



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085657 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201410201478. 0

(22) 申请日 2014. 05. 14

(71) 申请人 北京凯因科技股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术开
发区荣京东街6号

(72) 发明人 田硕 杨璐 潘海

(51) Int. Cl.

C07K 14/555(2006. 01)

C12N 15/20(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C07K 1/107(2006. 01)

A61K 38/21(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 29/00(2006. 01)

A61P 31/12(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表2页 附图2页

(54) 发明名称

一种干扰素突变体及聚乙二醇衍生物

(57) 摘要

本发明涉及一种 Lambda 干扰素突变体,将干扰素 lambda1 的第 123 位脯氨酸突变为丝氨酸,得到一种新型的突变体干扰素 Lambda,所述的突变体干扰素 Lambda 具有相对突变前更好的稳定性,本发明还涉及该 Lambda 干扰素突变体的聚乙二醇衍生物及其用途。

1. 一种 IFN- λ 1 突变体,其特征在於所述突变体的氨基酸序列的第 123 位的 Pro 突变为 Ser。
2. 一种核苷酸序列,其特征在於编码权利要求 1 所述的 IFN- λ 1 突变体。
3. 一种表达载体,其特征在於所述表达载体含有权利要求 2 所述的核苷酸序列。
4. 培养的细胞,其中已经导入了权利要求 3 所述的表达载体,所述细胞表达由该 DNA 区段编码的多肽。
5. 一种 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物,其特征在於所述聚乙二醇修饰剂连接於所述 IFN- λ 1 突变体的第 15 位的 Cys 上。
6. 权利要求 5 所述的 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物,其中所述的聚乙二醇修饰剂为巯基聚乙二醇修饰剂,是具有选自二硫对吡啶、乙烯砜、马来酰亚胺或碘乙酰胺的官能团的多元醇衍生物。
7. 权利要求 5 或 6 所述的 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物,其中所述聚乙二醇修饰剂的分子量为 10-40kDa。
8. 一种制备权利要求 5、6 或 7 中任意一权利要求所述 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物的方法,其特征在於包括如下步骤:用硫醇反应性多元醇剂和所述多肽反应,所述多肽具有单一游离的半胱氨酸残基,所述多元醇试剂和所述多肽的位点特异性共价结合,形成共价硫醚键,得到多元醇-多肽偶联物,回收纯化产生的目的多元醇-多肽偶联物,即得。
9. 一种药用组合物,其特征在於,该组合物包括权利要求 1 至 2 中任意一权利要求所述 IFN- λ 1 突变体或权利要求 5-7 中任意一权利要求所述 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物,以及药物学上可接受的载体或赋形剂。
10. 权利要求 1 或 2 所述 IFN- λ 1 突变体,或权利要求 5-7 中任意一权利要求所述 IFN- λ 1 变体的聚乙二醇衍生物,或权利要求 9 所述的组合物在制备具有治疗炎症、病毒感染、细菌感染以及癌症药物中的用途。

一种干扰素突变体及聚乙二醇衍生物

技术领域

[0001] 本发明涉及 IFN- λ 1 突变体、其聚乙二醇衍生物及其制备方法,以及包含所述 IFN- λ 1 突变体或该突变体的聚乙二醇衍生物在预防或治疗病毒性疾病、肿瘤方面的应用。

背景技术

[0002] 干扰素是一类重要的家族性细胞因子,具有广谱的抗病毒、抗细胞增殖和免疫调节作用。

[0003] 迄今,已经鉴定到 6 种形式的干扰素,它们分为三个大组。所谓的“I 型”干扰素包括干扰素 α 、干扰素 β 、干扰素 ω 、干扰素 δ 、干扰素 τ 。目前,干扰素 γ 和干扰素 α 的一个亚类是仅有的 II 型干扰素。III 型干扰素是最近发现的一类细胞因子家族,包括干扰素 λ 1、 λ 2 和 λ 3,也称为 IL-28A、IL-28B 和 IL-29

[0004] IL-28A、IL-28B 和 IL-29 包含最近发现的新蛋白家族,所述蛋白质家族与 I 型干扰素有序列同源性,并与 IL-10 有基因序列的同源性。该新家族在共同所有的 PCT 申请 W002/086087 和 Sheppard 等, *Nature Immunol.* 4:63-68, 2003 (全文都纳入本文参考) 中有详细的描述。从功能上说,IL-28 和 IL-29 类似于 I 型干扰素,均能诱导细胞中的抗病毒状态,与 I 型干扰素不同的是,它们不显示出抗某些 B 细胞系的抗增殖活性。

