



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I728975 B

(45)公告日：中華民國 110 (2021) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：105114582

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 05 月 11 日

(51)Int. Cl. : C40B30/06 (2006.01)

C40B40/10 (2006.01)

C07K14/555 (2006.01)

(30)優先權：2015/05/12 美國

62/160,006

(71)申請人：英屬維爾京群島商遠東超級實驗室有限公司 (英屬維爾京群島) SUPERLAB FAR
EAST LIMITED (VG)

英屬維爾京群島

(72)發明人：魏光文 WEI, GUANGWEN (CN)

(74)代理人：惲軼群；劉法正

(56)參考文獻：

US 2013/273527A1

Kim NH et al., p53 and miRNA-34 are Suppressors of Canonical Wnt Signaling. Sci Signal. 4(197): available in PMC 2012 September 20.
 Gideon Schreiber., The molecular basis for functional plasticity in type I interferon signaling. Trends in Immunology. 36(3), March 2015, P139-149.

審查人員：吳淑君

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：18 共 111 頁

(54)名稱

鑒定對腫瘤具有直接抑制作用的干擾素的方法及其用途

(57)摘要

本發明提供了對測試干擾素相對於 rSIFN-co(一種對實體瘤具有治療效果的干擾素)的效力進行確定或比較的新方法；建立測試干擾素與 rSIFN-co 間的基本等效性的方法；以及確定測試干擾素的效力的方法，這些方法的鑒定試劑盒，和具有所述活性的干擾素或干擾素替代物。

The invention provides novel methods of determining or comparing potency of a test interferon relative to rSIFN-co (an interferon having therapeutic effects on solid tumors); methods of establishing substantial equivalence between a test interferon and rSIFN-co; as well as methods for determining potency of a test interferon, kits for determination of such methods, and an interferon or an interferon substitute having said activities.

I728975

發明摘要

※ 申請案號：105114582

※ 申請日：2016/5/11

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

鑒定對腫瘤具有直接抑制作用的干擾素的方法及其用途

METHODS OF DETERMINING INTERFERON HAVING DIRECT INHIBITORY
EFFECTS ON TUMORS AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供了對測試干擾素相對於rSIFN-co（一種對實體瘤具有治療效果的干擾素）的效力進行確定或比較的新方法；建立測試干擾素與rSIFN-co間的基本等效性的方法；以及確定測試干擾素的效力的方法，這些方法的鑒定試劑盒，和具有所述活性的干擾素或干擾素替代物。

【英文】

The invention provides novel methods of determining or comparing potency of a test interferon relative to rSIFN-co (an interferon having therapeutic effects on solid tumors); methods of establishing substantial equivalence between a test interferon and rSIFN-co; as well as methods for determining potency of a test interferon, kits for determination of such methods, and an interferon or an interferon substitute having said activities.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。(無)

【本代表圖之符號簡單說明】：

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

(無)

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

鑒定對腫瘤具有直接抑制作用的干擾素的方法及其用途

METHODS OF DETERMINING INTERFERON HAVING DIRECT
INHIBITORY EFFECTS ON TUMORS AND USES THEREOF

【技術領域】

[0001] 本發明在此涉及對測試干擾素相對於rSIFN-co的效力進行確定或比較的新方法，建立測試干擾素與rSIFN-co間的基本等效性的方法，對癌細胞遷移、偽足（pseudopod）形成、 β -聯蛋白/TCF-介導的轉錄活性和 β -聯蛋白的蛋白水準進行抑制的方法，下調Wnt相關受體或共受體（co-receptor）的表達的方法，抑制Wnt信號轉導通路的靶標基因的表達的方法，上調腫瘤抑制基因的方法，以及用於進行任何和所有上述方法的檢測試劑盒。本發明還涉及具有上述活性的干擾素或干擾素替代物。

【先前技術】

[0002] 超級干擾素（在下文中稱為“rSIFN-co”或“sIFN-I”，一種對實體瘤具有治療作用的干擾素）已經在美國專利7,364,724（重組高效複合干擾素）和美國專利7,585,647（編碼重組干擾素的核酸）中有過描述。rSIFN-co從編碼與INFERGEN®（干擾素alfaon-1）（在美國專利4,695,623中公開的一種複合干擾素 α ）相同的氨基酸序列的工程化基因構建體表達而來。然而，rSIFN-co由與編碼INFERGEN®的核酸序列不同的新的核酸序列所編碼。與INFERGEN®相比，rSIFN-co蛋白具有新的三級結構以及改善的生物學特性。

[0003] 與INFERGEN®相比，rSIFN-co還具有更寬的生物活性譜，包括直

接抑制實體瘤活性以及抗病毒活性，如美國專利8,114,395、8,287,852和8,425,896中記載的。

【發明內容】

[0004] 鑒於rSIFN-co具有與其它當前市售干擾素相比獨特的生物學活性及其用於人類用途的可能性，希望提供方法來評測rSIFN-co和其它測試干擾素的生物學活性和/或效力，例如出於在製造過程中或其它方面的品質控制目的，以保證最終產品保持有或具有所希望的活性並與當前市售干擾素相區分。還希望提供rSIFN-co的其它用途，以及具有期望活性的干擾素或干擾素替代物。

[0005] 在一個方面，本發明提供了一種對測試干擾素相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力進行確定或比較的方法，包括：(1) 提供所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物；和(2) 在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分別測定選自如下的任一種或更多種活性：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞例如A549細胞或SW620細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性；從而測試干擾素以統計學顯著方式存在

(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1種、或2種、或3種、或4種、或5種、或6種活性，和/或測試干擾素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一種或更多種活性，例如2種、或3種、或4種、或5種活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力，即，它們具有基本上相同的有效性或可產生基本上相同的結果。在此，“基本上相同”指至少約70%相同；任選地，至少約80%相同；進一步任選地，至少約90%相同；更任選地，至少約95%相同。

[0006] 在另一個方面，本發明提供了一種建立測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物間的基本等效性的方法，包括：(1) 提供所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物；和(2) 在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分別測定選自如下的任一種或更多種活性：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞例如A549細胞或SW620細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性；從而測試干擾素以統計學顯著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1種、或2種、或3種、或4種、或5種、或6種活性，和/或測試干擾素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一種或更多

種活性，例如2種、或3種、或4種、或5種活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物是基本等效的。

[0007] 在一些實施方式中，在測定上述一種或更多種活性中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、宮頸癌細胞、肝癌細胞、乳腺癌細胞和前列腺癌細胞。在一些實施方式中，在測定上述一種或更多種活性中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞、PANC-1細胞、SW620細胞、SPC-A4細胞、H1299細胞、H460細胞和HT-29細胞。

[0008] 在一些實施方式中，在測定活性(a)對體內癌細胞生長的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肝癌細胞、宮頸癌細胞、結腸癌細胞和肺癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(a)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：SMMC-7721細胞、Hela細胞、HT-29細胞、SPC-A4細胞和A549細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：HT-29細胞、SPC-A4細胞和A549細胞；進一步任選地，包括A549細胞。在一些實施方式中，在測定活性(a)抑制作用中生理鹽水或PBS被用作對照。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg的量施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以每隔一天施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物施用持續約2周至約6周；任選地，約3周至約4周。

[0009] 在一些實施方式中，在測定活性(b)對癌細胞生存力的降低中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物在約6.25 mcg/ml至約25 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml至約18 mcg/ml；更任選地，約10 mcg/ml至約15 mcg/ml的濃度範圍下，各自引起癌細胞生存力約50%下降。在一些實施方式中，在測定活性(b)中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物在至少約25 mcg/ml；任選地，至少約50 mcg/ml，進一步任選地，至少約75 mcg/ml；更任選地，至少約100 mcg/ml的濃度下，各自引起癌細胞生存力至基本上無法檢測的水準。在一些實施方式中，在測定活性(b)中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物的濃度包括在約0.2 mcg/ml至約100 mcg/ml的濃度。在一些實施方式中，在測定活性(b)中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理癌細胞至少約1天；任選地，至少約2天。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、宮頸癌細胞、肝癌細胞、乳腺癌細胞和前列腺癌細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、肝癌細胞、乳腺癌細胞和前列腺癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞和PANC-1細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞和PANC-1細胞。

[0010] 在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(b)

中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞被處理約1天至約10天；任選地，約1天至約6天。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW620細胞。

[0011] 在一些實施方式中，在測定活性(c)對癌細胞遷移的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(c)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，其中使用Transwell法測定活性(c)中對癌細胞遷移的抑制。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(c)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(c)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。

[0012] 在一些實施方式中，在測定活性(d)對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(d)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H1299細胞、H460細胞、HT-29細胞和SW620細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H1299細胞、H460細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(d)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任

選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(d)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中， β -聯蛋白/TCF的轉錄活性通過使用報告系統來測定。在一些實施方式中，所述報告系統包括TOPFlash或pSV40-RL質體。

[0013] 在一些實施方式中，在測定活性(e)對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(e)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H460細胞、SW620細胞和HT-29細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、SW620細胞和HT-29細胞；更任選地，包括HT-29細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(e)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(e)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(e)中通過測定LRP6和/或FZD6的mRNA水準來確定LRP6和/或FZD6的表達。

[0014] 在一些實施方式中，在測定活性(f)對Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制中所使用的癌細胞包括肺癌細胞；任選地，包括A549細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(f)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(f)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(f)中通過測定

Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2的mRNA水準來確定其相應的表達。在一些實施方式中，在測定活性(f)中，當與對照相比測試干擾素降低癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的至少約30%；任選地，至少約40%；更任選地，至少約50%；還更優選地，至少約60%的表達，則所述測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被認為具有基本上相同的效力或基本上等效。

[0015] 在一些實施方式中，在測定活性(g)對癌細胞中偽足形成的抑制中所使用的癌細胞包括肺癌細胞；任選地，A549細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(g)中所使用的癌細胞至少約4天；任選地，至少約8天。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(g)中所使用的癌細胞。

[0016] 在一些實施方式中，在測定活性(h)對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(h)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW480細胞。在一些實施方式中，在測定活性(h)中通過蛋白質印跡法測定對 β -聯蛋白表達的抑制。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(h)中所使用的癌細胞至少約48小時；任選地，至少約72小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(h)中所使用的癌細胞。

[0017] 在一些實施方式中，在測定活性(i)對癌細胞中DKK-3、KLF-4和

BATF2中任一種或更多種的表達的上調中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(i)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H460細胞、SW620細胞和HT-29細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(i)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(i)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(i)中通過測定DKK-3、KLF-4和/或BATF2的mRNA水準來確定其相應的表達。

[0018] 在一些實施方式中，在測定活性(j)中，當與IFN α -2b相比測試干擾素具有至少約2倍；任選地，至少約3倍；更任選地，至少約4倍；還更任選地，至少約4.5倍，例如4.72倍更高的結合IFNAR1的親和力，則所述測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被認為具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些實施方式中，在測定活性(j)中，當與IFN α -2b相比測試干擾素具有至少約5倍；任選地，至少約7倍；更任選地，至少約9倍；還更任選地，至少約11倍，例如11.9倍更低的結合IFNAR2的親和力，則所述測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被認為具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些實施方式中，在測定活性(j)中，通過測定解離常數(KD)確定IFN α -2b、測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物結合IFNAR1和/或IFNAR2的親和力。

[0019] 在一些實施方式中，在測定活性(k)中使用的癌細胞包括如下的任

一種或更多種：A549細胞和Hela細胞。在一些實施方式中，在測定活性(k)中在與癌細胞接觸前將IFN α -2b、測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物與約5 ng/ml至約20 ng/ml、任選地約10 ng/ml的B18R溫育。在一些實施方式中，在測定活性(k)中，當與IFN α -2b相比在對癌細胞p-STAT表達的上調中測試干擾素具有更低的對B18R抑制的敏感性時，則所述測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被認為具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些實施方式中，在測定活性(k)中通過蛋白質印跡測定p-STAT表達的上調。

[0020] 在一些實施方式中，統計學顯著指當與對照相比，p值小於或等於0.05，或小於或等於0.01，或小於或等於0.005，或小於或等於0.001，或小於或等於0.0005，或小於或等於0.0001。

[0021] 在一些實施方式中，所述對照不用測試干擾素或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理，或用生理鹽水或PBS處理，或用IFN α -2b處理，或所述對照為未處理對照(Mock)。

[0022] 在另一個方面，本發明提供確定或比較化合物（例如，測試干擾素）的效力的方法，包括：(a) 提供多個濃度的測試干擾素；(b) 使用該多個濃度的測試干擾素，在特定條件下確定測試干擾素針對第一組癌細胞的生存力的第一劑量反應；(c) 提供多個濃度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物；(d) 使用該多個濃度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物，在相同的特定條件下確定rSIFN-co或rSIFN-co替代物針對第二組癌細胞的生存力的第二劑量反應；以及(e) 比較第一劑量反應與第二劑量反應。以這種方式，確定化合物例如測試干擾素相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力。

[0023] 在一些實施方式中，rSIFN-co包含特定的比活性，且比活性在約

4×10^8 IU/mg至約 1×10^9 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 4.4×10^8 IU/mg至約 9×10^8 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 5×10^8 IU/mg至約 8×10^8 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 6×10^8 IU/mg至約 7.5×10^8 IU/mg的範圍內。任選地，比活性在約 4×10^8 IU/mg至約 5×10^8 IU/mg的範圍內。

[0024] 在一些實施方式中，在確定或比較化合物效力的方法中，測試干擾素或rSIFN-co的濃度在約0.2 mcg/ml至約100 mcg/ml的範圍內。在一些實施方式中，測試干擾素或rSIFN-co的濃度為至少兩種或更多種的以下濃度：0.2 mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78 mcg/ml、1.56 mcg/ml、3.13 mcg/ml、6.25 mcg/ml、12.5 mcg/ml、25 mcg/ml、50 mcg/ml和100 mcg/ml。

[0025] 在一些實施方式中，用測試干擾素或rSIFN-co處理癌細胞至少約20小時，任選地為至少約24小時，還任選地為至少約48小時，和更任選地為至少約72小時。

[0026] 在一些實施方式中，本發明提供如本文所述的方法，其中，rSIFN-co具有能夠在約6.25 mcg/ml至約25 mcg/ml的濃度範圍內（取決於癌細胞類型）使癌細胞生存力降低50%的效力。在一些實施方式中，rSIFN-co能夠在約6.25 mcg/ml至12.5 mcg/ml的濃度範圍內使癌細胞生存力降低50%。在另一實施方式中，rSIFN-co能夠在約12.5 mcg/ml至25 mcg/ml的濃度範圍內使癌細胞生存力降低50%。在一些實施方式中，rSIFN-co的IC₅₀在約10 mcg/ml至約18 mcg/ml的範圍內，任選地，在約10 mcg/ml至約15 mcg/ml的範圍內。

[0027] 在另一個方面，本發明提供確定或比較化合物（例如測試干擾素）相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的針對癌細胞生存力的效力的方法，包

括：(a) 提供多個癌細胞；(b) 在特定條件下用某一量的測試干擾素測試第一組癌細胞，以生成第一組生存力資料；(c) 在相同的特定條件下，用有效量的rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理第二組癌細胞，以生成第二組生存力資料；以及(d) 比較第一組生存力資料與第二組生存力資料，從而確定測試干擾素的效力。

[0028] 在一些實施方式中，在約1天至約6天的範圍內處理癌細胞。在一些實施方式中，以約6.25 mcg/ml至約50 mcg/ml範圍內的濃度使用rSIFN-co；任選地為約7 mcg/ml至約25 mcg/ml；更任選地為約8 mcg/ml至約12.5 mcg/ml；還更任選地為約10 mcg/ml。在一些實施方式中，以約5 mcg/ml至約20 mcg/ml範圍內的濃度使用rSIFN-co。在一些實施方式中，rSIFN-co包括特定的比活性。

[0029] 在一些實施方式中，本文使用的癌細胞選自人腫瘤細胞和動物腫瘤細胞。在一些實施方式中，腫瘤細胞是肺腫瘤細胞、或宮頸腫瘤細胞、或肝腫瘤細胞、或結腸直腸腫瘤細胞、或乳腺腫瘤細胞、或胰腺腫瘤細胞、或前列腺腫瘤細胞、或病毒引發的腫瘤細胞或病毒轉化的細胞。在一些實施方式中，癌細胞選自A549細胞、Calu-1細胞、CL-1細胞、H460細胞、H1299細胞、Hela細胞、HT29細胞、Huh-7細胞、MDA-MB-231細胞、PANC-1細胞、RAW264.7細胞、SMMC-7721細胞、SW480細胞和SW620細胞中的至少一種。

[0030] 在一些實施方式中，測試干擾素也是干擾素，包括得自與rSIFN-co不同的生產批次的干擾素。在一些實施方式中，所述測試干擾素的氨基酸序列與rSIFN-co的氨基酸序列（SEQ ID NO：1）具有至少90%的同一性，任選地，至少95%、96%、97%、98%、99%、100%的同一性。在一些實施方式

中，編碼所述測試干擾素的核苷酸序列與編碼rSIFN-co的核苷酸序列（SEQ ID NO: 2）具有至少90%的同一性，任選地，至少95%、96%、97%、98%、99%、100%的同一性。在一些實施方式中，所述測試干擾素與rSIFN-co具有相同的氨基酸序列（SEQ ID NO: 1）且為相同的核苷酸序列（SEQ ID NO: 2）所編碼。在一些實施方式中，所述測試干擾素與rSIFN-co具有基本上相同的比活性。在一些實施方式中，所述比活性在約 4×10^8 IU/mg至約 1×10^9 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，所述測試干擾素可獲得自包含將SEQ ID NO: 2中所示的多核苷酸序列導入大腸桿菌（*E. coli*）中的方法。在一些實施方式中，所述測試干擾素通過在大腸桿菌宿主中表達多核苷酸（SEQ ID NO: 2）而製成，任選地，在大腸桿菌宿主中在 P_{BAD} 啟動子的控制下表達。

[0031] 在另一個方面，本發明提供抑制（例如在腫瘤轉移中發生的）細胞遷移的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制細胞遷移。

[0032] 在一些實施方式中，rSIFN-co的有效量包括約5 mcg/ml至約100 mcg/ml；任選地為約8 mcg/ml至約50 mcg/ml；更任選地為約10 mcg/ml至約25 mcg/ml；更任選地為約12 mcg/ml至約18 mcg/ml。在一些實施方式中，rSIFN-co的有效量包括約5 mcg/ml至約20 mcg/ml，任選地，約10 mcg/ml。

[0033] 在另一個方面，本發明提供抑制癌細胞中偽足形成的方法，包括將癌細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制偽足形成。在一些實施方式中，rSIFN-co的有效量包括約5 mcg/ml至約20 mcg/ml，任選地，約10 mcg/ml。

[0034] 在另一個方面，本發明提供抑制細胞中 β -聯蛋白/TCF-介導的轉

錄活性的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間。在一些實施方式中，使用報告系統，任選地，螢光素酶報告系統，來確定 β -聯蛋白/TCF-介導的轉錄活性。在一些實施方式中，報告系統是TOPFlash報告系統。在一些實施方式中，使用質體pSV40-RL。

[0035] 在另一個方面，本發明還提供降低細胞中 β -聯蛋白的蛋白水準的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間。在一些實施方式中，使用 β -聯蛋白的特異性抗體經蛋白質印跡來檢測 β -聯蛋白的蛋白水準。在一些實施方式中，使用GAPDH作為對照。

[0036] 在另一個方面，本發明提供下調細胞中的Wnt相關受體或共受體的表達的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而下調Wnt相關受體或共受體。在一些實施方式中，Wnt相關受體或共受體包括LRP蛋白，例如LRP6。在一些實施方式中，Wnt信號轉導的受體或共受體包括FZD蛋白，例如FZD6。在一些實施方式中，確定Wnt相關受體或共受體的表達包括確定這些受體或共受體的mRNA水準。在一些實施方式中，製備與這些mRNA對應的cDNA來確定這些mRNA水準。

[0037] 在另一個方面，本發明提供抑制細胞中某些基因（包括Wnt信號轉導通路的至少一個靶標基因）的表達的方法，例如用於治療靶標基因過度活躍（over-active）的疾病或症狀。這些下調基因包括Axin2、CD24、存活蛋白（Survivin）、和/或ID2。該方法包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制靶標基因的表達。

[0038] 在本發明的一些實施方式中，細胞暴露於rSIFN-co的特定時間為至少約12小時；任選地，至少約20小時；再任選地，至少約24小時；再任選

地，至少約36小時；再任選地，至少約48小時；再任選地，至少約72小時。在一些實施方式中，rSIFN-co處理的細胞是癌細胞。

[0039] 在另一個方面，本發明提供上調細胞中某些基因（包括至少一種腫瘤抑制基因）的表達的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而實現對至少一種腫瘤抑制基因的表達的上調。在一些實施方式中，上調的基因包括DKK3、KLF4和BATF2中的至少一種。在一些實施方式中，通過測定這些的mRNA水準來確定上調基因的表達。在一些實施方式中，從這些mRNA合成cDNA並任選地擴增以用於測定目的。

[0040] 在另一個方面，本發明提供在至少一種、任選地為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或11種下列活性上建立測試化合物與rSIFN-co或rSIFN-co替代物間的基本等效性的方法，包括對其比較這些活性並顯示出基本相同的反應：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性。在一些實施方式中，本發明提供在至少2種上述活性中建立基本等效性；任選地，本發明提供在至少3種上述活性中建立基本等效性；任選地在至少4種上述活性中建立基本等效性；更任選地為在至少5種上述活

性中建立基本等效性；更任選地爲在至少6種上述活性中建立基本等效性；更任選地爲在至少7種、或8種、或9種、或10種、或11種上述活性中建立基本等效性。

[0041] 在另一個方面，本發明提供用於確定測試干擾素效力、抑制至少一種Wnt-相關靶基因表達、上調節腫瘤抑制基因、和/或下調節LRP6和/或FZD6表達的檢測試劑盒，包含（a）rSIFN-co或rSIFN-co替代物，以及（b）用於執行本文描述的一個以上方法的說明書和用於執行這些方法的試劑中的至少一者。這些試劑可以包含磷酸緩衝鹽水（PBS）或緩衝劑。在一些實施方式中，檢測試劑盒中的rSIFN-co或rSIFN-co替代物包括特定的比活性。

[0042] 在另一個方面，本發明提供一種干擾素或干擾素替代物，包含選自以下的一種或多種活性，任選地爲選自其中的2、3、4、5、6、7、8、9、10或11種活性：對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；對癌細胞生存力的降低；對癌細胞遷移的抑制；對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；對癌細胞中偽足形成的抑制；對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；對癌細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性；其中所述干擾素或干擾素替代物不是rSIFN-co。

[0043] 本發明的發明者發現由rSIFN-co的施用或治療引起的某些生物學作用，並且這些生物學作用可以用於評測rSIFN-co以及其它可能具有相似特

性的化合物的效力，特別是在製造過程中需要效力的一致性時或是在藥物開發過程中想要改善效力時。本發明的發明者還發現迄今未知的使用rSIFN-co治療的某些生物學作用，並且這些生物學作用可以用於rSIFN-co的其它用途，包括用於治療需要上調或下調某些基因的其它症狀或疾病。

[0044] 在一個方面，本發明提供了一種對測試干擾素相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力進行確定或比較的方法，包括：(1) 提供所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物；和(2) 在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分別測定選自如下的任一種或更多種活性：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞例如A549細胞或SW620細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性；從而測試干擾素以統計學顯著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1種、或2種、或3種、或4種、或5種、或6種活性，和/或測試干擾素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一種或更多種活性，例如2種、或3種、或4種、或5種活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力。

[0045] 在另一個方面，本發明提供了一種建立測試干擾素與rSIFN-co或

rSIFN-co替代物間的基本等效性的方法，包括：(1) 提供所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物；和(2) 在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分別測定選自如下的任一種或更多種活性：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞例如A549細胞或SW620細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性；從而測試干擾素以統計學顯著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1種、或2種、或3種、或4種、或5種、或6種活性，和/或測試干擾素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一或更多種活性，例如2種、或3種、或4種、或5種活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物是基本等效的。任選地，在測試干擾素處理或施用的情況下，以統計學顯著方式存在對體外癌細胞生存力的降低，例如在A549細胞和/或SW620細胞中，以及對 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制，例如在如下的任一種或更多種中：A549細胞、H1299細胞、H460細胞和HT-29細胞，以及任選地，額外存在JAK/STAT信號轉導，指示測試干擾素與rSIFN-co間是基本等效的。還任選地，可在使用例如約10 mcg/ml的測試干擾素處理合適的細胞約1天至約6天的情況下，進行細胞生存力的測定。任選地，在如下的任

一種或更多種癌細胞中：A549細胞、H1299細胞、H460細胞或HT-29細胞，測定對 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制，例如，通過用約10 mcg/ml的測試干擾素處理這些細胞約24小時。任選地，通過測定STAT蛋白，例如STAT1、STAT2和/或STAT3磷酸化的存在測定JAK/STAT信號轉導，例如用約10 mcg/ml的測試干擾素對A549細胞或Hela細胞進行處理不同的時間，例如約5、15、30、60、120和/或240分鐘。

[0046] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少2種上述活性，例如(a)和(b)；(a)和(c)；(a)和(d)；(a)和(e)；(a)和(f)；(a)和(g)；(a)和(h)；(a)和(i)；(a)和(j)；(a)和(k)；(b)和(c)；(b)和(d)；(b)和(e)；(b)和(f)；(b)和(g)；(b)和(h)；(b)和(i)；(b)和(j)；(b)和(k)；(c)和(d)；(c)和(e)；(c)和(f)；(c)和(g)；(c)和(h)；(c)和(i)；(c)和(j)；(c)和(k)；(d)和(e)；(d)和(f)；(d)和(g)；(d)和(h)；(d)和(i)；(d)和(j)；(d)和(k)；(e)和(f)；(e)和(g)；(e)和(h)；(e)和(i)；(e)和(j)；(e)和(k)；(f)和(g)；(f)和(h)；(f)和(i)；(f)和(j)；(f)和(k)；(g)和(h)；(g)和(i)；(g)和(j)；(g)和(k)；(h)和(i)；(h)和(j)；(h)和(k)；(i)和(j)；(i)和(k)；(j)和(k)。

[0047] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少3種上述活性，例如(a)、(b)和(c)；(a)、(b)和(d)；(a)、(b)和(e)；(a)、(b)和(f)；(a)、(b)和(g)；(a)、(b)和(h)；(a)、(b)和(i)；(a)、(b)和(j)；(a)、(b)和(k)；(a)、(c)和(d)；(a)、(c)和(e)；(a)、(c)和(f)；(a)、(c)和(g)；(a)、(c)和(h)；(a)、(c)和(i)；(a)、(c)和(j)；(a)、(c)和(k)；(a)、(d)和(e)；(a)、(d)和(f)；(a)、(d)和(g)；(a)、(d)和(h)；(a)、(d)和(i)；(a)、(d)和(j)；(a)、(d)和(k)；(a)、(e)和(f)；(a)、(e)和(g)；

(a)、(e)和(h)；(a)、(e)和(i)；(a)、(e)和(j)；(a)、(e)和(k)；(a)、(f)和(g)；(a)、(f)和(h)；(a)、(f)和(i)；(a)、(f)和(j)；(a)、(f)和(k)；(a)、(g)和(h)；(a)、(g)和(i)；(a)、(g)和(j)；(a)、(g)和(k)；(a)、(h)和(i)；(a)、(h)和(j)；(a)、(h)和(k)；(a)、(i)和(j)；(a)、(i)和(k)；(a)、(j)和(k)；(b)、(c)和(d)；(b)、(c)和(e)；(b)、(c)和(f)；(b)、(c)和(g)；(b)、(c)和(h)；(b)、(c)和(i)；(b)、(c)和(j)；(b)、(c)和(k)；(b)、(d)和(e)；(b)、(d)和(f)；(b)、(d)和(g)；(b)、(d)和(h)；(b)、(d)和(i)；(b)、(d)和(j)；(b)、(d)和(k)；(b)、(e)和(f)；(b)、(e)和(g)；(b)、(e)和(h)；(b)、(e)和(i)；(b)、(e)和(j)；(b)、(e)和(k)；(b)、(f)和(g)；(b)、(f)和(h)；(b)、(f)和(i)；(b)、(f)和(j)；(b)、(f)和(k)；(b)、(g)和(h)；(b)、(g)和(i)；(b)、(g)和(j)；(b)、(g)和(k)；(b)、(h)和(i)；(b)、(h)和(j)；(b)、(h)和(k)；(b)、(i)和(j)；(b)、(i)和(k)；(b)、(j)和(k)；(c)、(d)和(e)；(c)、(d)和(f)；(c)、(d)和(g)；(c)、(d)和(h)；(c)、(d)和(i)；(c)、(d)和(j)；(c)、(d)和(k)；(c)、(e)和(f)；(c)、(e)和(g)；(c)、(e)和(h)；(c)、(e)和(i)；(c)、(e)和(j)；(c)、(e)和(k)；(c)、(f)和(g)；(c)、(f)和(h)；(c)、(f)和(i)；(c)、(f)和(j)；(c)、(f)和(k)；(c)、(g)和(h)；(c)、(g)和(i)；(c)、(g)和(j)；(c)、(g)和(k)；(c)、(h)和(i)；(c)、(h)和(j)；(c)、(h)和(k)；(c)、(i)和(j)；(c)、(i)和(k)；(c)、(j)和(k)；(d)、(e)和(f)；(d)、(e)和(g)；(d)、(e)和(h)；(d)、(e)和(i)；(d)、(e)和(j)；(d)、(e)和(k)；(d)、(f)和(g)；(d)、(f)和(h)；(d)、(f)和(i)；(d)、(f)和(j)；(d)、(f)和(k)；(d)、(g)和(h)；(d)、(g)和(i)；(d)、(g)和(j)；(d)、(g)和(k)；(d)、(h)和(i)；(d)、(h)和(j)；(d)、(h)和(k)；(d)、(i)和(j)；(d)、(i)和(k)；(d)、(j)和(k)；(e)、(f)和(g)；(e)、(f)和(h)；(e)、(f)和(i)；(e)、(f)和(j)；(e)、(f)和(k)；(e)、(g)和(h)；(e)、(g)和(i)；(e)、(g)和(j)；(e)、(g)和(k)；(e)、(h)和(i)；(e)、(h)和(j)；(e)、(h)和(k)；(e)、(i)和(j)；

