子包含一个 PEG 分子。
42. 含有根据权利要求 1-41 任一项的组合物的主要产品容器。
- 15 43. 根据权利要求 42 的容器, 它是预装的注射器。
44. 一种增强配制成药用组合物的干扰素多肽的稳定性的方法, 所述的方法包括向所述组合物中掺入磺基烷基醚环糊精衍生物, 并可选包含一种缓冲剂。
45. 根据权利要求 44 的方法, 其中该干扰素多肽在贮存期间表现出聚集体形成, 且该磺基烷基醚环糊精衍生物的掺入量足以减少干扰素多肽的聚集体形成。
20 体形成。
46. 根据权利要求 44 或 45 的方法, 其中该组合物按权利要求 1-41 任一项限定。
47. 对哺乳动物进行干扰素治疗的方法, 该方法包含施用治疗上有效量的
25 根据权利要求 1-41 任一项的组合物。
48. 根据权利要求 1-41 任一项的组合物作为药物的用途。
49. 根据权利要求 1-41 任一项的组合物在制备用于治疗疾病或紊乱的药物中的用途。

干扰素配制品

5 技术领域

本发明涉及诸如药用干扰素组合物的干扰素组合物及其制备方法。具体地说它涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物(sulfoalkyl ether cyclodextrin derivative)的稳定组合物。

背景技术

10 干扰素是重要的细胞因子，其特征在于具有抗病毒，抗增生，和免疫调节活性。这些活性形成了在包括肝炎，各种癌症和多发性硬化的许多疾病中观察到的临床疗效的基础。I型干扰素包括干扰素 α ， β ， τ 和 ω ，而干扰素 γ 是不同类型的II型中唯一已知的成员。干扰素的综述参见 Aggarwall 和 Gutterman，在 Human Cytokines, 第I卷，Blackwell Science, Inc. 1996 中。

15 干扰素 β 及其变体和偶联物在 WO 01/15736 和 PCT/DK02/00128 中进行了描述，本文引用其内容以供参考。

干扰素 γ 是由T-淋巴细胞和天然杀伤细胞产生的一种细胞因子且作为两个非共价结合的多肽亚基的同型二聚体存在。各单体的成熟形式包含143个氨基酸残基(以 SEQ ID NO: 2 表示)且包含信号序列的其前体形式含有166个
20 氨基酸残基(以 SEQ ID NO: 3 表示)。

各亚基在位置 25 和 97 具有两个潜在的 N-糖基化位点 (Aggarwal 等，Human Cytokines, Blackwell Scientific Publications, 1992)。根据糖基化程度，二聚体形式的干扰素 γ 的分子量是 34-50 kDa(Farrar 等，Ann. Rev. Immunol, 1993,11: 571-611)。

25 野生型人干扰素的一级序列由 Gray 等(Nature 298: 859-863, 1982)，Taya 等(EMBO J. 1: 953-958, 1982)，Devos 等(Nucleic Acids Res. 10: 2487-2501, 1982)和 Rinderknecht 等(J. Biol. Chem.259: 6790-6797,1984)，和在 EP 77670, EP 89676 和 EP 110044 中进行了报导。

干扰素 γ 变体及其偶联物在 WO 01/36001 中描述，本文引用其内容以供
30 参考。

通过 X-射线晶体学测定的野生型人干扰素 γ 的实验三维结构已由 Ealick

等, Science 252: 698-702 (1991)报导, 他们报导了干扰素 γ 同型二聚体的 C- α 痕迹。Walter 等, Nature 376: 230-235 (1995)公开了与两分子的干扰素 γ 受体可溶形式复合的干扰素 γ 同型二聚体的结构。然而, 该结构的坐标不能公开获得。Thiel 等, Structure 8: 927-936 (2000)表明与两分子的干扰素 γ 受体可溶形式复合的干扰素 γ 同型二聚体的结构具有在结构上不与干扰素 γ 同型二聚体发生相互作用的第三个受体分子。

作为药用化合物, 使用重组人干扰素 γ 取得了某些成功, 尤其是对某些病毒感染和肿瘤。重组人干扰素 γ 通常适用于通过肠胃外, 优选通过皮下, 进行注射。

10 与干扰素配制成药用产品相联系认识到的一个问题是干扰素多肽的聚集。已尝试通过使用各种稳定剂来解决这一问题, 例如, 在 WO 98/28007, WO 99/15193 和 WO 01/24814 中所述。商业上可得到的干扰素 β 产品已经通过使用人血清白蛋白来稳定。

发明简述

15 根据本发明, 提供了新的含有干扰素的药用组合物, 该组合物包含磺基烷基醚环糊精衍生物作为稳定剂。

因此, 本发明的第一个方面涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定的药用组合物。

20 术语“干扰素多肽”试图表示表现出干扰素活性, 例如由 Aggarwel 和 Gutterman, 出处同上限定的活性的多肽。

干扰素多肽一般选自由干扰素 α , 干扰素 β , 干扰素 ω , 干扰素 τ , 干扰素 ϵ 和干扰素 γ 组成的组中。

本发明的另一方面涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的第一产品容器。

25 本发明的另一方面涉及增加配制成药用组合物的干扰素多肽的稳定性的方法, 所述的方法包含在所述的组合物中掺入磺基烷基醚环糊精衍生物和任选的一种缓冲剂。

本发明的另一方面涉及对哺乳动物进行干扰素治疗的方法, 该方法包括施用治疗上有效量的含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物。

30 本发明的另一方面涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的药用组合物。

本发明的另一方面涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物在制备用于治疗疾病或紊乱的药物中的用途。

当干扰素多肽是干扰素 α ，或干扰素 β ，或其变体或偶联物时，本发明提供了用于治疗大多数类型的病毒感染，癌症或肿瘤或肿瘤血管形成，

5 Chrohn's 疾病，溃疡性结肠炎，Guillain-Barré 综合征，神经胶质瘤，原发性肺纤维变性，异常细胞生长，或者用于任何合适的动物，优选哺乳动物，且特别是人类的免疫调节的组合物和方法。例如，本发明的组合物可用于治疗骨肉瘤，基层细胞癌，卵巢癌，颈发育异常，颈癌，喉乳头瘤病，真菌类霉菌病，神经胶质瘤，急性骨髓白血病，多发性骨髓瘤，何杰金氏病，黑素瘤，

10 乳腺癌，非小细胞肺癌，恶性黑素瘤(辅药，晚期，以及预防剂)，类癌瘤，B-细胞淋巴瘤，T-细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，卡波西肉瘤，慢性骨髓性白血病，肾细胞癌，复发性表面膀胱癌，结肠直肠癌，多毛细胞白血病，和病毒性感染，例如乳头瘤病毒，病毒性肝炎，生殖器疱疹，带状疱疹，疱疹性角膜炎，单纯疱疹，病毒性脑炎，巨细胞病毒性肺炎，鼻病毒慢性顽固性肝

15 炎，慢性病期 HCV (I 型)，慢性病期 HCV (II 型)和慢性乙肝。具体地说，本发明的多肽或组合物可用于多发性硬化(MS)的治疗，例如公认的 4 种类型的 MS(良性，复发减轻型 MS (RRMS)，原发型进行性 MS (PPMS)和继发型进行性 MS (SPMS)) 中的任一种和用于单症状 MS，癌症或肿瘤，肝炎，例如乙肝和丙肝，或者疱疹感染的治疗(后一种治疗任选与 IL-10 治疗结合)。

20 当干扰素多肽是干扰素 γ 或其变体或偶联物时，本发明的组合物可用于治疗 WO 01/36001 中描述的任一医学适应征，特别是间质肺疾病，最具体地说是原发性肺纤维变性。已有建议将干扰素 γ 用于治疗间质肺疾病(IPF)，为了该目的，干扰素 γ 可与强的松龙结合使用。除了 IPF 外，肉芽肿疾病，某些分枝杆菌感染，肾癌，骨硬化病，硬皮病，乙肝，丙肝，脓毒性休克，和

25 类风湿性关节炎可用干扰素 γ 治疗。

在另一方面，本发明涉及含有根据本发明的组合物的试剂盒。

发明详述

术语“稳定”试图表示该组合物与不含磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物相比具有增加的贮存稳定性。例如，在以液体配制品本身贮存或者以冷冻

30 状态贮存且使用前融化的液体配制品中，在以后使用前重新组成液体形式的干燥形式，例如冻干，喷雾干燥或空气干燥形式中，在例如，打算用于肺或

鼻给药的固体形式中,和/或在例如,制备用于特殊给药系统的任何其它形式(例如微球体等等)中观察到增加的贮存稳定性。该增加的贮存稳定性一般根据在相同贮存条件下与对照组合物相比增加的生物活性来测量。该增加的贮存稳定性试图包含物理和/或化学稳定性。

- 5 术语“生物活性”试图表示通过任何合适的试验测定的体外和/或体内生物活性。例如,生物活性可根据与目的干扰素多肽相关的本领域已知的方法以抗病毒活性,抗增殖活性,免疫调节活性,受体结合/活化活性等进行测量。

已经发现磺基烷基醚环糊精衍生物对在贮存期间形成聚集的干扰素多肽具有极大的稳定活性。因此,本发明发现了用于稳定该干扰素多肽的具体用途。另外,根据本发明可稳定在贮存期间由于其它原因,例如在贮存期间由于化学或其它物理降解而丧失活性的干扰素多肽。

术语“聚集体形成”试图表示导致形成低聚物的干扰素多肽之间的物理相互作用。聚集体形成是不受欢迎的,因为在大多数情况下它导致减小或者甚至丧失生物活性和/或增加免疫原性。当本发明的组合物是液体组合物时,聚集体可保持可溶或者以大型可见聚集体的形式从溶液中沉淀出来。当该组合物是干燥形式时,在其制备期间可形成聚集体导致得到次等配制品。该聚集体形成可通过视觉检查来测量,或者以任何合适的分光光度装置测量。

干扰素多肽

本发明一般适用于所有类型的干扰素,包括从天然来源(例如,人白细胞或成纤维细胞)分离的干扰素,重组产生的天然存在的或变体干扰素,以及化学合成的干扰素。例如,干扰素多肽可以是,但不限于是I型干扰素或II型干扰素,例如选自由干扰素 α ,干扰素 β ,干扰素 ω ,干扰素 τ ,干扰素 ϵ 和干扰素 γ 组成的组中。

干扰素多肽可具有天然发现的氨基酸序列(野生型干扰素)或者可以是该野生型干扰素的变体。

更具体地说,干扰素多肽可以是含有一个或多个氨基酸修饰,即,缺失,插入或取代,且表现出干扰素活性的野生型干扰素的变体。该修饰可以位点特异性方式(例如,通过使用定点诱变)或以随机或半随机方式,例如,通过使用随机或局部随机诱变,例如在WO 01/04287中限定的诱变,或者通过使用定向进化技术,例如,按Stemmer, Bio/Technology 13: 549-553 (1995), US 5,605,793, US 5,830,721, US 5,811,238等所述的技术进行。一般来说,

该变体包含最多 15 个氨基酸的修饰, 例如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个修饰。最优选的是, 该干扰素多肽是人干扰素(具有天然存在的人干扰素的氨基酸序列)或其变体。

术语“偶联物”(或者可互换的“偶联多肽”)试图表示通过一个或多个干扰素多肽与一个或多个非多肽半分子的共价连接形成的杂合(以复合或嵌合的含义)分子。术语共价连接是指干扰素多肽和非多肽半分子互相之间直接共价连接, 或者通过诸如桥接, 间隔, 或一个或多个连接半分子的一个或多个间插半分子在互相之间的间接共价连接。优选的是, 偶联的干扰素多肽在有关浓度和条件下是可溶的, 即, 在诸如血液的生理学液体中是可溶的。偶联的干扰素多肽的例子包括糖基化和/或 PEG 化的干扰素多肽。术语“非偶联的多肽”可用于偶联的干扰素多肽的多肽部分。

与特定修饰相联系使用的术语“区别”或“不同”打算允许存在除了该特定氨基酸区别外的其它区别。因此, 除了导入本文公开的特定修饰外, 如果需要, 该干扰素多肽可包含其它修饰。例如, 它们可包括在 N-末端添加一个或多个额外的残基, 例如在 N-末端添加一个 Met 残基和/或截短一个或多个 C-末端残基以及“保守氨基酸取代”, 即在具有相似特征, 例如, 小氨基酸, 酸性氨基酸, 极性氨基酸, 碱性氨基酸, 疏水氨基酸和芳香氨基酸的氨基酸组内进行的取代。具体地说, 保守取代的例子可选自下表所列的组中。

1	丙氨酸(A) 甘氨酸(G) 丝氨酸(S) 苏氨酸(T)
2	天冬氨酸(D) 谷氨酸(E)
3	天冬酰胺(N) 谷酰胺(Q)
4	精氨酸(R) 组氨酸(H) 赖氨酸(K)
5	异亮氨酸(I) 亮氨酸(L) 甲硫氨酸(M) 缬氨酸(V)
6	苯丙氨酸(F) 酪氨酸(Y) 色氨酸(W)

术语“随机诱变”是指对于受试核酸内的突变位点是随机的且对于导入的突变是随机的诱变方法, 例如, 化学诱变, 紫外或 γ 照射, 通过修复缺陷细胞的传代等。术语“局部诱变”用于表示诱变方法优先在受试核酸的预定部分或子序列中发生。在本发明上下文中, “定点诱变”是指在一个或多个预定的核苷酸位置的改变, 通常以改变编码的氨基酸序列内的一个或多个氨基酸残基为目的。定点诱变通常根据待修饰的多肽的一级或三级(例如模型)结构的分析进行设计。

术语“连接基团”试图表示能与诸如多聚体分子或糖类半分子的有关非多肽半分子偶联的氨基酸残基基团。有用的连接基团及其匹配的非多肽半分子从下表中是显而易见的。

连接基团	氨基酸	非多肽半分子的例子	结合方法/活化的PEG	参考文献
-NH ₂	N-末端, Lys	多聚体, 例如 PEG	mPEG-SPA TresylatedmPEG	Shearwater Inc. Delgado 等, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 (3,4): 249-304(1992)
-COOH	C-末端, Asp, Glu	多聚体, 例如 PEG 糖类半分子	mPEG-Hz 体外偶联	Shearwater Inc
-SH	Cys	多聚体, 例如 PEG 糖类半分子	PEG-乙烯砜 PEG-顺丁烯二酰亚胺 体外偶联	Shearwater Inc Delgado 等, critical reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9 (3,4): 249-304(1992)
-OH	Ser, Thr, OH-, Lys	糖类半分子	体内 O-连接的糖基化	
-CONH ₂	Asn 作为 N-糖基化位点的部分	糖类半分子	体内糖基化	
芳香残基	Phe, Tyr, Trp	糖类半分子	体外偶联	
-CONH ₂	Gln	糖类半分子	体外偶联	Yan 和 Wold, Biochemistry, 1984 年 7 月 31 日; 23(16): 3759-65
醛酮	氧化的糖类	多聚体, 例如 PEG, PEG-酰肼	PEG 化	Andresz 等, 1978, Makromol. Chem. 179:301; WO 92/16555, WO 00/23114
胍基	Arg	糖类半分子	体外偶联	Lundblad 和 Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc. Boca Raton, FL
咪唑环	His	糖类半分子	体外偶联	对于胍

- 对于体内 N-糖基化, 术语“连接基团”以非常规方式用于表示组成 N-糖基化位点的氨基酸残基(具有序列 N-X'-S/T/C-X", 其中 X'是除脯氨酸外的任一氨基酸残基, X"是与 X'相同或不同的任一氨基酸残基且优选不同于脯氨酸, N 是天冬酰胺, S/T/C 是丝氨酸, 苏氨酸或半胱氨酸之一, 优选是丝氨酸或苏氨酸, 且最优选是苏氨酸)。尽管 N-糖基化位点的天冬酰胺残基是糖基化期间连接糖类半分子的残基, 但是除非存在 N-糖基化位点的其它氨基酸残基, 否则不能完成该连接。因此, 当该非多肽半分子是糖类半分子且该连接通过 N-糖基化完成时, 术语“含有非多肽半分子的连接基团的氨基酸残基”与亲本多肽的氨基酸序列的改变相联系使用时应理解为构成 N-糖基化

位点的一个，两个或所有氨基酸残基以这样的方式改变，即将功能性 N-糖基化位点导入氨基酸序列中或者从所述的序列中去掉。

显然，当干扰素多肽是具有一个或多个连接的非多肽半分子的偶联物形式时，去掉和/或导入含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基是首选的。通过去掉和/或导入含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基，可优化与干扰素多肽偶联的非多肽半分子的数目和分布(例如，确保非多肽半分子在干扰素多肽表面的最佳分布，从而，例如，有效屏蔽多肽的表位和其它表面部分而不明显减小其功能)，正如在 WO 01/15736，和在 PCT/DK02/00128 中的详细解释。例如，通过导入连接基团，可提高或者改变相关非多肽半分子结合的特异性氨基酸残基的含量，从而实现更有效，更特异和/或更广泛的偶联。通过去掉一个或多个连接基团，可避免在部分多肽中与非多肽半分子的偶联，其中该偶联对于例如，位于或者靠近该多肽功能性位点的氨基酸残基是不利的(因为在该位点的偶联由于损害了受体识别导致所得的偶联物的干扰素活性失活或者降低)。另外，去掉紧靠另一连接基团的一个连接基团以避免与该基团的不均一偶联是有利的。

应明白去掉的或导入的含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基可根据非多肽半分子的特性，且在大多数情况下，根据使用的偶联方法来选择。例如，当该非多肽半分子是诸如聚乙二醇或聚环氧烷衍生分子的多聚体分子时，能作为连接基团起作用的氨基酸残基可选自由赖氨酸，半胱氨酸，天冬氨酸，谷氨酸和精氨酸组成的组中。当该非多肽半分子是糖类半分子时，连接基团是体内糖基化位点，优选是 N-糖基化位点。

导入或去掉的氨基酸残基一般位于干扰素多肽的表面暴露位置，优选在被这样的氨基酸残基占据的位置，即该氨基酸残基具有超过 25% 的其侧链与溶剂接触，优选超过 50% 的其侧链与溶剂接触。而且，它与去掉占据干扰素多肽中位于受体结合位点的位置的连接基团相关。另外，它与将连接基团导入位于干扰素多肽中的位置或其表位相关。该位置可根据对干扰素多肽的三维结构的分析或者通过任一其它合适的方法，例如在使用干扰素 β 作为例子的 WO 01/15736 中所述的方法进行鉴定。

导致在暴露于干扰素 β 多肽表面且被具有超过 25% 的侧链暴露于表面的氨基酸残基占据的位置导入另一 N-糖基化位点的取代包括：

S2N+N4S/T, L6S/T, L5N+G7S/T, F8N+Q10S/T, L9N+R11S/T, R11N,

R11N+S13T, S12N+N14S/T, F15N+C17S/T, Q16N+Q18S/T, Q18N+L20S/T,
 K19N+L21S/T, W22N+L24S/T, Q23N+H25S/T, G26N+L28S/T,
 R27N+E29S/T, L28S+Y30S/T, Y30N+L32S/T, L32N+D34S/T, K33N+R35S/T,
 R35N+N37S/T, M36N+F38S/T, D39S/T, D39N+P41S/T, E42N+I44S/T,
 5 Q43N+K45S/T, K45N+L47S/T, Q46N+Q48S/T, L47N+Q49T/S,
 Q48N+F50S/T, Q49N+Q51S/T, Q51N+E53S/T, K52N+D54S/T, L57N+I59S/T,
 Q64N+I66S/T, A68N+F70S/T, R71N+D73S/T, Q72N, Q72N+S74T, D73N,
 D73N+S75T, S75N+T77S, S75N, S76N+G78S/T, E81N+I83S/T,
 T82N+V84S/T, E85N+L87S/T, L88S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T,
 10 Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T, L98S/T, H97N+K99S/T, K99N+V101S/T,
 T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, K105N+E107S/T,
 E107N+E109S/T, K108N+D110S/T, E109N+F111S/T, D110N+T112S, D110N,
 F111N+R113S/T, R113N+K115S/T, G114N+L116S/T, K115N+M117S/T,
 L116N, L116N+S118T, S119N+H212S/T, L120N+L122S/T, H121N+K123S/T,
 15 K123N+Y125S/T, R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, R128N+L130S/T,
 L130N+Y132S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+E137S/T,
 K136N+Y138S/T, E137N, Y138N+H140S/T, H140N+A142S/T,
 V148N+I150S/T, R152N+F154S/T, Y155N+I157S/T, L160S/T, R159N+T161S,
 R159N, G162N+L164S/T, 和 Y163N+R165S/T, 该取代相对于 SEQ ID NO 1
 20 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。

导致在具有超过 50% 的侧链暴露于表面的暴露于干扰素 β 多肽表面的位置导入另一 N-糖基化位点的取代包括:

L6S/T, L5N+G7S/T, F8N+Q10S/T, L9N+R11S/T, S12N+N14S/T,
 F15N+C17S/T, Q16N+Q18S/T, K19N+L21S/T, W22N+L24S/T,
 25 Q23N+H25S/T, G26N+L28S/T, R27N+E29S/T, Y30N+L32S/T,
 K33N+R35S/T, R35N+N37S/T, M36N+F38S/T, D39S/T, D39N+P41S/T,
 E42N+I44S/T, Q46N+Q48S/T, Q48N+F50S/T, Q49N+Q51S/T, Q51N+E53S/T,
 K52N+D54S/T, L57N+I59S/T, R71N+D73S/T, D73N, D73N+S75T,
 S75N+T77S, S75N, S76N+G78S/T, E81N+I83S/T, T82N+V84S/T,
 30 E85N+L87S/T, A89N+V91S/T, Y92S/T, Y92N+Q94S/T, H93N+I95S/T,
 T100N+L102S/T, E103N+K105S/T, E104N+L106S/T, E107N+E109S/T,

K108N+D110S/T, D110N+T112S, D110N, F111N+R113S/T, R113N+K115S/T, L116N, L116N+S118T, K123N+Y125S/T, R124N+Y126S/T, G127N+I129S/T, H131N+L133S/T, K134N+K136S/T, A135N+E137S/T, E137N, V148N+I150S/T, 和 Y155N+I157S/T, 该取代相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。