[0005] 野生型 IL-29 (干扰素 λ 1) 基因编码 200 个氨基酸多肽,该蛋白质成熟氨基酸序列显示在 SEQ ID NO:1 中,编码本文所述的 IL-29 多肽区域、域、基序、残基和序列的相应多核苷酸显示在 SEQ ID NO:2 中。IL-29 的螺旋预测如下:螺旋 A 有氨基酸残基 30(Ser) 至 44(Leu) 所定义;螺旋 B 由氨基酸残基 57(Asn) 至 65(Val) 所定义;螺旋 C 有氨基酸残基 70(Val) 至 85(Ala) 所定义;螺旋 D 由氨基酸残基 92(Lys) 至 111(Gln) 所定义;螺旋 E 由氨基酸残基 118(Thr) 至 139(Lys) 所定义;而螺旋 F 由氨基酸残基 144(Gly) 至 170(Leu) 所定义。

[0006] 已知 IL-29 分子具有 5 个半胱氨酸残基 (PCT 申请 W002/086087W002/02627),基于多重比对进行的 IL-29 的进一步分析预测,氨基酸残基第 49 和 145 位,及第 112 和 171 位的半胱氨酸将形成分子内二硫键,第 15 位的半胱氨酸是游离的,可以形成分子间二硫键。

[0007] 无论是 I 型干扰素、II 型干扰素还是 III 型干扰素,作为蛋白质药物,由于稳定性差、血浆清除率高,体内半衰期短,易产生抗原抗体等,在临床治疗中很大的限制。基因工程技术使大规模合成人重组蛋白成为可能,工程蛋白通过改变野生蛋白序列中的某个或某几个氨基酸,以获得相对更为稳定、比活性更高的重组蛋白,并降低其免疫原性,这在一定程度上解决了异源蛋白引起的不稳定或免疫原性问题。

[0008] 尽管这样,还无法克服血浆清除快和生物利用度低等缺点,这些缺点造成的结果是:需频繁注射干扰素才能达到有效血浆治疗浓度;而且,每次注射后均会导致血药浓度的较大波动,形成药物浓度的峰值和谷值。这样就可能增加了治疗费用以及给药不便和不良反应的风险。因此,人们试图采用各种药物传递技术来提高蛋白质药物的疗效。

[0009] 蛋白药物的生物利用度通常受血浆半衰期的限制,并且对蛋白酶降解敏感,阻碍

在临床治疗上的应用聚乙二醇修饰蛋白质的技术是近年来发展起来的一种用于改进蛋白质类药物体内药动学性质的新技术。它是将活化的聚乙二醇分子 (PEG) 键合到蛋白质分子表面上,从而影响蛋白质的空间结构,最终导致蛋白质各种生物化学性质的改变,如:化学稳定性增加,抵抗蛋白酶水解能力提高,免疫原性和毒性降低消失,体内半衰期延长,血浆清除率降低等等。

[0010] 发明概述

[0011] IFN- λ 1 上有多处氨基酸可供进行突变,但这些氨基酸序列的改变应当考虑 IFN- λ 1 的折叠及空间结构不受影响、并至少得到可以保持相当于野生型 IFN- λ 1 活性的突变体。本发明的目的是提供一种在第 123 位氨基酸进行突变得到的一种新型的突变体 IFN- λ 1,将第 123 位的 Pro 突变为 Ser,该突变体相对于野生型 IFN- λ 1,活性更强、稳定性更好。

[0012] 本发明提供制备可溶性 IFN- λ 1 突变体的方法,该方法通过先构建设计 IFN- λ 1 突变体引物,构建获得突变体基因,将所得基因插入到表达载体,将所得的载体转入到宿主大肠杆菌中,得到相应的表达工程菌,再进行发酵和诱导表达、包涵体变性和复性,得到可溶性 IFN- λ 1 突变体。

[0013] 所需的蛋白质从可溶性细胞质部分,可溶性周质部分、培养基的可溶性部分以及包涵体中回收和纯化,可使用从培养基、细胞质、周质部分以及包涵体中回收和纯化蛋白质的任何方法,这些回收和纯化方法是已知的或本领域的技术人员容易确定的,包括,但不限于,离心,过滤,透析,层析(包括分子排阻层析)等方法。回收和纯化所需蛋白质的合适方法部分取决于蛋白质的特性和目的用途。

[0014] 为实现所采取的技术方案是利用蛋白工程技术,对 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列进行定点突变,将 123 位的 Pro 突变为 Ser,具体方法是:

[0015] 1) 利用体外定点突变技术获得编码目的蛋白的重组基因;

[0016] 2) 将此重组基因插入到表达载体中获得可编码重组蛋白的重组质粒,所述表达载体包括但不限于 pET-23b;

[0017] 3) 将重组质粒转化大肠杆菌感受态细胞获得可稳定表达目的蛋白的工程菌,所述大肠杆菌感受态细胞包括但不限于 BL21 (DE3);

[0018] 4) 工程菌以包含体形式表达的目的蛋白。表达产物包涵体形式存在,表达量占菌体总蛋白的 40% 以上,重组蛋白的纯化依次采用 Blue 染料亲和层析、铜离子亲和层析、CM 弱阳离子交换层析三步纯化工艺,可以得到高纯度的重组目的蛋白 IFN- λ 1 突变体。