(e)、(i)和(k)；(e)、(j)和(k)；(f)、(g)和(h)；(f)、(g)和(i)；(f)、(g)和(j)；(f)、(g)和(k)；(f)、(h)和(i)；(f)、(h)和(j)；(f)、(h)和(k)；(f)、(i)和(j)；(f)、(i)和(k)；(f)、(j)和(k)；(g)、(h)和(i)；(g)、(h)和(j)；(g)、(h)和(k)；(g)、(i)和(j)；(g)、(i)和(k)；(g)、(j)和(k)；(h)、(i)和(j)；(h)、(i)和(k)；(h)、(j)和(k)；(i)、(j)和(k)。

[0048] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少4種上述活性，例如(a)、(b)、(c)和(d)；(a)、(b)、(c)和(e)；(a)、(b)、(c)和(f)；(a)、(b)、(c)和(g)；(a)、(b)、(c)和(h)；(a)、(b)、(c)和(i)；(a)、(b)、(c)和(j)；(a)、(b)、(c)和(k)；(a)、(c)、(d)和(e)；(a)、(c)、(d)和(f)；(a)、(c)、(d)和(g)；(a)、(c)、(d)和(h)；(a)、(c)、(d)和(i)；(a)、(c)、(d)和(j)；(a)、(c)、(d)和(k)；(a)、(d)、(e)和(f)；(a)、(d)、(e)和(g)；(a)、(d)、(e)和(h)；(a)、(d)、(e)和(i)；(a)、(d)、(e)和(j)；(a)、(d)、(e)和(k)；(a)、(e)、(f)和(g)；(a)、(e)、(f)和(h)；(a)、(e)、(f)和(i)；(a)、(e)、(f)和(j)；(a)、(e)、(f)和(k)；(a)、(f)、(g)和(h)；(a)、(f)、(g)和(i)；(a)、(f)、(g)和(j)；(a)、(f)、(g)和(k)；(a)、(g)、(h)和(i)；(a)、(g)、(h)和(j)；(a)、(g)、(h)和(k)；(a)、(h)、(i)和(j)；(a)、(h)、(i)和(k)；(a)、(i)、(j)和(k)；(b)、(c)、(d)和(e)；(b)、(c)、(d)和(f)；(b)、(c)、(d)和(g)；(b)、(c)、(d)和(h)；(b)、(c)、(d)和(i)；(b)、(c)、(d)和(j)；(b)、(c)、(d)和(k)；(b)、(d)、(e)和(f)；(b)、(d)、(e)和(g)；(b)、(d)、(e)和(h)；(b)、(d)、(e)和(i)；(b)、(d)、(e)和(j)；(b)、(d)、(e)和(k)；(b)、(e)、(f)和(g)；(b)、(e)、(f)和(h)；(b)、(e)、(f)和(i)；(b)、(e)、(f)和(j)；(b)、(e)、(f)和(k)；(b)、(f)、(g)和(h)；(b)、(f)、(g)和(i)；(b)、(f)、(g)和(j)；(b)、(f)、(g)和(k)；(b)、(g)、(h)和(i)；(b)、(g)、(h)和(j)；(b)、(g)、(h)和(k)；(b)、(h)、(i)和(j)；(b)、(h)、(i)和(k)；(b)、(i)、(j)

和(k)；(c)、(d)、(e)和(f)；(c)、(d)、(e)和(g)；(c)、(d)、(e)和(h)；(c)、(d)、(e)和(i)；(c)、(d)、(e)和(j)；(c)、(d)、(e)和(k)；(c)、(d)、(f)和(g)；(c)、(d)、(f)和(h)；(c)、(d)、(f)和(i)；(c)、(d)、(f)和(j)；(c)、(d)、(f)和(k)；(c)、(d)、(g)和(h)；(c)、(d)、(g)和(i)；(c)、(d)、(g)和(j)；(c)、(d)、(g)和(k)；(c)、(d)、(h)和(i)；(c)、(d)、(h)和(j)；(c)、(d)、(h)和(k)；(c)、(e)、(f)和(g)；(c)、(e)、(f)和(h)；(c)、(e)、(f)和(i)；(c)、(e)、(f)和(j)；(c)、(f)、(g)和(h)；(c)、(f)、(g)和(i)；(c)、(f)、(g)和(j)；(c)、(f)、(g)和(k)；(c)、(g)、(h)和(i)；(c)、(g)、(h)和(j)；(c)、(g)、(h)和(k)；(c)、(h)、(i)和(j)；(c)、(h)、(i)和(k)；(c)、(i)、(j)和(k)；(d)、(e)、(f)和(g)；(d)、(e)、(f)和(h)；(d)、(e)、(f)和(i)；(d)、(e)、(f)和(j)；(d)、(e)、(f)和(k)；(d)、(f)、(g)和(h)；(d)、(f)、(g)和(i)；(d)、(f)、(g)和(j)；(d)、(f)、(g)和(k)；(d)、(g)、(h)和(i)；(d)、(g)、(h)和(j)；(d)、(g)、(h)和(k)；(d)、(h)、(i)和(j)；(d)、(h)、(i)和(k)；(d)、(i)、(j)和(k)；(e)、(f)、(g)和(h)；(e)、(f)、(g)和(i)；(e)、(f)、(g)和(j)；(e)、(f)、(g)和(k)；(e)、(g)、(h)和(i)；(e)、(g)、(h)和(j)；(e)、(g)、(h)和(k)；(e)、(h)、(i)和(j)；(e)、(h)、(i)和(k)；(e)、(i)、(j)和(k)；(f)、(g)、(h)和(i)；(f)、(g)、(h)和(j)；(f)、(g)、(h)和(k)；(f)、(h)、(i)和(j)；(f)、(h)、(i)和(k)；(f)、(i)、(j)和(k)；(g)、(h)、(i)和(j)；(g)、(h)、(i)和(k)；(g)、(i)、(j)和(k)；(h)、(i)、(j)和(k)。

[0049] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少5種上述活性，例如(a)、(b)、(c)、(d)和(e)；(a)、(b)、(c)、(d)和(f)；(a)、(b)、(c)、(d)和(g)；(a)、(b)、(c)、(d)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)和(j)；

(a)、(b)、(c)、(d)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)和(f)；(a)、(c)、(d)、(e)和(g)；(a)、(c)、(d)、(e)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)和(k)；(a)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(d)、(e)、(f)和(h)；(a)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(e)、(f)、(g)和(k)；(a)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)和(f)；(b)、(c)、(d)、(e)和(g)；(b)、(c)、(d)、(e)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)和(g)；(b)、(d)、(e)、(f)和(h)；(b)、(d)、(e)、(f)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)和(j)；(b)、(d)、(e)、(f)和(k)；(b)、(e)、(f)、(g)和(h)；(b)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(c)、(e)、(f)、(g)和(h)；(c)、(e)、(f)、(g)和(i)；(c)、(e)、(f)、(g)和(j)；(c)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(f)、(g)、(h)和(i)；(c)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(f)、(g)、(h)和(k)；(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(d)、(f)、(g)、(h)和(i)；(d)、(f)、(g)、(h)和(j)；(d)、(f)、(g)、(h)和(k)；(f)、(g)、(h)、(i)和(j)；(f)、(g)、(h)、(i)和(k)；(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0050] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少6種上述活性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(g)；(a)、(b)、

(c)、(d)、(e)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(j)；
 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(c)、(d)、(e)、
 (f)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(c)、
 (d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；
 (a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(a)、(e)、(f)、(g)、
 (h)和(i)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、
 (d)、(e)、(f)和(g)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；
 (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、
 (g)和(h)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(d)、
 (e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；
 (b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(c)、(d)、(e)、(f)、
 (g)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(c)、(d)、
 (e)、(f)、(g)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；
 (c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(d)、(e)、(f)、(g)、
 (h)和(i)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)。

[0051] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少7種上述活性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；
 (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(b)、
 (c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、
 (f)、(g)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和
 (k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、

(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)。

[0052] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少8種上述活性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)。

[0053] 在一些實施方式中，在上述方法的步驟（2）中，在相同的特定條件下，對所述測試干擾素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物測定至少9種、10種或所有11種上述活性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0054] 在一些實施方式中，在測定活性（a）中，當與對照相比測試干擾素以統計學顯著方式（例如 $p < 0.05$ ，任選地， $p < 0.01$ ，進一步任選地， $p < 0.005$ ，更任選地， $p < 0.001$ ，還任選地， $p < 0.0005$ ，還更任選地， $p < 0.0001$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0055] 在一些實施方式中，在測定活性（a）中使用的荷瘤動物模型包括小鼠，任選地，裸小鼠，更任選地，BALB/cA nu/nu小鼠。在一些實施方式中，所述小鼠，例如，BALB/cA nu/nu小鼠，包括約3至約7周齡，任選地，約4至約6周齡的小鼠。在一些實施方式中，所述小鼠，例如，BALB/cA nu/nu小鼠，體重在約 15 ± 2 g至約 30 ± 2 g，任選地，約 19 ± 2 g至約 23 ± 2 g的範圍內。

[0056] 在一些實施方式中，在測定活性(a)對體內癌細胞生長的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肝癌細胞、宮頸癌細胞、結腸癌細胞和肺癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(a)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：SMMC-7721細胞、Hela細胞、HT-29細胞、SPC-A4細胞和A549細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：HT-29細胞、SPC-A4細胞和A549細胞；進一步任選地，包括A549細胞。

[0057] 在一些實施方式中，在測定活性(a)抑制作用中生理鹽水或PBS，任選地，生理鹽水被用作對照。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施

用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以每隔一天施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物施用持續約2周至約6周；任選地，約3周至約4周。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的對照以約0.05 ml至約0.30 ml；任選地，約0.10 ml至約0.20 ml的量施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的對照以每隔一天施用。在一些實施方式中，在測定活性(a)中被施用於荷瘤動物模型的對照施用持續約2周至約6周；任選地，約3周至約4周。在一些實施方式中，瘤內施用測試干擾素和/或對照。

[0058] 在一些實施方式中，在測定活性(a)中當使用SMMC-7721細胞時，與對照（例如生理鹽水）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如對於約0.05mg和約 0.10 mg， $p<0.05$ ，任選地，對於約0.15 mg， $p<0.01$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量每隔一天施用，持續約3周。

[0059] 在一些實施方式中，在測定活性(a)中當使用Hela細胞時，與對照（例如生理鹽水）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如對於約0.15mg，

$p < 0.05$ ，任選地，對於約0.05mg和約 0.10 mg， $p < 0.01$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量每隔一天施用，持續約4周。

[0060] 在一些實施方式中，在測定活性(a)中當使用HT-29細胞時，與對照（例如生理鹽水）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如對於約0.10mg和約 0.15 mg， $p < 0.01$ ，任選地，對於約0.05 mg， $p < 0.001$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量每隔一天施用，持續約4周。

[0061] 在一些實施方式中，在測定活性(a)中當使用SPC-A4細胞時，與對照（例如生理鹽水）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如對於約0.05 mg、約0.10 mg和約0.15 mg， $p < 0.01$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量每隔一天施用，持續約3周。

[0062] 在一些實施方式中，在測定活性(a)中當使用A549細胞時，與對照（例如PBS）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如 $p < 0.0001$ ）存在(a)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本

上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以約0.02 mg至約0.30 mg；任選地，約0.05 mg至約0.15 mg，進一步任選地，約0.075 mg至約0.10 mg的量每隔一天施用，持續約3周。

[0063] 在一些實施方式中，在測定活性(b)對癌細胞生存力的降低中，當測試干擾素在約6.25 mcg/ml至約25 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml至約18 mcg/ml；更任選地，約10 mcg/ml至約15 mcg/ml的濃度範圍下，引起癌細胞生存力約50%下降，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，在測定活性(b)中，當測試干擾素在至少約25 mcg/ml；任選地，至少約50 mcg/ml，進一步任選地，至少約75 mcg/ml；更任選地，至少約100 mcg/ml的濃度下，引起癌細胞生存力至基本上無法檢測的水準，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0064] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物的濃度包括在約0.2 mcg/ml至約100 mcg/ml的濃度。在一些實施方式中，測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物的濃度為至少兩種或更多種的以下濃度：0.2 mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78 mcg/ml、1.56 mcg/ml、3.13 mcg/ml、6.25 mcg/ml、12.5 mcg/ml、25 mcg/ml、50 mcg/ml和100 mcg/ml。在一些實施方式中，在測定活性(b)中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理癌細胞至少約1天；任選地，至少約2天。

[0065] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、宮頸癌細胞、肝癌細胞、乳腺

癌細胞和前列腺癌細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、肝癌細胞、乳腺癌細胞和前列腺癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞和PANC-1細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、SW480細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞、SMMC-7721細胞和PANC-1細胞。

[0066] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中，當所述測試干擾素在約6.25 mcg/ml至約12.5 mcg/ml的濃度範圍下進行處理後，引起SW480細胞、MDA-MB-231細胞和PANC-1細胞中的任一種或更多種的生存力約50%下降，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0067] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中，當所述測試干擾素在約12.5 mcg/ml至約25 mcg/ml的濃度範圍下進行處理後，引起A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、Calu-1細胞和SMMC-7721細胞中的任一種或更多種的生存力約50%下降，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0068] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中，當使用A549細胞和/或SW620細胞，與對照（例如IFN α -2b）相比，測試干擾素以統計學顯著方式（例如 $p < 0.01$ ）存在(b)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/

或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(b)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(b)中所使用的癌細胞被處理約1天至約10天；任選地，約1天至約6天。

[0069] 在一些實施方式中，在測定活性(b)中，通過Am-Blue法或MTT法測定癌細胞生存力。

[0070] 在一些實施方式中，在測定活性(c)中，當與對照相比測試干擾素以統計學顯著方式（例如 $p < 0.01$ ）存在(c)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，所述對照是未處理的對照（Mock）。

[0071] 在一些實施方式中，在測定活性(c)對癌細胞遷移的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(c)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，其中使用Transwell法測定活性(c)中對癌細胞遷移的抑制。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(c)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(c)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。

[0072] 在一些實施方式中，在測定活性(d)中，當與對照相比測試干擾素以統計學顯著方式（例如 $p < 0.05$ ，任選地， $p < 0.01$ ）存在(d)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，所述對照是未處理的對照（Mock）。

[0073] 在一些實施方式中，在測定活性(d)對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(d)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H1299細胞、H460細胞、HT-29細胞和SW620細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H1299細胞、H460細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(d)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(d)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中， β -聯蛋白/TCF的轉錄活性通過使用報告系統來測定。在一些實施方式中，所述報告系統包括TOPFlash或pSV40-RL質體。

[0074] 在一些實施方式中，在測定活性(e)中，當與對照相比測試干擾素以統計學顯著方式(例如 $p < 0.005$ ，任選地， $p < 0.001$ ，進一步任選地， $p < 0.0005$)存在(e)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，所述對照是未處理的對照(Mock)。

[0075] 在一些實施方式中，在測定活性(e)對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(e)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H460細胞、SW620細胞和HT-29細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞、SW620細胞和HT-29細胞；更

任選地，包括HT-29細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(e)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(e)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(e)中通過測定LRP6和/或FZD6的mRNA水準來確定LRP6和/或FZD6的表達。在一些實施方式中，當測定mRNA水準時，使用GAPDH作為對照。

[0076] 在一些實施方式中，在測定活性(f)中，當與對照相比測試干擾素以統計學顯著方式（例如， $p < 0.0005$ ，任選地， $p < 0.0001$ ）存在(f)中指定的活性，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些實施方式中，所述對照是未處理的對照（Mock）。

[0077] 在一些實施方式中，在測定活性(f)對Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制中所使用的癌細胞包括肺癌細胞；任選地，包括A549細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(f)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(f)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(f)中通過測定Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2的mRNA水準來確定其相應的表達。在一些實施方式中，當測定mRNA水準時，使用GAPDH作為對照。

[0078] 在一些實施方式中，在測定活性(f)中，當與對照相比測試干擾素

降低癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的至少約30%；任選地，至少約40%；更任選地，至少約50%；還更優選地，至少約60%的表達，則所述測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被認為具有基本上相同的效力或基本上等效。

[0079] 在一些實施方式中，在測定活性(g)中，當所述測試干擾素基本上抑制了癌細胞中偽足的形成，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在此，“基本上抑制”指至少約60%抑制；任選地，至少約70%抑制；更任選地，至少約80%抑制；進一步任選地，至少約90%抑制；還更任選地，至少約95%抑制。

[0080] 在一些實施方式中，在測定活性(g)對癌細胞中偽足形成的抑制中所使用的癌細胞包括肺癌細胞；任選地，A549細胞。 在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(g)中所使用的癌細胞至少約4天；任選地，至少約8天。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(g)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在Matrigel中培養在測定活性(g)中所使用的癌細胞。

[0081] 在一些實施方式中，在測定活性(h)中，當所述測試干擾素引起癌細胞中 β -聯蛋白水準明顯下降，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在此，當例如在蛋白質印跡上與處理前相比表示蛋白質的條帶變得暗淡或消失時，則處理後癌細胞中 β -聯蛋白水準明顯下降。

[0082] 在一些實施方式中，在測定活性(h)對癌細胞中 β -聯蛋白表達的

抑制中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(h)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW480細胞。在一些實施方式中，在測定活性(h)中通過蛋白質印跡法測定對 β -聯蛋白表達的抑制。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(h)中所使用的癌細胞至少約48小時；任選地，至少約72小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(h)中所使用的癌細胞。

[0083] 在一些實施方式中，在測定活性(i)中，當與IFN α -2b相比所述測試干擾素能更有效地上調癌細胞中如下的任一種或更多種的表達：DKK-3、KLF-4和BATF2，表示所述測試干擾素與rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0084] 在一些實施方式中，在測定活性(i)對癌細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞和結腸癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(i)中所使用的癌細胞包括如下的任一種或更多種：A549細胞、H460細胞、SW620細胞和HT-29細胞；任選地，包括如下的任一種或更多種：A549細胞和SW620細胞。在一些實施方式中，用測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(i)中所使用的癌細胞至少約20小時；任選地，至少約24小時。在一些實施方式中，使用約5 mcg/ml至約20 mcg/ml；任選地，約10 mcg/ml的測試干擾素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理在測定活性(i)中所使用的癌細胞。在一些實施方式中，在測定活性(i)中通過測定DKK-3、KLF-4

和/或BATF2的mRNA水準來確定其相應的表達。在一些實施方式中，當測定mRNA水準時，使用GAPDH作為對照。

[0085] 在一些實施方式中，統計學顯著指當與對照相比，p值小於或等於0.05，或小於或等於0.01，或小於或等於0.005，或小於或等於0.001，或小於或等於0.0005，或小於或等於0.0001。

[0086] 在一些實施方式中，所述對照不用測試干擾素或rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理，或用生理鹽水或PBS處理，或用IFN α -2b處理，或所述對照為未處理對照（Mock）。

[0087] 在一個方面，本發明提供確定或比較化合物（例如，測試干擾素）的效力的方法，包括：（a）提供多個濃度的測試干擾素；（b）使用該多個濃度的測試干擾素，在特定條件下確定測試干擾素針對第一組癌細胞的生存力的第一劑量反應；（c）提供多個濃度的rSIFN-co或rSIFN-co的替代物（下文中稱為“rSIFN-co替代物”）；（d）使用該多個濃度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物，在相同的特定條件下確定rSIFN-co或rSIFN-co替代物針對第二組癌細胞的生存力的第二劑量反應；以及（e）比較第一劑量反應與第二劑量反應。以這種方式，確定化合物例如測試干擾素相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力。

[0088] 在本發明的一些實施方式中，通過在大腸桿菌宿主中，任選地在大腸桿菌宿主中在啟動子P_{BAD}的控制下表達新的多核苷酸（SEQ ID NO:2）來製備如美國專利7,364,724（重組高效複合干擾素）中記載的rSIFN-co（SEQ ID NO:1）。在本發明的一些實施方式中，rSIFN-co可獲得自包括將SEQ ID NO:2所示的多核苷酸序列導入大腸桿菌中的方法。在本發明的一些實施方式

中，rSIFN-co具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列，並為SEQ ID NO: 2的核苷酸序列所編碼，其中與不為SEQ ID NO: 2的核苷酸序列所編碼的干擾素例如干擾素alfaon-1（INFERGEN®）相比，所述干擾素對乙肝病毒表面抗原（HbsAg）和乙肝病毒e抗原（HbeAg）的表達具有增加的抑制活性。

[0089] 在一些實施方式中，用於本文方法中的rSIFN-co包括特定的比活性，該比活性可以是，例如在約 4×10^8 IU/mg至約 1×10^9 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 4.4×10^8 IU/mg至約 9×10^8 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 5×10^8 IU/mg至約 8×10^8 IU/mg的範圍內。在一些實施方式中，比活性在約 6×10^8 IU/mg至約 7.5×10^8 IU/mg的範圍內。任選地，比活性在約 4×10^8 IU/mg至約 5×10^8 IU/mg的範圍內。

[0090] 在一些實施方式中，在確定或比較化合物效力的方法中，測試干擾素或rSIFN-co的濃度在約0.2 mcg/ml至約100 mcg/ml的範圍內。在一些實施方式中，測試干擾素或rSIFN-co的濃度為至少兩種或更多種的以下濃度：0.2 mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78 mcg/ml、1.56 mcg/ml、3.13 mcg/ml、6.25 mcg/ml、12.5 mcg/ml、25 mcg/ml、50 mcg/ml和100 mcg/ml。

[0091] 在一些實施方式中，用於本文的確定rSIFN-co效果的方法中的細胞是癌細胞，其是人細胞或是動物細胞。使用測試干擾素或rSIFN-co處理細胞至少約24小時，任選地為至少約48小時，且再任選地，至少約72小時，除非另外指出，在標準培養條件下，在完全培養基中，在37°C下，在5%CO₂氛中。培養基可以是適於培養腫瘤細胞的任何標準完全培養基，例如可得自Shanghai Cell Collection,（中國上海）的培養基，並補充有10%胎牛血清（Biochrom, Germany）、4 mM穀氨醯胺、50 U/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素。

IFN α -2b可以得自上海華新生物高技術有限公司（中國上海），以及rSIFN-co可以得自四川輝陽生命工程股份有限公司（中國成都）。

[0092] 在一些實施方式中，本發明提供具有能夠在約6.25 mcg/ml至約25 mcg/ml的濃度範圍內（取決於癌細胞類型）使癌細胞生存力降低50%的能力的rSIFN-co。在一些實施方式中，rSIFN-co能夠在約6.25 mcg/ml至12.5 mcg/ml的濃度範圍內使細胞的生存力降低50%。在另一實施方式中，rSIFN-co能夠在約12.5 mcg/ml至25 mcg/ml的濃度範圍內使細胞生存力降低50%。在一些實施方式中，rSIFN-co的IC₅₀在約10 mcg/ml至約18 mcg/ml的範圍內。

[0093] 在一些實施方式中，測試干擾素也是干擾素，但是得自與在比較中使用的rSIFN-co不同的生產批次。

[0094] 因此，例如，在確定化合物例如測試干擾素的效力時，測試干擾素被稀釋到多種濃度，並將適於所使用容器的一定數量的製備細胞（例如 5×10^3 細胞於100微升完全培養基中），與這些多種濃度的測試干擾素一起溫育一定時間，例如48小時。在溫育之後，確定細胞的生存力並與相似地用rSIFN-co而非測試干擾素處理的細胞生存力進行比較。可以從結果中生成對於各個用測試干擾素處理的和用rSIFN-co處理的細胞的劑量反應曲線並進行比較。以這種方式，可以在50%有效劑量或IC₅₀的層面上，確定測試干擾素相對於rSIFN-co的效力。

[0095] 在另一個方面，本發明提供確定或比較化合物（例如測試干擾素）相對於rSIFN-co或rSIFN-co替代物的針對癌細胞生存力的效力的方法，包括：（a）提供多個癌細胞；（b）在特定條件下用一定量的測試干擾素測試第一組癌細胞，以生成第一組生存力資料；（c）在相同的特定條件下，用有

效量的rSIFN-co或rSIFN-co替代物處理第二組癌細胞，以生成第二組生存力資料；以及（d）比較第一組生存力資料與第二組生存力資料，從而確定測試干擾素的效力。

[0096] 在一些實施方式中，在約1天至約6天的範圍內處理癌細胞。在一些實施方式中，以約6.25 mcg/ml至約50 mcg/ml範圍內的濃度使用rSIFN-co；任選地為約7 mcg/ml至約25 mcg/ml；還任選地為約8 mcg/ml至約12.5 mcg/ml；更任選地為約10 mcg/ml。在一些實施方式中，rSIFN-co包括特定的比活性。

[0097] 在一些實施方式中，本文使用的癌細胞選自人腫瘤細胞和動物腫瘤細胞。在一些實施方式中，腫瘤細胞是肺腫瘤細胞、或宮頸腫瘤細胞、或肝腫瘤細胞、或結腸腫瘤細胞、或乳腺腫瘤細胞、或胰腺腫瘤細胞、或前列腺腫瘤細胞、或病毒引發的腫瘤細胞或病毒轉化的細胞。在一些實施方式中，癌細胞選自A549細胞、Calu-1細胞、CL-1細胞、H460細胞、H1299細胞、Hela細胞、HT29細胞、Huh-7細胞、MDA-MB-231細胞、PANC-1細胞、RAW264.7細胞、SMMC-7721細胞、SW480細胞和SW620細胞中的至少一種。

[0098] 因此，例如，適於測試容器的合適體積的一定數量的癌細胞，例如 2×10^3 細胞於100微升完全培養基中，可以放置在96孔板中，使用約10 mcg/ml的測試干擾素或rSIFN-co處理，或不處理作為對照，其中處理持續1、2、3、4、5或6天，並且每天確定處理細胞的生存力相對於未處理對照組的生存力。在結束實驗時，相對於未處理對照組生存力的處理細胞的生存力可以針對干擾素處理的天數進行繪圖。以這種方式，可以比較測試化合物降低癌細胞生存力的能力，並確定其相對於rSIFN-co的效力。

[0099] 在一些實施方式中，本發明提供抑制（例如在腫瘤轉移中發生的）細胞遷移的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制細胞遷移。

[0100] 在一些實施方式中，通過在有效量的rSIFN-co的存在下於37°C將細胞溫育一段時間，例如24小時，或通過向動物或受試者施用有效量的rSIFN-co從而使一定濃度的rSIFN-co保持足以獲得所希望效果的一段時間，可在體外或體內實施本文中提到的細胞例如腫瘤細胞暴露於rSIFN-co，上述所希望效果例如抑制轉移中的腫瘤細胞遷移、或抑制偽足生成、抑制 β -聯蛋白/TCF轉錄活性、抑制 β -聯蛋白的表達、下調Wnt相關受體和/或共受體、下調Wnt信號轉導下游靶標基因、上調腫瘤抑制基因、以及本文中記載的其它情況。

[0101] 可以使用任何合適的市售試劑盒進行細胞遷移檢測。例如，在本文中可以使用放置在Becton-Dickinson Biosciences（N.J., USA）的24孔板中的含有微孔膜的8微米插入式小室（insert）。對於該檢測，可以將37°C不含FBS的溫熱碳酸氫鹽類培養基添加到插入式小室的內部以及孔的底部，並允許在加濕組織培養箱中於37°C、5% CO₂氛下複水約2小時。在複水之後，可以小心除去培養基，並且可以以約 0.5×10^4 細胞/插入式小室的密度將混懸於無FBS培養基的約500微升所製備細胞（例如在37°C下用rSIFN-co預處理24小時的細胞）接種到插入式小室濾器的上側。之後，可以向24孔板的下室添加500微升含有10%FBS的完全培養基。然後可以在37°C下溫育細胞/插入式小室/板約24小時，且可以用例如棉拭子除去在室膜上側的非遷移細胞。可以例如用4%多聚甲醛固定含有遷移細胞的插入式培養小室的下表面，並用2%

結晶紫染色。可以對在室膜相反側的遷移細胞的數量進行計數，並確定單位區域的平均遷移細胞數。以這種方式，可以表明測試干擾素抑制腫瘤細胞遷移的能力。

[0102] 在一些實施方式中，rSIFN-co的有效量包括約5 mcg/ml至約100 mcg/ml；任選地為約8 mcg/ml至約50 mcg/ml；更任選地為約10 mcg/ml至約25 mcg/ml；更任選地為約12 mcg/ml至約18 mcg/ml。

[0103] 在另一個方面，本發明提供抑制癌細胞中偽足形成的方法，包括將癌細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制偽足形成。

[0104] 在另一個方面，本發明提供抑制細胞中 β -聯蛋白/TCF-介導的轉錄活性的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間。

[0105] 在一些實施方式中，可以使用螢光素酶報告系統來確定 β -聯蛋白/TCF-介導的轉錄活性。在一些實施方式中，報告系統是TOPFlash報告系統。在一些實施方式中，使用質體pSV40-RL。因此，例如，將待評測的細胞鋪到96孔板上，例如每孔約 1×10^4 細胞，在37°C下溫育約12小時，之後，用約100 ng的TOPFlash (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 對其進行暫態轉染。為使轉染效率標準化，還用1 ng由SV40啟動子驅動的內參報告基因海腎 (Renilla reniformis) 螢光素酶 (pRL-SV40, Promega, Madison, WI) 對細胞進行共轉染。在轉染6小時後，用於體外分析的細胞可以在之後用rSIFN-co處理約24小時。在用於體外分析的rSIFN-co處理之後或用於體內分析的轉染之後，可以使用雙螢光素酶檢測系統試劑盒根據製造商的操作指南 (Cat#:E1960, Promega) 進行螢光素酶檢測。相對螢光素酶活性可以確定為螢火蟲螢光素酶/海腎螢光素酶 (firefly/renilla luciferase) 活性的比率。

[0106] 在另一個方面，本發明還提供降低細胞中 β -聯蛋白的蛋白水準的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間。在一些實施方式中，使用其特異性抗體經蛋白質印跡來檢測 β -聯蛋白的蛋白水準。在一些實施方式中，使用GAPDH作為對照。

