



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 104448003 B

(45)授权公告日 2019.03.26

(21)申请号 201410443460.1

(22)申请日 2004.05.06

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104448003 A

(43)申请公布日 2015.03.25

(30)优先权数据

60/469600 2003.05.06 US

60/487964 2003.07.17 US

60/539207 2004.01.26 US

(62)分案原申请数据

200480019188.9 2004.05.06

(73)专利权人 威拉特生物治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 R.T.彼得斯 A.R.梅佐

D.S.赖夫拉 A.J.比通蒂

J.M.斯塔特尔 S.C.罗

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 梁谋 万雪松

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 38/18(2006.01)

A61K 47/42(2017.01)

A61P 7/04(2006.01)

(56)对比文件

US 5605689 A,1997.02.25,

WO 9315210 A1,1993.08.05,

CN 1343221 A,2002.04.03,

CN 1407900 A,2003.04.02,

WO 9221755 A1,1992.12.10,

审查员 陈雪梅

权利要求书3页 说明书54页 附图26页

(54)发明名称

免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体

(57)摘要

本发明涉及免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体。本发明涉及嵌合单体-二聚体杂合体蛋白，其中所述蛋白包含第一和第二多肽链，所述第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子，所述第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区，不含第一链的生物活性分子。本发明还涉及本发明嵌合单体-二聚体杂合体蛋白的使用方法和制备方法。

1. 一种包含第一多肽链和第二多肽链的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白具有以下式

$X-L_a-F:F$ 或 $F:F-L_a-X$

其中

在所述第一多肽链中的X为单一生物活性分子,其选自由以下组成的组:细胞因子、抗病毒剂、激素、细胞表面受体以及凝血因子;

在所述第一多肽链中的L为接头;

在所述第一多肽链中的a为任何整数或零;

代表化学缔合;

在所述第一多肽链中的F为包含FcRn结合位点的免疫球蛋白恒定区的至少一个部分并且不包含生物活性分子;以及

在所述第二多肽链中的F为包含FcRn结合位点的免疫球蛋白恒定区的至少一个部分,并且不包含生物活性分子或免疫球蛋白可变区。

2. 一种包含第一多肽链和第二多肽链的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白具有以下式

$X-L_a-F:F-T$ 或 $T:F:F-L_a-X$

其中

在所述第一多肽链中的X为单一生物活性分子,其选自由以下组成的组:细胞因子、抗病毒剂、激素、细胞表面受体以及凝血因子;

在所述第一多肽链中的L为接头;

在所述第一多肽链中的a为任何整数或零;

代表化学缔合;

在所述第一多肽链中的F为包含FcRn结合位点的免疫球蛋白恒定区或其部分;

在所述第二多肽链中的T为第二接头或标签,其中T具有小于2 kD的分子量;以及

在所述第二多肽链中的F为包含FcRn结合位点的免疫球蛋白恒定区的至少一个部分。

3. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含一个生物活性分子和与其结合的两条多肽链,每条多肽链包括含FcRn结合配偶体的、免疫球蛋白恒定区的部分,其中所述一个生物活性分子通过接头结合到所述两条多肽链,其中所述一个生物活性分子不是免疫球蛋白分子或其片段。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子为激素。

5. 如权利要求4所述的嵌合蛋白,其中所述激素选自由以下组成的组:促性腺激素释放激素(GnRH)、生长激素、亮丙瑞林、促卵泡激素、孕酮、雌激素以及睾酮。

6. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子为细胞因子。

7. 如权利要求6所述的嵌合蛋白,其中所述细胞因子选自由以下组成的组:EPO、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、RANTES、MIP1 $\alpha$ 、MIP1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、GM-CSF以及肿瘤坏死因子。

8. 如权利要求7所述的嵌合蛋白,其中所述细胞因子为IFN- $\alpha$ 。

9. 如权利要求7所述的嵌合蛋白,其中所述细胞因子为IFN- $\beta$ 。

10. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子为抗病毒剂。

11. 如权利要求10所述的嵌合蛋白,其中所述抗病毒剂为病毒融合抑制剂。

12. 如权利要求11所述的嵌合蛋白,其中所述病毒融合抑制剂为HIV融合抑制剂。

13. 如权利要求12所述的嵌合蛋白,其中所述HIV融合抑制剂为T20、T21或T1249。

14. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述单一生物活性分子为细胞表面受体。

15. 如权利要求14所述的嵌合蛋白,其中所述细胞表面受体选自由以下组成的组:CD4、CCR5、CXCR4、CD21、CD46、TNF $\alpha$ 受体、促红细胞生成素受体、CD25、CD122以及CD132。

16. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子为凝血因子。

17. 如权利要求16所述的嵌合蛋白,其中所述凝血因子选自由以下组成的组:因子VIII、因子IX、因子XI、因子XII、纤维蛋白原、凝血酶原、因子V、因子VII、因子X、因子XIII以及血管假性血友病因子。

18. 如权利要求17所述的嵌合蛋白,其中所述凝血因子为因子IX。

19. 如权利要求17所述的嵌合蛋白,其中所述凝血因子为因子VIII。

20. 如权利要求17所述的嵌合蛋白,其中所述凝血因子为因子VII。

21. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白恒定区或其部分为Fc片段。

22. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白为IgG。

23. 如权利要求22所述的嵌合蛋白,其中所述IgG为IgG<sub>1</sub>或IgG<sub>2</sub>。

24. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中在所述第一多肽链或所述第一免疫球蛋白恒定区或其部分中的F与在所述第二多肽链或所述第二免疫球蛋白恒定区或其部分中的F之间的所述化学缔合为非共价相互作用。

25. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中在所述第一多肽链或所述第一免疫球蛋白恒定区或其部分中的F与在所述第二多肽链或所述第二免疫球蛋白恒定区或其部分中的F之间的所述化学缔合为共价键。

26. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中在所述第一多肽链或所述第一免疫球蛋白恒定区或其部分中的F与在所述第二多肽链或所述第二免疫球蛋白恒定区或其部分中的F之间的所述化学缔合为二硫键。

27. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中在所述第一多肽链或所述第一免疫球蛋白恒定区或其部分中的F与在所述第二多肽链或所述第二免疫球蛋白恒定区或其部分中的F之间的所述化学缔合并不是二硫键。

28. 如权利要求1至3中任一项所述的嵌合蛋白,其中所述接头包含聚乙二醇(PEG)或氨基酸。

29. 如权利要求28所述的嵌合蛋白,其中所述接头包含PEG。

30. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中所述L<sub>a</sub>由15-25个氨基酸组成。

31. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中L<sub>a</sub>由15-20个氨基酸组成。

32. 如权利要求1或2所述的嵌合蛋白,其中a为零。

33. 如权利要求2所述的嵌合蛋白,其中T连接至所述第二多肽链中的F的C末端。

34. 如权利要求2所述的嵌合蛋白,其中T连接至所述第二多肽链中的F的N末端。

35. 如权利要求2所述的嵌合蛋白,其中T为亲和性标签。

36. 如权利要求35所述的嵌合蛋白,其中所述亲和性标签为FLAG标签或His标签。

37. 一种编码如权利要求1至36中任一项所述的嵌合蛋白的核酸。

38. 一种包含如权利要求37所述的核酸的载体。

39. 一种包含如权利要求37所述的核酸的宿主细胞。

40. 一种包含如权利要求1至36中任一项所述的嵌合蛋白、如权利要求37所述的核酸、如权利要求38所述的载体或如权利要求39所述的宿主细胞和药学上可接受的载体的药物组合物。

41. 如权利要求40所述的药物组合物用于制造用以治疗或预防有需要的患者的疾病或病状的药物的用途。

42. 如权利要求41所述的用途, 其中所述嵌合蛋白适用于静脉内施用、皮下施用、口服施用、颊内施用、舌下施用、鼻内施用、胃肠外施用、直肠施用、阴道施用或通过肺部途径施用。

43. 如权利要求41或42所述的用途, 其中所述疾病或病状为病毒感染。

44. 如权利要求41或42所述的用途, 其中所述疾病或病状为凝血障碍。

45. 如权利要求41或42所述的用途, 其中所述疾病或病状为A型血友病。

46. 如权利要求41或42所述的用途, 其中所述疾病或病状为B型血友病。

47. 如权利要求41或42所述的用途, 其中所述疾病或病状为贫血。

## 免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2004年5月6日；申请号：201110082150.8；发明名称：同上。

[0002] 本发明要求2003年5月6日提出的美国临时申请号60/469,600、2003年7月17日提出的美国临时申请号60/487,964、2004年1月26日提出的美国临时申请号60/539,207的优先权，所有上述临时申请通过引用整体结合到本文中。2004年5月6日同时申请的题为“免疫球蛋白嵌合蛋白的化学合成方法”的美国非临时申请通过引用结合到本文中。

### 发明领域

[0003] 本发明主要涉及由两条多肽链组成的治疗性嵌合蛋白，其中第一链由治疗性生物活性分子组成，第二链不由第一链的治疗性生物活性分子组成。更具体的说，本发明涉及由两条多肽链组成的嵌合蛋白，其中两条链都由至少一部分免疫球蛋白恒定区组成，其中第一链被修饰成进一步包含生物活性分子，而第二链没有被如此修饰。因此，本发明涉及为单体-二聚体杂合体的嵌合蛋白，即具有二聚体方面和单体方面的嵌合蛋白，其中二聚体方面涉及如下事实，即嵌合蛋白由两条多肽链组成，每条链由一部分免疫球蛋白恒定区组成，而单体方面涉及如下事实，即两条链中只有一条链由治疗性生物活性分子组成。图1阐明了单体-二聚体杂合体的一个实例，其中生物活性分子是促红细胞生成素 (EPO)，免疫球蛋白恒定区部分是IgGFc区。

### [0004] 发明背景

[0005] 免疫球蛋白由四条多肽链组成，其中两条是重链，另两条是轻链，它们通过二硫键结合，形成四聚体。每条链还由一个可变区和一个恒定区组成。可变区介导抗原识别与结合，而恒定区特别是重链恒定区介导多种效应子功能，例如补体结合和Fc受体结合（参见例如美国专利6,086,875；5,624,821；5,116,964）。

[0006] 恒定区还由表示为CH（恒定区重链）结构域（CH1、CH2等）的结构域组成。取决于同种型（即IgG、IgM、IgA、IgD、IgE），恒定区可由三个或四个CH结构域组成。一些同种型（例如IgG）恒定区还包含铰链区（Janeway等，2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.）。

[0007] 已有文献描述了由目的蛋白或其片段与免疫球蛋白恒定区连接组成的嵌合蛋白的构建（参见例如美国专利5,480,981和5,808,029；Gascoigne等，1987，Proc.Natl.Acad.Sci.USA84:2936；Capon等，1989，Nature337:525；Traunecker等，1989，Nature339:68；Zettmeissl等，1990，DNACellBiol.USA9:347；Byrn等，1990，Nature344:667；Watson等，1990，J.Cell.Biol.110:2221；Watson等，1991，Nature349:164；Aruffo等，1990，Cell61:1303；Linsley等，1991，J.Exp.Med.173:721；Linsley等，1991，J.Exp.Med.174:561；Stamenkovic等，1991，Cell66:1133；Ashkenazi等，1991，Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:10535；Lesslauer等，1991，Eur.J.Immunol.27:2883；Peppel等，1991，J.Exp.Med.174:1483；Bennett等，1991，J.Biol.Chem.266:23060；Kurschner等，1992，J.Biol.Chem.267:9354；Chalupny等，1992，Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:10360；

Ridgway和Gorman,1991,JCellBiol.115,摘要号1448;Zheng等,1995,J.Immun.154:5590)。这些分子通常具有与所连接的目的分子相关的生物活性以及效应子功能,或者某些与免疫球蛋白恒定区相关的其他合乎需要的特性(例如生物稳定性、细胞分泌)。

[0008] 取决于免疫球蛋白的同种型,免疫球蛋白恒定区的Fc部分可包括CH2、CH3和CH4结构域以及铰链区。包含免疫球蛋白Fc部分的嵌合蛋白赋予嵌合蛋白某些合乎需要的性质,包括稳定性提高、血清半寿期提高(参见Capon等,1989,Nature337:525)以及与Fc受体如新生Fc受体(FcRn)的结合(美国专利6,086,875、6,485,726、6,030,613;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0009] FcRn活跃于成人上皮组织中,并表达于肠内腔、肺气道、鼻表面、阴道表面、结肠和直肠表面(美国专利6,485,726)。包含FcRn结合配偶体(如IgG、Fc片段)的嵌合蛋白通过FcRn能有效地穿过上皮屏障,从而提供了全身性给予所需治疗性分子的非侵入性方法。另外,包含FcRn结合配偶体的嵌合蛋白被表达FcRn的细胞所胞吞。但是这些嵌合蛋白不是被标记进行降解,而是被再循环到体内循环中,从而增加这些蛋白的体内半寿期。

[0010] 免疫球蛋白恒定区各部分(例如FcRn结合配偶体)通常通过二硫键和其他非特异性相互作用互相结合形成二聚体和更高等级的多聚体。本发明部分基于这样的意外发现,即包含FcRn结合配偶体的嵌合蛋白的胞转作用似乎受限于嵌合蛋白的分子量,分子量较高的蛋白转运效率较低。

[0011] 一旦给予包含生物活性分子的嵌合蛋白,其通常会与靶分子或细胞发生相互作用。本发明还部分基于这样的意外发现,即只有一个生物活性分子、但有两个免疫球蛋白恒定区部分(例如两个FcRn结合配偶体)的单体-二聚体杂合体比同源二聚体(在本文中也简称“二聚体”)或具有两个或更多个生物活性分子拷贝的更高等级多聚体能更有效地发挥功能和被转运。这在部分上是由于这样一个事实,即包含两个或多个生物活性分子、以二聚体和更高等级的多聚体形式存在的嵌合蛋白,由于存在两个或多个相互邻近的生物活性分子,且生物活性分子对其本身具有很高的亲合性,在空间上会被阻碍与其靶分子或细胞发生相互作用。

[0012] 因此,本发明的一个方面提供可被转运穿过上皮屏障的包含生物活性分子的嵌合蛋白。本发明的另一方面提供包含至少一个能与其靶分子或细胞发生相互作用、而又少有或没有位阻或自身聚集作用的生物活性分子的嵌合蛋白。

[0013] 本发明各方面提供了包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,第一链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中免疫球蛋白恒定区部分已被修饰成包括生物活性分子,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中免疫球蛋白恒定区部分没有同样被修饰成包括第一链的生物活性分子。

#### [0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及包含一个生物活性分子和两个免疫球蛋白恒定区至少一部分分子的嵌合蛋白。所述嵌合蛋白与由至少两个生物活性分子和至少两个免疫球蛋白恒定区的一部分组成的嵌合蛋白相比,能够以较小的位阻与靶分子或细胞发生相互作用。本发明还涉及包含至少一个生物活性分子和两个免疫球蛋白恒定区至少一部分分子的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白比相应的同源二聚体(即其中两条链连接到同一个生物活性分子上)能更有效地转运穿过上皮屏障。因此,本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所

述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区并不连接有任何生物活性分子。

[0016] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区或任何生物活性分子,且其中所述第二链不与分子量大于1kD、2kD、5kD、10kD或20kD的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于0-2kD的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于5-10kD的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于15-20kD的任何分子共价连接。

[0017] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述部分不与除所述第一多肽链免疫球蛋白部分之外的任何其他分子共价连接。

[0018] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记物组成。

[0019] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链基本由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记物组成。

[0020] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区或任何生物活性分子,任选包含分子量小于10kD、5kD、2kD或1kD的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于15-20kD的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于5-10kD的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于1-2kD的分子。

[0021] 本发明涉及包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第一结构域,所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体,其中所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第二结构域,但不含任何免疫球蛋白可变区或生物活性分子,其中所述第二结构域是所述第一结构域的特异性结合配偶体。

[0022] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码第一多肽链(包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区)的DNA分子和任选接头的第一DNA构建物,及包含编码第二多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区)的DNA分子和任选接头的第二DNA构建物转染细胞;在第一DNA构建物编码多肽链得以表达和第二DNA构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离包含第一DNA构建物编码多肽链和第二DNA构建物编码多肽链的单体-二聚体杂合体。

[0023] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,其中所述第一多肽链包含生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第一结构域,所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体,其中所述第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第二结构域,其中所述第二结构域是所述

第一结构域的特异性结合配偶体,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区,所述方法包括用包含编码所述第一多肽链的DNA分子的第一DNA构建物,及包含编码所述第二多肽链的DNA分子的第二DNA构建物转染细胞;在第一DNA构建物编码多肽链得以表达和第二DNA构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离由第一DNA构建物编码多肽链和第二DNA构建物编码多肽链组成的单体-二聚体杂合体。

[0024] 本发明涉及制备本发明嵌合蛋白的方法,所述方法包括用包含编码第一多肽链(包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区)的DNA分子和任选接头的第一DNA构建物转染细胞;在第一DNA构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离第一DNA构建物编码的多肽链;用包含编码第二多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区)的DNA分子的第二DNA构建物转染细胞;在第二DNA构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离第二DNA构建物编码的多肽链;在包含第一DNA构建物编码多肽链和第二DNA构建物编码多肽链的单体-二聚体杂合体得以形成的条件下,合并第一DNA构建物编码多肽链和第二DNA构建物编码多肽链;分离所述单体-二聚体杂合体。

[0025] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的DNA分子的DNA构建物转染细胞;在DNA构建物编码多肽链得以表达,其N末端为半胱氨酸,从而形成多肽链二聚体的条件下培养细胞;分离由两个拷贝的DNA构建物编码多肽链组成的二聚体;并使分离的二聚体与生物活性分子在生物活性分子主要只与二聚体一条多肽链反应的条件下发生化学反应,其中所述生物活性分子具有C末端硫酯,从而形成单体-二聚体杂合体。

[0026] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的DNA分子的DNA构建物转染细胞;在DNA构建物编码多肽链得以表达,其N末端为半胱氨酸,从而形成多肽链二聚体的条件下培养细胞;分离由两个拷贝的DNA构建物编码多肽链组成的二聚体;使分离的二聚体与生物活性分子发生化学反应,其中所述生物活性分子具有C末端硫酯,使得生物活性分子与二聚体的每条链连接;使由与生物活性分子连接的免疫球蛋白部分组成的二聚体变性,形成单体链;将单体链与包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(其没有连接生物活性分子)的多肽链结合,形成单体-二聚体杂合体;分离单体-二聚体杂合体。

[0027] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的DNA分子的DNA构建物转染细胞;在以下条件下培养细胞:DNA构建物编码的多肽链被表达为两条多肽链的混合物,其中所述混合物包含具有N末端半胱氨酸的多肽和邻近N末端处具有半胱氨酸的多肽;分离由DNA构建物编码多肽链的混合物组成的二聚体;使分离二聚体与生物活性分子发生化学反应,其中所述生物活性分子具有活性硫酯,从而形成至少一些单体-二聚体杂合体;从所述混合物分离单体-二聚体杂合体。

[0028] 本发明涉及治疗疾病或病症的方法,所述方法包括给予本发明嵌合蛋白,从而治疗疾病或病症。



[0029] 本发明另外的目标和优点将在下述说明中进行部分阐述,部分从下述说明中将容易理解到,或可从本发明的实施中发现。通过所附权利要求书中具体指出的要素和组合,本发明的目标和优点将得以实现和达到。

[0030] 应当理解,以上概述和以下详述只是示范性和说明性内容,并不对要求保护的本发明构成限制。

[0031] 附图简述

[0032] 图1是比较EP0-Fc同源二聚体或二聚体的结构与EP0-FC单体-二聚体杂合体的结构的示意图。

[0033] 图2a是嵌合蛋白VII因子-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,以及前肽(粗线),其被维生素K依赖性 $\gamma$ 羧化酶识别,所述羧化酶能修饰VII因子,以获得完全活性。所述序列随后被PACE切割,产生VII因子-Fc。

[0034] 图2b是嵌合蛋白IX因子-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,以及前肽(粗线),其被维生素K依赖性 $\gamma$ 羧化酶识别,所述羧化酶能修饰IX因子,以获得完全活性。所述序列随后被PACE切割,产生IX因子-Fc。

[0035] 图2c是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -Fc。

[0036] 图2d是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$ 接头的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$ 接头。

[0037] 图2e是嵌合蛋白Flag-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的Flag-Fc。

[0038] 图2f是嵌合蛋白Epo-CCA-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的Epo-CCA-Fc。酸性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0039] 图2g是嵌合蛋白CCB-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的CCB-Fc。碱性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0040] 图2h是嵌合蛋白Cys-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的Cys-Fc。当该序列在CHO细胞中产生时,一部分序列分子被信号肽酶不正确地切割,使得在N末端保留两个多余的氨基酸,从而防止具有C末端硫酯的生物活性分子的连接(例如通过自然连接反应)。当这些不正确切割的序列分子与正确切割的Cys-Fc形成二聚体并随后与具有C末端硫酯的生物活性分子反应时,就形成单体-二聚体杂合体。

[0041] 图2i是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -GS15-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -GS15-Fc。

[0042] 图2j是嵌合蛋白Epo-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的Epo-Fc。8氨基酸接头也以粗线表示。

[0043] 图3a是嵌合蛋白VII因子-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线)和被维生素K依赖性 $\gamma$ 羧化酶识别的前肽(粗线),所述羧化酶能修饰VII因子,以获得完全活性。翻译序列随后被PACE切割,产生成熟的VII因子-Fc。

[0044] 图3b是嵌合蛋白IX因子-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线)和被维生素K依赖性 $\gamma$ 羧化酶识别的前肽(粗线),所述羧化酶能修饰IX因子,以获得完全活性。翻译序列随后被PACE切割,产生成熟的IX因子-Fc。

[0045] 图3c是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -Fc。

[0046] 图3d是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$ 接头的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$ 接头。

[0047] 图3e是嵌合蛋白Flag-Fc的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的Flag-Fc。

[0048] 图3f是嵌合蛋白Epo-CCA-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的Epo-CCA-Fc。酸性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0049] 图3g是嵌合蛋白CCB-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的CCB-Fc。碱性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0050] 图3h是嵌合蛋白Cys-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的Cys-Fc。

[0051] 图3i是嵌合蛋白IFN $\alpha$ -GS15-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的IFN $\alpha$ -GS15-Fc。

[0052] 图3j是嵌合蛋白Epo-Fc的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的Epo-Fc。编码8氨基酸接头的核酸序列也以粗线表示。

[0053] 图4表示通过自然连接反应形成单体-二聚体杂合体的方法。

[0054] 图5a显示Fc MESNA的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)。

[0055] 图5b显示Fc MESNA的DNA序列(SEQ ID NO:5)。

[0056] 图6比较IFN $\alpha$ 同源二聚体(即由2个IFN $\alpha$ 分子组成)和IFN $\alpha$ 单体-二聚体杂合体(即包含1个IFN $\alpha$ 分子)的抗病毒活性。

[0057] 图7是VIIa因子-Fc嵌合单体-二聚体杂合体(一个VII因子分子)和VIIa因子-Fc嵌合同源二聚体(两个VII因子分子)的凝血活性的比较。

[0058] 图8比较VIIa因子-Fc嵌合单体-二聚体杂合体(一个VII因子分子)和VIIa因子-Fc嵌合同源二聚体(两个VII因子分子)在新生大鼠中的口服剂量。

[0059] 图9比较IX因子-Fc嵌合单体-二聚体杂合体(一个IX因子分子)和嵌合同源二聚体在新生大鼠中的口服剂量。

[0060] 图10是比较口服给予新生大鼠IX因子-Fc嵌合单体-二聚体杂合体(一个IX因子分子)和口服给予嵌合同源二聚体的时间进程研究。

[0061] 图11说明肺部单剂量给药后与Epo-Fc单体-二聚体杂合体相比Epo-Fc二聚体在食蟹猴(cynomolgus monkey)中的药物动力学。

[0062] 图12比较皮下给药的Epo-Fc单体-二聚体杂合体和皮下给药的 **Aranesp<sup>®</sup>**(阿法达贝泊汀)在猴中的血清浓度。

[0063] 图13比较静脉内给药的Epo-Fc单体-二聚体杂合体和静脉内给药的 **Aranesp<sup>®</sup>**(阿法达贝泊汀)和 **Epogen<sup>®</sup>**(阿法依泊汀)在猴中的血清浓度。

[0064] 图14显示获自Mimetic Red2<sup>TM</sup>柱(ProMetic LifeSciences, Inc., Wayne, NJ)的曲线及含EpoFc单体-二聚体杂合体、EpoFc二聚体和Fc的柱级份的SDS-PAGE。EpoFc单体-二聚体杂合体出现在级份11、12、13和14。EpoFc二聚体出现在级份18。Fc出现在级份1/2。

[0065] 图15显示肺部单剂量给药后带有8氨基酸接头的IFN $\beta$ Fc在食蟹猴中的药物动力学。

[0066] 图16显示食蟹猴中应答IFN $\beta$ -Fc同源二聚体和IFN $\beta$ -FcN297A单体-二聚体杂合体的新蝶呤刺激作用。

[0067] 图17a显示 $\beta$ 干扰素-Fc的核苷酸序列;图17b显示 $\beta$ 干扰素-Fc的氨基酸序列。

[0068] 图18显示T20 (a)、T21 (b) 和T1249 (c) 的氨基酸序列。

[0069] 实施方案的说明

[0070] A. 定义

[0071] 亲合标记物,在本文中用以指与另一个目的分子连接的分子,其能够与特异性结合配偶体相互作用,以分离或鉴定所述另一个目的分子。

[0072] 本发明嵌合蛋白或者与本发明嵌合蛋白实际等同的蛋白质或肽的类似物,在本文中用以指蛋白质或肽的相关氨基酸序列与特定序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的一致性。举例说,这种序列可以是源自各种物种的变体,或者它们可以通过截短、缺失、氨基酸置换或添加从特定序列衍生。两个氨基酸序列之间的一致性百分率通过标准的比对算法确定,所述算法例如Altschul等,1990,J.Mol.Biol.,215:403-410中描述的基本局部比对工具(BLAST);Needleman等,1970,J.Mol.Biol.,48:444-453的算法;Meyers等,1988,Comput.Appl.Biosci.,4:11-17的算法;或者Tatusova等,1999,FEMSMicrobiol.Lett.,174:247-250等。这些算法整合到BLASTN、BLASTP和“BLAST2序列”程序中(参见[www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST))。当采用这些程序时,可以使用缺省参数。例如,对于核苷酸序列,以下设置可用于“BLAST2序列”:程序BLASTN、匹配奖分2、错配罚分-2、开放空位罚分和拓展空位罚分分别为5和2、gapx\_dropoff50、期望值10、字长11、滤器开。对于氨基酸序列,以下设置可用于“BLAST2序列”:程序BLASTP、矩阵BLOSUM62、开放空位罚分和拓展空位罚分分别为11和1、gapx\_dropoff50、期望值10、字长3、滤器开。

[0073] 生物利用度,在本文中用以指某物质被吸收到生命系统中或在生理活动位点得以利用的程度和速度。

[0074] 生物活性分子,在本文中用以指能够在生物背景中(例如在生物体、细胞或它们的体外模型中)治疗疾病或病症,或者通过发挥某种功能或作用,或通过刺激或应答某种功能、作用或反应,将某种分子局限于或靶向体内疾病或病症位点的非免疫球蛋白分子或其片段。生物活性分子可包括至少多肽、核酸、小分子(如有机或无机小分子)之一。

[0075] 嵌合蛋白,在本文中用以指由源自第一来源的第一氨基酸序列与源自第二来源的第二氨基酸序列共价或非共价连接组成的任何蛋白质,其中第一和第二来源不相同。互不相同的第一来源和第二来源可包括两种不同的生物实体,或同一生物实体的两种不同的蛋白质,或某种生物实体和某种非生物实体。嵌合蛋白可包括例如源自至少两种不同生物来源的蛋白质。生物来源可包括任何非合成法产生的核酸或氨基酸序列(例如基因组或cDNA序列、质粒或病毒载体、天然病毒颗粒或者上述任何一种的突变体或类似物(如本文的进一步描述))。合成来源可包括通过化学法而不是通过生物系统产生的蛋白质或核酸序列(例如氨基酸序列的固相合成)。嵌合蛋白也可包括源自至少两种不同的合成来源的蛋白质或者源自至少一种生物来源和至少一种合成来源的蛋白质。嵌合蛋白还可包含源自第一来源的、与源自任何来源的核酸或者源自任何来源的有机或无机小分子共价或非共价连接的第

一氨基酸序列。嵌合蛋白在第一和第二氨基酸序列之间,或在第一氨基酸序列和核酸之间,或在第一氨基酸序列和有机或无机小分子之间,可包含接头分子。

[0076] 凝血因子,在本文中用以指在患有止血病症的对象中防止或缩短出血发作持续时间的任何天然或重组产生的分子或其类似物。换句话说,凝血因子指具有凝血活性的任何分子。

[0077] 凝血活性,在本文中用以指参与最终导致形成血纤蛋白块和/或减少出血或流血发作的严重性、持续时间或频率的生化反应级联的能力。

[0078] 二聚体,在本文中用以指包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一和第二多肽链均包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区。同源二聚体指其中两个生物活性分子相同的二聚体。

[0079] 以二聚体形式连接的单体-二聚体杂合体指包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(例如免疫球蛋白的Fc片段)、生物活性分子和连接上述两者从而使一个生物活性分子与两条多肽链(每条链包含一部分免疫球蛋白恒定区)结合的接头的嵌合蛋白。图4给出以二聚体形式连接的单体-二聚体杂合体的一个实例。

[0080] DNA构建物,在本文中用以指这样的单链或双链DNA分子或这种分子的克隆,所述DNA分子已通过人工干预而被修饰,从而含有以某种方式结合在一起的各DNA区段,所述方式使得所述各区段作为整体不会在自然界中另外存在。DNA构建物含有指导目的多肽的表达所需的信息。DNA构建物可包括启动子、增强子和转录终止子。含有指导目的多肽分泌所需信息的DNA构建物也含有至少一种分泌信号序列。