[0019] 本发明的个目的是提供如上所述的 IFN- λ 1 突变体的聚乙二醇衍生物及其制备方法,通过硫醇反应使聚乙二醇 (PEG) 试剂与 IFN- λ 1 中的游离半胱氨酸残基反应获得特异性偶联物,所得产物中,PEG 实现在游离半胱氨酸定点修饰,得到的 PEG-IFN- λ 1 突变体。较未 PEG 化的 IFN- λ 1 相比,所得的 PEG-IFN- λ 1 具有稳定性提高、免疫原性减弱。

[0020] 一般来说,PEG 化蛋白质方法类似 W09412219 (Cox 和 McDermott) 和 W09422466 (Cox 和 Russe11) 中所述的方法,并略加改良,本文引用这两篇文献以供参考。将含游离半胱氨酸的多肽或蛋白质与过量的“巯基化 PEG”相接触(一般 PEG:蛋白质或多肽的摩尔比为 1:1、5:1、10:1、和 50:1) 搅拌进行反应,反应条件中优选的温度是 4°C 到 37°C;优选的 pH 范围可以从 6.5 到 9.5,但更优选为 7.5 到 8.5。使用 SDS-PAGE 测定分子量的改变可检测蛋

白质的 PEG 化,一般认为产生大量单 PEG 化产物而不产生二 PEG 化产物的 PEG 的最低量是最佳的(一般认为 80% 转变成单 PEG 化产物是较好的)。

[0021] 本发明半胱氨酸以形成“PEG 化”蛋白质的“PEG 部分”包括任何合适的多聚体,例如,线性或带支链的多元醇。优选的多元醇是聚乙二醇,它是环氧乙烷单元组成的合成多聚体,可改变环氧乙烷单元以便通过大小排阻层析获得表观分子量范围大约为 3,000-70,000Da 的 PEG 化蛋白质变异体。PEG 部分的大小直接影响其循环半衰期。因此,可通过改变 PEG 部分的大小或结构来加工具有不同循环半衰期的蛋白变异体使之用于具体治疗应用或优选的剂量方案。

[0022] 如本申请所用的“巯基化反应性 PEG 化剂”指任何与半胱氨酸残基的巯醇基团反应的 PEG 衍生物,这些用于半胱氨酸残基修饰的反应性 PEG 末端基团,其包括但不限于二硫对吡啶、乙烯砜、马来酰亚胺、碘乙酰胺。PEG 末端基团应对游离巯基具有特异性,实现单 PEG 化。但在不损伤蛋白质的条件下发生反应。以其单-甲氧基化形式使用的 PEG 化剂,其中仅一个末端能被偶联。

[0023] 术语“单 PEG 化”定义为通过单个 PEG 部分共价附着到蛋白质的特定位点而修饰的蛋白质。“单 PEG 化”方法可使用本领域的技术人员已知的任何方法,包括,但不限于,本发明实施例中所列举的方法。

[0024] 在本发明中,优选的巯基化剂为 mPEG-二硫对吡啶(mPEG-OPSS)或 mPEG-马来酰亚胺(mPEG-MAL)。值得注意的是,上述两个 PEG 化剂与 IFN- λ 的反应是位点特异性的,分别是在 IFN- λ 1 的游离的 ¹⁵Cys 而其他天然存在的 Cys 残基位点由于易形成分子内二硫键,不和巯醇反应性 PEG 化剂反应。

[0025] 在本发明中,还提供了一种纯化本发明所得的 PEG-IFN- λ 1 偶联物的方法,一般来说,经过诸如透析、超滤、分子排阻色谱、离子交换层析、亲和层析、反相色谱或疏水层析,从未 PEG 化蛋白质和未反应的 PEG 中纯化 PEG 化蛋白质缀合物,也可使用其它的纯化方法,如两相有机提取或盐沉淀法。

[0026] 可以进行实验以证实 PEG 部分在正确的位点附着到蛋白质上,经过化学裂解或蛋白水解消化该蛋白质,以分子排阻、离子交换或反相层析纯化 PEG 多肽(它具有较大的分子量),随后进行氨基酸测序可完成。在氨基酸测序过程中,PEG 偶联的氨基酸以空白出现。

[0027] 术语“层析方法”或“层析法”指任何用来分离混合物组分的技术,通过将混合物施加于溶剂(流动相)流过填充物(固定相),进行分离层析法的分离原理是基于固定相和流动相的不同物理特性。

[0028] 本发明的又一目的在于提供一种本发明所述 IFN- λ 1 突变体及其聚乙二醇偶联物在制备具有治疗或预防病毒性疾病方面或肿瘤方面的应用,病毒指的是 IFN 所能抗的任何病毒,例如肝炎病毒、乳头状病毒、单纯性疱疹病毒、HIV、EB 病毒、冠状病毒和 / 或流感病毒等,优选是肝炎病毒,如 HBV 或 HCV;细菌感染以及癌症(例如,骨髓瘤,淋巴瘤、肝癌、乳腺癌、黑素瘤、白血病等)。如本发明的实施例中给出了本发明 PEG-IFN- λ 偶联物对肝癌细胞 HepG2、心肌炎病毒 EMCV

