



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103228792 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201280003367. 8

C07K 11/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 03. 01

(30) 优先权数据

1-2011-02222 2011. 08. 25 VN

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 04. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2012/027317 2012. 03. 01

(87) PCT申请的公布数据

W02013/028233 EN 2013. 02. 28

(71) 申请人 纳诺巨医药生物科技公司

地址 越南胡志明市

(72) 发明人 何南

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 余刚 张英

(51) Int. Cl.

C12P 21/04 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书20页 附图6页

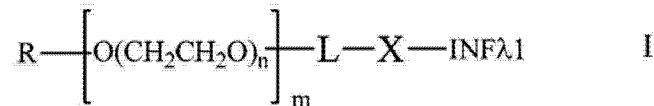
(54) 发明名称

PEG-干扰素 $\lambda 1$ 结合物

(57) 摘要

本申请公开了新型 PEG-干扰素 $\lambda 1$ 结合物 (PEG-IFN $\lambda 1$)、其制备方法、包含这些结合物的药物组合物以及制备其的方法。这些结合物相比于 IFN $\lambda 1$ 具有提高的血液半衰期和存留时间,且有效治疗乙型肝炎和丙型肝炎。

1. 一种生理活性的 PEG-IFN λ 1 结合物, 包含以下式 I 或其药用盐:



其中:

R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基;

m 是 1、2、3 或 4;

n 是选自 400-550 范围内的正整数;

L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物;

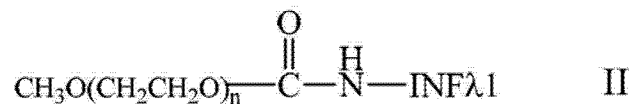
X 是 -O-、-NH- 或 -S-; 以及

IFN λ 1 是干扰素 λ 1。

2. 根据权利要求 1 所述的结合物, 其中 R 是 H 或 -CH₃, m 是 1, L 是 -C(O)- 且 X 是 -NH-。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的结合物, 其中 n 为 500-550。

4. 根据权利要求 1 所述的结合物, 包含下式:



其中 IFN λ 1 是 SEQ ID2 的干扰素 λ 1; 以及

n 为 500-550。

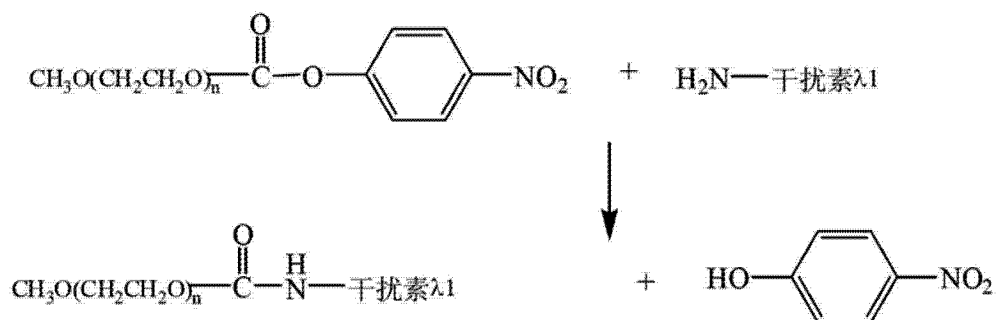
5. 根据权利要求 1-4 中任一项所述的结合物, 其中所述结合物具有相比于 IFN λ 1 延长或拖长的血清半衰期和存留时间。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项所述的结合物, 其中 PEG 在所述 IFN λ 1 的 N 端连接于甲硫氨酸。

7. 一种包含根据权利要求 1-6 中任一项所述的结合物和药用载体以及赋形剂的药物组合物。

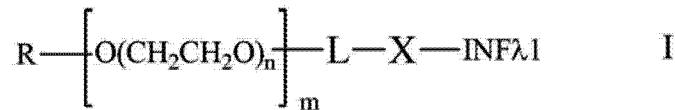
8. 根据权利要求 7 所述的药物组合物, 其中所述药物组合物用于治疗乙型肝炎和丙型肝炎。

9. 一种用于制备根据权利要求 1 所述的人重组结合物的方法, 包括以下步骤: 通过如下的结合反应共价连接 (α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基)) 聚氧乙烯 (PEG-pNC)40kDa 与 IFN λ 1:



其中, n 是选自 500-550 范围内的正整数以使 PEG 部分的分子量为约 40kDa; 以及分离所述结合物。

10. 一种用于制备包含以下式 I 的 Peg-IFN λ 1 结合物或其药用盐的方法:



其中：

R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；

m 是 1、2、3 或 4；

n 是选自 400-550 范围内的正整数；

L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物；

X 是 -O-、-NH- 或 -S-；以及

IFN λ 1 是干扰素 λ 1；

所述方法包括：

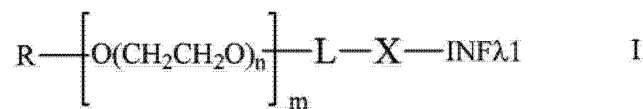
使所述 IFN λ 1 在足以促使与所述 IFN λ 1 的氨基酸残基共价连接的条件与预活化 Peg 接触。

11. 通过权利要求 10 所述的方法制备的 PEG-IFN λ 1 结合物。

12. 一种用于抑制患者中癌细胞增殖的方法，包括使所述癌细胞与根据权利要求 1-4 中任一项所述的结合物接触，其中所述结合物具有相比于 IFN λ 1 延长或拖长的血清半衰期和存留时间。

13. 一种用于治疗哺乳动物中增殖性疾病的方法，包括向所述哺乳动物给予治疗有效量的权利要求 1 所述的结合物。

14. 一种治疗感染病毒感染或处于感染病毒感染风险中的患者的方法，包括向需要其的患者给予治疗有效量的以下式 I 的结合物或其药用盐；或包含所述式 I 的结合物的药物制剂：



其中：

R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；

m 是 1、2、3 或 4；

n 是选自 500-550 范围内的正整数；

L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物；

X 是 -O-、-NH- 或 -S-；以及

IFN λ 1 是干扰素 λ 1。

15. 根据权利要求 14 所述的方法，其中 R 是 -CH₃，m 是 1，L 是 -C(O)-，X 是 -NH- 且 IFN λ 1 是 SEQ ID2。

16. 根据权利要求 14 或 15 所述的方法，其中所述病毒感染是由丙型肝炎病毒引起或所述病毒感染导致晚期肝硬化。

17. 根据权利要求 14、15 或 16 中任一项所述的方法，其中以每周约 0.5 μ g/kg-10.0 μ g/kg 的剂量给予所述 PEG-IFN λ 1。

18. 根据权利要求 14-17 中任一项所述的方法，进一步包括给予选自病毒唑和维拉唑啉的核苷类似物。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中以每日 5mg/kg-25mg/kg 的剂量给予病毒唑。
20. 根据权利要求 14-17 中任一项所述的方法,其中所述患者是 HCV 抗性 or 难治疗的患者。

PEG- 干扰素 $\lambda 1$ 结合物

[0001] 相关申请：

[0002] 本申请要求 2011 年 8 月 25 日提交的越南专利申请序列号 VN1-2011-02222 的权益，其结合于本文中作为参考。

技术领域

[0003] 在一个实施方式中，本申请公开了重组人干扰素 $\lambda 1$ 的 PEG 化衍生物(PEG- 干扰素 $\lambda 1$ 结合物或 PEG-IFN $\lambda 1$)，其制备方法，包含这些结合物的药物组合物以及制备其的方法。

背景技术

[0004] 丙型肝炎病毒(HCV)是主要的健康问题和全世界慢性肝病的主要原因。据估计，全球至少有 180 百万人慢性感染 HCV。在越南，在人口中感染 HCV 的个体比例占 4%-9%，大约 55%-85% 的急性感染 HCV 个体将转化为慢性感染，5%-25% 的这些慢性携带者具有在 25-30 年后发展为肝硬化和患有肝硬化人群的风险，30% 在 10 年内具有肝代偿失调的风险，而每年 1%-3% 将发展为肝癌。根据流行病学研究，HCV 是 40% 晚期肝硬化(final stage cirrhosis)和 60% 肝癌的病因。

[0005] 目前， α -干扰素(AI)是治疗慢性 HCV 感染选择的治疗方法。AI 可以在约 70% 的病例中对 HCV 提供持久响应，然而，这些干扰素会产生很多副作用，甚至在 PEG- 干扰素 α 的情况下也是如此。这些副作用有时可能限制治疗，使患者的治疗不完整。副作用包括流感样体征和诸如地中海贫血及贫血等血液效应。

[0006] 干扰素目前用于治疗许多病毒性疾病，如乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎、尖锐湿疣、瘤型麻风、慢性白血病和 AIDS。AI 也有效减少恶性肿瘤以及治疗卡波西氏肉瘤、黑色素瘤和肾细胞癌。此外，AI 适用于牛等家畜的疾病的预防和治疗。例如，AI 增强手足口病、猪生殖和呼吸系统综合症的预防和治疗中所使用的疫苗的活性。

[0007] AI 已由在组织培养基中培养的人类细胞系或捐赠者的白细胞产生。然而，这些方法是费时的、劳动密集的、昂贵的，且不适合于大规模生产。此外，存在由来自细胞系的传染性病原体引起败血病的风险。

[0008] 随着重组 DNA 技术的发展，现在我们可以将 AI 基因引入能够产生大量干扰素的微生物中。然而，这些方法，主要在表达和大规模蛋白生产的步骤中，也存在一定的优势和困难。

[0009] IL-29 是螺旋细胞因子家族的成员，是 III 型干扰素。它也被称为干扰素 $\lambda 1$ (IFN $\lambda 1$)，高度类似于 IL-28(其它 III 型干扰素)的氨基酸序列。IL-28 和 IL-29(IFN $\lambda 1$) 最近被描述为与 I 型干扰素(IFN)共有的新型细胞因子家族的成员，相同 Jak/Stat 信号通路促使共同基因组的表达。因此，他们命名为 IFN λ 。IFN λ 表现出与 I 型 IFN 的几个共同特征：抗病毒活性、抗增殖活性和体内抗肿瘤活性。然而，更重要的是，IFN λ 结合至 IFNLR1 和 IL10R2 构成的独特膜受体。