[0081] 结构域,在本文中用以指多肽(根据这个术语的定义,包括蛋白质)中具有某些区别性物理特征或功能的区域,包括例如由多肽链的一段组成的独立折叠结构。结构域可含有多肽的区别性物理特征序列,或可含有保留其结合特性(即其能结合第二结构域)的物理特征片段。结构域可与另一结构域联合。换句话说,第一结构域可自然结合第二结构域。

[0082] 片段,在本文中用以指包含具有至少2个连续氨基酸残基、至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少100个连续氨基酸残基或至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列,或者包含蛋白质、肽或多肽的任何缺失或截短的肽或多肽。

[0083] 止血,在本文中用以指停止流血或出血;或者停止血液流过血管或身体部位。

[0084] 止血障碍,在本文中用以指由于血纤蛋白块形成能力受损或无此能力导致的、以自发性或创伤性出血倾向为特征的遗传性或获得性病症。

[0085] 连接,在本文中用以指第一核酸序列与第二核酸序列共价结合。第一核酸序列可直接与第二核酸序列直接结合或并列,或者插入序列可将第一序列与第二序列共价结合。连接在本文中也可用以指第一氨基酸序列与第二氨基酸序列共价或非共价结合。第一氨基酸序列可直接与第二氨基酸序列直接结合或并列,或者插入序列可将第一氨基酸序列与第二氨基酸序列共价结合。

[0086] 有效连接,在本文中用以指第一核酸序列与第二核酸序列连接,从而两个序列都能够被表达为生物活性蛋白质或肽。

[0087] 多肽,在本文中用以指氨基酸聚合物,但不是指特定长度的产物;因此,肽、寡肽和

蛋白质都包括在多肽的定义内。这个术语并不排斥多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化、聚乙二醇化、脂质部分的添加或者任何有机或无机分子的添加。包括在此定义内的例如有含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸)的多肽和含有取代键的多肽,以及其他本领域公知的天然或非天然修饰的多肽。

[0088] 高严格性,在本文中用以包括技术人员根据例如DNA的长度容易确定的条件。通常,这种条件在Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,第1卷,1.101-104页,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)中定义,包括使用硝酸纤维素滤膜预漂洗溶液:5X SSC,0.5% SDS,1.0mM EDTA (pH8.0);杂交条件:50%甲酰胺,6X SSC,42℃(或其他类似的杂交溶液如Stark溶液,50%甲酰胺中,42℃);和漂洗条件:约68℃,0.2X SSC,0.1% SDS。技术人员会认识到,温度和漂洗溶液盐浓度可根据例如探针的长度等因素按需要进行调整。

[0089] 中等严格性,在本文中用以包括本领域普通技术人员根据例如DNA的长度容易确定的条件。Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,第1卷,1.101-104页,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)规定了基本的条件,包括使用硝酸纤维素滤膜预漂洗溶液:5X SSC,0.5% SDS,1.0mM EDTA (pH8.0);杂交条件:50%甲酰胺,6X SSC,42℃(或其他类似的杂交溶液如Stark溶液,50%甲酰胺中,42℃);和漂洗条件:60℃,0.5X SSC,0.1% SDS。

[0090] 无机小分子,在本文中用以指不含碳原子且不大于50kD的分子。

[0091] 有机小分子,在本文中用以指含至少一个碳原子且不大于50kD的分子。

[0092] 治疗,在本文中用以指以下任何一项:降低疾病或病症的严重性;减少疾病过程持续时间;改善与疾病或病症相关的一种或多种症状;为患有疾病或病症的对象提供有益效果,而不必治愈疾病或病症;预防与疾病或病症相关的一种或多种症状。

[0093] B.本发明一些实施方案提供的改进效果

[0094] 本发明提供包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白(单体-二聚体杂合体),其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白的可变区。图1将传统的融合蛋白二聚体与本发明单体-二聚体杂合体的一个实例进行对比。

[0095] 如同其他包含至少一部分免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白一样,本发明提供的嵌合蛋白与单独的生物活性分子相比,其稳定性提高,生物利用度增加。而且此外,由于嵌合蛋白的两条链中只有一条包含生物活性分子,所述嵌合蛋白的分子量比其中所有的链均包含生物活性分子的嵌合蛋白更低,虽然不想囿于任何理论,但这确会导致嵌合蛋白更容易地例如通过与FcRn受体结合而被胞转穿过上皮屏障,从而增加嵌合蛋白的半寿期。在一个实施方案中,本发明因此提供给予本发明治疗性嵌合蛋白的改进非侵入性方法(例如通过任何黏膜表面如口腔、口颊、舌下、鼻、直肠、阴道,或者通过肺部或眼部途径)。本发明因此提供与前述嵌合蛋白(例如由至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子组成的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白所有的链均包含生物活性分子)相比,使用更低频率和更少剂量而达到本发明嵌合蛋白的治疗水平的方法。

[0096] 在另一实施方案中,本发明提供给予本发明治疗性嵌合蛋白的侵入性方法,例如皮下、静脉内给药。本发明治疗性嵌合蛋白的侵入性给药方法能增加治疗性嵌合蛋白的半

寿期,结果与前述嵌合蛋白(例如由至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子组成的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白所有的链均包含生物活性分子)相比,可采用更低频率和更少剂量。

[0097] 其中只有一条链包含生物活性分子的嵌合蛋白的又一个优点是,其与其中所有的链均包含生物活性分子的嵌合蛋白相比,由于位阻减少、疏水作用减少、离子相互作用减少或分子量降低,生物活性分子对靶细胞或分子的可达性提高。

[0098] C. 嵌合蛋白

[0099] 本发明涉及包含一个生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选至少一个接头的嵌合蛋白。所述免疫球蛋白部分须同时具有N末端或氨基末端和C末端或羧基末端。所述嵌合蛋白可含有与所述免疫球蛋白部分的N末端连接的生物活性分子。或者,生物活性分子可与所述免疫球蛋白部分的C末端连接。在一个实施方案中,连接键是共价键。在另一个实施方案中,连接键是非共价键。

[0100] 嵌合蛋白可任选包含至少一个接头;因此,生物活性分子不必直接与免疫球蛋白恒定区部分连接。接头可插入在生物活性分子和免疫球蛋白恒定区部分中间。接头可连接到免疫球蛋白恒定区部分的N末端,或免疫球蛋白恒定区部分的C末端。如果生物活性分子包含至少一个氨基酸,该生物活性分子须具有N末端和C末端,接头可连接到生物活性分子的N末端,或生物活性分子的C末端。

[0101] 本发明涉及式 $X-L_a-F$ 或 $F:F-L_a-X$ 的嵌合蛋白,其中X是生物活性分子,L是任选的接头,F是至少一部分免疫球蛋白恒定区,a是任何任何整数或零。本发明还涉及式 $T_a-X-L_a-F:F$ 或 $T_a-F:F-L_a-X$ 的嵌合蛋白,其中X是生物活性分子,L是任选的接头,F是至少一部分免疫球蛋白恒定区,a是任何任何整数或零,T是第二接头或者可用以帮助嵌合蛋白纯化的标记,例如FLAG标记、组氨酸标记、GST标记、麦芽糖结合蛋白标记,(:)表示化学缔合作用,例如至少一个非肽键。在某些实施方案中,化学缔合作用即(:)是共价键。在其他实施方案中,化学缔合作用即(:)是非共价键,例如离子相互作用、疏水相互作用、亲水相互作用、范德华相互作用和氢键。技术人员应能理解,当a等于0时,X将直接与F连接。因此,例如,a可以是0、1、2、3、4、5或大于5。

[0102] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2a的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2b的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2c的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2d的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2e的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2f的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2g的氨基酸序列(SEQ ID NO:18)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2h的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2i的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2j的氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图17b的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)。

[0103] 1. 嵌合蛋白变体

[0104] 本发明嵌合蛋白的衍生物、抗本发明嵌合蛋白的抗体和抗本发明嵌合蛋白结合配偶体的抗体均被考虑在内,它们可通过置换、添加和/或缺失/截短从而改变氨基酸序列,或

者通过引入能导致产生功能相当分子的化学修饰来制备。本领域普通技术人员应能理解到,任何蛋白质序列中的某些氨基酸可被其他氨基酸置换,而不会对蛋白质的活性产生不利的影响。

[0105] 在本发明嵌合蛋白的氨基酸序列或其DNA编码序列中可制造各种变化,而又不明显丧失本发明嵌合蛋白的活性、功能或效用。由这种变化产生的衍生物、类似物或突变体及这种衍生物的应用都在本发明的范围内。在某个具体的实施方案中,所述衍生物具有功能活性,即能够表现出与本发明嵌合蛋白相关的一种或多种活性,例如FcRn结合、病毒抑制、止血、红细胞生成。有许多能够检测包含生物活性分子的嵌合蛋白的活性的试验法为本领域所公知。在生物活性分子是HIV抑制剂的情况中,可通过使用公知方法测量逆转酶活性来检测活性(参见例如Barre-Sinoussi等,1983,Science220:868;Gallo等,1984,Science224:500)。或者,可通过测量促融活性来检测活性(参见例如Nussbaum等,1994,J.Virol.68(9):5411)。在生物活性为止血的情况中,可进行StaCLot FVIIa-rTF试验来评估VIIa因子衍生物的活性(Johannessen等,2000,Blood Coagulation and Fibrinolysis11:S159)。

[0106] 序列中氨基酸的置换物可选自该氨基酸所属类别的其他成员(参见表1)。此外,各种氨基酸通常都用中性氨基酸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸来置换(参见例如MacLennan等,1998,Acta Physiol.Scand.Suppl.643:55-67;Sasaki等,1998,Adv.Biophys.35:1-24)。

[0107] 表1

[0108]

原始残基	示例性置换	典型置换
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu

[0109]

Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0110] 2. 生物活性分子

[0111] 本发明考虑任何生物活性分子作为本发明治疗性分子的用途。生物活性分子可以是多肽。生物活性分子可以是单个氨基酸。生物活性分子可包括修饰多肽。

[0112] 生物活性分子可包括脂质分子(例如类固醇或胆固醇、脂肪酸、三酰甘油、甘油磷脂或鞘脂)。生物活性分子可包括糖分子(例如葡萄糖、蔗糖、甘露糖)。生物活性分子可包括



核酸分子(例如DNA、RNA)。生物活性分子可包括有机小分子或无机小分子。

[0113] a.细胞因子和生长因子

[0114] 在一个实施方案中,生物活性分子是生长因子、激素或细胞因子或者它们的类似物或片段。生物活性分子可以是能够诱导细胞生长和增殖的任何作用物。在某个具体的实施方案中,生物活性分子是能诱导红细胞增殖的任何作用物。因此,本发明考虑的生物活性分子的一个实例是EPO。生物活性分子还可包括但不限于RANTES、MIP1 $\alpha$ 、MIP1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、GM-CSF、生长激素、肿瘤坏死因子(例如TNF $\alpha$ 或 $\beta$ )。

[0115] 生物活性分子可包括合成法或重组法生产的 $\alpha$ 干扰素,包括但不限于约25种结构相关的亚型之任一种,例如现市售供临床使用的 $\alpha$ 2a干扰素(ROFERON<sup>®</sup>, Roche)和也被批准供临床使用的 $\alpha$ 2b干扰素(INTRON<sup>®</sup>, Schering),以及各种亚型的基因工程体,包括但不限于市售的共有 $\alpha$ 干扰素(INFERGEN<sup>®</sup>, Intermune, Amgen开发)和共有人白细胞干扰素(参见例如美国专利4,695,623;4,897,471)、 $\beta$ 干扰素、表皮生长因子、促性腺素释放激素(GnRH)、亮丙立德、促卵泡激素、孕酮、雌激素或睾酮。

[0116] 可用于本发明嵌合蛋白的细胞因子和生长因子清单已有在先描述(参见例如美国专利6,086,875;6,485,726;6,030,613;W003/077834;US2003-0235536A1)。

[0117] b.抗病毒剂

[0118] 在一个实施方案中,生物活性分子是抗病毒剂,包括其片段和类似物。抗病毒剂可包括能抑制或防止病毒复制,或者能抑制或防止病毒进入细胞,或者能抑制或防止病毒逸出细胞的任何分子。在一个实施方案中,抗病毒剂是融合抑制剂。在一个实施方案中,抗病毒剂是抑制病毒复制的细胞因子。在另一实施方案中,抗病毒剂是 $\alpha$ 干扰素。

[0119] 供用于嵌合蛋白的病毒融合抑制剂可以是减少或防止病毒穿过靶细胞细胞膜的任何分子。病毒融合抑制剂可以是减少或防止在至少两个易感细胞之间形成合胞体的任何分子。病毒融合抑制剂可以是减少或防止真核细胞的脂双层膜与有包膜病毒的脂双层结合的任何分子。有包膜病毒的实例包括但不限于HIV-1、HIV-2、SIV、流感病毒、副流感病毒、Epstein-Barr病毒、CMV、单纯疱疹病毒1、单纯疱疹病毒2和呼吸道合胞病毒。

[0120] 病毒融合抑制剂可以是减少或防止病毒融合的任何分子,包括但不限于多肽、有机小分子或无机小分子。在一个实施方案中,融合抑制剂是多肽。在一个实施方案中,病毒融合抑制剂是3-36个氨基酸的多肽。在另一实施方案中,病毒融合抑制剂是3-50、10-65、10-75个氨基酸的多肽。多肽可包含天然氨基酸序列(例如gp41片段),包括该序列的类似物和突变体,或者多肽可包含自然界中不存在的氨基酸序列,只要该多肽能表现出病毒融合抑制活性。

[0121] 在一个实施方案中,病毒融合抑制剂是多肽,该多肽可通过使用至少一种计算机算法,例如ALLMOT15、107x178x4和PLZIP(参见例如美国专利6,013,263;6,015,881;6,017,536;6,020,459;6,060,065;6,068,973;6,093,799和6,228,983)鉴定为病毒融合抑制剂。

[0122] 在一个实施方案中,病毒融合抑制剂是HIV融合抑制剂。在一个实施方案中,HIV是HIV-1。在另一实施方案中,HIV是HIV-2。在一个实施方案中,HIV融合抑制剂是由HIV-1gp41包膜蛋白片段组成的多肽。HIV融合抑制剂可包含例如T20(SEQ ID NO:1)或其类似物、T21(SEQ ID NO:2)或其类似物、T1249(SEQ ID NO:3)或其类似物、Nccgp41(Louis等,2001,

J.Biol.Chem.276: (31) 29485) 或其类似物、或5螺旋 (Root等, 2001, Science291:884) 或其类似物。

[0123] 可用本领域公知的试验检测多肽、有机小分子或无机小分子的病毒融合抑制活性。这些试验包括逆转录酶试验、p24试验或合胞体试验 (参见例如美国专利5,464,933)。

[0124] 可用于本发明嵌合蛋白的抗病毒剂的清单已有在先描述 (参见例如美国专利6,086,875、6,485,726、6,030,613;W003/077834;US2003-0235536A1)。

[0125] c. 止血剂

[0126] 在一个实施方案中,生物活性分子是凝血因子或其他能促进止血的作用物,包括其片段和类似物。凝血因子可包括具有凝血活性或能激活凝血活性分子的任何分子。凝血因子可由多肽组成。凝血因子可以是例如但不限于VIII因子、IX因子、XI因子、XII因子、血纤蛋白原、凝血酶原、V因子、VII因子、X因子、XIII因子或von Willebrand因子。在一个实施方案中,凝血因子是因子VII或因子VIIa。凝血因子可以是参与外源途径的因子。凝血因子可以是参与内源途径的因子。或者,凝血因子可以是参与外源和内源两种途径的因子。

[0127] 凝血因子可以是人凝血因子,或者是非人凝血因子,例如衍自非人灵长目动物、猪或任何哺乳动物的凝血因子。凝血因子可以是嵌合凝血因子,例如凝血因子可包含人凝血因子的一部分和猪凝血因子的一部分,或者包含第一非人凝血因子的一部分和第二非人凝血因子的一部分。

[0128] 凝血因子可以是活化凝血因子。或者,凝血因子可以是非活性形式的凝血因子,例如酶原。非活性凝血因子可在连接到至少一部分免疫球蛋白恒定区后被激活。非活性凝血因子可在给药于对象后被激活。或者,非活性凝血因子可在给药前激活。

[0129] 在某些实施方案中,可用内肽酶例如成对碱性氨基酸切割酶 (PACE) 或任何PACE家族成员如PCSK1-9,包括其截短形式或其酵母同等物Kex2 (来自酿酒酵母 (*S.cerevisiae*)) 和Kex2的截短形式 (参见例如美国专利5,077,204;5,162,220;5,234,830;5,885,821;6,329,176) 切割前肽,以形成成熟的本发明嵌合蛋白 (例如VII因子、IX因子)。

[0130] d. 其他蛋白质类生物活性分子

[0131] 在一个实施方案中,生物活性分子是受体或其片段或类似物。受体可在细胞外表面上表达,或者受体可在细胞内表面上表达。受体可以是病毒受体,例如CD4、CCR5、CXCR4、CD21、CD46。生物活性分子可以是细菌受体。生物活性分子可以是在细菌定居和感染中有重要作用的胞外基质蛋白或其片段或类似物 (参见美国专利5,648,240;5,189,015;5,175,096) 或者是在粘附和感染中有重要作用的细菌表面蛋白 (参见美国专利5,648,240)。生物活性分子可以是生长因子、激素或细胞因子受体或者它们的片段或类似物,例如TNF $\alpha$ 受体、促红细胞生成素受体、CD25、CD122或CD132。

[0132] 可用于本发明嵌合蛋白的其他蛋白质类分子的清单已有在先描述 (参见例如美国专利6,086,875、6,485,726、6,030,613;W0 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0133] e. 核酸

[0134] 在一个实施方案中,生物活性分子是核酸,例如DNA、RNA。在一个具体的实施方案中,生物活性分子是可用于RNA干扰 (RNAi) 的核酸。核酸分子可以是例如但不限于反义分子或核酶或适体。

[0135] 反义RNA和DNA分子通过与靶mRNA杂交并防止蛋白质翻译来发挥作用,从而直接阻

断mRNA的翻译。反义方法涉及与靶基因mRNA互补的寡核苷酸的设计。反义寡核苷酸会与互补的靶基因mRNA转录物结合,从而防止翻译。并不要求绝对的互补性。

[0136] 本文所指的序列与RNA的一部分“互补”,是指序列具有足够的互补性,从而能够与RNA杂交形成稳定的双链体;在双链反义核酸的情况中,双链体DNA的单链可由此得以检测,或者可以检验出三链体的形成。杂交的能力取决于互补程度和反义核酸的长度。一般的说,杂交核酸越长,其可含有更多与RNA的碱基错配,且仍能形成稳定的双链体(或三链体,视情况而定)。本领域技术人员通过使用标准的方法测定杂交复合体的熔点,能确定可容忍的错配程度。

[0137] 反义核酸的长度应至少为六个核苷酸,优选反义核酸是长度为6个至约50个核苷酸的寡核苷酸。在具体的各方面,所述寡核苷酸是至少10核苷酸,至少17个核苷酸,至少25个核苷酸或至少50个核苷酸。

[0138] 寡核苷酸可以是DNA或RNA或嵌合混合体或者它们的衍生物或修饰形式,不管是单链还是双链。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链上被修饰,例如以提高分子的稳定性、杂交等。寡核苷酸可包括其他附属基团如多肽(例如用以靶向宿主体内细胞受体)、或者能促进转运通过细胞膜(参见例如Letsinger等,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA86:6553;Lemaitre等,1987,Proc.Natl.Acad.Sci.USA84:648;WO 88/09810,)或血脑屏障(参见例如WO 89/10134)的作用物、杂交引发的切割剂(参见例如Krol等,1988,BioTechniques6:958)或嵌入剂(参见例如Zon1988,Pharm.Res.5:539)。为此,寡核苷酸可缀合到另一分子,例如多肽、杂交引发的交联剂、转运剂或杂交引发的切割剂。

[0139] 设计来催化切割靶基因mRNA转录物的核酶分子也可用来防止靶基因mRNA的翻译,从而防止靶基因产物的表达(参见例如WO90/11364;Sarver等,1990,Science247,1222-1225)。

[0140] 核酶是能够催化RNA的特异性切割的酶性RNA分子。(参见Rossi1994,Current Biology4:469)。核酶的作用机制涉及核酶分子与互补靶RNA的序列特异性杂交及随后的内切核苷酸切割事件。核酶分子的组成成分必须包括一种或多种与靶基因mRNA互补的序列,且必须包括公知的引起mRNA切割的催化序列。后者序列参见例如美国专利5,093,246。

[0141] 在一个实施方案中,在位点特异性识别序列切割mRNA的核酶可用来破坏靶基因mRNA。在另一个实施方案中,考虑采用锤头核酶。在由与靶mRNA形成互补碱基对的侧翼区指示的位置,锤头核酶对mRNA进行切割。唯一的要求是靶mRNA具有以下两碱基序列:5'-UG-3'。锤头核酶的构建和生产在本领域是公知的,在Myers1995,Molecular Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference,VCH Publishers,New York及在Haseloff和Gerlach1988,Nature,334:585中有更全面的描述。

[0142] f. 小分子

[0143] 本发明还考虑使用任何治疗性小分子或药物作为本发明嵌合蛋白中的生物活性分子。可用于本发明嵌合蛋白的小分子和药物的清单已有在先描述(参见例如美国专利6,086,875、6,485,726、6,030,613;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0144] 2. 免疫球蛋白

[0145] 本发明嵌合蛋白包含至少一部分免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白由共价缔合的四条蛋白链——两条重链和两条轻链组成。每条链进一步由一个可变区和一个恒定区组成。

取决于免疫球蛋白的同种型,重链恒定区由3或4个恒定区结构域组成(例如CH1、CH2、CH3、CH4)。某些同种型还包含铰链区。

[0146] 免疫球蛋白恒定区部分可获自任何哺乳动物。免疫球蛋白恒定区部分可包括人免疫球蛋白恒定区、非人灵长目动物免疫球蛋白恒定区、牛免疫球蛋白恒定区、猪免疫球蛋白恒定区、鼠免疫球蛋白恒定区、绵羊免疫球蛋白恒定区或大鼠免疫球蛋白恒定区的一部分。

[0147] 免疫球蛋白恒定区部分可通过重组法或合成法生产。免疫球蛋白可从cDNA文库分离。免疫球蛋白恒定区部分可从噬菌体文库分离(参见例如McCafferty等,1990,Nature348:552,Kang等,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA88:4363;EP0589877B1)。免疫球蛋白恒定区部分可通过已知序列的基因重排获得(Mark等,1992,Bio/Technol.10:779)。免疫球蛋白恒定区部分可通过体内重组来分离(Waterhouse等,1993,Nucl.AcidRes.21:2265)。免疫球蛋白可以是人源化免疫球蛋白(美国专利5,585,089,Jones等,1986,Nature332:323)。

[0148] 免疫球蛋白恒定区部分可包括IgG、IgA、IgM、IgD或IgE的一部分。在一个实施方案中,免疫球蛋白是IgG。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是IgG1。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是IgG2。

[0149] 免疫球蛋白恒定区部分可包括整个重链恒定区或其片段或类似物。在一个实施方案中,重链恒定区可包含CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和/或铰链区。在另一个实施方案中,重链恒定区可包含CH1结构域、CH2结构域、CH3结构域和/或CH4结构域。

[0150] 免疫球蛋白恒定区部分可包括Fc片段。Fc片段可由免疫球蛋白的CH2和CH3结构域及免疫球蛋白的铰链区组成。Fc片段可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的Fc片段。在一个具体的实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是IgG1的Fc片段。在另一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是IgG2的Fc片段。

[0151] 在另一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是Fc新生受体(FcRn)结合配偶体。FcRn结合配偶体是能被FcRn受体特异性结合的任何分子,结果FcRn结合配偶体被FcRn受体主动转运。特异性结合指两个分子形成在生理条件下相对稳定的复合体。特异性结合的特征是高亲合性及低至中等容量,这与通常具有低亲合性及中等至高容量的非特异性结合区别开来。通常,当亲合常数 $K_A$ 大于 $10^6 M^{-1}$ ,或更优选大于 $10^8 M^{-1}$ 时,可认为结合是特异性的。如有必要,可通过改变结合条件减少非特异性结合,而又不使特异性结合发生实质改变。适当的结合条件如分子浓度、溶液的离子强度、温度、允许的结合时间、阻断剂(例如血清白蛋白、牛奶酪蛋白)的浓度等,可由技术人员使用常规技术进行优化。

[0152] 已从几种哺乳动物(包括人类)中分离出FcRn受体。人FcRn、猴FcRn、大鼠FcRn和小鼠FcRn的序列是公知的(Story等,1994,J.Exp.Med.180:2377)。FcRn受体在相对较低的pH下结合IgG(但不结合其他种类的免疫球蛋白,如IgA、IgM、IgD和IgE),沿着腔至浆膜的方向跨细胞主动转运IgG,然后在见于间质流体中的相对较高的pH下释放IgG。FcRn受体表达于成人上皮组织(美国专利6,485,726、6,030,613、6,086,875;WO 03/077834;US2003-0235536A1),包括肺部和肠道上皮(Israel等,1997,Immunology92:69)、肾近端小管上皮(Kobayashi等,2002,Am.J.Physiol.Renal Physiol.282:F358)以及鼻上皮、阴道表面和胆管表面。

[0153] 本发明FcRn结合配偶体包括能被FcRn受体特异性结合的任何分子,包括完整的

IgG、IgG的Fc片段和其他包括FcRn受体的完全结合区的片段。已根据X射线晶体学对IgG的Fc部分中FcRn受体的结合区进行了描述(Burmeister等,1994,Nature372:379)。Fc与FcRn的主要接触区域在CH2和CH3结构域的连接处附近。所有Fc-FcRn接触均在单条Ig重链之内。FcRn结合配偶体包括完整的IgG、IgG的Fc片段和其他包括FcRn的完全结合区的IgG片段。主要接触位点包括CH2结构域的氨基酸残基248、250-257、272、285、288、290-291、308-311和314和CH3结构域的氨基酸残基385-387、428和433-436。所有提及的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号均基于Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Public Health,Bethesda,MD。

[0154] IgG的Fc区可按照公认方法如定点诱变等进行修饰,以产生能被FcRn结合的修饰IgG或其Fc片段或部分。这种修饰包括远离FcRn接触位点的修饰以及接触位点内的修饰,所述修饰能保持或甚至提高与FcRn的结合能力。例如,下列人IgG1 Fc(Fc $\gamma$ 1)中的单氨基酸残基可被置换,而不明显损失Fc与FcRn的结合亲合性:P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A和K447A,其中例如P238A表示野生型脯氨酸在238位被丙氨酸置换。举例说,一个具体的实施方案掺入了N297A突变,从而除去高度保守的N-糖基化位点。除丙氨酸之外,也可在以上指定的位置用其他氨基酸置换野生型氨基酸。可个别地向Fc中引入突变,产生一百多种不同于天然Fc的FcRn结合配偶体。或者,可一起引入两个、三个或更多个这种单个突变的组合,再产生几百种FcRn结合配偶体。此外,单体-二聚体杂合体的一个FcRn结合配偶体可被突变,而另一个FcRn结合配偶体根本没有突变,或者它们都可被突变,但突变类型不同。不管什么生物活性分子(例如EPO、IFN、IX因子、T20),本文描述的任何突变(包括N297A)均可用来修饰Fc。

[0155] 以上突变中有些能赋予FcRn结合配偶体新的功能性。例如,有一个实施方案掺入了N297A,从而除去高度保守的N-糖基化位点。这个突变的效果是,减少了免疫原性,从而增加FcRn结合配偶体的循环半寿期,并使得FcRn结合配偶体不能够与Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIA、Fc $\gamma$ RIIB和Fc $\gamma$ RIIIA结合,而又不损害对FcRn的亲合性(Routledge等,1995,Transplantation60:847;Friend等,1999,Transplantation68:1632;Shields等,1995,J.Biol.Chem.276:6591)。作为上述突变带来新功能的另一个实例,在某些情况下对FcRn的亲合性可增加至超过野生型。亲合性增加可反映在“结合”速度增加、“脱离”速度降低或“结合”速度增加且“脱离”速度降低。相信增加对FcRn亲合性的突变包括T256A、T307A、E380A、N434A(Shields等,2001,J.Biol.Chem.276:6591)。

[0156] 另外,至少有三种人Fc $\gamma$ 受体似乎能识别IgG的下铰链区的结合位点,通常为氨基酸234-237。因此,新功能和潜在的免疫原性降低的另一个实例可由这个区域的突变产生,所述突变例如通过将人IgG1“ELLG”的氨基酸233-236置换成IgG2“PVA”的相应序列(缺失一

个氨基酸)。已显示当引入了这种突变时,介导各种效应子功能的Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII和Fc $\gamma$ RIII将不会结合IgG1。Ward和Ghetie1995, *Therapeutic Immunology*2:77及Armour等, 1999, *Eur. J. Immunol.*29:2613。

[0157] 在一个实施方案中,FcRn结合配偶体是包含序列PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:26) 并任选还包含选自HQSLGTQ (SEQ ID NO:27)、HQNLSDGK (SEQ ID NO:28)、HQNISDGK (SEQ ID NO:29) 或VISSHLGQ (SEQ ID NO:30) 的序列的多肽(美国专利5,739,277)。

[0158] 有两种FcRn受体能结合单个Fc分子。结晶学数据提示每个FcRn分子各结合Fc同源二聚体的单条多肽。在一个实施方案中,将FcRn结合配偶体(例如IgG的Fc片段)与生物活性分子连接,提供了生物活性分子的以下递送方式:经口、口腔内、舌下、直肠内、阴道内、作为气雾剂鼻内给药或者通过肺部途径或眼部途径给药。在另一个实施方案中,嵌合蛋白可通过侵入方式给药,例如皮下给药、静脉内给药。