[0029] 对于治疗用途,技术人员可容易地确定合适的剂量、给药频率和给药途径。做出这些决定的因素包括,但不限于,所用的蛋白质的特性,所需治疗的病症,潜在的病人应变性,病人的年龄、体重以及个体反应等。

[0030] 本发明 PEG-IFN- λ 1 偶联物或含多元醇-IFN- λ 1 偶联物的组合物, 结合适合的药用载体或赋形剂, 以用于治疗各种病症, 在这些药物组合物中所用的特定载体可以采取各种形式, 其取决于所希望的给药类型。适当的给药途径包括, 但不限于, 肠道(例如, 口服)、局部、栓剂、吸入、以及非胃肠道, 优选为非胃肠道给药, 如皮下、肌肉、或静脉注射。

[0031] 在制备口服液体剂型(例如, 混悬剂、酞剂、胶体或溶液)的组合物时, 可以采用典型的药物介质, 如水、乙二醇、丙三醇、油、乙醇、增味剂、防腐剂、着色剂等。类似地, 当制备口服固体剂型(如片剂、胶囊剂等)时, 可采用诸如淀粉、糖类、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂等。

[0032] 用于非胃肠道给药的药物组成可以制备成包括有效成分和适当载体的注射剂型。为了非胃肠道给药, 载体通常包括无菌注射水, 也可包括一些其它可用的助溶剂或防腐剂组分, 此外也可制备注射型混悬剂, 在这种情况下, 将采用合适的液体载体、悬浮剂等。用于非胃肠道给药的载体在本技术领域是熟知的并且包括, 水、盐溶液、林格氏液、和/或葡萄糖, 该载体可以包含少量的赋形剂以便保持药剂的稳定性和等渗性, 这些溶液可以按照通常的方法制备。

[0033] 为了局部给药, 本发明的 PEG-IFN- λ 1 偶联物可用温和的含水基质进行配制, 如软膏或乳膏, 适用软膏基质的如凡士林、羊毛脂、以及油包水乳剂如 Eucerin™, 其可获自 Beiersdorf(Cincinnati, Ohio); 冷霜(USP); Purpose Cream™, 可获自 Johnson&Johnson(New Brunswick, New Jersey) 等。

[0034] 本发明的 PEG-IFN- λ 1 偶联物一般以单位剂量的形式给药, 本发明的化合物通常以每日、每周、以及每月剂量给药, 从约 0.01 μ g/kg 体重至约 50mg/kg 体重, 优选为从约 0.1 μ g/kg 体重至约 25mg/kg 体重, 更优选为从约 1 μ g/kg 体重至约 5mg/kg 体重。对于 75kg 的平均体重, 剂量可以在每日 10 μ g 和 1mg 之间, 更优选为 20 μ g 到 200 μ g 之间。对经修饰的 PEG-IFN- λ , 其给药周期可延长, 例如, 每周、或每两周给药方案。例如, 每人每周剂量可以是 10 μ g 至约 500 μ g, 在某些具体的实施例中, 每人每周剂量可以是约 50 μ g 至约 250 μ g, 在某些其它的实施例中, 每人每周剂量可以是约 100 至约 200 μ g。如本领域技术人员所明了的, 根据本发明的药物组成的特定量取决于若干因素, 包括但不限于所希望的生物活性、患者的状态、以及对药物的耐受性等。

附图说明

[0035] 图 1: 表示干扰素 lambda1 P123S 突变体的工程菌体蛋白诱导表达 SDS-PAGE 图谱。1 泳道为诱导表达 0h; 2 泳道为诱导表达 1h; 3 泳道为诱导表达 2h; 4 泳道为诱导表达 3h; 5 泳道为诱导表达 4h; 6 泳道为干扰素 lambda1 标准品;

[0036] 图 2: 表示纯化后的干扰素 lambda1 P123S 突变体的 SDS-PAGE 图谱。1 泳道为蛋白分子量 Marker; 2 泳道为纯化后的干扰素 lambda1 P123S 突变体蛋白;

[0037] 图 3: 表示纯化后的 PEG 修饰的干扰素 lambda1 P123S 突变体的 SDS-PAGE 图谱。1 泳道为蛋白分子量 Marker; 2 泳道为纯化后的 PEG 修饰的干扰素 lambda1 P123S 突变体蛋白。