[0010] 大多数生物制剂治疗用途的主要缺点在于它们经胃肠外给予,例如静脉注射(i. v.)、皮下(s. c.)、肌肉注射(i. m.)等。这意味着向患者的递送与疼痛和不适是分不开的。此外,因为他们通常半衰期很短,生物制品需要频繁向患者给予,才能保持药物的治疗血清或血浆水平。不能自我给予的注射需要经常去往诊所和找寻训练有素的医务人员,致使这种治疗不便和昂贵。干扰素 α -2a 干扰素(Roferon, Roche)和干扰素 α -2b (Intron A, Schering A G),治疗慢性乙型和丙型肝炎中使用的人干扰素 α 的两种重组形式,具有低于 12h 的血清半衰期(McHutchison, et al., Engl. J. Med. 1998, 339, 1485-1492; Glue, et al., Clin. Pharmacol. Ther. 2000, 68, 556-567)因此需要每周 3 次给予。也需要重复注射干扰素 β -1b (倍泰龙)以治疗多发性硬化症(MS)的患者。

[0011] 一种克服上述频繁高剂量注射以保持体内药物阈值水平的非常成功且广为接受的方法是使其与聚合物,如聚乙二醇(PEG 或 Peg)连接以增加治疗性蛋白质的体内半衰期。具有其长链的 PEG 分子不仅在含水溶液中在 PEG 化药物分子周围产生保护屏障,从而降低蛋白药物的免疫原性,同时也保护其免受蛋白酶的作用,但通过提高其流体动力学体积它们进一步有助于提高药物的循环半衰期,从而降低其由肾脏肾小球网络过滤机制的损失。在其与蛋白分子分离后,PEG 部分清除而没有任何结构上的变化,且其清除正比于其分子量。

[0012] 通常 PEG 部分连接到蛋白质,通过首先激活 PEG 部分随后使活化的 PEG 试剂与蛋白质的氨基酸侧链,如赖氨酸残基和 / 或该蛋白 N 端氨基反应。最频繁使用的 PEG 是单官能的 PEG,因为这部分抗交联和团聚。一个这种实例已经由 Davis 等在美国专利号 4, 179, 337 中公开。

发明内容

[0013] PEG-干扰素 λ 1 (PEG-IFN λ 1) 是人重组 IFN λ 1 的 PEG 化衍生物(其中聚乙二醇连接至 IFN λ 1, 也称之为“结合物”),这用于治疗成年患者中的慢性肝炎 C。PEG-IFN λ 1 在注入患者体内之后避开了胞外酶的作用并防止肾脏中的过滤;因此其半衰期在循环中延长。也就是说,相比于相应非 PEG 连接的 IFN λ 1, 结合物具有显著改善的稳定性、较好的溶解性和提高的循环半衰期和血浆停留时间。

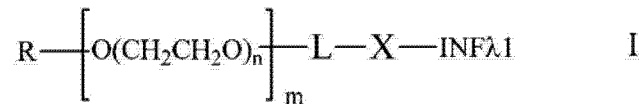
[0014] 干扰素 λ 1 (IFN λ 1, Zcyto21 或 IL-28A) 在本领域内是已知的,例如,根据美国专利号 7, 038, 032、6, 927, 040、7, 135, 170、7, 157, 559 和 7, 351, 689; 以及 PCT 公开号 W005/097165、W007/012, 033、W007/013, 944 和 W007/041, 713; 所有这些以其全文结合于本文中作为参考。

[0015] 在一个实施方式中,本申请公开了一种线性 PEG-IFN λ 1 结合物。在一个方面中,本申请的结合物具有直链的 PEG 链结构。相比于未改变 IFN λ 1(即,没有用 PEG 或 mPEG 连接的 IFN λ 1),这些结合物已提高了血浆中循环半衰期和持久性。水溶性 PEG 包括聚乙二醇(PEG)、单甲氧基-PEG (mPEG),单 $-C_{1-10}$ 烷氧基-PEG 和单 $-C_{1-3}$ 烷氧基-PEG。这些可以使用的 PEG 可以具有约 600-60,000 的分子量并且包括,例如,具有约 10kDa、20kDa、30kDa、40kDa、50kDa 和 60kDa 的那些。在一个方面中,在本发明的结合物中使用的 PEG 是具有分子量 40kDa 的 mPEG。

[0016] 在一个实施方式中,提供了一种包含以下式 I 的生理活性 Peg-IFN λ 1 结合物或其

药用盐：

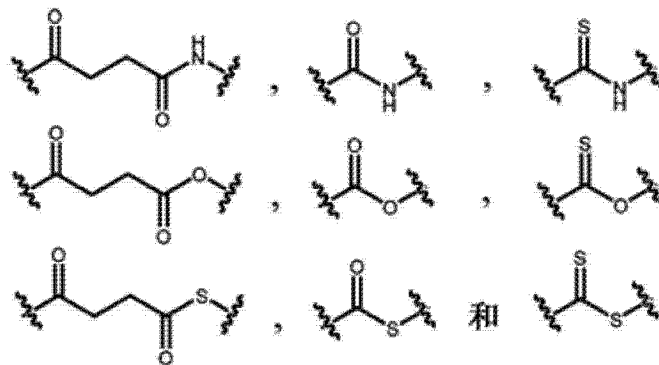
[0017]



[0018] 其中：R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；m 是 1、2、3 或 4；n 是选自 400-550 范围内的正整数；L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物；X 是 -O-、-NH- 或 -S-；且 IFN λ 1 是干扰素 λ 1。在一个方面中，干扰素 λ 1 是人重组干扰素。在另一方面中，IFN λ 1 可以是天然或重组蛋白。在另一方面中，IFN λ 1 是人体蛋白，源于诸如组织、蛋白合成或使用天然细胞或重组细胞的细胞培养物的来源。在又一方面中，IFN λ 1 是人重组蛋白。在另一方面中，式 I 的结合干扰素 λ 1 是 SEQ ID2。在一个实施方式中，PEG 链经由，例如，赖氨酸的伯氨基上的酰胺键或 IFN λ 1 的 N 端连接至 IFN λ 1。

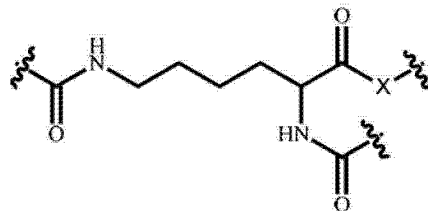
[0019] 杂烷基定义为 C₁₋₁₀ 烷基，其中至少一个 C₁₋₁₀ 烷基碳被 -O-、-C(=O)-、-NH- 或其组合取代。这种组合包括，例如，-OC(=O)-、-C(=O)O-、-NHC(=O)-、-C(=O)NH- 等。在一个方面中，n 为约 500-550。在另一方面中，n 为约 420、520 或 455。在另一方面中，Peg 基团的分子量为约 35kDa-45kDa 或约 40kDa。在以上另一方面中，m 是 1 或 2。C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基可以是直链或支链的烷基或杂烷基。在一个方面中，C₁₋₁₀ 烷基是 -C(O)- 基团。在一个实施方式中，m 是 1 且 L-X- 选自由以下各式组成的组：

[0020]



[0021] 在以上结合物的一个方面中，m 是 2 且 L-X- 为下式：

[0022]

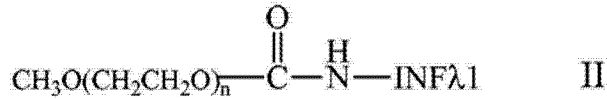


[0023] 在以上结合物的另一方面中，两个 PEG 基团，PEG、烷基-PEG 或 m-PEG 都连接于以上式的两个甲酰胺基团（即，-C(O)NH-）。在另一方面中，X 是 -NH- 或 -O- 且 m 是 2。在另一方面中，连接物连接于两个 PEG 基团。在另一方面中，X 是 -NH-，而连接至连接物的基团是 IFN λ 1 上赖氨酸的残基。在一个方面中，连接至连接物的 -NH- 基团（即，氨基）是组氨酸的残基。在另一方面中，X 是 -O-，而连接至连接物的基团可以源于 IFN λ 1 上丝氨酸的残基。在上式的一个改变体中，R 是 -CH₃。在另一方面中，连接物连接于 IFN λ 1 上赖氨酸、丝

氨酸、组氨酸或其混合物的残基。在另一方面中,连接物连接于 IFN λ 1 上赖氨酸、丝氨酸、组氨酸或其混合物的残基的位置异构体。在结合物的另一方面中,R 是 H 或 $-\text{CH}_3$, m 是 1, L 是 $-\text{C}(\text{O})-$ 且 X 是 $-\text{NH}-$ 。在另一方面中, n 为 500-550。

[0024] 在另一方面中,结合物(Nanogen PEG-IFN λ 1) 包含以下式 II:

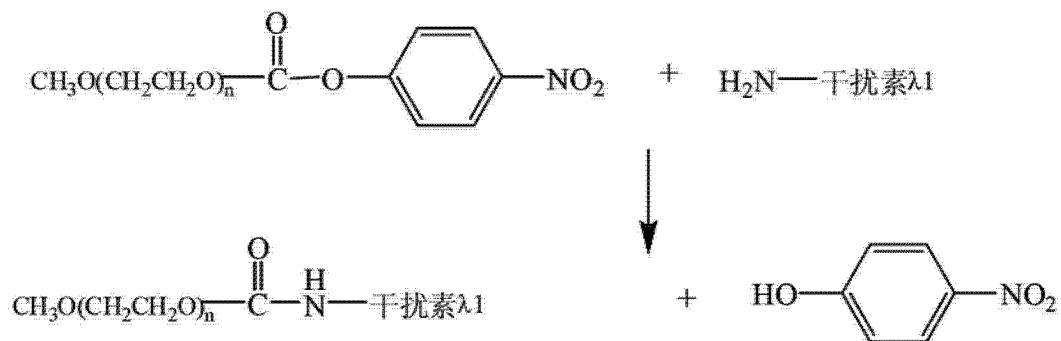
[0025]



[0026] 其中 INF λ 1 是干扰素 λ 1; 且 n 为 500-550。在一个方面中, n 是 PEG 结构中乙二醇单元的数量且其是选自任何使 PEG 部分的分子量为约 40kDa 的数量的正整数, 且 INF λ 1 是干扰素 λ 1。在以上另一个实施方式中, 结合物相比于 IFN λ 1 具有延长或拖长的血清半衰期和存留时间。在结合物的另一方面中, PEG 连接于 IFN λ 1 的 N 端的甲硫氨酸。在又一方面中, 结合物有效治疗肝炎 B 和肝炎 C。

[0027] 在另一实施方式中, 提供了一种用于制备如以上公开的人重组结合物的方法, 该方法包括以下步骤: 通过如下的结合反应共价连接 (α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基)) 聚氧乙烯 (PEG-pNC) 40kDa 与 IFN λ 1:

[0028]



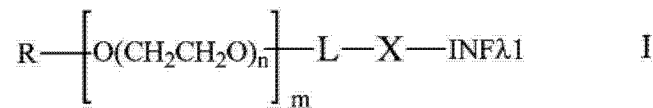
[0029] 其中, n 是选定以使 PEG 部分的分子量为约 40kDa 的正整数; 以及分离结合物。在一个方面中, n 为约 500-550。