[0159] 技术人员会理解,用于本发明嵌合蛋白的免疫球蛋白恒定区部分可包括其突变体或类似物,或者可包括经化学修饰的免疫球蛋白恒定区(例如聚乙二醇化)或其片段(参见例如Aslam和Dent1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences* Macmillan Reference, London)。在一个实例中,突变体能提高FcRn结合配偶体对FcRn的结合能力。还考虑用于本发明嵌合蛋白的是至少一部分免疫球蛋白恒定区的肽模拟物,例如Fc片段的肽模拟物或FcRn结合配偶体的肽模拟物。在一个实施方案中,肽模拟物用噬菌体展示或通过化学文库筛选来鉴定(参见例如McCafferty等,1990, *Nature*348:552, Kang等,1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*88:4363; EP 0 589 877 B1)。

[0160] 3. 任选的接头

[0161] 本发明嵌合蛋白可任选包含至少一个接头分子。接头可由任何有机分子组成。在一个实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)。在另一个实施方案中,接头由氨基酸组成。接头可包含1-5个氨基酸、1-10个氨基酸、1-20个氨基酸、10-50个氨基酸、50-100个氨基酸、100-200个氨基酸。在一个实施方案中,接头是八个氨基酸的接头EFAGAAAV (SEQ ID NO:31)。不管何种生物活性分子(例如EPO、IFN、IX因子),本文描述的任何接头(包括EFAGAAAV)均可用于本发明嵌合蛋白(例如单体-二聚体杂合体)。

[0162] 接头可含G<sub>n</sub>序列。接头可包含(GA)<sub>n</sub>序列(SEQ ID NO:32)。接头可包含(GGS)<sub>n</sub>序列(SEQ ID NO:33)。接头可包含(GGS)<sub>n</sub>(GGGS)<sub>n</sub>序列(SEQ ID NO:34)。在这些实例中,n可以是1-10的整数,即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。接头的实例包括但不限于GGG (SEQ ID NO:35)、SGGSGGS (SEQ ID NO:36)、GGSGSGSGSGSGG (SEQ ID NO:37)、GGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO:38)、GGSGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO:39)。接头不消除或减少嵌合蛋白的生物活性。任选接头提高嵌合蛋白的生物活性,例如通过进一步减少位阻的影响和使生物活性分子更容易达到其靶结合位点。

[0163] 在一个具体的实施方案中, $\alpha$ 干扰素的接头长度为15-25个氨基酸。在另一个具体的实施方案中, $\alpha$ 干扰素的接头长度为15-20个氨基酸。在一个具体的实施方案中, $\alpha$ 干扰素的接头长度为10-25个氨基酸。在一个具体的实施方案中, $\alpha$ 干扰素的接头长度为15个氨基酸。在一个实施方案中, $\alpha$ 干扰素的接头是(GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40),其中G表示甘氨酸、S表示丝氨酸,n是1-10的整数。在一个具体的实施方案中,n是3。

[0164] 接头也可掺入能够通过化学法(例如酯键的水解)、酶法(即掺入蛋白酶切割序列)

或光解法(例如生色团如3-氨基-3-(2-硝基苯基)丙酸(ANP))切割的部分,以从Fc蛋白中释放出生物活性分子。

[0165] 4.用特异性结合配偶体进行的嵌合蛋白二聚化

[0166] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包括包含至少第一结构域的第一多肽链和包含至少第二结构域的第二多肽,其中所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体,所述第二结构域是所述第一结构域的特异性结合配偶体。因此,所述嵌合蛋白包含由于第一结构域和第二结构域的相互作用而能够与另一条多肽形成二聚体的多肽。用异源结构域使抗体二聚化的方法是本领域公知的(美国专利5,807,706和5,910,573;Kostelny等,1992, *J. Immunol.* 148 (5):1547)。

[0167] 二聚化可通过形成共价键或者非共价键来产生,所述非共价键例如疏水相互作用;范德华力;两性肽(例如但不限于 $\alpha$ 螺旋)的交错;带有相反电荷的氨基酸,如但不限于赖氨酸和天冬氨酸、精氨酸和谷氨酸的电荷-电荷相互作用。在一个实施方案中,结构域是包含螺旋、转角和其它螺旋的螺旋束。在另一个实施方案中,结构域是包含具有几个重复氨基酸的肽的亮氨酸拉链,其中每第七个氨基酸是亮氨酸残基。在一个实施方案中,特异性结合配偶体是fos/jun。(参见Branden等,1991, *Introduction To Protein Structure*, Garland Publishing, New York)。

[0168] 在另一个实施方案中,结合由化学连接键介导(参见例如Brennan等,1985, *Science* 229:81)。在这个实施方案中,完整的免疫球蛋白或包含至少一部分免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白被切割,产生重链片段。这些片段在二巯基化物络合剂亚砷酸钠存在时被还原,以使邻近的二巯基化物稳定,防止形成分子间二硫键。所产生的片段随后被转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后,其中一种TNB衍生物通过用巯基乙胺还原再次被转化为重链片段,接着与等摩尔量的其他TNB衍生物混合,形成嵌合二聚体。

[0169] D. 核酸

[0170] 本发明涉及第一核酸构建物和第二核酸构建物,各构建物包含编码至少一部分本发明嵌合蛋白的核酸序列。在一个实施方案中,第一核酸构建物包含编码一部分免疫球蛋白恒定区的核酸序列,该序列与编码生物活性分子的第二DNA序列有效连接,所述第二DNA构建物包含编码免疫球蛋白恒定区的DNA序列,不含表面生物活性分子的第二DNA序列。

[0171] 生物活性分子可包括例如但不限于病毒融合抑制剂、凝血因子、生长因子或激素,或者前述任一项的受体或类似物或片段。核酸序列也可包括另外的本领域公知的序列或元件(例如启动子、增强子、poly A序列、亲合标记物)。在一个实施方案中,第二构建物的核酸序列可任选包括编码接头的核酸序列,所述接头序列位于编码生物活性分子和编码免疫球蛋白恒定区部分的核酸序列之间。第二DNA构建物的核酸序列可任选包括接头序列,所述序列位于编码生物活性分子和/或免疫球蛋白恒定区部分的核酸序列之前或之后。

[0172] 在一个实施方案中,核酸构建物由DNA组成。在另一个实施方案中,核酸构建物由RNA组成。核酸构建物可以是载体,例如病毒载体或质粒。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体或者鼠白血病病毒载体。质粒的实例包括但不限于pUC、pGEM和pGEX。

[0173] 在一个实施方案中,核酸构建物包含图3a的核酸序列(SEQ ID NO:7)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3b的核酸序列(SEQ ID NO:9)。在一个实施方案中,核酸构建物

包含图3c的核酸序列(SEQ ID NO:11)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3d的核酸序列(SEQ ID NO:13)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3e的核酸序列(SEQ ID NO:15)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3f的核酸序列(SEQ ID NO:17)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3g的核酸序列(SEQ ID NO:19)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3h的核酸序列(SEQ ID NO:21)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3i的核酸序列(SEQ ID NO:23)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图3j的核酸序列(SEQ ID NO:25)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图17a的核酸序列(SEQ ID NO:27)。

[0174] 由于公知的遗传密码的简并性,即不只一个密码子能编码同一个氨基酸,DNA序列可以不同于SEQ ID NO:7、9、11、13、15、17、19、21、23、25或27所示的序列,且仍编码分别具有SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26的相应氨基酸序列的多肽。这种变体DNA序列可由沉默突变导致(例如在PCR扩增过程中产生),或者可以是天然序列的有意诱变的产物。因此,本发明提供选自以下的编码本发明多肽的分离DNA序列:(a)包含SEQ ID NO:7、9、11、13、15、17、19、21、23、25或27核苷酸序列的DNA;(b)编码SEQ ID NO:6、8、10、12、14、16、18、20、22、24或26多肽的DNA;(c)能够在中等严格性条件下与(a)或(b)的DNA杂交且编码本发明多肽的DNA;(d)能够在高严格性条件下与(a)或(b)的DNA杂交且编码本发明多肽的DNA;(e)遗传密码与(a)、(b)、(c)或(d)中定义的DNA简并且编码本发明多肽的DNA。当然,这种DNA序列所编码的多肽都为本发明所包括。

[0175] 在另一个实施方案中,包含本发明嵌合蛋白编码序列的核酸分子也可包含与天然序列具有至少80%一致性的核苷酸序列。还考虑了这样的实施方案,其中包含本发明嵌合蛋白编码序列的核酸分子包含与天然序列具有至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、或至少99.9%一致性的序列。天然序列可包括没有人工改变过的任何DNA序列。一致性百分数可通过目视检查或数学计算来确定。或者,两种核酸序列的一致性百分数可通过用GAP计算机程序(版本6.0,Devereux等,1984,Nucl.Acids Res.12:387描述,the University of Wisconsin Genetics Computer Group(UWGCG)提供)对序列信息进行比较来确定。GAP程序的优选缺省参数包括:(1)核苷酸一元比较矩阵(其中一致的值为1,不一致的值为0)及Gribskov和Burgess1986,Nucl.Acids Res.14:6745的加权比较矩阵,如Schwartz和Dayhoff(编辑)1979,Atlas of Protein Sequence and Structure,National Biomedical Research Foundation,第353-358页所描述;(2)每个空位罚分为3.0,每个空位中的每个符号附加罚分0.10;(3)末端空位无罚分。也可使用序列比较领域的技术人员所用的其他程序。

#### [0176] E. 嵌合蛋白的合成

[0177] 包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子的嵌合蛋白可用本领域公知的技术来合成。例如,本发明嵌合蛋白可在细胞中重组合成(参见例如Sambrook等,1989,Molecular Cloning A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,N.Y.和Ausubel等,1989,Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Publishing Associates and Wiley Interscience,N.Y.)。或者,本发明嵌合蛋白可用公知的合成方法如固相合成法来合成。合成技术是本领域公知的(参见例如Merrifield,1973,Chemical Polypeptides,(Katsoyannis和Panayotis编辑)第335-61页;Merrifield1963,J.Am.Chem.Soc.85:2149;Davis等,1985,Biochem.Intl.10:394;Finn等,1976,The



Proteins (第3版) 2:105;Erikson等,1976,The Proteins (第3版) 2:257;美国专利3,941,763)。或者,本发明嵌合蛋白可通过联合使用重组方法和合成方法来合成。在某些应用方案中,使用重组方法或者联合使用重组和合成方法可好处。

[0178] 编码生物活性分子的核酸可方便地用本领域公知的重组技术来合成。或者,肽本身可通过化学法合成。本发明核酸可通过本领域公知的标准方法来合成,例如通过使用自动DNA合成仪(如Biosearch、Applied Biosystems等市售的DNA合成仪)来合成。举例说,寡核苷酸硫代磷酸酯可通过Stein等,1988,Nucl.AcidsRes.16:3209的方法合成,寡核苷酸甲基磷酸酯可通过使用Sarin等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:7448中描述的可控多孔玻璃聚合物支持体来制备。另外的核酸合成方法是本领域公知的。(参见例如美国专利6,015,881;6,281,331;6,469,136)。

[0179] 编码免疫球蛋白恒定区或其片段的DNA序列可从各种本领域公知的基因组或者cDNA文库中克隆。使用基于探针的方法分离这种DNA序列的技术是常规的技术,为本领域技术人员所公知。用以分离这种DNA序列的探针可基于公布的DNA序列(参见例如Hieter等,1980,Cell22:197-207)。可使用Mullis等(美国专利4,683,195)和Mullis(美国专利4,683,202)公开的聚合酶链反应(PCR)方法。文库的选择和用于分离这种DNA序列的探针的挑选工作在本领域普通技术人员的水平之内。或者,编码免疫球蛋白或其片段的DNA序列可获自本领域公知含免疫球蛋白或其片段的载体。

[0180] 为进行重组生产,将编码一部分本发明嵌合蛋白(例如一部分免疫球蛋白恒定区)的第一多核苷酸序列和编码一部分本发明嵌合蛋白(例如一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子)的第二多核苷酸序列插入合适的表达载体,即含有转录和翻译插入编码序列所需的元件的载体,或者在RNA病毒载体的情况中,含有复制和翻译所需的元件的载体。编码嵌合蛋白的核酸以合适的可读框插入载体中。

[0181] 然后,表达载体转染或共转染到合适的靶细胞中,后者将表达多肽。本领域公知的转染技术包括但不限于磷酸钙沉淀法(Wigler等,1978,Cell14:725)和电穿孔法(Neumann等,1982,EMBO,J.1:841)以及基于脂质体的试剂。可采用各种宿主-表达载体系统来表达本文描述的嵌合蛋白,包括原核细胞或真核细胞。这些细胞包括但不限于微生物,例如用含合适编码序列的重组噬菌体DNA或质粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌);用含合适编码序列的重组酵母或真菌表达载体转化的酵母或丝状真菌;用含合适编码序列的重组病毒表达载体(例如杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含合适编码序列的重组病毒表达载体(例如花椰菜花叶病毒或烟草花叶病毒)感染或用含合适编码序列的重组质粒表达载体(例如Ti质粒)转化的植物细胞系统;或动物细胞系统,包括哺乳动物细胞(例如CHO、Cos、HeLa细胞)。

[0182] 当本发明嵌合蛋白在原核细胞中重组合成时,有必要使嵌合蛋白重折叠。可用本领域公知的条件,例如在还原条件下变性,然后慢慢透析到PBS中,将这种方法生产的嵌合蛋白重折叠成生物活性构象。

[0183] 取决于所用的表达系统,表达的嵌合蛋白接着通过本领域的既定程序(例如亲和层析、尺寸排阻层析、离子交换层析)进行分离。

[0184] 表达载体可以编码用以方便纯化重组产生的嵌合蛋白的标记。其实例包括但不限于pUR278载体(Ruther等,1983,EMBO J.2:1791),其中本文描述的嵌合蛋白的编码序列可

在载体中框内连接到lacZ编码区,以产生杂交蛋白;可用pGEX载体表达带有谷胱甘肽S-转移酶(GST)标记的本发明嵌合蛋白。这些蛋白质通常是可溶的,可以容易地通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠,然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱,从细胞中纯化出来。载体包括切割位点(凝血酶或Xa因子蛋白酶或PreScission Protease<sup>TM</sup>(Pharmacia,Peapack,N.J.)),以方便在纯化后除去标记。

[0185] 为提高生产效率,可将多核苷酸设计成能编码多个本发明嵌合蛋白单位,所述各单位被酶切割位点分隔。可切割所得多肽(例如通过用合适的酶处理),以回收多肽单位。这样就能够提高由单个启动子驱动的多肽产率。当在合适的病毒表达系统中使用时,mRNA编码的各条多肽的翻译在转录物内部被例如内部核糖体进入位点(IRES)指导。因此,多顺反子构建物指导单个巨大的多顺反子mRNA的转录,后者又指导多个个体多肽的翻译。这种方法消除了多蛋白的产生和酶加工,可以显著地提高由单个启动子驱动的多肽产率。

[0186] 在转化中使用的载体通常会含有用以鉴定转化子的选择性标记。在细菌系统中,这可包括抗生素抗性基因,所述抗生素如氨苄青霉素或卡那霉素。用于培养哺乳动物细胞的选择性标记包括能赋予药物抗性的基因,所述药物如新霉素、潮霉素和氨甲蝶呤。选择性标记可以是可扩增的选择性标记。一种可扩增的选择性标记是DHFR基因。另一种可扩增的选择性标记是DHFR cDNA(Simonsenh和Levinson1983,Proc.Natl.Acad.Sci.USA80:2495)。Thilly(Mammalian Cell Technology,Butterworth Publishers,Stoneham,MA)对选择性标记进行了综述,选择性标记的挑选在本领域普通技术人员的技术水平范围内。

[0187] 选择性标记可在单独的质粒上与目的基因一起同时引入细胞,或者它们可以在同一质粒上引入。如果在同一质粒上,选择性标记和目的基因可以在不同启动子或相同启动子的控制下,后一种方式产生双顺反子信息。这种类型的构建物是本领域公知的(例如美国专利4,713,339)。

[0188] 表达系统的表达元件的强度和特异性各不相同。取决于所采用的宿主/载体系统,在表达载体中可使用多种合适转录和翻译元件的任一种,包括组成型和诱导型启动子。例如,当在细菌系统中克隆时,可使用诱导型启动子,如 $\lambda$ 噬菌体的pL、plac、ptrp、ptac(ptrp-lac杂合启动子)等等;当在昆虫细胞系统中克隆时,可使用杆状病毒多角体启动子之类的启动子;当在植物细胞系统中克隆时,可使用源自植物细胞基因组的启动子(例如热休克启动子;RUBISCO小亚基的启动子;叶绿素a/b结合蛋白的启动子)或源自植物病毒的启动子(例如CaMV的35SRNA启动子;TMV的外被蛋白启动子);当在哺乳动物细胞系统中克隆时,可使用源自哺乳动物基因组的启动子(例如金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如腺病毒晚期启动子;痘苗病毒7.5K启动子);当产生含有表达产物多重拷贝的细胞系时,基于SV40、BPV和EBV的载体可与合适的选择性标记一起使用。

[0189] 在使用植物表达载体的情况中,编码线型或非环状本发明嵌合蛋白的序列其表达可通过多种启动子的任一种来驱动。例如,可使用病毒启动子如CaMV的35SRNA和19SRNA启动子(Brissori等,1984,Nature310:511-514)或TMV的外被蛋白启动子(Takamatsu等,1987,EMBOJ.6:307-311);或者,也可使用植物启动子如RUBISCO的小亚基启动子(Coruzzi等,1984,EMBO J.3:1671-1680;Broglie等,1984,Science224:838-843)或热休克启动子,例如大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B(Gurley等,1986,Mol.Cell.Biol.6:559-565)。这些构建物可通过使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、微注射、电穿孔等,引入到植物

细胞中。有关这种技术的综述参见例如Weissbach和Weissbach1988, *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, 第VIII节, 第421-463页; Grierson和Corey1988, *Plant Molecular Biology*, 第2版, Blackie, London, 第7-9章。

[0190] 在可用以生产本发明嵌合蛋白的一个昆虫表达系统中, 使用苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 作为载体来表达外源基因。该病毒生长于草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中。可将编码序列克隆到该病毒的非必需区 (例如多角体基因) 并置于AcNPV启动子 (例如多角体启动子) 的控制下。编码序列的成功插入会导致多角体基因失活和产生非包含体重组病毒 (即缺乏由多角体基因编码的蛋白外被的病毒)。然后用这些重组病毒感染草地夜蛾细胞, 插入基因在细胞中得以表达。(参见例如Smith等, 1983, *J. Virol.* 46:584; 美国专利4,215,051)。这种表达系统的更多实例见Ausubel等 (编辑) 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, 第2卷, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience。

[0191] 可用来表达本发明嵌合蛋白的另一个系统是谷氨酰胺合成酶基因表达系统, 也称为“GS表达系统” (Lonza Biologics PLC, Berkshire UK)。这个表达系统在美国专利5,981,216中有详细的描述。

[0192] 在哺乳动物宿主细胞中, 可采用多种基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况中, 可将编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合体, 例如晚期启动子和三联前导序列。然后可通过体外或体内重组法将嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入到病毒基因组的非必需区 (例如E1或E3区) 会导致出现可生存且能够在感染宿主中表达肽的重组病毒 (参见例如Logan和Shenk1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655)。或者, 可使用痘苗7.5K启动子 (参见例如Mackett等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7415; Mackett等, 1984, *J. Virol.* 49:857; Panicali等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4927)。

[0193] 在腺病毒用作表达载体的情况中, 可将编码序列连接到腺病毒转录/翻译控制复合体, 例如晚期启动子和三联前导序列。然后可通过体外或体内重组法将嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入到病毒基因组的非必需区 (例如E1或E3区) 会导致出现可生存且能够在感染宿主中表达肽的重组病毒 (参见例如Logan和Shenk1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3655)。或者, 可使用痘苗7.5K启动子 (参见例如Mackett等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7415; Mackett等, 1984, *J. Virol.* 49:857; Panicali等, 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:4927)。

[0194] 将含有嵌合蛋白DNA构建物的宿主细胞在合适的生长培养基中培养。本文所用术语“合适的生长培养基”指含有细胞生长所需的营养成分的培养基。细胞生长所需的营养成分可包括碳源、氮源、必需氨基酸、维生素、矿物质和生长因子。培养基可任选含有牛血清或胎牛血清。在一个实施方案中, 培养基基本不含IgG。通常, 生长培养基通过例如药物选择性或者缺乏必需营养成分, 来选出含有DNA构建物的细胞, 所述营养成分由在DNA构建物上或与DNA构建物共转染的选择性标记补充。培养哺乳动物细胞通常在市售的含血清或无血清培养基 (例如MEM、DMEM) 中培养。选择适合所用具体细胞系的培养基在本领域普通技术人员的技术水平内。

[0195] 重组生产的本发明嵌合蛋白可从培养基中分离。适当生长的转化或转染宿主细胞的培养基分离出细胞材料后, 嵌合蛋白的存在可得以证实。检测嵌合蛋白的一种方法是例

如通过将嵌合蛋白或部分嵌合蛋白与能识别本发明嵌合蛋白的特异性抗体结合。抗嵌合蛋白抗体可以是针对所研究的嵌合蛋白而产生的单克隆或多克隆抗体。例如嵌合蛋白含有至少一部分免疫球蛋白恒定区。能识别多种免疫球蛋白恒定区的抗体是本领域公知的,且可通过市售获得。可用抗体进行ELISA或蛋白质印迹,以检测本发明嵌合蛋白的存在。

[0196] 本发明嵌合蛋白可以在转基因动物,如啮齿动物、牛、猪、绵羊或山羊中合成。术语“转基因动物”指其基因组中已掺入外源基因的非人类动物。因为外源基因存在于种系组织中,其可从亲代传到子代。外源基因可引入到单细胞胚胎中(Brinster等,1985,Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:4438)。生产转基因动物的方法是本领域公知的,包括生产免疫球蛋白分子的转基因学方法(Wagner等,1981,Proc.Natl.Acad.Sci.USA78:6376;McKnight等,1983,Cell34:335;Brinster等,1983,Nature306:332;Ritchie等,1984,Nature312:517;Baldassarre等,2003,Therigenology59:831;Robl等,2003,Therigenology59:107;Malassagne等,2003,Xenotransplantation10(3):267)。

[0197] 本发明嵌合蛋白也可通过联合使用化学合成技术和重组技术来生产。例如免疫球蛋白恒定区部分可如上所述进行重组表达。生物活性分子可使用公知的化学合成技术(例如固相合成)来生产。

[0198] 免疫球蛋白恒定区部分可用合适的化学连接技术与生物活性分子连接,然后与没有连接生物活性分子的一部分免疫球蛋白恒定区结合,形成本发明嵌合蛋白。在一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是Fc片段。Fc片段可重组产生,形成Cys-Fc,并与带有硫酯的生物活性分子反应,制备单体-二聚体杂合体。在另一个实施方案中,制备Fc-硫酯,并使其与带有N末端半胱氨酸的生物活性分子反应(图4)。

[0199] 在一个实施方案中,与生物活性分子连接的免疫球蛋白恒定区部分会形成同源二聚体。所述同源二聚体可通过将其暴露于变性和还原条件中(例如 $\beta$ -巯基乙醇和8M尿素)来破坏,随后与没有连接生物活性分子的一部分免疫球蛋白恒定区结合,形成单体-二聚体杂合体。然后单体-二聚体杂合体通过透析到PBS中而恢复活性和重新折叠,通过例如尺寸排阻层析或亲和层析进行分离。

[0200] 在另一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分在与生物活性分子连接之前会形成同源二聚体。在这个实施方案中,可调整生物活性分子与同源二聚体连接的反应条件(例如通过调整每种反应物的摩尔当量),以使生物活性分子只与同源二聚体的一条链连接。

[0201] 生物活性分子可化学合成为带有N末端半胱氨酸。编码一部分免疫球蛋白恒定区的序列可亚克隆到载体中,所述载体编码与壳多糖结合结构域连接的内含肽(New England Biolabs,Beverly,MA)。内含肽可连接到免疫球蛋白恒定区部分的C末端。在一个实施方案中,其C末端连接有内含肽的免疫球蛋白部分可在原核细胞中表达。在另一个实施方案中,其C末端连接有内含肽的免疫球蛋白部分可在真核细胞中表达。与内含肽连接的免疫球蛋白恒定区部分可与MESNA反应。在一个实施方案中,与内含肽连接的免疫球蛋白恒定区部分结合到柱例如壳多糖柱上,然后用MESNA洗脱。生物活性分子和免疫球蛋白部分可一起反应,使得发生亲核重排,生物活性分子通过酰胺键共价连接到免疫球蛋白部分。(Dawsen等,2000,Annu.Rev.Biochem.69:923)。通过这种方式合成的嵌合蛋白可任选在免疫球蛋白部分和生物活性分子之间包括接头肽。接头可例如在生物活性分子的N末端上合成。接头可包括肽和/或有机分子(例如聚乙二醇和/或短的氨基酸序列)。这种重组合成和化学合成的组

合方法能够快速筛选生物活性分子和接头,以最优化所需的本发明嵌合蛋白性质,例如病毒抑制、止血、红细胞的生产、生物半寿期、稳定性、与血清蛋白的结合性或者嵌合蛋白的某些其它性质。这种方法也使得可以将非天然氨基酸掺入到本发明嵌合蛋白中,这对于最优化所需的本发明嵌合蛋白性质是有用的。如需要,可使用本领域公知的条件,例如还原条件,然后慢慢透析到PBS中,将这种方法生产的嵌合蛋白再折叠成生物活性构象。

[0202] 或者,N末端半胱氨酸可以在免疫球蛋白恒定区部分(例如Fc片段)上。可利用天然Fc在226位具有半胱氨酸这个事实,产生具有N末端半胱氨酸的Fc片段(参见Kabat等,1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD)。

[0203] Fc片段可进行重组表达,以使末端半胱氨酸暴露。在一个实施方案中,Fc片段在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达。可使以Cys226(EU编号)为起始的编码Fc部分的序列紧接于编码信号肽(例如OmpA、PhoA、STII)的序列后。原核细胞可进行渗透冲击,以释放重组Fc片段。在另一个实施方案中,Fc片段在真核细胞(例如CHO细胞、BHK细胞)中生产。可使编码Fc片段的序列紧接于编码信号肽(例如小鼠Ig $\kappa$ 轻链或MHC I类Kb信号序列)的序列后,使得当重组嵌合蛋白由真核细胞合成时,信号序列能被切合,留下N末端半胱氨酸,其然后可被分离并与带有硫酯的分子(例如如果所述分子由氨基酸组成时,为C末端硫酯)进行化学反应。

[0204] Fc片段上的N末端半胱氨酸也可用在N末端切割其底物的酶(例如X<sup>a</sup>因子、肠激酶)来产生,然后分离产物并使其与带有硫酯的分子反应。

[0205] 重组表达的Fc片段可用来制备同源二聚体或单体-二聚体杂合体。

[0206] 在一个具体的实施方案中,表达其226位的Cys附近具有人 $\alpha$ 干扰素信号肽的Fc片段。当编码该多肽的构建物在CHO细胞中表达时,CHO细胞在两个不同的位置(在Cys226和信号肽内N末端方向上游2个氨基酸的Val)切割信号肽。这会产生两种Fc片段的混合物(一种具有N末端Val,另一种具有N末端Cys)。而这又会导致出现二聚体的混合物(具有末端Val的同源二聚体、具有末端Cys的同源二聚体和其中一条链具有末端Cys、另一条链具有末端Val的异源二聚体)。Fc片段可与具有C末端硫酯的生物活性分子反应,所得单体-二聚体杂合体可从混合物中分离(例如通过尺寸排阻层析)。设想当其他信号肽序列用于在CHO细胞中表达Fc片段时,会产生具有至少两种不同N末端的Fc片段的混合物。

[0207] 在另一个实施方案中,重组产生的Cys-Fc可形成同源二聚体。同源二聚体可与C末端上具有分支接头的肽反应,其中分支接头具有两个可与Cys-Fc反应的C末端硫酯。在另一个实施方案中,生物活性分子具有单个可与Cys-Fc反应的非末端硫酯。或者,分支接头可具有两个可与Fc硫酯反应的C末端半胱氨酸。在另一个实施方案中,分支接头具有两个可与Fc硫酯反应的官能团,例如2-巯基胺。生物活性分子可由氨基酸组成。生物活性分子可包括有机小分子或无机小分子。

[0208] F. 嵌合蛋白的使用方法

[0209] 本领域技术人员会认识到,本发明嵌合蛋白具有许多用途,包括但不限于患有疾病或病症的对象的治疗方法。疾病或病症可包括但不限于病毒感染、止血障碍、贫血症、癌症、白血病、炎症或自身免疫病(例如关节炎、牛皮癣、红斑狼疮、多发性硬化症)、或细菌感染(参见例如美国专利6,086,875、6,030,613、6,485,726;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0210] 1. 治疗具有红细胞缺乏的对象的方法

[0211] 本发明涉及治疗具有红细胞缺乏(例如贫血症)的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种能够诱导红细胞增殖的作用物(例如EPO),第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的能够诱导红细胞增殖的作用物。

[0212] 2. 治疗病毒感染对象的方法

[0213] 本发明涉及治疗受病毒感染或暴露于病毒的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种抗病毒剂(例如融合抑制剂或 $\alpha$ 干扰素),第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的抗病毒剂。在一个实施方案中,对象感染能够用IFN $\alpha$ 治疗的病毒,例如丙肝病毒。在一个实施方案中,对象感染HIV,例如HIV-1或HIV-2。

[0214] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白抑制病毒复制。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白防止或抑制病毒进入靶细胞,从而阻止、防止或限制病毒感染在对象中的扩散,减少受感染对象的病毒数量。通过将免疫球蛋白的一部分连接到病毒融合抑制剂,本发明提供了具有病毒融合抑制活性的嵌合蛋白,与单独的病毒融合抑制剂(例如T20、T21、T1249)相比,其稳定性和生物利用度更高。因此,在一个实施方案中,病毒融合抑制剂减少或防止HIV(例如HIV-1)对靶细胞的感染。