具体实施方式

- [0038] 实施例 1 :IFN- λ 1P123S 突变体的基因克隆、工程菌构建及序列确认
- [0039] 提取 IFN- λ 1 的质粒作为模板,将 IFN- λ 1 的第 123 位脯氨酸 (CCG) 突变为丝氨酸 (TCT),首轮 PCR 包括两个反应体系:
- [0040] 反应体系 1 引物为:
- [0041] P1 :5' -CCATATGGGTCCGGTGCCGACCTCGAAACCG-3'
- [0042] P2 :5' -GCGAACCTGCAGCAGACGCAGATC-3'
- [0043] 扩增 62 位点及其上游 DNA 序列。
- [0044] 反应体系 1 引物为:
- [0045] P3 :5' -GAT CTG CGT CTG CTG CAG GTT CGC-3'
- [0046] P4 :5' -C CTCGAGTTATTATTAGGTCGATTCCGG-3'
- [0047] 扩增 123 位点及其下游 DNA 序列。
- [0048] PCR 条件为 :94°C 预变性 5min,94°C 变性 30s,53°C 退火 30s,72°C 延伸 1min,循环 30 次,最后再 72°C 延伸 5min。
- [0049] 第二轮 PCR 以第一轮 PCR 的产物为模板,以 P1、P4 为引物进行 PCR 扩增。反应条件为 :94°C 预变性 5min,94°C 变性 30s,53°C 退火 30s,72°C 延伸 1min,循环 30 次,最后再 72°C 延伸 5min。
- [0050] 将 pET-23b 载体与 PCR 扩增产物分别进行 Nde I/Xho I 酶切反应,37°C 反应 1h,回收线性化载体与目的片段 (约 600bp)。T4DNA 连接酶对 PCR 产物和载体的酶切片段进行连接 :10×T4DNA Ligase Buffer5 μ L,PCR 双酶切回收产物 15 μ L,质粒双酶切回收产物 30 μ L,T4DNA Ligase2 μ L,ddH₂O 加至 50 μ L,16°C 过夜。
- [0051] 将连接反应液直接转化 BL21 (DE3) 感受态细胞,转化上述连接产物,涂布氨苄平板,37°C 过夜培养。
- [0052] 挑取单菌落作为模板,用于上述设计的引物 P1、P2 进行扩增,琼脂糖凝胶电泳检测,阳性克隆在 600bp 左右出现条带,与预期情况相符,初步说明重组质粒构建成功。为进一步确认其序列,以 T7 通用引物通过 ABI377 测序仪进行全自动序列测定。
- [0053] 实施例 2 :IFN- λ 1P123S 突变体的表达和纯化
- [0054] 将工程菌以 1:100 的比例接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37°C 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 时,加入终浓度为 0.5mM IPTG 诱导,继续培养 4h 后收集菌体 (见图 1)。大肠杆菌 BL21 (DE3) 作为宿主时的表达的 IFN- λ 1 约占菌体总蛋白的 30-50%,主要以包涵体形式存在。
- [0055] 将发酵菌体以 TE 溶液 (m:V = 1:10) 洗涤菌体 3 次,然后进行高压匀浆破碎,破碎条件为 :35Mpa 高压匀浆。匀浆后,镜检破菌率。当菌体破碎率约 95% 时 (约破菌 2~3 次),8000rpm 离心 15min,收集破碎菌体沉淀。取破碎菌体沉淀置于烧杯中,加入包涵体洗涤液 (10mM Tris-HCl+1mM EDTA+0.5% Triton-X100, pH6.5, m:V = 1:10),于磁力搅拌机上搅拌 30min,洗涤 3~5 次。包涵体用包涵体裂解液裂解 (7M 盐酸胍 +50mM Tris-HCl+10mM DTT, pH6.5, m:V = 1:10),室温搅拌,过夜。裂解的蛋白慢速加入复性液 (100mM Tris-HCl, 0.5M Arginine,0.5% PEG3350 (m:V),2mM GSH:0.5mM GSSG, pH8.5) 中,使蛋白终浓度为 0.2mg/ml,室温搅拌,过夜。
- [0056] 复性液 8000rpm 离心 5min,收集上清。利用超滤杯,超滤膜孔径为 30kDa,用 A 液

(20mM PB pH7.0) 平衡超滤膜,然后将 1L 上清液浓缩 10 倍。浓缩液加入 2 倍缓冲液继续超滤,最终收集样品溶液 50ml。将浓缩液上样到用 A 液充分平衡的 Blue Sepharose FF 层析柱,用两个柱体积的 A 液冲洗,然后用 B 液 (20mM PB+2M NaCl pH7.0) 进行洗脱,收集洗脱峰组分;Chelating Sepharose Fast Flow 填料装柱,0.1mol CuSO₄ 上柱,Buffer A (50mmol/L Tris (pH0.5)+50mmol/L NaCl+0.1mmol/L CuSO₄) 平衡,直到检测器基线平稳。过 Blue Sepharose FF 层析得到的滤液用 Buffer A 稀释 5 倍后上样。分别用 Buffer A、Buffer B (50mmol/L Tris (pH7.5)+0.5mol/L NaCl) 平衡 5 个柱体积,至基线平稳。Buffer C (50mmol/L Gly (pH3.0)+0.3mol/L NaCl) 洗脱。Buffer D (50mmol/L EDTA (pH8.0) 对柱子进行再生。将 Chelating Sepharose Fast Flow 亲和层析的洗脱峰组分上样到用 C 液 (25mmol/L 醋酸钠缓冲液 pH4.5) 充分平衡好的 CM Sepharose FF 阳离子交换层析柱,用 D 液 (25mmol/L 醋酸钠缓冲液 +0.3mol/L NaCl pH4.5) 冲洗,收集洗脱峰组分。经以上纯化流程后,最后得到的 IFN- λ 1 突变体纯度在 95% 以上 (见图 2)。