在上述取代中, 优选的是在 141 N-末端氨基酸残基中, 特别是在 116 N-末端氨基酸残基中具有导入的 N 残基的取代。

通过唯一一个氨基酸的取代导致导入一个 N-糖基化位点的取代包括: L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T, D110N, L116N, E137N, R159N 和 L160S/T, 该取代相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。其中, 优选的取代选自由 L6S/T, R11N, D39S/T, Q72N, D73N, S75N, L88S/T, Y92S/T, L98S/T, D110N 和 L116N 组成的组中, 更优选的是选自由 L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N, L116N 和 E137N 组成的组中; 且最优选的是选自由 L6S/T, D39S/T, D73N, S75N, L88S/T, D110N 和 L116N 组成的组中。

优选的是, 导入的含有非多肽半分子的连接基团的氨基酸残基产生新的 N-糖基化位点或新的 PEG 化位点。

另外, 当干扰素多肽含糖基化位点时, 可优化该位点的利用。通过修饰紧靠所述糖基化位点的氨基酸残基可实现这一点, 该修饰属于导致增加糖基化的类型。一般来说, 体内糖基化位点是 N-糖基化位点, 但它也可以是 O-糖基化位点。

在本发明上下文中, 术语“增加的糖基化”试图表示连接的糖类分子水平提高, 一般由于一个或多个糖基化位点的利用提高(或更好)而获得。通过用于分析连接的糖类结构的本领域已知的任何合适方法可测定增加的糖基化。

在本发明上下文中术语“体内 N-糖基化程度增加”或“N-糖基化程度增加”试图表示连接的糖类分子水平提高, 一般由于一个或多个 N-糖基化位点的利用提高(或更好)而获得。对于干扰素 γ , 熟知的是(Hooker 等, 1998, J. Interferon and Cytokine Res. 18, 287-295 和 Sarenva 等, 1995, Biochem J., 308,9-14)当野生型人干扰素 γ 在 CHO 细胞中表达时只有大约 50% 的干扰素 γ 多肽利用了两个糖基化位点, 大约 40% 利用了一个糖基化位点(1N), 且大约 10% 没有被糖基化(0N)。通过本领域已知的任何合适的方法, 例如, 通过

SDS-PAGE 可测定体内 N-糖基化程度的增加。

术语“表现出干扰素 γ 活性”试图表示该干扰素 γ 多肽具有天然人干扰素 γ 或重组人干扰素 γ 的一种或多种功能，包括与干扰素 γ 受体结合并引起转导体外或体内测定的人干扰素 γ 结合其受体时转导的信号的能力(即体外或
5 体内生物活性)。Aguet 等(Cell 55: 273-280,1988)和 Calderon 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4837-4841, 1988)描述了该干扰素 γ 受体。检测干扰素 γ 活性的合适的试验是本文公开的题为“一级试验”的试验。

“干扰素 γ 多肽”是表现出干扰素 γ 活性的多肽，且合适时，本文用于以单体或二聚体形式的干扰素 γ 多肽。例如，当表示具体取代时，它们一般相
10 对于干扰素 γ 多肽单体表示。应明白术语“干扰素 γ 多肽”也包含野生型干扰素 γ 多肽的 C-末端截短的和变体形式。该变体的具体例子包括具有诸如 S99T, E38N+S40T 的修饰的变体及其 C-末端截短形式。合适的修饰的更多例子在下文给出。

一般来说，干扰素 γ 多肽的变体形式与人干扰素 γ 相比(或者如果需要其
15 截短形式，与相应截短的人干扰素 γ 相比)有 1-15 个氨基酸残基的区别(例如有 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个氨基酸残基的区别)，例如有 1-10 个氨基酸残基，1-5 个氨基酸残基或 1-3 个氨基酸残基的区别。

如上所述，已知可从 C-末端缺失 1-15 个氨基酸残基而不消除该多肽的
20 干扰素 γ 的活性。因此，术语“干扰素 γ 多肽”也包含这样的干扰素 γ 多肽(具有人野生型序列或其变体)，其中 1-15 的干扰素 γ 多肽是 C-末端截短 1-15 个氨基酸残基。一个具体的例子包括 C-末端截短 3 个氨基酸残基的干扰素 γ 多肽。

术语“人干扰素 γ ”试图表示具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的野生型
25 人干扰素 γ 的成熟形式。

术语“重组人干扰素 γ ”试图包含以重组方式产生的具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的野生型人干扰素 γ 的成熟形式。

本文使用的术语“Actimmune[®]”是指通过发酵遗传改造的大肠杆菌细菌获得的干扰素 γ 的 140 个氨基酸的形式(以 SEQ ID NO: 4 公开)。Actimmune[®]
30 的其它信息可在 www.actimmune.com 上获得。

氨基酸残基“位于靠近”糖基化位点通常是位于相对于糖类连接的糖基

化位点的氨基酸残基的-4, -3, -2, -1, +1, +2, +3 或+4 位。该位置可选自-1, +1, 或+3 位, 特别是在+1 或+3 位。因此, 位于靠近 N-糖基化位点(具有序列 N-X'-S/T/C-X'')的氨基酸残基相对于 N 残基位于-4, -3, -2, -1 位, 在 X' 或 X'' 位(在这种情况下导入的氨基酸残基优选不同于脯氨酸), 或在相
5 对于 X'' 残基的+1 位。氨基酸修饰一般是取代, 取代用与未修饰的多肽相比导致干扰素多肽糖基化增加的任一其它氨基酸残基进行。这一其它氨基酸残基可通过试验和差错型实验来测定(即, 通过将有关位置的氨基酸残基取代成任一其它氨基酸残基, 并测定所得变体的所得糖基化)。

当修饰相对于 N-残基的+2 位时, 应明白只有有限数目的修饰是可能的,
10 因为为了保留/导入体内 N-糖基化位点, 所述位置的氨基酸残基可以是 Ser, Thr 或 Cys 之一。在一个特别优选的实施方案中, 相对于体内 N-糖基化位点的+2 位的氨基酸残基的修饰是所述氨基酸残基被 Thr 残基取代的取代。另一方面, 如果所述的氨基酸残基已经是 Thr 残基, 一般在该位置不优选或者不必进行任何取代。当修饰 X' 时, X' 应不是 Pro 且优选不是 Trp, Asp, Glu
15 和 Leu。如果修饰 X', 需导入的氨基酸残基优选自由 Phe, Asn, Gln, Tyr, Val, Ala, Met, Ile, Lys, Gly, Arg, Thr, His, Cys 和 Ser 组成的组中, 更优选 Ala, Met, Ile, Lys, Gly, Arg, Thr, His, Cys 和 Ser, 特别是 Ala 或 Ser。当修饰相对于 N-残基的+3 位置时, 需导入的氨基酸残基优选自由
20 His, Asp, Ala, Met, Asn, Thr, Arg, Ser 和 Cys 组成的组中, 更优选 Thr, Arg, Ser 和 Cys。如果 X' 残基是 Ser 残基, 该修饰特别适当。

另外, 可通过例如, 用诸如中性氨基酸残基, 例如 Gly, Val, Ala, Leu, Ile, Tyr, Phe, His, Trp, Ser, Thr 或 Met 的另一氨基酸残基, 优选 Ser
或 Thr 取代可去掉干扰素多肽的游离半胱氨酸(即, 不形成半胱氨酸桥键的一部分的半胱氨酸残基), 例如, 按 US 4,959,314 或 EP 192,811 中所述。

25 干扰素多肽可用非多肽半分子, 例如, 诸如聚乙二醇的多聚体分子或糖类半分子(当干扰素多肽被糖基化时)进行衍生化。

术语“非多肽半分子”试图表示能与本发明的多肽的连接基团偶联的分子。该分子的优选例子包括多聚体分子, 糖类半分子, 亲脂性化合物, 或有
机衍生剂。在本发明的偶联物的上下文中使用时, 应明白非多肽半分子通过
30 该多肽的连接基团与偶联物的多肽部分连接。

术语“多聚体分子”定义为由两个或多个单体共价连接形成的分子, 其中

单体中没有一个是氨基酸残基，除非该多聚体是人白蛋白或另一高丰度血浆蛋白质。术语“多聚体”与术语“多聚体分子”可互换使用。该术语试图包含经体外糖基化，即，正常情况下涉及任选使用交联剂将糖类分子共价连接到多肽的连接基团上的体外进行的合成糖基化，连接的糖类分子。通过诸如 N-或 O-糖基化的体内糖基化连接的糖类分子(如下面的进一步描述)本文称为“糖类半分子”。除了特意表明偶联物中诸如多聚体分子或糖类半分子的非多肽半分子的数目的情况外，每次提及偶联物中所含的或者本发明中使用的“一个非多肽半分子”应当是指偶联物中的一个或多个诸如多聚体分子或糖类半分子的非多肽半分子。

10 当干扰素多肽包含导入的含有非多肽半分子的连接基团的氨基酸残基时，该非多肽半分子优选与该氨基酸残基连接。

在第一个方面，本发明涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定化组合物。

15 在第二个方面，本发明涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定化药用组合物。

在一个实施方案中，该磺基烷基醚环糊精衍生物以从 1 mg/ml 到 150 mg/ml，例如从 5 mg/ml 到 100 mg/ml 的浓度存在。

20 在一个实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个导入的和/或至少一个去掉的含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基。在另一实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个导入的和至少一个去掉的含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基。在另一实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个导入的含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基。在另一实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个去掉的含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基。

25 在另一实施方案中，该非多肽半分子包含诸如聚乙二醇的多聚体分子，或糖类半分子。在一个具体实施方案中，该多聚体分子包含聚乙二醇。在另一具体实施方案中，该非多肽半分子包含糖类半分子，特别是在哺乳动物细胞，优选 CHO 细胞中表达干扰素多肽获得的糖类半分子。

30 在另一实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个导入的糖基化位点，和至少一个与导入的糖基化位点连接的糖类半分子。在另一实施方案中，该干扰素多肽包含至少一个导入的糖基化位点，和至少一个与导入的糖基化位点连接的糖类半分子，和一个诸如聚乙二醇的多聚体分子。在一个特别优选的

实施方案中，该干扰素多肽包含 3 个糖类半分子，每个糖类半分子与 N-糖基化位点相连。

在一个优选的实施方案中，干扰素多肽被糖基化和/或 PEG 化。在另一实施方案中，干扰素多肽被糖基化和 PEG 化。在另一实施方案中，干扰素多肽被糖基化。在另一实施方案中，干扰素多肽被 PEG 化。当干扰素多肽被糖基化时，优选被 N-糖基化。当干扰素多肽被糖基化时，它通常含有 1-5 个糖类半分子，例如 1-3 个糖类半分子。在另一实施方案中，干扰素多肽被 N-糖基化，且包含 1-5 个糖类半分子，例如 1-3 个糖类半分子。当干扰素多肽被 PEG 化时，它通常含有 1-5 个聚乙二醇 (PEG) 分子。在另一实施方案中，干扰素多肽包含 1-5 个 PEG 分子，例如 1, 2 或 3 个 PEG 分子。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 5 kDa(千道尔顿)至 100 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 10 kDa 至 40 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 12 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 20 kDa 的分子量。优选的干扰素多肽包含 1-3 个分别具有大约 12 kDa 分子量的 PEG 分子，或具有大约 20 kDa 分子量的 1 个 PEG 分子。合适的 PEG 分子可从 Shearwater Polymers 公司和 Enzon 公司获得且可选自 SS-PEG, NPC-PEG, 醛基-PEG, mPEG-SPA, mPEG-SCM, mPEG-BTC, SC-PEG, tresylated mPEG(US 5,880,255), 或氧羰基-氧-N-二羧酰亚胺-PEG(US 5,122,614)。

在一个优选的实施方案中，干扰素多肽是干扰素 β 多肽，例如，野生型人干扰素 β 或其变体，任选与非多肽半分子连接。

例如，干扰素 β 多肽可以是野生型人干扰素 β 的变体，其中在位置 17 的半胱氨酸残基缺失或者被诸如上述中性氨基酸残基的另一氨基酸残基取代。例如，该干扰素 β 多肽包含 C17S 突变，取代用相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。

在优选的实施方案中，该干扰素 β 多肽是 WO 01/15736 中所述的任一多肽。在另一优选的实施方案中，干扰素 β 多肽是在 PCT/DK02/00128 中所述的任一多肽。优选的变体包括在例如，S2, Q49, Q51, 或 F111 位置具有至少一个导入的糖基化位点的变体；和在例如，K19, K33, K45 或 K123 位置具有至少一个去掉的 PEG 化位点的变体。

在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含与干扰素 β 多肽共价连接的至

少一个第一非多肽半分子的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 区别在于导入了至少一个并去掉了至少一个含有所述第一非多肽半分子连接基团的氨基酸残基。

5 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含与干扰素 β 多肽的至少一个赖氨酸残基结合的至少一个第一非多肽半分子的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 区别在于导入了至少一个和/或去掉了至少一个赖氨酸残基。

10 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含与干扰素 β 多肽的至少一个半胱氨酸残基结合的至少一个第一非多肽半分子的偶联物，该多肽的氨基酸序列区别在于在野生型人干扰素 β 被表面暴露的氨基酸残基占据的位置导入了至少一个半胱氨酸残基。

15 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含具有酸性基团作为连接基团的至少一个第一非多肽半分子的偶联物，该半分子与干扰素 β 多肽的至少一个天冬氨酸或谷氨酸残基结合，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 区别在于导入了至少一个和/或去掉了至少一个天冬氨酸或谷氨酸残基。

在另一实施方案中，第一非多肽半分子包含诸如聚乙二醇的多聚体分子，或糖类半分子。

20 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含与干扰素 β 多肽共价连接的至少一个多聚体分子和至少一个糖类半分子的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 区别在于

a)导入了至少一个和/或去掉了至少一个含有该多聚体分子的连接基团的氨基酸残基，和

b)导入了至少一个和/或去掉了至少一个含有该糖类半分子的连接基团的氨基酸残基，

25 前提是当该多聚体分子的连接基团是半胱氨酸残基，且该糖类半分子是N-连接的糖类半分子时，不以破坏N-糖基化位点的方式插入半胱氨酸残基。

30 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含干扰素 β 多肽的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于导入了至少一个糖基化位点，该偶联物还含有与导入的糖基化位点连接的至少一个 un-PEG 化的糖类半分子。

在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含干扰素 β 多肽的偶联物，该多

肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于导入了至少一个糖基化位点，该偶联物还含有与导入的糖基化位点连接的至少一个糖类半分子。

因此，在一个具体方面，本发明涉及稳定化的组合物，包括：

5 a)含有干扰素 β 多肽的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于导入了至少一个糖基化位点，该偶联物还含有与导入的糖基化位点连接的至少一个糖类半分子，和

b)磺基烷基醚环糊精衍生物。

10 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含干扰素 β 多肽的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于通过在野生型人干扰素 β 被表面暴露的氨基酸残基占据的位置导入或去掉构成糖基化位点一部分的一个或多个氨基酸残基的方式导入或去掉了一个糖基化位点。

15 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含干扰素 β 多肽的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于通过在野生型人干扰素 β 被表面暴露的氨基酸残基占据的位置导入构成糖基化位点一部分的一个或多个氨基酸残基的方式导入了一个糖基化位点。

在还有另一实施方案中，干扰素 β 多肽是包含与干扰素 β 多肽共价连接的糖类半分子的偶联物，该多肽的氨基酸序列与野生型人干扰素 β 的区别在于去掉了至少一个糖基化位点。

20 在还有另一个实施方案中，干扰素 β 多肽是含有至少一个体内糖基化位点的亲本干扰素 β 多肽的糖基化变体，其中修饰了位于靠近所述糖基化位点的所述亲本多肽的氨基酸残基以获得与亲本干扰素 β 多肽的糖基化相比糖基化增加的变体多肽。

25 在另一实施方案中，干扰素 β 多肽包含选自由如下组成的组中的氨基酸取代 K19R+K45R+K123R； K19Q+K45R+K123R； K19R+K45Q+K123R；
K19R+K45R+K123Q； K19Q+K45Q+K123R； K19R+K45Q+K123Q；
K19Q+K45R+K123Q； K19Q+K45Q+K123Q； K45R+K123R； K45Q+K123R；
K45Q+K123Q； K45R+K123Q； K19R+K123R； K19Q+K123R； K19R+K123Q；
K19Q+K123Q； K19R+K45R； K19Q+K45R； K19R+K45Q； K19Q+K45Q；
K52R+K134R； K99R+K136R； K33R+K105R+K136R； K52R+K108R+K134R；
30 K99R+K115R+K136R； K19R+K33R+K45R+K123R； K19R+K45R+K52R+
K123R； K19R+K33R+K45R+K52R+K123R； K19R+K45R+K52R+K99R+

- K123R; K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R; K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T ; K19R+K45R+Q49N+Q51T+K123R ; S2N+N4T/S ; L9N+R11T/S ; R11N ; S12N+N14T/S ; F15N+C17S/T ; Q16N+Q18T/S ; K19N+L21T/S ; Q23N+H25T/S ; G26N+L28T/S ;
- 5 R27N+E29T/S; L28N+Y30T/S; D39T/S; K45N+L47T/S; Q46N+Q48T/S; Q48N+F50T/S; Q49N+Q51T/S; Q51N+E53T/S; R71N+D73T/S; Q72N; D73N; S75N ; S76N+G78T/S ; L88T/S ; Y92T/S ; N93N+I95T/S ; L98T/S ; E103N+K105T/S; E104N+L106T/S; E107N+E109T/S; K108N+D110T/S; D110N; F111N+R113T/S; L116N; S2N+N4T; L9N+R11T; 49N+Q51T;
- 10 F111N+R113T; R71N+D73T; 49N+Q51T; F111N+R113T; R71N+D73T; Q49N+Q51T+F111N+R113T; Q49N+Q51T+R71N+D73T+F111N+ R113T; S2N+N4T+F111N+R113T; S2N+N4T+Q49N+Q51T; S2N+N4T+Q49N+Q51T+F111N+R113T; S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T; S2N+N4T+L9N+R11T+F111N+R113T; S2N+N4T+L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T; L9N+
- 15 R11T+Q49N+Q51T; L9N+R11T+Q49N+Q51T+F111N+R113T; L9N+R11T+F111N+R113T; R27K+R159K; R27K+K45R+R159K; R27K+Q49K+E85K+A89K; R27K+K45R+Q49K+E85K+A89K; R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K; R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K; N4K+R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K ; N4K+R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K ; R27K+K123R+
- 20 R159K; R27K+K45R+K123R+R159K; R27K+Q49K+E85K+A89K+K123R; R27K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R ; R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K+K123R ; R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R ; N4K+R27K+D39K+Q49K+E85K+A89K+K123R; N4K+R27K+D39K+K45R+Q49K+E85K+A89K+K123R ; K19R+K45R+F111K+K123R ; K19R+K45R+Q49K+
- 25 F111K+K123R; K19R+K45R+Q49K+K123R; K19R+K45R+F111K; K19R+K45R+Q49K+F111K; K19R+Q49K+K123R; K19R+Q49K+F111K+K123R; K45Q+F111K+K123Q ; K45R+Q49K+K123R ; 或 K45R+Q49K+F111K+K123R; 该取代相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。各具体变体被认为是干扰素 β 变体的一个实施方案。
- 30 本发明感兴趣的的具体干扰素 β 变体包括选自由如下组成的组中的氨基酸取代 Q49N+Q51T ; Q49N+Q51T+F111N+R113T ; F111N+R113T ;

C17S+Q49N+Q51T+L980+F111N+R113T; S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T;
 S2N+N4T+C17S+Q51N+E53T+F111N+R113T; C17S+Q49N+Q51T+F111N+
 R113T; C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T; C17S+Q48F+Q49N+
 Q51T+D110F+F111N+R113T ; C17S+Q48Y+Q49N+Q51T+D110Y+
 5 F111N+R113T; K19R+K45R+K123R; K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+
 R113T+K123R; C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R;
 C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R ; C17S+K19R+
 Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R ; C17S+K19R+K45R+Q49N+Q51T+
 D110F+F111N+R113T+K123R ; C17S+K19R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+
 10 R113T+K123R; S2N+N4T+C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+K123R; C17S+
 K19R+K45R+Q48F+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R; S2N+N4T+
 C17S+K19R+K45R+Q51N+E53T+D110F+F111N+R113T+K123R ; C17S+
 K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T ; C17S+
 K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T+K123R ; C17S+
 15 K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T; 和 C17S+K19R+K33R+
 K45R+Q49N+Q51T+F111N+R113T+K123R; 该取代相对于 SEQ ID NO 1 所
 示的野生型人干扰素 β 的氨基酸序列表示。各具体变体被认为是干扰素 β 变
 体的一个实施方案。例如, 一个实施方案是 C17S+Q49N+Q51T+D110F+
 F111N+R113T; 另一个实施方案是 C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+
 20 D110F+F111N+R113T。上述具体变体中突变优选的实施方案是其中表示的
 取代仅仅是相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 的取代。

这些变体可以是偶联物的形式, 它还包含一个或多个非多肽半分子。例
 如, 该变体被糖基化和/或 PEG 化。当干扰素 β 多肽被糖基化时, 它优选被
 N-糖基化。当干扰素 β 多肽被糖基化时, 它通常含有 1-5 个糖类半分子,
 25 例如 1-3 个糖类半分子。在另一实施方案中, 干扰素 β 多肽被 N-糖基化,
 且含有 1-5 个糖类半分子, 例如 1-3 个糖类半分子。

当干扰素 β 多肽含有至少一个导入的糖基化位点时, 优选该多肽还含有
 与导入的糖基化位点连接的至少一个糖类半分子。具体地说, 该干扰素 β 多
 肽含有 2-5 个糖类半分子, 例如 2-3 个糖类半分子。在另一实施方案中,
 30 干扰素 β 多肽被 N-糖基化, 且包含 2-5 个糖类半分子, 例如 2-3 个糖类
 半分子。在一个特别优选的实施方案中, 干扰素 β 多肽包含 3 个糖类半分子,