[0215] a. 可以治疗的病症

[0216] 本发明嵌合蛋白可用来抑制或防止肝炎病毒(例如丙肝病毒)对靶细胞的感染。嵌合蛋白可包含抑制病毒复制的抗病毒剂。

[0217] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含融合抑制剂。本发明嵌合蛋白可用来抑制或防止任何病毒对任何靶细胞的感染(参见例如美国专利6,086,875、6,030,613、6,485,726;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。在一个实施方案中,病毒是有包膜病毒,例如但不限于HIV、SIV、麻疹病毒、流感病毒、EB病毒、呼吸道合胞病毒或副流感病毒。在另一个实施方案中,病毒是无包膜病毒,如鼻病毒或脊髓灰质炎病毒。

[0218] 本发明嵌合蛋白可用来治疗已经感染病毒的对象。对象可急性感染病毒。或者,病毒也可慢性感染病毒。本发明嵌合蛋白也可用来预防性治疗有受病毒感染风险的对象,例如已知或据信与病毒或者据信感染或携带病毒的对象有密切接触的对象。本发明嵌合蛋白可用来治疗已经暴露于病毒、但尚未诊断为阳性的对象。

[0219] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染HCV的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含IgG的Fc片段和细胞因子,例如IFN $\alpha$ 。

[0220] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染HIV的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含IgG的Fc片段和包括T20的病毒融合抑制剂。

[0221] 3. 治疗止血障碍对象的方法

[0222] 本发明涉及治疗止血障碍对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二链,其中第一链包含至少一种凝血因子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区。

[0223] 本发明嵌合蛋白通过促进血纤蛋白块的形成来治疗或防止止血障碍。本发明嵌合蛋白能激活凝血级联的任何成员。凝血因子可以是外源途径、内源途径或这两种途径的参与者。在一个实施方案中,凝血因子是VII因子或VIIa因子。VIIa因子能激活X因子,后者于Va因子相互作用,将凝血酶原切割成凝血酶,而凝血酶又将血纤蛋白原切割成血纤蛋白。在另一个实施方案中,凝血因子是IX因子或IXa因子。在又一个实施方案中,凝血因子是VIII因子或VIIIa因子。在又一个实施方案中,凝血因子是von Willebrand因子、XI因子、XII因子、V因子、X因子或XIII因子。

[0224] a. 可以治疗的病症

[0225] 本发明嵌合蛋白可用来治疗任何止血障碍。可通过给予本发明嵌合蛋白治疗的止血障碍包括但不限于A型血友病、B型血友病、(冯) 韦尔布兰德病、XI因子缺乏 (PTA缺乏)、XII因子缺乏以及血纤蛋白原、凝血酶原、V因子、VII因子、X因子或XIII因子的缺乏或结构异常。

[0226] 在一个实施方案中,止血障碍是遗传性疾病。在一个实施方案中,对象患有A型血友病,嵌合蛋白包含VIII因子或VIIIa因子。在另一个实施方案中,对象患有A型血友病,嵌合蛋白包含VII因子或VIIa因子。在另一个实施方案中,对象患有B型血友病,嵌合蛋白包含IX因子或IXa因子。在另一个实施方案中,对象患有B型血友病,嵌合蛋白包含VII因子或VIIa因子。在另一个实施方案中,对象具有抗VIII因子或VIIIa因子的抑制性抗体,嵌合蛋白包含VII因子或VIIa因子。在又一个实施方案中,对象具有抗IX因子IXa因子的抑制性抗体,嵌合蛋白包含VII因子或VIIa因子。

[0227] 本发明嵌合蛋白可用来预防性地治疗患有止血障碍的对象。本发明嵌合蛋白可用来治疗患有止血障碍的对象的急性出血发作。

[0228] 在一个实施方案中,止血障碍由缺乏凝血因子 (例如IX因子、VIII因子) 导致。在另一个实施方案中,止血障碍可由缺陷凝血因子 (例如von Willebrand因子) 导致。

[0229] 在另一个实施方案中,止血障碍可能是获得性疾病。获得性疾病可由潜在的继发疾病或病症导致。不相关的病症可以是例如但不限于癌症、自身免疫病或妊娠。获得性疾病可由年老或潜在继发疾病的治疗用药 (例如癌症的化疗) 导致。

[0230] 4. 治疗需要普通止血剂的对象的方法

[0231] 本发明也涉及治疗没有止血障碍或没有患导致获得止血障碍的继发疾病或病症的对象。因此,本发明涉及治疗需要普通止血剂的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种凝血因子,第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的凝血因子。

[0232] a. 可以治疗的病症

[0233] 在一个实施方案中,需要普通止血剂的对象正在进行或将要进行外科手术。本发明嵌合蛋白可在外科手术之前或之后作为预防药而给予。本发明嵌合蛋白可在外科手术过程中或之后给予,用以控制急性出血发作。外科手术可包括但不限于肝移植、肝切除或干细胞移植。

[0234] 本发明嵌合蛋白可用来治疗没有止血障碍的对象的急性出血发作。急性出血事件可由严重外伤 (例如外科手术)、车祸、创伤、裂伤、枪伤或其他导致不可控出血的创伤事件

引起。

#### [0235] 5. 治疗形式

[0236] 本发明嵌合蛋白可通过静脉内、皮下、肌肉内,或者通过任何黏膜表面,例如口内、舌下、口腔内、舌下、鼻、直肠内、阴道内,或者通过肺部途径给药。嵌合蛋白可植入或连接到生物聚合物固相支持体,以便嵌合蛋白缓慢释放到所需的位点。

[0237] 本发明嵌合蛋白的剂量根据对象和所用的具体给药途径而改变。剂量可为0.1-100,000 $\mu$ g/kg体重。在一个实施方案中,剂量范围是0.1-1,000 $\mu$ g/kg。嵌合蛋白可连续给予,或者按特定的时间间隔给予。可采用体外试验确定最佳的剂量范围和/或给药时间表。许多测量病毒感染力的体外试验是本领域公知的。例如,可使用逆转录酶试验或rtPCR试验或分支DNA试验来测量HIV浓度。可使用StaClot试验了测量凝血活性。或者,可从由动物模型获得的剂量-反应曲线推断有效剂量。

[0238] 本发明还涉及包含病毒融合抑制剂、至少一部分免疫球蛋白和药物可接受载体或赋形剂的药物组合物。合适的药物载体的实例在E.W.Martin著的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述。赋形剂的实例可包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油一硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。组合物还可含有pH缓冲液和湿润剂或乳化剂。

[0239] 对于口内给药,药物组合物可采用常规方法制备的片剂或胶囊剂的形式。组合物也可制备成液体形态,例如糖浆剂或混悬剂。液体可包括悬浮剂(例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪)、乳化剂(卵磷脂或阿拉伯树胶)、非水介质(例如杏仁油、油状酯、乙醇或分馏植物油)和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或者山梨酸)。制剂还可包括矫味剂、着色剂和甜味剂。或者,组合物可为干品,供与水或另一合适的介质进行配制。

[0240] 对于口腔内和舌下给药,组合物可按常规方案采用片剂、锭剂或速溶膜的形式。

[0241] 对于吸入给药,按本发明使用的化合物可以喷雾剂的形式,从压力容器或喷雾器(例如在PBS中)通过合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷、二氧化碳或其他合适的气体方便地递送。在加压喷雾剂的情况中,可通过由阀门放出一定的计量数量,来确定剂量单位。可配制供在吸入器或吹入器中使用的胶囊剂和(例如明胶)药筒,使其含有化合物和合适粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0242] 可配制药物组合物供通过大剂量注射进行胃肠外给药(即静脉内或肌肉内给药)。注射剂型可以是单位剂量形式,例如与添加的防腐剂装在安瓿或多剂量容器中。组合物可以采用油相或水相介质中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式,且含有配方成分,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末形式,供与合适的介质(例如无热原的水)一起配制。

[0243] 药物组合物也可配制成栓剂或滞留型灌肠剂(例如含有常规的栓剂基质,如可可油或其他甘油酯),以供直肠内给药。

#### [0244] 6. 组合疗法

[0245] 本发明嵌合蛋白可与至少一种治疗疾病或病症的其他已知药物联合使用,来治疗患有所述疾病或病症的对象。

[0246] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染HIV的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种包含第一和第二链的嵌合蛋白,其中第一链包含HIV融合抑制剂和至



少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的HIV融合抑制剂,并联合给予至少一种其他抗HIV药物。所述其他抗HIV药物可以是证实具有抗HIV活性的任何治疗药物。作为实例,所述其他抗HIV药物可包括但不限于蛋白酶抑制剂(例如 **Amprenavir**<sup>®</sup>、**Crixivan**<sup>®</sup>、**Ritonivir**<sup>®</sup>)、逆转录酶核苷类似物(例如AZT、DDI、D4T、3TC、**Ziagen**<sup>®</sup>)、非核苷类似物逆转录酶抑制剂(例如 **Sustiva**<sup>®</sup>)、另一种HIV融合抑制剂、HIV特异性中和抗体、CD4特异性抗体、CD4模拟物如CD4-IgG2融合蛋白(美国专利申请09/912,824)或者CCR5或CXCR4特异性抗体或CCR5或CXCR4的特异性结合配偶体。

[0247] 在另一个实施方案中,本发明涉及治疗具有止血障碍的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种包含第一和第二链的嵌合蛋白,其中第一链包含至少一种凝血因子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的凝血因子,并联合给予至少一种其他凝血因子或促进止血的药物。所述其他凝血因子或促进止血的药物可以是证明具有凝血活性的任何治疗药物。举例说(但不限于这些实例),凝血因子或止血药物可包括V因子、VII因子、VIII因子、IX因子、X因子、XI因子、XII因子、XIII因子、凝血酶原或血纤蛋白原或者以上任一项的活化形式。凝血因子或止血药物也可包括抗纤溶药物,例如 $\epsilon$ -氨基己酸、凝血酸。

[0248] 7. 抑制病毒与靶细胞融合的方法

[0249] 本发明还涉及抑制HIV与哺乳动物细胞融合的体外方法,所述方法包括使哺乳动物细胞与至少一种嵌合蛋白结合,其中嵌合蛋白包含第一和第二链,其中第一链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和HIV抑制剂,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的HIV抑制剂。哺乳动物细胞可包括易受HIV感染的任何细胞或细胞系,包括但不限于原代人CD4<sup>+</sup>T细胞或巨噬细胞、MOLT-4细胞、CEM细胞、AA5细胞或在细胞表面表达CD4的HeLa细胞。

[0250] G. 分离嵌合蛋白的方法

[0251] 通常,当本发明嵌合蛋白生产出来时,它们包含在其他分子如其他蛋白质或蛋白片段的混和物当中。因此,本发明提供从含有嵌合蛋白的混合物中分离任何上述嵌合蛋白的方法。已明确知道,本发明嵌合蛋白在合适的条件下会与染料配体结合,在结合后改变这些条件能破坏染料配体与嵌合蛋白之间的键,从而提供了分离嵌合蛋白的方法。在某些实施方案中,混合物可能包含单体-二聚体杂合体、二聚体和至少一部分免疫球蛋白恒定区(例如Fc)。因此,在一个实施方案中,本发明提供分离单体-二聚体杂合体的方法。在另一个实施方案中,本发明提供分离二聚体的方法。

[0252] 因此,在一个实施方案中,本发明提供从混合物中分离单体-二聚体杂合体的方法,其中所述混合物包含

[0253] a) 包含第一和第二多肽链的单体-二聚体杂合体,其中第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含生物活性分子或免疫球蛋白可变区;

[0254] b) 包含第一和第二多肽链的二聚体,其中第一和第二链均包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区;

[0255] c) 免疫球蛋白恒定区的一部分;所述方法包括

[0256] 1) 在合适的条件下,使混合物与连接到固相支持体的染料配体接触,结果单体-二聚体杂合体和二聚体都与染料配体结合;

[0257] 2) 除去未结合的免疫球蛋白恒定区部分;

[0258] 3) 改变1)的合适条件,使单体-二聚体杂合体与连接到固相支持体的染料配体之间的结合被破坏;

[0259] 4) 分离单体-二聚体杂合体。

[0260] 在某些实施方案中,在使混合物与染料配体接触之前,可使混合物先与色谱物质如A蛋白琼脂糖凝胶等接触。用适宜的洗脱缓冲液(例如低pH缓冲液)将混合物从色谱物质上洗脱下来,然后使含有混合物的洗脱液与染料配体接触。

[0261] 使混合物与染料配体接触的合适条件可包括将混合物维持在适宜pH的缓冲液。适宜pH可包含pH3-10、4-9、5-8。在一个实施方案中,适宜pH是8.0。可使用本领域公知的任何缓冲剂,只要其将pH维持在适宜的范围内,例如tris、HEPES、PIPES、MOPS。合适的条件也可包括用以从染料配体洗脱非结合成分的洗涤缓冲液。洗涤缓冲液可以是不会破坏结合成分结合的任何缓冲液。例如,洗涤缓冲液可以是接触步骤中使用的同一缓冲液。

[0262] 一旦嵌合蛋白与染料配体结合,可通过改变合适的条件来分离嵌合蛋白。改变合适的条件可包括将盐加入到缓冲液中。可使用任何的盐,例如NaCl、KCl。盐的添加浓度应足够高,以破坏染料配体和所需成分(例如单体-二聚体杂合体)之间的结合。

[0263] 在某些其中混合物由Fc、单体-二聚体杂合体和二聚体组成的实施方案中,发现Fc不会与染料配体结合,因而被洗脱流出。二聚体与染料配体的结合比单体-二聚体杂合体更紧密。因此,破坏二聚体和染料配体之间的键(例如洗脱)所需的盐浓度比破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的键所需的盐浓度更高。

[0264] 在某些实施方案中,可使用NaCl从混合物中分离单体-二聚体杂合体。在某些实施方案中,破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的键的适宜盐浓度是200-700mM、300-600mM、400-500mM。在一个实施方案中,破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的结合所需的NaCl浓度是400mM。

[0265] 也可用NaCl从混合物中分离二聚体。通常,单体-二聚体杂合体先于二聚体从混合物中分离出来。通过将适宜浓度的盐加入到缓冲液中,从而破坏染料配体与二聚体之间的结合来分离二聚体。在某些实施方案中,破坏染料配体与二聚体之间的键的适宜盐浓度是800mM-2M、900mM-1.5M、950mM-1.2M。在一个具体实施方案中,要用1M NaCl破坏染料配体与二聚体之间的结合。

[0266] 染料配体可以是生物模拟物。生物模拟物是模拟自然的人造物质、装置或者系统。因此,在某些实施方案中,染料配体模拟分子的天然配体。染料配体可选自Mimetic Red1<sup>TM</sup>、Mimetic Red2<sup>TM</sup>、Mimetic Orangel<sup>TM</sup>、Mimetic Orange2<sup>TM</sup>、Mimetic Orange3<sup>TM</sup>、Mimetic Yellow1<sup>TM</sup>、Mimetic Yellow2<sup>TM</sup>、Mimetic Green1<sup>TM</sup>、Mimetic Blue1<sup>TM</sup>和Mimetic Blue2<sup>TM</sup>(Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。在一个具体的实施方案中,染料配体是Mimetic Red2<sup>TM</sup>(Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。在某些实施方案中,染料配体连接到固相支持体,所述固相支持体例如选自Mimetic Red1A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Red2A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic OrangelA6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Orange2A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Orange3A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Yellow1A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Yellow2A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic Green1A6XL<sup>TM</sup>、Mimetic

Blue1A6XL™和Mimetic Blue2A6XL™(Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。

[0267] 染料配体可连接到固相支持体。固相支持体可以是本领域公知的任何固相支持体(参见例如[www.seperationsNOW.com](http://www.seperationsNOW.com))。固相支持体的实例可包括珠、凝胶、膜、纳米颗粒或微球体。固相支持体可包括能与染料配体连接的任何材料(例如琼脂糖、聚苯乙烯、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶)。固相支持体可包含任何有机合成聚合物,如聚丙烯酸、乙烯基聚合物、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯和聚丙烯酰胺。固相支持体也可包含碳水化合物聚合物,例如琼脂糖、纤维素或葡聚糖。固相支持体可包含无机氧化物,如二氧化硅、氧化锆、氧化钛、二氧化铈、氧化铝、镁氧(即氧化镁)或氧化钙。固相支持体也可包括某些上述支持体的组合,包括但不限于葡聚糖-丙烯酰胺。

## 实施例

### [0268] 实施例1:分子量影响FcRn介导的胞转作用

[0269] 由各种目的蛋白和IgG Fc组成的嵌合蛋白用重组法生产(Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)), 或者在接触蛋白-Fc、MAB-β-gal(单克隆抗体结合β-gal的复合体)(Biodesign International, Saco, ME)和MAB-GH(单克隆抗体和生长激素的复合体)(Research Diagnostics, Inc. Flanders, NJ)的情况下,它们通过市售途径购得。简言之,编码目的蛋白的基因通过PCR克隆,然后亚克隆到Fc融合表达质粒。所述质粒转染到DG44CHO细胞中,挑出稳定转染子,用氨甲蝶呤扩增。嵌合蛋白同源二聚体在A蛋白柱上纯化。受试蛋白包括α干扰素、生长激素、促红细胞生成素、促卵泡激素、IX因子、β-半乳糖苷酶、接触蛋白和VIII因子。通过将蛋白连接到免疫球蛋白部分,包括FcRn受体结合配偶体,或者使用市售的全抗体(包括FcRn结合区)-抗原复合体,可以研究胞转作用与分子量的关系(参见美国专利6,030,613)。嵌合蛋白经口给予大鼠,给药后2-4小时使用ELISA测量重组产生的嵌合蛋白在血清中的水平,使用蛋白质印迹和ELISA测量市售途径获得的抗体复合体和嵌合蛋白在血清中的水平。或者,所有市售途径获得的蛋白质或复合体以及VIII因子-Fc、IX因子-Fc和Epo-Fc对照物用IOD0珠(Pierce, Pittsburgh, PA)进行碘化。结果表明,经口给予大鼠的Fc和单克隆抗体嵌合蛋白的血清水平与蛋白质的大小直接相关。经口给予的Fc嵌合蛋白的表观截断点是200-285kD。(表2)。

### [0270] 表2

[0271]

蛋白质	大小 (kD)	胞转作用
IFNα-Fc	92	++++
GH-Fc	96	+++
Epo-Fc	120	+++
FSH-Fc	170	+++
MAB:GH	172-194	+++
FIX-Fc	200	+
MAB:βGal	285-420	-

[0272]

接触蛋白-Fc	300	-
FVIII Δ -Fc	380	-

[0273] 实施例2:pcDNA3.1-Flag-Fc的克隆

[0274] 将用来鉴定或纯化蛋白质的普通亲合标记物——FLAG肽 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) 的序列克隆到pcDNA3.1-Fc质粒中,该质粒含有小鼠Igκ信号序列和紧接其后的人IgG1 Fc片段(氨基酸221-447,EU编号)。使用以下引物,通过重叠PCR创建构建物:

[0275] FlagFc-F1:5'-GCTGGCTAGCCACCATGGA-3' (SEQ ID NO:41)

[0276] FlagFc-R1:5'-CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCGTCA

[0277] CCAGTGAACCTGGAAC-3' (SEQ ID NO:42)

[0278] FlagFc-F2:5'-GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAA ACTCACACAT GCCCACC GTG CCCAGCTCCG GAACTCC-3' (SEQ ID NO:43)

[0279] FlagFc-R2:5'-TAGTGGATCCTCATTTACCCG-3' (SEQ ID NO:44)

[0280] 然后将pcDNA3.1-Fc模板添加到两个单独的PCR反应中,每个反应的50μl反应液中均含有各50pmol的引物对FlagFc-F1/R1或FlagFc-F2/R2,按厂商标准方案使用Pfu UltraDNA聚合酶(Stratagene,CA),在MJ热循环仪中进行以下循环:95℃,2分钟;(95℃,30秒,52℃,30秒,72℃,45秒)30个循环,然后72℃,10分钟。然后将这两个反应的产物混合到另一个PCR反应中(各2μl),在50μl反应液中含有各50pmol的引物对FlagFc-F1和FlagFc-R2引物,按厂商标准方案使用Pfu UltraDNA聚合酶(Stratagene,CA),在MJ热循环仪中进行以下循环:95℃,2分钟;(95℃,30秒,52℃,30秒,72℃,45秒)30个循环,然后72℃,10分钟。所得片段经凝胶纯化、消化后,插入pcDNA3.1-Fc质粒NheI-BamHI。所得质粒含有能产生FlagFc蛋白的小鼠Igκ信号序列。

[0281] 实施例3:VII因子-Fc构建物的克隆

[0282] 通过RT-PCR,从人胎儿肝脏RNA(Clontech,Palo Alto,CA)获得VII因子的编码序列。克隆区由bp36-bp1430的cDNA序列组成,刚好在终止密码子前终止。在N末端引入了SbfI位点。在C末端引入了BspEI位点。用以下引物通过PCR克隆构建物:

[0283] 下游:5'-GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGG3' (SEQ ID NO:45)

[0284] 上游:5'-CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTTTGTGCGGAAATGG3' (SEQ ID NO:46)

[0285] 循环条件如下:95℃,5分钟,然后95℃,30秒、55℃,30秒、72℃,1分45秒,30个循环,最后的延伸循环为72℃,10分钟。

[0286] 所得片段用SbfI-BspEI消化并插入pED.dC-Fc——编码IgG1的Fc片段的质粒。

[0287] 实施例4:IX因子-Fc构建物的克隆

[0288] 人IX因子编码序列,包括前肽原序列,用以下引物通过RT-PCR扩增从成人肝脏RNA获得:

[0289] natFIX-F:5'-TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGGTGAACATG-3' (SEQ ID NO:47)

[0290] F9-R:5'-TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTCTTAATCC-3' (SEQ ID NO:48)

[0291] 将20ng成人肝脏RNA(Clontech,Palo Alto,CA)和25pmol的各引物加入到RT-PCR反应中,在PLATINUM®Taq系统(Invitrogen,Carlsbad,CA)中按厂商的方案应用

SuperScript.<sup>TM</sup>一步RT-PCR。在MJ热循环仪中用以下循环进行反应:50℃,30分钟;94℃,2分钟;(94℃,30秒,58℃,30秒,72℃,1分钟)35个循环,最后72℃,10分钟。所得片段用Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) 进行凝胶纯化,用PstI-EcoRI消化,凝胶纯化,然后克隆到相应的pED.dC.XFc质粒消化物中。

[0292] 实施例5:PACE构建物的克隆

[0293] 人PACE (成对碱性氨基酸切割酶,一种内切蛋白酶)的编码序列通过RT-PCR获得。使用以下引物:

[0294] PACE-F1:5'-GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC-3' (SEQ ID NO:49)

[0295] PACE-R1:5'-GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC-3' (SEQ ID NO:50)

[0296] PACE-F2:5'-GCCAGGCCACATGACTACTCCGC-3' (SEQ ID NO:51)

[0297] PACE-R2:5'-GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC-3' (SEQ ID NO:52)

[0298] PACE-F1引物将始于起始密码子前3个核苷酸的HindIII位点加入到PACE序列的5'末端,而PACE-R2引物在氨基酸715 (出现在PACE的胞外结构域的末端)之后加入终止密码子,并将EcoRI位点加入到终止密码子的3'末端。PACE-R1和PACE-F2引物分别在内部BamHI位点的3'和5'侧退火。然后分别用各25pmol的引物对PACE-F1/R1或PACE-F2/R2进行两个RT-PCR反应,50μl RT-PCR反应液中用20ng成人肝脏RNA (Clontech, Palo Alto, CA),在PLATINUM®Taq系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中按厂商的方案应用SuperScript.<sup>TM</sup>一步RT-PCR。在MJ热循环仪中用以下循环进行反应:50℃,30分钟;94℃,2分钟;(94℃,30秒,58℃,30秒,72℃,2分钟)30个循环,然后72℃,10分钟。所得片段各自连接到载体pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中,并完全测序。然后使用BamHI/EcoRI位点,将F2-R2片段亚克隆到pcDNA6V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中,接着使用HindIII/BamHI位点,将F1-R1片段克隆到该构建物中。最终质粒pcDNA6-PACE产生可溶形式的PACE (氨基酸1-715),因为跨膜区已缺失。pcDNA6-PACE中的PACE序列基本如Harrison等,1998, Seminars in Hematology 35:4中的描述。

[0299] 实施例6:IFNα-Fc八氨基酸接头构建物的克隆

[0300] 人α干扰素2b (hIFNα) 编码序列,包括信号序列,用以下引物通过PCR从人基因组DNA获得:

[0301] IFNα-Sig-F :5'-GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3' (SEQ ID NO:53)

[0302] IFNα-EcoR-R :5'-CGTTGAATTCTTCCTTACTTCTTAACTTTCTTGC-3' (SEQ ID NO:54)

[0303] 按标准方法 (Sambrook等,1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 从373MG人星细胞瘤细胞系制备基因组DNA。简言之,离心沉淀约 $2 \times 10^5$ 个细胞,然后重新悬浮于100μl磷酸盐缓冲盐水 (pH7.4) 中,接着与等体积的裂解缓冲液 (100mM Tris pH8.0/200mM NaCl/2% SDS/5mM EDTA) 混合。加入蛋白酶K,至终浓度为100μg/ml,将样品在37℃下消化4小时,不时轻微混合。然后用苯酚:氯仿抽提样品两次,通过加入乙酸钠 (pH7.0, 至100mM) 和等体积的异丙醇沉淀DNA,然后在室温下离心沉淀10分钟。除去上清液,沉淀用冷的70%乙醇洗涤一次,风干,然后重新悬浮于TE (10mM Tris pH8.0/1mM EDTA)。

[0304] 然后,将100ng的此基因组DNA用于25μl PCR反应中,各引物为25pmol,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在

MJ热循环仪中进行以下循环:94℃,2分钟;(94℃,30秒,50℃,30秒,72℃,45秒)30个循环,最后72℃,10分钟。预期大小的条带(~550bp)用Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)凝胶纯化,用PstI/EcoRI消化,再次凝胶纯化,然后克隆到pED.dC.XFc的PstI/EcoRI位点,该位点含8氨基酸接头(EFAGAAAV)和紧接其后的人IgG1的Fc区。

[0305] 实施例7:IFN $\alpha$ Fc  $\Delta$ 接头构建物的克隆

[0306] 接着,将1 $\mu$ g实施例6的纯化pED.dC.天然人IFN $\alpha$ Fc DNA用作25 $\mu$ l PCR反应的模板,反应中使用各25pmol的IFN $\alpha$ -Sig-F引物和以下引物:

[0307] hIFN $\alpha$ NoLinkFc-R:5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTTTGTCTTCCTTACTTCTTAAACTTTTTGCAAGTTTG-3' (SEQ ID NO:55)。

[0308] 按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在RapidCycler热循环仪(Idaho Technology, Salt Lake City, UT)中进行PCR反应,在94℃变性2分钟;然后95℃,15秒,55℃,0秒,72℃,1分钟,斜率为6,18个循环,然后72℃延伸10分钟。正确大小(~525bp)的PCR产物用Gel Extraction试剂盒(Qiagen; Valencia, CA)凝胶纯化,用PstI和BspEI限制酶消化,凝胶纯化,然后亚克隆到修饰pED.dC.XFc的相应位点,其中Fc区的氨基酸231-233利用遗传密码的简并性加以改变,以掺入BspEI位点,同时保持野生型氨基酸序列。

[0309] 实施例8:IFN $\alpha$ FcGS15接头构建物的克隆

[0310] 用见于 $\Delta$ 接头构建物(在5'末端含有BspEI和RsrII位点,利用遗传密码的简并性保持氨基酸序列)的Fc创建新的主链载体,并使用此DNA为模板,用以下引物进行PCR反应:

[0311] 5'B2xGGGS:5' gtcaggatccggcgggtggaggaggagcgacaaaactcacacgtgccc3' (SEQ ID NO:56)

[0312] 3'GGGS:5' tgacgcggccgctcattttacccggagacaggg3' (SEQ ID NO:57)

[0313] 用各25pmol的引物,按厂商的标准方案使用Pfu Turbo酶(Stratagene, La Jolla, CA),在MJ热循环仪中采用以下方法进行PCR反应:95℃,2分钟;(95℃,30秒,54℃,30秒,72℃,2分钟)30个循环,然后72℃,10分钟。预期大小的条带(~730bp)用Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)凝胶纯化,用BamHI/NotI消化;再次凝胶纯化,然后克隆到BamHI/NotI消化的载体pcDNA6ID中,该载体是IRES序列和dhfr基因插入到NotI/XbaI位点的pcDNA6。

[0314] 然后,将500ng的纯化pED.dC.天然人IFN $\alpha$ Fc DNA用作25 $\mu$ l PCR反应的模板,反应引物如下:

[0315] GGGGS的5' IFN $\alpha$ :5' ccgctagcctgcaggccaccatggccttgacc3' (SEQ ID NO:58)

[0316] GGGGS的3' IFN $\alpha$ :5' ccggatccgcggccaccttccttactacgtaaacc3' (SEQ ID NO:59)。

[0317] 用各25pmol的引物,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在MJ热循环仪中按以下循环进行PCR反应:95℃,2分钟;(94℃,30秒,48℃,30秒,72℃,1分钟)14个循环,然后72℃,10分钟。预期大小的条带(~600bp)用Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA)凝胶纯化,用NheI/BamHI消化;再次凝胶纯化,然后克隆到上述pcDNA6ID/Fc载体的NheI/BamHI位点,创建IFN $\alpha$ Fc与10氨基酸Gly/Ser接头(2xGGGS)的融合体pcDNA6ID/IFN $\alpha$ -GS10-Fc。