[0107] 對於確定細胞（細胞來自體外培養或來自體內腫瘤樣本）中 β -聯蛋白水準的蛋白質印跡分析，可以採用標準步驟。例如，可以使用提取試劑（Cat#:P0013）遵循製造商的操作指南（Beyotime, China）來提取總細胞蛋白。可以使用Bio-Rad Lowry蛋白檢測系統來確定蛋白濃度。可以通過SDS-PAGE在10%~12%膠上來分離總蛋白，之後將其轉移到0.45微米的硝酸纖維素膜（Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）上。該膜可以用封閉緩衝液（5%牛血清白蛋白、10 mmol/L Tris-HCl pH8.0、150 mol/L NaCl，和0.05%吐溫20）在4°C下封閉過夜，之後與一抗（1:1000稀釋）一起溫育，接著與HRP結合的二抗溫育。抗體可以來自任何賣家，例如可以使用以下抗體：小鼠單克隆 β -聯蛋白抗體（1:1000，Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA）、小鼠單克隆GAPDH抗體（1:2000, Kangwei Biotechnology, China）和抗小鼠HRP結合的二抗（1:2000, Santa Cruz Technology）等。可以使用冷光/螢光成像LAS4000系統（GE Healthcare Life Sciences，USA）和super signal west pico化學發光底物試劑盒（Thermo Scientific，USA）來對印跡進行視覺化。

[0108] 在另一個方面，本發明提供下調細胞中Wnt相關受體或共受體的表達的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而下調Wnt相關受體或共受體。在一些實施方式中，Wnt相關受體或共受體包括LRP蛋白，例如LRP6。在一些實施方式中，Wnt信號轉導受體或共受體包括FZD

蛋白，例如FZD6。如上所述，將細胞暴露於rSIFN-co的方法可以是體外方法或體內方法。

[0109] 在一些實施方式中，確定Wnt相關受體或共受體的表達包括確定這些受體或共受體的mRNA水準。可以通過任何標準方法確定這些mRNA水準。在一些實施方式中，製備與這些mRNA對應的cDNA來確定這些mRNA水準。例如，可以使用TRIZOL試劑（Invitrogen, Carlsbad, CA）根據製造商的說明書來分離總mRNA。可以使用RT-PCT試劑盒（Cat#: FSQ-101, TOYOBO, Japan）根據製造商的說明書來合成互補DNA（cDNA），之後使用SYBR Green PCR試劑盒（Cat#:QPK-201, TOYOBO, Japan）來進行定量PCR（qPCR）。可使用合適的引子，例如，用於LRP6的引子可以是，正義引子：5' -TGAAGAACCAGCACACAGG-3'（SEQ ID NO:4）；反義引子：5' -CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3'（SEQ ID NO:5），且用於FZD6的引子可以是，正義引子：5' -GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3'（SEQ ID NO:6）；反義引子：5' -TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC -3'（SEQ ID NO:7）。擴增方案可以是，在95°C下溫育1分鐘，40個迴圈（95°C，15秒；60°C，15秒；以及72°C，30秒）。SYBR Green染料結合入PCR產物中可以用Bio-Rad檢測系統進行即時監測，然後使用Bio-Rad CFX manager 2.1軟體進行分析。可對各個條件彙集樣品，並平行運行。可以使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法將干擾素處理的樣品與Mock未處理樣品進行比較，並針對倍率變化來繪圖。可以使用GAPDH作為標準化對照。該 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法通常用於分析來自即時定量PCR實驗的基因表達的相對變化。

[0110] 在另一個方面，本發明提供下調細胞中某些基因（包括Wnt信號

轉導通路中的至少一個靶標基因)的表達的方法，例如用於治療靶標基因突變或過度活躍的疾病或症狀。這些下調基因包括例如Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2。該方法包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而抑制靶標基因的表達。下調的程度可以通過標準技術例如之前所述的qPCR來確定。例如，對於這些qPCR，對於Axin2，可以使用正義引子：5' - CGTGGATACCTTAGACTT-3' (SEQ ID NO : 8) 和反義引子：5' -GCTGTTGTTCTCAATGTA-3' (SEQ ID NO : 9)；對於CD24，可以使用正義引子5' - TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3' (SEQ ID NO : 10) 和反義引子5' -GAAAACCTGAATCTCCATTCCACAA-3' (SEQ ID NO : 11)；對於存活蛋白，可以使用正義引子：5' -ACCGCATCTCTACATTCAAG-3' (SEQ ID NO : 12) 和反義引子5' -CAAGTCTGGCTCGTTCTC-3' (SEQ ID NO : 13)；以及對於ID2，可以使用正義引子5' -CACAACAACAACAAC-3' (SEQ ID NO : 14) 和反義引子5' -CACAGTCCAAGTAAGAGA-3' (SEQ ID NO : 15)。

[0111] 在本發明的一些實施方式中，細胞暴露於rSIFN-co的特定時間為至少約12小時；任選地，至少約20小時；再任選地，至少約24小時；再任選地，至少約36小時；再任選地，至少約48小時；再任選地，至少約72小時。在一些實施方式中，rSIFN-co處理的細胞是癌細胞。

[0112] 在另一個方面，本發明提供上調細胞中某些基因（包括至少一種腫瘤抑制基因）的表達的方法，包括將細胞暴露於有效量的rSIFN-co一段特定時間，從而實現對至少一種腫瘤抑制基因的表達的上調。在一些實施方式中，上調的基因包括DKK3、KLF4和BATF2中的至少一種。可以通過標準

技術確定這些基因的上調程度。在一些實施方式中，通過測定mRNA水準來確定上調基因的表達。在一些實施方式中，從這些mRNA合成cDNA並任選地擴增以用於此測定目的。作為一個實例，對於擴增目的，可以使用以下引子：對於BATF2，正義引子5' -CAGAGCAGGGAGCACAAACC -3' (SEQ ID NO: 16) 和反義引子5' -TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG -3' (SEQ ID NO: 17)；對於DKK3，正義引子5' -GGAGCCTGACTGAAGAGATGG-3' (SEQ ID NO: 18) 和反義引子5' -ACGCCTAAAGCACACACCTG-3' (SEQ ID NO: 19)；對於KLF4，正義引子5' -CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO: 20) 和反義引子5' -GGCTGCTGCGGCGGAATG -3' (SEQ ID NO: 21)。

[0113] 在另一個方面，本發明提供在至少1種，任選地為至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或11種下列活性上建立測試化合物與rSIFN-co或rSIFN-co替代物間的基本等效性的方法，包括對其比較這些活性並顯示出基本相同的反應：(a) 對任一或更多只荷瘤動物模型體內癌細胞生長的抑制；(b) 對癌細胞生存力的降低；(c) 對癌細胞遷移的抑制；(d) 對癌細胞中 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制；(e) 對癌細胞中LRP6和/或FZD6的表達的下調；(f) 對癌細胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或更多種的表達的抑制；(g) 對癌細胞中偽足形成的抑制；(h) 對癌細胞中 β -聯蛋白表達的抑制；(i) 對癌細胞例如A549細胞或SW620細胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一種或更多種的表達的上調；(j) 與IFN α -2b相比更高的結合IFNAR1的親和力和/或更低的結合IFNAR2的親和力；和(k) 在對癌細胞p-STAT表達的上調中與IFN α -2b相比更低的對B18R抑制的敏感性。在一些實施方式中，本發明提

供在至少2種上述活性中建立基本等效性，例如(a)和(b)；(a)和(c)；(a)和(d)；
(a)和(e)；(a)和(f)；(a)和(g)；(a)和(h)；(a)和(i)；(a)和(j)；(a)和(k)；(b)和(c)；
(b)和(d)；(b)和(e)；(b)和(f)；(b)和(g)；(b)和(h)；(b)和(i)；(b)和(j)；(b)和(k)；
(c)和(d)；(c)和(e)；(c)和(f)；(c)和(g)；(c)和(h)；(c)和(i)；(c)和(j)；(c)和(k)；
(d)和(e)；(d)和(f)；(d)和(g)；(d)和(h)；(d)和(i)；(d)和(j)；(d)和(k)；(e)和(f)；
(e)和(g)；(e)和(h)；(e)和(i)；(e)和(j)；(e)和(k)；(f)和(g)；(f)和(h)；(f)和(i)；
(f)和(j)；(f)和(k)；(g)和(h)；(g)和(i)；(g)和(j)；(g)和(k)；(h)和(i)；(h)和(j)；
(h)和(k)；(i)和(j)；(i)和(k)；(j)和(k)；任選地，本發明提供在至少3種上述活
性中建立基本等效性，例如(a)、(b)和(c)；(a)、(b)和(d)；(a)、(b)和(e)；(a)、
(b)和(f)；(a)、(b)和(g)；(a)、(b)和(h)；(a)、(b)和(i)；(a)、(b)和(j)；(a)、(b)
和(k)；(a)、(c)和(d)；(a)、(c)和(e)；(a)、(c)和(f)；(a)、(c)和(g)；(a)、(c)和(h)；
(a)、(c)和(i)；(a)、(c)和(j)；(a)、(c)和(k)；(a)、(d)和(e)；(a)、(d)和(f)；(a)、
(d)和(g)；(a)、(d)和(h)；(a)、(d)和(i)；(a)、(d)和(j)；(a)、(d)和(k)；(a)、(e)
和(f)；(a)、(e)和(g)；(a)、(e)和(h)；(a)、(e)和(i)；(a)、(e)和(j)；(a)、(e)和(k)；
(a)、(f)和(g)；(a)、(f)和(h)；(a)、(f)和(i)；(a)、(f)和(j)；(a)、(f)和(k)；(a)、(g)
和(h)；(a)、(g)和(i)；(a)、(g)和(j)；(a)、(g)和(k)；(a)、(h)和(i)；(a)、(h)和(j)；
(a)、(h)和(k)；(a)、(i)和(j)；(a)、(i)和(k)；(a)、(j)和(k)；(b)、(c)和(d)；(b)、
(c)和(e)；(b)、(c)和(f)；(b)、(c)和(g)；(b)、(c)和(h)；(b)、(c)和(i)；(b)、(c)
和(j)；(b)、(c)和(k)；(b)、(d)和(e)；(b)、(d)和(f)；(b)、(d)和(g)；(b)、(d)和(h)；
(b)、(d)和(i)；(b)、(d)和(j)；(b)、(d)和(k)；(b)、(e)和(f)；(b)、(e)和(g)；(b)、
(e)和(h)；(b)、(e)和(i)；(b)、(e)和(j)；(b)、(e)和(k)；(b)、(f)和(g)；(b)、(f)
和(h)；(b)、(f)和(i)；(b)、(f)和(j)；(b)、(f)和(k)；(b)、(g)和(h)；(b)、(g)和(i)；

(b)、(g)和(j)；(b)、(g)和(k)；(b)、(h)和(i)；(b)、(h)和(j)；(b)、(h)和(k)；(b)、(i)和(j)；(b)、(i)和(k)；(b)、(j)和(k)；(c)、(d)和(e)；(c)、(d)和(f)；(c)、(d)和(g)；(c)、(d)和(h)；(c)、(d)和(i)；(c)、(d)和(j)；(c)、(d)和(k)；(c)、(e)和(f)；(c)、(e)和(g)；(c)、(e)和(h)；(c)、(e)和(i)；(c)、(e)和(j)；(c)、(e)和(k)；(c)、(f)和(g)；(c)、(f)和(h)；(c)、(f)和(i)；(c)、(f)和(j)；(c)、(f)和(k)；(c)、(g)和(h)；(c)、(g)和(i)；(c)、(g)和(j)；(c)、(g)和(k)；(c)、(h)和(i)；(c)、(h)和(j)；(c)、(h)和(k)；(c)、(i)和(j)；(c)、(i)和(k)；(c)、(j)和(k)；(d)、(e)和(f)；(d)、(e)和(g)；(d)、(e)和(h)；(d)、(e)和(i)；(d)、(e)和(j)；(d)、(e)和(k)；(d)、(f)和(g)；(d)、(f)和(h)；(d)、(f)和(i)；(d)、(f)和(j)；(d)、(f)和(k)；(d)、(g)和(h)；(d)、(g)和(i)；(d)、(g)和(j)；(d)、(g)和(k)；(d)、(h)和(i)；(d)、(h)和(j)；(d)、(h)和(k)；(d)、(i)和(j)；(d)、(i)和(k)；(d)、(j)和(k)；(e)、(f)和(g)；(e)、(f)和(h)；(e)、(f)和(i)；(e)、(f)和(j)；(e)、(f)和(k)；(e)、(g)和(h)；(e)、(g)和(i)；(e)、(g)和(j)；(e)、(g)和(k)；(e)、(h)和(i)；(e)、(h)和(j)；(e)、(h)和(k)；(e)、(i)和(j)；(e)、(i)和(k)；(e)、(j)和(k)；(f)、(g)和(h)；(f)、(g)和(i)；(f)、(g)和(j)；(f)、(g)和(k)；(f)、(h)和(i)；(f)、(h)和(j)；(f)、(h)和(k)；(f)、(i)和(j)；(f)、(i)和(k)；(f)、(j)和(k)；(g)、(h)和(i)；(g)、(h)和(j)；(g)、(h)和(k)；(g)、(i)和(j)；(g)、(i)和(k)；(g)、(j)和(k)；(h)、(i)和(j)；(h)、(i)和(k)；(h)、(j)和(k)；(i)、(j)和(k)；任選地，在至少4種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)和(d)；(a)、(b)、(c)和(e)；(a)、(b)、(c)和(f)；(a)、(b)、(c)和(g)；(a)、(b)、(c)和(h)；(a)、(b)、(c)和(i)；(a)、(b)、(c)和(j)；(a)、(b)、(c)和(k)；(a)、(c)、(d)和(e)；(a)、(c)、(d)和(f)；(a)、(c)、(d)和(g)；(a)、(c)、(d)和(h)；(a)、(c)、(d)和(i)；(a)、(c)、(d)和(j)；(a)、(c)、(d)和(k)；(a)、(d)、(e)和(f)；(a)、(d)、(e)

和(g)；(a)、(d)、(e)和(h)；(a)、(d)、(e)和(i)；(a)、(d)、(e)和(j)；(a)、(d)、(e)
 和(k)；(a)、(e)、(f)和(g)；(a)、(e)、(f)和(h)；(a)、(e)、(f)和(i)；(a)、(e)、(f)
 和(j)；(a)、(e)、(f)和(k)；(a)、(f)、(g)和(h)；(a)、(f)、(g)和(i)；(a)、(f)、(g)
 和(j)；(a)、(f)、(g)和(k)；(a)、(g)、(h)和(i)；(a)、(g)、(h)和(j)；(a)、(g)、(h)
 和(k)；(a)、(h)、(i)和(j)；(a)、(h)、(i)和(k)；(a)、(i)、(j)和(k)；(b)、(c)、(d)
 和(e)；(b)、(c)、(d)和(f)；(b)、(c)、(d)和(g)；(b)、(c)、(d)和(h)；(b)、(c)、(d)
 和(i)；(b)、(c)、(d)和(j)；(b)、(c)、(d)和(k)；(b)、(d)、(e)和(f)；(b)、(d)、(e)
 和(g)；(b)、(d)、(e)和(h)；(b)、(d)、(e)和(i)；(b)、(d)、(e)和(j)；(b)、(d)、(e)
 和(k)；(b)、(e)、(f)和(g)；(b)、(e)、(f)和(h)；(b)、(e)、(f)和(i)；(b)、(e)、(f)
 和(j)；(b)、(e)、(f)和(k)；(b)、(f)、(g)和(h)；(b)、(f)、(g)和(i)；(b)、(f)、(g)
 和(j)；(b)、(f)、(g)和(k)；(b)、(g)、(h)和(i)；(b)、(g)、(h)和(j)；(b)、(g)、(h)
 和(k)；(b)、(h)、(i)和(j)；(b)、(h)、(i)和(k)；(b)、(i)、(j)和(k)；(c)、(d)、(e)
 和(f)；(c)、(d)、(e)和(g)；(c)、(d)、(e)和(h)；(c)、(d)、(e)和(i)；(c)、(d)、(e)
 和(j)；(c)、(d)、(e)和(k)；(c)、(d)、(f)和(g)；(c)、(d)、(f)和(h)；(c)、(d)、(f)
 和(i)；(c)、(d)、(f)和(j)；(c)、(d)、(f)和(k)；(c)、(d)、(g)和(h)；(c)、(d)、(g)
 和(i)；(c)、(d)、(g)和(j)；(c)、(d)、(g)和(k)；(c)、(d)、(h)和(i)；(c)、(d)、(h)
 和(j)；(c)、(d)、(h)和(k)；(c)、(e)、(f)和(g)；(c)、(e)、(f)和(h)；(c)、(e)、(f)
 和(i)；(c)、(e)、(f)和(j)；(c)、(e)、(f)和(k)；(c)、(f)、(g)和(h)；(c)、(f)、(g)
 和(i)；(c)、(f)、(g)和(j)；(c)、(f)、(g)和(k)；(c)、(g)、(h)和(i)；(c)、(g)、(h)
 和(j)；(c)、(g)、(h)和(k)；(c)、(h)、(i)和(j)；(c)、(h)、(i)和(k)；(c)、(i)、(j)
 和(k)；(d)、(e)、(f)和(g)；(d)、(e)、(f)和(h)；(d)、(e)、(f)和(i)；(d)、(e)、(f)
 和(j)；(d)、(e)、(f)和(k)；(d)、(f)、(g)和(h)；(d)、(f)、(g)和(i)；(d)、(f)、(g)

和(j)；(d)、(f)、(g)和(k)；(d)、(g)、(h)和(i)；(d)、(g)、(h)和(j)；(d)、(g)、(h)和(k)；(d)、(h)、(i)和(j)；(d)、(h)、(i)和(k)；(d)、(i)、(j)和(k)；(e)、(f)、(g)和(h)；(e)、(f)、(g)和(i)；(e)、(f)、(g)和(j)；(e)、(f)、(g)和(k)；(e)、(g)、(h)和(i)；(e)、(g)、(h)和(j)；(e)、(g)、(h)和(k)；(e)、(h)、(i)和(j)；(e)、(h)、(i)和(k)；(e)、(i)、(j)和(k)；(f)、(g)、(h)和(i)；(f)、(g)、(h)和(j)；(f)、(g)、(h)和(k)；(f)、(h)、(i)和(j)；(f)、(h)、(i)和(k)；(f)、(i)、(j)和(k)；(g)、(h)、(i)和(j)；(g)、(h)、(i)和(k)；(g)、(i)、(j)和(k)；(h)、(i)、(j)和(k)；更任選地，在至少5種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)、(d)和(e)；(a)、(b)、(c)、(d)和(f)；(a)、(b)、(c)、(d)和(g)；(a)、(b)、(c)、(d)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)和(f)；(a)、(c)、(d)、(e)和(g)；(a)、(c)、(d)、(e)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)和(k)；(a)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(d)、(e)、(f)和(h)；(a)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(e)、(f)、(g)和(k)；(a)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)和(f)；(b)、(c)、(d)、(e)和(g)；(b)、(c)、(d)、(e)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)和(g)；(b)、(d)、(e)、(f)和(h)；(b)、(d)、(e)、(f)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)和(j)；(b)、(d)、(e)、(f)和(k)；(b)、(e)、(f)、(g)和(h)；(b)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(c)、

(d)、(e)、(f)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(c)、(e)、(f)、(g)和(h)；(c)、(e)、(f)、(g)和(i)；(c)、(e)、(f)、(g)和(j)；(c)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(f)、(g)、(h)和(i)；(c)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(f)、(g)、(h)和(k)；(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(d)、(f)、(g)、(h)和(i)；(d)、(f)、(g)、(h)和(j)；(d)、(f)、(g)、(h)和(k)；(f)、(g)、(h)、(i)和(j)；(f)、(g)、(h)、(i)和(k)；(g)、(h)、(i)、(j)和(k)；更任選地，在至少6種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(g)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(d)、

(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；更任選地，在至少7種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；更任選地，在至少8種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(j)；(a)、

(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(k)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j)；(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)；或任選地，在至少9種、10種或所有11種上述活性中建立基本等效性，例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0114] 在另一個方面，本發明提供檢測試劑盒，包含（a）rSIFN-co或rSIFN-co替代物，以及（b）用於執行本文描述的一個以上方法的說明書和用於執行這些方法的試劑中的至少一者。這些試劑可以包含磷酸緩衝鹽水（PBS）或緩衝劑。在一些實施方式中，檢測試劑盒中的rSIFN-co或rSIFN-co替代物包括特定的比活性。

[0115] 在一些實施方式中，所述測試干擾素還通過癌細胞中JAK/STAT信號轉導通路傳遞信號和/或與rSIFN-co享有共同的IFNAR1/2受體，從而與rSIFN-co基本等價或與rSIFN-co具有基本上相同的效力。在一些實施方式中，借助於檢測來自STAT家族，例如STAT1、STAT2和/或STAT3的磷酸化蛋白的存在，從而檢測通過JAK/STAT途徑的信號傳導。在一些實施方式中，使用蛋白質印跡來進行這樣的檢測。在一些實施方式中，癌細胞A549和/或Hela細胞可用於進行這樣的檢測。在一些實施方式中，用約10 mcg/ml的測試干擾素或rSIFN-co處理所述癌細胞。在一些實施方式中，用所述測試干擾素或rSIFN-co處理癌細胞約5、15、30、60、120和/或240分鐘。在一些實施方案中，在用干擾素處理後，收集細胞蛋白用於蛋白質印跡分析。在一些實施方式，GAPDH用作對照。

[0116] 在一些實施方式中，可以使用任何常規的方法且不限於在此披露的方法，來進行用於建立與rSIFN-co或rSIFN-co替代物的等效性或相對其效力的待測測試或活性。

【圖式簡單說明】

[0117] 圖1顯示實施例1中所描述的在開始處理之後21天的期間中人肝癌腫瘤SMMC-7721在裸鼠中的生長曲線，用平均相對腫瘤體積(RTV)表示，各個組用MMC(5 mg/kg)或0.15 mg/小鼠的rSIFN-co或0.10 mg/小鼠的rSIFN-co或0.05 mg/小鼠的rSIFN-co處理、或用賦形劑生理鹽水(NS)(0.15 ml/小鼠)注射。

[0118] 圖2顯示實施例2中所描述的在28天處理期間的人宮頸腫瘤在裸鼠中的生長曲線，用RTV表示，各個組用MMC(5 mg/kg)或0.15 mg/小鼠的rSIFN-co或0.10 mg/小鼠的rSIFN-co或0.05 mg/小鼠的rSIFN-co處理、或用賦形劑生理鹽水(0.15 ml/小鼠)注射。

[0119] 圖3顯示實施例3中所描述的在28天處理期間的人結腸腫瘤HT-29在裸鼠中的生長曲線，用RTV表示，各個組用MMC(5 mg/kg)或0.15 mg/小鼠的rSIFN-co或0.10 mg/小鼠的rSIFN-co或0.05 mg/小鼠的rSIFN-co處理、或0.15 mg/小鼠的IFN α -2b、或用賦形劑生理鹽水(0.15 ml/小鼠)注射。

[0120] 圖4顯示實施例4中所描述的在21天處理期間的人肺腫瘤SPC-A4在裸鼠中的生長曲線，用RTV表示，各個組用MMC(5 mg/kg)或0.15 mg/小鼠的rSIFN-co或0.10 mg/小鼠的rSIFN-co或0.05 mg/小鼠的rSIFN-co處理、或0.15 mg/小鼠的IFN α -2b、或用賦形劑生理鹽水(0.15 ml/小鼠)注射。

[0121] 圖5顯示在用0、0.2、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25、

50和100 mcg/ml (μ g/ml) 濃度的rSIFN-co或IFN α -2b處理48小時後針對不同腫瘤細胞的生存力的劑量反應曲線。測試的細胞是：A549肺腫瘤細胞（圖5A）；Hela宮頸腫瘤細胞（圖5B）；CL-1肝腫瘤細胞（圖5C）；Huh-7肝腫瘤細胞（圖5D）；SW480結腸腫瘤細胞（圖5E）；MDA-MB-231乳腺腫瘤細胞（圖5F）；Calu-1肺腫瘤細胞（圖5G）；SMMC-7721肝腫瘤細胞（圖5H）；以及PANC-1前列腺腫瘤細胞（圖5I）。結果表示為相對於對照細胞的細胞生存力百分比，並且呈現為至少兩個獨立實驗的均值。

[0122] 圖6是分別顯示在1、2、3、4、5和6的所示天數的處理後，10 mcg/ml 下的IFN α -2b處理和rSIFN-co處理對A549細胞（圖6A）和SW620細胞（圖6B）生存力的作用的生存力曲線。細胞生存力通過MTT法來評測。結果表示為相對於對照細胞的細胞生存力百分比並呈現為至少兩個獨立實驗的均值。
(**p<0.01)

[0123] 圖7是分別顯示與Mock對照（圖7，A列）相比，rSIFN-co處理（圖7，C列）和IFN α -2b處理（圖7，B列）對肺癌細胞A549在3D培養中的4天后群落形成（第一排）（放大100 $\times$ ）和8天后偽足形成（第二排和第三排）（放大400 $\times$ ）的作用的圖片。A列和B列中的黑色箭頭指向由癌細胞突出的偽足。C列中的帶星號箭頭指向沒有偽足的細胞。

[0124] 圖8A-8E是分別顯示與mock對照相比，rSIFN-co處理和IFN α -2b處理對不同的肺癌細胞A549（圖8A）、H1299（圖8B）和H460（圖8C）；和不同的結腸癌細胞HT-29（圖8D）和SW620（圖8E）的 β -聯蛋白/TCF-介導的轉錄活性的作用的直條圖。數值是3次試驗的均值。（*p<0.05, **p<0.01）

[0125] 圖9A和9B是分別顯示與mock對照相比，rSIFN-co處理和IFN α -2b

處理對不同的癌細胞A549、H460、SW620和HT-29中Wnt相關受體或共受體LRP6（圖9A）和FZD6（圖9b）的表達的作用的直條圖（通過相對於GAPDH表達的mRNA水準來測量）。以三組平行進行實驗，結果用mock對照組標準化。

[0126] 圖10A和10B是蛋白質印跡，並分別顯示在分別處理24、48和72小時後，與mock對照相比，rSIFN-co處理和IFN α -2b處理對癌細胞A549（圖10A）和SW480（圖10B）中 β -聯蛋白的蛋白水準的作用。GAPDH表達用作對照。以三組平行進行實驗。

[0127] 圖11A-11D是顯示用rSIFN-co或IFN α -2b處理A549肺癌細胞24小時後，與mock對照相比，作為Wnt信號轉導通路下游的4種基因的相對mRNA表達水準的直條圖：Axin2（圖11A）；CD24（圖11B）；存活蛋白（圖11C）；和ID2（圖11D）。以三組平行進行實驗，並用mock對照組標準化。

[0128] 圖12A-12C是顯示用rSIFN-co或IFN α -2b處理後，與mock對照相比，在不同的腫瘤細胞A549、H460、SW620和HT-29中的3種腫瘤抑制基因DKK-3（圖12A）、BATF2（圖12B）和KLF4（圖12C）的相對mRNA表達水準的直條圖。以三組平行進行實驗，並用mock對照組標準化。

[0129] 圖13A和13B是顯示與Mock對照相比，在用IFN α -2b或rSIFN-co處理後，A549細胞（圖13A）和SW620細胞（圖13B）的腫瘤細胞遷移的直條圖。結果表示為該處理後的單位區域中遷移細胞平均數 $\pm$ SD。（** $p < 0.01$ ）

[0130] 圖14是與Mock對照和5FU處理的細胞相比，在A549細胞（圖14A）和SW620細胞（圖14B）用IFN α -2b或rSIFN-co處理24小時或48小時後，分別用針對半胱天冬酶-3酶原（procaspase-3）、切割的半胱天冬酶-3（cleaved

caspase-3)、半胱天冬酶-8酶原 (procaspase-8)、切割的半胱天冬酶-8 (cleaved caspase-8)、PARP和 β -微管蛋白的特異性抗體進行染色得到的蛋白質印跡。

[0131] 圖15是A549細胞用10 mcg/ml的IFN α -2b (圖15A)、或10 mcg/ml的rSIFN-co (圖15B)處理後，或者Hela細胞用10 mcg/ml的IFN α -2b (圖15C)、或10 mcg/ml的rSIFN-co (圖15D)處理後，用針對P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3和GAPDH的特異性抗體進行染色得到的蛋白質印跡。

[0132] 圖16是顯示與PBS處理的對照相比，在開始處理之後的27天期間，經IFN α -2b或rSIFN-co處理後對腫瘤生長的抑制的腫瘤生長曲線。資料表示為平均腫瘤體積 (mm^3) $\pm$ SD (n=8)。

[0133] 圖17A顯示通過穩態分析 (steady-analysis) 模型分析得到的IFNAR1干擾素受體的親和常數： K_D (IFNAR1-EC/IFN α -2b): $2.835 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ (黑色菱形) 和 K_D (IFNAR1-EC/rSIFN-co): $6.003 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ (黑色圓形)。圖17B顯示了通過動態分析模型分析得到的IFNAR2干擾素受體的親和常數： K_D (IFNAR2-EC/IFN α -2b) $1.843 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 和 K_D (IFNAR2-EC/rSIFN-co): $2.192 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。圖17C是顯示IFN α -2b和rSIFN-co分別對IFNAR1-EC或IFNAR2-EC的受體結合親和力的比較結果的直條圖，表明rSIFN-co/IFNAR1顯示出更強的結合親和力，較IFN α -2b/IFNAR1強約4.72倍，以及rSIFN-co/IFNAR2顯示出較弱的結合親和力，較IFN α -2b/IFNAR2弱約11.9倍。

[0134] 圖18是在用1 ng/ml (最終的測定濃度) rSIFN-co或IFN α -2b處理癌細胞後，用針對P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3、肌動蛋白和GAPDH的特異性抗體進行染色得到的蛋白質印跡，該癌細胞在

處理前分別與1、10或100 ng/ml的B18R重組蛋白溫育，其中所述癌細胞是A549細胞（圖18A）或Hela細胞（圖18B）。

【實施方式】

定義

[0135] 除非另外指出，否則本文使用的科學和技術術語應具有本領域普通技術人員賦予它們的含義或為本領域普通技術人員所通常理解的含義。

[0136] 此外，除非上下文另有規定，否則單數詞將包括複數形式，複數詞將包括單數形式。

[0137] 此外，除非另作說明，本文中使用的術語“或（or）”應指“和/或（and/or）”。

[0138] 本文所用的術語“化合物”應指任何蛋白（包括任何抗體、任何活性抗體片段、和任何二聚體蛋白或多聚體蛋白）、多肽、小分子、和具有一種或更多種生物學活性的其它分子。