每个糖类半分子与一个 N-糖基化位点连接。

当干扰素 β 多肽被 PEG 化时，它通常包含 1-5 个聚乙二醇(PEG)分子。在另一实施方案中，干扰素 β 多肽包含 1-5 个 PEG 分子，例如 1, 2 或 3 个 PEG 分子。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 5 kDa(千道尔顿)至 100 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 10 kDa 至 40 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 12 kDa 的分子量。在另一实施方案中，各 PEG 分子具有大约 20 kDa 的分子量。优选的干扰素 β 多肽包含 1-3 个分别具有大约 12 kDa 分子量的 PEG 分子，或 1 个具有大约 20 kDa 分子量的 PEG 分子。更优选干扰素 β 多肽含有至少一个与导入的糖基化位点连接的糖类半分子和 1 个具有大约 20Kda 分子量的 PEG 分子。最优选干扰素 β 多肽含有与 3 个 N-糖基化位点连接的 3 个糖类半分子和 1 个具有大约 20Kda 分子量的 PEG 分子。

干扰素多肽可按照本领域已知的方法生产。优选的是，干扰素多肽通过从糖基化宿主细胞中表达而重组产生(在 WO 01/15736, PCT/DK02/00128, 和 WO 01/36001 中进行了详细描述)。表达宿主细胞可选自真菌(丝状真菌或酵母)，昆虫，哺乳动物细胞，转基因植物细胞或转基因动物。另外，当在基因治疗中使用编码本发明的偶联物的多肽部分或本发明的多肽的核苷酸序列时，可在人体中完成糖基化。在一个实施方案中，宿主细胞是哺乳动物细胞，例如 CHO 细胞，BHK 或 HEK 细胞，例如 HEK293，或昆虫细胞，例如 SF9 细胞，或者酵母细胞，例如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)，*Pichia pastoris* 或者任何其它合适的糖基化宿主。合适的哺乳动物宿主细胞的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系，(例如，CHO-K1; ATCC CCL-61)，绿猴细胞系(COS)(例如 COS 1(ATCC CRL-1650)，COS 7(ATCC CRL-1651)); 小鼠细胞(例如 NS/O)，幼年仓鼠肾(BHK)细胞系(例如 ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10)，和人细胞(例如 HEK 293(ATCC CRL-1573))，以及组织培养物中的植物细胞。任选的是，通过体内糖基化与多肽连接的糖类半分子可通过使用糖基转移酶，例如使用 Neose, Horsham, PA, USA 销售的 glycoAdvance™ 技术进行进一步修饰。因此，例如可增加 CHO 细胞表达和体内糖基化之后的糖基化多肽的唾液酸化。

可按照本领域已知的方法纯化干扰素多肽以获得足够纯度的干扰素制品以便用作药物。一般来说，该纯化方法包括超滤，渗滤，阳离子交换色谱

法(例如,来自 Pharmacia 的 S-Sepharose), 疏水相互作用色谱法, 羟基磷灰石色谱法, 和/或在聚丙烯酰胺葡聚糖柱上的分离。

在另一实施方案, 干扰素多肽是干扰素 γ 多肽, 例如, 野生型人干扰素 γ 或其变体, 任选与非多肽半分子结合, 例如在 WO 01/36001 中所述的任一
5 变体或偶联物。

在本发明的另一实施方案中, 该干扰素 γ 多肽选自干扰素 γ 变体, 例如在下文“干扰素 γ 变体”部分公开的任一变体。

干扰素 γ 变体

具有优化的 N-糖基化位点的干扰素 γ 变体

10 已经发现通过用苏氨酸残基取代位于人干扰素 γ 99 位的丝氨酸残基可增加位于人干扰素 γ 97 位天然存在的 N-糖基化位点的糖基化, 即可获得增加的完全, 或者基本上完全糖基化的干扰素 γ 多肽的成份。例如, 已经发现通过进行取代 S99T, 在收获的培养基中存在的大约 90% 的干扰素 γ 多肽利用了两个 N-糖基化位点, 而在收获的培养基中存在的重组产生的人干扰素 γ
15 多肽只有大约 60% 被完全糖基化。

因此, 在极有利的实施方案中, 干扰素 γ 多肽包含取代 S99T。

除了优化 97 位的体内 N-糖基化位点所需的上述 S99T 突变外, 也可优化已经导入序列内的其它体内糖基化位点(参见题为“非多肽半分子是糖类半分子的干扰素 γ 变体”的部分)。一般来说, 体内糖基化位点是 N-糖基化位点,
20 但是在有关情况下也包含 O-糖基化位点。该优化可通过在位于靠近糖基化位点, 特别是靠近体内 N-糖基化位点的位置进行修饰, 优选进行取代来完成。可导入体内 N-糖基化位点的合适的位置的具体例子在 WO 01/36001 中公开。

因此, 对于天然存在的体内 N-糖基化, 预期通过在选择自由 E93, K94,
25 L95, T96, Y98, V100 和 T101(即在相对于 N97 的位置-4, -3, -2, -1, +1, +3 或+4)组成的组中的位置进行诸如取代的修饰可进一步优化 97 位的 N-糖基化位点。在 98 位进行取代的具体例子包括 Y98F, Y98N, Y98Q, Y98V, Y98A, Y98M, Y98I, Y98K, Y98G, Y98R, Y98T, Y98H, Y98C 和 Y98S, 优选 Y98A, Y98M, Y98I, Y98K, Y98G, Y98R, Y98T, Y98H, Y98C 和
30 Y98S, 特别是 Y98S。在 100 位进行取代的具体例子包括 V100H, V100D, V100A, V100M, V100N, V100T, V100R, V100S, 或 V100C, 特别是 V100T,

V100R, V100S 或 V100C。

同样,对于在 25 位的体内 N-糖基化位点,预期通过在选择自由 D21, V22, A23, D24, G26, L28 和 F29(即在相对于 N25 的位置-4, -3, -2, -1, +1, +3 或+4)组成的组中的一个位置进行诸如取代的修饰可进一步优化该位点。

- 5 在 26 位进行取代的具体例子包括 G26F, G26N, G26Y, G26Q, G26V, G26A, G26M, G26I, G26K, G26R, G26T, G26H, G26C 和 G26S, 优选 G26A, G26M, G26I, G26K, G26R, G26T, G26H, G26C 和 G26S, 更优选 G26A 和 G26S, 特别是 G26A。在 28 位进行取代的具体例子包括 G28H, G28D, G28A, G28M, G28N, G28T, G28R, G28S, 或 G28S, 特别是 G28A, G28T, 10 G28R, G28S 或 G28C。

显然,与优化 97 位糖基化相联系所述的任一修饰可与优化 25 位糖基化相联系所述的任一修饰相结合。

含有非多肽半分子连接基团的干扰素 γ 变体

- 15 可导入的另一类型的感兴趣的修饰包括用于增加皮下给药时的 AUC 和/或静脉内给药时的血清半寿期的修饰。

在一个感兴趣的实施方案中,干扰素 γ 多肽包含至少一个导入的和/或至少一个去掉的含有非多肽连接基团的氨基酸残基。

- 20 为了避免过多地破坏干扰素 γ 多肽的结构和功能,根据该实施方案待修饰的氨基酸残基的总数一般不超过 15 个。通常该氨基酸序列与 SEQ ID NO: 2(或其 C-末端截短形式)相比含有 1-10 个,例如 1-5 个,例如 1-3 个修饰。优选的是,该修饰是取代。

除了去掉和/或导入该氨基酸残基外,该多肽可包含其它修饰,例如与导入和/或去掉含有非多肽半分子连接基团的氨基酸残基无关的取代。该修饰的例子包括保守氨基酸取代和/或在 N-末端导入 Cys-Tyr-Cys 或 Met。

- 25 可用于结合且在二聚体形式的干扰素 γ 多肽中存在的连接基团的精确数目依赖于需要通过结合达到的效果。需要获得的效果依赖于例如,结合的性质和程度(例如,非多肽半分子的特性,需要或可能与该多肽结合的非多肽半分子的数目,它们应结合的位置或者应避免结合的位置,等)。

- 30 应明白可去掉或导入的含有非多肽半分子的连接基团的氨基酸残基可根据选定非多肽半分子部分的特性进行选择,且在大多数情况下,根据所用的结合方法选择。例如,当非多肽半分子是诸如聚乙二醇或聚环氧烷衍生分

子的多聚体分子时，能作为连接基团起作用的氨基酸残基可选自由半胱氨酸，赖氨酸，天冬氨酸，谷氨酸和精氨酸组成的组中。具体地说，优选半胱氨酸。当该非多肽半分子是糖类半分子时，连接基团是例如，体内糖基化位点，优选是 N-糖基化位点。

- 5 无论非多肽半分子的连接基团是需要干扰素 γ 多肽中导入的还是去掉的，待修饰的多肽的位置可方便地选择如下：

该位置优选位于干扰素 γ 多肽的表面，且更优选被根据干扰素 γ 以其二聚体形式的三维结构或模型测定时具有超过 25% 的其侧链与溶剂接触的氨基酸残基占据，优选超过 50% 的其侧链与溶剂接触，该结构或模型任选进一步含有一个或两个干扰素 γ 受体分子。该位置在本文实施例 A 中列出。

- 10 另外，感兴趣的可能是修饰位于干扰素 γ 环区域的一个或多个氨基酸残基，因为位于这些环区域内的大多数氨基酸残基暴露于表面且与功能性位点相距足够远使得可导入诸如多聚体分子，特别是 PEG 分子的非多肽半分子，和/或 N-糖基化位点而不会损害该多肽的功能。通过检查任选与其受体复合的人干扰素 γ 的三维结构可鉴定该环区域。构成所述环区域的氨基酸残基是残基 N16-K37(“A-B 环”)，F60-S65(“B-C 环”)，N83-S84 (“C-D 环”)和 Y98-L103(“D-E 环”)。

- 另外，在干扰素 γ 多肽中，优选已经去掉了位于干扰素 γ 的受体结合位点的连接基团，优选通过取代含有该基团的氨基酸残基来去掉。构成干扰素 γ 受体结合位点的氨基酸残基是 Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119(也参见本文实施例 B)。

- 25 为了测定连接基团的最佳分布，根据干扰素 γ 二聚体多肽的三维结构计算位于干扰素 γ 多肽表面的氨基酸残基之间的距离。更具体地说，测定含有该连接基团的氨基酸残基的 CB 之间的距离，或者一个残基的官能团(赖氨酸的 NZ, 天冬氨酸的 CG, 谷氨酸的 CD, 半胱氨酸的 SG)和含有连接基团的另一氨基酸残基的 CB 之间的距离。对于甘氨酸，使用 CA 代替 CB。在干扰素 γ 多肽部分中，为了避免或减少不均一结合，任一所述的距离优选超过 8Å，特别是超过 10 Å。

- 30 如上所述，在生理条件下，干扰素 γ 以二聚体多肽存在。该多肽一般是同型二聚体形式(例如通过缔合按本文所述制备的两个干扰素 γ 多肽制备)。

然而, 如果需要, 干扰素 γ 多肽可以单链形式提供, 其中两个干扰素 γ 多肽单体通过肽键或肽接头连接。以单链形式提供干扰素 γ 多肽具有的优势是两个组分的干扰素 γ 多肽可以不同, 这有利于例如, 使得该多肽的不对称诱变成为可能。例如, 可从一个单体的受体结合位点去掉 PEG 化位点, 但在另一单体中保留。因此, PEG 化后, 一个单体具有一个完整的受体结合位点, 而另一单体被完全 PEG 化(且因此提供明显增加的分子量)。

非多肽半分子是糖类半分子的干扰素 γ 变体

在优选的实施方案中, 干扰素 γ 多肽含有至少一个导入的和/或至少一个去掉的糖基化位点, 即非多肽半分子是糖类半分子。优选的是, 糖基化位点是体内糖基化位点, 即非多肽半分子是糖类半分子, 例如 O-连接的或 N-连接的糖类半分子, 优选 N-连接的糖类半分子。

在特别优选的实施方案中, 干扰素 γ 多肽含有至少一个导入的糖基化位点, 特别是导入的体内 N-糖基化位点。优选的是, 该导入的糖基化位点通过取代导入。

例如, 体内 N-糖基化位点可在含有暴露于表面的氨基酸残基的干扰素 γ 多肽的位置导入。优选所述的表面暴露的氨基酸残基具有至少 25% 的侧链暴露于表面, 特别是至少 50% 的其侧链暴露于表面。关于测定该位置的详情可参见本文实施例 A。

N-糖基化位点以这样的方式导入, 即所述位点的 N-残基位于所述的位置。同样, 可导入 O-糖基化位点以便构成该位点的 S 或 T 残基位于所述位置。应明白当术语“其侧链的至少 25%(或 50%)暴露于表面”与体内 N-糖基化位点的导入相联系使用时, 该术语是指在糖类半分子实际连接的位置的氨基酸侧链的表面可达性。在许多情况下必需在相对于糖类半分子实际连接的天冬氨酸残基的+2 位导入一个丝氨酸或苏氨酸残基, 且允许包埋导入丝氨酸或苏氨酸残基的这些位置, 即具有不超过 25%(或 50%)的其侧链暴露于该分子的表面。

另外, 为了确保有效糖基化, 优选体内糖基化位点, 特别是 N-糖基化位点的 N 残基或 O-糖基化位点的 S 或 T 残基位于干扰素 γ 多肽的 118 N-末端氨基酸残基内, 更优选的是位于 97 N-末端氨基酸残基内。甚至更优选的是, 在产生该位点仅需要一个突变的位置(即, 产生功能性糖基化位点所需的任何其它氨基酸残基已经存在于该多肽中的位置)导入体内糖基化位点。

例如,导致在暴露于干扰素 γ 多肽表面且被具有至少 25% 的侧链暴露于表面(在具有受体分子的结构中)的氨基酸残基占据的位置导入另一 N-糖基化位点的取代包括: Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T, 5 H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, 10 E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, 15 T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T 和 K130N。S/T 表示取代成丝氨酸或苏氨酸残基, 优选苏氨酸残基。

导致在暴露于干扰素 γ 多肽表面且具有至少 50% 的侧链暴露于表面(在具有受体分子的结构中)的位置导入另一 N-糖基化位点的取代包括: P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, 20 G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S/T, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, 25 Q106S/T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N 和 K130N+S132T。S/T 表示取代成丝氨酸或苏氨酸残基, 优选苏氨酸残基。

导入一个 N-糖基化位点仅需要一个氨基酸取代的取代包括 K12S/T, 30 G18S/T, G18N, K37S/T, E38N, M45N, I49N, K61S/T, D63N, Q67N, V70N, K80S/T, F82N, N85S/T, K87S/T, K94N, Q106S/T, E119N, A124N,

K130N 和 R140N, 特别是 K12S/T, G18N, G18S/T, K37S/T, E38N, K61S/T, D63N, Q67N, K80S/T, N85S/T, K94N, Q106S/T, A124N 和 K130N(在没有受体分子的结构中具有超过 25% 的其侧链暴露于表面的位置), 或更优选 G18N, E38N, D63N, Q67N, K94N, A124N 和 K130N(在没有受体分子的结构中具有超过 50% 的其侧链暴露于表面的位置)。

通常, 优选不在构成受体结合位点的区域导入 N-糖基化位点(除了在特殊情况下, 参见题为“受体亲和力下降的干扰素 γ 变体”的部分)。因此, 一般不应进行突变 Q1N+P3S/T, E9N+L11S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E119N 和 E119N+S121T, 除非需要降低受体亲和力。

特别优选的干扰素 γ 多肽包括至少一个选择由 K12S, K12T, G18S, G18T, E38N, E38N+S40T, K61S, K61T, N85S, N85T, K94N, Q106S 和 Q106T 组成的组中的取代, 更优选选自由 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T, N85T, K94N 和 Q106T 组成的组中, 甚至更优选选自由 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T 和 N85T 组成的组中, 特别是 E38N+S40T。

应明白上文确定的取代优选与 S99T 突变结合。因此, 非常优选的干扰素 γ 多肽包括选自由 K12S+S99T, K12T+S99T, G18S+S99T, G18T+S99T, E38N+S99T, E38N+S40T+S99T, K61S+S99T, K61T+S99T, N85S+S99T, N85T+S99T, K94N+S99T, S99T+Q106S 和 S99T+Q106T 组成的组中的取代, 更优选选自由 K12T+S99T, G18T+S99T, E38N+S40T+S99T, K61T+S99T, N85T+S99T, K94N+S99T 和 S99T+Q106T 组成的组中, 甚至更优选选自由 K12T+S99T, G18T+S99T, E38N+S40T+S99T, K61T+S99T 和 N85T+S99T 组成的组中, 特别是 E38N+S40T+S99T。

应明白任一上述修饰可与题为“优化了 N-糖基化位点的干扰素 γ 变体”的部分公开的任一修饰, 特别是与取代 S99T, 以及与题为“非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的分子的干扰素 γ 变体”的部分公开的任一修饰结合。

非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的分子的干扰素 γ 变体

在另一优选的实施方案中, 干扰素 γ 多肽包含至少一个导入的半胱氨酸残基。优选的是, 通过取代导入半胱氨酸残基。

例如, 可在含有暴露于表面的氨基酸残基的干扰素 γ 多肽的位置导入半

胱氨酸残基。优选所述的表面暴露的氨基酸残基具有至少 25% 的侧链暴露于表面，特别是至少 50% 的其侧链暴露于表面。关于测定该位置的详情可参见本文实施例 A。

例如，导致在暴露于干扰素 γ 多肽表面且被具有至少 25% 的侧链暴露于表面(在具有受体分子的结构中)的氨基酸残基占据的位置导入一个半胱氨酸残基的取代包括：Q1C, D2C, P3C, K6C, E9C, N10C, K13C, Y14C, N16C, G18C, H19C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, N35C, K37C, E38C, E39C, S40C, K55C, K58C, N59C, K61C, D62C, D63C, Q64C, S65C, Q67C, K68C, E71C, T72C, K74C, E75C, N78C, V79C, K80C, N83C, S84C, N85C, K86C, K87C, D90C, E93C, K94C, T101C, D102C, L103C, N104C 和 E119C。

导致在暴露于干扰素 γ 多肽表面且被具有至少 50% 的侧链暴露于表面(在具有受体分子的结构中)的氨基酸残基占据的位置导入一个半胱氨酸残基的取代包括：P3C, K6C, N10C, K13C, N16C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, K37C, E38C, E39C, K55C, K58C, N59C, D62C, Q64C, S65C, K68C, E71C, E75C, N83C, S84C, K86C, K87C, K94C, T101C, D102C, L103C 和 N104C。

通常，优选不在构成受体结合位点的区域(除了在特殊情况下，参见题为“受体亲和力下降的干扰素 γ 变体”的部分)导入半胱氨酸残基(且随后将这些半胱氨酸残基与非多肽半分子连接)。因此，一般不应进行突变 Q1C, E9C, G18C, H19C, D21C, G26C, K34C, K37C 和 E119C，除非需要降低受体亲和力。

最优选的是，通过选自由 N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C, N104C 和 A124C 组成的组中的取代导入所述的半胱氨酸残基。

优选的是，任一上述修饰的干扰素 γ 多肽还含有取代 S99T。在上述取代中，特别优选下列取代 N10C+S99T, N16C+S99T, E38C+S99T, N59C+S99T, N83C+S99T, K94C+S99T, N104C+S99T 和 A124C+S99T。

应明白导入的半胱氨酸残基优选与非多肽半分子，例如 PEG 或更优选 mPEG 结合。干扰素 γ 变体与活化多聚体分子的结合通过使用任一常规方法进行，例如，按下列参考文献所述(其中也描述了活化多聚体分子的合适方法)：Harris 和 Zalipsky, eds., Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological

Applications, AZC, Washington; R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson 等, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques",
5 Academic Press, N. Y.).