[0057] 实施例 3:IFN- λ 1P123S 突变体的 PEG 偶联

[0058] 将纯化的蛋白 IFN- λ 1 突变体与分子量 20kDa 的 mPEG-MAL 按摩尔比 1/10-1/5 的比例混合,在 25mM Tris-HCl 缓冲液中,置 4°C 反应 10h 后,用醋酸溶液调节反应体系 pH 至 5.0 以下以终止反应。SDS-PAGE 检测反应的偶联程度。

[0059] 实施例 4:IFN- λ 1P123S 突变体衍生物的纯化

[0060] 将修饰产物进行 SP Sepharose HP 纯化,平衡液为 25mM 乙酸钠缓冲液 (pH5.5) 洗脱液 25mM 乙酸钠缓冲液,含 1M NaCl,pH5.5,从 0-100% Buffer B (见实施例 2 中的 Buffer B) 进行线性洗脱。本步层析目的是除去多修饰蛋白及未修饰蛋白,最后得到的单 PEG 修饰的 IFN- λ 1 突变体的纯度在 95% 以上 (见图 3)。

[0061] 实施例 5:采用报告基因法测定 IFN- λ 1,突变体 IFN- λ 1 及突变体 IFN- λ 1 聚乙二醇衍生物的体外细胞生物学活性。

[0062] 使 HEK293-ISRE-Luc 细胞在完全培养液中贴壁生长。按 1:4 传代,每周 2~3 次,于完全培养液中生长。取培养的细胞弃去培养液,用 PBS 洗 1 次后消化和收集细胞,用测定培养液配制成每 1ml 含 $3.5 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^5$ 个细胞的细胞悬液。将配制完成的标准品溶液和供试品溶液移入可用于细胞培养和化学发光酶标仪读数的 96 孔板中,每孔加入 100 μ l,然后将上述细胞悬液接种于同一 96 孔板中,每孔 100 μ l。于 37°C、5% 二氧化碳条件下培养 19~23 小时。小心吸净 96 孔板中的上清液,按荧光素酶检测试剂盒说明书加入细胞裂解液和荧光素酶底物,用化学发光酶标仪进行测定,记录其 ED₅₀ 值,记录测定结果。

[0063] 实施例 6:IFN- λ 1、IFN- λ 1 突变体和 IFN- λ 1mPEG-MAL 修饰产物、IFN- λ 1 突变体 mPEG-MAL 修饰产物的 25°C 稳定性试验结果

[0064] 将 IFN- λ 1、IFN- λ 1 突变体和 IFN- λ 1mPEG-MAL 修饰产物、IFN- λ 1 突变体 mPEG-MAL 修饰产物透析至 25mM pH5.0 醋酸缓冲溶液含 2mM ZnCl₂ 和 100mM NaCl 中。用 SDS-PAGE 电泳和分子排阻 HPLC 法分别检测上述蛋白纯度,干扰素 Lambda 突变体的稳定性明显增强,聚乙二醇 IFN- λ 1 突变体的纯度结果均在 97% 以上,活性变化不大。

[0065] 表 1IFN- λ 125°C 稳定性试验结果

[0066]

| 取样时间 (天) | ED50 (ng/ml) | 外观 | 电泳纯度 (%) | 分子排阻高效液相纯度 (%) |
|----------|--------------|--------|----------|----------------|
| 0 | 1.01 | 澄清无色透明 | 98.2 | 98.1 |
| 3 | 1.31 | 澄清无色透明 | 96.2 | 95.4 |
| 7 | 1.83 | 澄清无色透明 | 91.0 | 90.2 |
| 15 | 2.30 | 澄清无色透明 | 87.0 | 85.2 |
| 30 | 3.82 | 澄清无色透明 | 75.7 | 72.5 |

[0067] 表 2IFN- λ 1P123S 突变体 25°C 稳定性试验结果

[0068]

| 取样时间 (天) | ED50 (ng/ml) | 外观 | 电泳纯度 (%) | 分子排阻高效液相纯度 (%) |
|----------|--------------|--------|----------|----------------|
| 0 | 0.58 | 澄清无色透明 | 98.8 | 97.3 |
| 3 | 0.61 | 澄清无色透明 | 97.2 | 96.8 |
| 7 | 0.78 | 澄清无色透明 | 95.4 | 94.7 |
| 15 | 1.22 | 澄清无色透明 | 89.6 | 88.5 |
| 30 | 1.31 | 澄清无色透明 | 85.3 | 84.1 |