[0139] 本文使用的術語“包括（comprise or comprising）”應被廣義解讀且不受限，並應包含“是（is or are）”。

[0140] 本文使用的術語“症狀”和“疾病”可互換使用或者共同使用來指示受試者中的疾病、感染、炎症、癌症、治療引起的副作用、或較差健康狀況的其它成因。

[0141] 本文使用的術語“有效量”應指產生所希望效果，例如用於降低細胞生存力、下調或上調蛋白的表達或活性、或治療疾病或病症的量。

[0142] 本文使用的術語“建立基本等效性”應指進行某一或某些測試來表明基本相同水準的反應、活性、有效性或結果，其在實驗誤差的限制

內（例如±標準差（SD））。

[0143] 本文使用的術語“基本上相同”應指至少約70%相同；任選地，至少約80%相同；進一步任選地，至少約90%相同；更任選地，至少約95%相同。

[0144] 本文使用的術語“在約……的範圍”或“在約……之間的範圍”應指該範圍內的數，以及在此特定範圍內的所有個位和小數點。例如，“在約 4×10^8 IU/mg與約 5×10^8 IU/mg之間的範圍”將包括 4×10^8 IU/mg、 4.1×10^8 IU/mg、 4.2×10^8 IU/mg、 4.3×10^8 IU/mg、 4.4×10^8 IU/mg等，且“8 mcg/ml至20 mcg/ml”應包括9 mcg/ml、10 mcg/ml等。

[0145] 本文使用的術語“包含（include or including）”應理解為是非限制性的，並且涵蓋指定的元素以及非指定的元素。

[0146] 本文使用的術語“干擾素”或“IFN”應指任何天然出現的或人為產生的干擾素，包括題為“複合人白細胞干擾素”的美國專利4,695,623中記載的複合干擾素 α ，以及rSIFN-co。

[0147] 本文使用的術語“干擾素活性”應指作為天然出現的干擾素和rSIFN-co的特徵的一種或更多種生物學活性，例如抗腫瘤活性和/或抗病毒活性。

[0148] 本文使用的術語“rSIFN-co”按照上下文，應指具有如美國專利7,364,724和美國專利7,585,647中記載的多核苷酸序列和氨基酸序列、或其活性片段的蛋白或核酸分子。所述在美國專利7,364,724和美國專利7,585,647中記載的多核苷酸序列和氨基酸序列如下所示：

M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A

1 ATGTGCGACC TGCCGCAGAC CCACTCCCTG GGTAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT
TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P

61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCG
GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E

121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA
GTCCTTCTTA AGCTGCCATT GGTCAAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGGCA AGACGTGCTT

M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E

181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA
TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCCCTGCTT

S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C

241 TCCCTGCTGG AAAAATTCTA CACCGAACTG TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC
AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A

301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT
CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GGCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C

361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC
CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG

A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q

421 GCTTGGGAAG TTGTTCGTGC TGAAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG
CGAACCCCTC AACAAGCACG ACTTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

E R L R R K E (SEQ ID NO:1)

481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGA ATAA (SEQ ID NO:2)

CTTGCAGACG CAGCATTTCT TATT (SEQ ID NO:3)

[0149] 本文使用的術語“rSIFN-co 替代物”應指已經或將要針對rSIFN-co測定其效力並可以在測試化合物效力或活性的確定中出於比較的目的替代rSIFN-co使用的任何化合物。rSIFN-co替代物可以是干擾素或具有干擾素特性的化合物。

[0150] 本文使用的比活性是生物學活性與蛋白質含量之比。該生物學活性可以是任何本領域慣用的相關生物學活性，例如通過中華人民共和國藥典2010版三部附錄X C中公佈的細胞病變抑制法測定的生物學活性。蛋白質含量可通過本領域慣用的任意方法，例如中華人民共和國藥典2010版三部附錄VI B中公佈的Lowry法測定的。

[0151] 本文使用的術語“治療（treatment）”應包括引起疾病的完全或部分痊癒、引起或引發疾病的不進展、改善或降低疾病或病症的嚴重度、防止疾病復發、降低疾病復發的頻率、減少疾病的副作用、使疾病緩解、引起健康狀況改善的總體感覺等。

[0152] 術語“Wnt相關受體或共受體”應包括獨自或共同結合到Wnt家族蛋白以引發細胞中經典Wnt信號轉導通路或非經典Wnt信號轉導通路中的信號轉導的一種或更多種分子。該術語包括，例如LRP6，其是已知與DKK1相互作用的低密度脂蛋白受體相關蛋白6，一種Wnt共受體；和FZD6，其是Wnt信號轉導的受體，據信其是Wnt-4配體的受體。

[0153] 本文使用的術語“Wnt信號轉導活性”是指經由與捲曲蛋白

(Frizzled, FZD) 家族受體以及LRP5/LRP6共受體結合而轉導的Wnt信號轉導級聯反應，引起 β -聯蛋白的釋放及其向細胞核的遷移以進行細胞活化。

[0154] 本文使用的術語“IFNAR1”指Uze等, Cell, 60: 225-234 (1990)克隆的557個氨基酸受體蛋白，如Uze等的第229頁圖5所示，包括409個殘基的胞外域，21個殘基的跨膜域和100個殘基的胞內域。在一些實施方式中，前述術語包括IFNAR1的片段，其包含有IFNAR1的胞外域（EC或ECD）（或EC或ECD的片段）。

[0155] 本文使用的術語“IFNAR2”指Domanski等, J. Biol. Chem., 37: 21606-21611 (1995)克隆的515個氨基酸受體蛋白，如Domanski等的第21608頁圖1所示，包括217個殘基的胞外域，21個殘基的跨膜域和250個殘基的胞內域。在一些實施方式中，前述術語包括IFNAR2的片段，其包含有IFNAR2的胞外域（EC或ECD）（或EC或ECD的片段）。

[0156] 在此通過下列實施例來進一步說明本發明，但是這些實施例並不是意在限制本發明的範圍。可以在存在或不存在沒有具體提及但本領域普通技術人員認為其可用的任何元素、限制的情況下實踐本發明。此外，除非另外指出，文中本發明的描述並不意在成為限制，而應該解讀為包括本領域普通技術人員理解的所描述特徵、元素或限制或其部分的等同物或修改。應當理解的是，鑒於本文提供的總體描述，可以實踐各種其它實施方式。結合附圖，根據上述內容，並基於具體描述和實施例以及所附請求項，本發明的其它目的、特徵和有利之處對於本領域技術人員將是顯而易見的。

[0157] 所有資料都表示為均值±標準差（SD）。應用t檢驗（以及非參數檢驗）來分析不同變數之間的關係。當 $p < 0.05$ 時，呈現統計顯著性。

實施例1. rSIFN-co對於人肝癌的活性

[0158] 使用人肝癌SMMC-7721作為模型進行本研究，以證明rSIFN-co在體內系統中對人肝癌的活性和效力。將測試物rSIFN-co的活性與絲裂黴素C（“MMC”）的活性進行比較。藥物rSIFN-co是無色液體，濃度為1 mg/ml，由四川輝陽生命工程股份有限公司（中國成都）提供。使用測試物而不經稀釋。將其存儲在4℃直至解凍用於注射。絲裂黴素C（“MMC”），批號505 AGB，濃度為2 mg/瓶，由Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.（日本）提供。MMC在注射時用生理鹽水稀釋。

[0159] 根據美國國立衛生研究院（NIH）試驗動物的護理和使用指南，進行動物實驗。

[0160] 使用的動物為4-6周齡雄性BALB/cA nu/nu鼠，稱重為約 23 ± 2 g，得自上海藥物研究所（中國上海）。研究方案由上海藥物研究所動物使用和護理委員會審閱，以符合規章制度，在研究開始前得到委員會批准。盡可能地將研究中所用的流程設計為避免或最小化動物的不適感、痛苦和疼痛。根據規定，經歷嚴重或慢性且不能緩解的疼痛或痛苦的動物經無痛方式安樂死。將6只動物圈養在一個籠內。這些動物通過耳朵打孔識別法進行耳標。室溫保持在 $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。光照設定為12小時照明，12小時黑暗。以自由採食方式供應食物。以自由飲水方式通過水瓶向動物提供經5微米（ μm ）篩檢程式過濾的城市自來水。研究人員和輝陽生命工程股份有限公司均認為沒有任何干擾或影響本發明意向和目的的食品污染或水污染。

[0161] 測試物（rSIFN-co）和賦形劑對照各自進行瘤內（i.t.）給藥。根據動物的分組，以每種處理每只小鼠0.05 ml-0.15 ml的體積施用測試物。MMC

以10微升 (μl) /g靜脈 (i.v.) 給藥。以每只小鼠0.15 ml的體積注射生理鹽水，用作賦形劑對照。

[0162] 將動物隨機分配到處理組。初始時，所有動物都安置在一個大的動物籠中。為分組進行研究，它們在之後被分開進行飼養，每處理組每籠6只動物。各個組的劑量和給藥方案記載在表1中。組1和組2是對照組，在第一次處理後每隔一天對各只動物施用賦形劑。組3的動物在開始處理後的第1天和第6天以5 mg/kg的劑量給予MMC。組4、組5和組6的動物在第一次處理後分別以0.15 mg/小鼠 (組4)、或0.10 mg/小鼠 (組5) 或0.05 mg/小鼠 (組6) 每隔一天給予rSIFN-co。在研究的過程中，通過一周兩次地測量各個腫瘤的長和寬來監測腫瘤生長。在研究的過程中，還對各只動物進行每週兩次稱量。

[0163] 通過向各只小鼠中皮下 (s.c.) 接種 5×10^6 個細胞，在各只動物建立腫瘤，即人肝癌SMMC-7721異種移植物。在研究開始前，異種移植物在裸鼠中傳代兩次。在無菌條件下，將生長良好的腫瘤切割成 1.5 mm^3 的片段，通過套針將一個這樣的片段注射到各只研究動物的右側腹。當腫瘤達到 100 mm^3 - 200 mm^3 的體積時，將小鼠隨機分成對照組或處理組，各個組以表1所記載的劑量和排程接受賦形劑 (組1和組2)、rSIFN-co (組4、組5和組6) 或MMC (組3)，持續3周。用千分卡尺來測量各個腫瘤尺寸 (長和寬)，每週兩次。使用公式 $V = (\text{長} \times \text{寬}^2) / 2$ 來計算腫瘤體積 (V)。各個相對腫瘤體積 (RTV) 使用公式 $\text{RTV} = V/V_0$ 來計算，其中 V_t 是在測量當天的腫瘤體積，而 V_0 是第一次處理當天的腫瘤體積。測試物或對照物的治療效果以T/C (%) 和抑制%表示，T/C (%) 使用公式： $\text{T/C} (\%) = (\text{處理組的平均RTV} / \text{對照組的平均RTV}) \times 100\%$

RTV) ×100%；抑制%使用公式：抑制%=100%-T/C%。

表 1. 實施例 1 的劑量水準和組別

組	n	處理	劑量	給藥日程
1	6	賦形劑	NA	每隔一天
2	6	賦形劑	NA	每隔一天
3	6	MMC	5 mg/kg	第 1 天和第 16 天
4	6	rSIFN-co	0.15 mg/小鼠	每隔一天
5	6	rSIFN-co	0.10 mg/小鼠	每隔一天
6	6	rSIFN-co	0.05 mg/小鼠	每隔一天

[0164] 結果示於表2和圖1中。表2顯示對於各個處理組的第0天的初始腫瘤尺寸、第21天的最終腫瘤尺寸以及所計算的平均RTV、T/C%和抑制%。

表 2. rSIFN-co 對人肝癌 SMMC-7721 的活性

處理	TV (mm ³ , 均值±SD) (D0)	TV (mm ³ , 均值±SD) (D21)	RTV (均值±SD)	T/C (%)	抑制 %	P 值
生理鹽水 (12 只小鼠)	129±26	1172±302	9.36±3.9			
MMC	125±35	621±247	5.05±2.1*	52.82	47.18	p<0.05
0.15 mg rSIFN-co	123±20	505±226	4.13±1.9**	43.20	56.80	p<0.01
0.10 mg rSIFN-co	124±15	573±287	4.57±2.3*	47.80	52.20	p<0.05
0.05 mg rSIFN-co	124±26	592±139	4.97±1.7*	51.99	48.01	p<0.05

[0165] 表2顯示rSIFN-co在所有的3個測試劑量下有活性且有效地抑制人肝癌細胞的生長。對於第21天 (D21) 的平均RTV，賦形劑對照組為9.36±3.9，MMC處理組為5.05±2.1，0.15 mg rSIFN-co處理組為4.13±1.9，0.10 mg rSIFN-co

處理組為 4.57 ± 2.3 ，且0.05 mg rSIFN-co處理組為 4.97 ± 1.7 。在第21天（D21）的抑制%：MMC處理組為47.18%，0.15 mg rSIFN-co處理組為56.80%，0.10 mg rSIFN-co處理組為52.20%，且0.05 mg rSIFN-co處理組為48.01%。各個處理組與賦形劑對照組之間的RTV差異被確定為是統計學顯著的。

[0166] 圖1顯示對於各個處理組在21天的研究期間，人肝癌SMMC-7721在裸鼠中的生長進程（由RTV表示），呈現出在開始處理之後第3、7、10、14、17和21天的腫瘤測量結果。結果顯示在第7天之前在各個MMC處理組和rSIFN-co處理組中腫瘤生長的延遲，並保持到第21天。結果還顯示出在更高的rSIFN-co劑量下更大的抑制趨勢。

[0167] 所有用測試物處理的動物都較好地耐受測試劑量，沒有毒性或體重減輕的跡象。賦形劑組、MMC處理組、0.15 mg rSIFN-co處理組、0.10 mg rSIFN-co處理組和0.05 mg rSIFN-co處理組的動物的平均體重（以克計）在第0天（和第21天）分別為：22.7（24.8）；23.9（25.4）；23.7（25.3）；24.3（26.2）；和22.6（24.4）。

實施例 2. rSIFN-co 對人宮頸癌的活性

[0168] 該研究使用Hela細胞作為模型證實rSIFN-co對於人宮頸腫瘤治療的活性和效力。結果顯示，rSIFN-co有活性並且有效抑制人宮頸癌細胞的生長。如實施例1進行該研究，除了另外具體指出的那些。首先以與實施例1中相似的方式通過在裸鼠中皮下接種 5×10^6 個Hela細胞並使生長良好的異種移植物在裸鼠中傳代兩次，建立並製備人宮頸癌異種移植物。之後，製備 1.5 mm^3 片段以s.c.方式植入到動物中。動物的體重在給藥初始時平均為

19±2g。與實施例1相比，使用的動物均為雌性。各個處理組的劑量和給藥方案與實施例1相似，不同在於在第0天開始處理之後的第1和13天注射MMC，且研究在開始處理後持續28天。

[0169] 結果顯示在表3和圖2中。表3顯示計算出的第0天和第28天的平均TV，以及計算出的平均RTV、T/C(%)和抑制%。對於第28天(D28)的RTV，賦形劑對照組是12.45±4.46，MMC處理組為4.97±1.85，0.15 mg rSIFN-co處理組為7.42±1.91，0.10 mg rSIFN-co處理組為6.64±2.04，及0.05 mg rSIFN-co處理組為6.64±1.60。對於第28天的抑制%，MMC處理組為60.08%，0.15 mg rSIFN-co處理組為40.40%，0.10 mg rSIFN-co處理組為46.67%，及0.05 mg rSIFN-co處理組為46.67%。與MMC處理組、0.15 mg rSIFN-co處理組、0.10 mg rSIFN-co處理組和0.05 mg rSIFN-co處理組對應的T/C(%)分別為39.92%、59.60%、53.33%和53.33%。各個處理組與賦形劑對照組之間的RTV差異被確定為是統計學顯著的。結果顯示，rSIFN-co有效抑制測試動物中人宮頸癌的生長。

表3. rSIFN-co對人宮頸癌Hela異種移植物的活性

處理	TV (mm ³ , 均值±SD) (D0)	TV (mm ³ , 均值±SD) (D28)	RTV (均值±SD)	T/C (%)	抑制 %	P 值
生理鹽水(12只小鼠)	138± 25	1720± 756	12.45±4.46			
MMC	130± 28	676± 358	4.97± 1.85**	39.92	60.08	p<0.01
0.15 mg rSIFN-co	136± 25	1025± 400	7.42± 1.91*	59.60	40.40	p<0.05
0.10 mg rSIFN-co	135± 28	865± 186	6.64±2.04**	53.33	46.67	p<0.01
0.05 mg rSIFN-co	135± 26	886± 232	6.64±1.60**	53.33	46.67	p<0.01

[0170] 圖2顯示在28天研究期間各個處理組的RTV進展，反映出在開始處理之後第4、7、11、14、18、21、25和28天做出的腫瘤測量。結果顯示在第7天之前在各個MMC處理組和rSIFN-co處理組中人宮頸腫瘤生長的延遲，並保持到第28天。

[0171] 研究中的所有動物均耐受rSIFN-co處理，沒有毒性跡象。在28天的處理期間觀察到極小的平均體重變化。

實施例 3. rSIFN-co 對人結腸癌的活性

[0172] 使用HT-29作為模型進行該研究來證實rSIFN-co對於人結腸癌治療的活性和效力。結果顯示，rSIFN-co有活性並且有效抑制人結腸癌細胞的生長。如實施例1進行該研究，除了另外具體指出的那些。首先以與實施例1中相似的方式通過在裸鼠中皮下接種 5×10^6 個HT-29細胞並使生長良好的異種移植物在裸鼠中傳代兩次，建立並製備人結腸癌異種移植物。之後，製備 1.5 mm^3 片段以s.c.方式植入到測試動物中。動物的體重在給藥初始時平均為 $20 \pm 2 \text{ g}$ 。與實施例1相比，在該研究中使用的動物均為雌性。各個處理組的劑量和給藥方案同實施例1所記載，不同在於在第1天和第10天對組3施用MMC，且增加額外的組，即組7，該組的各只小鼠用體積為 0.15 ml 且劑量為 0.15 mg /小鼠的IFN α -2b進行處理，如rSIFN-co處理組一樣每隔一天進行，處理共執行4周。濃度為 1.41 mg/ml 的IFN α -2b由輝陽生命工程股份有限公司提供。結果顯示在表4和圖3中。

表4. rSIFN-co對人結腸癌HT-29異種移植物的活性

處理	TV (mm ³ , 均值 ±SD) (D0)	TV (mm ³ , 均值 ±SD) (D28)	RTV (均值 ±SD)	T/C (%)	抑制 %	P 值
生理鹽水 (12 只小鼠)	131±23	1107±424	8.41±2.82			
MMC (5 mg/kg)	132±22	395±95	3.12± 1.19***	37.10	62.9	p<0.001
rSIFN-co 0.15 mg	131±36	570±144	4.51± 1.25**	53.63	46.37	p<0.01
rSIFN-co 0.10 mg	128±39	541±196	4.22±0.87**	50.18	49.82	p<0.01
rSIFN-co 0.05 mg	130±26	416±166	3.28±1.25***	39	61	p<0.001
IFN α -2b 0.15 mg	128±44	831±420	6.26±1.43	74.44	25.56	p>0.05

[0173] 表4顯示計算出的第0天初始平均TV和第28天最終平均TV，以及計算出的平均RTV、T/C (%)和抑制%。對於第28天 (D28) 的RTV，賦形劑對照組為8.41±2.82，MMC處理組為3.12±1.19，0.15 mg rSIFN-co處理組為4.51±1.25，0.10 mg rSIFN-co處理組為4.22±0.87，0.05 mg rSIFN-co處理組為3.28±1.25，及IFN α -2b處理組為6.26±1.43。對於第28天的抑制%，MMC處理組為62.9%，0.15 mg rSIFN-co處理組為46.37%，0.10 mg rSIFN-co處理組為49.82%，0.05 mg rSIFN-co處理組為61%，及IFN α -2b處理組是25.56%。與MMC處理組、0.15 mg rSIFN-co處理組、0.10 mg rSIFN-co處理組、0.05 mg rSIFN-co處理組以及IFN α -2b處理組對應的T/C (%)分別為37.10%、53.63%、50.18%、39.00%和74.44%。結果顯示，rSIFN-co比IFN α -2b更有效地抑制人結腸癌細胞的生長。各個處理組與賦形劑對照組之間的RTV差異被確定為是統計學顯著的。

[0174] 圖3顯示在28天研究期間各個處理組的由RTV表示的對人結腸腫瘤生長的抑制，反映出在開始處理之後的第3、7、10、14、17、21、24和28天做出的腫瘤測量。結果顯示在第7天之前在各個MMC處理組和rSIFN-co處理組中人結腸腫瘤生長的延遲，並保持到第28天。3種劑量的rSIFN-co均引起比IFN α -2b更強的腫瘤生長抑制。

[0175] 同實施例1和2，所有rSIFN-co處理的動物均耐受所測試的劑量，且沒有顯示出藥物毒性跡象，並顯示出最小化的體重變化。

實施例4. rSIFN-co對人肺癌的活性

[0176] 使用SPC-A4作為模型進行該研究來證實rSIFN-co對於人肺癌治療的活性和效力。結果顯示，rSIFN-co對人肺腫瘤生長有顯著抑制，並且rSIFN-co比IFN α -2b有效得多。如實施例3進行該研究，除了另外具體指出的那些。首先以與實施例1中相似的方式建立並製備用於注射到測試動物中的人異種移植物，不同在於通過在裸鼠中皮下（s.c.）接種 2.5×10^6 個SPC-A4細胞並使生長良好的腫瘤在裸鼠中傳代兩次。之後，使用 1.5 mm^3 片段以s.c.方式將其植入到測試動物中。動物的體重在給藥初始時平均為 $22 \pm 2 \text{ g}$ 。與實施例3相比，在該研究中使用的動物均為雄性且該研究進行21天處理。各個處理組的劑量和給藥方案同實施例3所記載，不同在於在第1和第6天對組3施用MMC。結果顯示在表5和圖4中。

表5. rSIFN-co對人肺癌SPC-A4異種移植植物在裸鼠中的生長的作用.

處理	TV (mm ³ , 均值 ±SD) (D0)	TV (mm ³ , 均值 ±SD) (D21)	RTV (均值 ±SD)	T/C (%)	抑制 %	P 值
生理鹽水 (12 只小鼠)	168±42	7133±2708	42.54±2.82			
MMC (5 mg/kg)	166±42	1831±540	11.54± 4.37***	27.13	72.87	p<0.001
rSIFN-co 0.15 mg	169±40	2284±653	13.72± 3.96**	32.25	67.75	p<0.01
rSIFN-co 0.10 mg	168±49	2388±1544	14.91±11.19**	35.05	64.95	p<0.01
rSIFN-co 0.05 mg	170±41	2244±1043	15.45±9.07**	36.32	63.68	p<0.01
IFN α -2b 0.15 mg	191±44	4908±2433	27.84±15.51	65.47	34.53	p>0.05

[0177] 圖4顯示在21天研究期間各個處理組的由RTV表示的人肺腫瘤在裸鼠中的生長抑制，反映出在開始處理之後的第4、7、11、14、18、和21天做出的腫瘤測量。結果顯示在第7天之前在各個MMC處理組和rSIFN-co處理組中腫瘤生長的延遲，並保持到研究結束的第21天。直到第11天才在IFN α -2b處理組中觀察到腫瘤抑制。IFN α -2b引起的腫瘤生長抑制低於任一rSIFN-co處理組中的腫瘤生長抑制且不是統計學顯著的(p>0.05)。因此，rSIFN-co比IFN α -2b更有效地抑制人肺癌細胞的生長。

[0178] 同實施例1-3，所有動物均耐受測試物的測試劑量，沒有觀察到毒性或體重減輕的跡象，除0.05 mg rSIFN-co處理組中的一隻小鼠在第17天原因不明地死亡之外。

實施例5. rSIFN-co降低多種人實體癌細胞的生存力

[0179] 細胞培養和試劑。人肺癌細胞系（A549、H1299、H460、Calu-1）、人肝癌細胞系（SMMC-7721、Huh-7、CL-1）、人宮頸癌細胞系（Hela）、人乳腺癌細胞系（MDA-MB-231）、人前列腺癌細胞系（PANC-1）和人結腸癌細胞系（SW620、HT29、SW480）從Shanghai Cell Collection（中國上海）購買。以上細胞系均在Shanghai Cell Collection配置的對應的完全生長培養基中於5%CO₂和37℃下培養，該完全生長培養基含有10%熱失活胎牛血清（Biochrom, Germany），並補充有4 mM穀氨醯胺、50 U/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素。完全生長培養基為：對於A549為F-12K（批號GNM21127；杭州吉諾生物醫藥技術有限公司）；對於SW620和MDA-MB-231為L-15（批號41300-039，GIBCO）；對於SMMC-7721、Hela、Huh-7、CL-1和PANC-1為DMEM（批號C11995，GIBCO）；對於H460、H1299和SW480為RMPI-1640（批號C11875，GIBCO）；對於HT-29為Macro5a（批號M4892，Sigma）；以及對於Calu-1為DMEM+10%FBS。

[0180] 對96孔板以每孔約 5×10^3 個細胞于100 μ l完全培養基中進行鋪板，溫育過夜，之後分別用IFN α -2b或rSIFN-co以100 μ g/ml、50 μ g/ml、25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、6.25 μ g/ml、3.13 μ g/ml、1.56 μ g/ml、0.78 μ g/ml、0.39 μ g/ml和0.20 μ g/ml的濃度處理約48小時，然後收集細胞進行分析。通過SunBio Am-Blue 檢測試劑盒（Cat#: SBAB8025, Shanghai SBO Medical Biotechnology Co., Ltd，中國上海）評測細胞存活率。根據其操作指南，向各孔添加10 μ l的Am-Blue。之後，細胞在5%CO₂和37℃下溫育4小時。在將96孔板搖動30秒之後，通過Thermo Scientific酶標儀（Thermon Fisher Scientific,

Inc., Lowell, MA) 在570 nm和595 nm讀取各個孔的吸光率。如下計算相對細胞生存力：細胞生存力=(處理組(OD₅₇₀-OD₅₉₅)-空白(OD₅₇₀-OD₅₉₅))/(對照組(OD₅₇₀-OD₅₉₅)-空白(OD₅₇₀-OD₅₉₅))×100%，其中對照組是對應的未處理細胞。結果顯示在圖5中，其中腫瘤細胞的生存力表示為相對於未經處理的對照細胞的百分比。各個數據點表示至少兩個獨立實驗的平均值。

[0181] 圖5顯示rSIFN-co或IFN α -2b處理而降低癌細胞的生存力的各個癌細胞系(A)-(I)的劑量反應曲線。(A) A549細胞；(B) Hela細胞；(C) CL-1細胞；(D) Huh-7細胞；(E) SW480細胞；(F) MDA-MB-231細胞；(G) Calu-1細胞；(H) SMMC-7721細胞；(I) PANC-1細胞。

[0182] 結果顯示，即使在最高測試濃度(100 μ g/ml)下，IFN α -2b也對A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、SW480細胞和SMMC-7721細胞的生存力降低沒有效果或幾乎沒有效果。當用100 mcg/ml(μ g/ml)的IFN α -2b處理Huh-7細胞、MDA-MB-231細胞、Calu-1細胞和PANC-1細胞時，觀察到小於50%的生存力降低。相比之下，rSIFN-co能夠在低得多的劑量下以劑量依賴的方式降低腫瘤細胞生存力，對於SW480細胞、MDA-MB-231細胞和PANC-1細胞，在6.25 μ g/ml至12.5 μ g/ml的濃度下，以及對於A549細胞、Hela細胞、CL-1細胞、Huh-7細胞、Calu-1細胞和SMMC-7721細胞，在12.5 μ g/ml至25 μ g/ml的濃度下，達到接近50%的細胞生存力降低。通常而言，rSIFN-co降低細胞生存力的IC₅₀，對於不同的癌細胞在約10 mcg/ml至18 mcg/ml的範圍內。在100 mcg/ml的rSIFN-co下，對於任何癌細胞系都檢測不到細胞生存力。因此，在各個測試濃度下，rSIFN-co均比IFN α -2b更有效地降低腫瘤細胞生存力。

實施例6A. rSIFN-co比IFN α -2b更有效地降低細胞生存力.