特别优选与半胱氨酸残基偶联的活化 PEG 多聚体的具体例子包括下列线形 PEGs: 乙烯砜-PEG(VS-PEG), 优选乙烯砜-mPEG(VS-mPEG); 顺丁烯二酰亚胺-PEG(MAL-PEG), 优选顺丁烯二酰亚胺-mPEG(MAL-mPEG)和正吡啶基-二硫化物-PEG (OPSS-PEG), 优选正吡啶基-二硫化物-mPEG
10 (OPSS-mPEG)。一般来说, 该 PEG 或 mPEG 多聚体具有大约 5 kDa, 大约 10 kD, 大约 12kDa 或大约 20 kDa 的大小。为了与半胱氨酸残基 PEG 化, 在 PEG 化之前通常用诸如二硫苏糖醇(DTT)的还原剂处理干扰素 γ 变体。随后用任何常规方法, 例如通过脱盐去掉该还原剂。PEG 与半胱氨酸残基的结合一般在 pH 6-9 的合适缓冲液中在 4°C 到 25°C 的温度范围内进行长达 16 小
15 时。

应明白任一上述修饰可与题为“优化了 N-糖基化位点的干扰素 γ 变体”的部分公开的任一修饰, 特别是与取代 S99T, 以及与题为“非多肽半分子是糖类半分子的干扰素 γ 变体”的部分公开的任一修饰结合。

第一非多肽半分子是糖类半分子且第二非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的分子的干扰素 γ 变体
20

在另一特别优选的实施方案中, 干扰素 γ 多肽包含至少一个导入的 N-糖基化位点和至少一个导入的半胱氨酸残基。优选的是通过取代导入半胱氨酸残基和/或 N-糖基化位点。通过选择在分别描述导入 N-糖基化位点和半胱氨酸残基的合适位置的两个前述部分中所述的残基制备该多肽。因此, 在一个感兴趣的实施方案中, 干扰素 γ 多肽包含选自由 K12T+N16C, K12T+E38C,
25 K12T+N59C, K12T+N83C, K12T+K94C, K12T+N104C, K12T+A124C, G18T+N10C, G18T+E38C, G18T+N59C, G18T+N83C, G18T+K94C, G18T+N104C, G18T+A124C, E38N+S40T+N10C, E38N+S40T+N16C, E38N+S40T+N59C, E38N+S40T+N83C, E38N+S40T+K94C, E38N+S40T+N104C, E38N+S40T+A124C, K61T+N10C, K61T+N16C,
30 K61T+E38C, K61T+N83C, K61T+K94C, K61T+N104C, K61T+A124C,

N85T+N10C, N85T+N16C, N85T+E38C, N85T+N59C, N85T+K94C, N85T+N104C, N85T+A124C, K94N+N10C, K94N+N16C, K94N+E38C, K94N+N59C, K94N+N83C, K94N+N104C, K94N+A124C, Q106T+N10C, Q106T+N16C, Q106T+E38C, Q106T+N59C, Q106T+N83C, Q106T+K94C
 5 和 Q106T+A124C 组成的组中的取代, 更优选自由 E38N+S40T+N10C, E38N+S40T+N16C, E38N+S40T+N59C, E38N+S40T+N83C, E38N+S40T+K94C, E38N+S40T+N104C 和 E38N+S40T+A124C 组成的组中。

优选的是, 任一上述修饰的干扰素 γ 多肽还包含取代 S99T, 即干扰素 γ 多肽包含选自由 K12T+N16C+S99T, K12T+E38C+S99T, K12T+N59C+S99T,
 10 K12T+N83C+S99T, K12T+K94C+S99T, K12T+N104C+S99T, K12T+A124C+S99T, G18T+N10C+S99T, G18T+E38C+S99T, G18T+N59C+S99T, G18T+N83C+S99T, G18T+K94C+S99T, G18T+N104C+S99T, G18T+A124C+S99T, E38N+S40T+N10C+S99T, E38N+S40T+N16C+S99T, E38N+S40T+N59C+S99T, E38N+S40T+N83C+S99T,
 15 E38N+S40T+K94C+S99T, E38N+S40T+N104C+S99T, E38N+S40T+A124C+S99T, K61T+N10C+S99T, K61T+N16C+S99T, K61T+E38C+S99T, K61T+N83C+S99T, K61T+K94C+S99T, K61T+N104C+S99T, K61T+A124C+S99T, N85T+N10C+S99T, N85T+N16C+S99T, N85T+E38C+S99T, N85T+N59C+S99T,
 20 N85T+K94C+S99T, N85T+N104C+S99T, N85T+A124C+S99T, K94N+N10C+S99T, K94N+N16C+S99T, K94N+E38C+S99T, K94N+N59C+S99T, K94N+N83C+S99T, K94N+N104C+S99T, K94N+A124C+S99T, Q106T+N10C+S99T, Q106T+N16C+S99T, Q106T+E38C+S99T, Q106T+N59C+S99T, Q106T+N83C+S99T,
 25 Q106T+K94C+S99T 和 Q106T+A124C+S99T 组成的组中的取代, 更优选自由 E38N+S40T+N10C+S99T, E38N+S40T+N16C+S99T, E38N+S40T+N59C+S99T, E38N+S40T+N83C+S99T, E38N+S40T+K94C+S99T, E38N+S40T+N104C+S99T 和 E38N+S40T+A124C+S99T 组成的组中。

应明白, 导入的半胱氨酸残基优选与非多肽半分子, 例如 PEG 或更优
 30 选 mPEG 结合。含有半胱氨酸的多肽变体与多聚体分子之间的结合可以任何合适的方式完成, 例如按题为“非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的

分子的干扰素 γ 变体”的部分所述。

应明白任一上述修饰可与题为“优化了体内 N-糖基化位点的干扰素 γ 变体”的部分公开的任一修饰，特别是与取代 S99T 结合。

受体亲和力降低的干扰素 γ 变体

- 5 增加干扰素 γ 多肽血清半寿期的一种方式是通过降低受体介导的内化且因此减少受体介导的清除。受体介导的内化依赖于干扰素 γ 二聚体对干扰素 γ 受体复合物的亲和力，因此预期干扰素 γ 多肽对干扰素 γ 受体复合物的亲和力降低会使得内化，且因此清除的程度更低。

- 10 通过在干扰素 γ 多肽的受体结合区进行一种或多种修饰，特别是取代可降低干扰素 γ 二聚体与其受体复合物的亲和力。构成受体结合区的氨基酸残基在本文实施例 B 中限定。可进行的一类取代是保守氨基酸取代。在另一实施方案中，进行的修饰引起导入 N-糖基化位点。

- 因此，在另一感兴趣的实施方案中，干扰素 γ 多肽在受体结合位点(按本文限定)含有至少一个修饰。更具体的说，干扰素 γ 多肽在所述的受体结合区
- 15 含有产生体内 N-糖基化位点的至少一个修饰，优选取代。例如，该取代可选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, Y4N+K6S/T, V5N+E7S/T, E9N+L11S/T, K12N+Y14S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, V22N+D24S/T, D24N+G26S/T, G26N+L28S/T, L30N+I32S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, K108N+I110S/T, H111N+L113S/T,
- 20 E112N+I114S/T, I114N+V116S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 和 E119N+S121T 组成的组中，优选选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, E9N+L11S/T, K12N+Y14S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, H111N+L113S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 和
- 25 E119N+S121T 组成的组中(在含有其侧链的至少 25% 暴露于表面的氨基酸残基的位置导入 N-糖基化位点)，更优选选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, E9N+L11S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 和 E119N+S121T 组成的组中(在含有其侧链的至少
- 30 50% 暴露于表面的氨基酸残基的位置导入 N-糖基化位点)，甚至更优选选自 Q1N+P3T, D2N+Y4T, E9N+L11T, G18N+S20T, H19N+D21T,

S20N+V22T, D21N+A23T, K34N+W36T, K37N+E39T, Q115N+M117T, A118N+L120T 和 E119N+S121T 组成的组中, 最优选自由 G18N+S20T, H19N+D21T, D21N+A23T 和 E119N+S121T 组成的组中, 特别是 D21N+A23T。

- 5 预期该变体与人干扰素 γ 或 Actimmune® 相比表现出降低的受体亲和力。该受体亲和力可通过任何合适的试验来测量且是本领域的技术人员已知的。测定受体结合亲和力的合适试验的一个例子是 Michiels 等, Int. J. Biochem. Cell Biol. 30: 505-516 (1998) 所述的 BIAcore® 试验。

10 一般来说, 例如, 当在本文所述的“一级试验”中检测时, 受体亲和力降低的干扰素 γ 多肽表现出降低的干扰素 γ 活性。例如, 干扰素 γ 多肽可表现出 Actimmune® 或人干扰素 γ 的 1-95% 的干扰素 γ 活性, 例如 1-75%, 例如 1-50%, 例如 1-20% 或 1-10% 的 Actimmune® 或以其糖基化形式的人干扰素 γ 的干扰素 γ 活性。

15 显然, 导致受体结合亲和力降低的任一上述修饰可与本文公开的任一其它修饰结合, 特别是在题为“优化 N-糖基化位点的干扰素 γ 变体”, “含有非多肽半分子连接基团的干扰素 γ 变体”, “非多肽半分子是糖类半分子的干扰素 γ 变体”, “非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的分子的干扰素 γ 变体”和“第一非多肽半分子是糖类半分子且第二非多肽半分子是以半胱氨酸作为连接基团的分子的干扰素 γ 变体”部分提及的修饰, 例如选自由 E38N, 20 S40T, S99T 及其组合组成的组中的修饰, 特别是 E38N+S40T+S99T。

在另一实施方案中, 干扰素 γ 多肽含有至少一个导入的糖基化位点, 和至少一个与导入的糖基化位点连接的糖类半分子。在另一实施方案中, 干扰素 γ 多肽包含至少一个导入的糖基化位点和至少一个与导入的糖基化位点连接的糖类半分子, 和一个诸如聚乙二醇的多聚体分子。在特别优选的实施方案中, 干扰素 γ 多肽含有 3 个糖类半分子, 每个糖类半分子与一个 N-糖基化位点连接。

对于干扰素 γ 多肽的截短分析

以许多方式可对干扰素 γ 多肽纯化样品的 C-末端截短进行测定。

30 阐明干扰素 γ 多肽 C-末端截短的一种方式依赖于通过质谱法的精确质量测定。不幸的是, 干扰素 γ 的糖基化是不均一的, 因此使得极难直接测定糖蛋白的精确质量。因此, 一般使用不同水平的酶促去糖基化与质谱法结合。

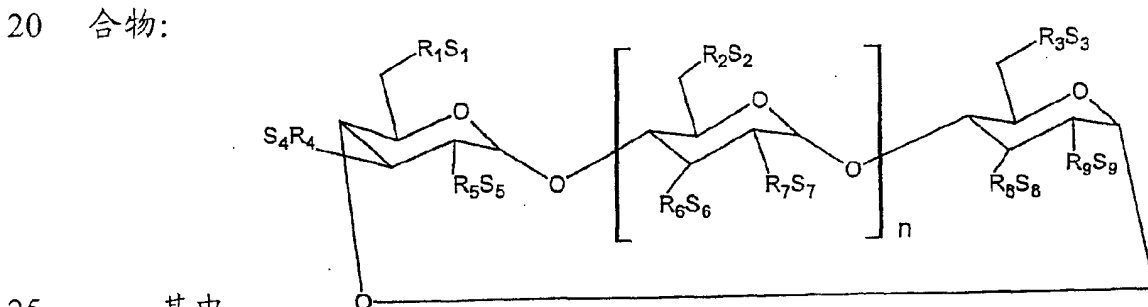
在一种方法中，使用内切糖苷酶 PNGase F 裂解干扰素 γ 多肽的全部聚糖部分，接着使用 ESI 质谱法或 MALDI-TOF 质谱法进行精确质量测定。比较实验质量与干扰素 γ 的已知氨基酸序列使得测定 C-末端截短的位点成为可能。

- 5 在另一有关方法中，仅裂解干扰素 γ 多肽的聚糖部分的唾液酸而不是全部聚糖。在某些情况下，将样品的不均一性降低到这样的水平是足够的，即在该水平下使用 ESI 质谱法或 MALDI-TOF 质谱法进行精确质量测定后可推测出 C-末端截短的位点。

10 阐明干扰素 γ 多肽 C-末端截短的一种更传统的方式是采用肽图谱结合质谱法和化学氨基酸测序。简单地说，干扰素 γ 多肽用已知特异性的蛋白酶 (Asp-N 蛋白酶) 降解，接着使用 RP-HPLC 进行肽分离。然后线上使用 ESI 质谱法或离线使用 MALDI-TOF 质谱法对分级分离成份进行质量分析。比较获得的肽质量与干扰素 γ 的已知氨基酸序列使得测定 C-末端截短的可能位点成为可能。然后通过氨基酸测序得到证实。

15 磺基烷基醚环糊精衍生物

在本发明的组合物中，磺基烷基醚环糊精衍生物是在 US 5,874,418, US 5,376,645 和 US 5,134,127 中所述的任一衍生物，本文引用其内容以供参考。磺基烷基醚环糊精衍生物在 WO 91/11172 中也进行了描述，本文引用其内容以供参考。在本发明的一个实施方案中，磺基烷基醚环糊精是具有式(I)的化合物：



其中

n 是 4, 5 或 6,

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8,$ 和 R_9 分别独立地是, -O-或-O-(C_2 - C_6 亚烷基)- SO_3 -基团, 其中 R_1 和 R_2 中至少一个独立地是 -O-(C_2 - C_6 亚烷基)- SO_3 -基团, 且

- 30 $S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_8$ 和 S_9 分别独立地是可药用的阳离子。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, n 是 5。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, n 是 6。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, R_1 和 R_2 中至少一个是 $-O-(CH_2)_m-SO_3^-$, 且 m 是 2, 3, 4, 5 或 6。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, R_1 和 R_2 独立地选自
5 $-OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$ 或 $-OCH_2CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ 。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, R_4 , R_6 和 R_8 中至少一个独立地是 $-O-(C_2-C_6 \text{ 亚烷基})-SO_3^-$; 且 R_5 , R_7 和 R_9 都是 $-O-$ 。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , S_7 , S_8 和 S_9 分别独立地是可药用的阳离子, 该阳离子选自 H^+ , 碱金属(例如 Li^+ ,
10 Na^+ , K^+), 碱土金属(例如, Ca^{+2} , Mg^{+2}), 铵离子和诸如 (C_1-C_6) 烷基胺, 吡啶, 吡嗪, (C_1-C_6) 烷醇胺和 (C_4-C_8) 环烷醇胺的阳离子的铵阳离子。

在式(I)的化合物的另一实施方案中, S_1 , S_2 , S_3 , S_4 , S_5 , S_6 , S_7 , S_8 和 S_9 独立地选自碱金属阳离子, 碱土金属阳离子, 四价铵阳离子, 三价铵阳离子, 和二价铵阳离子。

15 在另一实施方案中, R_4 , R_6 和 R_8 中至少一个独立地是 $-O-(C_2-C_6 \text{ 亚烷基})-SO_3^-$; 且 R_5 , R_7 和 R_9 都是 $-O-$ 。

本文使用的术语“亚烷基”和“烷基”(例如在 $-O-(C_2-C_6 \text{ 亚烷基})-SO_3^-$ 基团或在烷基胺中)分别包括线型, 环状, 和分支, 饱和和不饱和(即, 含有一个双键)的二价亚烷基基团和单价烷基基团。本文中的术语“烷醇”同样包括线
20 型, 环状, 和分支, 饱和和不饱和烷基成份的烷醇基团, 其中羟基可位于烷基半分子的任一位置。术语“环烷醇”包括未取代或取代(例如, 用甲基或乙基)的环醇。

目前优选的磺基烷基醚环糊精衍生物是 β 环糊精磺基丁基醚的盐(特别是以 Captisol® 可获得的也称为 SBE7- β -CD 的其钠盐)(Cydex, Overland Park,
25 Kansas 66213, US)。

本发明组合物的其它实施方案

一般来说, 本发明的组合物的 pH 范围为 3-8, 例如 4-8, 5-8, 6-8, 7-8, 4-7, 4-6, 或 4-5。对于干扰素 β , 优选的 pH 范围是 4-8, 优选 5-8, 或另选 4-7。在另一实施方案中, 该 pH 范围为 5-6, 例如大约 5.5。一般通过使用在
30 下文中进一步描述的合适量的缓冲剂可获得该 pH。

另外, 需要该组合物与血液几乎等渗, 即, 具有大约 240-360 mOsmol/kg

的摩尔渗透压浓度，例如 280-320 mOsmol/kg，特别是大约 300 mOsmol/kg。一般通过使用下文进一步描述的合适量的张度剂可获得该摩尔渗透压浓度。

因此，在广义的方面，本发明涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定化组合物。该干扰素多肽一般选自上文和实施例中提及的任意一种。干扰素多肽的优选实施方案是干扰素 β 和干扰素 γ ，特别是干扰素 β 变体和干扰素 γ 变体，例如糖基化和/或 PEG 化的变体，如上文的详细描述。

干扰素多肽一般在液体制品中以大约 1-100 MIU/ml 的浓度或者在固体制品中以大约 1-100 MIU/剂存在。该浓度可选自在液体制品中的大约 1-10 MIU/ml, 1-20 MIU/ml, 1-30 MIU/ml, 1-40 MIU/ml, 1-50 MIU/ml, 1-60 MIU/ml, 1-70 MIU/ml, 1-80 MIU/ml, 1-90 MIU/ml, 10-20 MIU/ml, 20-30 MIU/ml, 30-40 MIU/ml, 40-50 MIU/ml, 50-60 MIU/ml, 60-70 MIU/ml, 70-80 MIU/ml, 80-90MIU/ml, 90-100 MIU/ml, 5-95 MIU/ml, 15-85 MIU/ml, 25-75 MIU/ml, 35-65 MIU/ml, 和 45-55 MIU/ml。另外，该浓度可选自在固体制品中的大约 1-10 MIU/剂, 1- 20 MIU/剂, 1-30 MIU/剂, 1-40 MIU/剂, 1-50 MIU/剂, 1-60 MIU/剂, 1-70MIU/剂, 1-80 MIU/剂, 1-90 MIU/剂, 10-20 MIU/剂, 20-30 MIU/剂, 30-40MIU/剂, 40-50 MIU/剂, 50-60 MIU/剂, 60-70 MIU/剂, 70-80 MIU/剂, 80-90MIU/剂, 90-100 MIU/剂, 5-95 MIU/剂, 15-85 MIU/剂, 25-75 MIU/剂, 35-65MIU/剂, 和 45-55 MIU/剂。

磺基烷基醚环糊精衍生物一般以大约 1-150 mg/ml 的浓度存在。该浓度可选自大约 1-10 mg/ml, 1-20 mg/ml, 1-30 mg/ml, 1-40 mg/ml, 1-50 mg/ml, 1-60 mg/ml, 1-70 mg/ml, 1-80 mg/ml, 1-90 mg/ml, 1-100 mg/ml, 1-110 mg/ml, 1-120 mg/ml, 1-130 mg/ml, 1-140 mg/ml, 10-20 mg/ml, 20-30 mg/ml, 30-40 mg/ml, 40-50 mg/ml, 50-60 mg/ml, 60-70 mg/ml, 70-80 mg/ml, 80-90 mg/ml, 90-100 mg/ml, 100-110 mg/ml, 110-120 mg/ml, 120-130 mg/ml, 130-140 mg/ml, 140-150 mg/ml, 5-100 mg/ml, 5-95 mg/ml, 5-90 mg/ml, 5-85 mg/ml, 5-80 mg/ml, 5-75 mg/ml, 5-70 mg/ml, 5-65 mg/ml, 5-60 mg/ml, 5-55 mg/ml, 5-50 mg/ml, 5-45 mg/ml, 5-40 mg/ml, 5-35 mg/ml, 5-30 mg/ml, 5-25 mg/ml, 5-20 mg/ml, 5-15 mg/ml, 和 5-10 mg/ml。

在一个实施方案中，本发明的组合物的 pH 范围为 4-8，且摩尔渗透压浓度为大约 240-360 mOsmol/kg，例如 280-320 mOsmol/kg，特别是大约 300 mOsmol/kg。

在一个具体方面，本发明的组合物涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的液体溶液。

在另一具体方面，本发明的组合物涉及含有干扰素多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的水溶液。

5 磺基烷基醚环糊精衍生物一般以大约 1-150 mg/ml 的浓度存在。然而，任一上述浓度范围都认为为本发明的一个实施方案。

干扰素多肽一般在液体溶液中以大约 1-100 MIU/ml 的浓度存在。然而，任一上述浓度范围都认为为本发明的一个实施方案。

10 在一个实施方案中，液体溶液或水溶液是等渗的且具有大约 240-360 mOsmol/kg 的摩尔渗透压浓度。在另一实施方案中，液体溶液或水溶液是等渗的且具有大约 240-360 mOsmol/kg 的摩尔渗透压浓度，并具有 4-8 的 pH 范围，例如 5-8，6-8，7-8，4-7，4-6，或 4-5。在还有另一实施方案中，液体溶液或水溶液还含有提供大约 240-360 mOsmol/kg 的摩尔渗透压浓度的张度剂。该张度剂可以是任何合适的张度剂，例如在下文“肠胃外制品”部分提及的任一张度剂。在还有另一实施方案中，该液体溶液或水溶液还含有以高达 100 mM 的浓度存在的缓冲剂。缓冲剂的浓度可选自在下文“肠胃外制品”部分提及的任一浓度范围。该缓冲剂可以是任何合适的缓冲剂，例如在下文“肠胃外制品”部分提及的任一缓冲剂。

20 如上所述，干扰素多肽一般选自上文和实施例提及的任一多肽。干扰素多肽的优选实施方案是干扰素 β 和干扰素 γ ，特别是任一干扰素 β 变体和干扰素 γ 变体，例如任一糖基化和/或 PEG 化的变体，如上文的详细描述。干扰素多肽的其它优选的实施方案是人野生型干扰素 β 和人野生型干扰素 γ ，例如糖基化和/或 PEG 化分子，例如与多聚体，例如包括聚乙二醇的多聚体偶联的糖基化干扰素 β -1a。

25 优选的是，本发明的组合物是其中干扰素多肽在 37°C 的温度下贮存至少 1 周，优选至少 2，3 或 4 周期间基本上保留其生物活性的组合物(在加速稳定性试验中测量的)。其中干扰素多肽基本上保留其生物活性是指保留其生物活性的至少 80%，优选其生物活性的至少 90%。

30 另外，在本发明的组合物中优选干扰素多肽在 25°C 的温度下贮存至少 4 周，例如至少 5，6，7，8，9，10，11 或 12 周期间基本上保留其生物活性。在另一选择中，本发明的组合物是其中干扰素多肽在 37°C 的温度下贮存至少

1 周期间,和在 25°C 的温度下贮存至少 4 周期间基本上保留其生物活性的组合物。待测量的生物活性是,例如抗病毒活性。

抗病毒活性可用本领域已知的方法测定,例如,通过使用在 WO 01/15736(干扰素 β)和 WO 01/36001(干扰素 γ)中所述的测定法。

5 WO 01/15736 的测定法如下:

使用 A549 细胞(CCL 185,美国组织培养物保藏中心)和脑心肌炎(EMC)病毒(VR-129B,美国组织培养物保藏中心)进行抗病毒生物测定。将细胞以 10,000 个细胞/孔的浓度接种在 96 孔组织培养平板中并在 37°C 下在 5% CO₂ 的空气中培养。在含有胎牛血清和抗生素的总共 100 μ l DMEM 培养基中以从
10 大约 100-0.0001 IU/mL 的浓度范围(一般为 100-0.0001 IU/mL)加入本发明的多肽或偶联物。24 小时后取出培养基并向各孔中加入含有 EMC 病毒的 0.1 mL 新鲜培养基。以 24 小时后在无干扰素- β 的细胞培养物中引起 100% 细胞死亡的浓度加入 EMC 病毒。再过 24 小时后,使用 WST-1 测定法测量该多肽或偶联物的抗病毒效果。向 0.1 mL 培养物中加入 0.01 mL WST-1(WST-1
15 细胞增生剂, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)并在 37°C 下在 5% CO₂ 的空气中培养 1/2-2 小时。在活细胞中线粒体脱氢酶裂解四氮唑盐 WST-1 导致形成可通过在 450 nm 下测量吸光度进行定量的甲月替 (formazan)。