[0318] 然后用500ng的此pcDNA6ID/IFN $\alpha$ -GS10-Fc和以下引物进行PCR反应

[0319] 5'B3XGGGS:5' (SEQ ID NO:60) gtcaggatccggtggaggcgggtccggcgggtggaggagcg  
acaaaactcacacgtgccc

[0320] 3' (SEQ ID NO:61)

[0321] fcclv-R:5'atagaagcctttgaccaggc3' (SEQ ID NO:62)。

[0322] 用各25pmol的引物,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在MJ热循环仪中按以下循环进行PCR反应:95℃,2分钟;(94℃,30秒,48℃,30秒,72℃,1分钟)14个循环,然后72℃,10分钟。预期大小的条带(504bp)用Gel Extraction试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化,用BamHI/BspEI消化,凝胶纯化68bp条带,并将其克隆到上述pcDNA6ID/IFN $\alpha$ -GS10-Fc载体的BamHI/BspEI位点,创建IFN $\alpha$ Fc与15氨基酸Gly/Ser接头(3xGGGS)的融合体pcDNA6ID/IFN $\alpha$ -GS15-Fc。

[0323] 实施例9:碱性肽构建物的克隆

[0324] 人IgG1Fc片段氨基酸221-229 (EU编号)的铰链区用碱性肽 (CCB) 替换。

[0325] 使用四种重叠寡核苷酸 (IDT, Coralville, IA) :

[0326] 1.CCB-Fc正义1:

[0327] 5'GCC GGC GAA TTC GGT GGT GAG TAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG GTG GCC CAG  
CTG AAG GCC AAG AAC CAG GCC CTG AAG AAG AAG3' (SEQ ID NO:63)

[0328] 2.CCB-Fc正义2:

[0329] 5'GTG GCC CAG CTG AAG CAC AAG GGC GGC GGC CCC GCC CCA GAG CTC CTG GGC  
GGA CCG A3' (SEQ ID NO:64)

[0330] 3.CCB-Fc反义1:

[0331] 5'CGG TCC GCC CAG GAG CTC TGG GGC GGC GCC GCC CTT GTG CTT CAG CTG  
GGC CAC CTT CTT CTT CAG GGC CTG GTT CTT G3' (SEQ ID NO:65)

[0332] 4.CCB-Fc反义2:

[0333] 5'GCC TTC AGC TGG GCC ACC TTC TTC TTC AGG GCC TGG TAC TCA CCA CCG AAT  
TCG CCG GCA3' (SEQ ID NO:66)

[0334] 将各寡核苷酸用dH<sub>2</sub>O重建成50 $\mu$ M的浓度。将各5 $\mu$ l的寡核苷酸在装有2.2 $\mu$ l限制缓冲液#2 (即终浓度为10mM的Tris HCl pH7.9, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 1mM二硫苏糖醇) (New England Biolabs, Beverly, MA) 的薄壁PCR管中合并,以互相退火,并加热至95℃,保持30秒,然后缓慢冷却2小时至25℃,让其退火。按试剂盒说明书的指示,将5pmol已退火的寡核苷酸连接到pGEMT-Easy载体。(Promega, Madison WI)。在冰浴上2分钟内,将连接混合物加入到50 $\mu$ lDH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA),在37℃孵育5分钟,在冰浴上孵育2分钟,然后涂布于LB+100 $\mu$ g/L氨苄青霉素琼脂平板,置于37℃下14小时。将单个细菌菌落挑至5ml LB+100 $\mu$ g/L氨苄青霉素中,让其生长14小时。在2000xg、4℃下离心PCR管15分钟,用Qiagen miniprep试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA),按试剂盒说明书的指示分离载体DNA。用NcoI IV-Rsr-II消化2 $\mu$ g DNA。所得片段按试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 说明书指示的Qiaquick方法进行凝胶纯化,并用NcoI IV-Rsr-II连接到pED.dEpoFc中。连接产物转化到DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌细胞中,按对pGEM T-Easy载体的描述制备DNA。

[0335] 实施例10:促红细胞生成素-酸性肽Fc构建物的克隆

[0336] EPO-Fc中人IgG1 Fc片段氨基酸221-229 (EU编号)的铰链区用酸性肽 (CCA) 替换。

使用四种重叠寡核苷酸 (IDT, Coralville, IA) :

[0337] 1.Epo-CCA-Fc正义1:

[0338] 5'CCG GTG ACA GGG AAT TCG GTG GTG AGT ACC AGG CCC TGG AGA AGG AGG TGG CCC AGC TGG AG3' (SEQ ID NO:67)

[0339] 2.Epo-CCA-Fc正义2:

[0340] 5'GCC GAG AAC CAG GCC CTG GAG AAG GAG GTG GCC CAG CTG GAG CAC GAG GGT GGT GGT CCC GCT CCA GAG CTG CTG GGC GGA CA3' (SEQ ID NO:68)

[0341] 3.Epo-CCA-Fc反义1:

[0342] 5'GTC CGC CCA GCA GCT CTG GAG CGG GAC CAC CAC CCT CGT GCT CCA GCT GGG CCA C3' (SEQ ID NO:69)

[0343] 4.Epo-CCA-Fc反义2:

[0344] 5'CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTT CTC GGC CTC CAG CTG GGC CAC CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTA CTC ACC ACC GAA TTC CCT GTC ACC GGA3' (SEQ ID NO:70)。

[0345] 将各寡核苷酸用dH<sub>2</sub>O重建成50μM的浓度。将各5μl的寡核苷酸在装有2.2μl限制缓冲液No.2 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的薄壁PCR管中合并,以互相退火,并加热至95℃,保持30秒,然后让其缓慢冷却2小时至25℃。按试剂盒说明书的指示,将5pmol已退火的寡核苷酸连接到pGEMT-Easy载体。(Promega, Madison WI)。在冰浴上2分钟内,将连接混合物加入到50μl DH5α感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 在37℃孵育5分钟,在冰浴上孵育2分钟,然后涂布于LB+100μg/L氨苄青霉素琼脂平板,置于37℃下14小时。将单个细菌菌落挑至5ml LB+100μg/L氨苄青霉素中,让其生长14小时。在2000xg、4℃下离心PCR管15分钟,用Qiagen miniprep 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA), 按试剂盒说明书的指示分离载体DNA。用Age I-Rsr-II消化2μg DNA。所得片段按试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 说明书指示的Qiaquick方法进行凝胶纯化,并用AgeI-Rsr-II连接到pED.EpoFc.1中。连接产物转化到DH5α感受态大肠杆菌细胞中,并如上所述制备DNA。

[0346] 实施例11:Cys-Fc构建物的克隆

[0347] 使用PCR和标准的分子生物学技术 (Sambrook等, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 产生哺乳动物表达构建物, 使得人IFNα信号肽的编码序列直接紧靠从第一个半胱氨酸残基 (Cys226, EU编号) 开始的Fc编码序列。经信号肽酶切割和哺乳动物细胞分泌, 就产生具有N末端半胱氨酸残基的Fc蛋白。简言之, 在PCR反应中使用引物IFNα-Sig-F (IFNα-Sig-F: 5'-GCTACTGCAGCCACCA TGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3') (SEQ ID NO:71) 和Cys-Fc-R (5'-CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCG GAGAGCCCACAGAGCAGCTTG-3') (SEQ ID NO:72), 来创建连接IFNα信号序列和从Cys226开始的FcN末端的片段。将500ng pED.dC.天然hIFNα Δ 接头加入到PCR反应中各25pmol的引物, 反应按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)。在MJ热循环仪中按以下循环进行反应: 94℃, 2分钟; (94℃, 30秒, 50℃, 30秒, 72℃, 45秒) 30个循环, 最后72℃, 10分钟。预期大小的条带 (~112bp) 用Gel Extraction试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化, 用PstI和BspEI限制酶消化, 凝胶纯化, 然后亚克隆到pED.dC.天然hIFNα Δ 接头的相应位点, 产生pED.dC.Cys-Fc (图5)。

[0348] 实施例12:蛋白质表达和Fc-MESNA的制备



[0349] Fc(人IgG1的恒定区)的编码序列通过PCR扩增从含Fc质粒获得,PCR扩增时使用标准的条件和试剂,按照厂商建议的程序亚克隆Fc编码序列NdeI/SapI。简言之,用引物5'-GTGGTCATATGGGCATTGAAGGCAGAGGCGCCGCTGCGGTCG-3'(SEQ ID NO:73)和5'-

[0350] GGTGGTTGCTCTTCCGCAAAAACCCGAGACAGGGAGAGACTCTTCTGCG-3'(SEQ ID NO:74)扩增500ng质粒pED.dC.Epo-Fc的Fc序列,使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在RapidCycler热循环仪(Idaho Technology Salt Lake City, Utah)进行反应:95℃变性2分钟,然后95℃,0秒,55℃,0秒,72℃,1分钟,斜率为4,进行18个循环,最后72℃延伸10分钟。将PCR产物亚克隆到中间克隆载体,完全测序,然后用NdeI和SapI位点,按标准程序亚克隆至pTWIN1载体中。Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版; Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press。然后用标准方法(同上)将此质粒转化到BL21(DE3) pLysS细胞中。待1升细胞培养物在37℃下生长至吸光度读数为0.8AU后,用1mM异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷诱导,然后在25℃下生长过夜。离心沉淀细胞,用20mM Tris 8.8/1% NP40/0.1mM 苯基甲磺酰氟/1μg/ml Benzonase核酸酶(Novagen Madison, WI)裂解,并在4℃下与几丁质珠(New England Biolabs; Beverly, MA)结合过夜。然后用几倍柱床体积的20mM Tris 8.5/500mM NaCl/1mM EDTA洗涤珠,并在-80℃下保藏。通过在20mM Tris 8.5/500mM NaCl/1mM EDTA/500mM 2-巯基乙磺酸(MESNA)中将蛋白质从珠上洗脱下来,产生纯化的Fc-MESNA,洗脱液直接用于以下偶联反应中。

[0351] 实施例13: VII因子-Fc单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0352] 建立表达VII因子-Fc的CHO DG-44细胞。将CHO DG-44细胞在37℃、5%CO<sub>2</sub>下,在加入核苷和核糖核苷及补充5%热失活胎牛血清的MEM Alpha中培养,直到转染。

[0353] 将DG44细胞涂布于100mm组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿50%-60%。用共10μg DNA转染一个100mm培养皿:7.5μg pED.dC.FVII-Fc+1.5μg pcDNA3/Flag-Fc+1μg pcDNA6-PACE。按Superfect转染试剂手册(Qiagen, Valencia, CA)的描述转染细胞。转染48小时后,除去培养基,用不加核苷但加入5%透析胎牛血清和10μg/ml杀稻瘟素(Invitrogen, Carlsbad, CA)和0.2mg/ml遗传霉素(Invitrogen, Carlsbad, CA)的MEM Alpha取代。10天后,用0.25%胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到T25组织培养瓶中,继续进行选择10-14天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加25nM氨甲蝶呤扩大蛋白质的表达。

[0354] 用约2×10<sup>7</sup>个细胞接种1700cm<sup>2</sup>滚瓶(Corning, Corning, NY)中的300ml生长培养基,所述生长培养基补充有5μg/ml维生素K<sub>3</sub>(甲基萘醌亚硫酸氢钠)(Sigma, StLouis, MO)。将滚瓶在5%CO<sub>2</sub>、37℃下温育72小时。然后用300ml无血清生产培养基(含5μg/ml牛胰岛素和10μg/ml庆大霉素的DMEM/F12)替换生长培养基,所述生产培养基补充有5μg/ml维生素K<sub>3</sub>。连续10天每天收集生产培养基(条件培养基)并在4℃下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。集中的培养基首先用Sartoclean玻璃纤维过滤器(3.0μm+0.2μm)(Sartorius Corp. Göttingen, 德国)澄清,然后用Acropack500过滤器(0.8μm+0.2μm)(Pall Corp., East Hills, NY)澄清。然后用Pellicon Biomax切向流过滤盒(10kDa MWC0)(Millipore Corp., Billerica, MA)将澄清培养基浓缩约20倍。

[0355] 然后将浓缩培养基流过A蛋白琼脂糖凝胶4快速流动柱(AP Biotech, Piscataway,

NJ),以从浓缩培养基中捕捉Fc嵌合体。 $5 \times 5\text{cm}$  (100ml)柱每ml柱体积加样品 $<5\text{mg}$  Fc蛋白,线性流速为 $100\text{cm/小时}$ ,使残留时间 $\geq 3$ 分钟。然后用 $>5$ 倍柱体积的 $1\times$  DPBS洗涤柱,以除去非特异性结合蛋白。结合蛋白用 $100\text{mM}$ 甘氨酸 $\text{pH}3.0$ 洗脱。然后通过向10份洗脱级份中加入1份 $1\text{M}$  Tris-HCl ( $\text{pH}8$ ),中和含蛋白峰的洗脱级份。

[0356] 为从制备产物中除去FLAG-Fc同源二聚体(即其中FLAG肽被表达为与两个Fc分子的融合体的嵌合Fc二聚体),将A蛋白琼脂糖凝胶4快速流动集合物流过Unosphere S阳离子交换柱(BioRad Corp.,Richmond,CA)。在该柱的操作条件下,FLAG-Fc单体-二聚体杂合体不带电荷(FLAG-Fc的理论 $\text{pI}=6.19$ ),从而从柱中流过,而hFVII-Fc构建物带正电荷,因此与柱子结合,要用更高的离子强度来洗脱。A蛋白琼脂糖凝胶4快速流动集合物先透析到 $20\text{mM}$  MES, $20\text{mM}$  NaCl, $\text{pH}6.1$ 中。然后将透析物料以 $150\text{cm/小时}$ 的流速加样到 $1.1 \times 11\text{cm}$  ( $9.9\text{ml}$ )柱。在洗涤和洗脱过程中,将流速提高到 $500\text{cm/小时}$ 。用8倍柱体积的 $20\text{mM}$  MES, $20\text{mM}$  NaCl, $\text{pH}6.1$ 和8倍柱体积的 $20\text{mM}$  MES, $40\text{mM}$  NaCl, $\text{pH}6.1$ 依次洗涤柱。结合蛋白用 $20\text{mM}$  MES, $750\text{mM}$  NaCl, $\text{pH}6.1$ 洗脱。集中含蛋白峰的洗脱级份,通过 $0.2\mu\text{m}$ 滤片过滤除菌,然后在 $-80^\circ\text{C}$ 下保藏。

[0357] 用抗FLAG MAB亲和柱,将其中hFVII融合到两个Fc分子的嵌合Fc二聚体与含一个FLAG肽和一个hFVII融合体的嵌合Fc二聚体分离开来。UnosphereS洗脱液集合用 $20\text{mM}$  Tris, $50\text{mM}$  NaCl, $5\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ , $\text{pH}8$ 稀释(1:1),然后以 $60\text{cm/小时}$ 的线性流速加样到 $1.6 \times 5\text{cm}$  M2抗FLAG琼脂糖凝胶柱(Sigma Corp.,St.Louis,MO)。加样要做到 $<2.5\text{mg}$ 单体-二聚体杂合体/ml柱体积。加样后,用5倍柱体积的 $20\text{mM}$  Tris, $50\text{mM}$  NaCl, $5\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ , $\text{pH}8.0$ 洗涤柱子,然后用 $100\text{mM}$ 甘氨酸, $\text{pH}3.0$ 洗脱单体-二聚体杂合体。然后,通过向10份洗脱级份中加入1份 $1\text{M}$  Tris-HCl ( $\text{pH}8$ ),中和含蛋白峰的洗脱级份。在 $-80^\circ\text{C}$ 下保藏集合物。

#### [0358] 实施例14:IX因子-Fc同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0359] 建立表达IX因子-Fc的CHO DG-44细胞。将DG44细胞涂布于 $100\text{mm}$ 组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿 $50\%-60\%$ 。用共 $10\mu\text{g}$  DNA转染一个 $100\text{mm}$ 培养皿:对于同源二聚体转染,使用 $8\mu\text{g}$  pED.dC.IX因子-Fc+ $2\mu\text{g}$  pcDNA6-PACE;对于单体-二聚体杂合体转染,使用 $8\mu\text{g}$  pED.dC.IX因子-Fc+ $1\mu\text{g}$  pcDNA3-FlagFc+ $1\mu\text{g}$  pcDNA6-PACE。按Superfect转染试剂手册(Qiagen,Valencia,CA)的描述转染细胞。转染48小时后,除去培养基,对于两个转染试验,均用不加核苷但加入 $5\%$ 透析胎牛血清和 $10\mu\text{g/ml}$ 杀稻瘟素(Invitrogen,Carlsbad,CA)的MEM Alpha取代,而对于单体-二聚体杂合体转染,还补充 $0.2\text{mg/ml}$ 遗传霉素(Invitrogen,Carlsbad,CA)。3天后,用 $0.25\%$ 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到T25组织培养瓶中,继续进行选择10-14天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过分别对同源二聚体和单体-二聚体杂合体添加 $10\text{nM}$ 或 $100\text{nM}$ 氨甲蝶呤,扩大蛋白质的表达。

[0360] 对于两种细胞系,都是用约 $2 \times 10^7$ 个细胞接种 $1700\text{cm}^2$ 滚瓶(Corning,Corning,NY)中的 $300\text{ml}$ 生长培养基,所述生长培养基补充有 $5\mu\text{g/ml}$ 维生素 $\text{K}_3$ (甲基萘醌亚硫酸氢钠)(Sigma,StLouis,MO)。将滚瓶在 $5\%\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$ 下温育约72小时。然后用 $300\text{ml}$ 无血清生产培养基(含 $5\mu\text{g/ml}$ 牛胰岛素和 $10\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素的DMEM/F12)替换生长培养基,所述生产培养基补充有 $5\mu\text{g/ml}$ 维生素 $\text{K}_3$ 。连续10天每天收集生产培养基(条件培养基)并在 $4^\circ\text{C}$ 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用

SuporCap-100 (0.8/0.2 $\mu$ m) 过滤器 (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) 澄清培养基。以下所有步骤均在4℃下进行。将澄清培养基加样到A蛋白琼脂糖凝胶,用5倍柱体积的1X PBS (10mM磷酸盐, pH7.4, 2.7mM KCl和137mM NaCl) 洗涤,用0.1M甘氨酸 (pH2.7) 洗脱,然后用1/10体积的1M Tris-HCl (pH9.0) 中和。然后将蛋白质透析到PBS中。

[0361] 因为其中含有FIX-Fc:FIX-Fc同源二聚体、FIX-Fc:Flag-Fc单体-二聚体杂合体和Flag-Fc:Flag-Fc同源二聚体的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩,以4ml/分钟 (36cm/小时) 的流速加样到2.6cm $\times$ 60cm (318ml) Superdex200Prep Grade柱,然后用3倍柱体积的1X PBS洗脱。收集与UV检测器上的两个峰对应的级份,用SDS-PAGE进行分析。第一个峰的级份含FIX-Fc:FIX-Fc同源二聚体或FIX-Fc:Flag-Fc单体-二聚体杂合体,而第二个峰含Flag-Fc:Flag-Fc同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含Flag-Fc同源二聚体的级份,以60cm/小时的线性流速直接加样到1.6 $\times$ 5cm M2抗FLAG琼脂糖凝胶柱 (Sigma Corp., St. Louis, MO)。加样后,用5倍柱体积的PBS洗涤柱子。然后用100mM甘氨酸 (pH3.0) 洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入1/10体积的1M Tris-HCl中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原SDS-PAGE进行分析。将级份透析到PBS中,浓缩至1-5mg/ml,并在-80℃下保藏。

[0362] 实施例15: IFN $\alpha$ 同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0363] 建立表达hIFN $\alpha$ 的CHO DG-44细胞。将DG44细胞涂布于100mm组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿50%-60%。用共10 $\mu$ gDNA转染一个100mm培养皿:对于同源二聚体转染,用10 $\mu$ g hIFN $\alpha$ Fc构建物;对于单体-二聚体杂合体转染,用8 $\mu$ g hIFN $\alpha$ Fc构建物+2 $\mu$ g pcDNA3-FlagFc。按Superfect转染试剂手册 (Qiagen, Valencia, CA) 的描述转染细胞。转染48小时后,除去培养基,用不加核苷但加入5%透析胎牛血清的MEM Alpha取代,而对于单体-二聚体杂合体转染,还补充0.2mg/ml遗传霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。3天后,用0.25%胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到T25组织培养瓶中,继续进行选择10-14天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加10-50nM氨甲蝶呤,扩大蛋白质的表达。

[0364] 对于所有细胞系,都是用约2 $\times$ 10<sup>7</sup>个细胞接种1700cm<sup>2</sup>滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的300ml生长培养基。将滚瓶在5%CO<sub>2</sub>、37℃下温育约72小时。然后用300ml无血清生产培养基 (含5 $\mu$ g/ml牛胰岛素和10 $\mu$ g/ml庆大霉素的DMEM/F12) 替换生长培养基。连续10天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在4℃下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI) 的SuporCap-100 (0.8/0.2 $\mu$ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在4℃下进行。将澄清培养基加样到A蛋白琼脂糖凝胶,用5倍柱体积的1XPBS (10mM磷酸盐, pH7.4, 2.7mM KCl和137mM NaCl) 洗涤,用0.1M甘氨酸 (pH2.7) 洗脱,然后用1/10体积的1M Tris-HCl (pH9.0) 中和。然后将蛋白质透析到PBS中。

[0365] 因为其中含有IFN $\alpha$ Fc:IFN $\alpha$ Fc同源二聚体、IFN $\alpha$ Fc:FlagFc单体-二聚体杂合体和FlagFc:FlagFc同源二聚体 (或者 $\Delta$ 接头或GS15接头) 的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩,以4ml/分钟 (36cm/小时) 的流速加样到2.6cm $\times$ 60cm (318ml) Superdex200Prep Grade柱,然后用3倍柱体积的1X PBS洗脱。收集与UV检测器上的两个峰对应的级份,用SDS-PAGE进行分析。第一个峰的级份含IFN $\alpha$ Fc:IFN $\alpha$ Fc同源二聚体或

IFN $\alpha$ :Fc:FlagFc单体-二聚体杂合体,而第二个峰含Flag-Fc:Flag-Fc同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含Flag-Fc同源二聚体的级份,以60cm/小时的线性流速直接加样到1.6 $\times$ 5cmM2抗FLAG琼脂糖凝胶柱(Sigma Corp.,St.Louis,MO)。加样后,用5倍柱体积的PBS洗涤柱子。然后用100mM甘氨酸(pH3.0)洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入1/10体积的1M Tris-HCl中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原SDS-PAGE进行分析。将级份透析到PBS中,浓缩至1-5mg/ml,并在-80℃下保藏。

#### [0366] 实施例16:卷曲螺旋蛋白的表达与纯化

[0367] 将质粒pED.dC Epo-CCA-Fc和pED.dC CCB-Fc单独或者以1:1的比例共同转染到CHO DG44细胞中。细胞按Superfect转染试剂手册(Qiagen,Valencia,CA)的描述进行转染。48小时后除去培养基,用不加核苷但加入5%透析胎牛血清的MEM Alpha取代。在A蛋白柱上按本领域公知的方法进行亲和层析纯化。另外还可用尺寸排阻层析实现纯化。

#### [0368] 实施例17:Cys-Fc的表达与纯化

[0369] 建立表达Cys-Fc的CHO DG-44细胞。用Superfect转染试剂(Qiagen;Valencia,CA)按厂商的方案,将含小鼠二氢叶酸还原酶(dhfr)基因的pED.dC.Cys-Fc表达质粒转染到CHO DG44(dhfr缺陷型)细胞,然后在补充有5%透析FBS和青霉素/链霉素抗生素(Invitrogen;Carlsbad,CA)的 $\alpha$ MEM(不含核苷)组织培养基中培养10天,选择稳定的转染子。然后用50nM 氨甲蝶呤扩增所得的稳定转染细胞集合,以增加表达。用约 $2 \times 10^7$ 个细胞接种1700cm<sup>2</sup>滚瓶(Corning,Corning,NY)中的300ml生长培养基。将滚瓶在5%CO<sub>2</sub>、37℃下温育约72小时。然后用300ml无血清生产培养基(含5 $\mu$ g/ml牛胰岛素和10 $\mu$ g/ml庆大霉素的DMEM/F12)替换生长培养基。连续10天每天收集生产培养基(条件培养基)并在4℃下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用Pa11 Gelman Sciences(Ann Arbor,MI)的SuporCap-100(0.8/0.2 $\mu$ m)过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在4℃下进行。将澄清培养基加样到A蛋白琼脂糖凝胶,用5倍柱体积的1XPBS(10mM磷酸盐,pH7.4,2.7mM KCl和137mM NaCl)洗涤,用0.1M甘氨酸(pH2.7)洗脱,然后用1/10体积的1M Tris-HCl(pH9.0)中和。然后将蛋白质透析到PBS中,直接用于偶联反应中。

#### [0370] 实施例18:将T20-硫酯与Cys-Fc偶联

[0371] 在室温下,将Cys-Fc(4mg,终浓度3.2mg/ml)和T20-硫酯或T20-PEG-硫酯(2mg,约5摩尔当量)在0.1M Tris/10mM MESNA中温育16小时。用还原性样品缓冲液进行SDS-PAGE(Tris-Gly胶)分析,显示存在比Fc对照约大5kDa的新条带(偶联物转化率>40-50%)。事先对Cys-Fc和未反应Cys-Fc进行的N末端测序显示,信号肽在一部分分子中被不正确地加工,留下(Cys)-Fc(其会通过自然连接与肽-硫酯反应)与(Val)-(Gly)-(Cys)-Fc(其不会通过自然连接与肽-硫酯反应)的混合物。由于反应条件不足以破坏Cys-Fc分子的二聚化,该反应产生T20-Cys-Fc:T20-Cys-Fc同源二聚体、T20-Cys-Fc:Fc单体-二聚体杂合体和Cys-Fc:Cys-FcFc二聚体的混合物。用上述尺寸排阻层析法纯化蛋白,以分离所述三种组分。结果在非还原条件下通过SDS-PAGE分析进行确认。

#### [0372] 实施例19:IFN $\alpha$ 抗病毒活性试验

[0373] 用CPE(致细胞病变效应)试验确定IFN $\alpha$ 融合蛋白的抗病毒活性(IU/ml)。将A549细胞涂布于含生长培养基(补充有10%胎牛血清(FBS)和2mM L-谷氨酰胺的RPMI1640)的96孔组织培养板,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养2小时。用生长培养基稀释IFN $\alpha$ 标准品和IFN $\alpha$ 融合蛋白,

并加到细胞中,试验重复三次,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下温育20小时。温育后,除去各孔的所有培养基,用生长培养基稀释脑心肌炎病毒(EMC),并将其加入到各孔中(3000pfu/孔),但对照孔不加入。将培养板在37℃、5%CO<sub>2</sub>下温育28小时。用10%冷三氯乙酸(TCA)固定活细胞,然后用磺基罗丹明B(SRB)按公开的方案(Rubinstein等,1990,J.Natl.Cancer Inst.82,1113)染色。SRB染料用10mM tris pH10.5溶解后,用分光光度计在490nm处读数。通过将活性与公知的标准曲线(世界卫生组织IFN $\alpha$ 2b国际标准,5-0.011IU/ml)比较,对样品进行分析。结果在以下表3和图6中显示,表明单体-二聚体杂合体抗病毒活性提高。

[0374] 表3:干扰素抗病毒试验:同源二聚体与单体-二聚体杂合体

[0375]

蛋白质	抗病毒活性 (IU/nmol)	标准偏差
IFN $\alpha$ Fc 8 氨基酸接头同源二聚体	$0.45 \times 10^5$	$0.29 \times 10^5$
IFN $\alpha$ Fc 8 氨基酸接头:FlagFc 单体-二聚体杂合体	$4.5 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$
IFN $\alpha$ Fc $\Delta$ 接头同源二聚体	$0.22 \times 10^5$	$0.07 \times 10^5$
IFN $\alpha$ Fc $\Delta$ 接头:FlagFc 单体-二聚体杂合体	$2.4 \times 10^5$	$0.0005 \times 10^5$
IFN $\alpha$ Fc GS15 接头同源二聚体	$2.3 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$
IFN $\alpha$ Fc GS15 接头单体-二聚体杂合体	$5.3 \times 10^5$	$0.15 \times 10^5$

[0376] 实施例20:FVIIa凝血活性分析

[0377] StaClot FVIIa-rTF检测试剂盒购自Diagnostica Stago (Parsippany,NJ),按Johannessen等,2000,Blood Coagulation and Fibrinolysis11:S159的描述进行改装。用FVIIa世界卫生组织标准89/688制备标准曲线。这个试验用来比较单体-二聚体杂合体与同源二聚体的凝血活性。结果显示单体-二聚体杂合体的凝血活性是同源二聚体的四倍(图7)。

[0378] 实施例21:FVIIa-Fc经口给予10天龄大鼠

[0379] 25克9天龄新生Sprague Dawley大鼠购自Charles River (Wilmington,MA),并让其适应24小时。经口给予大鼠FVIIaFc同源二聚体、单体-二聚体杂合体或两者的50:50混合物。以1mg/kg的剂量给予体积为200 $\mu$ l的FVIIaFc溶液。该溶液由Tris-HCl缓冲液(pH7.4)和5mg/ml大豆胰蛋白酶抑制剂组成。在几个时间点用CO<sub>2</sub>使大鼠安乐死,通过心脏穿刺法抽取200 $\mu$ l血液。通过加入3.8%柠檬酸钠溶液并在室温下以1268xg的速度离心,获得血浆。血浆样品马上进行试验,或者在20℃下冻藏。经口给予的单体-二聚体杂合体与同源二聚的VII因子相比,其最大血清浓度(C<sub>max</sub>)明显更高(图8)。