[0069] 表 3IFN- λ 1mPEG-MAL 修饰产物的 25°C 稳定性试验结果

[0070]

| 取样时间 (天) | ED50 (ng/ml) | 外观 | 电泳纯度 (%) | 分子排阻高效液相纯度 (%) |
|----------|--------------|--------|----------|----------------|
| 0 | 4.01 | 澄清无色透明 | 98.7 | 98.7 |
| 3 | 4.02 | 澄清无色透明 | 98.6 | 98.5 |
| 7 | 4.05 | 澄清无色透明 | 98.3 | 98.1 |
| 15 | 4.45 | 澄清无色透明 | 97.0 | 96.5 |
| 30 | 4.68 | 澄清无色透明 | 96.8 | 96.1 |
| 60 | 4.72 | 澄清无色透明 | 95.2 | 94.8 |
| 180 | 5.11 | 澄清无色透明 | 92.7 | 91.7 |

[0071] 表 4IFN- λ 1P123S 突变体 mPEG-MAL 修饰产物的 25°C 稳定性试验结果

[0072]

| 取样时间 (天) | ED50 (ng/ml) | 外观 | 电泳纯度 (%) | 分子排阻高效液相纯度 (%) |
|----------|--------------|--------|----------|----------------|
| 0 | 2.01 | 澄清无色透明 | 98.8 | 98.7 |
| 3 | 2.02 | 澄清无色透明 | 98.6 | 98.5 |
| 7 | 2.12 | 澄清无色透明 | 98.4 | 98.3 |
| 15 | 2.22 | 澄清无色透明 | 98.2 | 98.1 |
| 30 | 2.30 | 澄清无色透明 | 97.9 | 97.7 |
| 60 | 2.33 | 澄清无色透明 | 97.7 | 97.4 |
| 180 | 2.42 | 澄清无色透明 | 97.5 | 97.2 |

[0073]

[0074] 从上表结果可知, IFN- λ 1 突变体经 P123S 突变后, 其 ED50 值要小于突变前, 活性更好; 25°C 稳定性试验结果证明突变后稳定性得到明显提高。

[0075] 实施例 6: 大鼠药代动力学研究

[0076] 24 只雌性 SPF 级 SD 大鼠, 体重 270-290g/ 只, 随机分为 4 个组, 分别为干扰素 Lambda 组、干扰素 Lambda 突变体组和干扰素 Lambda mPEG-MAL 修饰产物组、干扰素 Lambda

突变体 mPEG-MAL 修饰产物组, 每组 6 只。给药前动物禁食 12h, 不禁水。按设定的剂量给药与干扰素样品经透析过滤除菌。单次皮下注射给药, 给药剂量为 200 μ g/kg 体重。干扰素 Lambda 组、干扰素 Lambda 突变体组给药后 0、5、15、30、60、120、240、720 和 1440min 尾静脉采血, 干扰素 Lambda mPEG-MAL 修饰产物组、干扰素 Lambda 突变体 mPEG-MAL 修饰产物组给药后 0、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120、144h 尾静脉采血。一次采血 1ml, 采血密集点取 0.5ml。采取的血样经 5000rpm、离心 8min, 分离血浆, 置 -70° 保存。使用 eBioscience 公司的 Human IL-29 (IFN- λ 1) ELISA 试剂盒检测。Kinetica 软件分析结果见表, 突变体的 C_{max} 及 AUC 值均要较未突变前更高, 突变体在同等条件下, C_{max} 及 AUC 值均有一定提高。

[0077] 表 5: 药代动力学参数

[0078]

| PK 参数 | IFN- λ 1 | IFN- λ 1-P123S | | PEG-IFN- λ 1-P123S | |
|--------------------------|------------------|------------------------|---------|----------------------------|----|
| | | 突变 | 突变 | 突变 | 突变 |
| $t_{1/2}$ Ka(h) | 0.33 | 0.37 | 14.33 | 15.67 | |
| $t_{1/2}$ Ke(h) | 1.45 | 1.63 | 16.28 | 18.32 | |
| Tmax (h) | 0.86 | 1.12 | 23.14 | 24.33 | |
| C_{max} (ng/ml) | 55.36 | 58.92 | 70.21 | 80.24 | |
| AUC(∞)(ng.h/ml) | 162.57 | 174.34 | 2088.92 | 2264.21 | |

[0001]

序列表

<110> 北京凯因科技股份有限公司

<120> 一种干扰素突变体及聚乙二醇衍生物

<130> 参考文献在说明书中

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Gly Pro Val Pro Thr Ser Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His
 1 5 10 15
 Ile Gly Arg Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys
 20 25 30
 Lys Ala Arg Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser
 35 40 45
 Cys Ser Ser Pro Val Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln
 50 55 60
 Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu
 65 70 75 80
 Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp
 85 90 95
 Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys
 100 105 110
 Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His
 115 120 125
 His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly
 130 135 140
 Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg
 145 150 155 160
 Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr
 165 170 175
 His Pro Glu Ser Thr
 180