相对于已知标准以 U/ml 计算产量,该标准包括在相同的平板上和在同
20 同条件下分析。

WO 01/36001 中的测定法如下:

以前已经公开了干扰素 γ 与 HeLa 细胞上的干扰素 γ 受体相互作用并激活该受体。因而,在含有干扰素刺激反应元件(ISRE)的启动子上可激活转录。因此通过使用放置于 HeLa 细胞中的偶联萤光素酶报道基因的
25 ISRE(ISRE-luc)来筛选干扰素受体的激动剂是可能的。

用 ISRE-Luc 和 pCDNA 3.1/hygro 共转染 HeLa 细胞,通过在含有潮霉素 B 的 DMEM 培养基中选择可产生转化灶(细胞克隆)。在存在或不存在干扰素 γ 的条件下筛选细胞克隆的萤光素酶活性。表现出刺激与未刺激的萤光素酶活性的最高比率的那些克隆用于进一步的试验。

30 为了筛选突变体,在 96 孔培养平板中接种 15,000 个细胞/孔并在 DMEM 培养基中培养过夜。第二天以各种浓度向细胞中加入突变体和已知标准。平

板在 37°C 下在 5% CO₂ 的空气中培养 6 小时，随后向各孔中加入 LucLite 底物(Packard Bioscience, Groningen The Netherlands)。密封平板并在 TopCount 发光计(Packard)上以 SPC(单光子计数)方式测量发光。每个平板含有用于干扰素 γ 培养的孔作为刺激对照，其它孔含有正常培养基作为未刺激对照。刺激的和未刺激的荧光素酶活性之间的比率用作突变体活性和实验与实验间误差的内部标准。

本发明的药用组合物可以是各种形式，包括液体，凝胶，冻干品，肺分散剂，或者任何其它合适的形式，例如压缩固体。在本发明上下文中术语“液体”试图包括术语“含水的”。

10 在本发明的另一实施方案中，该组合物是干燥形式或者是液体配制品。在本发明的另一实施方案中，该组合物是干燥形式。在本发明的另一实施方案中该组合物是液体形式。在本发明的另一实施方案中，该组合物是水溶液。在本发明的另一实施方案中该组合物是含水悬液。

15 优选的形式依赖于所治疗的具体适应症且对本领域的技术人员是显而易见的。例如，冻干溶液可用于进一步增加稳定性。

本发明的药用组合物可通过口腔，静脉内，大脑内，肌肉内，腹膜内，真皮内，皮下，鼻内，肺内，或以任何其它可接受的方式，例如使用诸如 PowderJect 或 ProLease 技术的给药系统进行给药。优选的给药方式依赖于所治疗的具体适应症且对本领域的技术人员是显而易见的。

20 在下文中，描述了适合于配制品的特定类型的组合物。应明白使用的各种添加剂的性质和量依赖于干扰素多肽以及配制品的类型和给药途径。一般来说，本发明的组合物包含缓冲剂，张度剂，保存剂，润湿剂，粘度增加剂，和/或一种或多种除了磺基烷基醚环糊精衍生物之外的稳定剂。应明白该稳定剂必须对磺基烷基醚环糊精衍生物的稳定效果无有害影响。该组合物的其它
25 组分在下文中进一步描述。

另外，本发明的组合物可包含人血清白蛋白或用于稳定该组合物和/或最小化与贮存该组合物的容器的吸附的其它人体蛋白质。然而，在一个具体实施方案中，该组合物基本上不含人血清白蛋白或其它人体蛋白质，因为从受控制的观点来看可能不需要存在该蛋白质。

30 本发明的组合物可用制备药用组合物的常规方法来制备。例如，通过在掺入干扰素多肽前预先混合稳定和缓冲剂，和任何其它添加剂可制备该组合

物。在一个实施方案中用氮净化含水配制品和/或氮净化部分填充的产品容器的空隙容积来制备该组合物。在另一实施方案中，无须该氮净化来制备该组合物。

存在于组合物中的干扰素多肽的量依赖于干扰素多肽，配制品和给药途径的特性。例如，当该组合物是含有干扰素 β 的组合物时，干扰素 β 多肽以相应于1-100 MIU/ml的量存在，一般为1-50 MIU/ml(当配制成液体配制品时)或1-100 MIU/剂(当配制成固体配制品时)。

肠胃外制品

药用组合物的一个例子是设计成用于肠胃外给药的溶液。尽管在许多情况下，药用溶液配制品以适合于立即使用的液体形式提供，但是该肠胃外配制品也可以冷冻或者冻干形式提供。在前一种情况下，该组合物必须在使用前融化。后一种形式常用于增强组合物中所含的活性化合物在各种贮存条件下的稳定性，因为本领域的技术人员会认识到冻干制品一般比其液体相应物更稳定。该冻干制品在使用前通过加入一种或多种合适的可药用的诸如注射用无

菌水或者无菌生理盐溶液的稀释剂来重建。

对于肠胃外制品，可通过合适地混合具有所需纯度的干扰素多肽与一种或多种可药用的载体，本领域常用的赋形剂或者稳定剂(它们都称为“赋形剂”)，例如缓冲剂，稳定剂，保存剂，张度剂，非离子去污剂，抗氧化剂和/或其它各种添加剂来制备它们用于作为冻干配制品或者水溶液贮存。

缓冲剂以这样的浓度存在，即该浓度确保pH维持在所需水平，例如接近生理水平的水平。该缓冲剂对于各种缓冲类型具有高达100mM的合适浓度。对于大多数缓冲剂，该浓度一般以1-100 mM的范围存在，例如1-90 mM，1-80 mM，1-70 mM，1-60 mM，1-50 mM，1-40 mM，1-30 mM，1-20 mM，1-10 mM，5-15 mM，15-25 mM，25-35 mM，35-45 mM，45-55 mM，55-65 mM，65-75 mM，75-85 mM，85-95 mM。合适的浓度可由技术人员测定。缓冲剂一般是弱酸，弱碱或该酸的阴离子盐的溶液。用于本发明的合适缓冲剂包括有机和无机酸及其盐，例如柠檬酸盐缓冲剂(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)，琥珀酸盐缓冲剂(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)，酒石酸盐缓冲剂(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)，延胡索酸

盐缓冲剂(例如, 延胡索酸-延胡索酸一钠混合物, 延胡索酸-延胡索酸二钠混合物, 延胡索酸一钠-延胡索酸二钠混合物, 等), 马来酸盐缓冲剂(例如, 马来酸钠), 葡萄糖酸盐缓冲剂(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), 草酸盐缓冲剂(例如, 5 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), 乳酸盐缓冲剂(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)和乙酸盐缓冲剂(例如, 乙酸-乙酸钠混合物, 乙酸-氢氧化钠混合物, 等)。其它可能性是磷酸盐缓冲剂, 碳酸盐缓冲剂(例如, 碳酸钠), 组氨酸缓冲剂, 和谷氨酸盐缓冲剂。加入保存剂以阻止微生物生长, 且一般以大约 0.2%-1%(w/v)的量加入。用于本发明的合适的保存剂包括苯酚, 苯甲10 醇, 间甲酚, 对羟基苯甲酸烷基酯, 例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯, 苄烷铵卤化物(例如, 苄烷铵氯, 溴或碘), 儿茶酚, 间苯二酚, 3-戊醇和其合适的混合物。

因此, 在另一实施方案中, 本发明的组合物包含诸如上述任一种或其混15 合物的缓冲剂。

在另一实施方案中, 本发明的组合物还含有保存剂和/或粘度增加剂。

在另一实施方案中, 本发明的组合物不含保存剂。

在另一实施方案中, 本发明的组合物包含选自柠檬酸盐缓冲剂, 琥珀酸盐缓冲剂, 酒石酸盐缓冲剂, 延胡索酸盐缓冲剂, 马来酸盐缓冲剂, 葡萄糖20 酸盐缓冲剂, 草酸盐缓冲剂, 磷酸盐缓冲剂, 碳酸盐缓冲剂, 组氨酸缓冲剂, 谷氨酸盐缓冲剂, 乳酸盐缓冲剂, 和乙酸盐缓冲剂的一种缓冲剂。

在另一实施方案中, 本发明的组合物包含以高达 100 mM 的浓度存在的缓冲剂, 例如 1 mM 至 100 mM, 1-90 mM, 1-80 mM, 1-70 mM, 1-60 mM, 1-50 mM, 1-40 mM, 1-30 mM, 1-20 mM, 1-10 mM, 5-15 mM, 15-25 mM, 25 25-35 mM, 35-45 mM, 45-55 mM, 55-65 mM, 65-75 mM, 75-85 mM, 或 85-95 mM。

加入张度剂以确保液体组合物的等渗性且该张度剂包括多羟基糖醇, 优选三羟基或更高级糖醇, 例如甘油, 赤藓醇, 阿拉伯糖醇, 木糖醇, 山梨醇和甘露醇(甘露醇一般以高达 50mg/ml 的浓度存在), 或 NaCl(NaCl 一般以高达 9mg/ml 的浓度存在)。考虑到其它成分的相对量, 多羟基醇以占重量的 0.1 30 %和 25%之间的量存在, 一般为 1%至 5%。

稳定剂是指各种赋形剂，按功能从膨胀剂到可增溶治疗剂或帮助防止变性或粘附到容器壁的添加剂之间变化。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(上面列举); 诸如精氨酸, 赖氨酸, 甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 组氨酸, 丙氨酸, 鸟氨酸, L-亮氨酸, 2-苯丙氨酸, 谷氨酸, 苏氨酸等的氨基酸, 有机糖类或者糖醇, 例如乳糖, 海藻糖, 水苏糖, 甘露醇, 山梨醇, 木糖醇, 核糖醇, 肌醇, 半乳糖醇, 甘油等, 包括诸如肌醇的环醇; 聚乙二醇; 氨基酸多聚体; 诸如尿素, 谷胱甘肽, 硫辛酸, 巯基醋酸钠, 硫代甘油, α -一硫代甘油和硫代硫酸钠的含硫还原剂; 低分子量多肽(即 < 10 个残基); 诸如人血清白蛋白, 牛血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白的蛋白质; 诸如聚乙烯吡咯烷酮的亲水性多聚体; 诸如木糖, 甘露糖, 果糖和葡萄糖的单糖; 诸如乳糖, 麦芽糖和蔗糖的二糖; 诸如棉子糖的三糖, 和诸如葡聚糖的多糖。稳定剂一般以基于活性蛋白重量的从 0.1 到 10,000 份重量的范围存在。

可存在非离子表面活性剂或去污剂(也称为“润湿剂”)以帮助增溶治疗剂和防止治疗性多肽的搅拌诱导型聚集, 它也允许该配制品暴露于剪切面张力而不引起多肽变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨酯(20, 80 等), polyoxamers (184,188 等), Pluronic[®]多元醇, 聚氧化乙烯脱水山梨醇单醚(Tween[®]-20(Tween-20 一般以高达 2mg/ml 的浓度存在), Tween[®]-80(Tween-80 一般以高达 2mg/ml 的浓度存在), 等)。

在一个优选的实施方案中, 当组合物包含干扰素 β 多肽时不加入诸如非离子表面活性剂的表面活性剂。

其它各种赋形剂包括膨胀剂或者填充剂(例如, 淀粉), 螯合剂(例如, EDTA), 抗氧化剂(例如, 抗坏血酸, 甲硫氨酸, 维生素 E)和助溶剂。在胶体给药系统(例如, 脂质体, 白蛋白微球体, 微乳状液, 纳米颗粒和纳米胶囊)或在缓释制品(参见下一部分)中, 该活性成分也可包埋于通过例如, coascervation 技术或者通过界面聚合制备的微胶囊中, 例如羟甲基纤维素, 明胶或聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。该技术在 Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, 第 18 版, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins 中公开。

用于体内给药的肠胃外配制品必须是无菌的。例如, 通过无菌过滤膜过滤可容易地实现这点。

缓释制品(用于肠胃外或其它用途)

缓释制品的合适例子包括含有干扰素多肽的固态疏水多聚体和/或亲水性多聚体的半透性基质，该基质具有诸如薄膜，杆状，微胶囊或微球体的合适形式。缓释基质的例子包括聚酯，水凝胶(例如，聚(2-羟乙基-异丁烯酸酯)或聚(乙烯醇))，聚交酯，L-谷氨酸和乙基-L-谷氨酸共聚物，不可降解的乙烯乙酸乙烯酯，葡聚糖，淀粉，诸如 ProLease[®]技术或 Lupron Depot[®](由乳酸-乙醇酸共聚物和 leuprolide 乙酸组成的可注射的微球体)的可降解的乳酸-乙醇酸共聚物，和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管诸如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸的多聚体能在诸如达到或者超过 100 天的长时间内释放分子，但是某些水凝胶在较短的时间期限内释放蛋白质。

肺或鼻给药配制品

该配制品可以是液体形式或者是固体配制品，作为分散体形式或者以该形式使用。

用于给药和/或产生分散体的所有有关装置需要使用适合于分散该干扰素多肽的配制品。一般来说，各配制品对于采用的装置类型具有特异性且可包括使用除了用于治疗的常规稀释剂，佐剂和/或载体外的合适的推进剂物质。各配制品对于作为分散体给药的干扰素多肽一般也具有特异性。另外，也包含使用脂质体，微胶囊或微球体，包涵体复合物，或其它类型的载体。现在描述可在最常见类型的肺分散装置中使用以实施本发明的干扰素多肽配制品。

喷雾器干扰素配制品

适合于用喷射或者超声波的喷雾器使用的干扰素多肽配制品一般包含以例如，大约 0.01 到 25mg 干扰素多肽每 mL 溶液，优选大约 0.1 到 10 mg/mL 的浓度溶于水中的干扰素多肽。该配制品也可包括缓冲剂和张度剂，例如用于蛋白质稳定和渗透压调节的糖类，和/或 0.1 到 10 mg/ml 浓度范围内的人血清白蛋白。可使用的缓冲剂的例子有醋酸钠，柠檬酸盐和甘氨酸。优选的是，缓冲剂具有适合于将溶液 pH 调节到 3 至 9 范围内的组分和摩尔浓度。一般来说，从 1 mM 到 50 mM 的缓冲剂摩尔浓度适用于该目的。可使用的糖类的例子是乳糖，麦芽糖，甘露醇，山梨醇，海藻糖和木糖，含量范围通常占配制品重量的 1%到 10%。

喷雾器配制品也可含有表面活性剂以减小或防止在形成气溶胶时由溶

液喷雾引起的蛋白质的表面诱导型聚集。可使用各种常规表面活性剂，例如聚氧化乙烯脂肪酸酯和醇，和聚氧化乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯。含量范围一般在配制品重量的 0.001%和 4%之间变动。用于本发明目的的特别优选的表面活性剂是聚氧化乙烯脱水山梨醇一油酸酯。

5 具体配制品和产生液体颗粒的合适分散体的方法在 WO 9420069, US 5915378, US 5960792, US 5957124, US 5934272, US 5915378, US 5855564, US 5826570, 和 US 5522385 中描述，它们在本文中引用以供参考。

适合于本发明实践的商业上可获得的喷雾器的 3 个具体例子是由 Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo.生产的 Ultravent 喷雾器，由 Marquest Medical
10 Products, Englewood, Colorado 生产的 Acorn II 喷雾器，和由 Aradigm Corporation, Hayward, California 生产的 AERx 肺给药系统。

用于标明剂量的吸入器和粉末吸入器的干燥配制品

用标明剂量的吸入器装置使用的干扰素配制品一般包含有关形状，表面和大小
15 的精细分开的粉末。该粉末可通过冻干且如果需要，随后研磨固体配制品来生产，也可含有诸如人血清白蛋白(HSA)的稳定剂。一般来说，加入超过 0.5%(w/w)的 HAS。另外，如果需要，可向制品中加入一种或多种糖或糖醇。其例子包括乳糖，麦芽糖，甘露糖，山梨醇，山梨糖，海藻糖，木糖醇，和木糖。加入配制品中的量从大约 0.01 到 100% (w/w)之间变化，优选从大约 1 到 50%。然后冻干该配制品并研磨成所需颗粒大小。

20 然后借助于表面活性剂将合适大小的颗粒悬浮于推进剂中。推进剂可以是用于该目的任一常规物质，例如含氯氟烃，氢氯氟烃(hydrochlorofluorocarbon)，氢氟烃(hydrofluorocarbon)，或碳氢化合物，包括三氟氯甲烷，二氯二氟甲烷，二氯四氟乙醇，和 1,1,1,2-四氟乙烷，或其组合。合适的表面活性剂包括脱水山梨醇三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也可用作表面活性剂。然后将该混合物装载进给药装置中。适用于本发明的商业上
25 可获得的标明剂量的吸入器的例子是由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, N. C 生产的 Ventolin 标明剂量的吸入器。

用于粉末吸入器的该干扰素配制品包含含有偶联物的精细分开的干燥粉末且也可包括膨胀剂，例如乳糖，山梨醇，蔗糖，或甘露醇，其含量有助于粉末从该装置散布，例如占配制品重量的 50%至 90%。粉末的颗粒应具有
30 肺内空气动力学特性。一般相应于具有不超过 10 微米中央直径的大约 1

g/cm²密度的颗粒,优选在0.5至5微米之间,最优选在1.5至3.5微米之间。

根据本文的教导适用的粉末吸入器的一个例子是由 Fisons Corp., Bedford, Mass 生产的 Spinhaler 粉末吸入器。

用于这些装置的粉末可通过 US 5997848, US 5993783, US 5985248,
5 US 5976574, US 5922354, US 5785049 和 US 55654007 中公开的方法产生和/或给药。

用于本发明的分散体给药的机械装置

含有干扰素多肽的药用组合物可通过设计用于治疗产品的肺给药的各种机械装置给药,该装置包括,但不限于喷雾器,标明剂量的吸入器,和粉
10 末吸入器,所有这些都是本领域的技术人员熟悉的。

适用于本发明实践的商业上可获得的装置的一些具体例子是由 Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri 生产的 Ultravent 喷雾器;由 Marquest Medical Products, Englewood, Colorado 生产的 Acorn II 喷雾器;由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina 生产的 Ventolin 标明剂量的吸入器;由
15 Fisons Corp., Bedford, Massachusetts 生产的 Spinhaler 粉末吸入器;Inhale Therapeutic Systems, Inc., San Carlos, California 的“静止雾(standing cloud)”装置;Alkermes, Cambridge, Massachusetts 生产的 AIR 吸入器;和由 Aradigm Corporation, Hayward, California 生产的 AERx 肺给药系统。

本发明还提供了含有本发明组合物的主要产品容器。该容器可以是适合于所述组合物的任何类型的容器,例如由不锈钢或玻璃制成的容器。该容器
20 可以是注射器,例如预装的注射器。

另外,本发明提供了用于肠胃外施用根据本发明的液体干扰素组合物的试剂盒和使用说明。该试剂盒可包含干扰素组合物作为唯一药用活性成份,或者可包含在同一容器或不同容器中的一种或多种其它药用活性成份。

25 在另一方面,本发明涉及增加配制成药用组合物的干扰素多肽的稳定性的方法,所述的方法包含在所述的组合物中掺入磺基烷基醚环糊精衍生物和一种缓冲剂。

当干扰素多肽在贮存期间表现出聚集体形成且以足以减少干扰素多肽聚集体形成的量掺入磺基烷基醚环糊精衍生物时该方法特别适当。该干扰素
30 多肽优选是本文所述的任一多肽。磺基烷基醚环糊精衍生物优选是在 US 5,376,645, US 5,874,418 或 US 5,134,127 中所述任一衍生物,特别是 β 环糊

精磺基丁基醚的盐，例如可作为 Captisol®获得的钠盐。

在另一方面，本发明涉及对哺乳动物进行干扰素治疗的方法，该方法包含施用治疗上有效量的根据本发明的组合物。另外，本发明涉及本发明的组合物在治疗疾病中的用途以及涉及本发明的组合物在生产治疗疾病的药物中的用途。很明显当本发明的组合物用作治疗疾病或紊乱的药物时，它是一种药用组合物。

本发明的药用组合物可与其它治疗剂结合给药。这些治疗剂可作为同一药用组合物的一部分掺入或者可与该干扰素多肽同时或按照任何其它可接受的治疗计划分别给药。另外，本发明的药用组合物可用作其它疗法的辅助。

10 应明白可治疗的疾病取决于组合物中存在的干扰素多肽的类型。

当干扰素多肽是干扰素 α ，或干扰素 β ，或其变体或偶联物时，本发明提供了用于治疗大多数类型的病毒感染，癌症或肿瘤或肿瘤血管形成，Chrohn's 疾病，溃疡性结肠炎，Guillain-Barré 综合征，神经胶质瘤，原发性肺纤维变性，异常细胞生长，或者用于任何合适的动物，优选哺乳动物，且特别是人类的免疫调节的组合物和方法。例如，本发明的组合物可用于治疗骨肉瘤，基层细胞癌，卵巢癌，颈发育异常，颈癌，喉乳头瘤病，真菌类霉菌病，神经胶质瘤，急性骨髓白血病，多发性骨髓瘤，何杰金氏病，黑素瘤，乳腺癌，非小细胞肺癌，恶性黑素瘤(辅药，晚期，以及预防剂)，类癌瘤，B-细胞淋巴瘤，T-细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，卡波西肉瘤，慢性骨髓性白血病，肾细胞癌，复发性表面膀胱癌，结肠直肠癌，多毛细胞白血病，和病毒性感染，例如乳头瘤病毒，病毒性肝炎，生殖器疱疹，带状疱疹，疱疹性角膜炎，单纯疱疹，病毒性脑炎，巨细胞病毒性肺炎，鼻病毒慢性顽固性肝炎，慢性病期 HCV(I 型)，慢性病期 HCV(II 型)和慢性乙肝。