[0030] 在另一实施方式中, 提供了一种包含如以上公开的结合物和药用载体以及赋形剂的药物组合物。常规药物制剂也可以使用包含本申请的结合物的组合物制备。这些制剂可以包含治疗有效量的包含连同本领域已知的药用载体的结合物的组合物。例如, 可以使用佐剂、稀释剂、防腐剂 and / 或如果需要, 增溶剂。包含结合物的药物组合物可以包含各种具有一定 pH 和离子强度范围的缓冲剂 (例如, Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐) 的稀释剂, 载体 (例如, 人血清白蛋白), 增溶剂 (例如, 聚氧乙烯山梨聚糖或 TWEEN®, 聚山梨醇酯) 和防腐剂 (例如, 硫柳汞钠, 苯甲醇), 例如, 如美国专利号 4, 496, 537 中公开的那些。在一个方面中, 药物组合物配制为注射用无菌冻干粉。在另一方面中, 组合物包含药用载体的组合, 包括盐水、缓冲盐水和在水中 5% 的葡萄糖。在另一方面中, 药物组合物配制成小瓶或预装填注射器中的注射用溶液。在以上的一个方面中, 药物组合物用于治疗肝炎 B 和肝炎 C。药用制剂和制备这种制剂的方法在本领域是公知的, 并且例如, 公开于 Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 19th ed. 1995 中。

[0031] 在另一实施方式中, 提供了一种制备包含以下式 I 的 Peg-IFN λ 1 结合物或其药用

盐的方法：

[0032]



[0033] 其中：R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；m 是 1、2、3 或 4；n 是选自 400-550 范围内的正整数；L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物；X 是 -O-、-NH- 或 -S-；以及 IFNλ 1 是干扰素 λ 1；该方法包括：使 IFNλ 1 与预活化 Peg 在足以促使与 IFNλ 1 的氨基酸残基共价连接的条件接触。在一个实施方式中，提供了通过本文描述的方法制备的 PEG-IFNλ 1 结合物。在一个方面中，公开了一种制备上述结合物的方法，包括使 IFNλ 1 与足量的活化 PEG 或 mPEG 在足以促使 PEG 或 mPEG 共价连接在 IFNλ 1 上的条件下接触。在另一方面中，活化的 mPEG 是 mPEG-pNC。在另一方面中，活化的 mPEG 连接在 IFNλ 1 的 N 端的甲硫氨酸上。在另一方面中，mPEG 具有约 40kDa 的分子量。在另一方面中，活化的氧羰基试剂是单活化剂或双活化剂。

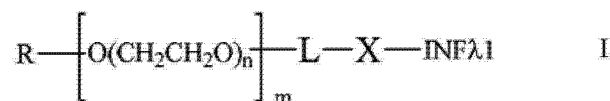
[0034] 在另一个实施方式中，提供了一种用于抑制患者中癌细胞增殖的方法，包括使癌细胞与上述结合物接触，其中该结合物具有相比于 IFNλ 1 延长或拖长的血清半衰期和存留时间。在一个方面中，本申请的结合物具有的血清半衰期比相应未结合的 IFNλ 1 的血清半衰期延长超过 2 倍、3 倍、5 倍、8 倍或超过 10 倍。

[0035] 在另一个实施方式中，提供了一种用于治疗哺乳动物中增殖性疾病的方法，包括向该哺乳动物给予治疗有效量的上述结合物。在一个实施方式中，该结合物可以用于治疗干扰素易感性病症或将阳性或有利地响应于基于干扰素疗法的病症。在一个方面中，采用这种结合物的疗法相比于采用干扰素的常规疗法基本使副作用降低或消除。

[0036] 在一个方面中，可以用本申请的结合物治疗的示例性病症包括，但不限于，细胞增殖紊乱症，尤其是癌症（例如，毛细胞白血病、卡波氏肉瘤、慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、基细胞癌和恶性黑素瘤、卵巢癌和皮肤 T 细胞淋巴瘤）和病毒感染。在另一方面中，结合物可以用于治疗将得益于抑制干扰素敏感病毒复制的病症。可以用本申请的结合物治疗的病毒感染包括甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、其他非甲 / 非乙型肝炎、疱疹病毒、Epstein-Barr 病毒 (EBV)、巨细胞病毒 (CMV)、单纯疱疹病毒、人疱疹病毒 6 型 (HHV-6)、乳头状瘤、痘病毒、细小核糖核酸病毒、腺病毒、鼻病毒、人 T 淋巴细胞病毒 1 型和 2 型 (HTLV-1/-2)、人轮状病毒、狂犬病、逆转录病毒，包括人免疫缺陷病毒 (HIV)、脑炎、呼吸道病毒感染。

[0037] 在另一实施方式中，提供了一种治疗病毒感染或具有病毒感染风险的患者的方法，包括向需要其的患者给予治疗有效量的以下式 I 的结合物或其药用盐；或包含以下式 I 的结合物的药物制剂：

[0038]



[0039] 其中：R 是 H 或 C₁₋₃ 烷基；m 是 1、2、3 或 4；n 是选自 500-550 范围内的正整数；L 是 C₁₋₁₀ 烷基或杂烷基连接物；X 是 -O-、-NH- 或 -S-；且 IFNλ 1 是干扰素 λ 1。在一个方面中，式 I 的结合干扰素 λ 1 是 SEQ ID2。在一个方面中，哺乳动物是人。在该方法的另一方面

中,病毒感染是由丙型肝炎病毒引起或该病毒感染导致晚期肝硬化。在一个具体方面中,患者是 HCV 抗性或难治疗性患者。在以上方法的另一方面中,PEG-IFN λ 1 以每周约 0.5 μ g/kg-10.0 μ g/kg 的剂量给予。在该方法的一个方面中,PEG-IFN λ 1 以每周约 2.5 μ g/kg 的剂量给予。在另一方面中,PEG-IFN λ 1 给予约 8 至约 52 周。在另一方面中,PEG-IFN λ 1 给予约 12 周、约 16 周、约 20 周或约 24 周。在另一方面中,给予 PEG-IFN λ 1 直至检测到患者血清中不含 HCV RNA。在另一方面中,给予结合物对标准 PEG-INF- α 疗法提供了显著改进,因为该方法并没有导致中性粒细胞计数、血小板计数或血红蛋白水平显著降低。在上述方法的又一方面中,该方法进一步包括给予选自病毒唑和维拉嘧啶中的核苷类似物。在该方法的另一方面中,病毒唑以每日 5mg/kg-25mg/kg 或每日 15mg/kg-25mg/kg 的剂量口服给予。在一个方面中,病毒唑以每日 1 次或 2 次约 10mg/kg-30mg/kg 或每日 1 次或 2 次约 15mg/kg 的剂量给予。在以上的一个方面中,结合物经胃肠外给予。

[0040] 在一个实施方式中,HBV 可以使用每周约 200 μ g 的 PEG-IFN λ 1 结合物的剂量,联合每天约 300mg 的替诺福韦(富马酸替诺福韦二吡呋酯)进行治疗。根据这种治疗方法,在约 30 天内约 4 次注射之后检测大多数患者清除了 HBV。在这些病症下,发现 HBV 被抑制,并释放出 HBsAg(病毒表面抗原),这触发免疫系统产生抗体对抗这种抗原,致使具体治疗中产生最佳结果。这种治疗可以如本文公开的持续进行约 12-24 周,这取决于患者的初始病毒携带量。

[0041] 定义:

[0042] “烷基”是指具有碳原子链,可选地用氧(例如, C₁ 烷基可以是 -C(O)-)、氮原子(例如, C₁ 烷基可以是 -C(NH)-)或硫原子(例如, C₂ 烷基可以是 -CH₂C(S)-)取代的直链或支链的,饱和或不饱和的脂族自由基。通常使用 C_x 烷基和 C_{x-y} 烷基如 C₁₋₁₀ 烷基或 C₁₋₆ 烷基,其中 X 和 Y 是指链中的碳原子的数目。例如, C₁₋₆ 烷基包括具有 1-6 个碳原子的烷基(例如,甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、乙烯基、异丙烯基、1-丁烯基、乙炔基、1-丙炔基等)。

[0043] “杂烷基”或“杂亚烷基”是碳原子之间可以具有氧、氮或硫的烷基。这种杂烷基基团的实例包括 -C(O)NH-、-OC(O)-、-CH₂CH₂C(O)-NH-、-CH₂-O-CH₂-CH₂-、-CH₂-NH-CH₂-CH₂-、-CH₂-S-CH₂-CH₂-、和 -CH₂O-CH₂-CH₃ 等。

[0044] 正如在“PEG-IFN λ 1”中的术语“PEG”是指本领域所使用的聚乙二醇,除非另外明确指出,一般包括烷基-PEG 如 mPEG(甲氧基-聚乙二醇)和 PEG 两者。

[0045] “治疗有效剂量”是在所治疗的病症中足以产生临床显著变化,如病毒携带量或免疫功能的临床显著变化,发病率显著降低或组织学评分显著提高或其组合的 PEG-IFN λ 1 结合物的量。

[0046] 正如本文中所使用的“治疗方法”或“治疗”是指疗法治疗和防御或预防性措施。需要治疗的患者包括已经感染丙型肝炎病毒的患者以及需预防丙型肝炎疾病的那些患者。

[0047] 在上述方法的一个方面中,结合物通过注射或灌注给予。在另一方面中,结合物经由静脉、肌肉、皮下、皮内或腹腔给予。在另一方面中,以选自以下各项的剂量向患者给予结合物:小于 0.5 μ g/kg、0.5-1.0 μ g/kg、1.0-1.5 μ g/kg、1.5-2.0 μ g/kg、2.0-2.5 μ g/kg、2.5-3.0 μ g/kg、3.0-3.5 μ g/kg、3.5-4.0 μ g/kg、4.0-4.5 μ g/kg、4.5-5.0 μ g/kg、5.0-5.5 μ g/kg、5.5-6.0 μ g/kg、6.0-6.5 μ g/kg、6.5-7.0 μ g/kg、7.0-7.5 μ g/kg、7.5-8.0 μ g/kg、8.0-8.5 μ g/kg、8.5-9.0 μ g/kg、9.0-9.5 μ g/kg、9.5-10.0 μ g/kg 或大

于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在另一方面中,以选自以下各项的固定剂量给予结合物:约 60-80 μg 、80-100 μg 、100-120 μg 、120-140 μg 、140-160 μg 、160-180 μg 、180-200 μg 、200-220 μg 、220-240 μg 、240-260 μg 、260-280 μg 或约 280-300 μg 。在一个实施方式中,结合物以 200 μg 连续 12 周皮下给予。