[0183] 為證實rSIFN-co降低細胞生存力的能力，將A549和SW620腫瘤細胞（各自為每孔 2×10^3 個細胞于100 μ l完全培養基中）鋪在96孔板上，分別用10 μ g/ml的rSIFN-co或IFN α -2b處理1-6天。以標準MTT法（3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴鹽檢測，Sigma，St. Louis, MO）評測細胞存活率。對於該檢測，向各孔加入約20 μ l的MTT（4 mg/ml）。細胞在37°C下溫育4 小時。之後，仔細移去各孔的上清液，之後向各孔加入等體積（150微升）的二甲亞砒（DMSO）並在搖床上徹底混合15分鐘。用Thermo Scientific酶標儀（Thermo Fisher Scientific Inc., Lowell, MA）在595 nm讀取96孔板的吸光度。相對細胞生存力如下計算：細胞生存力=（處理組（OD₅₉₅）-空白（OD₅₉₅））/（對照組（OD₅₉₅）-空白（OD₅₉₅）） $\times 100\%$ 。

[0184] 結果表示為相對於未經處理的對照細胞的百分比。各個數據點表示至少兩個獨立實驗的均值。如圖6所示，與IFN α -2b相比，rSIFN-co以時間依賴的方式強烈地降低SW620細胞的細胞生存力，而IFN α -2b即使有也只有極弱的時間依賴效果。rSIFN-co的時間依賴性效果對於A549細胞而言，僅在處理的約前三天是明顯的。對於各個細胞系，在各個時間點，rSIFN-co與IFN α -2b之間的效果差異是統計學顯著的（ $p < 0.01$ ）。這些資料顯示出rSIFN-co的時間依賴性的強抗腫瘤效果。

實施例6B. rSIFN-co在體內抑制腫瘤生長

[0185] 根據NIH試驗動物的護理和使用指南來進行該實驗。4-5周齡的雌性BALB/c裸鼠得自上海實驗動物中心（中國上海）。將約 5×10^6 個A549細胞

皮下注射到各只小鼠中以建立異種移植腫瘤。將動物隨機分成三組（每組8只小鼠），並用PBS (1 X PBS, pH 7.2-7.4)、每只小鼠100 μ g/100 μ l的rSIFN-co或每只小鼠100 μ g/100 μ l的IFN α -2b每隔一天進行瘤內處理，共12次。每三天測量一次腫瘤，腫瘤體積如下計算：腫瘤體積 (mm^3) = (長 $\times$ 寬²) / 2。結果顯示在圖16中。資料顯示為均值 $\pm$ SD (n=8)。結果證實，與PBS處理組相比，rSIFN-co可以幾乎完全地抑制所建立腫瘤的生長 ($p < 0.0001$)。然而，IFN α -2b並沒有顯示出明顯的對腫瘤生長的抑制。結果證實，在體內抑制腫瘤生長方面，rSIFN-co比IFN α -2b更有效。

實施例6C. rSIFN-co抑制三維培養體系中腫瘤細胞的群落形成和偽足形成

[0186] 將Matrigel（來自BD Corporation, Cat#: 356234）在4°C冰箱中於冰上解凍過夜，並將24孔板在-20°C冷凍過夜。之後，用150 μ l的1.0 mg/ml的Matrigel塗覆冷凍的24孔板的各孔。之後，將塗覆有Matrigel的24孔板在37°C下溫育20-30分鐘。將肺癌細胞A549胰蛋白酶化並對其計數。在塗覆有Matrigel的孔上接種在含有2%Matrigel以及10 mcg/ml的IFN α -2b或rSIFN-co或者沒有干擾素（作為對照）的條件培養基中的約 5×10^3 個細胞。這些細胞在37°C溫育至少約8天。每3天添加一次約200 μ l的上述條件培養基，以防止培養基變幹。在第4天或第8天，拍照以觀察群落的尺寸和偽足形成。實驗以三組平行進行。

[0187] 結果顯示在圖7中。4天后，發現rSIFN-co處理組（圖7C）比未處理組（圖7A）具有更小的群落。8天后，rSIFN-co處理組不僅具有3組中最小的群落，還發現，在細胞周圍幾乎沒有突出的偽足（圖7C，第2和3排），而

在未處理組（圖7A，第2和3排）和IFN α -2b處理組（圖7B，第2和3排）的細胞中，偽足形成明顯。該實驗表明rSIFN-co不僅可以抑制癌細胞群落的生長，而且可以抑制癌細胞中的偽足形成（轉移必需的特徵）。

實施例7. rSIFN-co對 β -聯蛋白/TCF轉錄活性的抑制

[0188] β -聯蛋白/TCF轉錄報告系統檢測。測定了rSIFN-co對Wnt/ β -聯蛋白信號轉導的體外作用。將癌細胞鋪在96孔板上（每孔 1×10^4 個細胞），並溫育12個小時，之後用100 ng TOPFlash（Millipore Corporation, Billerica, MA, USA）對其進行暫態轉染。為使轉染效率標準化，將細胞與1 ng由SV40啟動子驅動的內參報告基因海腎螢光素酶pRL-SV40（Promega, Madison, WI, USA）共轉染，之後用10 mcg/ml 干擾素rSIFN-co或IFN α -2b處理6小時，或在轉染後不處理作為對照（Mock）。在干擾素處理24小時後，根據製造商的操作指南（Cat#:E1960, Promega），使用雙螢光素酶檢測體系試劑盒來進行螢光素酶檢測。相對螢光素酶活性表示為螢火蟲螢光素酶活性/海腎螢光素酶活性的比率。實驗以三組平行進行。

[0189] 如圖8所示，結果表明，rSIFN-co降低人實體癌細胞中 β -聯蛋白/TCF介導的轉錄活性。在處理24小時後，在三種肺癌細胞（A549、H1299、H460）和兩種結腸癌細胞（HT-29、SW620）中， β -聯蛋白/TCF介導的轉錄活性顯著被rSIFN-co抑制（*， $p < 0.05$ ；**， $p < 0.01$ ）。然而，對於A549細胞、H1299細胞、H460細胞和HT-29細胞，IFN α -2b不存在抑制作用，並且相反地導致了增強作用。

[0190] 簡言之，對照組、IFN α -2b處理組和rSIFN-co處理組的螢火蟲螢光

素酶活性/海腎螢光素酶活性的比率分別爲：(A) 對於A549細胞爲約310、約350和約100；(B) 對於H1299細胞爲約800、約1000和約500；(C) 對於H460細胞爲約450、約500和約280；(D) 對於HT-29細胞爲約300、約600和約200；(E) 對於SW620細胞爲約1500、約1200和約少於100。該研究表明，在抑制Wnt/TCF信號轉導方面，rSIFN-co優於IFN α -2b，因此，其抗腫瘤效果也更優。

實施例8. rSIFN-co降低癌細胞中 β -聯蛋白的蛋白水準

[0191] 將癌細胞A549和Sw480培養至約85%匯合率並放置到6孔板中。細胞分別用10 mcg/ml IFN α -2b或rSIFN-co處理24小時、48小時或72小時，或不處理作爲對照 (Mock)。處理後，收集細胞進行蛋白質印跡，使用其特異性抗體檢測 β -聯蛋白的蛋白水準，以GAPDH作爲內源加樣對照。實驗以三組平行進行重複。

[0192] 蛋白質印跡分析。爲確定多種蛋白的表達，從6孔板收集細胞，並根據製造商的操作指南 (Beyotime, China) 使用提取試劑 (Cat#: P0013) 來提取細胞總蛋白。通過Lowry蛋白檢測試劑盒 (Bio-Rad, USA) 來測定總蛋白濃度。通過十二烷基硫酸鈉-聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS-PAGE) 在10%-12%的膠上分離總蛋白，並將其轉移到0.22或0.45 μ m的PVDF膜上 (Millopore Corporation, Billerica, MA, USA)。用5%脫脂奶、牛血清白蛋白、10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl和0.05%吐溫20在4°C下將膜封閉過夜。然後將封閉的膜與一抗 (1:1000稀釋) 溫育，然後與HRP結合的二抗一起溫育。使用冷光/螢光成像LAS4000系統 (GE Healthcare Life

Sciences, USA) 和super signal west pico化學發光底物試劑盒 (Thermo Scientific, USA) 將印跡視覺化。

[0193] 對於該研究，所使用的一抗是小鼠單克隆 β -聯蛋白抗體 (1:1000; Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA) 和小鼠單克隆GAPDH抗體 (1:2000) (Kangwei Biotechnology, China)。抗小鼠HRP結合二抗 (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, CA) 以1:2000的濃度使用。圖10所示的結果表明，對於A549細胞，在處理2天 (48 小時) 後，rSIFN-co使 β -聯蛋白的蛋白水準巨幅降低。對於這些細胞，在處理3天 (72小時) 後，觀察到進一步的降低。SW480細胞中 β -聯蛋白的蛋白水準降低在用rSIFN-co處理72小時後較為明顯。在肺癌A549細胞和結腸癌SW480細胞中， β -聯蛋白的下調是明顯的時間依賴性的。相比而言，IFN α -2b未引起任何明顯的 β -聯蛋白水準下降，表明其對 β -聯蛋白的下調沒有作用。

實施例9. rSIFN-co引起Wnt通路介導的靶標基因的轉錄下調

[0194] 將肺癌A549細胞接種到6孔板中，並分別用10 μ g/ml的IFN α -2b或rSIFN-co處理，或不處理作為對照 (Mock)。在處理24小時後，使用TRIZOL試劑來分離細胞總mRNA，合成cDNA，並使用4種Wnt信號轉導下游基因Axin2、CD24、存活蛋白和ID2的特異性引子進一步進行qPCR。實驗以三組平行進行，並用Mock組標準化。

[0195] 定量PCR (qPCR) 分析。根據製造商的說明書，使用TRIZOL試劑 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 分離總mRNA。根據製造商的說明書使用RT-PCR試劑盒 (Cat#: FSQ-101, TOYOBO, Japan) 合成互補DNA (cDNA)，之後使

用SYBR Green PCR試劑盒（Cat#: QPK-201，TOYOBO，Japan）進行qPCR。

四種 Wnt 通路靶標基因的引子如下：Axin2 正義引子：5' - CGTGGATACCTTAGACTT-3'（SEQ ID NO:8）和反義引子：5' -GCTGTTGTTCTCAATGTA-3'（SEQ ID NO: 9）；CD24正義引子：5' -TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3'（SEQ ID NO: 10）和反義引子：5' -GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3'（SEQ ID NO: 11）；存活蛋白正義引子：5' -ACCGCATCTCTACATTCAAG-3'（SEQ ID NO: 12）和反義引子：5' -CAAGTCTGGCTCGTTCTC-3'（SEQ ID NO: 13）以及ID2正義引子：5' -CACAACAACAACAAC-3'（SEQ ID NO: 14）和反義引子 5' -CACAGTCCAAGTAAGAGA-3'（SEQ ID NO: 15）。

[0196] 擴增流程如下：95°C 溫育1分鐘，40個迴圈（95°C 15秒，60°C 15秒，72°C 30秒）。使用Bio-Rad檢測系統，即時監測SYBR Green染料結合入PCR產物的情況，接著使用Bio-Rad CFX manager 2.1軟體進行分析。對於各個條件彙集樣品，以兩組平行進行。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比較處理的樣品與Mock，並以倍率變化進行繪圖。GAPDH用作標準化對照。

[0197] 圖11所示的結果表明，rSIFN-co引起Wnt通路介導的靶標基因Axin2、CD24、存活蛋白和ID2的下調。在rSIFN-co處理後這些基因的mRNA水準顯著降低，但在IFN α -2b處理後沒有顯著降低。

[0198] 簡言之，當Mock對照的相對表達水準被設定為1時，對於Axin2基因而言（圖11A），IFN α -2b處理得到稍高於1的水準，而rSIFN-co處理得到約0.4的水準（ $p < 0.0001$ ，將rSIFN-co處理與未處理進行比較）。對於Mock未處理細胞、IFN α -2b處理細胞和rSIFN-co處理細胞，CD24基因的相應水準（圖

11B) 分別為1、約0.9和約0.4 ($p < 0.0001$); 存活蛋白基因的相應水準(圖11C) 分別為1、約0.9和約0.4 ($p < 0.0005$); ID2基因的相應水準(圖11D) 分別為1、約1和約0.4 ($p < 0.0001$)。

實施例10. rSIFN-co能夠下調不同細胞中Wnt相關受體或共受體LRP6/FZD6的 mRNA水準

[0199] 研究rSIFN-co對LRP6/FZD6的調節。如實施例9中進行的，通過qPCR來執行本實施例。將癌細胞A549、H460、SW620和HT-29接種到6孔板中，並用10 μ g/ml的IFN α -2b或rSIFN-co處理，或者不處理作為對照(Mock)。在處理24小時後，使用TRIZOL試劑分離細胞總mRNA，使用LRP6和FZD6的特異性引子對cDNA進行qPCR。使用的引子為，LRP6正義引子：5' -TGAAGAACCAGCACACAGG-3' (SEQ ID NO: 4) 和反義引子：5' -CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3' (SEQ ID NO: 5)，以及FZD6正義引子：5' -GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3' (SEQ ID NO: 6) 和反義引子：5' -TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC-3' (SEQ ID NO: 7)。實驗以三組平行進行，並用Mock對照組標準化。結果記錄為LRP6或FZD6相對於GAPDH的相對mRNA水準。

[0200] 圖9所示的結果表明，在四種癌細胞系中，rSIFN-co使LRP6和FZD6不同程度地下調。圖9A顯示在rSIFN-co處理後A549細胞($p < 0.005$)、SW620 細胞($p < 0.005$)和HT-29細胞($p < 0.005$)中LRP6 mRNA的相對表達有顯著降低，但是在IFN α -2b處理中沒有觀察到顯著降低。圖9B顯示在rSIFN-co處理後在所有4個細胞系A549 ($p < 0.001$)、H460 ($p < 0.0005$)、SW620 ($p < 0.001$)

和HT-29 ($p < 0.0005$) 中FZD6 mRNA的相對表達有顯著降低。另一干擾素IFN α -2b造成HT-29細胞中FZD6 mRNA表達的加強，但是在A549細胞、H460細胞和SW620細胞中引起FZD6 mRNA表達一定程度的降低，儘管未達到與rSIFN-co相同的程度。結果表明，rSIFN-co引起的Wnt信號轉導通路的抑制可能是由Wnt相關的細胞表面受體LRP6和FZD6的表達受抑制而引起。發現rSIFN-co在測試的人癌細胞（例如人肺癌細胞和人結腸癌細胞）中在抑制Wnt通路方面要優於干擾素IFN α -2b，包括對 β -聯蛋白/TCF介導的轉錄活性和 β -聯蛋白蛋白水準以及Wnt信號轉導通路相關受體、共受體和靶標基因的下調。

實施例11. rSIFN-co上調腫瘤抑制基因的表達

[0201] 在本研究中證實rSIFN-co對腫瘤抑制基因的上調作用。將癌細胞A549、H460、SW620和HT-29接種到6孔板中，並用10 mcg/ml的IFN α -2b或rSIFN-co處理，或不處理作為Mock對照。在處理24小時後，使用TRIZOL試劑來分離細胞總mRNA，並合成cDNA，使用DKK3、KLF4和BATF2的特異性引子來進一步進行qPCR。使用以下引子：對於BATF2，正義引子5' -CAGAGCAGGGAGCACAAACC -3' (SEQ ID NO: 16) 和反義引子5' -TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG -3' (SEQ ID NO: 17)；對於DKK3，正義引子5' -GGAGCCTGACTGAAGAGATGG-3' (SEQ ID NO: 18) 和反義引子5' -ACGCCTAAAGCACACACCTG-3' (SEQ ID NO: 19)；對於KLF4，正義引子5' -CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO: 20) 和反義引子5' -GGCTGCTGCGGCGGAATG -3' (SEQ ID NO: 21)。

[0202] 實驗以三組平行進行，並用mock對照組標準化。圖12所示的結果表示為與GAPDH比較的相對mRNA表達水準。對於A549細胞，rSIFN-co處理使所有3種腫瘤抑制基因DKK-3（圖12A）、BATF2（圖12B）和KLF4（圖12C）的表達大幅增高，並且比IFN α -2b有效得多。在SW620細胞中，與對照和IFN α -2b處理相比，在rSIFN-co處理之後KLF4表達的上調也大幅增加。IFN α -2b處理顯著地增加了H460細胞中DKK-3的表達。

實施例12. rSIFN-co抑制癌細胞遷移

[0203] 通過在用IFN α -2b或rSIFN-co處理24小時（與未處理對照（Mock）對比）後，確定肺癌A549細胞和結腸癌SW620細胞穿過微孔膜遷移的能力來證實rSIFN-co抑制腫瘤細胞遷移的能力。使用24孔板中的8 μ m細胞培養插入式小室（Becton-Dickinson Biosciences, NJ, USA）進行細胞遷移檢測。將不含FBS的溫熱（37°C）碳酸氫鹽類培養基加到插入式小室的內部以及孔的底部，並使其在加濕組織培養箱中於37°C、5% CO₂氛下複水約2小時。在複水之後，小心除去培養基。之後，將500 μ l混懸在不含FBS的培養基中的製備細胞（在用10 μ g/ml IFN α -2b或10 μ g/ml rSIFN-co處理後，或完全不做處理）以0.5×10⁴細胞/插入式小室的密度接種到插入式小室濾器的上部。在24孔板的下室置入500 μ l含有10%FBS的完全培養基。在常規培養條件下於37°C，24小時之後，將室膜上部的非遷移細胞用棉拭子除去。培養小室的下部用4%多聚甲醛固定並用2%結晶紫染色。在三組平行孔中的每一個中，對細胞被置入的室膜的相反側的遷移細胞數量進行計數。各個實驗重複至少兩次，每次使用三組平行孔。

[0204] 圖13所示的結果顯示出對於Mock、IFN α -2b處理細胞和rSIFN-co處理細胞各自的單位區域中的遷移細胞平均數量。對於穿膜遷移的A549細胞，在未處理的Mock組中觀察到約30個細胞/區域，在IFN α -2b組中觀察到約110個細胞，在rSIFN-co處理組中觀察到約10個細胞。由IFN α -2b處理造成的遷移增強和由rSIFN-co處理引起的遷移抑制是統計學顯著的 ($p < 0.01$)。使用SW620細胞時也觀察到rSIFN-co引起的顯著抑制。與此相反，IFN α -2b處理導致SW620細胞中腫瘤細胞遷移的增加。因此，rSIFN-co有效抑制腫瘤細胞遷移，並且比IFN α -2b有效得多。

實施例13. rSIFN-co並不是經細胞凋亡通路發揮作用

[0205] 進行本研究以顯示，rSIFN-co通過細胞凋亡通路以外的途徑來發揮降低腫瘤細胞生存力的作用。將腫瘤細胞A549和SW620鋪在6孔板上，溫育過夜並在之後用10 mcg/ml的IFN α -2b或10 mcg/ml的rSIFN-co或5FU處理24小時或48小時，或不處理（作為Mock對照）。之後，通過蛋白質印跡來監測細胞凋亡相關的分子標記物。使用的一抗是小鼠單克隆 β -微管蛋白抗體（1:2000，Cat#: CW0098A）和小鼠單克隆GAPDH抗體（1:2000，Cat#: CW0100A）（Kangwei Biotechnology, China）；小鼠單克隆PARP抗體（1:1000，Cat#: sc-2007，Santa Cruz Biotechnology, Inc.）；兔單克隆半胱天冬酶-3酶原抗體（1:1000，Cat#: 9665）和兔多克隆切割的半胱天冬酶-3抗體（1:1000，Cat#: 9661）（Cell Signaling Technology, USA）；山羊多克隆半胱天冬酶-8酶原抗體（1:1000，Cat#: sc-6136，Santa Cruz Biotechnology, Inc.）；兔單克隆切割的半胱天冬酶-8抗體（1:1000，Cat#: 9496）（Cell Signaling Technology, USA）。

[0206] 對於A549細胞的結果顯示在圖14A中，對於SW620細胞的結果顯示在圖14B中。蛋白質印跡顯示出，在用5FU（已知的導致細胞凋亡的藥物）處理後，細胞的半胱天冬酶-3酶原、半胱天冬酶-8酶原和PARP水準表現出顯著降低，但是表現出切割的半胱天冬酶-3和切割的半胱天冬酶-8的水準增加。相反，干擾素IFN α -2b或rSIFN-co均不造成任何半胱天冬酶-3酶原、半胱天冬酶-8酶原或PARP水準的降低，或引起任何切割的半胱天冬酶-3或切割的半胱天冬酶-8水準的增加。因此，結果表明，這兩種干擾素，特別是rSIFN-co可能是通過細胞凋亡以外的不同機制來造成腫瘤細胞生存力的降低。

實施例14. rSIFN-co引起STAT磷酸化

[0207] 進行該實驗以顯示，rSIFN-co同IFN α -2b一樣利用JAK/STAT信號轉導通路。在本研究中，將A549細胞和Hela細胞分別鋪到3.3 cm的盤中，37℃溫育過夜，之後分別用10 μ g/ml的IFN α -2b或rSIFN-co處理0、5、15、30、60、120和240分鐘。在處理後，收集細胞，提取細胞蛋白並加樣到SDS-PAGE瓊脂糖上進行蛋白質印跡分析，從而觀察STAT1（Tyr701）、STAT2（Tyr690）和STAT3（Tyr705）的磷酸化。GAPDH用作加樣對照。

[0208] 使用的一抗是：STAT1（1:1000，Cat#: 9175S）、Tyr701磷酸化-STAT1（1:1000，Cat#: 9167S）、STAT2（1:500，Cat#: 4594）、Tyr690磷酸化-STAT2（1:1000，Cat#: 441S）、STAT3（1:1000，Cat#: 9132）、Tyr705磷酸化-STAT3（1:1000，Cat#: 9145S）。抗小鼠（Cat#: sc-2005）或抗兔（Cat#: sc-2004）或抗山羊（Cat#: sc-2020）HRP-結合的二抗（Santa Cruz Technology, Santa Cruz,

CA) 以1:2000的濃度使用。使用冷光/螢光成像LAS4000系統 (GE Healthcare Life Sciences, USA) 和super signal west pico化學發光底物試劑盒 (Thermo Scientific, USA) 來對印跡進行視覺化。

[0209] 圖15所示的結果證實，這兩種干擾素，即IFN α -2b和rSIFN-co，在A549細胞和Hela細胞中在STAT1、STAT2和STAT3磷酸化模式上表現相似。因此，rSIFN-co介導的JAK/STAT信號轉導水準與IFN α -2b介導的JAK/STAT信號轉導水準沒有不同，表明rSIFN-co和IFN α -2b可能共用共同的IFNAR1/2受體。

實施例15. rSIFN-co結合IFNAR1和IFNAR2的親和力

[0210] 基於表面等離子共振技術，使用Biacore T100蛋白質相互作用陣列系統 (General Electric HealthCare Co.) 系統測定 IFN α -2b 和 rSIFN-co 對 IFNAR1-EC(Cata:13222-H08H, Sino Biological Inc) 或 IFNAR2-EC(Cata:10359-H08H, Sino Biological Inc)的結合親和力。爲了固定受體亞基，將CM5感測器晶片分別與20 μ g/ml的IFNAR1-EC亞基以及50 μ g/ml的IFNAR2-EC亞基溫育，通過蛋白質中的氨基結合至晶片的羧基葡聚糖表面。然後將兩種待測的干擾素以不同的濃度垂直注射於配體，對於IFN α -2b/IFNAR1結合在100 – 3,000 nM的範圍，對於rSIFN-co/IFNAR1結合在50-1,000 nM的範圍，以及對於它們與IFNAR2的結合在3.125-80 nM的另一範圍，在IFNs/IFNAR2結合期間添加更新的2 M NaCl緩衝液以持續5秒的再活化程式。根據製造商的操作指南分析資料。根據方程式 $K_D = k_d/k_a$ (d:解離; a:結合)由速率常數確定解離常數 K_D 。

[0211] 圖17顯示了rSIFN-co和IFN α -2b的不同的受體結合親和力。在該實驗條件下，可通過穩態分析模型分析得到IFNAR1干擾素受體的親和常數： K_D (IFNAR1-EC/_rSIFN-co): 6.003×10^{-7} mol/L； K_D (IFNAR1-EC/IFN α -2b): 2.835×10^{-6} mol/L (圖17A)；可通過動態分析模型分析得到IFNAR2干擾素受體的親和常數： K_D (IFNAR2-EC/rSIFN-co): 2.192×10^{-8} mol/L； K_D (IFNAR2-EC/IFN α -2b) 1.843×10^{-9} mol/L (圖17B)；關於它們的親和常數的比較結果，與IFN α -2b相比rSIFN-co/IFNAR1顯示更強的結合親和力(4.72倍)(圖17C)。然而，rSIFN-co/IFNAR2的結合親和力則顯示較IFN α -2b弱11.9倍(圖17C)。

實施例 16. 癌細胞中在B18R預處理後rSIFN-co較IFN α -2b引起更高的p-STATs

[0212] 在該研究中，A549和Hela細胞溫育培養過夜。在培養基中製備10倍連續稀釋(1、10和100 ng/ml，最終的測定濃度)的B18R重組蛋白(牛痘病毒編碼的中和I型干擾素受體，也稱為I型干擾素抑制劑，Cat#: 14-8185, eBioscience, Inc)並在室溫下與恒定量(1 ng/ml，最終的測定濃度)的每種IFN蛋白(IFN α -2b和rSIFN-co)混合1小時。將B18R/IFN複合物用於處理上述兩種細胞並溫育30分鐘。然後，收集細胞裂解物，通過蛋白質印跡法來檢測STAT1(Tyr701)、STAT2(Tyr690)和STAT3(Tyr705)的磷酸化。GAPDH和肌動蛋白用作加樣對照。

[0213] 使用的一抗為：STAT1 (1:1000, Cat#: 9175S) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr701磷酸化的-STAT1 (1:1000, Cat#: 9167S) (Cell Signaling

Technology, USA)、STAT2 (1:500-1:1000, Cat#4594) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr690 磷酸化的-STAT2 (1:500-1:1000, Cat#: 441S) (Cell Signaling Technology, USA)、STAT3 (1:1000, Cat#: 9132) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr705磷酸化的-STAT3 (1:1000, Cat#: 9145S) (Cell Signaling Technology, USA)、GAPDH (Cat#: CW0100A, Kangwei biotech, Inc)、b-肌動蛋白(Cat#: CW0096, Kangwei biotech, Inc)。

[0214] 圖18顯示與IFN α -2b組相比，在A549細胞(圖18A)和Hela細胞(圖18B)中於10 ng/ml的抑制劑B18R下，rSIFN-co顯示更高的對STAT1/2/3磷酸化的誘導。

工業應用性

[0215] 本文中描述的方法和檢測試劑盒可用於確定測試化合物例如干擾素的效力，並用於治療因 β -聯蛋白或LRP6、FZD6、Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一種或多種的過度活躍或過表達，或者DKK3、BATF2、或KLF4的下調而受到不利影響的某些疾病或病症。

【符號說明】

(無)

【序列表】

<110> 英屬維爾京群島商遠東超級實驗室有限公司 (SUPERLAB FAR EAST LIMITED)

<120> 鑒定對腫瘤具有直接抑制作用的干擾素的方法及其用途

<140> TW 105114582
<141> 2016-05-11

<150> US 62/160,006
<151> 2015-05-12

<160> 21

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 167
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 重組干擾素的氨基酸序列

<400> 1
Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu
100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

<210> 2
<211> 504
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼重組干擾素的核苷酸序列

<400> 2
atgtgcgacc tgccgcagac ccactccctg ggtaaccgtc gtgctctgat cctgctggct 60
cagatgcgtc gtatctcccc gttctcctgc ctgaaagacc gtcacgactt cggtttcccg 120
caggaagaat tcgacggtaa ccagttccag aaagctcagg ctatctccgt tctgcacgaa 180
atgatccagc agaccttcaa cctgtttctcc accaaagact cctccgctgc ttgggacgaa 240
tccctgctgg aaaaattcta caccgaactg taccagcagc tgaacgacct ggaagcttgc 300
gttatccagg aagttggtgt tgaagaaacc ccgctgatga acgttgactc catcctggct 360
gttaaaaaat acttccagcg tatcaccttg tacctgaccg aaaaaaata ctccccgtgc 420
gcttggaag ttgttcgtgc tgaaatcatg cgttccttct cctgtccac caacctgcag 480
gaacgtctgc gtcgtaaaga ataa 504

<210> 3
<211> 504
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 編碼重組干擾素的核苷酸序列

<400> 3
tacacgtgg acggcgtctg ggtgaggac ccattggcag cacgagacta ggacgaccga 60
gtctacgcag catagagggg caagaggacg gactttcttg cagtgtgaa gccaaagggc 120
gtccttctta agctgccatt ggtcaaggtc ttctgagtc gatagaggca agacgtgctt 180
tactaggtcg tctggaagtt ggacaagagg tggtttctga ggaggcgacg aacctgctt 240

agggacgacc tttttaagat gtggcttgac atggtcgtcg acttgctgga ccttcgaacg 300
caataggtcc ttcaaccaca acttcctttgg ggcgactact tgcaactgag gtaggaccga 360
caatttttta tgaaggtcgc atagtgggac atggactggc ttttttttat gaggggcacg 420
cgaacccttc aacaagcacg actttagtagt gcaaggaaga gggacaggtg gttggacgtc 480
cttgcaagacg cagcatttct tatt 504

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正義引子

<400> 4
tgaagaacca gcaccacagg 20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義引子

<400> 5
cataaccaag aggcacagaa gc 22

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正義引子

<400> 6
gcggagtgaa ggaaggatta gtc 23

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義引子

<400> 7
tgaacaagca gagatgtgga acc 23

<210>	8	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正義引子	
<400>	8	
	cgtggatacc ttagactt	18
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義引子	
<400>	9	
	gctgttggttc tcaatgta	18
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正義引子	
<400>	10	
	tgaagaacat gtgagaggtt tgac	24
<210>	11	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義引子	
<400>	11	
	gaaaactgaa tctccattcc acaa	24
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正義引子	

<400> 12
accgcatctc tacattcaag

20

<210> 13
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義引子

<400> 13
caagtctggc tcgttctc

18

<210> 14
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正義引子

<400> 14
cacaacaaca acaacaac

18

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反義引子

<400> 15
cacagtccaa gtaagaga

18

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 正義引子

<400> 16
cagagcaggg agcacaaacc

20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>		
<223>	反義引子	
<400>	17	
	tgagcagagg agagcagagg	20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正義引子	
<400>	18	
	ggagcctgac tgaagagatg g	21
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義引子	
<400>	19	
	acgcctaaag cacacacctg	20
<210>	20	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	正義引子	
<400>	20	
	ccttcaacct ggcggacatc aac	23
<210>	21	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	反義引子	
<400>	21	
	ggctgctgcg gcggaatg	18

申請專利範圍

1. 一種對測試干擾素相對於重組高效複合干擾素(rSIFN-co)的效力進行確定或比較或建立測試干擾素與rSIFN-co間的等效性的方法，其包括以下步驟：

- (1) 提供相同類型之癌細胞的一第一樣本、一第二樣本及一第三樣本；
- (2) 以該測試干擾素處理該第一樣本，以 rSIFN-co 處理該第二樣本，及將該第三樣本作為對照樣本；以及
- (3) 測定在該第一、第二及第三樣本中該測試干擾素與 rSIFN-co 結合干擾素 α 及 β 受體亞基 1 (IFNAR1)與干擾素 α 及 β 受體亞基 2 (IFNAR2)的親和力；

其中該第一及第二樣本間結合 IFNAR1 的相似親和力以及該第一及第二樣本間結合 IFNAR2 的相似親和力表示該測試干擾素及該 rSIFN-co 之間是等效的。

2. 如請求項 1 所述的方法，其中該等癌細胞包括如下的任一種或更多種：肺癌細胞、結腸癌細胞、宮頸癌細胞、肝癌細胞、乳腺癌細胞和前列腺癌細胞。

3. 如請求項 1 所述的方法，其中該等癌細胞包括 HT-29 細胞。

4. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素與含有 IFN α -2b 的該第三樣本相比具有高 2、3、4 或 4.5 倍的結合 IFNAR1 的親和力。

5. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素與含有 IFN α -2b 的該第三樣本相比具有低 5、7、9 或 11 倍的結合 IFNAR2 的親和力。

6. 如請求項 1 所述的方法，其中藉由解離常數(K_D)來確定結合 IFNAR1 或 IFNAR2 的親和力。

7. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素具有與 SEQ ID NO: 1 有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

8. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素是由與 SEQ ID NO: 2 有至少 90% 同一性的核苷酸序列所編碼。

9. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素與 rSIFN-co 具有相同的 SEQ ID NO: 1 之氨基酸序列，且其等是由相同的 SEQ ID NO: 2 之核苷酸序列所編碼。