[0380] 实施例22:IX因子-Fc经口给予新生大鼠

[0381] 以10nmol/kg的近似等摩尔剂量,经口给予10天龄新生Sprague Dawley大鼠200 $\mu$ l

FIX-Fc同源二聚体或FIX-Fc:FlagFc单体-二聚体杂合体,所用缓冲液为0.1M磷酸钠缓冲液,pH6.5,含5mg/ml大豆胰蛋白酶抑制剂和0.9%NaCl。注射后1、2、4、8、24、48和72小时,用CO<sub>2</sub>使大鼠安乐死,通过心脏穿刺法抽取血液,通过加入3.8%柠檬酸钠溶液并在室温下以1268xg的速度离心,获得血浆。然后离心沉淀样品,收集血清,在-20℃下冻藏,直到通过ELISA对融合蛋白进行分析。

[0382] 实施例23:IX因子-FcELISA

[0383] 用50mM碳酸盐缓冲液(pH9.6)以1:100稀释山羊抗IX因子IgG(Affinity Biologicals,Ancaster,加拿大),以100μl/孔包被96孔Immulon4HBX ELISA板(Thermo LabSystems,Vantaa,芬兰)。将各板在环境温度下温育2小时,或者在4℃下用塑料膜密封过夜。用TECAN洗板机用PBST洗涤各孔四次(300μl/孔)。各孔用PBST+6%BSA(200μl/孔)封闭,然后在环境温度下温育90分钟。用TECAN洗板机用PBST洗涤各孔四次(300μl/孔)。将标准品和实施例18中描述的大鼠血液样品加入各孔(100μl/孔),然后在环境温度下温育90分钟。样品和标准品用HBET缓冲液(HBET:5.95g HEPES,1.46g NaCl,0.93g Na<sub>2</sub>EDTA,2.5g牛血清白蛋白,0.25ml Tween-20,用dH<sub>2</sub>O定容至250ml,pH调至7.2)稀释。标准曲线的范围是200ng/ml至0.78ng/ml,该范围内的稀释倍数是2倍。用TECAN洗板机用PBST洗涤各孔四次(300μl/孔)。用HBET以1:25,000稀释耦合的山羊抗人IgG-Fc-HARP抗体(Pierce,Rockford,IL),并以100μl/孔加入到各孔。将各板在环境温度下温育90分钟。用TECAN洗板机用PBST洗涤各孔四次(300μl/孔)。按厂商的说明加入N-四甲联苯胺过氧化物酶底物(TMB)(Pierce,Rockford,IL)(100μl/孔),使各板显影。各板在室温下暗处温育5分钟,或者直至显影。反应应用2M硫酸(100μl/孔)终止。用SpectraMax plusplate读数器(Molecular Devices,Sunnyvale,CA)在450nm处读取吸光度。对第4小时抽取的血液分析显示,IX因子-Fc单体-二聚体杂合体和IX因子-Fc同源二聚体的血清浓度差别超过10倍(图9)。结果表明IX因子-Fc单体-二聚体杂合体水平始终比IX因子-Fc同源二聚体高(图10)。

[0384] 实施例24:Epo-Fc的克隆

[0385] 从编码成熟促红细胞生成素编码序列的质粒(事先通过RT-PCR从Hep G2mRNA获得)和以下所示引物hepoxba-F和hepoeco-R,通过PCR扩增获得成熟Epo编码区。引物hepoxba-F含XbaI位点,而引物hepoeco-R含EcoRI位点。在Idaho Technology RapidCycler中使用Vent聚合酶进行PCR:95℃变性15秒,然后(95℃,0秒,55℃,0秒,72℃,1分钟)28个循环,斜率为6.0,然后72℃延伸3分钟。凝胶纯化约514bp的产物,用XbaI和EcoRI消化,再次凝胶纯化,然后定向亚克隆到经XbaI/EcoRI消化和凝胶纯化的上述pED.dC.XFc载体。所得构建物命名为pED.dC.EpoFc。

[0386] 用成人肾脏QUICK-克隆cDNA制品为模板,使用下述引物Epo+Pep-Sbf-F和Epo+Pep-Sbf-R,通过PCR扩增获得含内源信号肽和成熟序列的Epo序列。引物Epo+Pep-Sbf-F含位于起始密码子上游的SbfI位点,而引物Epo+Pep-Sbf-R在Epo序列的内源SbfI位点下游退火。用Expand聚合酶在PTC-200MJ热循环仪中进行PCR反应:94℃变性2分钟,然后94℃,30秒,57℃,30秒,72℃,45秒,28个循环,然后72℃延伸10分钟。凝胶分离约603bp的产物,并亚克隆到pGEM-T Easy载体。正确的编码序列通过SbfI消化切除,凝胶纯化,并克隆到经PstI消化、虾碱性磷酸酶(SAP)处理、凝胶纯化的pED.dC.EpoFc质粒中。带有正确方向插入物的该质粒最初通过KpnI消化进行确定。比较此构建物的XmnI和PvuII消化结果和

pED.dC.EpoFc, 确认在正确方向上。对序列进行了确认, 并将构建物命名为 pED.dC.natEpoFc。

[0387] PCR引物:

[0388] hepoxba-F (EPO-F): 5'-AATCTAGAGCCCCACCACGCCTCATCTGTGAC-3' (SEQ ID NO: 75)

[0389] hepoeo-R (EPO-R): 5'-TTGAATTCTCTGTCCCCTGTCCTGCAGGCC-3' (SEQ ID NO: 76)

[0390] Epo+Pep-Sbf-F: 5'-GTACCTGCAGGCGGAGATGGGGGTGCA-3' (SEQ ID NO: 77)

[0391] Epo+Pep-Sbf-R: 5'-CCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3' (SEQ ID NO: 78)。

[0392] 实施例25:Epo-Fc的克隆

[0393] 本文在此描述克隆EPO-Fc的另一种方法。首先设计引物, 以扩增全长Epo编码序列, 包括天然信号序列, 如下所示:

[0394] Epo-F: 5'-GTCCAACCTG CAGGAAGCTTG CCGCCACCATGGGAGTGCACGAATGTCCTGCCTGG-3' (SEQ ID NO: 79)

[0395] Epo-R: 5'-GCCGAATTCA GTTTTGTCTGA CCGCAGCGGCGCCGGCGAA CTCTCTGTCC CCTGTTCTGC AGGCCTCC-3' (SEQ ID NO: 80)。

[0396] 正向引物在Kozak序列上游掺入sbfI和HindIII位点, 而反向引物除去内部sbfI位点, 并将8氨基酸接头(EFAGAAV) (SEQ ID NO: 81) 添加到编码序列的3'末端, 并加入SalI和EcoRI限制位点。然后在25μl PCR反应中使用25pmol的这些引物, 从肾脏cDNA文库(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 扩增Epo编码序列, PCR反应按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在MJ热循环仪中进行以下循环: 94℃2分钟; (94℃30秒, 58℃30秒, 72℃45秒) 30个循环, 然后72℃10分钟。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带(641bp), 并将其连接到中间克隆载体pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中。将DNA转化到DH5α细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 使少量制备培养物生长, 并用Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) 纯化, 两者均按厂商的标准方案操作。一旦序列得到确认, 将此插入物用SbfI/EcoRI限制酶消化, 凝胶纯化, 并按类似的方式克隆到哺乳动物表达载体pED.dC的PstI/EcoRI位点中。

[0397] 设计以下引物, 以扩增人IgG1恒定区(Fc区, EU编号221-447) 的编码序列:

[0398] Fc-F: 5'-GCTGCGGTCG ACAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CTCCGGAACCTCTGGCGGA CCGTCAGTC-3' (SEQ ID NO: 82)

[0399] Fc-R: 5'-ATTGGAATTC TCATTACCC GGAGACAGGG AGAGGC-3' (SEQ ID NO: 83)。正向引物在接头-Fc连接处掺入SalI位点, 并将BspEI和RsrII位点引入Fc区, 但不影响编码序列。而反向引物将EcoRI位点添加到终止密码子之后。然后在25μl PCR反应中使用25pmol的这些引物, 从白细胞cDNA文库(BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 扩增Fc编码序列, PCR反应按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在MJ热循环仪中进行以下循环: 94℃2分钟; (94℃30秒, 58℃30秒, 72℃45秒) 30个循环, 然后72℃10分钟。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带(696bp), 并将其连接到中间克隆载体pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中。将DNA转化到DH5α细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA) 中, 使少量制备培养物

生长,并用Plasmid Miniprep Kit (Qiagen,Valencia,CA) 纯化,两者均按厂商的标准方案操作。一旦序列得到确认,将此插入物用Sal/EcoRI限制酶消化,凝胶纯化,并按类似的方式克隆到质粒pED.dC.Epo(同上)的SalI/EcoRI位点中,以产生哺乳动物表达质粒pED.dC.EpoFc。在另一个实验中,该质粒也用RsrII/XmaI消化,并将含Asn297Ala突变(EU编号)的来自pSYN-Fc-002的相应片段克隆到其中,以创建pED.dC.EPO-Fc N297A(pSYN-EPO-004)。在哺乳动物细胞中的表达按实施例26中的描述进行。带有8氨基酸接头的EpoFc的氨基酸序列在图2j中提供。在这个另一克隆方法的进行过程中,虽然准确的EpoFc氨基酸序列得以保持(图2J),但在核苷酸水平上造成了多个非编码变化(图3J)。这些变化是G6A(核苷酸6处的G变成A)(消除引物中的可能二级结构)、G567A(将内源SbfI位点从Epo除去)、A582G(将EcoRI位点从接头除去)、A636T和T639G(将单一BspEI位点添加到Fc中)、及G651C(将单一RsrII位点添加到Fc中)。图3J中的核苷酸序列来自实施例25中创建的构建物,所述构建物掺入了来自实施例24构建物序列的上述这些变化。

#### [0400] 实施例26: EPO-Fc同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0401] 将DG44细胞涂布于100mm组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿50%-60%。用共10 $\mu$ g DNA转染一个100mm培养皿:对于同源二聚体转染,用10 $\mu$ g pED.dC.EPO-Fc;对于单体-二聚体杂合体转染,用8 $\mu$ g pED.dC.EPO-Fc+2 $\mu$ g pcDNA3-FlagFc。所用构建物如实施例24中所述进行克隆。也可用实施例25中描述的克隆方法来获得用于本实施例的构建物。按Superfect转染试剂手册(Qiagen,Valencia,CA)的描述转染细胞。或者,pED.dC.EPO-Fc与pSYN-Fc-016一起共转染,以制备非标记单体。转染48小时后,除去培养基,对于两种转染,均用不加核苷但加入5%透析胎牛血清的MEM Alpha取代,而对于单体-二聚体杂合体转染,还补充0.2mg/ml遗传霉素(Invitrogen,Carlsbad,CA)。3天后,用0.25%胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到T25组织培养瓶中,继续进行选择10-14天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加氨甲蝶呤扩大蛋白质的表达。

[0402] 对于两种细胞系,都是用约 $2 \times 10^7$ 个细胞接种1700cm<sup>2</sup>滚瓶(Corning,Corning,NY)中的300ml生长培养基。将滚瓶在5%CO<sub>2</sub>、37℃下温育约72小时。然后用300ml无血清生产培养基(含5 $\mu$ g/ml牛胰岛素和10 $\mu$ g/ml庆大霉素的DMEM/F12)替换生长培养基。连续10天每天收集生产培养基(条件培养基)并在4℃下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用Pall Gelman Sciences(Ann Arbor,MI)的SuporCap-100(0.8/0.2 $\mu$ m)过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在4℃下进行。将澄清培养基加样到A蛋白琼脂糖凝胶,用5倍柱体积的1X PBS(10mM磷酸盐,pH7.4,2.7mM KCl和137mM NaCl)洗涤,用0.1M甘氨酸(pH2.7)洗脱,然后用1/10体积的1M Tris-HCl(pH9.0)中和。然后将蛋白质透析到PBS中。

[0403] 因为含有EPO-Fc:EPO-Fc同源二聚体、EPO-Fc:Flag-Fc单体-二聚体杂合体和Flag-Fc:Flag-Fc同源二聚体的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩,以4ml/分钟(36cm/小时)的流速加样到2.6cm $\times$ 60cm(318ml) Superdex200Prep Grade柱,然后用3倍柱体积的1X PBS洗脱。收集与UV检测器上的两个峰对应的级份,用SDS-PAGE进行分析。第一个峰的级份含EPO-Fc:EPO-Fc同源二聚体或EPO-Fc:Flag-Fc单体-二聚体杂合体,而第二个峰含Flag-Fc:Flag-Fc同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含FlagFc同源二聚体的级份,以60cm/小时的线性流速直接加样到1.6 $\times$ 5cm M2抗FLAG琼



脂糖凝胶柱(Sigma Corp.)。加样后,用5倍柱体积的PBS洗涤柱子。然后用100mM甘氨酸(pH3.0)洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入1/10体积的1M Tris-HCl中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原SDS-PAGE进行分析。将级份透析到PBS中,浓缩至1-5mg/ml,并在-80℃下保藏。

[0404] 或者,用SDS-PAGE分析Superdex200的第一个峰对应的级份,且只集中含大量EpoFc单体-二聚体杂合体和少量EpoFc同源二聚体的级份。然后将富集了单体-二聚体杂合体的这个集合重新加样到Superdex200柱,再集中只含EpoFc单体-二聚体杂合体的级份,透析,并作为纯化蛋白保藏。注意,这种纯化方法也可用来纯化非标记单体-二聚体杂合体。

[0405] 实施例27:将带有8氨基酸接头的EpoFc二聚体和单体-二聚体杂合体给予猕猴

[0406] 对于肺部给药,用Aeroneb Pro™(AeroGen,Mountain View,CA)喷雾器配制EpoFc二聚体或EpoFc单体-二聚体杂合体(两者均带有8氨基酸接头)的PBS(pH7.4)气雾剂,并结合BirdMark7A呼吸器,通过气管内导气管(模拟正常的潮气呼吸)给予麻醉的首次试验的猕猴。还通过静脉注射将这两种蛋白质给予首次试验的猕猴。在不同的时间点进行取样,所得血浆中含Epo的蛋白质的量用Quantikine IVD人Epo免疫测定仪(R&D Systems,Minneapolis,MN)进行定量。药物动力学参数用WinNonLin软件进行计算。表4显示用EpoFc单体-二聚体杂合体或EpoFc二聚体处理的猕猴的生物利用度结果。

[0407] 表4:将EpoFc单体-二聚体杂合体和EpoFc二聚体给予猕猴

[0408]

蛋白质	猕猴 #	途径	大约沉积 剂量 <sup>1</sup> ( $\mu\text{g/kg}$ )	$C_{\max}$ (ng/ml)	$C_{\max}$ (fmol/ml)	$T_{1/2}$ (hr)	平均 $T_{1/2}$ (hr)
EpoFc 单体- 二聚体 杂合体	CO6181	肺部	20	72.3	1014	23.6	25.2
	CO6214	肺部	20	50.1	703	23.5	
	CO7300	肺部	20	120	1684	36.2	
	CO7332	肺部	20	100	1403	17.5	
	CO7285	静脉内	25	749	10508	21.3	22.6
	CO7288	静脉内	25	566	7941	23	
	CO7343	静脉内	25	551	1014	23.5	
EpoFc 二聚体	DD026	肺部	15	10.7	120	11.5	22.1
	DD062	肺部	15	21.8	244	27.3	
	DD046	肺部	15	6.4	72	21.8	
	DD015	肺部	15	12.8	143	20.9	
	DD038	肺部	35	27	302	29	
	F4921	静脉内	150	3701	41454	15.1	14.6
	96Z002	静脉内	150	3680	41219	15.3	
	1261CQ	静脉内	150	2726	30533	23.6	
	127-107	静脉内	150	4230	47379	15.0	
	118-22	静脉内	150	4500	50403	8.7	
	126-60	静脉内	150	3531	39550	9.8	

[0409] <sup>1</sup>基于  $\gamma$  闪烁照相测定的雾化剂量的15%沉积部分

[0410] 用以下方程式计算肺部剂量的生物利用度百分率 (F) :

[0411]  $F = (\text{肺部AUC}/\text{肺部剂量}) / (\text{静脉内AUC}/\text{静脉内剂量}) * 100$ 

[0412] 表5:EpoFc单体-二聚体杂合体和EpoFc二聚体经肺部给予首次试验的猕猴后生物利用度百分率的计算

[0413]

蛋白质	猕猴 #	大约剂量 <sup>1</sup> (沉积)	AUC ng•hr/mL	生物利用 度 <sup>2</sup> (F)	平均生物 利用度
EpoFc 单体- 二聚体 杂合体	C06181	20 µg/kg	3810	25.2%	34.9%
	C06214	20 µg/kg	3072	20.3%	
	C07300	20 µg/kg	9525	63.0%	
	C07332	20 µg/kg	4708	31.1%	
EpoFc 二聚体	DD026	15 µg/kg	361	5.1%	10.0%
	DD062	15 µg/kg	1392	19.6%	
	DD046	15 µg/kg	267	3.8%	
	DD015	15 µg/kg	647	9.1%	
	DD038	35 µg/kg	2062	12.4%	

[0414] <sup>1</sup>基于 γ 闪烁照相测定的喷雾化剂量的15%沉积部分

[0415] <sup>2</sup>静脉内给药的EpoFc单体-二聚体杂合体的平均AUC=18,913ng • hr/mL (n=3个猕猴), 给药剂量为25µg/kg。静脉内给药的EpoFc二聚体的平均AUC=70,967ng • hr/mL (n=6个猕猴), 给药剂量为150µg/kg

[0416] 给予猕猴的带8氨基酸接头EpoFc的药物动力学在图11中显示。该图比较了EpoFc单体-二聚体杂合体和EpoFc二聚体在肺部单剂量给药后的情况。根据摩尔比较结果, 用单体-二聚体杂合体处理的猕猴比用二聚体处理的猕猴血清水平明显更高。

[0417] 实施例38:EpoFc单体-二聚体杂合体的皮下给药

[0418] 为比较公知的促红细胞生成剂和EpoFc单体-二聚体杂合体的血清浓度, 将EpoFc单体-二聚体杂合体和Aranesp<sup>®</sup> (阿法达贝泊汀) (后者不是嵌合融合蛋白) 皮下给予不同的猕猴, 并测量两者在不同时间的血清浓度。

[0419] 猕猴 (每组n=3) 皮下注射0.025mg/kg EpoFc单体-二聚体杂合体。在给药前和给药后144小时内收集血液样品。从血液制备血清并冻藏, 直到ELISA分析 (人Epo Quantikine 免疫测定) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。用 WinNonLin<sup>®</sup> 软件 (Pharsight, Mountainview, CA) 测定药物动力学参数。

[0420] 结果显示, 虽然Aranesp<sup>®</sup> (阿法达贝泊汀) 的摩尔给药剂量稍高, 但随着时间的推移, EpoFc单体-二聚体杂合体和 Aranesp<sup>®</sup> (阿法达贝泊汀) 的血清浓度相当 (表6) (图12)。

[0421] 表6

[0422]

	途径	剂量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	剂量 ( $\text{nmol/kg}$ )	$C_{\text{max}}$ ( $\text{ng/mL}$ )	AUC ( $\text{ng}\cdot\text{hr}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$T_{1/2}$ (hr)	%生物利用度(F)
EpoFc 单体-二聚体杂合体	皮下	25	0.3	133 $\pm$ 34	10,745 $\pm$ 3,144	26 $\pm$ 5	57 $\pm$ 17
Aranesp <sup>®</sup>	皮下	20	0.54	83 $\pm$ 11	5390 $\pm$ 747	22 $\pm$ 2	53 $\pm$ 8

[0423] 实施例29:EpoFc单体-二聚体杂合体的静脉内给药

[0424] 为比较公知的促红细胞生成剂和EpoFc单体-二聚体杂合体的血清浓度,将EpoFc单体-二聚体杂合体、Aranesp<sup>®</sup>(阿法达贝泊汀)和Epogen<sup>®</sup>(阿法依泊汀)(后两者不是嵌融合蛋白)经静脉内给予不同的猕猴,并测量它们在不同时间的血清浓度。

[0425] 猕猴(每组n=3)静脉内注射0.025mg/kg EpoFc单体-二聚体杂合体。在给药前和给药后144小时内收集血液样品。从血液制备血清并冻藏,直到ELISA分析(人Epo Quantikine免疫测定)(R&D Systems,Minneapolis,MN)。用WinNonLin<sup>®</sup>软件(Pharsight,Mountainview,CA)测定药物动力学参数。

[0426] 结果显示,虽然猕猴接受的Aranesp<sup>®</sup>(阿法达贝泊汀)和Epogen<sup>®</sup>(阿法依泊汀)的摩尔剂量更高,但随着时间的推移,EpoFc单体-二聚体杂合体的血清浓度(AUC)比Aranesp<sup>®</sup>(阿法达贝泊汀)和Epogen<sup>®</sup>(阿法依泊汀)更高(表7)(图13)。

[0427] 表7

[0428]

	途径	剂量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	剂量 ( $\text{nmol/kg}$ )	$C_{\text{max}}$ ( $\text{ng/mL}$ )	AUC ( $\text{ng}\cdot\text{hr}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	$T_{1/2}$ (hr)
EpoFc 单体-二聚体杂合体	静脉内	25	0.3	622 $\pm$ 110	18,913 $\pm$ 3,022	23 $\pm$ 1
Aranesp <sup>®</sup>	静脉内	20	0.54	521 $\pm$ 8	10,219 $\pm$ 298	20 $\pm$ 1
Epogen	静脉内	20	0.66	514 $\pm$ 172	3936 $\pm$ 636	6.3 $\pm$ 0.6

[0429] 实施例30:EpoFc单体-二聚体杂合体的另一纯化方法

[0430] 本文在此描述纯化EPO-Fc的另一种方法。将含Fc、EpoFc单体-二聚体杂合体和EpoFc二聚体的混合物加样到A蛋白琼脂糖凝胶柱(Amersham,Uppsala,瑞典)。按厂商的说明洗脱混合物。将含有混合物的A蛋白琼脂糖凝胶洗脱液交换到50mM Tris-Cl(pH8.0)缓冲液中。将蛋白质混合物加样到已在50mM Tris-Cl(pH8.0)中平衡的8mL Mimetic Red2XL柱(ProMetic Life Sciences,Inc.,Wayne,NJ)。然后用50mM Tris-Cl(pH8.0);50mM NaCl洗脱柱。这个步骤除去了大部分的Fc。用50mM Tris-Cl(pH8.0);400mM NaCl将EpoFc单体-二聚体杂合体从柱特异性地洗脱出来。可洗脱EpoFc二聚体,柱可用5倍柱体积的1M NaOH再

生。柱子的洗脱级份用SDS-PAGE分析(图14)。

[0431] 实施例31:克隆Igκ信号序列-Fc构建物以单独制备未标记Fc

[0432] IgG1恒定区(EU编号221-447;Fc区)的编码序列用以下引物通过PCR扩增从白细胞cDNA文库(Clontech,CA)获得:

[0433] rcFc-F 5'-GCTGCGGTCGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCTCCGGAACCTCTGGGCG GACCGTCAGTC-3' (SEQ ID NO:84)

[0434] rcFc-R 5'-ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC-3' (SEQ ID NO:85)。

[0435] 正向引物在Fc区的起点前面加入三个氨基酸(AAV)和SalI克隆位点,还利用遗传密码的简并性,在氨基酸231-233掺入BspEI限制位点,在氨基酸236-238掺入RsrII限制位点,以保持正确的氨基酸序列(EU编号)。反向引物在Fc终止密码子的后面加入EcoRI克隆位点。使用各25pmol的引物进行25μl PCR反应,反应按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在MJ热循环仪中进行以下循环:94℃2分钟;(94℃30秒,58℃30秒,72℃45秒)30个循环,然后72℃10分钟。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)凝胶纯化预期大小的条带(~696bp),并将其克隆到pGEMT-Easy(Promega,Madison,WI)中,产生中间质粒pSYN-Fc-001(pGEMT-Easy/Fc)。

[0436] 使用以下引物,将小鼠Igκ信号序列添加到FcCDS:

[0437] rc-Igκ信号序列-F:5'-TTTAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTA CTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCG-3' (SEQ ID NO:86)

[0438] Fc-noXma-GS-R:5'-GGTCAGCTCATCGCGGGATGGG-3' (SEQ ID NO:87)

[0439] Fc-noXma-GS-F:5'-CCCATCCCGCGATGAGCTGACC-3' (SEQ ID NO:88)。

[0440] 引物rc-Igκ信号序列-F将HindIII限制位点添加到分子的5'末端,紧接的是Kozak序列(GCCGCCACC) (SEQIDNO:89),再紧接的是小鼠Igκ轻链的信号序列,与Fc序列的起点(EU编号221)直接邻接。引物Fc-noXma-GS-F和-R利用遗传密码的简并性,从Fc编码序列除去内部XmaI位点,以保持正确的氨基酸序列。用25pmol的rc-Igκ信号序列-F和Fc-noXma-GS-R或者Fc-noXma-GS-F和rcFc-R,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在MJ热循环仪中进行两个25μl PCR反应。第一个反应用500ng白细胞cDNA文库(BD Biosciences Clontech,Palo Alto,CA)为模板,进行以下循环:94℃2分钟;(94℃30秒,55℃30秒,72℃45秒)30个循环,然后72℃10分钟。第二个反应用500ng pSYN-Fc-001为模板(如上所述),进行以下循环:94℃2分钟;(94℃30秒,58℃30秒,72℃45秒)16个循环,然后72℃10分钟。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)凝胶纯化预期大小的条带(分别为~495bp和299bp),然后在PCR反应中与25pmol的引物rc-Igκ信号序列-F和RcFc-R混合,并如前所述,在58℃下退火,进行16个循环。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)凝胶纯化预期大小的条带(~772bp),并将其克隆到pGEM T-Easy(Promega,Madison,WI)中,产生中间质粒pSYN-Fc-007(pGEM T-Easy/rc-Igκ信号序列-Fc)。然后利用HindIII和EcoRI位点将整个Igκ信号序列-Fc盒亚克隆到PEE6.4(Lonza,Slough,UK)或pcDNA3.1(Invitrogen,Carlsbad,CA)哺乳动物表达载体中(取决于所使用的系统),以产生pSYN-Fc-009(pEE6.4/Igκ信号序列-Fc)和pSYN-Fc-015(pcDNA3/Igκ信号序列-Fc)。

[0441] 实施例32:克隆Igκ信号序列-Fc N297A构建物以单独制备未标记FcN297A

[0442] 为将Fc的Asn297 (EU编号) 突变成Ala残基,使用以下引物:

[0443] N297A-F5'-GAGCAGTACGCTAGCACGTACCG-3' (SEQ ID NO:90)

[0444] N297A-R5'-GGTACGTGCTAGCGTACTGCTCC-3' (SEQ ID NO:91)。

[0445] 用25pmol的rc-Ig $\kappa$ 信号序列-F和N297A-R或者N297A-F和rcFc-R,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在MJ热循环仪中进行两个PCR反应。两个反应均用500ng pSYN-Fc-007为模板,进行以下循环:94℃2分钟;(94℃30秒,48℃30秒,72℃45秒)16个循环,然后72℃10分钟。用Gel Extraction试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 凝胶纯化预期大小的条带(分别为~319bp和475bp),然后在PCR反应中与25pmol的引物rc-Ig $\kappa$ 信号序列-F和rcFc-R混合,并如前所述,在58℃下退火,进行16个循环。用Gel Extraction试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 凝胶纯化预期大小的条带(~772bp),并将其克隆到pGEM T-Easy (Promega,Madison,WI) 中,产生中间质粒pSYN-Fc-008 (pGEM T-Easy/rc-Ig $\kappa$ 信号序列-Fc N297A)。然后利用HindIII和EcoRI位点将单独的整个Ig $\kappa$ 信号序列-Fc盒亚克隆到PEE6.4 (Lonza,Slough,UK) 或pcDNA3.1 (Invitrogen,Carlsbad,CA) 哺乳动物表达载体中(取决于所使用的系统),以产生pSYN-Fc-010 (pEE6.4/Ig $\kappa$ 信号序列-Fc N297A) 和pSYN-Fc-016 (pcDNA3/Ig $\kappa$ 信号序列-FcN297A)。

[0446] 上述这些N297A引物也与引物rcFc-F和rcFc-R及pSYN-Fc-001一起,用作PCR反应的模板,然后如上所述进行亚克隆,以产生pSYN-Fc-002 (pGEM T Easy/Fc N297A)。

[0447] 实施例33:将EpoFc和Fc克隆到单一质粒中成为双基因载体,制备EpoFc野生型或N297A单体-二聚体杂合体,以及表达

[0448] 将EpoFc和Fc构建物转染到单个质粒的另一种方法是将它们克隆到单一质粒(也称为双基因载体,如在Lonza Biologics (Slough,UK) 系统中使用的载体) 中。按标准程序,将pSYN-Fc-002的RsrII/EcoRI片段亚克隆到pEE12.4 (Lonza Biologics,Slough,UK) 中的相应位点,产生pSYN-Fc-006 (pEE12.4/Fc N297A片段)。质粒pSYN-EPO-004用作PCR反应的模板,反应所用引物是实施例25的Epo-F引物以及以下引物:

[0449] EpoRsr-R:5'-CTGACGGTCCGCCAGGAGTTCCGGAGCTGGG

[0450] CACGGTGGGCATG TGTGAGTTTTGTGACCGCAGCGG-3' (SEQ ID NO:91)。

[0451] 按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在MJ热循环仪中如上所述进行PCR反应,16个循环,退火温度55℃。用Gel Extraction试剂盒 (Qiagen,Valencia,CA) 凝胶纯化预期大小的条带(~689bp),并利用HindIII/RsrII限制位点将其克隆到pSYN-Fc-006中,产生pSYN-EPO-005 (pEE12.4/EpoFcN297A)。然后通过将pSYN-Fc-010的NotI/BamHI片段克隆到pSYN-EPO-005中的相应位点,产生pSYN-EPO-008 (pEE12.4-6.4/EpoFc N297A/Fc N297A),从而构建EpoFc N297A单体-二聚体杂合体的双基因载体。