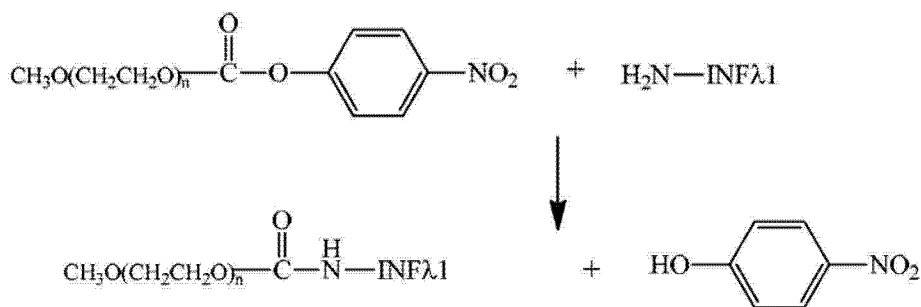
[0048] 在另一个实施方式中,提供了一种包含上述结合物和药用载体以及赋形剂的药物组合物。在另一方面中,药物组合物用于治疗乙型肝炎和丙型肝炎。在另一个实施方式中,提供了一种将该结合物与药用载体和赋形剂混合制备包含上述结合物的药物组合物的方法。

[0049] 本申请的结合物具有与 IFN λ 1 类似的效应或活性。例如,该结合物可以用作抗增殖剂、抗病毒剂或抗肿瘤剂。具体而言,本申请的结合物能够有效治疗乙型肝炎和丙型肝炎,并且它们比 IFN λ 1 具有更长的血液存留时间。在一个实施方式中,包含本申请的结合物的药物组合物作为注射无菌冻干粉或小瓶或预装填注射器中的注射用溶液进行制备。这些药物组合物可以通过将结合物与相关药用载体和赋形剂混合而配制。

[0050] 在另一个实施方式中,本申请提供了制备人重组 PEG-IFN λ 1 结合物的方法。首先,通过重组 DNA 技术在大肠杆菌中产生人重组 IFN λ 1,随后与 Peg 化试剂(如 α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基))聚氧乙烯(PEG-pNC)反应以生成 PEG-IFN λ 1。在一个方面中,PEG-IFN λ 1 是连接至 IFN λ 1 的直链 PEG40kDa。这种产物当注射到患者体内时避免胞外酶作用和肾脏过滤,因此延长了其血清半衰期。

[0051] (α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基))聚氧乙烯(PEG-pNC)40kDa 和 IFN λ 1 之间的 Peg 化反应生成该结合物,如下所示。在一个方面中,-NH₂ 基团是干扰素 λ 1 分子部位上 N 端处的甲硫氨酸残基。在另一方面中,-NH₂ 基团是干扰素 λ 1 分子部位上赖氨酸残基的胺。

[0052]



[0053] 在一个实施方式中,本申请的结合物可以通过干扰素 λ 1 与预活化的 PEG 共价连接而制备。在一个实施方式中,PEG 可以通过用连接基团取代 PEG 羟基基团进行活化以形成偶联剂或活化的 PEG 试剂,即 (α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基))聚氧乙烯(PEG-pNC)。在一个实施方式中,该 PEG-IFN λ 1 结合物可以通过制备 IFN λ 1 和 Peg 化 IFN λ 1 而制备。还公开了用于纯化和分析该结合物的方法。

附图说明

[0054] 图 1 举例说明了在核酸序列 (SEQ ID1) 合成和引入到表达载体 pNanogen1-IL29 之后用于产生人重组 IFN λ 1 的该序列。

[0055] 图 2 是由 Nanogen Pharmaceutical Biotechnology Co.,Ltd 产生的人重组 IFN λ 1 的典型氨基酸序列(SEQ ID2)。

[0056] 图 3 举例说明了包含编码人 IFN λ 1(白介素 -29)的基因的质粒 pNanogen1-IL29。

[0057] 图 4 描述了质粒 pNanogen1-IL29a 的分析结果。

[0058] 图 5 举例说明了检测含 pNanogen1-IL29 大肠杆菌用于产生 IFN λ 1 能力的电泳方法的结果。

[0059] 图 6 是蛋白再折叠之后盐相的典型谱图和 SDS-PAGE 电泳。图 6、7、8 和 9 的谱图都是考马斯亮蓝染色的。

[0060] 图 7 举例说明了阳离子 1 相之后的谱图和 SDS-PAGE 电泳。

[0061] 图 8 举例说明了阳离子 2 相之后的谱图和 SDS-PAGE 电泳。

[0062] 图 9 举例说明了凝胶过滤相之后的谱图和 SDS-PAGE 电泳。

[0063] 图 10 举例说明了纯化方法的谱图和 PEG-干扰素 λ 1 的 SDS-PAGE 电泳。

[0064] 图 11 举例说明了 FN λ 1 和 PEG-IFN λ 1 的识别结果。

[0065] 图 12 举例说明了由 Nanogen Pharmaceutical Co.,Ltd. 生产的 PEG-IFN λ 1 的 Maldi-Tof 质谱。

具体实施方式

[0066] 在一个实施方式中,本申请公开了用于制备包含编码 IFN λ 1 的基因的重组细菌菌株,大规模或工业化生产 IFN λ 1、Peg 化反应的 IFN λ 1、纯化产生的 PEG-IFN λ 1 和分析 PEG-IFN λ 1 的方法。

[0067] 在一个实施方式中,本申请公开了一种基于可获自生物技术信息国家中心(编码基因经过修饰而满足有关大肠杆菌的工业生产过程)的公开序列的编码 IFN λ 1 的基因的人工合成,产生转基因载体,将这些载体引入到细菌中以及选择最佳地产生 IFN λ 1 的菌株。

[0068] 在一个实施方式中,IFN λ 1 工业生产过程包括以下步骤:使初始原料发酵,收集粗蛋白的溶液以及纯化 IFN λ 1 蛋白。在典型的过程中,发酵过程可以在含有营养培养基的 10L 发酵罐中进行而 IFN λ 1 的生产通过乳糖引发。所获得的生物质进行分离和纯化。收集 IFN λ 1 并通过多个步骤精制,包括:再折叠该蛋白,例如通过离子交换层析(阳离子 1 和阳离子 2)分离该蛋白,以及在凝胶上精制蛋白。

[0069] 在一个实施方式中,Peg 化方法包括:具有分子量 40kDa 的直链(α -甲氧基- ω -(4-硝基苯氧基羰基))聚氧乙烯(PEG-pNC)和 IFN λ 1 之间的反应。所得到的结合物可以通过层析,如使用 HPLC 系统进行纯化,并对质量和纯度进行测试。

[0070] 参照以下实施例将更充分地理解本申请,认为这些实施例仅是说明性的,而不是限制如要求的本发明的范围。

[0071] 实施例:

[0072] 实施例 1:制备包含编码人重组干扰素 λ 1 (IFN λ 1)的基因的大肠杆菌菌株的方法

[0073] 编码 IFN λ 1 的基因基于可获自 NCBI 或其他数据库的蛋白序列数据进行人工合成。本文中提供的新方法减少了分离基因所需的时间,但仍然提供与常规方法同样准确的结果。用于产生 Nanogen Pharmaceutical Biotechnology Co.,Ltd. 中的 IFN λ 1 的核酸

序列如图 1 所示,该蛋白的氨基酸序列如图 2 所示。

[0074] 专门设计表达载体 pNanogen IL29 (包含 T7 转录启动子区、IFN λ 1 转基因、T7 反向启动部位、T7 转录终止子、f1 启动子(origin)、卡那霉素抗性基因和复制的 pUC 启动子) 以使其能够高表达该蛋白,促使大量 IFN λ 1 工业生产的发酵。图 3、图 4 显示了用于产生载体 pNanogen1-IL29 的过程。

[0075] 然后,将表达载体 pNanogen-IL29 转移到适合启动子 T7 表达的大肠杆菌菌株中。该菌株具有基因型 F⁻ompT hsdS_b(rB⁻mB⁻)gal dcm(DE3)。含有 IFN λ 1 基因的菌株称为大肠杆菌 pNanogen1-IL29。其具有通过发酵(参见图 5)并引入原始菌株库中产生高于 100mg 的 IFN λ 1/L 的能力。

[0076] 实施例 2:大肠杆菌发酵生产人重组 IFN λ 1 的方法

[0077] 在 140L 的发酵罐中采用营养培养基进行发酵过程,温度为 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C,空气压力为 0.5m³/h, pH 为 7.0 \pm 0.2,搅拌速率为 300rpm,并通过加入 H₃PO₄ 或 NH₄OH 将 pH 保持在 6.8-7.2 之间。8 小时后(大肠杆菌处于对数期生长是细胞增长最有效的时间),将温度冷却至 30 \pm 0.5 $^{\circ}$ C,搅拌速度降低到 200rpm 以启动 IFN λ 1 产生的过程。发酵过程在 4 小时后停止,将冷却产物在 6000rpm 下离心以获得生物质。

[0078] 通过在均质化装置中均质化以在细胞溶解液(12mL 溶液每 1g 湿生物质)中破坏生物质。将温度保持在 4 $^{\circ}$ C 下 1 小时,然后通过超声设备将细胞破坏 2 次。得到的悬浮液在 6000rpm 下离心 30min 以获得颗粒,然后用包涵体(包含体)洗涤缓冲液(12mL 缓冲液每 1g 湿生物质)洗涤该颗粒,所得的悬浮液在 4 $^{\circ}$ C 下保持 1h,然后以 13,000rpm 离心 30min 两次以获得颗粒。将颗粒溶解于 2M 的尿素溶液中并冰冷孵育 1h,然后将悬浮液以 13,000rpm 离心 30min 得到颗粒。将该颗粒溶解于洗涤液,以 13,000rpm 离心 30min 以获得颗粒,然后将该颗粒溶解于 6M 的胍溶液中,使该悬浮液保持冰冷 12-16h,并以 13,000rpm 离心 30min。回收含有蛋白质的溶液,并在下一步骤中纯化。

[0079] 用于分离 IFN λ 1 的培养基介质和溶液的组分如表 1 所示。

[0080] 表 1

[0081]	大肠杆菌-pNanogen1-IL29 细菌的培养基	- 70 µg/ml 的卡拉霉素 - 2 mM 的 MgSO ₄ - 0.1%的天冬氨酸盐/酯 - 25 mM 的 Na ₂ HPO ₄ - 25 mM 的 KH ₂ PO ₄ - 50 mM 的 NH ₄ Cl - 5 mM 的 Na ₂ SO ₄ - 0.5%的甘油 - 0.05%的葡萄糖 - 0.2%的 α-乳糖 - 200 µg/ml 的各氨基酸(18)
	细胞溶解液	- NaCl 50 mM - EDTA 1 mM - Tris 碱 20 mM
	包涵体洗涤液	- EDTA 1 mM - Tris 碱, pH 8, 20 mM - Triton X100 1%
	洗涤液	- EDTA 1 mM - Tris 碱 20 mM
	6M 的胍溶液	- EDTA 2 mM - Tris 碱 50 mM - 胍 6M - 半胱氨酸 HCl 75 mM