10. 如請求項 1 所述的方法，其中該測試干擾素與 rSIFN-co 具有相同的比活性。

11. 如請求項 10 所述的方法，其中該比活性在 4×10^8 IU/mg 至 1×10^9 IU/mg 的範圍內。

圖式

圖 1

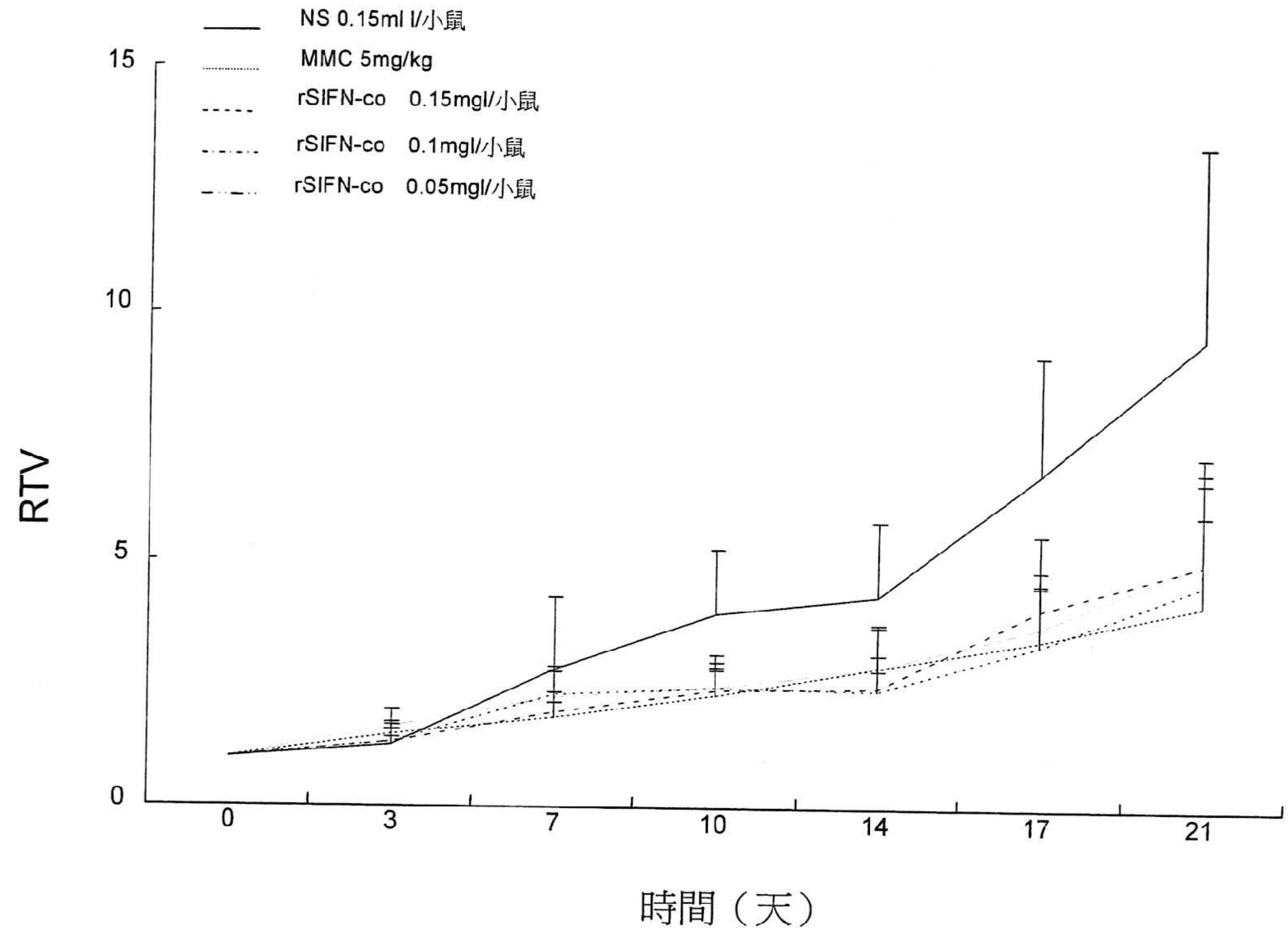


圖 2

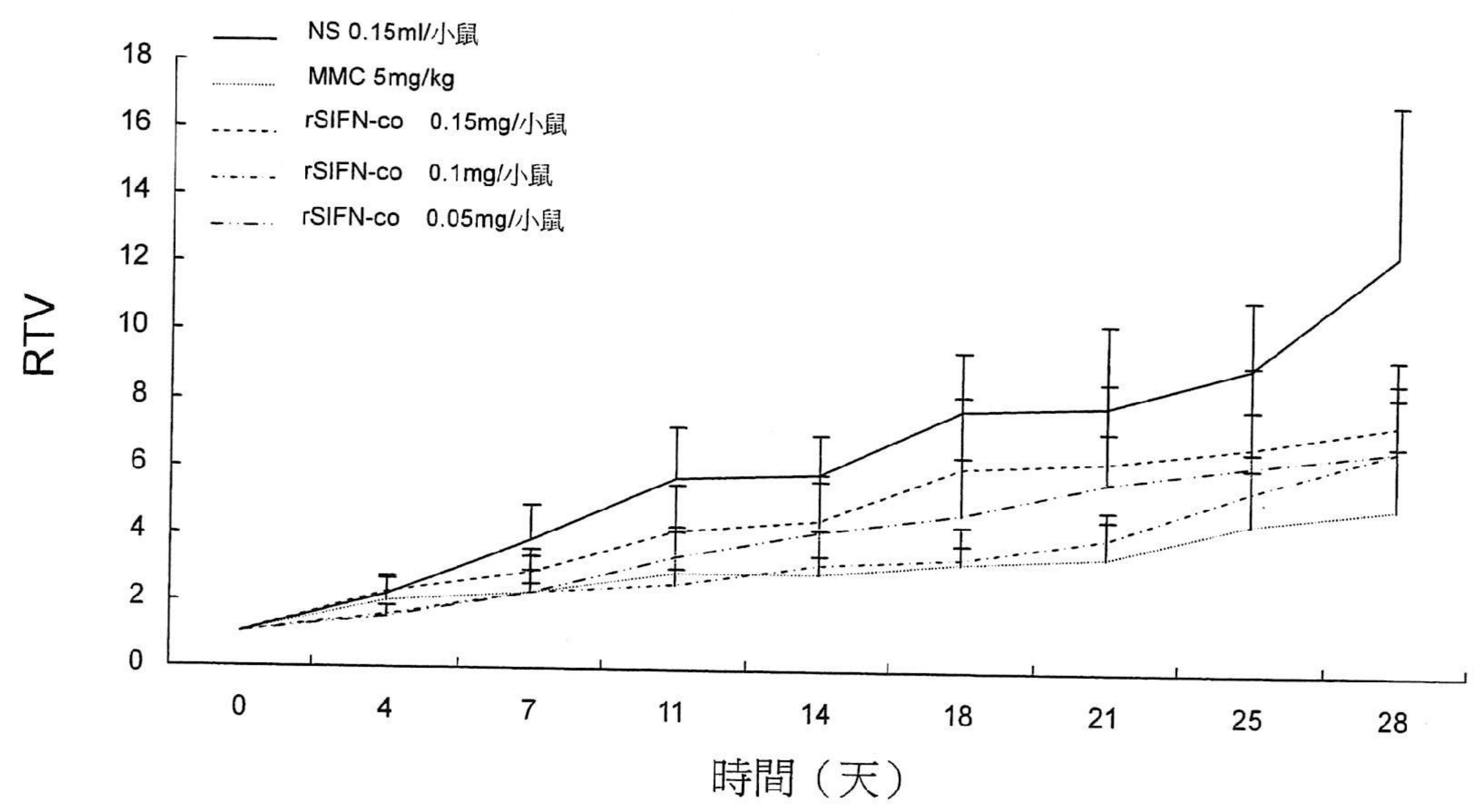


圖 3

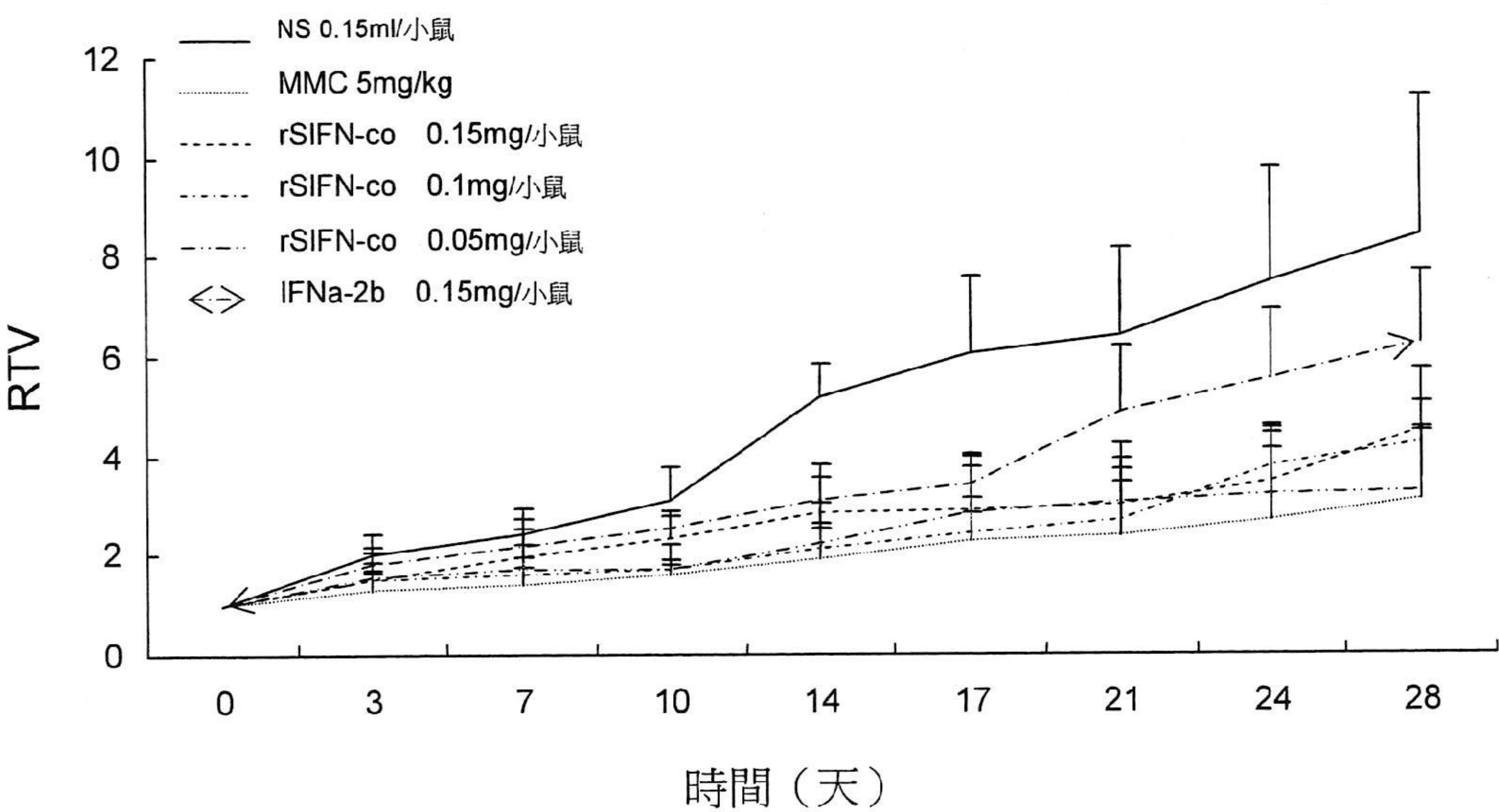


圖 4

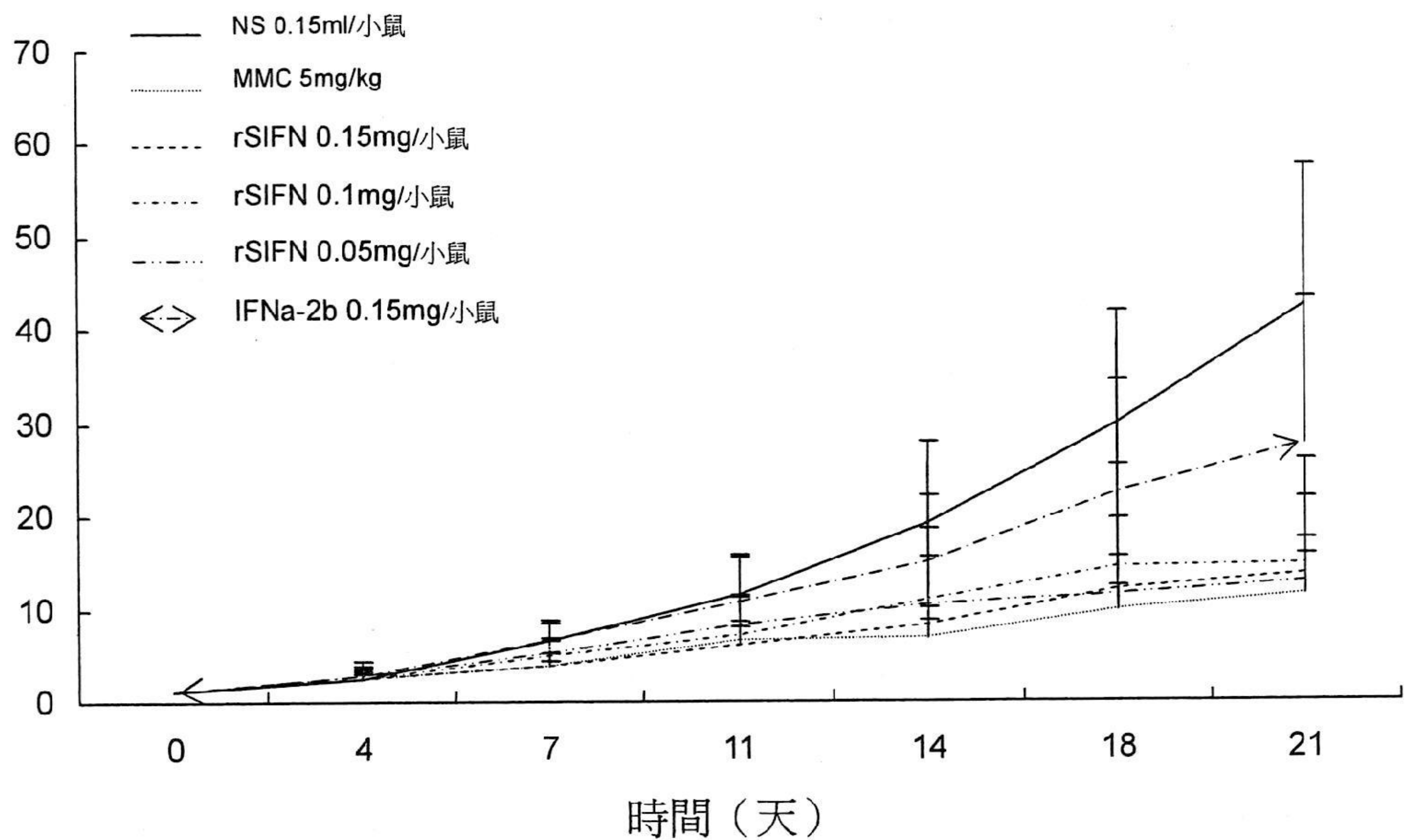


圖 5A

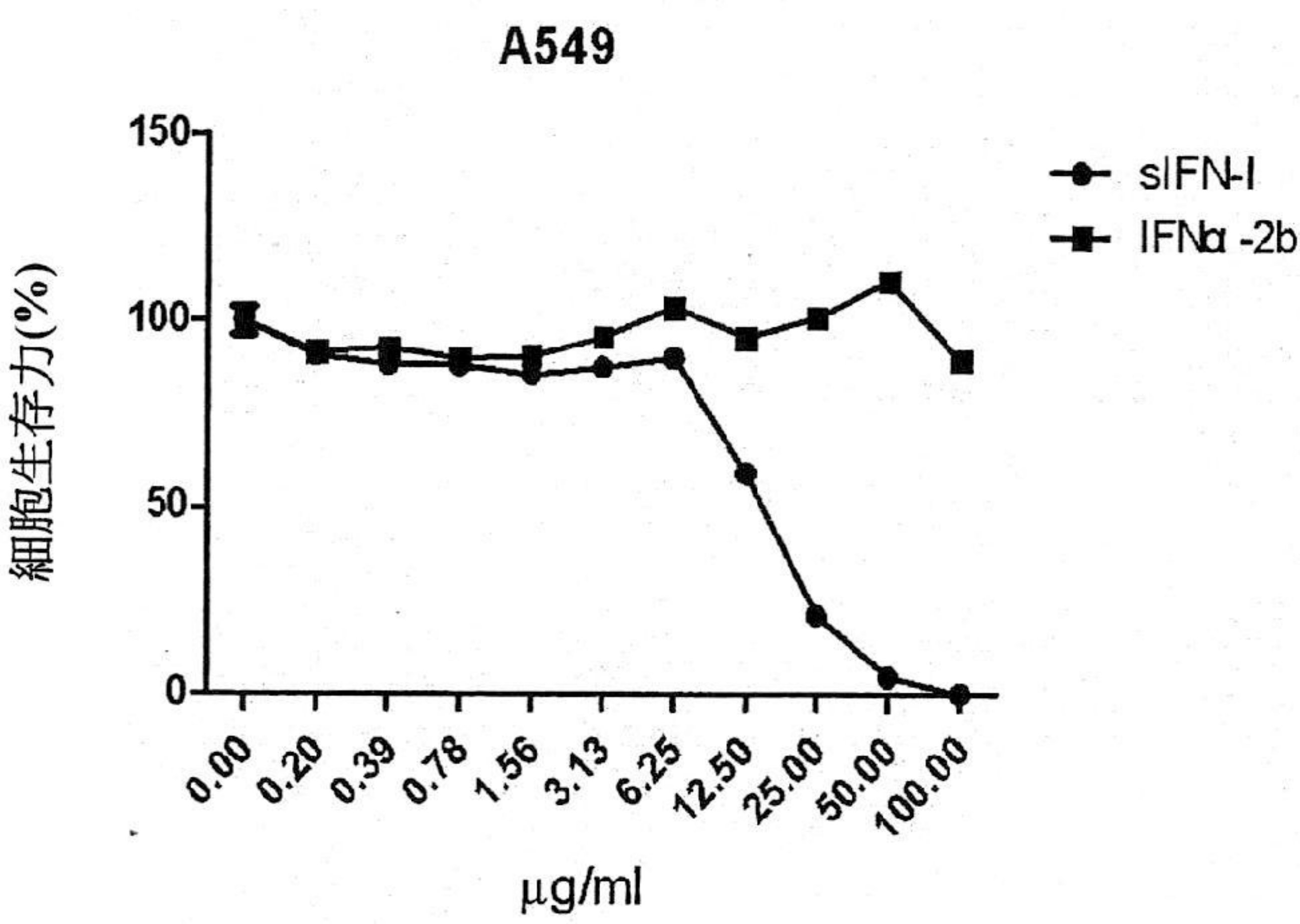


圖 5B

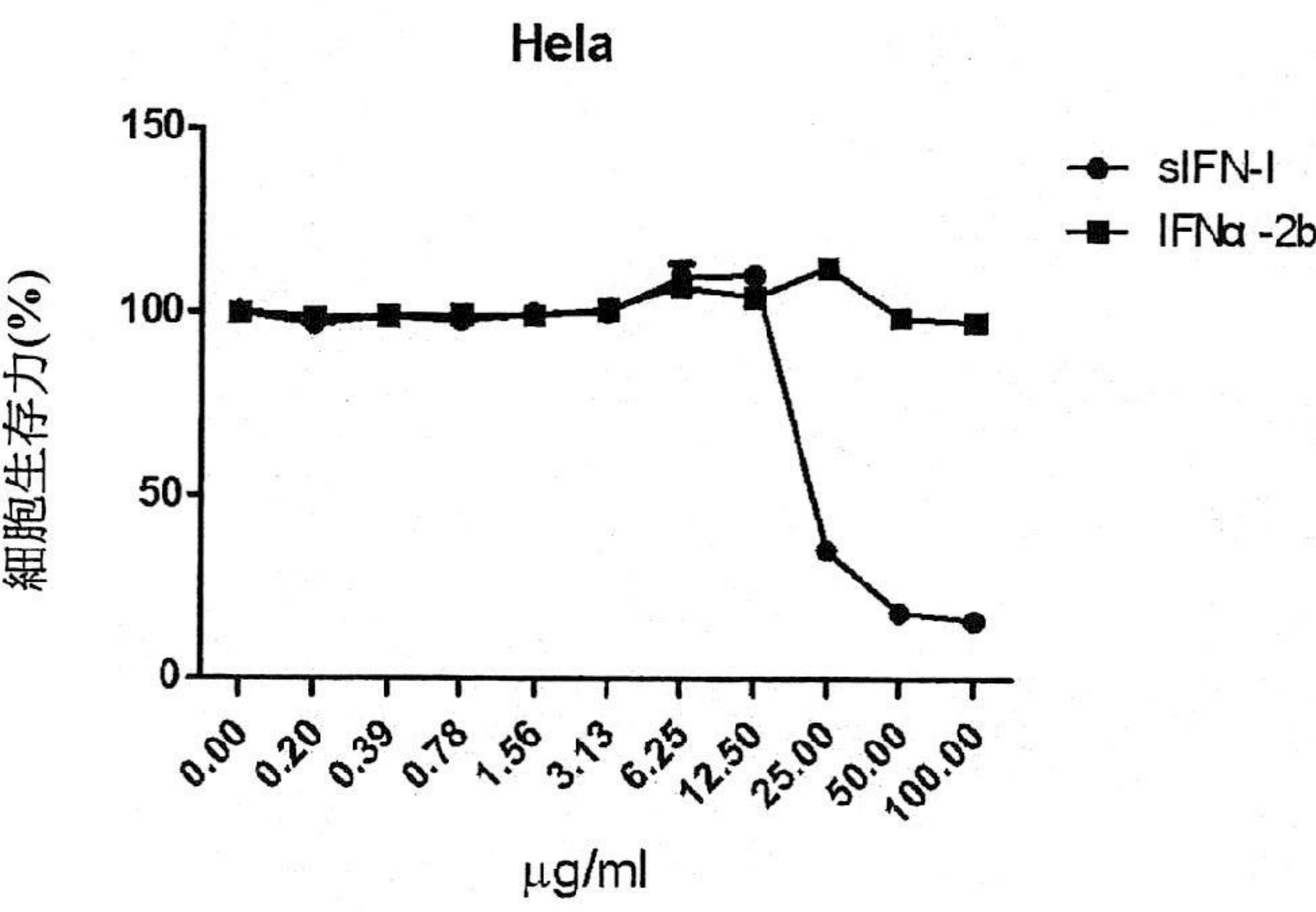


圖 5C

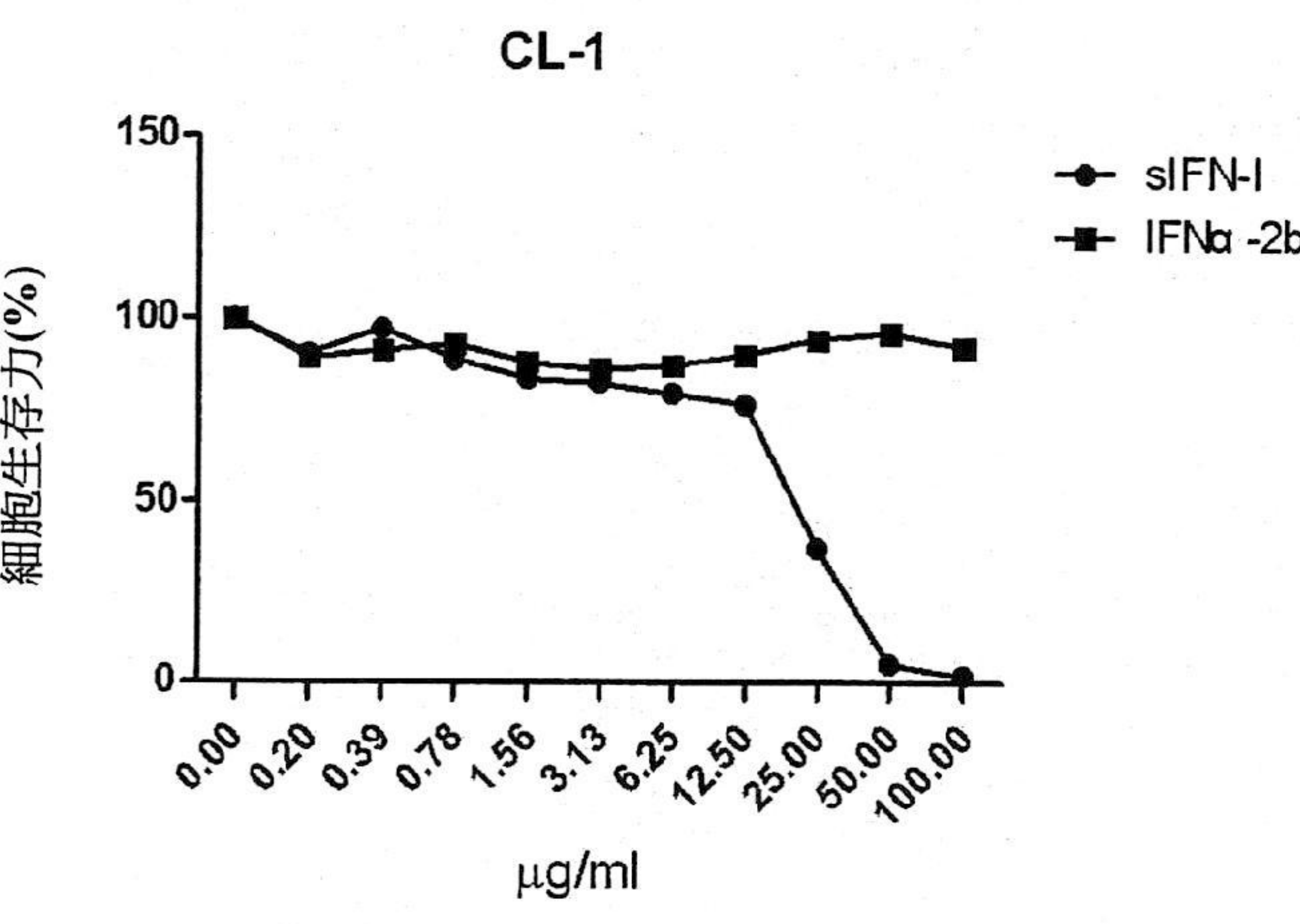