[0452] 还通过利用RsrII和EcoRI位点,将pSYN-Fc-001的野生型Fc序列亚克隆到pSYN-EPO-005中,产生pSYN-EPO-006 (pEE12.4/EpoFc),来创建野生型构建物。然后通过将pSYN-Fc-009的NotI/BamHI片段克隆到pSYN-EPO-006中的相应位点,产生pSYN-EPO-007 (pEE12.4-6.4/EpoFc/Fc),从而构建EpoFc单体-二聚体杂合体的双基因载体。

[0453] 按Lonza生物试剂手册标准操作程序 (Lonza Biologics,Slough,UK) 的说明,将各质粒转染到CHOK1SV细胞,鉴定出阳性克隆,使其适应无血清悬浮液,并按其他单体-二聚体

构建物的纯化方法进行纯化。

[0454] 实施例34:人IFN $\beta$ Fc、带有8氨基酸接头的IFN $\beta$ -Fc N297A和Ig $\kappa$ -Fc-6His构建物的克隆

[0455] 使用10ng得自Clontech(BD Biosciences Clontech,Palo Alto,CA)的人基因组DNA文库作为模板,并使用以下引物,分离人IFN $\beta$ 及其天然信号序列:

[0456] IFN $\beta$ -F H3/SbfI:

[0457] 5'-CTAGCCTGCAGGAAGCTTGCCGCCACCATGACCAACAAGTGTCTCCTC-3'(SEQ ID NO:92)

[0458] IFN $\beta$ -R(EFAG)SalI:

[0459] 5'-TTTGTGACCGCAGCGGCGCCGGCGAACTCGTTTCGGAGGTAACCTGTAAG-3'(SEQ ID NO:93)。

[0460] 反向引物也用来在人IFN $\beta$ 序列的3'末端创建8氨基酸接头序列(EFAGAAAV)(SEQ ID NO:94)。按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在Rapid Cycler热循环仪(Idaho Technology,Salt Lake City,UT)中进行PCR反应。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)凝胶纯化正确大小的PCR产物(~607bp),将其克隆到TA克隆载体(Promega,Madison,WI)中并测序。该构建物命名为pSYN-IFN $\beta$ -002。用SbfI和SalI消化pSYN-IFN $\beta$ -002,并将其克隆到pSP72(Promega)的PstI和SalI位点,产生pSYN-IFN $\beta$ -005。

[0461] 用SalI和EcoRI消化纯化的pSYN-Fc-001(0.6 $\mu$ g),并将其克隆到pSYN-IFN $\beta$ -005的相应位点,创建质粒pSYN-IFN $\beta$ -006,其含有通过8氨基酸接头序列与人Fc连接的人IFN $\beta$ 。然后用SbfI和EcoRI消化pSYN-IFN $\beta$ -006,将全长IFN $\beta$ -Fc序列克隆到pEDdC.sig的PstI和EcoRI位点,创建质粒pSYN-IFN $\beta$ -008。

[0462] 用BspEI和XmaI消化含人FcDNA和单个氨基酸变化(其中297位的天冬酰胺变成丙氨酸(N297A;EU编号))的pSYN-Fc-002,以分离含N297A突变的~365bpDNA片段。将此DNA片段克隆到pSYN-IFN $\beta$ -008的相应位点,创建质粒pSYN-IFN $\beta$ -009,其含带有8氨基酸接头的IFN $\beta$ -Fc序列,在表达载体pED.DC的Fc中具有N297A突变。

[0463] Ig $\kappa$ 信号序列-FcN297A-6His的克隆。用以下引物将6xHis标记添加到Fc N297A编码序列的C末端:

[0464] FcGS-F:5'-GGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCC-3'(SEQ ID NO:95)

[0465] Fc.6His-R:

[0466] 5'-TCAGTGGTGATGGTGATGATGTTTACCCGGAGACAGGGAG-3'(SEQ ID NO:96)

[0467] Fc.6His-F:5'-GGTAAACATCATCACCATCACCCTGAGAATTCCAATATCACTAGTGAATTTCG-3'(SEQ ID NO:97)

[0468] Sp6+T-R:5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC-3'(SEQ ID NO:98)。

[0469] 用50pmol的FcGS-F和Fc.6His-R或者Fc.6His-F和Sp6+T-R,按厂商的标准方案使用Expand High Fidelity System(Boehringer Mannheim,Indianapolis,IN),在MJ热循环仪中进行两个PCR反应。两个反应均用500ng pSYN-Fc-008作为50 $\mu$ l反应的模板,用标准的循环条件来进行。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,Valencia,CA)凝胶纯化预期大小的条带(分别为~780bp和138bp),然后在50 $\mu$ l PCR反应中与50pmol的引物FcGS-F和Sp6+T-R混合,并使用标准的循环条件如前所述进行反应。用Gel Extraction试剂盒(Qiagen,

Valencia,CA) 凝胶纯化预期大小的条带(~891bp),并利用HindIII和EcoRI位点,将其克隆到pcDNA6V5-HisB中,产生pSYN-Fc-014(pcDNA6/Ig $\kappa$ 信号序列-Fc N297A-6His)。

**[0470] 实施例35: IFN $\beta$ Fc、IFN $\beta$ -Fc N297A同源二聚体和IFN $\beta$ -Fc N297A单体-二聚体杂合体的表达与纯化**

**[0471]** 将CHO DG44细胞涂布于100mm组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿50%-60%。用共10 $\mu$ g DNA转染一个100mm培养皿。对于同源二聚体转染,使用10 $\mu$ g pSYN-IFN $\beta$ -008或pSYN-IFN $\beta$ -009构建物;对于单体-二聚体杂合体转染,使用8 $\mu$ g pSYN-IFN $\beta$ -009+2 $\mu$ g pSYN-Fc-014构建物。按厂商说明书用Superfect转染试剂(Qiagen,Valencia,CA) 转染细胞。转染48-72小时后,除去生长培养基,用0.25%胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到装有选择培养基(不加核苷但加入5%透析胎牛血清的MEM Alpha)的T75组织培养瓶中。单体-二聚体杂合体转染的选择培养基补充有5 $\mu$ g/ml杀稻瘟素(Invitrogen, Carlsbad,CA)。继续进行选择10-14天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加10-50nM氨甲蝶呤,扩大蛋白质的表达。

**[0472]** 对于所有细胞系,都是用约 $2 \times 10^7$ 个细胞接种1700cm<sup>2</sup>滚瓶(Corning,Corning,NY)中的300ml生长培养基。将滚瓶在5%CO<sub>2</sub>培养箱中37℃下温育约72小时。然后用300ml无血清生产培养基(含5 $\mu$ g/ml人胰岛素的DMEM/F12) 替换生长培养基。连续10天每天收集生产培养基(条件培养基)并在4℃下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用Pall Gelman Sciences (Ann Arbor,MI)的SuporCap-100(0.8/0.2 $\mu$ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在4℃下进行。将澄清培养基加样到A蛋白琼脂糖凝胶,用5倍柱体积的1X PBS(10mM磷酸盐,pH7.4,2.7mM KCl和137mM NaCl) 洗涤,用0.1M甘氨酸(pH2.7)洗脱,然后用1/10体积的1M Tris-HCl(pH8.0),5M NaCl中和。同源二聚体蛋白通过Superdex200Prep Grade尺寸排阻柱,用50mM磷酸钠(pH7.5),500mM NaCl,10%甘油洗脱,来进一步纯化。

**[0473]** 因为含有IFN $\beta$ Fc N297A:IFN $\beta$ Fc N297A同源二聚体、IFN $\beta$ Fc N297A:Fc N297A His单体-二聚体杂合体和Fc N297A His:Fc N297A His同源二聚体的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体蛋白。将50mM磷酸钠(pH 7.5),500mM NaCl中的物料加样到镍螯合柱。加样后,用50mM咪唑的50mM磷酸钠(pH 7.5),500mM NaCl溶液洗涤柱,用梯度为50-500mM咪唑的50mM磷酸钠(pH7.5),500mM NaCl溶液洗脱蛋白质。收集与UV检测器上的洗脱峰对应的级份,用SDS-PAGE进行分析。第一个峰的级份含IFN $\beta$ Fc N297A:Fc N297A His单体-二聚体杂合体,而第二个峰含Fc N297A His:Fc N297A His同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含Fc同源二聚体的级份,直接加样到Superdex200Prep Grade尺寸排阻柱,用50mM磷酸钠(pH7.5),500mM NaCl,10%甘油洗脱。收集含IFN $\beta$ -Fc N297A:Fc N297A His单体-二聚体杂合体的级份,并在-80℃下保藏。

**[0474] 实施例36: IFN $\beta$ 抗病毒活性试验**

**[0475]** 用CPE(致细胞病变效应) 试验确定IFN $\beta$ 融合蛋白的抗病毒活性(IU/ml)。将A549细胞涂布于含生长培养基(补充有10%胎牛血清(FBS)和2mM L-谷氨酰胺的RPMI1640)的96孔组织培养板,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下培养2小时。用生长培养基稀释IFN $\beta$ 标准品和IFN $\beta$ 融合蛋白,并加到细胞中,试验重复三次,在37℃、5%CO<sub>2</sub>下温育20小时。温育后,除去各孔的所有培养基,用生长培养基稀释脑心肌炎(EMC)病毒,并将其加入到各孔中(3000pfu/孔),但对照孔



不加入。将培养板在37℃、5%CO<sub>2</sub>下温育28小时。用10%冷三氯乙酸(TCA)固定活细胞,然后用磺基罗丹明B(SRB)按公开的方案(Rubinstein等,1990,J.Natl.Cancer Inst.82,1113)染色。SRB染料用10mM Tris pH10.5溶解后,用分光光度计在490nm处读数。通过将样品的活性与公知的标准曲线(范围在10-0.199IU/ml)比较,对样品进行分析。结果在下表8中显示,表明单体-二聚体杂合体抗病毒活性提高。

[0476] 表8:β干扰素抗病毒试验:同源二聚体与单体-二聚体杂合体

[0477]	蛋白质	抗病毒活性 (IU/nmol)	标准偏差
	IFNβ-Fc 8 氨基酸接头同源二聚体	$4.5 \times 10^5$	$0.72 \times 10^5$
	IFNβFc N297A 8 氨基酸接头同源二聚体	$3.21 \times 10^5$	$0.48 \times 10^5$
	IFNβFc N297A 8 氨基酸接头:Fc His 单体-二聚体杂合体	$12.2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$

[0478] 实施例37:将带有8氨基酸接头的IFNβFc同源二聚体和单体-二聚体杂合体给予猕猴

[0479] 对于肺部给药,用Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA) 喷雾器配制IFNβFc同源二聚体或IFNβFc N297A单体-二聚体杂合体(两者均带有8氨基酸接头)的PBS (pH7.4), 0.25% HSA气雾剂,并结合Bird Mark7A呼吸器,通过气管内导气管(模拟正常的潮气呼吸)给予麻醉的首次试验的猕猴。在不同的时间点抽取血样,所得血浆中含IFNβ的蛋白质的量用人IFNβ免疫测定仪(R&D Systems, Minneapolis, MN)进行定量。药物动力学参数用WinNonLin软件进行计算。表9显示用IFNβFc N297A单体-二聚体杂合体或IFNβFc二聚体处理的猕猴的结果。

[0480] 表9:将IFNβFc N297A单体-二聚体杂合体和IFNβFc同源二聚体给予猕猴

[0481]

蛋白质	猕猴 #	途径	大约沉积 剂量 <sup>1</sup> (μg/kg)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC (hr*ng/ml)	T <sub>1/2</sub> (hr)	平均 T <sub>1/2</sub> (hr)
IFNβFc N297A 单体- 二聚体杂 合体	CO7308	肺部	20	23.3	987.9	27.6	27.1
	CO7336	肺部	20	22.4	970.6	25.6	
	CO7312	肺部	20	21.2	1002.7	28.0	
IFNβFc 同 源二聚体	CO7326	肺部	20	2.6	94.6	11.1	11.4
	CO7338	肺部	20	5.0	150.6	11.7	

[0482] <sup>1</sup>基于γ闪烁照相测定的喷雾化剂量的15%沉积部分

[0483] 给予猕猴的带8氨基酸接头IFN $\beta$ Fc的药物动力学在图15中显示。该图比较了IFN $\beta$ Fc同源二聚体和IFN $\beta$ Fc N297A单体-二聚体杂合体在猴中肺部单剂量给药后的情况。用单体-二聚体杂合体处理的猕猴比用同源二聚体处理的猕猴血清水平明显更高。

[0484] 还用新蝶呤免疫测定法 (MP Biomedicals, Orangeburg, NY) 分析血清样品中的新蝶呤水平 (IFN $\beta$ 活性的一种生物标记)。分析结果在图16显示。该图比较了IFN $\beta$ -Fc同源二聚体和IFN $\beta$ -Fc N297A单体-二聚体杂合体对新蝶呤的刺激作用。可以看出,用IFN $\beta$ -Fc N297A单体-二聚体杂合体处理的猕猴中检测出的新蝶呤水平比用IFN $\beta$ -Fc同源二聚体处理的猕猴明显更高。

[0485] 在说明书和权利要求书中用以表示分量、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下都被术语“大约”修饰。因此,除非另外说明,在说明书及随附的权利要求书中提出的数字参数是近似值,可根据通过本发明获得的所需性质而改变。并不是企图限制等价原则在权利要求书的范围中的应用,但至少各数字参数应按有效数字和常规的舍入方法来理解。

[0486] 本文引用的所有参考文献通过引用整体结合到本文中,且对于所有的目的,它们结合到本文中的程度如同各个单独的出版物或专利或专利申请被明确、单独地指明为对于所有目的通过引用整体结合的程度。如果通过引用结合到本文的出版物或专利或专利申请与本说明书中的公开内容相抵触,则规定本说明书取代和/或优先于任何此类抵触性资料。

[0487] 本领域技术人员能明白,可不偏离本发明的精神和范围,对本发明作出许多修改和变化。本文描述的具体实施方案只以示例的方式提供,不以任何方式表示限制。要指明的是,本说明书和实施例应只被认为是示例性的,本发明的真正范围和精神由以下权利要求书来说明。

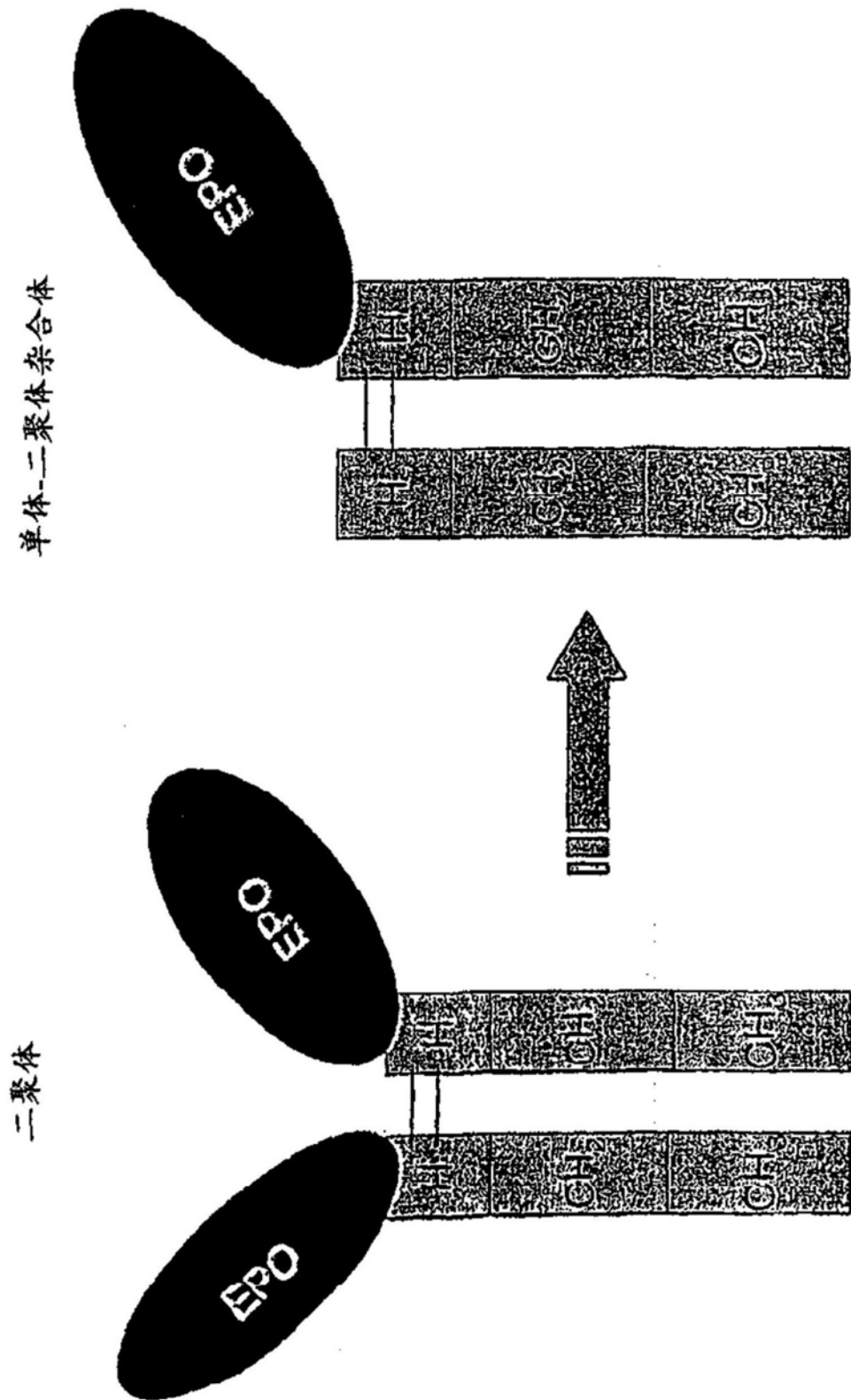


图1

## VII 因子-Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

```

1  MVSQALRLLC LLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS
51 LERECKEEQC SFEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK
101 DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC
151 RCHEGYSLLA DGVSCPTTVE YPCGKIPILE KRNASKPQGR IVGGKVCPKG
201 ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR NLIAVLGEHD
251 LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQFV VLTDHVVPCL
301 LPERTFSERT LAFVRFSLV GWGQLIDRGA TALELMVLNV PRIMTQDCLQ
351 QSRKVGDSPN ITEYMFCAGY SDGSKDSCKG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV
401 SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPDKTHTC
451 PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
551 ALPAPIEKT ISKAKQPREP QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFPYPSD
601 IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFS
651 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

图2A

## IX 因子-Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDMENANKI LNRPKRYNSG
51 KLEEFVQGNL ERECMEERCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCESN
101 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCEL DVTCNIKNGR CEOFCKNSAD
151 NKVVCSCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VSVSOTSKLT RAETVFPDND
201 YVNSTEAEIT LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
251 FCGGSIVNEK WIVTAAHCVE TGVKITTVAG EHNIEETEHT EQKRNVIIRI
301 PHHYNAAIN KYNHDIALLE LDEPLVLNSY VTPICIADKE YTNIFLKFGS
351 GYVSGWGRVF HKGRSALVLQ YLRVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
401 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMKGK YGIYTKVSRY
451 VNWIKEKTKL TEFAGAAAVD KTHTCPCCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL
501 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
551 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL
601 PPSRDELTKN QVELTCLVKG FYPSPDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDS
651 GSFFLYSKLT VDKSRWQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

图2B

IFN $\alpha$ -Fc 氨基酸序列(8 氨基酸接头)(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF OKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEEF AGAAAVDKTH
201 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK
251 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
301 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP
351 SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
401 CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

```

图2C

IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$  接头氨基酸序列(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF OKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEDK THTCPPCPAP
201 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
401 HNHYTQKSLS LSPGK

```

图2D

## FlagFc 氨基酸序列(下划线为信号肽)

```

1  METDTLLLWV LLLWVPGSTG DDYKDDDDKD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF
51 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
101 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
151 OPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPDIAVEW ESNGQPENNY
201 KTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
251 SLSPGK

```

图2E

**Epo-CCA-Fc 氨基酸序列(下划线为 K<sup>b</sup> 信号肽, 粗体为酸性卷曲螺旋)**

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGSRAPRLI CDSRVLQRYL LEAKEAENIT
51  TGCAEHCSLN ENITVPDTKV NPYAWKRMÉV GQQAVEVWQG LALLSEAVLR
101 GQALLVNSSQ PWEFLQLHVD KAVSGLRSLT TLLRALGAQK EAI SPPDAAS
151 AAPLRTITAD TFRKLFRVYS NFLRGKLY TGEACRTGDR EFGGEYQALE
201 KEVAQLEAEN QALEKEVAQL EHEGGGPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
251 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
301 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
351 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
401 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTOKSLSL SPGK

```

图2F

**CCB-Fc 氨基酸序列(下划线为 K<sup>b</sup> 信号肽, 粗体为碱性卷曲螺旋)**

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGEFGGEYQA LKKKVAQLKA KNQALKKKVA
51  QLKHKGGGPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
101 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
151 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
201 FYPDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
251 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

图2G

**CysFc 氨基酸序列(下划线为 hIFN $\alpha$  信号肽)**

```

1  MALTFALLVA LLVLSCSSC SVGCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
51  ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV
101 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF
151 PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPVLDSDG
201 SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSL LSPGK

```

图2H

IFN $\alpha$  GS15 Fc 蛋白质序列(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDPG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEGG GSGSGGGSGG
201 GGS DKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS
251 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
301 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGPPEPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
351 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTFPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
401 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