[0082] 实施例 3 :人重组 IFN λ 1 的纯化过程

[0083] 通过将包涵体溶解于再折叠溶液(25mM 的 Tris 缓冲液,1mM 的 EDTA,1.2M 的胍, pH8.2)中再折叠 IFN λ 1 以使得包涵体的最终浓度为 500 µg/mL。然后将该混合物保持在 2-8°C 下 16-24h。将所得的混合物脱盐之后使其在 Sephadex G25 柱上经受纯化步骤。盐交换缓冲液是磷酸盐缓冲液(10mM, pH8.0),在步骤“阳离子 1”中,将脱盐混合物上样到 SephadexG25 柱(该柱预先填装 CM-Sepharose FF 凝胶并在 pH8.0 的 10mM 磷酸盐缓冲液中平衡)中,使用 10mM 的磷酸钠 +0.5M 的 NaCl (pH8.0)洗脱产物。将所得的蛋白溶液脱盐并如上进行层析(步骤“阳离子 2”)。然后使蛋白溶液通过凝胶柱过滤以得到产物人重组 IFN λ 1,纯度大于 95% (参见图 5、图 6、图 7、图 8 和图 9 中的谱图和电泳结果)。

[0084] 实施例 4 :用于制备结合物的 Peg 化方法

[0085] 将在 50mM 的硼酸钠 - 磷酸钠(pH8.0)中的 5mg/mL 人重组 IFN λ 1(MW 约 20.1kDa)的溶液以摩尔比 PEG-pNC:IFN λ 1 为约 3:1 加入(α-甲氧基-ω-(4-硝基苯氧基羰基))聚氧乙烯(PEG-pNC) (MW 约 40kDa)中。将反应混合物保持在 2-4°C 下 20h。反应通过使用 30%w/w 的乙酸溶液调节 pH 至 4.0 终止。所得混合物随后用水稀释 5 倍。

[0086] 在一般的示例性过程中,活化的 PEG 或 m-PEG 试剂至 IFN λ 1 的结合反应的反应条件进一步包括采用相对于 IFN λ 1 约等摩尔至相对较少摩尔过量的活化 PEG 或 m-PEG 进行该反应。在一个变型中,结合可以以约 1-10 倍摩尔过量;或约 1.5-7 倍摩尔过量;或约 1.75-5 倍摩尔过量进行。在一个变型方案中,结合反应可以在约室温或约 20-25°C 下进行。结合反应可以使得进行约 1-10h、1-5h、1-3h 或约 1-2h 之后才通过猝灭(冷激)终止反应。

在某些情况下,反应条件提供了 PEG-IFN λ 1 位置异构体的混合物。在一个方面中,每种异构体包含经由如本文公开的氨基酸残基连接至 IFN λ 1 的单个 PEG- 连接物单元。在某些多个连接至 IFN λ 1 的 PEG- 连接物单元的情况下,如果需要,可以使用所得的包含这些结合物的组合物或可以采用标准纯化方法,包括超滤、离子交换层析(色谱)、亲和层析和尺寸排阻层析,通过层析(色谱)分离。在一个方面中,用于分离和纯化结合物的纯化方法是如本文中描述的阳离子交换层析。

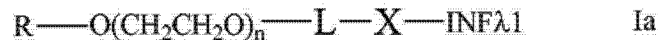
[0087] 在某些条件下,IFN λ 1 上的连接部位受到反应介质 pH 的影响。结合过程的具体 pH 的改变将产生某些优选的连接部位。例如,在某些条件下,碱性 pH 值如 pH7.5 以上,8.0 以上,8.5 以上,或 9.0 以上的连接促使 IFN λ 1 连接至赖氨酸基团。

[0088] 在上述方法中,Peg 化试剂,如 PEG-pNC,在 PEG 和 IFN λ 1 之间形成氨基甲酸酯连接物。上述方法中可以采用的其它 Peg 化试剂包括氧羰基-氧基-N-二羧酰亚胺(如碳酸琥珀酰亚胺酯,琥珀酸琥珀酰亚胺酯)、碳酸对硝基芳基酯、碳酸对硝基苯基酯、羰基二咪唑、碳酸苯并三唑酯、碳酸吡啶酯、N-琥珀酰亚胺、N-邻苯二甲酰亚胺、N-戊二酰亚胺和如美国专利号 5,122,614 中所公开的 N-四氢邻苯二甲酰亚胺。也可以用于形成结合物的典型活化的 PEG 或 mPEG 化合物包括 PEG-2,4,6-三氯-S-三嗪、mPEG-2,4,6-三氯-S-三嗪、PEG-N-琥珀酰亚胺基戊二酸酯、mPEG-N-琥珀酰亚胺基戊二酸酯,PEG-N-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯和 mPEG-N-琥珀酰亚胺基琥珀酸酯。

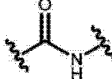
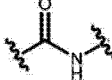
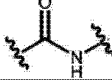
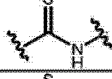
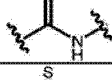
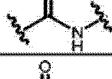
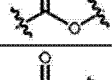
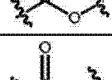
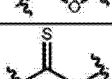

[0089] 这些实施例典型的化合物:

[0090] 下表提供了本文描述的实施例选定的化合物的总结:

[0091]

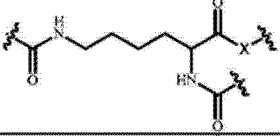
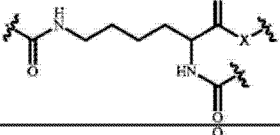
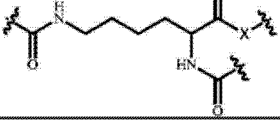
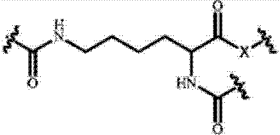
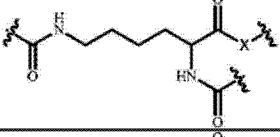
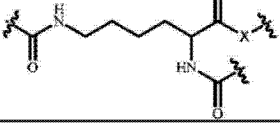


[0092]

结合物	变量			
	R	n (kDa)	-L-	-X-
1	CH ₃ -	900-945 (40)	-C(=O)-	-NH-
2	CH ₃ -	900-945 (40)	-C(=O)-	-O-
3	CH ₃ -	900-945 (40)	-C(=O)-	-S-
4	CH ₃ -	790-830 (35)	-C(=O)-	-NH-
5	CH ₃ -	790-830 (35)	-C(=O)-	-O-
6	CH ₃ -	790-830 (35)	-C(=O)-	-S-
7	CH ₃ -	1,010-1,060 (45)	-C(=O)-	-NH-
8	CH ₃ -	1,010-1,060 (45)	-C(=O)-	-O-
9	CH ₃ -	1,010-1,060 (45)	-C(=O)-	-S-
10	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
11	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
12	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
13	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
14	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
15	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
16	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
17	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
18	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
19	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-

结合物	变量			
	R	n (kDa)	-L-	-X-
20	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
21	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
22	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
23	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
24	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
25	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
26	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
27	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
28	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
29	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
30	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
31	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
32	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
33	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
34	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
35	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
36	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-

[0093]

结合物	变量			
	R	n (kDa)	-L-	-X-
37	CH ₃ -	900-945 (40)		-NH-
38	CH ₃ -	900-945 (40)		-O-
39	CH ₃ -	900-945 (40)		-S-
40	H-	900-945 (40)	-C(=O)-	-NH-
41	H-	900-945 (40)	-C(=O)-	-O-
42	H-	900-945 (40)	-C(=O)-	-S-
43	H-	900-945 (40)		-NH-
44	H-	900-945 (40)		-O-
45	H-	900-945 (40)		-S-

[0094]

[0095] 上表中式 Ia 的结合物的纯化方法采用本文描述的方法进行。所得的 PEG-IFN λ 1 具有的纯度高于约 95%。在凝胶过滤阶段之后该结合物的谱图和 SDS-PAGE 电泳如图 9 所示。该结合物的纯化过程的谱图和 SDS-PAGE 电泳如图 10 所示。该结合物对 Hep-2C 细胞具有抗病毒 EMC 活性, ED₅₀ 范围为约 10-50ng/mL。上表中式 I 的结合物的抗病毒活性在 ED₅₀ (ng/mL) 下为约 25.00-28.00; 平均值 (ng/mL) 为约 1.0-约 30.0; SD 为约 0.1-约 1.0 且 RSD 为约 3.0-7.0。

[0096] 上表中式 I 的结合物以 200 μ g (每周皮下注射)+ 病毒唑 15mg/kg (每日) 向患者给予。在第一个 4 周中, 所有患者都检测无 HCV RNA (血清中不含病毒)。治疗方案持续进行 12 周。所有患者在经过 12 周治疗和 12 周跟进之后达到了总病毒抑制的初始端点。

[0097] 实施例 5: PEG-IFN λ 1 的纯化

[0098] 这种含有 PEG-IFN λ 1、猝灭(冷激)试剂和未改变的 IFN λ 1 的溶液在阳离子柱(柱预填充有 Sepharose CM 凝胶并在 10mM 的磷酸钠 (pH6.0) 中平衡)上纯化, 用 10mM 的磷酸钠、0.5M 的 NaCl (pH6.0) 的溶液洗脱。使用 10mM 的磷酸钠 (pH6.0) 的溶液, 将洗脱的含蛋白部分转移到防腐剂缓冲液中。然后使这种产物经受无菌过滤过程并存储于 -20°C 之下。

[0099] 图 10 显示了 IFN λ 1 纯化过程的谱图和 SDS-PAGE 电泳。所得的 PEG-IFN λ 1 的纯度高于 95% 且对 Hep-2C 细胞的抗病毒 EMC 活性的 ED₅₀ 为约 10-50ng/mL (参见实施例 6)。

[0100] 实施例 6 :IFN λ 1 和 PEG-IFN λ 1 抗病毒活性的检测

[0101] 根据 Ank 等(J Virol. 2006May;80(9):4501-9) 的研究,检测基于在 EMC 病毒模型和 Hep-2C 细胞中的抗病毒活性。实验采用 3 组(IL290010111、IL290020311 和 IL290030411) 进行。结果表明,Nanogen 的干扰素 λ 1 的抗病毒活性(ED₅₀ 约 1-5ng/mL)等于 Sheppard 等(Nat Immunol. 2003Jan;4(1):63-8.) 的研究结果(参见表 2)。