25 在这一方面，该组合物可用于 CML 单一疗法或与阿糖胞苷结合，用于 B-细胞淋巴瘤单一疗法或者与基于阿霉素的疗法结合，用于滤泡性淋巴瘤疗法作为 CHOP-类疗法的辅助，用于丙肝单一疗法或与三氮唑核苷结合，用于多发性骨髓瘤单一疗法或者与 VBMCP，BCNU 或 VBMCP+HiCy 结合，或者用于肾癌单一疗法或者与长春花碱，氟尿苷，5-氟尿嘧啶或 IL-10 结合。

30 具体地说，本发明的多肽或组合物可用于多发性硬化(MS)的治疗，例如公认的 4 种类型的 MS(良性，复发减轻型 MS (RRMS)，原发型进行性 MS (PPMS)和继发型进行性 MS (SPMS)) 中的任一种和用于单症状 MS，癌症或

肿瘤, 肝炎, 例如乙肝和丙肝, 或者疱疹感染的治疗(后一种治疗任选与 IL-10 治疗结合)。

因此, 本发明还涉及含有干扰素 β 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物在制备用于治疗病毒感染, 癌症或肿瘤或肿瘤血管形成, Crohn's 疾病, 溃疡性结肠炎, Guillain-Barré 综合征, 神经胶质瘤, 原发性肺纤维变性, 异常细胞生长, 或者用于任何合适的动物, 优选哺乳动物, 且特别是人类的免疫调节的药物中的用途。更具体地说, 含有干扰素 β 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的本发明的组合物可用于治疗骨肉瘤, 基层细胞癌, 卵巢癌, 颈发育异常, 颈癌, 喉乳头瘤病, 真菌类霉菌病, 神经胶质瘤, 急性骨髓白血病, 多发性骨髓瘤, 何杰金氏病, 黑素瘤, 乳腺癌, 非小细胞肺癌, 恶性黑素瘤(辅药, 晚期, 以及预防剂), 类癌瘤, B-细胞淋巴瘤, T-细胞淋巴瘤, 滤泡性淋巴瘤, 卡波西肉瘤, 慢性骨髓性白血病, 肾细胞癌, 复发性表面膀胱癌, 结肠直肠癌, 多毛细胞白血病, 和病毒性感染, 例如乳头瘤病毒, 病毒性肝炎, 生殖器疱疹, 带状疱疹, 疱疹性角膜炎, 单纯疱疹, 病毒性脑炎, 巨细胞病毒性肺炎, 鼻病毒慢性顽固性肝炎, 慢性病期 HCV (I 型), 慢性病期 HCV (II 型), 慢性乙肝, 慢性或急性丙肝, 或疱疹感染, 多发性硬化(MS), 例如公认的 4 种类型的 MS(良性, 复发减轻型 MS (RRMS), 原发进行性 MS (PPMS)和继发进行性 MS (SPMS)) 中的任一种和用于单症状 MS。

在一个具体方面, 本发明涉及含有干扰素 β 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物在制备用于治疗选自骨肉瘤, 基层细胞癌, 卵巢癌, 颈发育异常, 颈癌, 喉乳头瘤病, 真菌类霉菌病, 神经胶质瘤, 急性骨髓白血病, 多发性骨髓瘤, 何杰金氏病, 黑素瘤, 乳腺癌, 非小细胞肺癌, 恶性黑素瘤(辅药, 晚期, 以及预防剂), 类癌瘤, B-细胞淋巴瘤, T-细胞淋巴瘤, 滤泡性淋巴瘤, 卡波西肉瘤, 慢性骨髓性白血病, 肾细胞癌, 复发性表面膀胱癌, 结肠直肠癌, 和多毛细胞白血病中任一种的癌症的药物中的用途, 其中干扰素 β 多肽相对于 SEQ ID NO 1 所示的野生型人干扰素 β 含有取代 C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T, 且具有与 3 个 N-糖基化位点连接的 3 个糖类半分子和具有大约 20 kDa 分子量的 1 个 PEG 分子(该干扰素 β 多肽的一个具体例子是例如, 用 20kDa-PEG 进行 PEG 化的实施例 3 的干扰素 β 变体)。每一种上述癌症认为是本发明的一个实施方案。在一个优选的实施方案中该癌症是黑素瘤。在另一优选的实施方案中, 该癌症是乳腺癌。

在另一优选的实施方案中，该癌症是非小细胞肺癌。在另一优选的实施方案中，该癌症是恶性黑素瘤。

因此，本发明还涉及含有干扰素 α 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物在制备用于治疗病毒感染，癌症或肿瘤或肿瘤血管形成，Chrohn's 疾病，
5 溃疡性结肠炎，Guillain-Barré 综合征，神经胶质瘤，原发性肺纤维变性，异常细胞生长，或者用于任何合适的动物，优选哺乳动物，且特别是人类的免疫调节的药物中的用途。更具体地说，含有干扰素 α 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的本发明的组合物可用于治疗骨肉瘤，基层细胞癌，卵巢癌，颈发育异常，颈癌，喉乳头瘤病，真菌类霉菌病，神经胶质瘤，急性骨髓白血病，
10 多发性骨髓瘤，何杰金氏病，黑素瘤，乳腺癌，非小细胞肺癌，恶性黑素瘤(辅药，晚期，以及预防剂)，类癌瘤，B-细胞淋巴瘤，T-细胞淋巴瘤，滤泡性淋巴瘤，卡波西肉瘤，慢性骨髓性白血病，肾细胞癌，复发性表面膀胱癌，结肠直肠癌，多毛细胞白血病，和病毒性感染，例如乳头瘤病毒，病毒性肝炎，生殖器疱疹，带状疱疹，疱疹性角膜炎，单纯疱疹，病毒性脑炎，巨细
15 胞病毒性肺炎，鼻病毒慢性顽固性肝炎，慢性病期 HCV (I 型)，慢性病期 HCV (II 型)，慢性乙肝，慢性或急性丙肝，或疱疹感染，多发性硬化(MS)，例如公认的 4 种类型的 MS(良性，复发减轻型 MS (RRMS)，原发进行性 MS (PPMS)和继发进行性 MS (SPMS)) 中的任一种和用于单症状 MS。

另外，当该组合物含有干扰素 β 多肽时，本发明涉及一种治疗哺乳动物的方法，该动物具有抗诸如 AvonexTM 或 Rebif[®] 的干扰素 β 1a 或者诸如 Betaseron[®] 的 1b 的循环抗体，该方法包括施用含有与所述抗体的反应减小或不反应的干扰素 β 多肽的本发明的组合物。该化合物以有效量给药。该哺乳动物优选是人类。需要治疗的哺乳动物可患有干扰素 β 是有用的治疗剂的上文所列的任一疾病。具体地说，本发明的该方面对于治疗多发性硬化(上文
20 所列的任一类型)，肝炎或癌症是有利的。术语“循环抗体”试图表示在哺乳动物中与用任一商业上可获得的干扰素 β 制品(Rebif, Betaseron, Avonex)治疗发生反应形成的抗体，特别是中和抗体。

当干扰素多肽是干扰素 γ 或其变体或偶联物时，本发明的组合物可用于治疗 WO 01/36001 中描述的任一医学适应征，特别是间质肺疾病，最具体地
30 说是原发性肺纤维变性。已有建议将干扰素 γ 用于治疗间质肺疾病(也称为间质肺纤维变性(IPF)) (Ziesche 等(N. Engl. J.Med. 341: 1264-1269,1999 和 Chest

110 : Suppl : 25S, 1996)和 EP 795332), 为了该目的, 干扰素 γ 可与强的松龙结合使用。除了 IPF 外, 肉芽肿疾病(Bolinger 等, Clinical Pharmacy, 1992,11 : 834-850), 某些分枝杆菌感染(N. Engl. J. Med. 330: 1348-1355, 1994), 肾癌(J. Urol.152: 841-845,1994), 骨硬化病(N. Engl. J. Med. 332: 1594-1599,1995), 硬皮病 (J.Rheumatol. 23: 654-658,1996), 乙肝 (Hepatogastroenterology 45: 2282-2294, 1998), 丙肝(Int. Hepatol. Communic. 6: 264-273,1997), 脓毒性休克(Nature Medicine 3: 678-681, 1997), 和类风湿性关节炎可用干扰素 γ 治疗。

因此, 本发明还涉及含有干扰素 γ 多肽和磺基烷基醚环糊精衍生物的组合物在制备用于治疗间质肺疾病, 最具体地说是原发性肺纤维变性, 间质肺疾病(也称为间质肺纤维变性(IPF)), 肉芽肿疾病, 分枝杆菌感染, 肾癌, 骨硬化病, 硬皮病, 乙肝, 丙肝, 脓毒性休克, 和类风湿性关节炎的药物中的用途。

15 实施例

制备干扰素 γ 的材料和方法

材料

CHO-K1 细胞(可从美国典型培养物保藏中心获得(ATCC# CCL-61))。

HeLa 细胞(可从美国典型培养物保藏中心获得(ATCC# CCL-2))。

20 ISRE-Luc 从 Stratagene, La Jolla USA 获得。

pCDNA 3.1/hygro 从 Invitrogen, Carlsbad USA 获得。

限制性酶和聚合酶可从 New England Biolabs Inc.,Beverly, USA 获得。

DMEM 培养基: Dulbecco's 改良的 Eagle 培养基(DMEM), 10%胎牛血清和潮霉素 B 可从 Life Technologies A/S, Copenhagen, Denmark 获得。

25 LucLite 底物可从 Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands 获得。

TopCount 发光计可从 Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands 获得。

生物素标记的多克隆抗人干扰素 γ 抗体 BAF285 可从 R & D Systems Inc., Minneapolis, USA 获得。

30 辣根过氧化物酶结合的链霉抗生物素蛋白 P0397 可从 DAKO,Copenhagen, Denmark 获得。

TMB 印迹试剂可从 KEM-EN-TEC, Copenhagen, Denmark 获得。

方法

干扰素测定法概要

- 5 以前已经公开了干扰素 γ 与 HeLa 细胞上的干扰素 γ 受体相互作用并激活该受体。因而，在含有干扰素刺激反应元件(ISRE)的启动子上可激活转录。因此通过使用放置于 HeLa 细胞中的偶联萤光素酶报道基因的 ISRE(ISRE-luc)来筛选干扰素受体的激动剂是可能的。

一级测定法

- 10 用 ISRE-Luc 和 pCDNA 3.1/hygro 共转染 HeLa 细胞，通过在含有潮霉素 B 的 DMEM 培养基中选择可产生转化灶(细胞克隆)。在存在或不存在干扰素 γ 的条件下筛选细胞克隆的萤光素酶活性。表现出刺激与未刺激的萤光素酶活性的最高比率的那些克隆用于进一步的试验。

- 15 为了筛选多肽，在 96 孔培养平板中接种 15,000 个细胞/孔并在 DMEM 培养基中培养过夜。第二天以各种浓度向细胞中加入多肽和已知标准。平板在 37°C 下在 5% CO₂ 的空气中培养 6 小时，随后向各孔中加入 LucLite 底物 (Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands)。密封平板并在 TopCount 发光计(Packard)上以 SPC(单光子计数)方式测量发光。

- 20 每个平板含有用干扰素 γ 培养的孔作为刺激对照，含有正常培养基的其它孔作为未刺激对照。刺激的和未刺激的萤光素酶活性之间的比率用作干扰素 γ 活性和实验与实验间误差的内部标准。

鉴定表面暴露的氨基酸残基

结构

- 25 通过 X-射线晶体学测定的人干扰素 γ 的实验三维结构已由 Ealick 等, Science 252: 698-702 (1991)报导，他们报导了干扰素 γ 同型二聚体的 C- α 痕迹。Walter 等, Nature 376: 230-235 (1995)报导了与两分子的干扰素 γ 受体可溶形式复合的干扰素 γ 同型二聚体的结构。然而，该结构的坐标不能公开获得。Thiel 等, Structure 8: 927-936 (2000)报导与两分子的干扰素 γ 受体可溶形式复合的干扰素 γ 同型二聚体的结构具有在结构上不与干扰素 γ 同型二聚体发生相互作用的第三个受体分子。
- 30

可及表面面积(ASA)

使用计算机程序 Access(B. Lee和 F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379-400 (1971))版本 2 (Copyright (c) 1983 Yale University)计算各原子在结构中的可及表面面积(ASA)。该方法一般使用 1.4Å 大小的探针并将可及表面面积(ASA)定义为探针中央形成的面积。计算前,从坐标组(coordinate set)中去掉所有水分子,氢原子和与该蛋白质不直接相关的其它原子。

侧链的部分 ASA

通过用代表延伸的 ALA-x-ALA 三肽中该残基类型侧链原子 ASA 的值除以该侧链中原子 ASA 的总和来计算侧链原子的部分 ASA。参见 Hubbard, Campbell & Thornton (1991) J. Mol. Biol. 220,507-530。例如,CA 原子认为是甘氨酸残基而不是剩下残基的侧链部分。下表用作侧链的标准 100% ASA:

	Ala	69.23 Å ²	Leu	140.76 Å ²
	Arg	200.35 Å ²	Lys	162.50 Å ²
15	Asn	106.25 Å ²	Met	156.08 Å ²
	Asp	102.06 Å ²	Phe	163.90 Å ²
	Cys	96.69 Å ²	Pro	119.65 Å ²
	Gln	140.58 Å ²	Ser	78.16 Å ²
	Glu	134.61 Å ²	Thr	101.67 Å ²
20	Gly	32.28 Å ²	Trp	210.89 Å ²
	His	147.00 Å ²	Tyr	176.61 Å ²
	Ile	137.91 Å ²	Val	114.14 Å ²

在结构中未检测的残基定义为具有 100%暴露,因为认为它们存在于弹性区中。

25

测定原子间的距离:

使用分子制图软件,例 InsightII v. 98.0, MSI INC 测定原子间的距离。

测定受体结合位点:

受体结合位点定义为包含受体结合时其可及表面面积改变的所有残基。它可通过至少两种 ASA 算法测定;一种针对配体/受体复合物中的分离配体,

一种针对完整配体/受体复合物。

实施例 A-测定表面暴露的氨基酸

使用的 X-射线结构属于 Thiel 等, Structure 8: 927-936 (2000)报导的具有
5 在结构上不与干扰素 γ 同型二聚体发生相互作用的第三个干扰素 γ 受体分子的
与两分子的干扰素 γ 受体可溶形式复合的干扰素 γ 同型二聚体。该结构由
干扰素 γ 同型二聚体组成, 其中两个分子标记为 A 和 B。为了构建目的, 在
干扰素 γ 序列前存在标记为 M0 的另一甲硫氨酸且该序列在 C-末端截短 10
10 个残基 (在构建的多肽中 Q133 是最后一个残基)。在该实施例的所有计算结
果中从结构中去掉 M0。两个干扰素 γ 单体的结构在残基 120 之后具有极弱
的电子密度且直到残基 T126 的残基仅仅是模型。因此, 在本实施例中计算
前从结构中去掉残基 S121-T126。标记为 C 和 D 的两个受体片断与干扰素 γ
同型二聚体发生直接相互作用而标记为 E 的第三个受体分子与干扰素 γ 同型
二聚体不发生接触且不包括在这些计算结果中。

15

表面暴露:

对两个分子中不包括 M0 和 S121-T126 的分子 A 和 B 的同型二聚体进行
部分 ASA 计算得出下列残基具有超过 25% 的其侧链暴露于至少一个单体的
表面: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K12, K13, Y14, N16, G18, H19,
20 S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, N35, K37, E38,
E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68,
E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87,
D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, H111, Q115,
A118 和 E119。

25 下列残基具有超过 50% 的其侧链暴露于至少一个单体的表面: Q1, D2,
P3, K6, E9, N10, K13, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25,
G26, T27, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64,
S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101,
D102, L103, N104, Q115, A118, E119。

30 对两个分子中不包括 M0 和 S121-T126 且包括受体分子 C 和 D 的分子 A
和 B 的同型二聚体进行部分 ASA 计算得出下列残基具有超过 25% 的其侧链

暴露于至少一个单体的表面: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, Y14, N16, G18, H19, D21, N25, G26, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, 5 K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, E119。

下列残基具有超过 50% 的其侧链暴露于至少一个单体的表面: P3, K6, N10, K13, N16, D21, N25, G26, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103 和 N104。

10 比较两次列出的结果, 得出受体结合时从超过 25% 的侧链 ASA 列出结果中去掉了 K12, S20, A23, D24, T27, H111, Q115 和 A118, 且受体结合时从超过 50% 的侧链 ASA 列出结果中去掉了 Q1, D2, E9, G18, H19, S20, A23, D24, T27, Q115, A118 和 E119。

在该结构中未测定的残基按表面完全暴露处理, 即残基 S121, P122, 15 A123, A124, K125, T126, G127, K128, R129, K130, R131, S132, Q133, M134, L135, F136, R137, G138, R139, R140, A141, S142, Q143。这些残基也构成用于导入连接基团的独立靶(或者可认为属于表面暴露的氨基酸残基的基团, 例如, 具有超过 25% 或超过 50% 暴露的侧链)。

20 实施例 B-测定受体结合位点

按上述进行 ASA 计算得出干扰素 γ 多肽的下列残基以对分离的二聚体的计算结果相比在复合物的至少一个单体中具有降低的 ASA: Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119。

25

实施例 C-设计用于表达干扰素 γ 的具有优化用于 CHO 细胞的密码子选择的表达序列盒

修饰包含编码具有其天然信号肽的成熟人干扰素 γ 的全长 cDNA 的 DNA 序列, 即 GenBank 登录号 X13274 以便有利于在 CHO 细胞中高度表达。30 通过形成在密码子选择上偏向于人类常用的密码子来修饰人干扰素 γ 核苷酸序列的密码子。随后, 用其它核苷酸取代在该序列中的某些核苷酸以便导入

DNA 限制性核酸内切酶的识别位点。设计引物以便合成该基因。

使用 Platinum *Pfx*-聚合酶试剂盒(Life Technologies)和标准三步 PCR 循环参数通过一步 PCR 将引物装配成合成基因。使用相同的条件通过 PCR 扩增该装配的基因且该基因具有 SEQ ID NO: 5 所示的序列。将合成基因克隆进 pcDNA3.1/hygro (InVitrogen) 5'端的 BamHI 和 3'端的 XbaI 之间, 产生 pIGY-22。

实施例 D-定点诱变

产生糖基化变体

10 为了在干扰素 γ 中导入突变, 以这样的方式设计寡核苷酸, 即 PCR-产生的改变可通过传统两步 PCR 导入表达质粒(pIGY-22)中。

使用两个载体引物以及特异性突变引物: ADJ013 : 5'-GATGGCTGGCAACTAGAAAG-3'(SEQ ID NO: 6), (反义下游载体引物)和 ADJ014 : 5'-TGTACGGTGGGAGGTCTAT-3' (SEQ ID NO: 7), (有义上游载体引物)。

15 使用 ADJ013 和 ADJ014 作为载体引物, ADJ093 (5'-GTTCAGGTCTGTCACGGTGTAATTGGTCAGCTT-3') (SEQ ID NO: 8), 和 ADJ094 (5'-AAGCTGACCAATTACACCGT GACAGACCTGAAC-3') (SEQ ID NO: 9)作为突变引物, 和 pIGY-22 作为模板通过传统两步 PCR 产生 S99T 20 变体。使用 BamHI 和 XbaI 将 447 bp PCR 产物亚克隆进 pcDNA3.1/Hygro (InVitrogen), 产生质粒 pIGY-48。

通过使用 Lipofectaim2000 (Life Technologies)作为转染剂将 pIGY-48 转染进 CHO K1 细胞。24 小时后收获培养基并测定干扰素 γ 活性。使用本文所述的一级测定法, 获得了如下活性: 5.1×10^6 AU/ml。

25 使用 ADJ013 和 ADJ014 作为载体引物, ADJ091 (5'-CATGATCTTCCGATCGGTCTCGTTCTTCCAATT-3') (SEQ ID NO: 10), 和 ADJ092 (5'-AATTGGAAGAACGAGACCGATCGG AAGATCATG-3') (SEQ ID NO: 11), 作为突变引物, 且 pIGY-48 作为模板通过传统两步 PCR 产生 E38N+S40T+S99T 变体。使用 BamHI 和 XbaI 将 447 bp PCR 产物亚克隆进 30 pcDNA3.1/Hygro (InVitrogen), 产生质粒 pIGY-54。

通过使用 Lipofectaim2000 (Life Technologies)作为转染剂将 pIGY-54 转

染进 CHO K1 细胞。24 小时后收获培养基并测定干扰素 γ 活性。使用本文所述的一级测定法，获得了 1.3×10^7 AU/ml 的活性。

使用上述相似的标准技术，制备了许多全长干扰素 γ 糖基化变体。

5 产生 C-末端截短的干扰素 γ 变体

使用 pIGY-22, pIGY-48 和 pIGY-54 作模板通过一步 PCR 产生在紧靠 Leu135 密码子的下游含有一个终止密码子的 C-末端截短的干扰素 γ 变体，接着使用 BamHI 和 XbaI 将 PCR 产物亚克隆进 pcDNA3.1/Hygro (InVitrogen)。用于构建这些变体的引物是：ADJ014(见上文，上游)和：
10 5'GAGTCTAGATTACAGC ATCTGGCTTCTCTT-3' (下游)。所得质粒称为 pIGY-72(Leu135 后截短的野生型干扰素 γ)，pIGY-73(Leu135 后截短的 S99T 变体)和 pIGY-74(Leu135 后截短的 E38N+S40T+ S99T)。

产生含有半胱氨酸的干扰素 γ 变体

15 使用 Stratagene's QuikChange™XL 定点诱变试剂盒，按照厂商说明书产生含有半胱氨酸残基的干扰素 γ 变体。使用 pIGY-48 作模板产生各含有一个导入的半胱氨酸的 7 个干扰素 γ 变体：N10C+S99T, N16C+S99T, E38C+S99T, N59C+S99T, N83C+S99T, K94C+S99T 和 S99T+N104C。同样，使用 pIGY-54 作模板产生各含有一个导入的半胱氨酸的 6 个干扰素 γ 变体：
20 N10C+E38N+S40T+S99T ， N16C+E38N+S40T+S99T ，
E38N+S40T+N59C+S99T ， E38N+S40T+N83C+S99T ， E38N+S40T+
K94C+S99T 和 E38N+S40T+S99T+N104C。