圖 5D

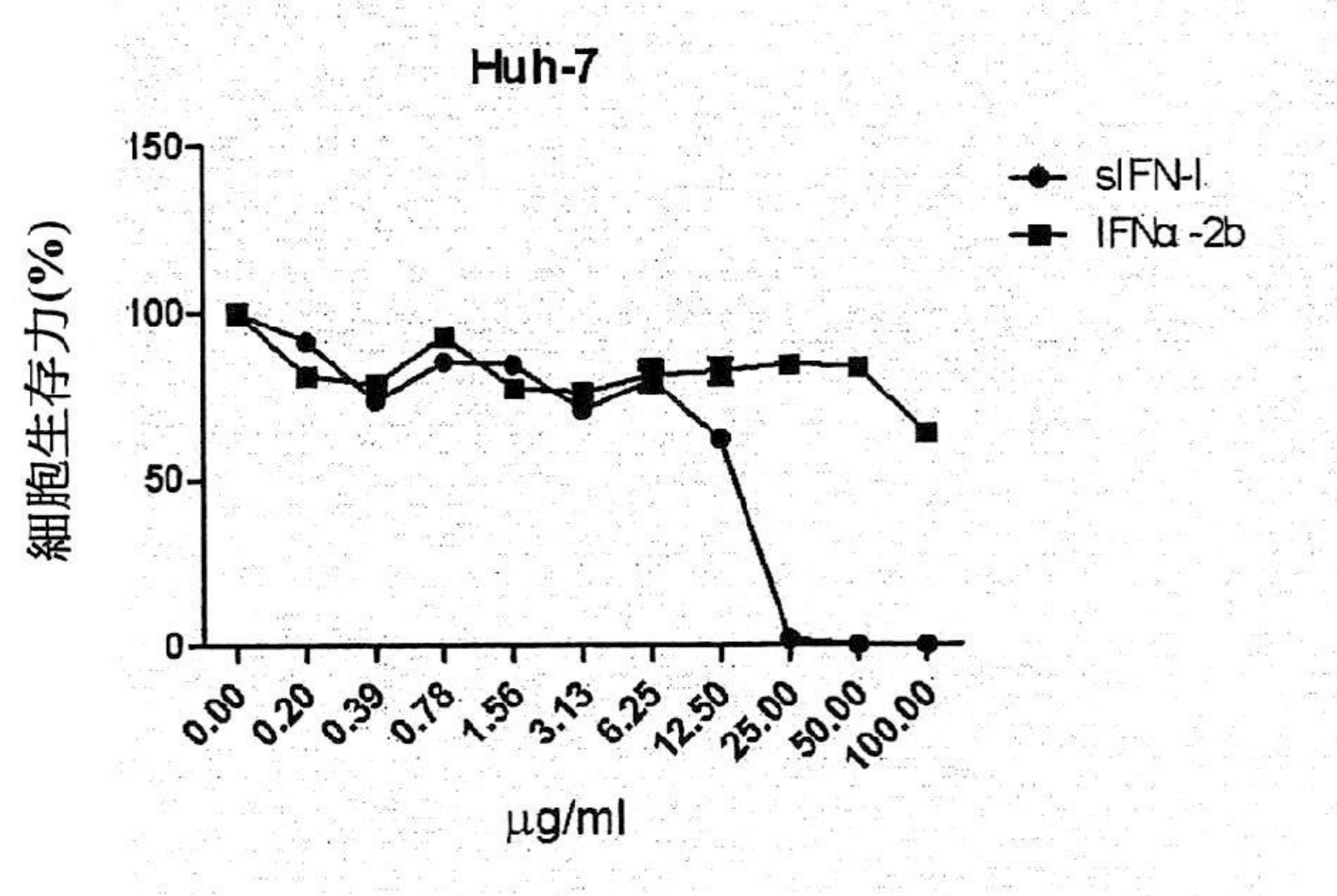


圖 5E

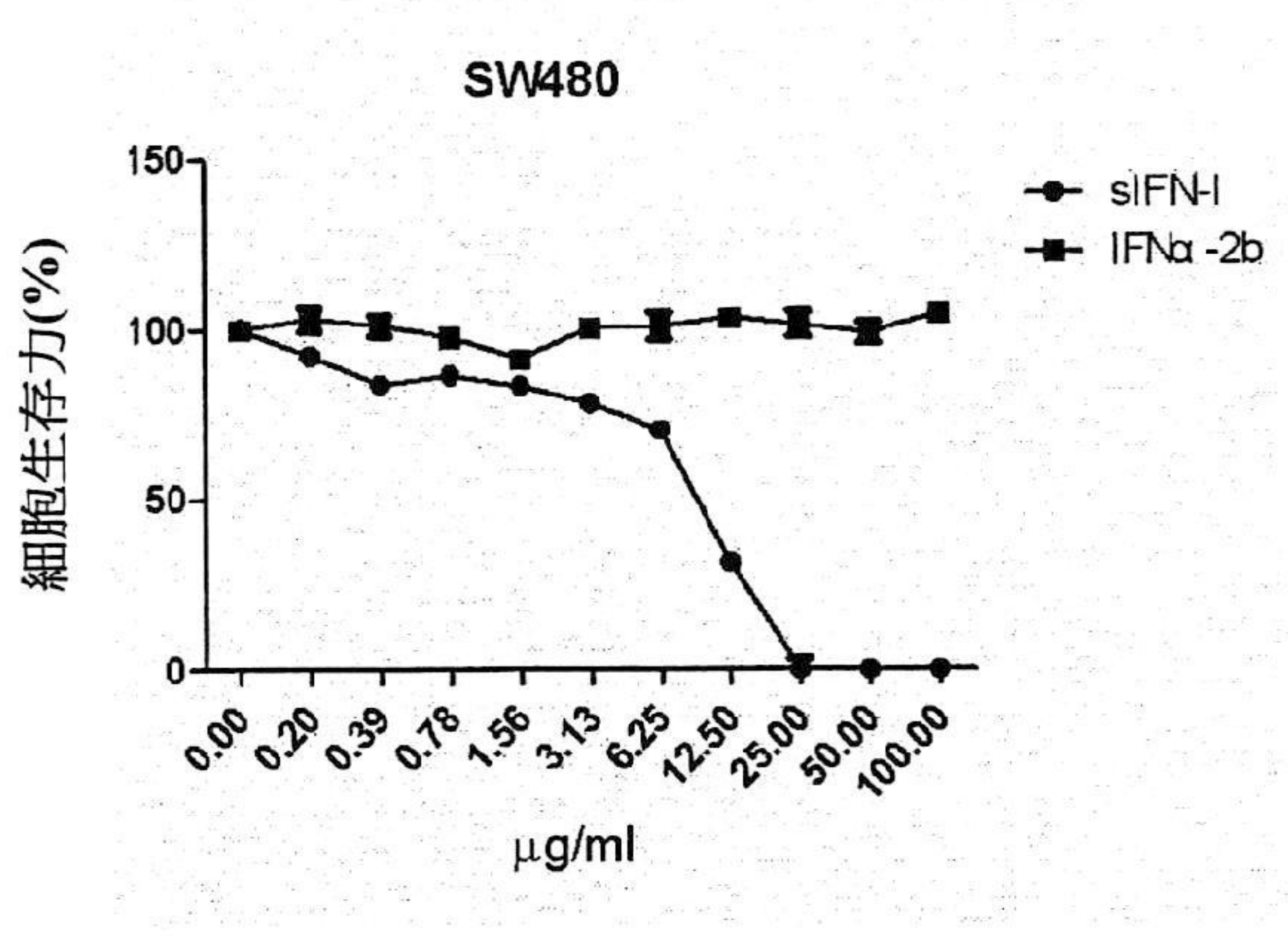


圖 5F

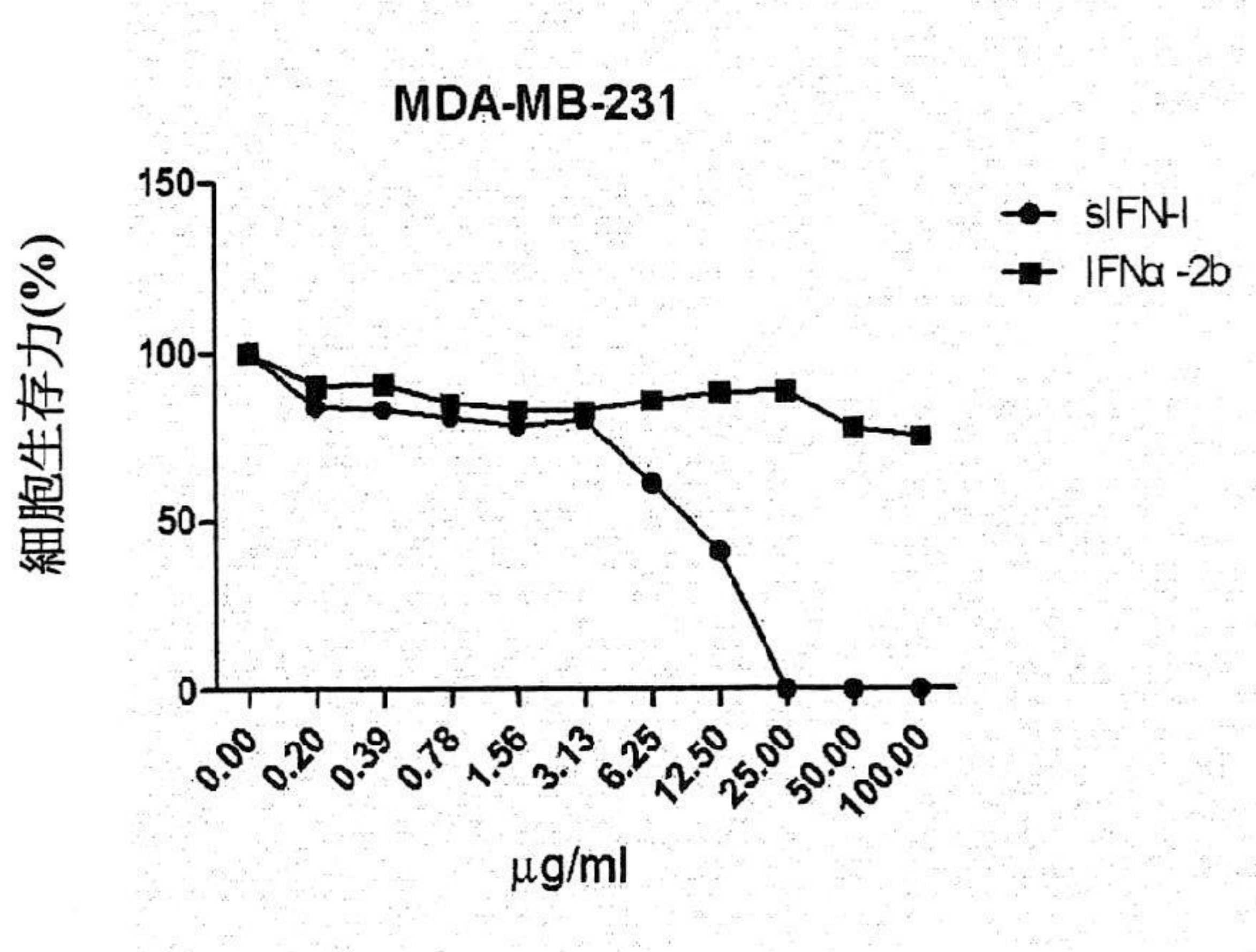


圖 5G

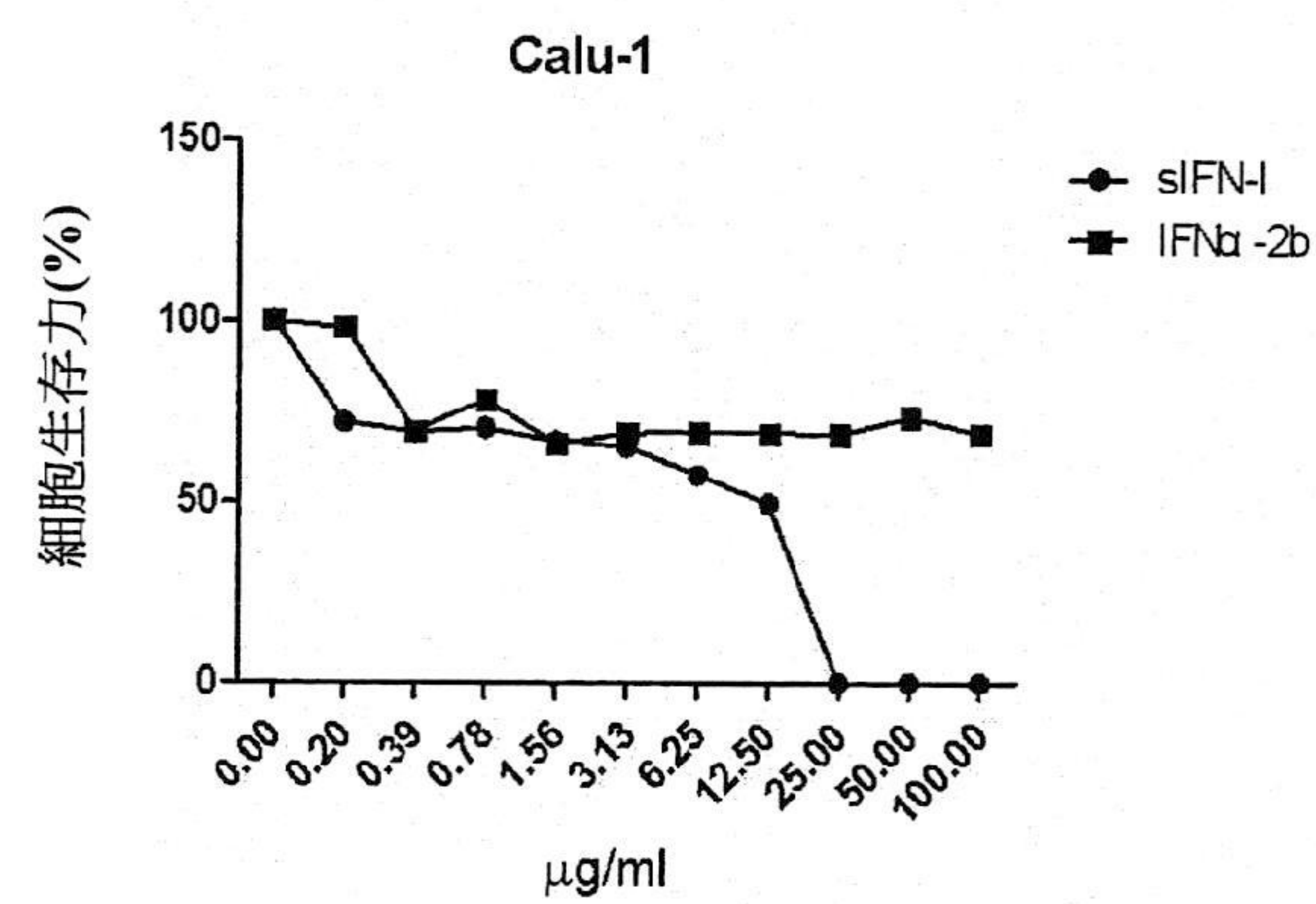


圖 5H

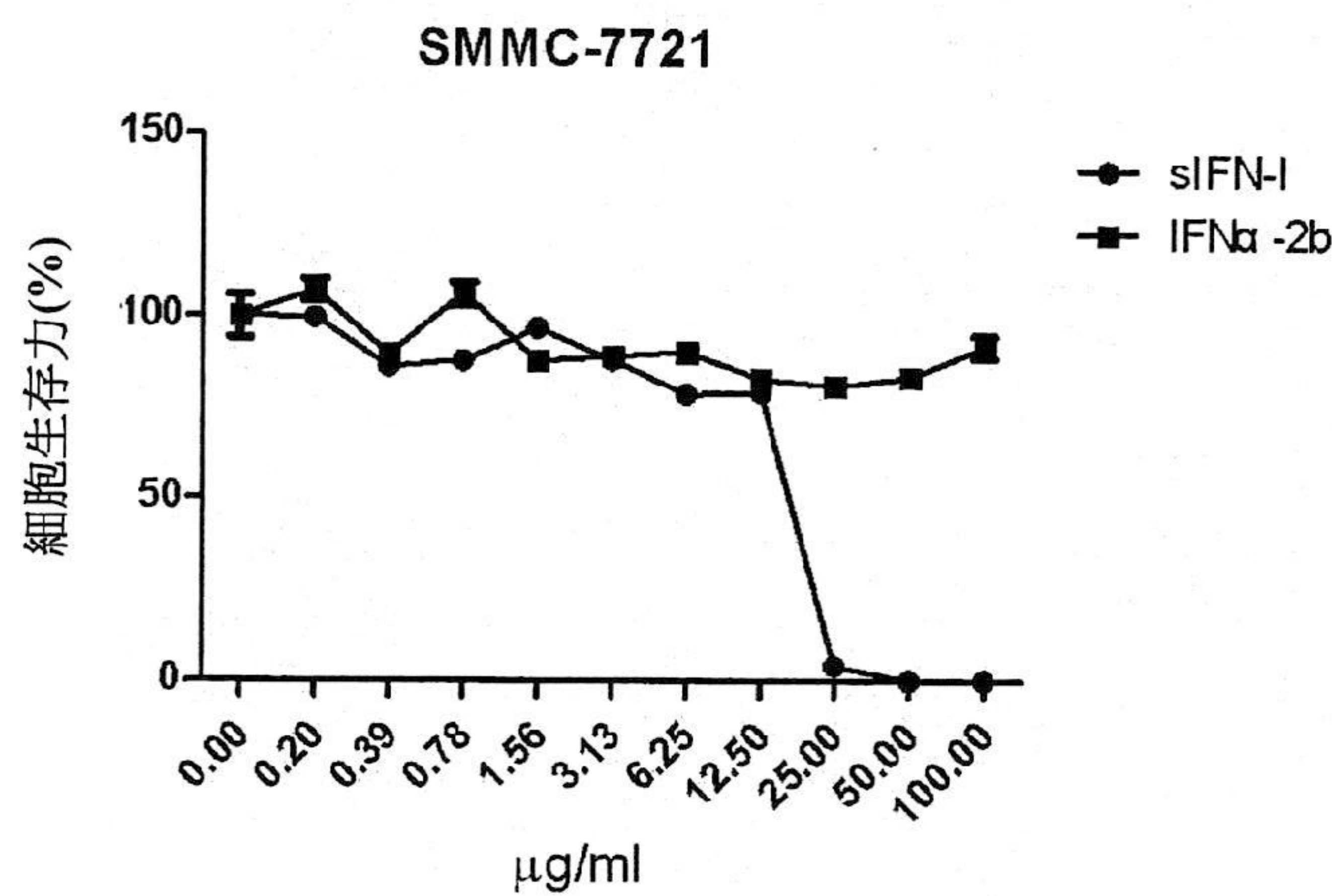


圖 5I

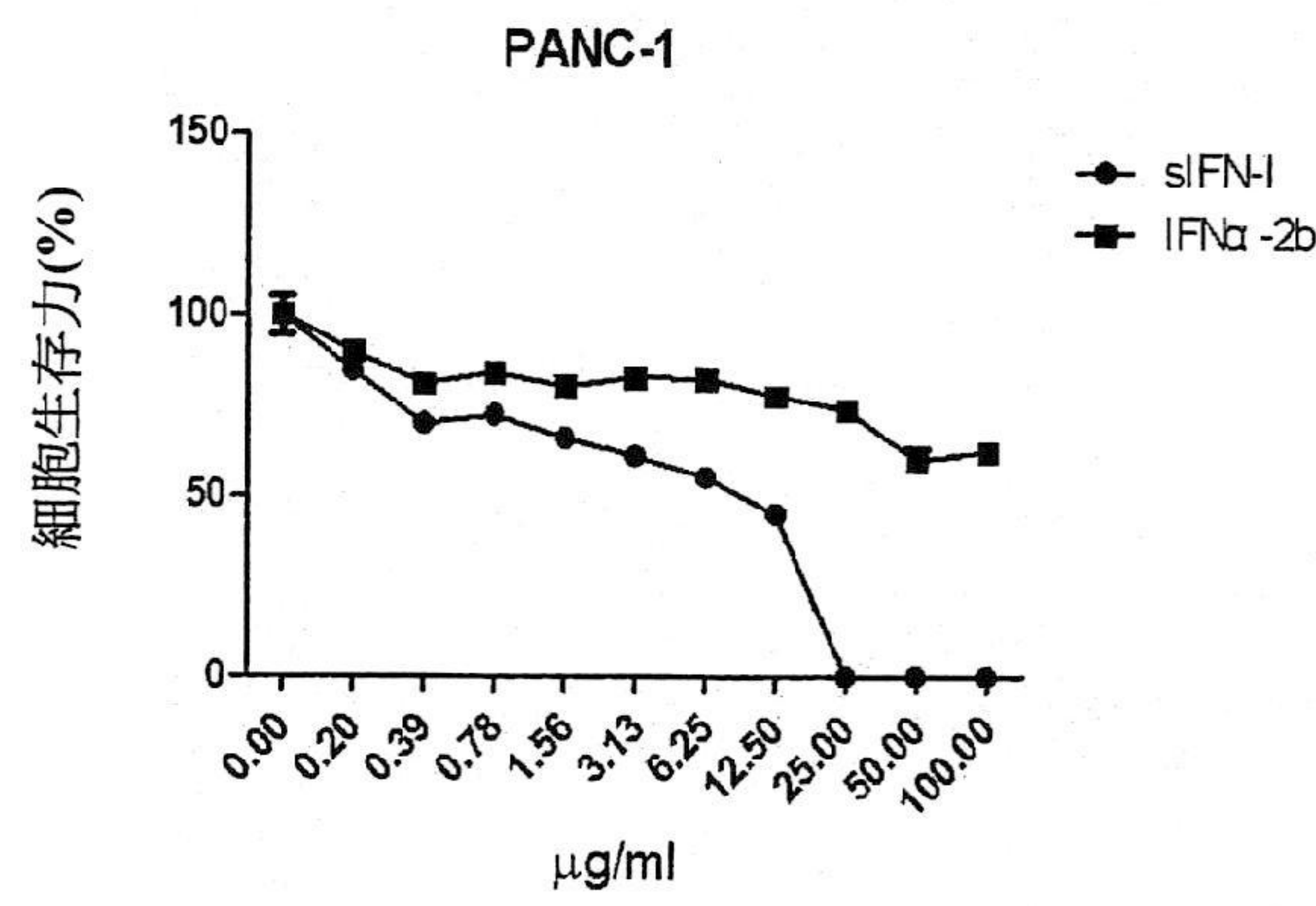


圖 6

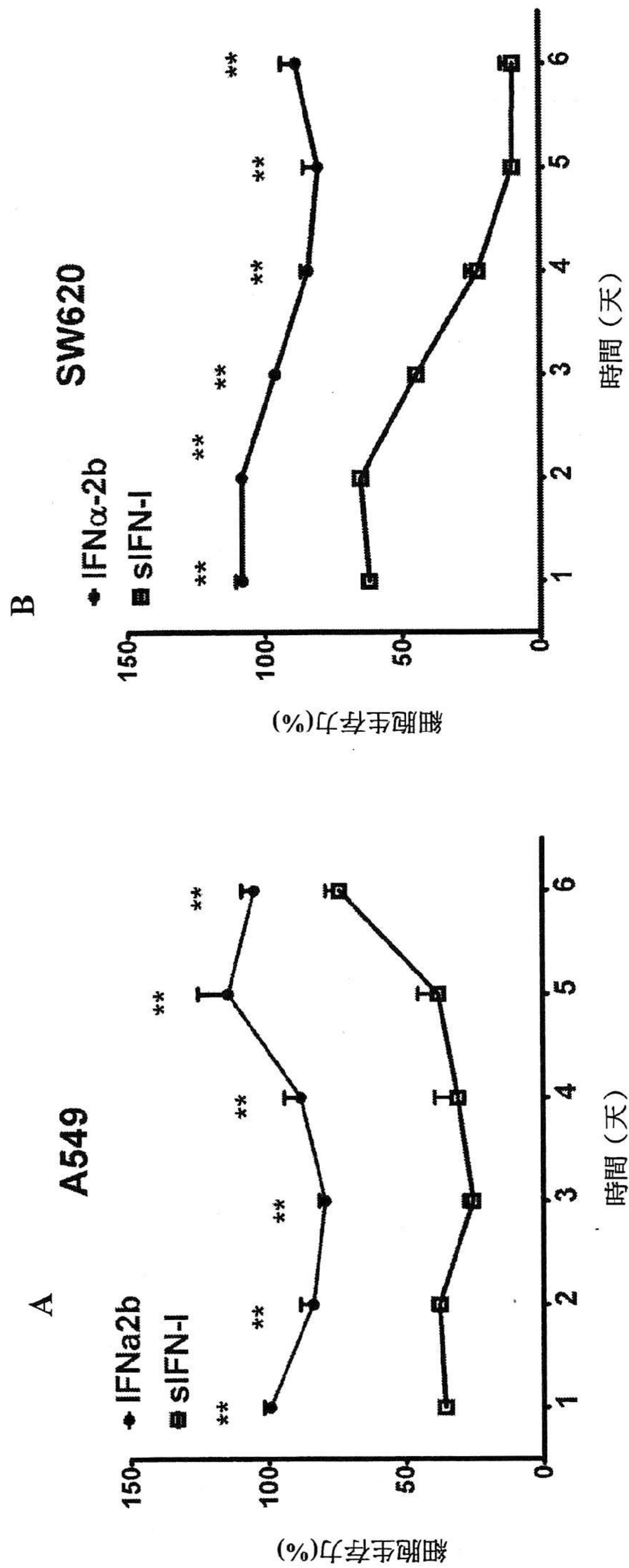


圖 7

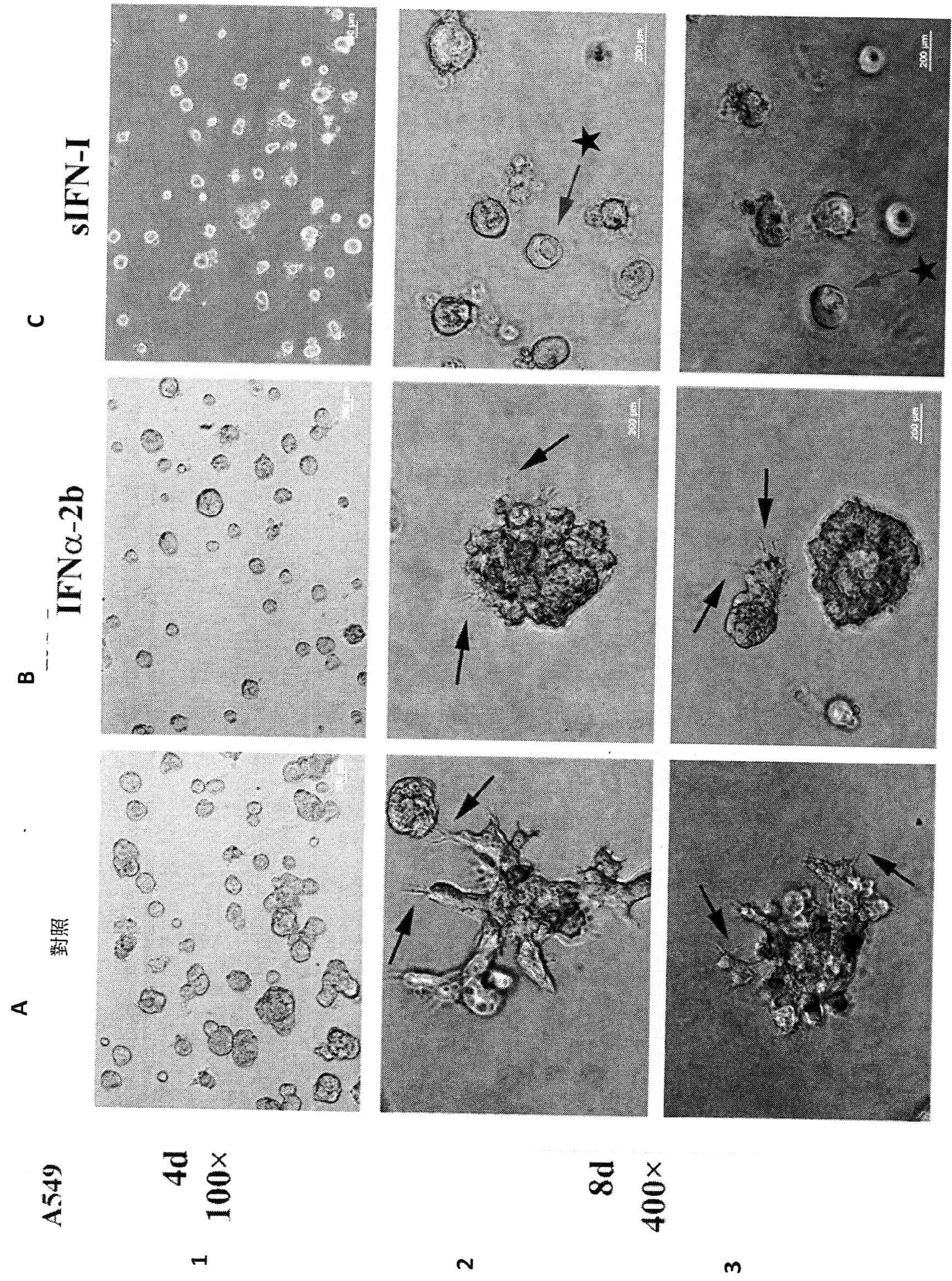


圖 8

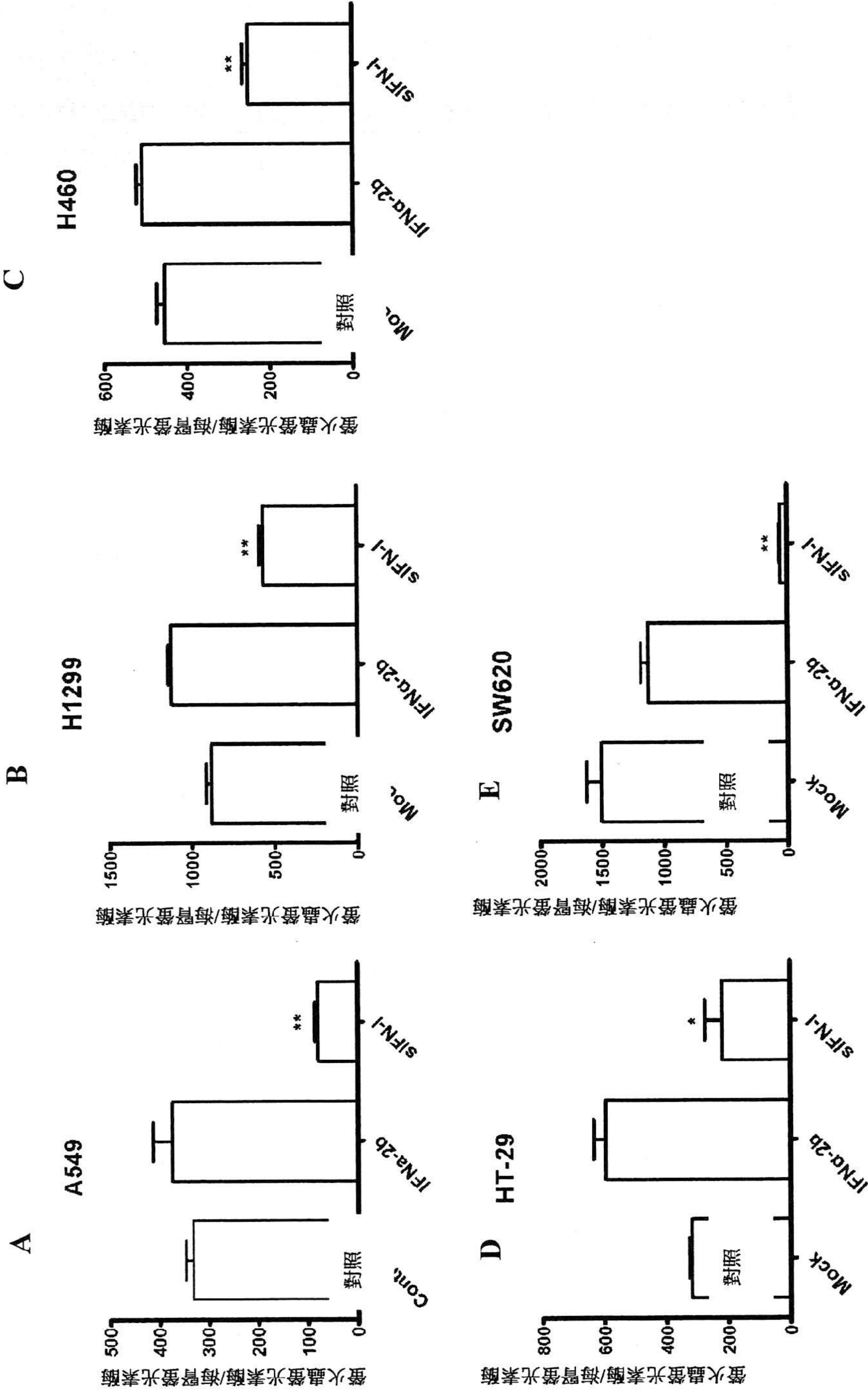