[0102] 将 PEG-IFN λ 1 的抗病毒活性与 IFN λ 1 相比较。实验采用 5 组(PIL290010111、PIL290020211、PIL290030311、PIL290040411、PIL290050511) 进行。在所有组中都获得类似结果,ED₅₀ 为约 10-50ng/mL (参见表 3)。

[0103] 治疗之前患者的临床信息:

[0104] 这个治疗组中所有患者都诊断患有慢性 HCV,之前都已使用珮格西施(派罗欣, Pegasys) (Peg 干扰素 α 2a)和佩乐能(PegIntron) (Peg 干扰素 α 2b)联合病毒唑(15mg/kg) 治疗超过六个月, HCV RNA 降低不超过 1log。HCV RNA>500,000IU/mL 血清;HCV 基因型 1-6 ;数量 150 ;年龄 26-78 岁 ;平均年龄 52 岁 ;有些患者具有较高的铁蛋白,低血小板 (<50,000/mL),低 Hb。大多数患者由于慢性感染 HCV,F4 的纤维规模(Fibro scale)具有较高水平的纤维化,其中高 AST/ALT 比值高于肝纤维化 1 个指示单位(indication)。使用胰岛素治疗一些患者的糖尿病。在治疗组中所有超过 50 岁的患者都患有高血压。

[0105] 治疗方案:

[0106] Peg λ (PEG-IFN λ 1) 200 μ g (每周皮下注射)+病毒唑 15mg/kg (每日)。第一个 4 周,所有患者都测定无 HCV RNA (血清中不含病毒)。治疗持续进行 12 周。

[0107] 结果:所有患者在 12 周治疗和 12 周跟进之后都达到总病毒抑制的初始端点。

[0108] 表 2 :Nanogen 的干扰素 λ 1 (PEG-IFN λ 1) 的抗病毒活性

[0109]

	组 IL290010111	组 IL290020311	组 IL290030411
ED ₅₀ (ng/ml)	1.23	2.10	1.99
平均值 (ng/ml)	1.97		
SD	0.13		
RSD	6.78		

[0110] 表 3 :Nanogen 的 PEG-IFN λ 1 的抗病毒活性

	组 PIL 290010111	组 PIL 290020211	组 PIL 290030311	组 PIL 290040411	组 PIL 290050511
ED ₅₀ (ng/ml)	26.94	28.70	26.27	26.00	27.31
平均值 (ng/ml)	27.04				
SD	1.06				
RSD	3.92				

[0112] HCV 抗性患者的疗法:

[0113] 超过 50 名患者之前已使用标准疗法,如 PEGASYS® (PEG 干扰素 α -2a) 联合病毒唑进行治疗,据发现是无效的。非响应的患者(由 AASLD 的 HCV 治疗准则定义为 24 周疗法并未显示出血清 HCV RNA 清除的患者)和无响应患者(定义为那些显示出在第 12 周时 HCV RNA 未能降低 $>2\log$ 的患者)在采用本申请的 PEG-IFN λ 1 的治疗方案中都被入选。

[0114] 在采用本文公开的治疗方案用 PEG-IFN λ 1 治疗的 4-12 周或 4-24 周之后,基本上所有患者都被测试并且检测呈 HCV RNA 阴性;或所有患者都具有持久的病毒学响应(SVR),这定义为在最后治疗剂量之后 24 周无可检测的病毒。

[0115] 在采用 HCV 抗性患者的其它研究中,本文公开的疗法据发现对于超过 80%、85%、90% 或超过 95% 的 HCV 抗性患者人群是有效的。因此,采用 PEG-IFN λ 1 的治疗方法证实了在 HCV 中的效能,包括对于当前 Peg 干扰素 α -2a+ 病毒唑的标准疗法具有抗性的病例。没有观察到与 PEGASYS® + 病毒唑的联合疗法典型相关的显著副作用。

[0116] 实施例 7 :IFN λ 1 和 PEG-IFN λ 1 的识别

[0117] Western 蛋白印迹法用于采用抗 IFN λ 1 抗体识别 IFN λ 1 和 PEG-IFN λ 1。将在 SDS-PAGE 凝胶上分析之后的蛋白溶液转移至硝基纤维素膜并用抗 -IFN λ 1 抗体探针探测。抗体用过氧化酶偶联蛋白 A 和 TMB 底物检测(参见图 11)。

[0118] 实施例 8 :PEG-IFN λ 1 的分子量

[0119] MALDI-TOF 分析法用于测定 PEG-IFN λ 1 的分子量。结果在图 12 中提供。在本实施例中, Nanogen 的 PEG-IFN λ 1 具有约 62kDa 的分子量。

[0120] 实施例 9 :PEG-IFN λ 1 的纯度

[0121] 5 组 (PIL290010111、PIL290020211、PIL290030311、PIL290040411、PIL290050511) 用于通过 SDS-PAGE 电泳测定 PEG-IFN λ 1 的纯度。电泳凝胶用考马斯蓝染色,脱色并随后采用 Phoretix 软件 (TotalLab, 英国) 分析。所有的测试组都显示出纯度高于 95%。

[0122] 以下测试采用如上制备的 PEG-IFN λ 1 :

[0123] 实施例 10 :PEG-IFN λ 1 的毒性

[0124] PEG-IFN λ 1 的急性毒性 :PEG-IFN λ 1 的急性毒性在瑞士小鼠和大鼠中进行评估。健康 ICR 小鼠和斯普拉格 - 杜勒大鼠, 5 周龄, 选定用于研究。观察动物两周。PEG-IFN λ 1 以三种不同剂量 (高剂量 3mg/kg, 中剂量 0.3mg/kg, 低剂量 0.03mg/kg 和载体治疗 (磷酸盐缓冲液, pH7.2)) 经皮下或腹膜内注射给予。观察动物临床体征, 体重变化和治疗 14 天后的死亡率。在研究结束时, 宰杀所有动物, 对其组织和器官进行异常检查。结果总结于表 4。

[0125] 表 4

[0126]

实验						结果		
动物	动物数量	给予途径	给予周期	剂量 (mg/kg)	体积 (ml)	体重	临床体征	尸检结果
瑞士鼠	5 只雄性, 5 只雌性	腹膜内注射	每周一次	3 0.3 0.03	0.5	无显著差异(*)	无	无异常 ¹
大鼠	5 只雄性, 5 只雌性	腹膜内注射	每周一次	3 0.3 0.03	1.0	无显著差异(*)	无	无异常 ¹
瑞士鼠	5 只雄性, 5 只雌性	皮下注射	每周一次	3 0.3 0.03	0.5	无显著差异(*)	无	无异常 ¹
大鼠	5 只雄性, 5 只雌性	皮下注射	每周一次	3 0.3 0.03	1.0	无显著差异(*)	无	无异常 ¹

[0127] (*) :ANOVA, 单因素, 相比于载体治疗, ($p > 0.05$)

[0128] ¹ 是指无异常

[0129] 所有动物即使在最高剂量下的测试期间都存活下来。相比于对照组, 治疗动物的体重并没有显著变化。在任一组试验动物中, 没有观察到临床体征或器官异常。

[0130] 基于这些结果, Nanogen 的 PEG-IFN $\lambda 1$ 在大鼠和小鼠中的致死剂量 (LD_{50}) 都大于 3mg/kg。PEG-IFN $\lambda 1$ 的亚急性毒性: 以三种不同剂量 (高剂量 3mg/kg, 中剂量 0.3mg/kg, 低剂量 0.03mg/kg) 每天一次经皮下或腹膜内注射 PEG-IFN $\lambda 14$ 周给予动物 (5 周龄的大鼠)。

[0131] 整个研究中对这些大鼠检测由 Nanogen 的 PEG-IFN $\lambda 1$ 给予所引起的任何临床和行为不良效应。在测试期之后, 宰杀存活的鼠进行尸检和生化分析。也从腹部动脉收集血液样品以进行血液测试。

[0132] 测试方法和结果总结于表 5 中。

[0133] 表 5

[0134]

动物	给予途径	给予周期	剂量 (mg/kg)	体积 (ml)
大鼠 5 只雄性, 5 只雌性	皮下注射	4 周, 每天 1 次	3 0.3 0.03	1.0
大鼠 5 只雄性, 5 只雌性	腹膜内注射	4 周, 每天 1 次	3 0.3 0.03	1.0
检测/分析		雄鼠	雌鼠	
临床体征		无	无	
体重		正常	正常	
食物消耗		正常	正常	
水消耗		正常	正常	
尿检		正常	正常	
血检		正常	正常	

尿分析	正常	正常
血检	正常	正常
血清生物化学	正常	正常
绝对和相对器官重量	正常	正常
尸检结果	正常	正常
组织病理学检测	正常	正常

[0135] 在整个研究期间任何组中都没有出现死亡且从所测试的鼠中没有检测到临床体征。所测试的鼠在其它检测类别和分析中甚至在高剂量组中也正常。因此,该研究表明,当以 3mg/kg 的剂量重复给予时 Nanogen 的 PEG-IFN λ 1 在大鼠中没有毒性作用。

[0136] PEG-IFN λ 1 的免疫毒性:进行研究以探讨 Nanogen 的 PEG-IFN λ 1 在豚鼠中的免疫潜力。健康雄性哈特利豚鼠,体重 300-500g,用 PEG-IFN λ 1 以高剂量(3mg/kg)或低剂量(0.03mg/kg)而卵清蛋白作为对照每周 2 次注射 3 周。最终致敏 14 天后,过敏性休克试验通过静脉注射高剂量的 PEG-IFN λ 1 进行。研究包括并入弗氏完全佐剂(FCA)中的 PEG-IFN λ 1。观察致敏豚鼠在注入高剂量 PEG-IFN λ 1 之后的活性全身过敏性休克反应。适应症列表用作过敏性反应的体征并在每个测试动物中监测其发生。

[0137] 表 6 显示了研究方法和结果。

[0138] 表 6

[0139]