实施例 E-PEG 化含有半胱氨酸的变体

25 所有缓冲液在使用前去氧化。蛋白质浓度通过测量 A280 估计。

使用 OPSS 偶联化学剂进行 PEG 化

7.2 ml 在 5 mM 琥珀酸钠，4%甘露醇，0.01% Tween 20，pH6.0 中的 1.3 mg/ml 的干扰素 γ 变体 N16C+S99T(全长)通过用 300 μ l 0.5M DTT 室温下温育
30 30 分钟进行还原。通过将 2.5 ml 的 3 个等分试样在 NAP25 凝胶过滤柱 (Pharmacia)上在缓冲液 A(50 mM 磷酸钠，1 mM EDTA, pH 8.1)中过柱对干扰

素 γ 变体脱盐。每个等分试样在 3.5 ml 中洗脱。

将 mPEG-OPSS(10KDa)溶于缓冲液 A 中达到 2 mg/ml 的浓度并以等体积加入还原且脱盐的干扰素 γ 变体中并在室温下轻轻摇动温育 60 分钟。

5 使用 Vivaspin20 柱(VivaScience)将 11 ml 的反应混合物浓缩到 1-6 ml 并使用以缓冲液 A 平衡的 Sephacryl S-100 柱(Pharmacia)通过凝胶过滤去掉剩余的 mPEG。

10 使用 Vivaspin 6 柱(VivaScience)将 PEG 化的干扰素 γ 变体渗滤进 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, pH 6.0 中并加入 Tween 20 至 0.01 %。纯化的 PEG 化的干扰素 γ 变体在本文所述的一级测定法中测量为具有 1.3×10^6 AU/mg 的比活(相应的未 PEG 化的干扰素 γ 变体比活的 15%)。

使用 MAL 偶联化学剂进行 PEG 化

15 1.6ml 在 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, 0.01% Tween 20, pH6.0 中的 1.5 mg/ml 的干扰素 γ 变体 N59C+S99T(全长)通过用 64 μ l 0.5M DTT 室温下温育 30 分钟进行还原。在 NAP25 凝胶过滤柱(Pharmacia)上在缓冲液 A(50 mM 磷酸钠, 1 mM EDTA, pH 8.1)中对干扰素 γ 变体脱盐。干扰素 γ 变体在 3.5 ml 中洗脱。

将 mPEG-MAL(5kDa)溶于缓冲液 A 中达到 0.5mg/ml 的浓度并以等体积加入还原且脱盐的干扰素 γ 变体中并在室温下轻轻摇动温育 120 分钟。

20 加入硫酸铵至 0.9 M 的浓度且对 PEG 化的干扰素 γ 变体使用在缓冲液 B(20 mM 磷酸钠, 0.9 M 硫酸铵, pH 6.6)中平衡的 1 ml ResourceTM 苯基柱(Pharmacia)。在 30 倍柱体积中以从 0 至 50%缓冲液 C(20 mM 磷酸钠, pH 6.6)的线型梯度洗脱结合的 PEG 化干扰素 γ 变体之前用 5 倍柱体积的缓冲液 B 洗涤柱子。PEG 化的干扰素 γ 变体在大约 0.6 M 硫酸铵处洗脱。

25 合并含有 PEG 化的干扰素 γ 变体的馏分并使用 Vivaspin 6 柱(VivaScience)渗滤进 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, pH 6.0 中并加入 Tween 20 至 0.01 %。纯化的 PEG 化的干扰素 γ 变体在本文所述的一级测定法中测量为具有 2.4×10^6 AU/mg 的比活(相应的未 PEG 化的干扰素 γ 变体比活的 15%)。

30 实施例 F 在哺乳动物细胞中表达干扰素 γ 多肽

为了瞬时表达干扰素 γ , 将细胞在含有 1: 10 胎牛血清(BioWhittaker

Cat#02-701F)和 1:100 青霉素和链霉素(BioWhittaker Cat#17-602E)的培养基(Dulbecco's MEM/Nut.-mix F-12 (Ham) L-谷酰胺, 15 mM HEPES, 吡哆醇-HCl(Life Technologies Cat #31330-038))中生长至 95 % 汇合。使用 Lipofectamine2000 (Life Technologies)按照厂商说明书将编码干扰素 γ 的质粒

5 转染进细胞。转染 24 小时后, 收集培养基并测定干扰素 γ 活性。另外, 为了定量利用的糖基化位点的相对数, 使用收获的培养基进行 Western 印迹。

通过用编码干扰素 γ 的质粒转染 CHO K1 细胞接着在含有 0.36 mg/ml 潮霉素的培养基中培养该细胞产生表达干扰素 γ 的稳定克隆。分离稳定转染的细胞并通过有限稀释亚克隆。通过 ELISA 鉴定产生高水平干扰素 γ 的克隆。

10

实施例 G-大规模生产

表达干扰素 γ 或变体的稳定细胞系在 1700cm² 摇瓶(Corning, #431200)中的 Dulbecco's MEM/Nut.-mix F-12(Ham) L-谷酰胺, 15 mM HEPES, 吡哆醇-HCl(Life Technologies Cat # 31330-038), 1: 10 胎牛血清(BioWhittaker Cat #02

15 - 701F), 1:100 青霉素和链霉素 (BioWhittaker Cat #17-602E)中生长至汇合。然后将培养基更换成含有 L-谷酰胺(BioWhittaker Cat #12-724Q)并加入了 1:500 EX-CYTE VLE(Serological Proteins Inc. #81-129)和 1:100 青霉素和链霉素(BioWhittaker Cat #17-602E)的 300ml UltraCHO。生长 48 小时后, 用含有相同添加物的新鲜 UltraCHO 更换培养基。再生长 48 小时后, 用加入了

20 1:100 ITS-A(Gibco/BRL#51300-044), 1:500 EX-CYTE VLE(Serological Proteins Inc. #81-129)和 1:100 青霉素和链霉素(BioWhittaker Cat #17-602E)的 Dulbecco's MEM/Nut. -mix F-12(Ham) L-谷酰胺, 吡哆醇-HCl(Life Technologies Cat#21041-025)更换培养基。随后, 每隔 24 小时, 收获培养基并用含有相同添加物的 300 ml 无血清培养基更换。收集的培养基通过 0.22 μ m

25 滤器过滤以去掉细胞。

实施例 H-纯化

使用 Millipore TFF 系统超滤至大约 1/15 体积前微孔过滤(0.22 μ m)滤液。在同一系统中使用 10 mM Tris, pH 7.6 渗滤该浓缩物。加入硫酸铵至 1.7 M 的

30 浓度, 搅拌后使用 GS3 转子在 Sorvall 离心机中以 8000 rpm 离心 25 分钟去掉沉淀。

将上清上样到预先在 10 mM Tris, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.6 中平衡的 25 ml Phenyl High Performance(Pharmacia)柱上。上样后用 3 倍柱体积的 10 mM Tris, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.6 洗涤柱子, 然后以在 10 倍柱体积内达到 100% 10 mM Tris, pH 7.6 的线形梯度洗脱结合的干扰素 γ 变体。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。合并富含干扰素 γ 变体的馏分并使用分子量截断值为 10,000 Da 的 Vivaflow200 系统(VivaScience)通过渗滤进 10 mM Tris, pH 9.0 中更换缓冲液。

然后将干扰素 γ 变体上样到预先在 10 mM Tris, pH 9.0 中平衡的 18 ml Q-sepharose Fast Flow (Pharmacia)柱上。上样后在 15 倍柱体积内以从 0 - 100%的 10 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 9.0 的梯度洗脱结合的干扰素 γ 变体之前用 3 倍柱体积的 10 mM Tris, pH 9.0 洗涤柱子。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。合并富含干扰素 γ 变体的馏分并使用分子量截断值为 10,000 Da 的 Vivaspin20 (VivaScience)柱通过渗滤将缓冲液更换成 10 mM 磷酸钠, pH 7.0。

然后, 将干扰素 γ 变体上样到在 10 mM 磷酸钠, pH 7.0 中预先平衡的 8 ml CHT 陶瓷羟基磷灰石柱(Biorad)上。上样后在 30 倍柱体积内以从 0-60% 500 mM 磷酸钠, pH 7.0 的梯度洗脱结合的干扰素 γ 变体之前用 5 倍柱体积的 10 mM 磷酸钠, pH 7.0 洗涤柱子。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。合并富含干扰素 γ 变体的馏分并使用 Vivaspin20 柱(VivaScience)将缓冲液更换成 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, pH 6.0 并随后加入 Tween 20 至 0.01% 的浓度。无菌过滤干扰素 γ 变体并贮存在 -80°C 。

另外, 干扰素 γ 变体可按照下面的纯化方案进行纯化:

使用 Millipore TFF 系统超滤至大约 1/15 体积前微孔过滤(0.22 μm)滤液。在同一系统中使用 10 mM Tris, pH 7.6 渗滤该浓缩物, 之后将 pH 调到 9.0 并通过微孔过滤去掉沉淀。

将该样品上样到在 10 mM Tris, pH 9.0 中预先平衡的 Q-sepharose Fast Flow (Pharmacia)柱上。上样后在 15 倍柱体积内以从 0 - 100%的 10 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 9.0 的梯度洗脱结合的干扰素 γ 变体之前用 3 倍柱体积的 10 mM Tris, pH 9.0 洗涤柱子。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。合并富含干扰素 γ 变体的馏分, 并将 pH 调节到 7.6。加入硫酸铵至 1.5 M 且在搅拌后通过离心去掉沉淀。

然后将干扰素 γ 变体上样到预先在 10 mM Tris, 1.5M 硫酸铵, pH 7.6 中平衡的苯基琼脂糖高效柱(Pharmacia)上。

上样后用 3 倍柱体积的 10 mM Tris, 1.5M 硫酸铵, pH 7.6 洗涤柱子, 然后以在 10 倍柱体积内达到 100% 10 mM Tris, pH 7.6 的线形梯度洗脱结合的
5 干扰素 γ 变体。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。合并富含干扰素 γ 变体的馏分并将硫酸铵调节到 1.7 M。

然后将干扰素 γ 变体上样到在 10 mM 磷酸钠, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.6 中预先平衡的丁基琼脂糖柱上。上样后在使用 10 mM 磷酸钠, pH 6.5 的一个
10 步骤中洗脱结合的干扰素 γ 变体之前用 10 mM 磷酸钠, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.6 洗涤柱子。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。

然后合并富含干扰素 γ 变体的馏分并上样到在 10 mM 磷酸钠, pH 6.5 中预先平衡的羟基磷灰石柱上。上样后在 30 倍柱体积内以从 0-100% 500 mM 磷酸钠, pH 6.5 的线形梯度洗脱结合的干扰素 γ 变体之前用 5 倍柱体积的 10
15 mM 磷酸钠, pH 6.5 洗涤柱子。分级分离流出物以及洗脱的干扰素 γ 变体。

合并含有干扰素 γ 变体的馏分并将缓冲液更换成含有 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, pH 6.0 的缓冲液。随后加入 Tween 20 至 0.01% 的浓度。无菌过滤干扰素 γ 变体并贮存在 -80°C。

干扰素多肽的配制品

20 实施例 1

干扰素 β (IFN- β) 变体 Q49N+Q51T+F111N+R113T 的配制品

该变体按 WO 01/15736 的实施例 7 和 8 所述构建和表达并用如下的两步法纯化:

离心从摇瓶收获的培养基且通过 0.22 μ m 滤膜(PVDF)过滤。过滤的培养
25 基在装备有截留值为 10000 的聚醚砜(PES)膜的 Vivaflow 200 系统上渗滤且上样到用 50 mM 醋酸钠, 50 mM 氯化钠, pH 5.5 平衡的 S-Sepharose 柱 (Pharmacia)上。结合到柱子上的干扰素变体用 50 mM 醋酸钠, 0.5 M 氯化钠, pH 5.5 洗脱。将 S-Sepharose 柱的洗脱物中的氯化钠浓度调节到 1.0 M 并将样品上样到用 50 mM 醋酸钠, 1.0 M 氯化钠, pH 5.5 平衡的苯基-琼脂糖高
30 效柱(Pharmacia)上。上样后用 Milli Q 水洗涤柱子。干扰素 β 变体用从 Milli Q 水到 60%乙二醇, 50 mM 醋酸钠, pH 5.5 的梯度以 30 倍柱体积洗脱。收集

含有完全糖基化的干扰素 β 变体的馏分。在装备有截留值为 10000 的 PES 膜的 Vivaspin 20 ml 浓缩器中将制品中的缓冲液更换成 50 mM 磷酸钠, pH 7.0。

5 将纯化的 IFN- β 变体配制成含有在 50 mM 磷酸钠缓冲液(最后调节到 pH 7.0)中起始浓度为 10 MIU/ml 的变体且含有 35 mg/ml 甘露醇以及 2 mg/ml Tween 80 的组合物。一种组合物(组合物 A)不添加 Captisol®(可从 CyDex Inc. 获得)。另一组合物(组合物 B)含有 10 mg/ml Captisol®。

10 组合物以 50 μ l 的等分试样在 0.5 ml Eppendorf 管中(不用氮或氩净化)分别在 -80°C 和 35°C 下贮存 18 天。使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

结果表示为“在 35°C 下贮存的样品的平均百分活性, 作为在 -80°C 下贮存的样品的活性的函数(在同一天分析)”。

15	贮存天数	“在 35°C 与 -80°C 下的活性 %”	
		组合物	
		A	B
	10	24	144
	18	27	78

20 实施例 2

含有 IFN- β 变体 *Q49N+Q51T+F111N+R113T* 的配制品的差示扫描量热法

通过差示扫描量热法(DSC)分析实施例 1 的蛋白质的样品以研究蛋白质的解折叠(或变性)且特别是测定在每次操作中蛋白质的解折叠温度(T_m)。

25 用于 DSC 分析的起始材料是在 50mM 乙酸钠缓冲液中的蛋白质溶液(最后调节到 pH 5.5)。以加入各种赋形剂产生 0.4 mg/mL 的最终蛋白质浓度制备了一系列的溶液。使用注射水作为 DSC 的空白, 因为焦点仅是测定 T_m 值的变化。在进行 DSC 分析之前, 按 MicroCal Inc. 所述通过使用真空足够的时间给所有溶液除气。

30 通过使用 MicroCal Inc 的 DSC 装置(VP-DSC 型)评估该蛋白质的行为。所述溶液的温度以每分钟 1.5°C 的速率从环境温度(25°C)逐渐增加到大约 120°C。随着温度的增加发生两次事件。第一次事件是解折叠反应(吸热), 且

在扫描中观察到向上的峰值。第二次事件为沉淀(放热反应),且在扫描中观察到向下的峰值。

向起始溶液中加入 2.4 mg/ml 的 Tween 80; 5 mg/ml 氯化钠或 40 mg/ml Captisol®导致 ΔT_m 的 T_m -值变化,分别为: -0.7; +1.2 或+7.2°C。其中 ΔT_m 定义为:

$$\Delta T_m = (T_{m2} - T_{m1})$$

其中“ T_{m1} ”涉及不加入其它赋形剂的起始溶液的 DSC 扫描且“ T_{m2} ”涉及加入了 2.4 mg/ml Tween 80; 5 mg/ml 氯化钠或 40 mg/ml Captisol®的溶液的分别 DSC 扫描。

10 这些数据清楚地证明加入 Captisol®稳定溶液中的蛋白质;从而支持了实施例 1 中的发现。

实施例 3

15 [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFN- β 糖基化变体的生产, 纯化和 PEG 化

将产生[C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFN- β 糖基化变体的一个 CHO K1 亚克隆(5/G-10)接种进 6 个摇瓶的 200 ml 补充了 10% FBS 和青霉素/链霉素(P/S)的 DMEM/F-12 培养基(Life Technologies; Cat. #31330)中, 每个摇瓶具有 1700cm² 的展开表面(Corning, USA)。2 天后更换培养基。再过 20 2 天后两个摇瓶接近 100% 汇合, 将培养基更换成补充了 1/500 EX-CYTE (Serologicals Proteins; Cat. #81129N)和 P/S 的 300 ml 无血清 UltraCHO 培养基 (BioWhittaker; Cat. #12-724)。细胞在该培养基中的生长促进细胞量的提高, 比在含血清的培养基中可达到的量更高。2 天后更新培养基。再过 2 天后, 将培养基更换成生产培养基: 补充了 1/100 ITSA (Life Technologies; Cat. 25 #51300-044) [ITSA 表示用于贴壁培养物的胰岛素(1.0 g/L)-运铁蛋白(0.55 g/L)-硒(0.67 mg/L)添加物], 1/500 EC-CYTE 和 P/S 的 DMEM/F-12 培养基(Life Technologies; Cat.#21041)。合并从摇瓶中收获的培养基, 之后取出培养基样品用于 IFN- β 活性测定。在 21 天中, 每天收获 1.8 l 培养基并在 -80°C 冷冻。

30 离心从摇瓶收获的培养基且通过 0.22 μ m 滤膜(PVDF)过滤。过滤的培养基在装备有截留值为 10000 的聚醚砜膜的 Vivaflow 200 系统上渗滤并上样到 S-Sepharose 柱(Pharmacia)上。

用 50 mM 醋酸钠, 50 mM 氯化钠, pH 5.5 平衡 S-Sepharose 柱, 并用 50 mM 醋酸钠, 0.5 M 氯化钠, pH 5.5 洗脱干扰素变体。将洗脱物中的氯化钠浓度调节到 1.0 M。

5 将来自 S-Sepharose 柱的洗脱物上样到用 50 mM 醋酸钠, 1.0 M 氯化钠, pH 5.5 平衡的苯基-琼脂糖高效柱(Pharmacia)上。上样后用 50 mM 醋酸钠, 50mM 氯化钠, pH 5.5 洗涤柱子。IFN- β 变体用从 50 mM 醋酸钠, 50mM 氯化钠, pH 5.5 到 60% 乙二醇, 50 mM 醋酸钠, pH 5.5 的梯度以 30 倍柱体积洗脱。收集并合并含有完全糖基化的 IFN- β 变体的馏分。

10 通过将洗脱物通过用 50 mM 醋酸钠, 50mM 氯化钠, pH 5.5 平衡的 S-Sepharose 柱去掉苯基-琼脂糖洗脱物中的乙二醇。乙二醇流过而干扰素变体结合到柱子上。上样后用 20 mM 醋酸钠, pH 5.5 洗涤柱子并用 100 mM 磷酸钠, pH7.5 洗脱干扰素变体。

15 将洗脱物中的磷酸盐浓度调节到 15 mM 磷酸钠缓冲液, pH 7.2, 并上样到用 15 mM 磷酸钠, pH 7.2 平衡的羟基磷灰石柱(CHT I, Ceramic hydroxyapatite, Type I, Biorad)上。完全糖基化形式通过柱子, 而糖基化不足形式使用一个富余的位点与柱子结合, 用从 15 mM 到 200 mM 磷酸钠, pH6.8 的线型磷酸钠梯度以 20 倍柱体积洗脱。

根据 SDS-PAGE 鉴定完全糖基化的变体[C17S+Q49N+ Q51T+ D110F+ F111N+R113T]IFN- β 的纯度高于 95%。

20 纯化后, 将变体进行 PEG 化。每次实验前在 96% 的乙醇中制备 10 mg/ml SCM-PEG(羧甲基化 PEG 的琥珀酰亚胺基酯, 来自 Shearwater, Alabama, 12 k 或 20 k)的新鲜原液。

25 0.1 mg/ml 在 20 mM 磷酸钠, pH 7.0 中的蛋白质溶液用 SCM-PEG, 20K 进行 PEG 化, PEG 比可能的 PEG 化位点, 即赖氨酸和 N-末端过剩 0.75 倍的摩尔数。室温下温育 30 分钟后, 通过加入过剩的 20 mM 甘氨酸, pH 8.0 终止反应。反应混合物含有单个, 2 个和未 PEG 化的物质的混合物。使用阳离子交换层析或大小排阻层析或两者的结合分离单个 PEG 化物质与其它种类。将 PEG 化溶液中的 pH 调节到 pH 2.7 并将样品上样到用 20 mM 柠檬酸钠, pH 2.7 平衡的 SP-Sepharose HR (Pharmacia)柱上。用含有 1M 氯化钠的 30 50 mM 醋酸钠从柱子上洗脱 PEG 化蛋白质并上样到用 100 mM 醋酸钠, 200 mM 氯化钠, pH 5.5 平衡的大小排阻柱 Sephacryl S-100, ((16/60) Pharmacia)

上。合并含有单个 PEG 化的物质的馏分并进一步鉴定。

在另一实验中，0.16 mg/ml 在 20 mM 磷酸钠，pH 7.0 中的蛋白质溶液用 SCM-PEG, 12K 进行 PEG 化，PEG 比可能的 PEG 化位点，即赖氨酸和 N-末端过剩 2 倍的摩尔数。室温下温育 30 分钟后，通过加入过剩的 20 mM 甘氨酸，pH 8.0 终止反应。反应混合物含有单个，2 个，3 个 PEG 化物质以及未衍生化物质的混合物。使用阳离子交换层析或大小排阻层析或两者的结合分离 PEG 化物质与未修饰的蛋白质。将 PEG 化溶液中的 pH 调节到 pH 2.7 并将样品上样到用 20 mM 柠檬酸钠，pH 2.7 平衡的 SP-Sepharose HR (Pharmacia) 柱上。用含有 1M 氯化钠的 50 mM 醋酸钠从柱子上洗脱 PEG 化蛋白质并上样到用 100 mM 醋酸钠，200 mM 氯化钠，pH 5.5 平衡的大小排阻柱 Sephacryl S-100, ((16/60) Pharmacia) 上。合并含有单个，2 个和 3 个 PEG 化蛋白质的混合物的馏分并进一步鉴定。

实施例 4

15 含有[C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T]IFN- β 糖基化变体的配制品的差示扫描量热法

通过差示扫描量热法(DSC)分析 IFN- β 糖基化变体的样品(实施例 3 制备)以研究蛋白质的解折叠(或变性)且特别是测定在每次操作中蛋白质的解折叠温度(T_m)。