圖 9

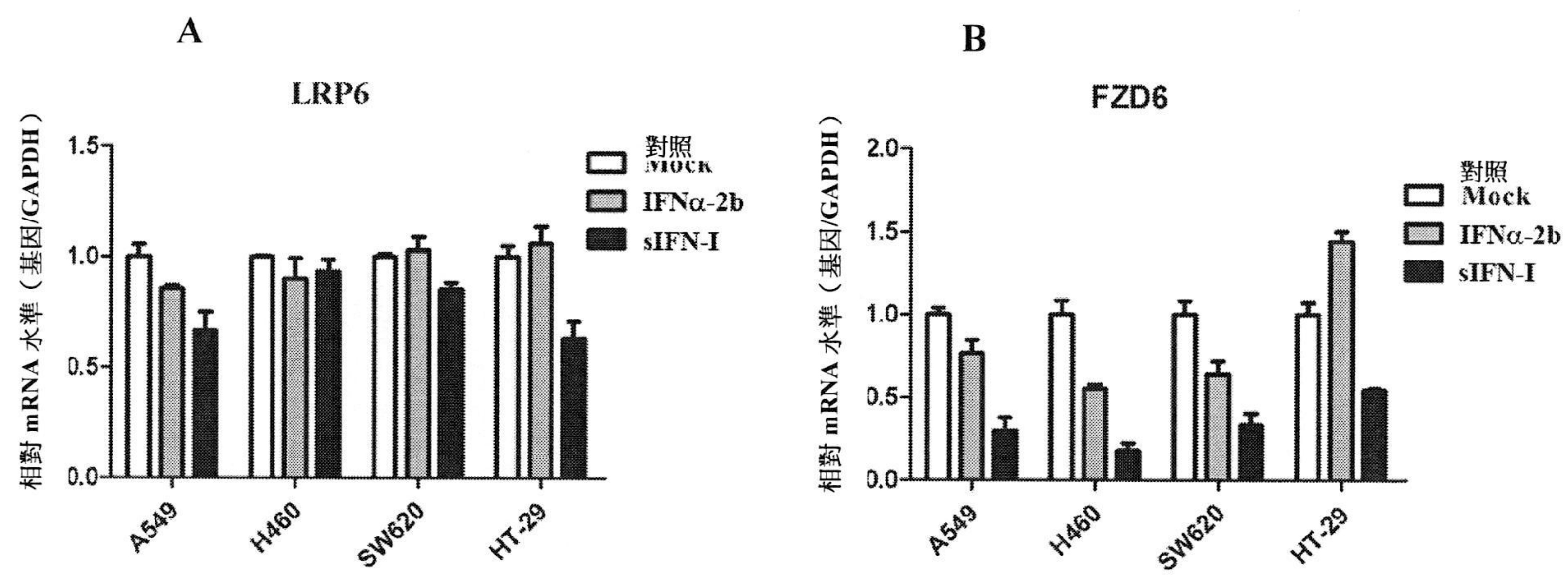


圖 10

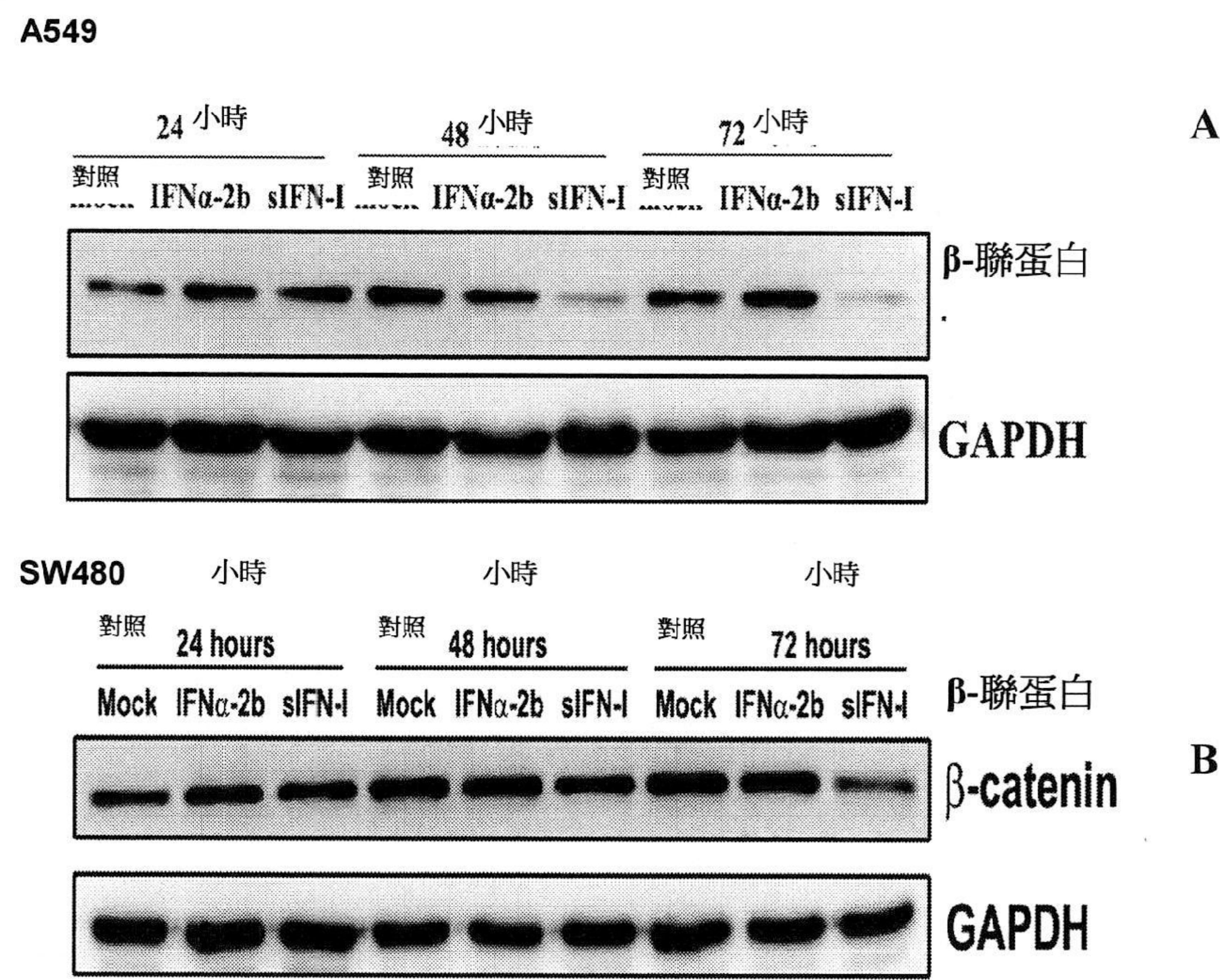


圖 11

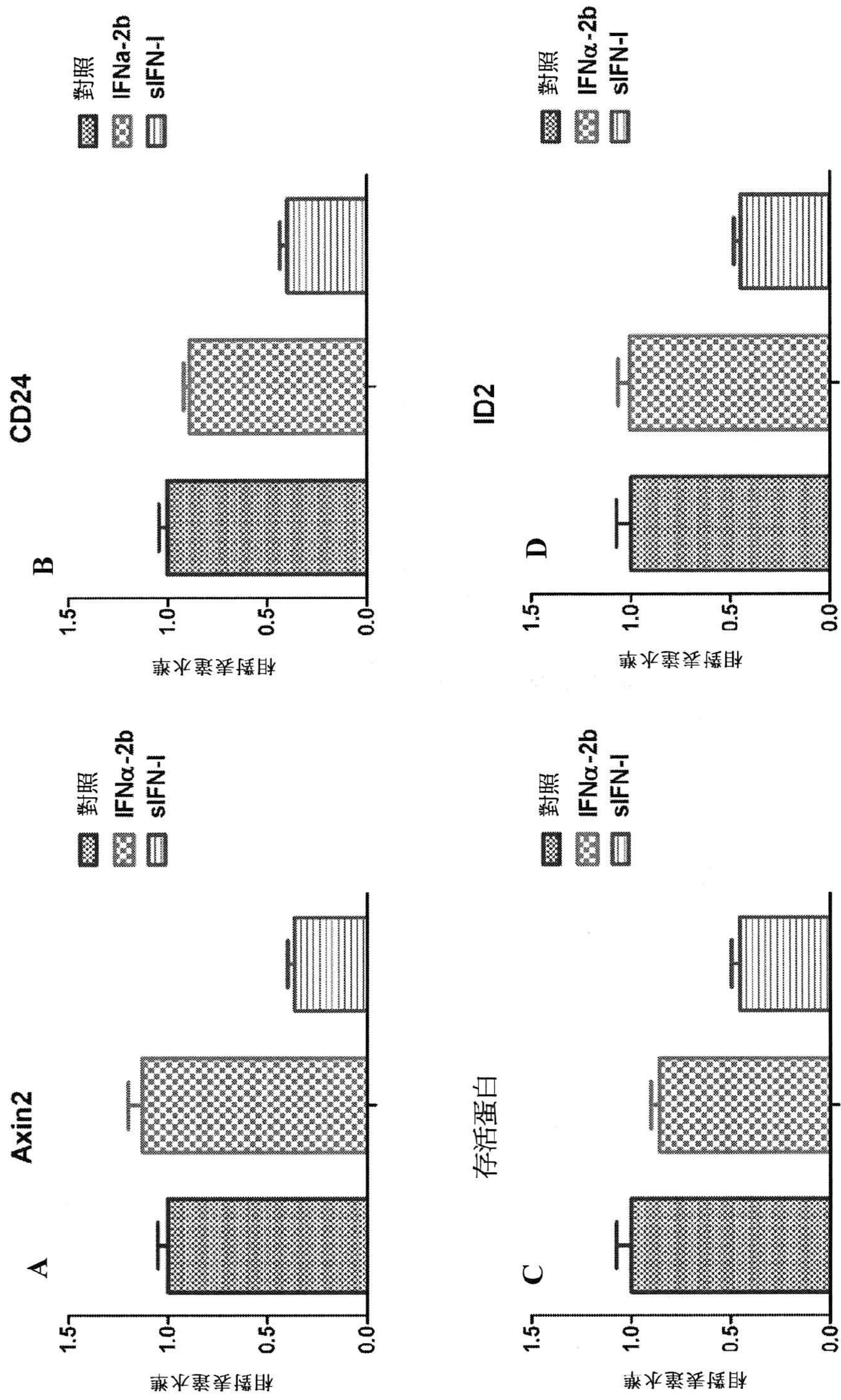


圖 12

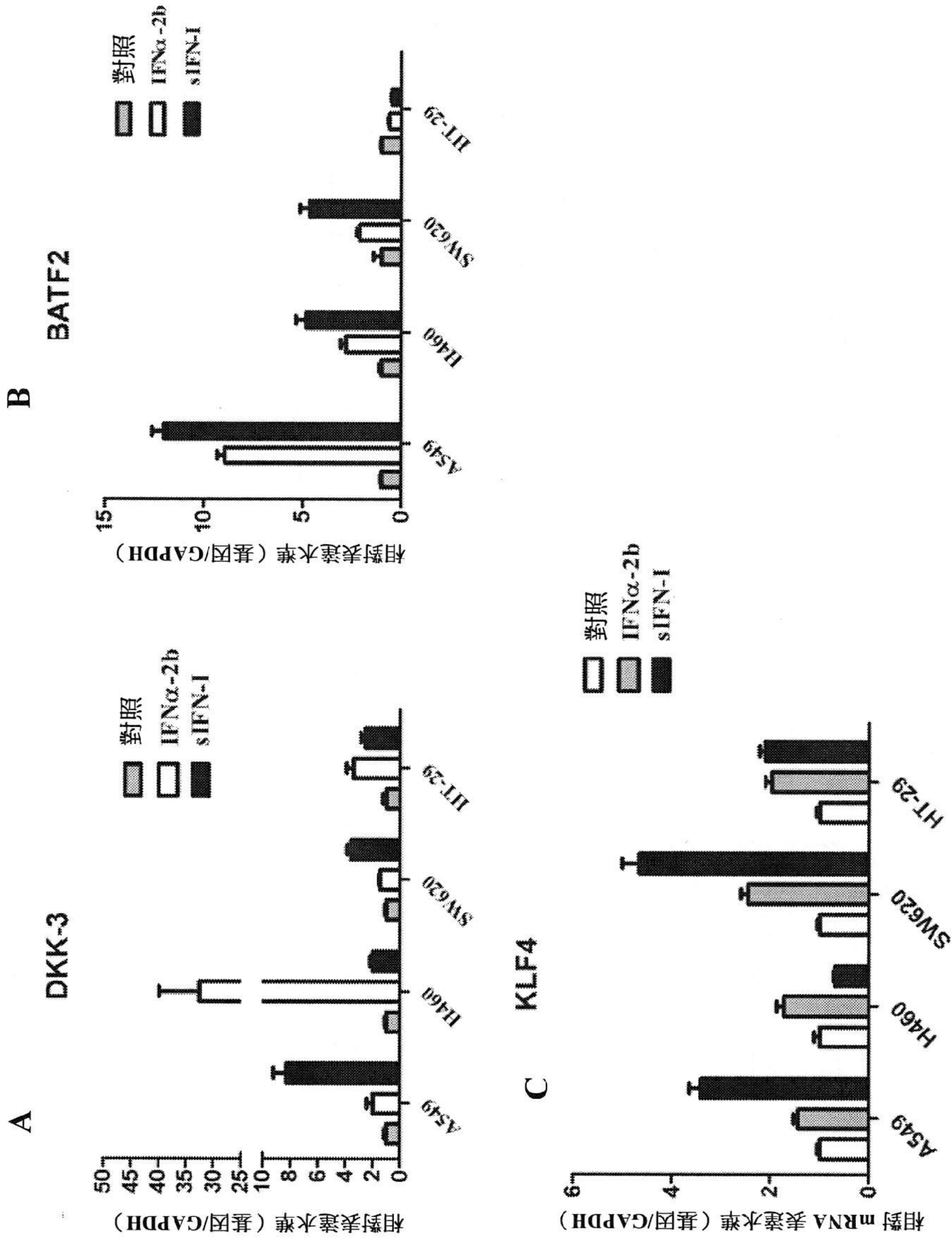


圖 13

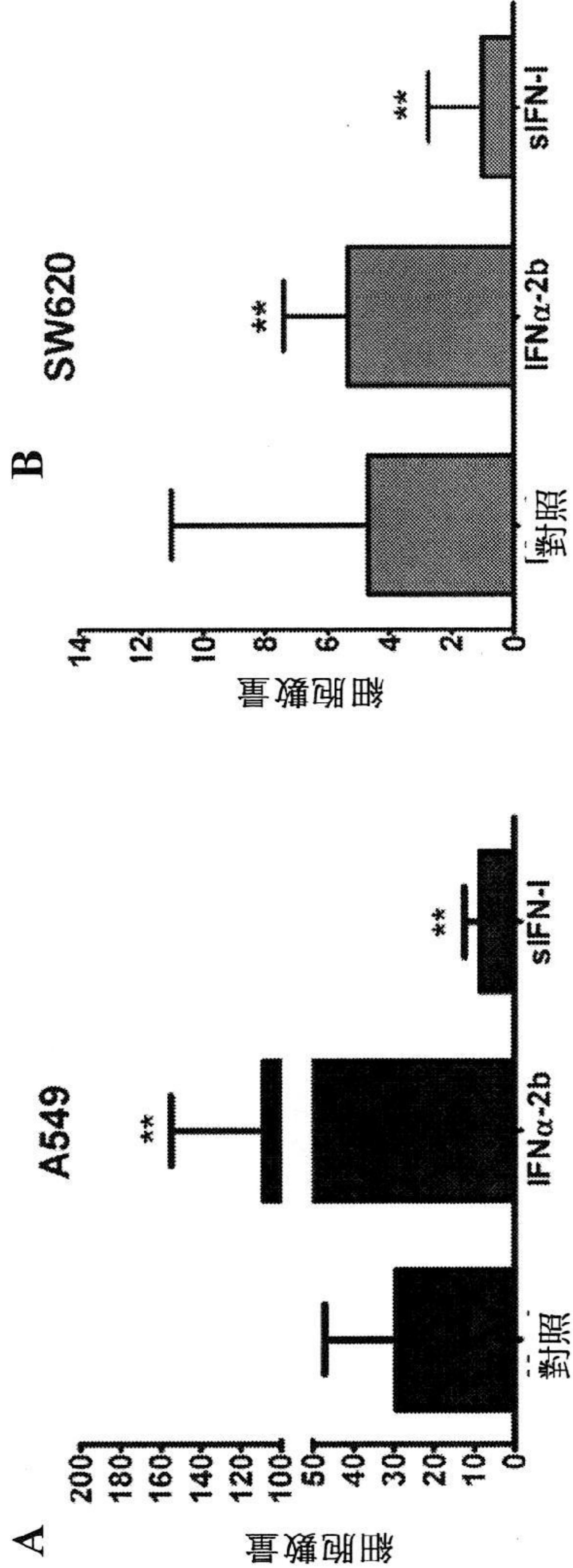


圖 14

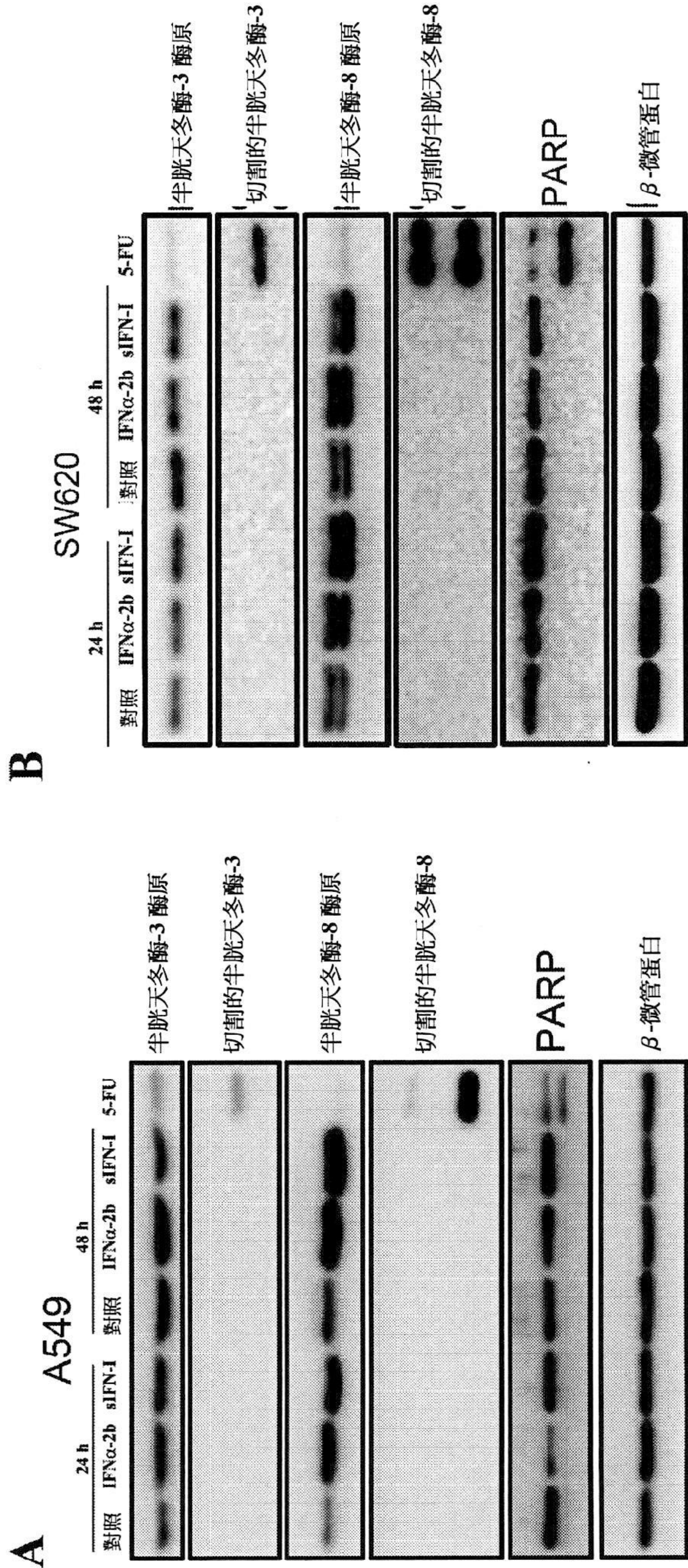


圖 15

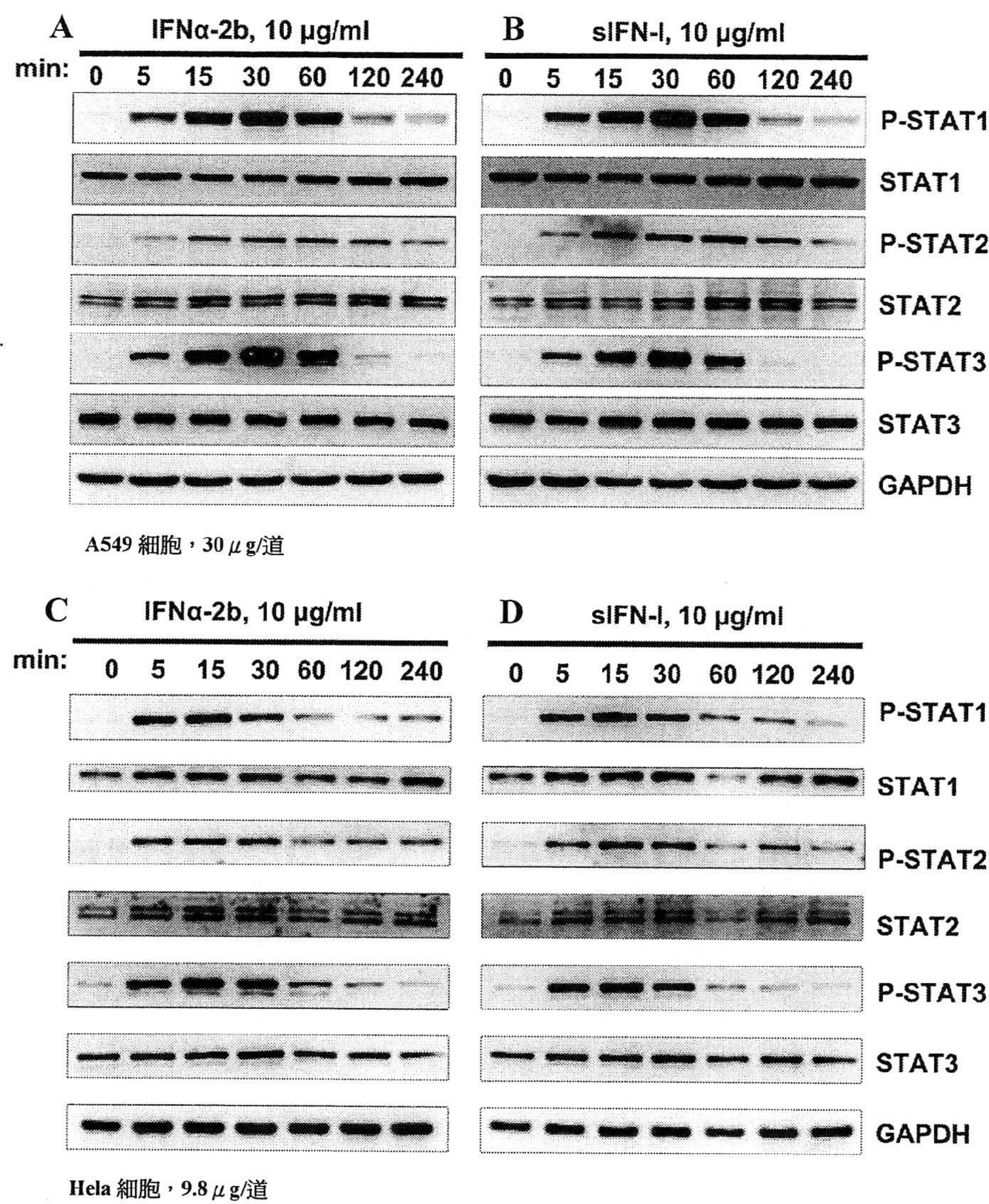


圖 16

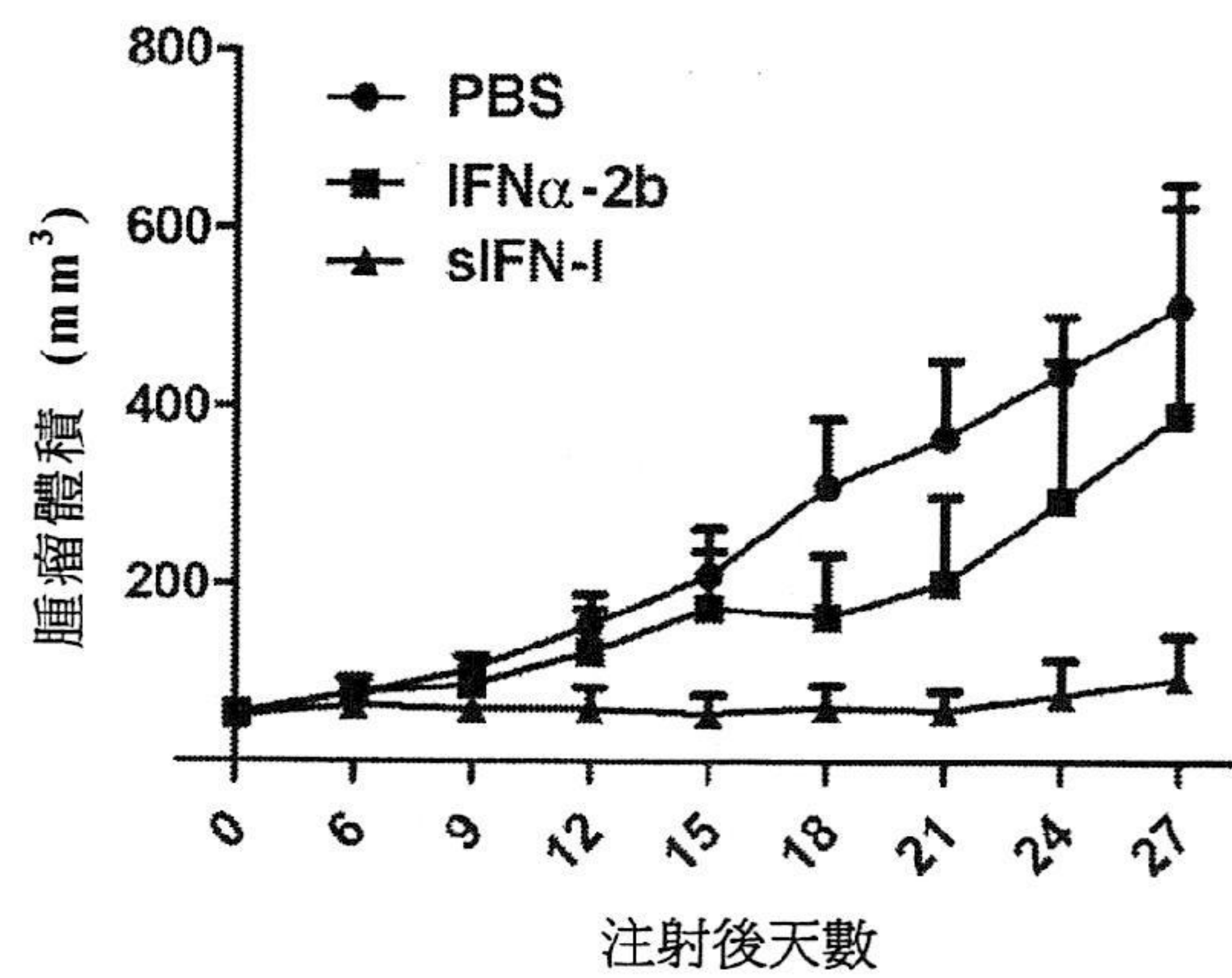


圖 17

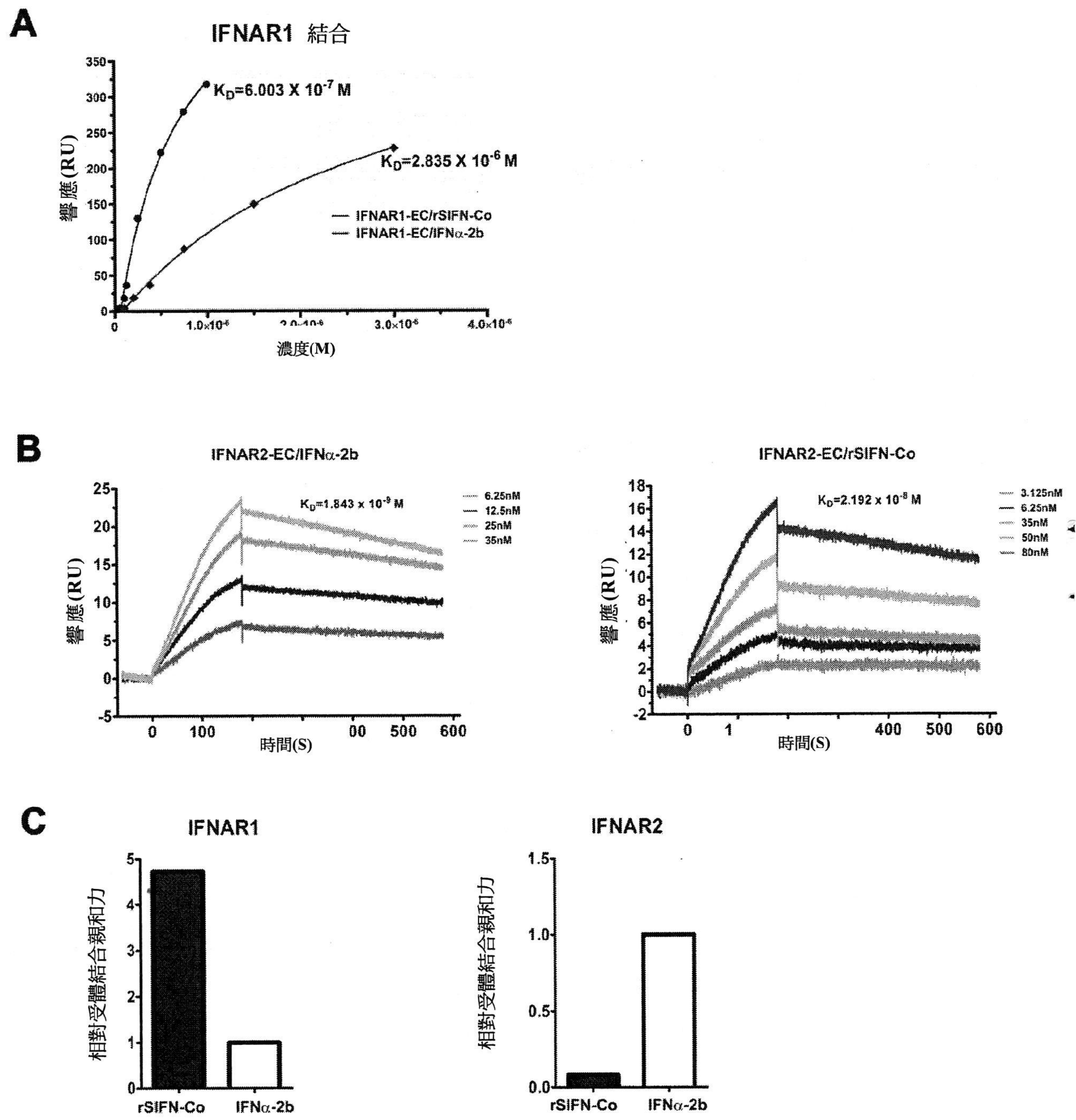


圖 18