测试组	剂量	给予途径	过敏性反应刺激	动物数量					
阴性对照 (PBS)	-	皮下	静脉注射PBS	5 只雄性					
阳性对照 (卵清蛋白)	2 mg/kg	皮下	静脉注射卵清蛋白	5 只雄性					
低剂量	0.03 mg/kg	皮下	静脉注射 3 mg/kg 的PEG-IFN λ 1	5 只雄性					
高剂量	3 mg/kg	皮下	静脉注射 3 mg/kg 的PEG-IFN λ 1	5 只雄性					
高剂量+ FCA	3 mg/kg+ FCA	皮下	静脉注射 3 mg/kg 的PEG-IFN λ 1	5 只雄性					
过敏性反应刺激	动物	物理检测 ⁽¹⁾							
		1	2	3	4	5	6	7	8
PBS	1	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	+	-	-	-
卵清蛋白 (2mg/kg)	1	-	+	+	-	+	+	+	+
	2	-	+	+	-	-	-	-	-
	3	-	+	+	+	+	+	+	+
	4	-	+	+	+	+	+	+	+
	5	-	+	+	+	-	-	-	-
Peg-IFN λ 1 (0.03mg/kg)	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	+	-	-	-
	5	-	-	-	-	+	-	-	-
Peg-IFN λ 1 (3mg/kg)	1	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	-	-	-	-	+	-	-	-
	3	-	-	-	-	+	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	+	-	-	-
Peg-IFN λ 1 (3mg/kg) + FCA	1	-	+	+	+	-	-	-	-
	2	-	+-	+-	-	+	-	-	-
	3	-	-	+	+	+	-	-	-
	4	-	+	+	-	+	-	-	-
	5	-	-	-	+	+	-	-	-

[0140] ⁽¹⁾ 1、舔鼻,擦鼻 ;2、抓挠皮毛 ;

[0141] 3、困难呼吸 ;4、打喷嚏,咳嗽 ;

[0142] 5、排便,排尿 ;6、痉挛 ;7、虚脱 ;

[0143] 8、死亡。- 阴性 ;+ 阳性

[0144] 在活性全身过敏性试验中,被高剂量的引入到弗氏完全佐剂(FCA)中的PEG-IFN λ 1 (3mg/kg)轻微敏化的豚鼠表现出过敏性反应的一些体征。另一方面,单独采用低剂量和高剂量的PEG-IFN λ 1 (0.03 和 3mg/kg)敏化的豚鼠没有显示出任何过敏性反应。在用 Nanogen 的PEG-IFN λ 1 和阴性治疗(PBS)给予之后无豚鼠死亡,但 3 只豚鼠在给予卵

清蛋白(阳性治疗)之后死亡。因此,可以推论, Nanogen 的 PEG-IFN λ 1 当在其临床使用中单独给予时并不引起全身过敏性反应。

[0145] 对于本领域技术人员而言将是显而易见的是对本发明的化合物、组合物和方法可以做出各种修改和变型,而不背离本发明的精神或范围。因此,本发明旨在覆盖本发明的修改和变型,只要它们在随附的权利要求及其等同物的范围内。

SEQ ID 1:

ATGGGCCCTGTTCCGACCTCTAAACCTACCACCACGGGTAAGGGTTGTCATATTGGTC
 GTTTCAAGTCTCTGTCCCCGCAGGAAGTGGCCTCTTTCAAGAAAGCTCGTGATGCCCT
 GGAAGAGTCTCTGAAGCTGAAAAACTGGAGCTGTTCTTCCCCGGTGTTCGCCGGCAAT
 TGGGACCTGCGCCTGCTGCAGGTTTCGCGAACGCCCGGTGGCTCTGGAAGCTGAGCTG
 GCTCTGACCCTGAAAGTACTGGAAGCGGCGGCTGGTCCGGCCCTGGAAGACGTTCTG
 GATCAGCCGCTGCACACCCTGCATCATATTCTGTCCCAGCTGCAGGCTTGCATCCAGC
 CTCAGCCAACCGCCGGTCCGCGTCCACGTGGCCGTCTGCACCACTGGCTGCATCGCCT
 GCAGGAAGCGCCGAAAAAGGAGAGCGCTGGCTGCCTGGAAGCAAGCGTAACCTTTA
 ACCTGTTCCGCTCTGCTGACTCGTGACCTGAAATATGTTGCAGATGGCAATCTGTGCCT
 GCGTACCTCCACCCACCCGGAATCCACCTGA

图 1

SEQ ID 2:

Met GPVPTSKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESL
 KLKNWSCSSPVFPGNWDLRLLQVRERPVALEAELATLKVLEA
 AAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHH
 WLHRLQEAPKKESAGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLCL
 RTSTHPEST

图 2

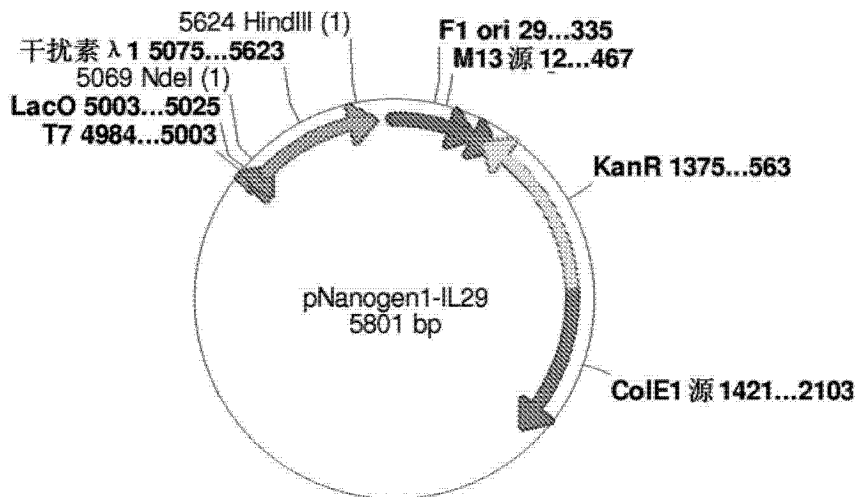
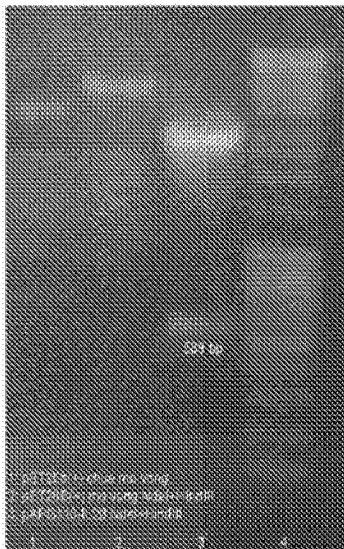
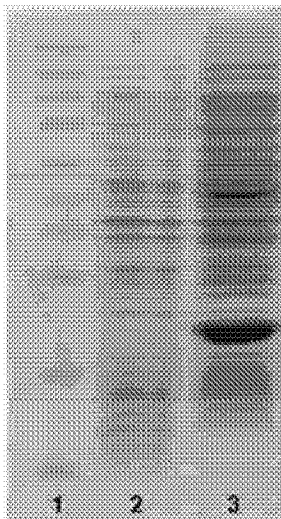


图 3



- 1: 载体pET26b(+)
- 2: 由NdeI和HindIII消化的载体 pET26b(+)
- 3: 由NdeI和HindIII消化的载体PAPG110-IFN λ
- 4: 酵母的DNA massRuler图案