20 用于 DSC 分析的起始材料是在 20mM 磷酸钠中的蛋白质溶液(最后调节到 pH 7.1)。以加入各种赋形剂产生 0.4 mg/mL 的最终蛋白质浓度来制备溶液。使用注射水作为 DSC 的空白，因为焦点仅是测定 T_m 值的变化。在进行 DSC 分析之前，按 MicroCal Inc.所述通过使用真空足够的时间给所有溶液除气。

25 通过使用 MicroCal Inc 的 DSC 装置(VP-DSC 型)评估该蛋白质的行为。所述溶液的温度以每分钟 1.5°C 的速率从环境温度(25°C)逐渐增加到大约 120°C。随着温度的增加在扫描中观察到解折叠反应(吸热)为向上的峰值。

30 比较对加入“0.2M 甘露醇”或“0.2M 甘露醇+35mg/ml Captisol®”的溶液的 DSC 操作揭示了含有 Captisol®的样品 T_m-值增加大约 6.4°C。这些数据清楚地证实了加入 Captisol®可稳定在溶液中的蛋白质。

实施例 5

含有以 12kDa PEG 化的 [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+ R113T] IFN- β 糖基化变体的配制品

- 5 将纯化的以 12kDa PEG 化的 IFN- β 糖基化变体(实施例 3 制备)配制成下列在如下缓冲液: 10 mM 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5)且含有 45 mg/ml 甘露醇以及 2 mg/ml Tween 80(缓冲液 I), 或 50 mM 磷酸钠缓冲液(最后调节到 pH 7.0)且含有 30mg/ml 甘露醇以及 2 mg/ml Tween 80(缓冲液 II) 中含有起始浓度为大约 5MIU/ml 的变体的组合物。对于缓冲系统 I: 一种组合物(组合物 A)不添加 Captisol®。另一组合物(组合物 B)含有 10 mg/ml Captisol®。对于缓冲系统 II: 一种组合物(组合物 C)不添加 Captisol®。另一组合物(组合物 D)含有 10 mg/ml Captisol®。

组合物以 50 μ l 的等分试样在 0.5 ml Eppendorf 管中在 -80°C 下贮存不同时间长度(不用氮或氩净化)。至少 0.4mL 的样品在硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中在 5, 25 和 35°C 下贮存(密封前用氮净化)。

- 15 使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

抗病毒活性试验的结果在下表中表示为“在给定的温度下贮存的样品的平均百分活性, 作为在 -80°C 下贮存的样品的活性的函数(在同一天分析)”:

贮存温度 (°C)	5				25				35			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
贮存天数												
4	-	-	-	-	-	-	-	-	13 2	83	33	35
21	-	-	-	-	-	-	-	-	0	22	5	0
32	-	-	-	-	-	-	-	-	0	10	3	1
38	114	173	86	73	48	90	29	16	-	-	-	-
67	64	107	-	-	0	20	-	-	-	-	-	-
80	45	69	-	-	-	9	-	-	-	-	-	-

NB.如果在给定时间点没有分析该组合物的样品, 则表示为“-”。

- 20 这些数据清楚地证明向可药用的缓冲系统中加入 Captisol®可延缓在某些 pH 值下的生物活性损失。

另外, 对在小瓶中贮存的各种组合物的视觉观测揭示了含有 Captisol®

的组合物防止或延缓 PEG 化的 IFN- β 变体的沉淀。例如, 组合物 A 和 B 在 35°C 贮存 34 天分别观测为“高度浑浊”和“澄清溶液”。

实施例 6

5 含有以 20kDa PEG 化的[C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N+ R113T] IFN- β 糖基化变体的配制品

将纯化的以 20kDa PEG 化的 IFN- β 变体(实施例 3 制备)配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为 11 - 14MIU/ml 的变体的下列组合物: 10 mM 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5)且含有 45 mg/ml 甘露醇以及 2 mg/ml Tween 80 和
10 6.7mg/ml Captisol®(组合物 A), 或 50 mM 磷酸钠缓冲液(最后调节到 pH 7.0)且含有 30mg/ml 甘露醇以及 2 mg/ml Tween 80 和 10 mg/ml Captisol®(组合物 B)。

组合物以 50 μ l 的等分试样在 0.5 ml Eppendorf 管中在 -80°C 下贮存不同时间长度(不用氮或氩净化)。至少 0.4mL 的样品在硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中在
15 5, 25 和 35°C 下贮存(密封前用氮净化)。

使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

抗病毒活性试验的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性, 作为在 -80°C 下贮存的样品的活性的函数(在同一天分析)”:

贮存温度(°C)	5		25		35	
组合物	A	B	A	B	A	B
贮存天数						
4	-		-	-	137	116
21	-	-	-	-	19	1
32	-	-	-	-	6	1
38	144	114	105	24	-	-
67	101	103	69	-	-	-
80	117	101	52	1	-	-
108	130	89	-	-	-	-

20 NB.如果在给定时间点没有分析该组合物的样品, 则表示为“-”。

这些数据清楚地支持实施例 5 的发现, 其中表明向可药用的缓冲系统中加入 Captisol®可延缓或甚至防止在某些 pH 值下的生物活性损失。

实施例 7

[C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T]IFN- β 糖基化变体的生产, 纯化和 PEG 化

- 5 将产生[C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+ F111N+R113T] IFN- β 糖基化变体的一个 CHO K1 亚克隆(5/G-10)按实施例 3 所述在 6 个摇瓶中生产并按实施例 3 所用的方案纯化。根据 SDS-PAGE 鉴定完全糖基化的变体[C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T] IFN- β 的纯度高于 95%。
- 10 纯化后, 将变体进行 PEG 化。每次实验前在乙醇中制备 SCM-PEG(羧甲基化 PEG 的琥珀酰亚胺基酯, 来自 Shearwater, Alabama, 12 kD 或 20 kD)的新鲜原液。

- 0.1 mg/ml 在 20 mM 磷酸钠, pH 7.0 中的蛋白质溶液用 SCM-PEG, 20K 进行 PEG 化, PEG 比可能的 PEG 化位点, 即赖氨酸和 N-末端过剩 3 倍的摩尔数。室温下温育 30 分钟后, 通过加入过剩的 20 mM 甘氨酸, pH 8.0 终止反应。反应混合物含有单个, 2 个和未 PEG 化的物质的混合物。使用阳离子交换层析或大小排阻层析或两者的结合分离单个 PEG 化物质与其它种类。将 PEG 化溶液中的 pH 调节到 pH 2.7 并将样品上样到用 20 mM 柠檬酸钠, pH 2.7 平衡的 SP-Sepharose HR (Pharmacia)柱上。用含有 1M 氯化钠的 50 mM 醋酸钠从柱子上洗脱 PEG 化蛋白质并上样到用 100 mM 醋酸钠, 200 mM 氯化钠, pH 5.5 平衡的大小排阻柱 Sephacryl S-100, ((16/60) Pharmacia)上。合并含有单个 PEG 化的物质的馏分并进一步鉴定。
- 15
- 20

- 在另一实验中, 0.1mg/ml 在 20 mM 磷酸钠, pH 7.0 中的蛋白质溶液用 (10mg/ml)SCM-PEG, 12K 进行 PEG 化, PEG 比可能的 PEG 化位点, 即赖氨酸和 N-末端过剩 5 倍的摩尔数。室温下温育 30 分钟后, 通过加入过剩的 20 mM 甘氨酸, pH 8.0 终止反应。反应混合物含有单个, 2 个, 3 个 PEG 化物质以及未衍生物质的混合物。使用阳离子交换层析或大小排阻层析或两者的结合分离 PEG 化物质与未修饰的蛋白质。将 PEG 化溶液中的 pH 调节到 pH 2.7 并将样品上样到用 20 mM 柠檬酸钠, pH 2.7 平衡的 SP-Sepharose HR (Pharmacia)柱上。用含有 1M 氯化钠的 50 mM 醋酸钠从柱子上洗脱 PEG 化蛋白质并上样到用 100 mM 醋酸钠, 200 mM 氯化钠, pH 5.5 平衡的大小排
- 25
- 30

阻柱 Sephacryl S-100, ((16/60) Pharmacia)上。合并含有单个, 2个和3个 PEG 化蛋白质的混合物的馏分并进一步鉴定。

实施例 8

5 含有以 20kDa PEG 化的 [C17S+K19R+K33R+K45R+Q49N+Q51T+D110F+F111N+R113T]IFN- β 糖基化变体的配制品

将纯化的以 20kDa PEG 化的 IFN- β 变体(实施例 7 制备)配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为 5 - 10MIU/ml 的变体的下列组合物: 10 mM 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.0, ~缓冲液 A); 10 mM 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5, ~缓冲液 B), 10 mM 琥珀酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5, ~缓冲液 C), 10 mM 琥珀酸钠缓冲液(最后调节到 pH 6.0, ~缓冲液 D)和 10 mM 柠檬酸钠缓冲液(最后调节到 pH 6.0, ~缓冲液 E)。向 5 种所述缓冲系统的每一种中加入各种组合的下列 3 种赋形剂 Tween 80(无, 0.2 和 2.0 mg/ml), Captisol®(10 和 50 mg/ml)和甘露醇(17 和 39 mg/ml)。另外, 对于缓冲系统 C 和 E, 还研究了无 Tween 80 或 Captisol®但仅加入甘露醇(分别为 34 和 32 mg/ml)的组合。

调节甘露醇的量以确保等渗溶液适合于肠胃外给药。

组合物以 25 μ l 的等分试样在 0.5 ml Eppendorf 管中在 -80°C 和 5°C 下贮存不同时间长度(不用氮或氩净化)。至少 0.4ml 的样品在硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中在 25°C 下贮存(密封前用氮净化)。

使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

抗病毒活性试验的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性, 作为在 -80°C 下贮存的样品的活性的函数(在同一天分析)”。

都含有 10 mM 琥珀酸钠缓冲液和甘露醇(最后调节到 pH 5.5, ~缓冲液 C)的 7 个不同的配制品在抗病毒分析前在 -80°C 和 25°C 下贮存。不含 Tween 80 和 Captisol®的配制品保持的稳定性比其它配制品晚 20 天。

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.2	2
0	40*		
10	64	101	116
50	117	109	65

在 25°C 下贮存 94-95 天的缓冲液 C 组合物样品的平均百分活性, 作为在

-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

*)在 25℃下贮存 74 天的该缓冲液 C 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.2	2
0	17*		
10	120	72	41
50	96	91	116

5 在 25℃下贮存 160 天的缓冲液 C 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

*)在 25℃下贮存 140 天的该缓冲液 C 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

10 都含有 10 mM 柠檬酸钠缓冲液和甘露醇(最后调节到 pH 6.0, ~缓冲液 E)的 7 个不同的配制品在抗病毒分析前在-80℃和 25℃下贮存。不含 Tween 80 和 Captisol®的配制品保持的稳定性比其它配制品晚 20 天。

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.2	2
0	68*		
10	86	81	61
50	103	117	111

在 25℃下贮存 94-95 天的缓冲液 E 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

15 *)在 25℃下贮存 75 天的该缓冲液 E 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.2	2
0	25*		
10	83	45	8
50	122	80	45

在 25℃下贮存 164 天的缓冲液 E 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

*)在 25℃下贮存 144 天的该缓冲液 E 组合物样品的平均百分活性, 作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

考虑到不含 Captisol®的组合物比剩下的组合物贮存的时间短得多，因此该数据清楚地表明向可药用的缓冲系统中加入 Captisol®可延缓或甚至防止在某些 pH 值下的生物活性损失，即使在升高的温度下贮存更长的时间。

5 实施例 9

结合下列参数研究包括实施例 1-8 的具体变体的选定纯化的 IFN-β 变体的稳定性：

a)“各种浓度”选自 1 - 50MIU/ml。

b)缓冲液类型选自乙酸钠，琥珀酸钠，柠檬酸钠，马来酸钠，碳酸钠，
10 酒石酸钠，乳酸钠，和其混合物，每种缓冲液类型具有高达 100 mM 的合适浓度。

c) pH 范围选自 pH 4.0-7.0。

d) Captisol®的浓度选自 5-100 mg/ml。

e)其它有关赋形剂的类型和量选自 Tween 20 (高达 2 mg/ml)，Tween
15 80(高达 2 mg/ml)，甘露醇(高达 50 mg/ml)，氯化钠(高达 9 mg/ml)。

f)适合于通过肠胃外施用给定产品的主要容器。

实施例 10

含有以 20kDa PEG 化的 [C17S+Q49N+Q51T+D110F+F111N +R113T]
20 IFN-β 糖基化变体的配制品

配制前，用由含有 25 mg/ml 甘露醇的 10 mM 乙酸钠缓冲液(最终调节到 pH 5.5)组成的溶液平衡纯化的以 20kDa PEG 化的 IFN-β 变体(实施例 3 制备)。将该物质配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为 100μg/ml 的变体的下列组合物：含有下列组合的甘露醇，氯化钠(NaCl)，Tween 80 和 Captisol®的 10 mM
25 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5)。

配制品	Tween 80 (mg/ml)	Captisol® (mg/ml)	甘露醇 (mg/ml)	NaCl (mg/ml)
M01	0	0	48	0
M02	0.05	0	48	0
M03	0.02	0	48	0
M04	0.05	10	45	0
M05	0.20	10	45	0
M06	0	25	38	0
M07	0.05	25	38	0
M08	0.20	25	38	0
M09	0	50	28	0
M10	0.05	50	28	0
M11	0	100	9.3	0
M12	0.05	100	9.3	0
NM01	0	0	9.3	6.8
NM02	0.05	0	9.3	6.8
NM03	0.20	0	9.3	6.8
NM04	0.05	10	9.3	6.2
NM05	0.20	10	9.3	6.2
NM06	0	25	9.3	5.1
NM07	0.05	50	9.3	5.1
NM08	0.20	25	9.3	5.1
NM09	0	50	9.3	3.4
NM10	0.05	50	9.3	3.4

组合物通过过滤灭菌，在无菌条件下装入无菌容器中并贮存不同时间长度。将 20 μ l 的等分试样装入 0.5 ml Eppendorf 管中并在 -80 $^{\circ}$ C 下贮存。至少 0.3ml 的等分试样装入硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中并在 5, 25 和 35 $^{\circ}$ C 下贮存。

5 使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

贮存大约 1 个月后抗病毒活性试验的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性，作为在 -80 $^{\circ}$ C 下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)”:

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.05	0.2
0	76	65	56
10		123	110
25	124	111	113
50	101	109	
100	155	128	

在 25°C 下贮存的配制品组合物 M01 至 M012 的样品的平均百分活性，作为在 -80°C 下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

Captisol (mg/ml)	Tween 80 (mg/ml)		
	0	0.05	0.2
0	38	16	7
10		71	68
25	109	90	73
50	87	93	
100	115	100	

5 在 35°C 下贮存的配制品组合物 M01 至 M012 的样品的平均百分活性，作为在 -80°C 下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

这些数据清楚地支持实施例 5 中的发现，其中表明向可药用的缓冲系统中加入 Captisol® 可延缓或甚至防止在某些 pH 值下的生物活性损失。

与实施例 6 相比，在本实施例中用明显少得多的 Tween 80，可解释在所述多肽温度升高时观察到的稳定性提高。

10

实施例 11

含有野生型 IFN-β(IFN-β) 的配制品

15 按与实施例 3 所述的变体区别在于最后步骤由通过 Superdex 75 柱的凝胶过滤组成的方法纯化 IFN-β 的大量制品。然后用由含有 0.1M 氯化钠和 0.2 M 甘露醇的 50 mM 乙酸钠(调节到 pH 5.5)组成的溶液平衡该物质。

将该物质配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为大约 5MIU/ml 的 IFN-β 的下列组合物：含有 28 mg/ml 甘露醇，1.3 mg/ml 氯化钠，和 2 mg/ml Tween 80 以及无 Captisol®(配制品 A)或 10 mg/ml Captisol®(配制品 B)的 50 mM 乙酸钠缓冲液(最后调节到 pH 5.5)。

20 将该组合物以 50μl 的等分试样装入 Eppendorf 管中并在 -80°C, -20 和 5°C

下贮存不同时间长度。

使用 WO 01/15736 中所述的抗病毒试验测量抗病毒活性。

贮存大约 354 天后抗病毒活性试验的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)”：

贮存温度	配制品 A	配制品 B
-20℃	32	35
5℃	9	31

在-20℃和 5℃下贮存 354 天的配制品组合物 A 和 B 的样品的平均百分活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

实施例 12

10 含有野生型 *IFN-γ*(*IFN-γ*) 的配制品

按“制备干扰素 γ 的材料和方法”部分内的实施例 H 所述进行 *IFN-γ* 的大量制备。将该制品配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为 0.5mg/ml 的 *IFN-γ* 的下列组合物：含有 40mg/ml 甘露醇和 0.01% Tween 20 以及无 Captisol®(配制品 A)或 50 mg/ml Captisol®(配制品 B)的 5mM 琥珀酸钠缓冲液(最后调节到 pH6.0)。

组合物通过过滤灭菌，在无菌条件下装入无菌容器中并贮存不同时间长度。将 20 μ l 的等分试样装入 0.5 ml Eppendorf 管中并在-80℃下贮存。至少 0.15ml 的等分试样装入硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中并在 5, 25, 35 和 40℃下贮存。

20 使用“制备干扰素 γ 的材料和方法”部分中所述的萤光素酶测定法测量活性。

贮存 8 天后萤光素酶测定的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)”：

贮存温度	配制品 A	配制品 B
25℃	63	118
35℃	44	95
40℃	39	83

25 在 25, 35 和 40℃下贮存 8 天的配制品组合物 A 和 B 的样品的平均百分

活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

实施例 13

含有[E38N+S40T+S99T] IFN- γ 糖基化变体的配制品

- 5 按“制备干扰素 γ 的材料和方法”部分描述的实施例 D 所述制备 IFN- γ 变体。按“制备干扰素 γ 的材料和方法”部分描述的实施例 H 所述纯化该材料。将该纯化的物质配制成在如下缓冲液中含有起始浓度为 0.5mg/ml 的变体的下列组合物：含有 40mg/ml 甘露醇和 0.01% Tween 20；以及无 Captisol®(配制品 A)或 50 mg/ml Captisol®(配制品 B)的 5mM 琥珀酸钠缓冲液(最后调节
- 10 到 pH6.0)。

组合物通过过滤灭菌，在无菌条件下装入无菌容器中并贮存不同时间长度。将 20 μ l 的等分试样装入 0.5 ml Eppendorf 管中并在-80℃下贮存。至少 0.15ml 的等分试样装入硅化玻璃小瓶(I 型玻璃)中并在 5 和 25℃下贮存。

- 15 使用“制备干扰素 γ 的材料和方法”部分中所述的荧光素酶测定法测量活性。

荧光素酶活性测定的结果在下表中表示为“在给定温度下贮存的样品的平均百分活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)”：

贮存天数	配制品 A		配制品 B	
	在 5℃下贮存	在 25℃下贮存	在 5℃下贮存	在 25℃下贮存
6		5		35
14	47	0	72	9
28	13		44	

在 5 和 25℃下贮存的配制品组合物 A 和 B 的样品的平均百分活性，作为在-80℃下贮存的样品活性的函数(在同一天分析)。

<110> 马克西根公司 (Maxygen ApS)
 马克西根控股有限公司 (Maxygen Holdings Ltd.)

<120> 干扰素配制品

<130> 0232wo410

<140>
 <141>

<150> DK PA 2001 01040
 <151> 2001-06-29

<150> DK PA 2001 01277
 <151> 2001-08-30

<150> DK PA 2002 00257
 <151> 2002-02-19

<160> 11

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 165

<210> 2
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 2
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1 5 10 15
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20 25 30
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35 40 45
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50 55 60
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65 70 75 80
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85 90 95
 Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
 100 105 110
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
 115 120 125
 Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 130 135 140

<210> 3
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 3
 Met Lys Tyr Thr Ser Tyr Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ile Val Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
 20 25 30
 Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn
 35 40 45
 Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp
 50 55 60
 Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 65 70 75 80
 Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile
 85 90 95
 Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
 100 105 110
 Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val
 115 120 125
 Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
 130 135 140
 Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
 145 150 155 160
 Gly Arg Arg Ala Ser Gln
 165

<210> 4

<211> 140
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Actimmune

<400> 4
 Met Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe
 1 5 10 15
 Asn Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly
 20 25 30
 Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser
 35 40 45
 Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp
 50 55 60
 Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
 65 70 75 80
 Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu
 85 90 95
 Thr Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His
 100 105 110
 Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly
 115 120 125
 Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg
 130 135 140

<210> 5
 <211> 498
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 使干扰素 γ 在 CHO 细胞中的表达优化的表达盒

<400> 5
 atgaagtaca caagctatat cctggccttt cagctgtgca tcgtgctggg ctccctgggc 60
 tgctattgcc aggaccctta cgtgaaggag gccgagaacc tgaagaagta cttaacgcc 120
 ggccacagcg atgtggccga caatggcaca ctgtttctgg gcacacctgaa gaattggaag 180
 gaggagagcg atcgaagat catgcagtcc cagatcgtgt ccttctattt caagctgttt 240
 aagaatttca aggacgatca gtccatccag aagtcctgtg agaccatcaa ggaggacatg 300
 aacgtgaagt ttttcaatag caataagaag aagagagacg atttcgagaa gctgaccaat 360
 tactccgtga cagacctgaa cgtgcagaga aaggccatcc acgagctgat ccagggtgatg 420
 gccgagctgt cccccgccgc caagaccggc aagagaaaga gaagccagat gctgttcaga 480
 ggcagacggg ccagccag 498

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 6
 gatggctggc aactagaag

19

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 7
 tgtacggtgg gaggtctat 19

 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 8
 gttcaggtct gtcacggtgt aattggtcag ctt 33

 <210> 9
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 9
 aagctgacca attacaccgt gacagacctg aac 33

 <210> 10
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 10
 catgatcttc cgatcggctct cgttcttcca att 33

 <210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列

 <220>
 <223> 引物

 <400> 11
 aattggaaga acgagaccga tcggaagatc atg 33