[0002]

| | | | |
|------------|------------|-----------------------------------|-----|
| <210> | 2 | | |
| <211> | 543 | | |
| <212> | DNA | | |
| <213> | 人 | | |
| <400> | 2 | | |
| ggtecggtgc | cgacctcgaa | accgaccacg accggcaaaag gctgccaat | 60 |
| | | atggttcgcttt | |
| aagtgcctgt | cgccgcagga | actggcgagc ttaagaaag cccgtgatgcc | 120 |
| | | caggaggaa | |
| tcgctgaaac | tgaagaactg | gagcctgagc tcgccggtgt tccgggcaa | 180 |
| | | cgggatctg | |
| cgctcctgc | aggctcaga | acgtccggtt gcctgggaag cggaaactggc | 240 |
| | | gctgacctg | |
| aaagtgcctg | aagcggcagc | gggtccggcg ctggaagatg ttctggatca | 300 |
| | | gcccctgcac | |
| acctgcatac | atattctgic | gcagctgag cgtgcattc aaccgcagcc | 360 |
| | | gaccgcgggc | |
| ccgcctcgc | gcccctctc | gcataactgg ctgcaaccgc tgcaggaagc | 420 |
| | | cccgaagaaa | |
| gagtcggcgg | gctgctgga | agcgtcgggt accitcaatc tgttcctct | 480 |
| | | gctgacctg | |
| gactgaaat | acgttcgga | cggcaactg tgcctcgta cctcgacca | 540 |
| | | cccgaatcg | |
| acc | | | 543 |

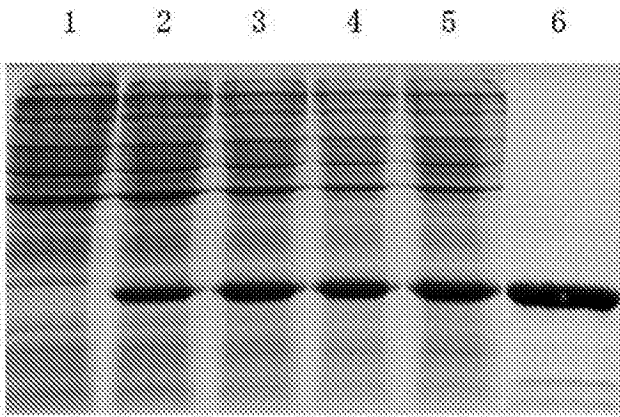


图 1

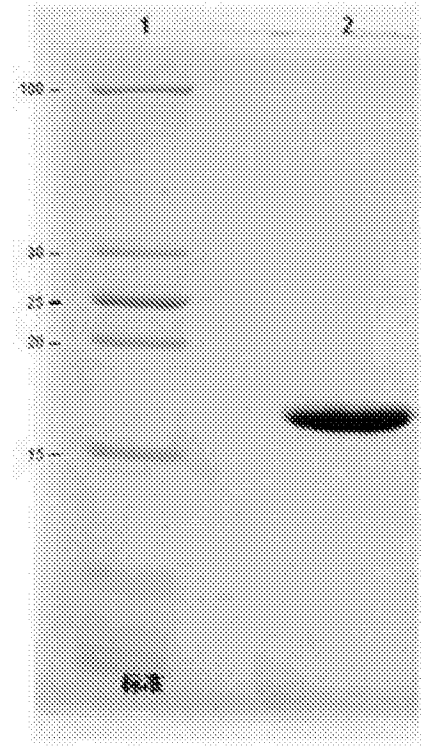


图 2

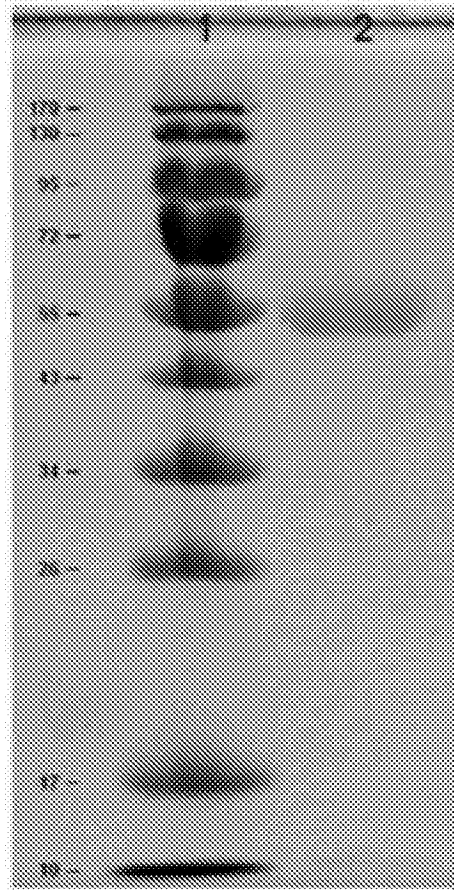


图 3