图 4



- 1: 酵母的蛋白图案
- 2: 未诱导的大肠杆菌-pNanogen1-IL29
- 3: 由IPTG诱导的大肠杆菌-pNanogen1-IL29

图 5

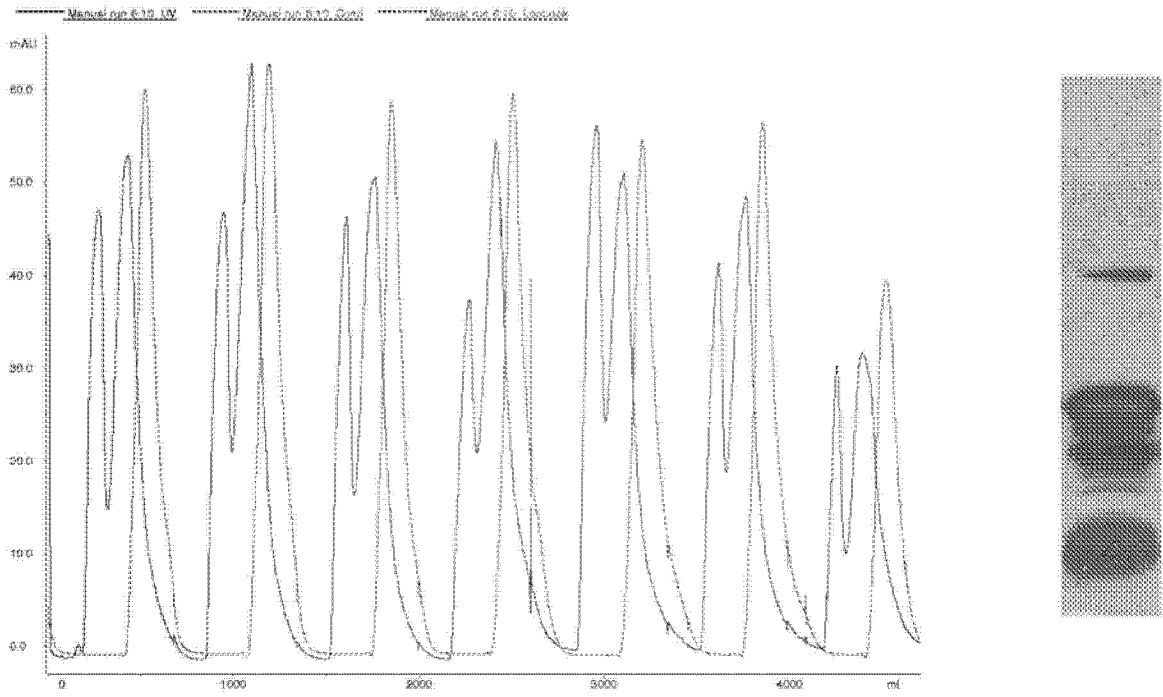


图 6

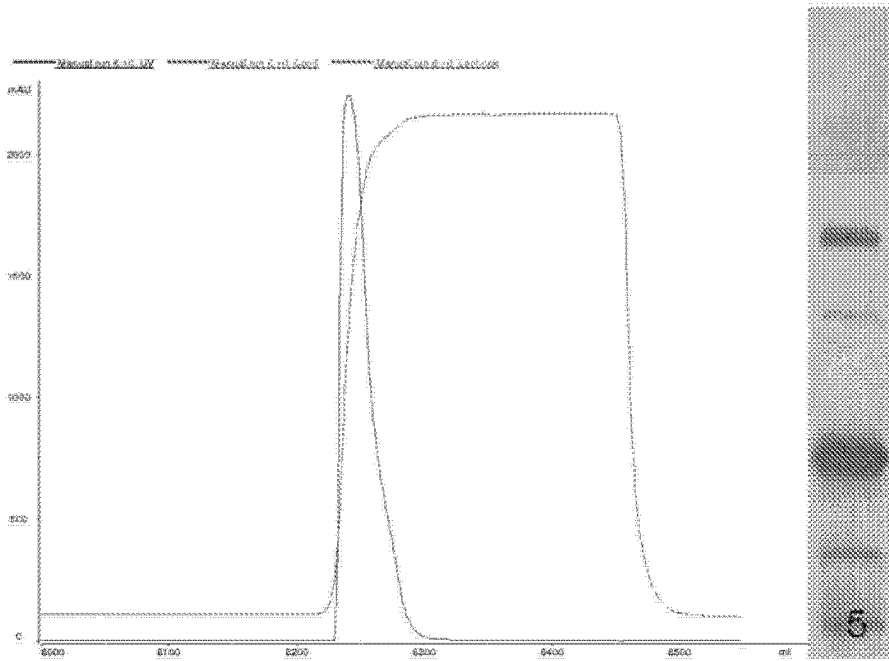


图 7

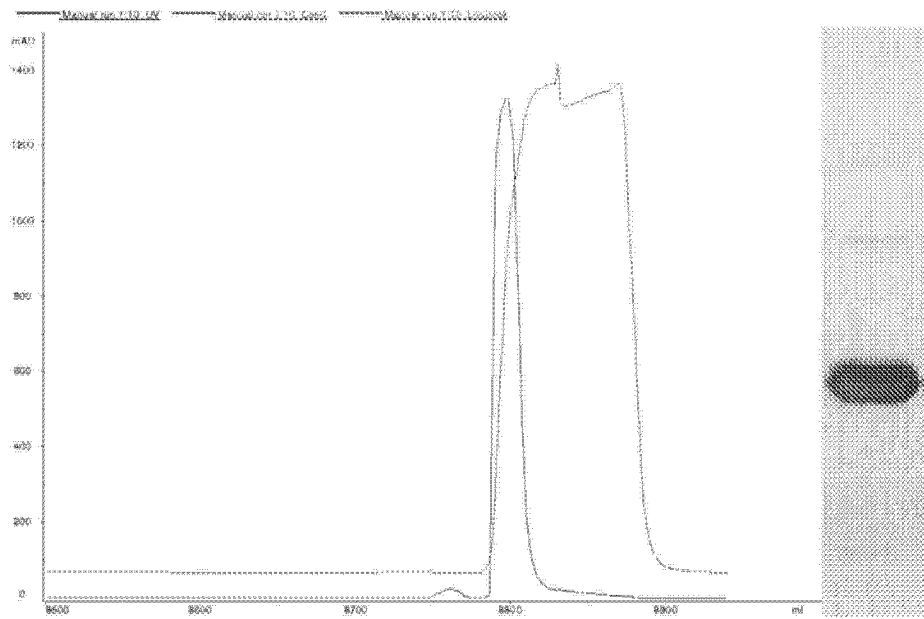


图 8

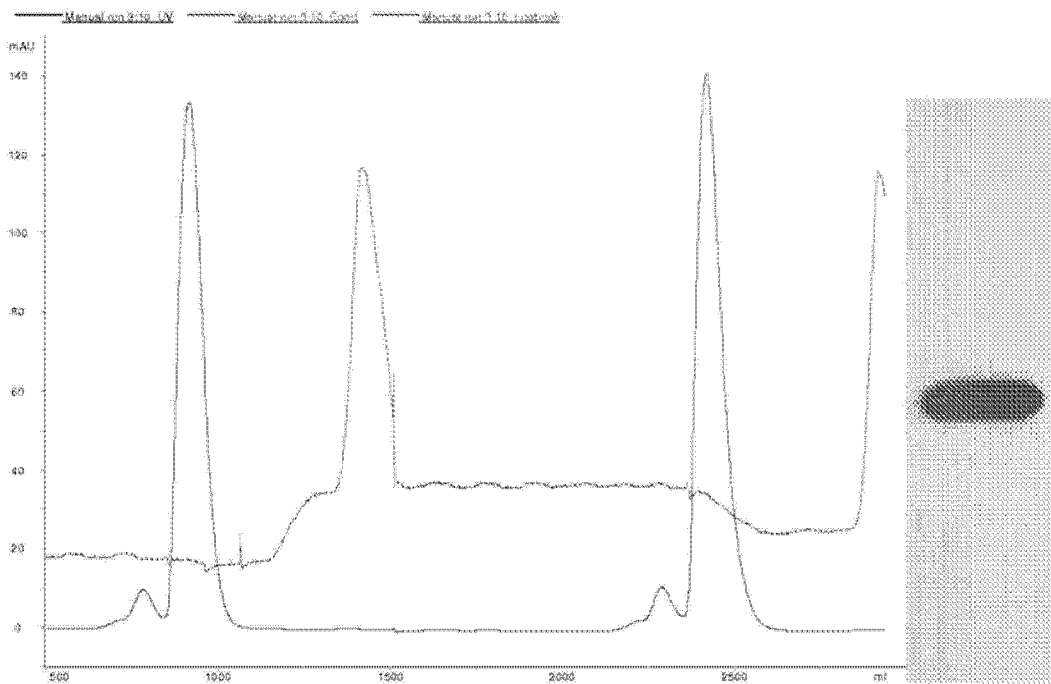


图 9

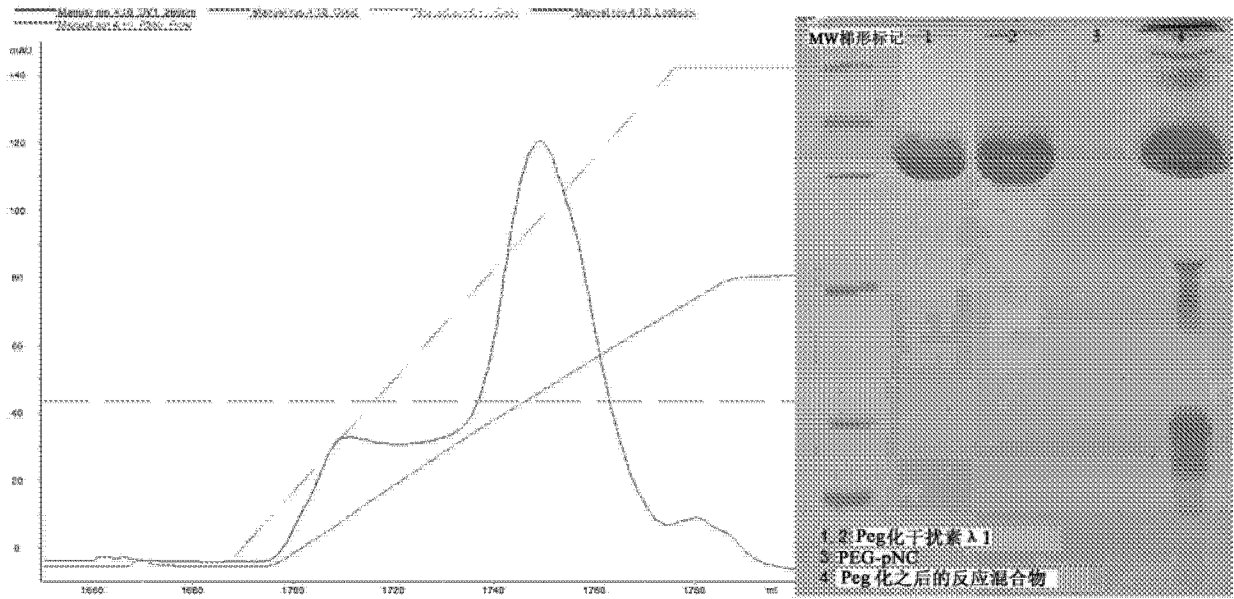
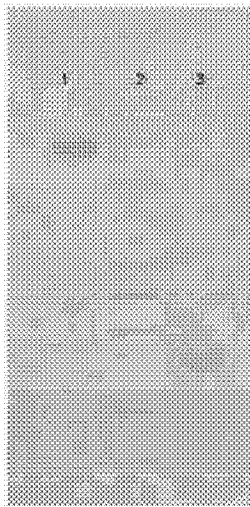


图 10



- 1: Peg化干扰素 λ 1, 组PIL290050511
- 2: MBI酵母的蛋白图案
- 3: 干扰素 λ 1, 组PIL290030411

图 11

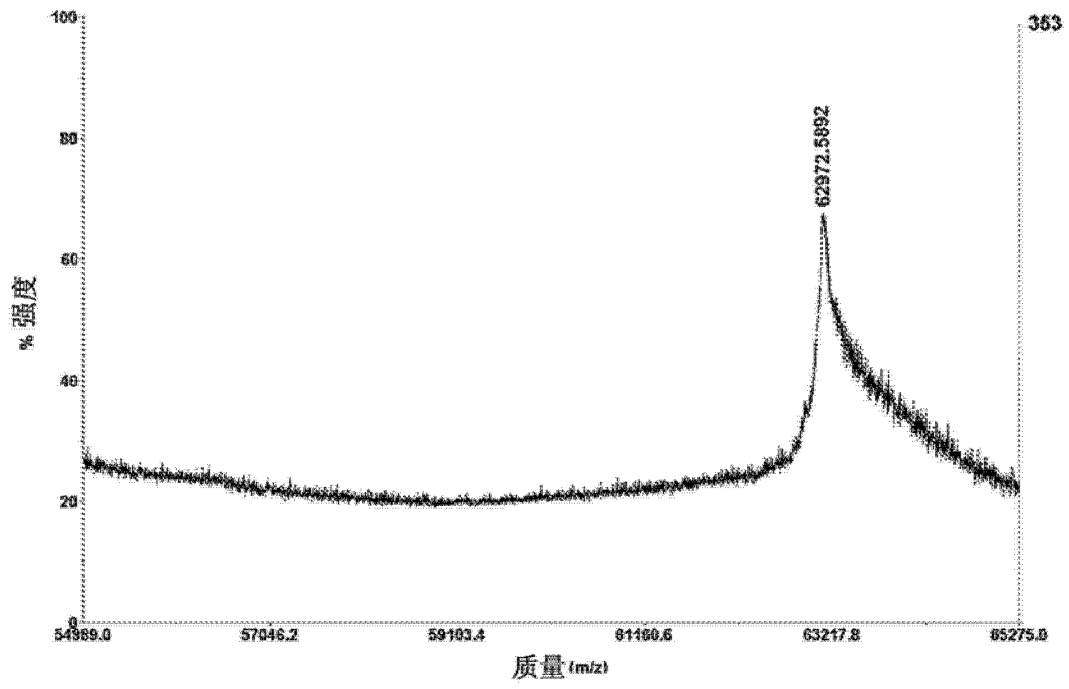


图 12