图2I

## EpoFc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头)

```

1  MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE
51 NITTGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAQEV WQGLALLSEA
101 VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTTLRLALG AQKEAISPDP
151 AASAAFLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDREFAGAAA
201 VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVDSHE
251 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
301 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV
351 KGFYPSDIAV EWESNGOPEN NYKTTFPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
401 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

图2J

## VII 因子-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

atggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctgcag  
tcttcgttaacccaggagggaagcccaacggcgctcctgcacggcgccggcgcccaacgcgttcc  
ggaggagctgcggccgggctccctggagaggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggag  
gcccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatgggg  
accagtgtgcctcaagtcctgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtccctat  
ctgcttctgcctccctgccttcgaggggccggaactgtgagacgcacsaaggatgacacgtgatc  
tgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtaactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcct  
gtcgggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgtcctgcacacccacagttgaata  
tccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtg  
gggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgatccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctc  
agttgtgtggggggaccctgatcacacccatctgggtgggtctccgcggcccatgttccgacaa  
aatcaagaactggagggaacctgatcggggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgagg  
gatgagcagagccggcggtggcgagggtcatcatccccagcaagtaagtccegggcaacccca  
accacgacatcgcgctgctccgcctgcacaggcccggtggtcctcactgacctgtggtgccct  
ctgcctgcccgaaacgggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagc  
ggctggggccagctgctggaccgtggcgccaaggccctggagctcatggtcctcaacgtgccc  
ggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacgggaagggtgggagactccccaaatatcacgga  
gtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggacagtggaaggc  
ccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggggccagggt  
ggcgaaacgtggggcaactttgggggtgtacacagggtctccagtagatcgagtggtgcaaaa  
ggtcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgcgagcccatctcccgacaaaactcac  
acgtgcccgcggtgcccagctccgggaactgctgggaggacgtcagtcctcctcttcccccaa  
aaccaaggacccctcatgatctcccggaacccctgagggtcacatgcgtgggtggacgtgag  
ccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggagggtgcataatgccaag  
acaaagccgcgggaggagcagtagaacagcaagtagcgtggtcagcgtcctcacgtcctgc  
accaggactggctgaatggcaaggagtagaagtgcaagggtctccaacaaagccctccagcccc  
catcgagaaaaccatctccaaagccaaaggggcagccccgagaaaccacagggtgtacacctgccc  
ccatcccgggatgagctgaccaagaaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatc  
ccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgcc  
tcccggtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacgtggacaagagcagg  
tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaccactacacgc  
agaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

图3A



## IX 因子-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

atgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccagggcctcatcaccatctgccttttaggat  
atctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcg  
gccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgt  
atggasgaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaaacaactg  
aattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcag  
ttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaaactgt  
gaattagatgtaacatgtaacattagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgtctg  
ataacaagggtggtttgctcctgtactgagggatatacgacttgcagaaaaccagaagtctgtga  
accagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcacaaacttctaagctcaccocgtgct  
ggagctgttttctcctgatgtggaactatgtaaatctactgaagctgaaaccattttggataaca  
tcactcaaagcaccacatcatttcaatgacttcaactcgggttgttgggtggagaagatgccaaacc  
aggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggagggctctatc  
gttaatgaaaaatggattgttaactgctgccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttg  
tcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcassaagcgaatgtgattcgaat  
tattcctcaccacaactacaatgcagctatttaataagtacaaccatgacattgcccttctggaa  
ctggacgaacccttagtgctsaacagctacgttacacctatttgcatgtgacsaagggaataca  
cgaacatcttccccaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagttctccacaaagg  
gagatcagcttagttcttcagtagctttagagttccaactgttgaccgagccacatgtcttcga  
tctacaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt  
catgtcaggaggtogtgggggaacccatgttaactgaagtggaggggaccagtttcttaactgg  
aattattagctggggtgaagagtggtgcaatgaaggccaatattggaatatataccaaggatatcc  
cogtatgtcaactggatttagggaaaaaacaaagctcaactgaattcgcgggcgcgcgtgcggtcg  
acaaaactcacacatgccacacgtgccagcacctgaactcctggggggacccgtcagttctcct  
cttcccccaaaaacccaaggacacccctcatgatctccgggacccctgaggtcacatgcgtggtg  
gtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc  
atgatgccaagacaaagccgcgggagggagcagtagcacaagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct  
cacgtcctgacccaggactggctgaatggcaaggagtagcaggtgcaagggtctccaaacaaagcc  
ctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaggggcagccccgagaaccacaggtgt  
acacccctgcccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa  
aggtctctatccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaactac  
aagaccaagcctccgtgttggaactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgg  
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctctgcacaa  
ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图3B

IFN $\alpha$ -Fc 核苷酸序列(8 氨基酸接头)

atggccttgacctttgctttactgggtggccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg  
 tgggctgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca  
 gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaggacagacatgactttggatttcccaggag  
 gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga  
 tcttcaatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt  
 ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatcacgggggtgggggtg  
 acagagactcccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca  
 ctctctatctgaaagagaagaatacagcccttgtgctgggaggttgtcagagcagaaatcat  
 gagatcttttcttltgtcaacaaacttgcaagaaagtttaagaagtaaggagaatctggccggc  
 gccgctgcggtcgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggac  
 cgtcagttctcctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaacctgaggt  
 cacatgcgtgggtgggtggscgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggac  
 gggtggaggtgcataatgccagacaaagccgaggaggagcagtaaacagcagctacgtg  
 tggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggt  
 ctccaacaaagccctcccagccccctcgagaaaacctctccaagccaaagggcagccccga  
 gaaccacaggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctga  
 cctgctgggtcaaggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc  
 ggagacaactacaagaccacgctcccggtgttggactccgacggctccttcttctctacagc  
 aagctcacctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcag  
 aggtctctgcacaaccactacacgcagagagagcctctccctgtctccgggttaaatga

图3C

IFN $\alpha$ -Fc  $\Delta$  接头核苷酸序列

atggccttgacctttgctttactgggtggccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg  
 tgggctgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca  
 gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaggacagacatgactttggatttcccaggag  
 gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga  
 tcttcaatctcttcagcacaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt  
 ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatcacgggggtgggggtg  
 acagagactcccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca  
 ctctctatctgaaagagaagaatacagcccttgtgctgggaggttgtcagagcagaaatcat  
 gagatcttttcttltgtcaacaaacttgcaagaaagtttaagaagtaaggagaacaaactcac  
 acgtgcccgcgtgcccagctccggaactgctgggcggaccgtcagttctcctcttcccccaa  
 aacccaaggacacctcatgatctcccggaacctgaggtcacatgcgtggtggcagctgag  
 ccacgaagacctgaggtcagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaa  
 acaagccgaggaggagcagtaacaacagcagctacgtgtggtcagcgtcctcacgctcctgc  
 accaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccc  
 catcgagaaaacctctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc  
 ccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaggtctctatc  
 ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccagcc  
 tccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaagagcagg  
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagaggtctgcacaaccactacacgc  
 agagagacctctccctgtctccgggttaaatga

图3D

## FlagFc 核苷酸序列

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacg  
actacaaggacgacgatgacaaggacaaactcacacatgccacagtgccagctccggaact  
cctggggggaccgtcagtcctcctctcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgg  
acccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacacctgaggtcaagttcaact  
ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacag  
cacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtac  
aagtgcaagggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaccatctccaagccaaag  
ggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaacca  
ggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagc  
aatgggcggccggagaaactacaagaccacgctcccggtgttggaactcgaaggctccttct  
tcctctacagcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc  
cgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa  
tga

图3E

Epo-CCA-Fc 核苷酸序列(下划线为 K<sup>b</sup> 信号肽, 粗体为酸性卷曲螺旋)

atgggtaccgtgacgctgctcctgctgttggcggccgcccctggctccgactcagaccggccgg  
gctctagagccccaccacgctcatctgtgacagccgagtcctgcagaggtacctcttggaggc  
caaggaggccgagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatataact  
gtcccagacaccaaagttaatttctatgcttggaaaggatggaggtcgggcagcaggccgtag  
aagtctggcaggggcctggccctgctgtcggaaagctgtcctggggggccaggccctgttgggtcaa  
ctcttcccagccgtgggaagccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtgcccttcgcagc  
ctcaccactctgcttcgggctctgggagcccagaagggaagccatctccctccagatggggcct  
cagctgctccactccgaacaataactgctgacactttccgcaaaactcttcgaggtctactccaa  
tttccctccgggggaagctgaagctgtacacaggggaggccctgcaggaccgggtgacagggaattc  
gggtggtgagtaccaggccctggagaaggagggtggcccagctggaggccgagaaaccaggccctgg  
agaaggagggtggcccagctggagcaccgagggtggtggtcccgaccccgagctgctgggcggacc  
gtcagtccttctcttcccccaaaaacccaaggacacctcatgatctccgggacccctgaggtc  
acatgctggtggtggtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacg  
gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggaggcagtagacaacagcacgtaccgtgt  
ggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtc  
tccaacaaagccctccagcccccatacgagaaaccatctccaagccaaagggcagccccgag  
aaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgac  
ctgcttgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg  
gagaacsaactacaagaccacgctcccggtgttggaactcgaaggctccttcttctctacagca  
agctcacgtggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga  
ggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaatga

图3F

## CCB-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为碱性卷曲螺旋)

atggtaccctgcacgctgctcctgctgttggcggccgcccctggctccgactcagacccgcgcgcg  
gcgaatttcgggtggtgagtagcaggccctgaggaagaagggtggcccagctgaaggccaagaacca  
ggccctgaagaagaagggtggcccagctgaagcacaagggcggcggcccccagagctcctg  
ggcgggaccgtcagtccttcttccccccsaaccacgaaggacaccctcatgatctcccggaacc  
ctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtg  
cgtggacggcgtggaggtgcataatgccagacaaagccgcgggaggagcagtagcagcagcag  
taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagt  
gcaaggctctccaacaaggccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaagccaagggca  
gccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtc  
agcctgacctgcctggtcasaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcagc  
ggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccggtgttggactccgacggctccttcttct  
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg  
atgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagcagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图3G

CysFc 核苷酸序列(下划线为 hIFN $\alpha$  信号肽)

atggccttgaaccttgccttactgggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcagctgctctg  
tgggctgcccgcgctgcccagctccggaactgctgggcggaccgtcagtcctcctcttcccccc  
aaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtg  
agccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcca  
agacaaagccgcgggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct  
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccsacaaagccctccagcc  
cccatcgagaaaaccatctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgc  
ccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgacctggtcaaaggcttcta  
tcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaaccag  
cctcccggtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagca  
ggtggcagcgggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacac  
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图3H

IFN $\alpha$  GS15 Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽)

atggccttgaccttctgctttactggtgcccctcctgggtgctcagctgcaagtcaagctgctctg  
tgggctgtgatctgcctcacaacacacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca  
gatgaggagaaatctctctctctctctctgcttgsaggacagsestgactttggatttccccaggag  
gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga  
tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt  
ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaggcctgtgtgatacaggggggtgggggtg  
acagagactccctgatgaggaggagctccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca  
ctctctatctgaaagagagaaatacagcccttgtgctggggaggttgtcagagcagaaatcat  
gagatctttttctttgtcaacaaacttgcaagaaagttaacgtagttaggaagggtggcgggcga  
tccggtggaggcggtccggcggtggaggagcgacaaactcacacgtgcccgcctgcccag  
ctccggactgctgggcggccgtcagttctctcttcccccaaaaacccaggacacccctcat  
gatctcccggaacccctgaggctcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagacccctgaggctc  
aagttcaactggtacgtgggcggcgtggagggtgcztatgccaagacaaagccgcggggaggagc  
agtcacacagcagctacgtgtggtcggcgtcctcacgcgtcctgacccaggactggctgaatgg  
caaggagtacaagtgcagggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctcc  
aaagccaaaggcgagcccgagaaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccgggatgagctga  
ccaagaaccagggtcagcctgacctgacctgggtcaagggttctatcccagcgacatcgccgtgga  
gtgggagagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccggtgtggactccgac  
ggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtct  
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtc  
tcgggttaattga

图3I

## EpoFc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头)

atgggagtgacgaatgtcctgcctggtgtggtttctcctgtccctgctgtcgctccctctgg  
gcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtctggagaggtacct  
cttggaggccaaggaggccgagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgag  
aatatcaactgtcccagacaccaaagttaatttctatgcctggaagaggatggagggtcgggcagc  
aggcctgagaagtctggcaggccctggccctgctgtcggaaagctgtcctgcggggccaggccct  
gttgggtcaactcttcccgccgtgggagccctgcagctgcatgtggataaagccgtccgtggc  
cttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagcccgagaagggaagccatctccctccag  
atgaggcctcagctgctccactccgaacaatactgctgacacttccgcaactcttccgagt  
ctactccaatttctccggggaaagctgaagctgtacacagggggaggcctgcagaaacaggggac  
agagagtgcgcgggcgcgtgcgggtcgacaaactcacacatgccacacgtgccagctccgg  
aactcctgggcggaccgtcagttctctcttcccccaaaaacccaggacacccctcatgatctc  
ccggaccctgaggctcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccaagagacccctgagggtcaagttc  
aactggtaacgtgggcggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccgcggggaggagcagta  
acagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacggtcctgcaccaggactggctgaatggcaagga  
gtacaagtgcagggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaagcc  
aaaggggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccgggatgagctgaccaaga  
accagggtcagcctgacctgacctgggtcaagggttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga  
gagcaatgggcagccggagaaacaactacaagaccacgcctcccggtgttggactccgacggctcc  
ttcttctctacagcaagctcacggtggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat  
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccggg  
taaatga

图3J

# 通过天然连接形成单体/二聚体复合体的各种方法

注意：肽可以用任何其他小分子、DNA 等取代。

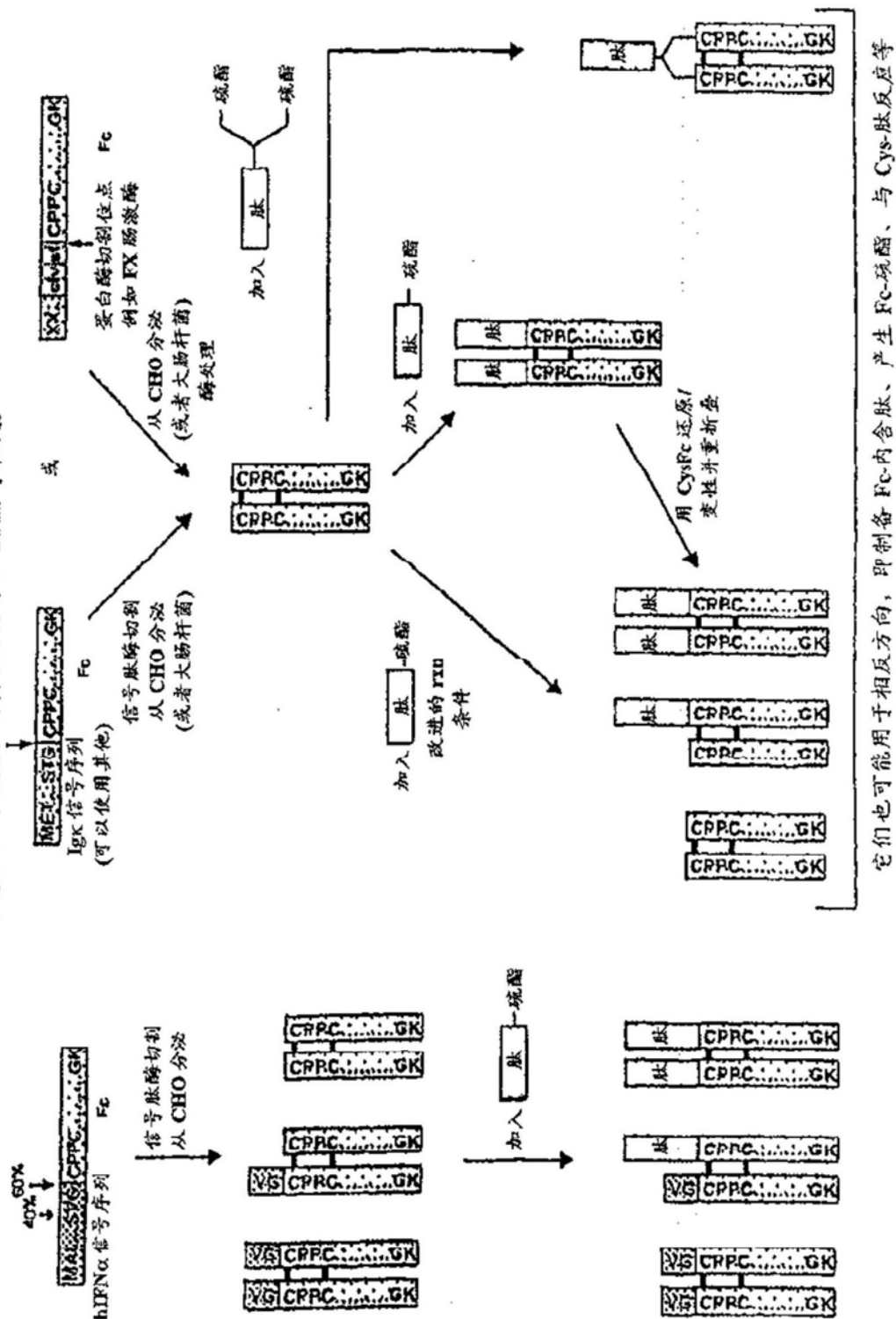


图4



**Fc-MESNA 的氨基酸序列** (在 pTWIN1 载体中从 NEB 生产; 当 Fc-内含肽-CBD 用 MESNA 从几丁质珠洗脱时, 产生在最后的 Phe 残基上具有 C 末端硫酯的以下蛋白质)

```

1  MGIEGRGAAA VDTSHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
51  TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
101 HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
151 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGOPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK
201 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGF

```

图5a

**pTWIN1 中 Fc CDS 的核苷酸序列** (最后的 F 残基 ttt 直接连接 pTWIN1 中的 Mxe GyrA 内含肽 CDS)

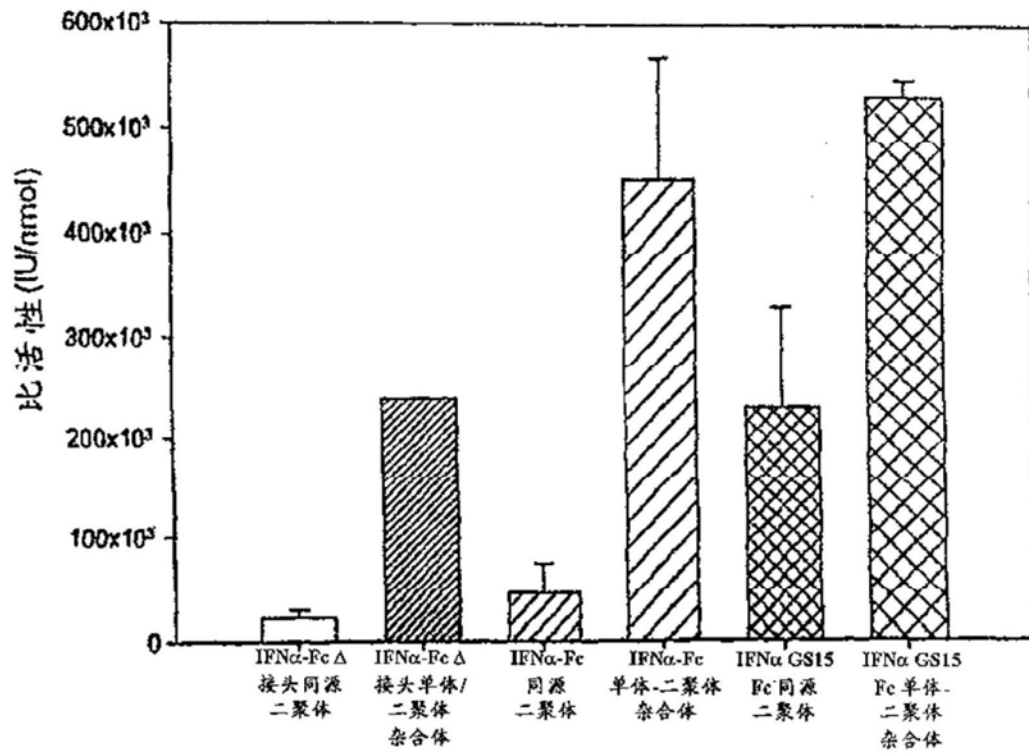
```

atggggcattgaaggcagagggcgccgctgcggctcgatactagtcacacatgccaccgctgccag
cacctgaactcctggggggaccgtcagtccttctcttccccccaaacccaaaggacacctcat
gatctcccggaacctcgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccacgaagacctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcggggaggagc
agtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgctcctcacggtcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaacctctcc
aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctga
ccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaagggttctatcccagcgacatcgccgtgga
gtggggagagcaatgggcagccggsggaaactacaagaccacgcctcccgtgttggaactccgac
ggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagtctctccctgtc
tccgggtttt

```

图5b

IFN $\alpha$ -Fc 二聚体和杂合单体-二聚体融合体的  
抗病毒活性(IU/nmol)



测试的 IFN $\alpha$  融合蛋白

图6



## STA-CLOT VIIa-rTF 凝血试验

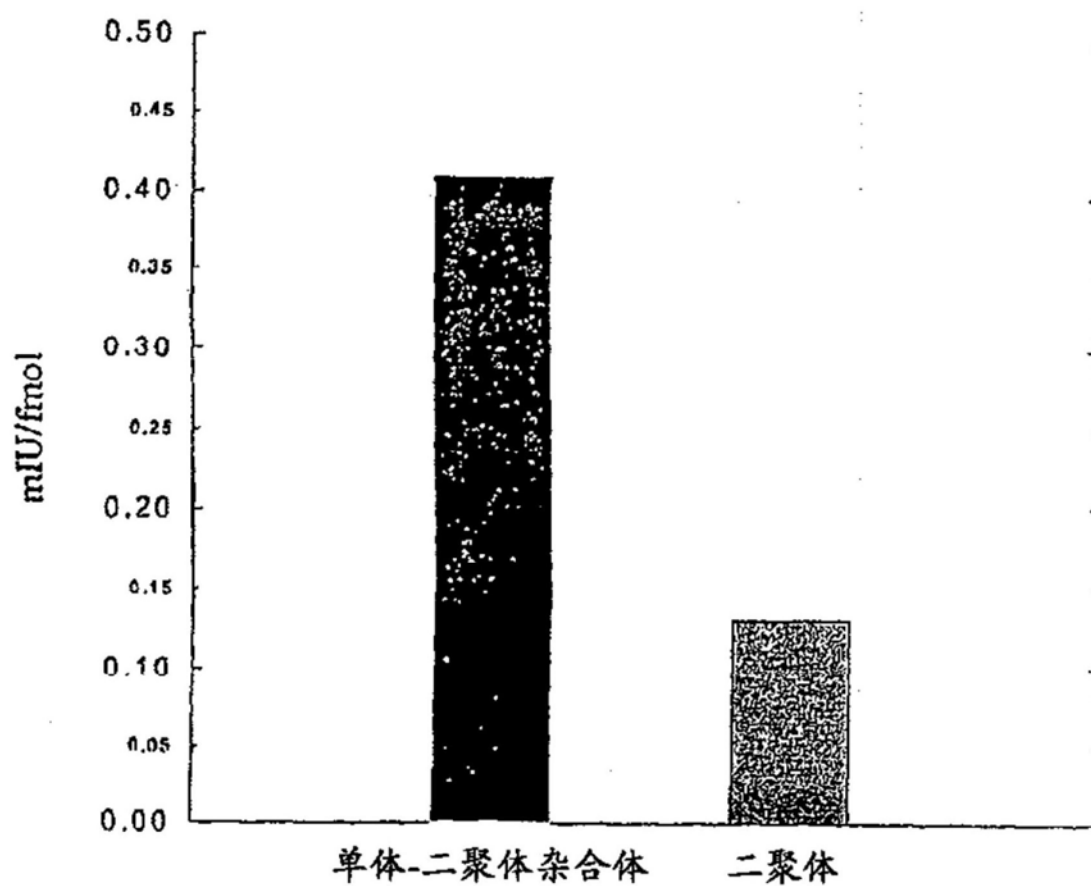


图7

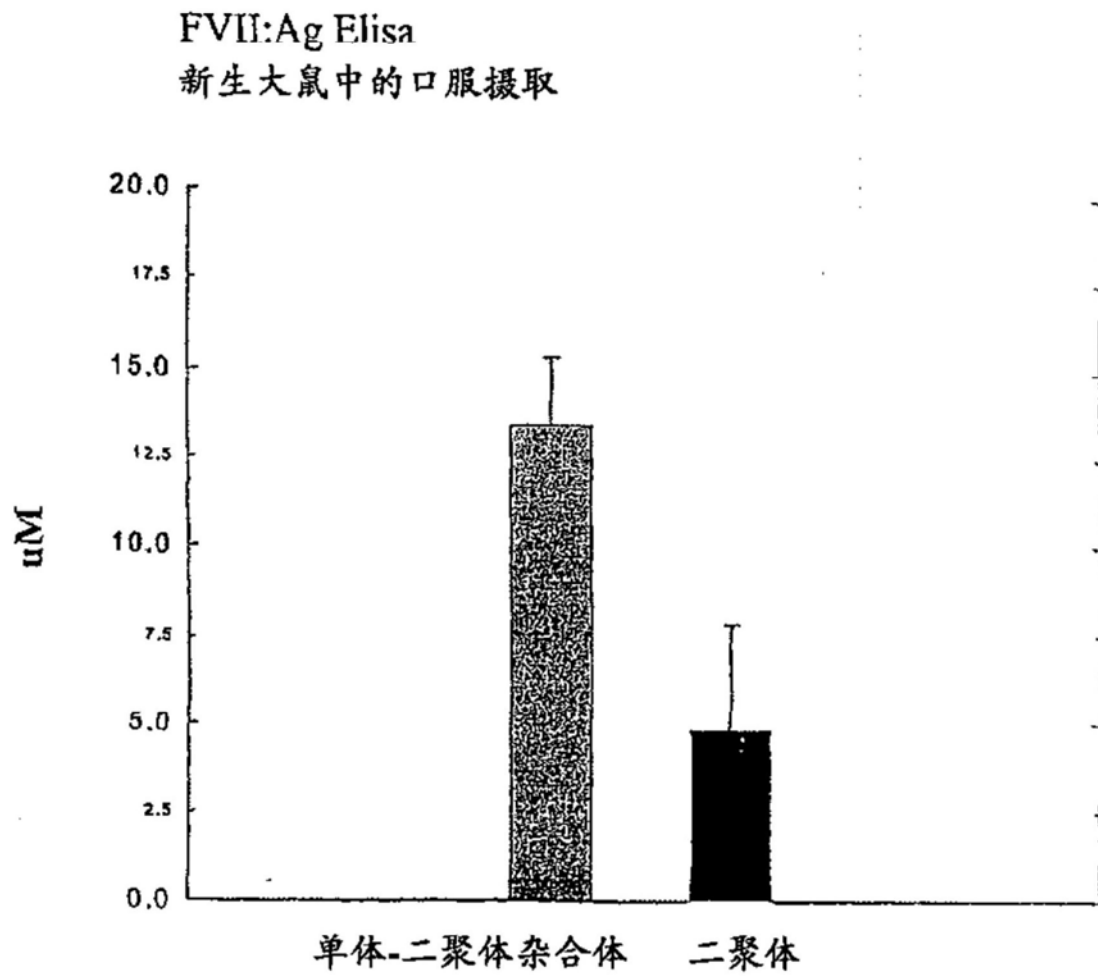


图8

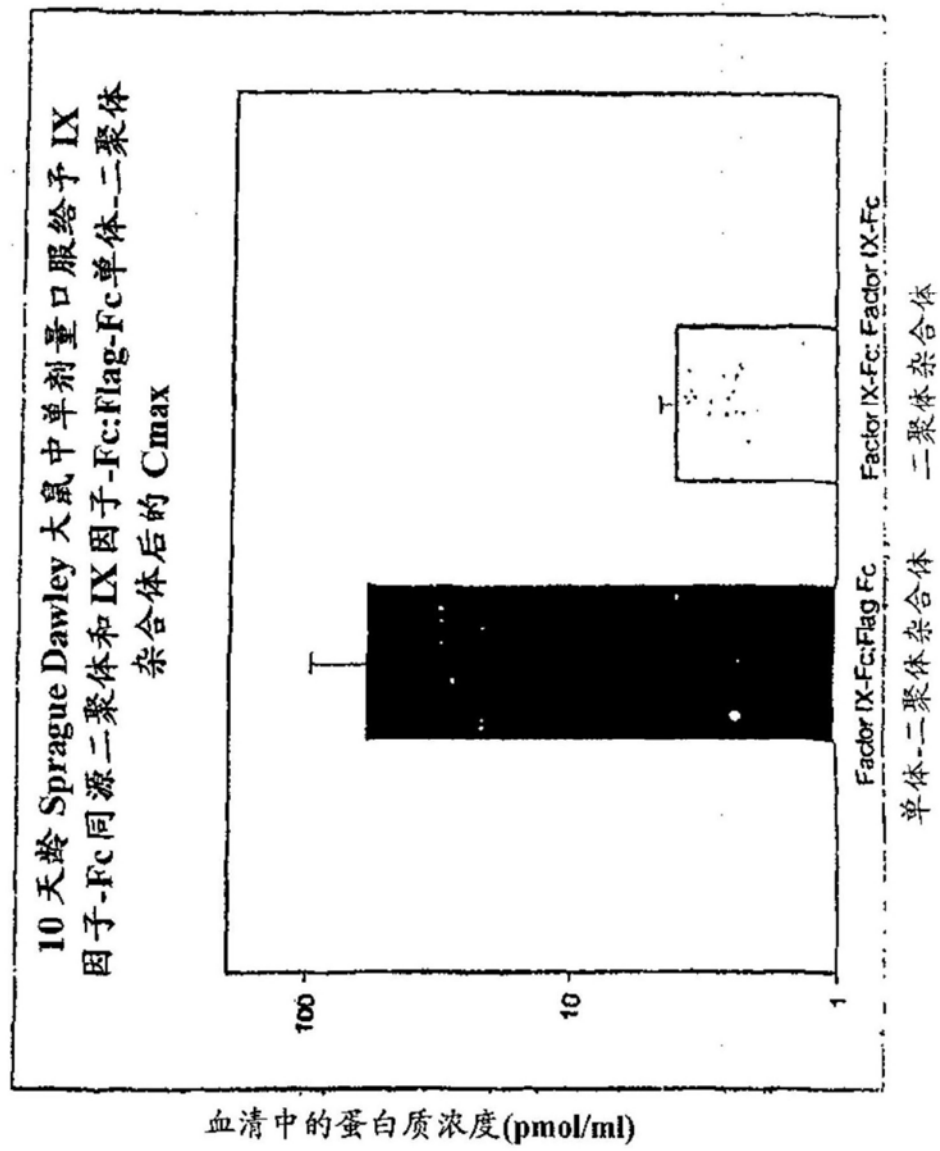


图9

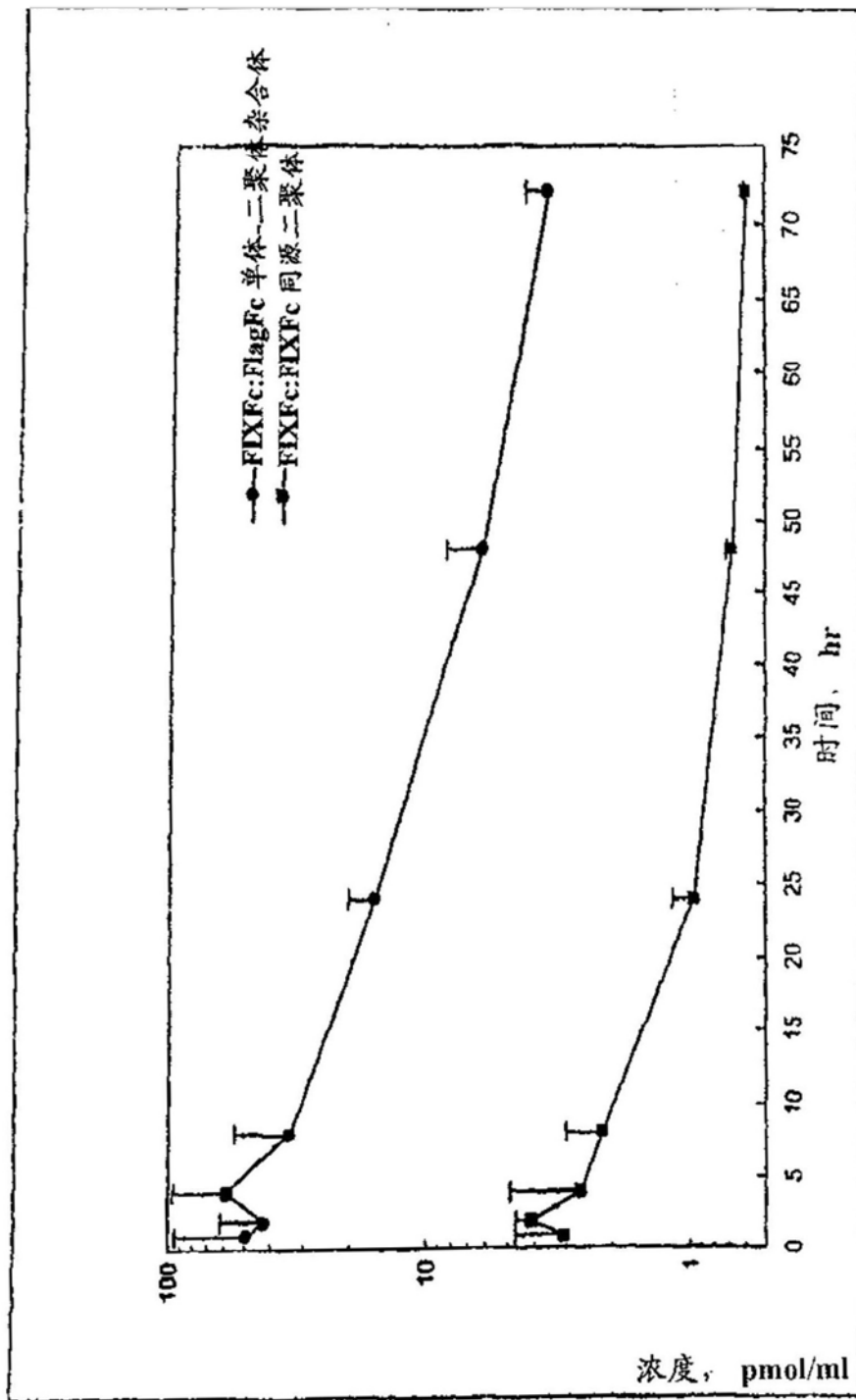


图10

在猕猴中肺部单剂量给药后 EpoFc 二聚体和  
单体-二聚体杂合体的药物动力学  
摩尔比较

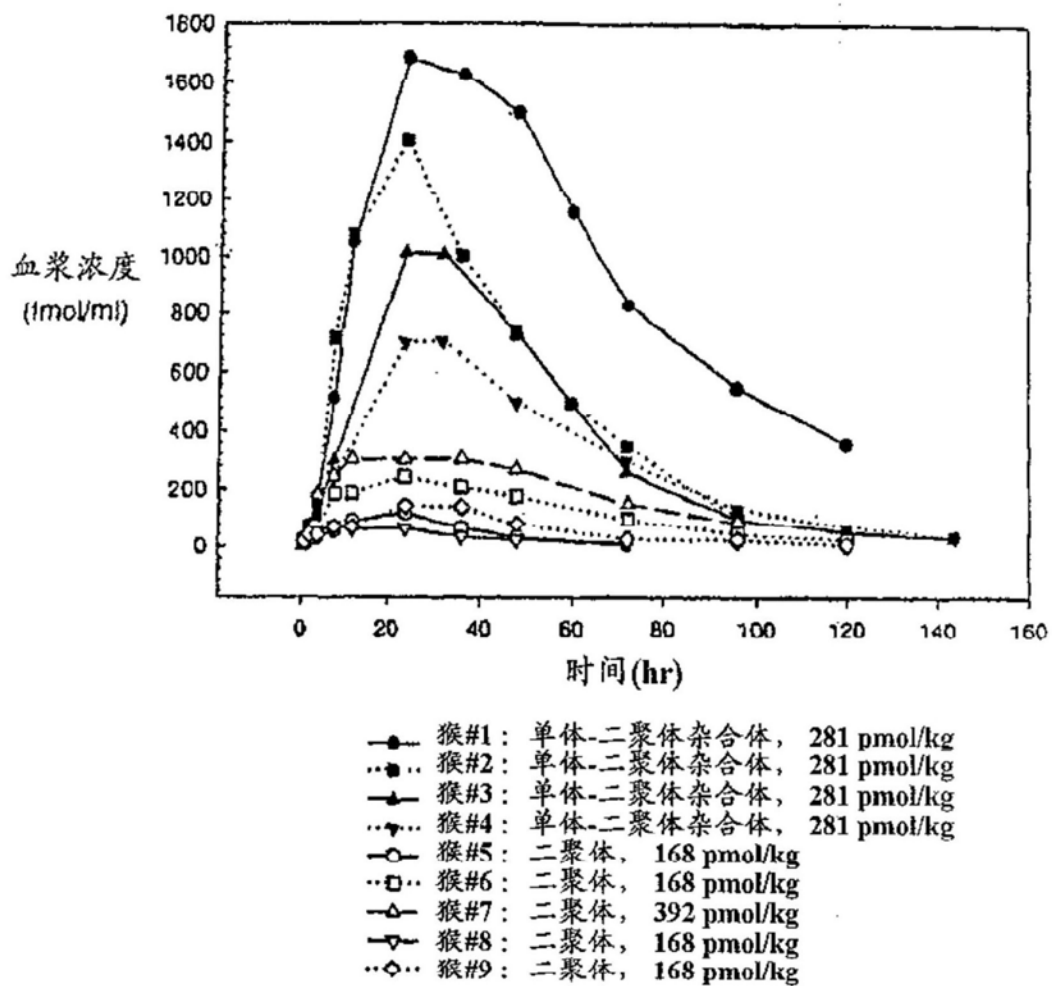


图11

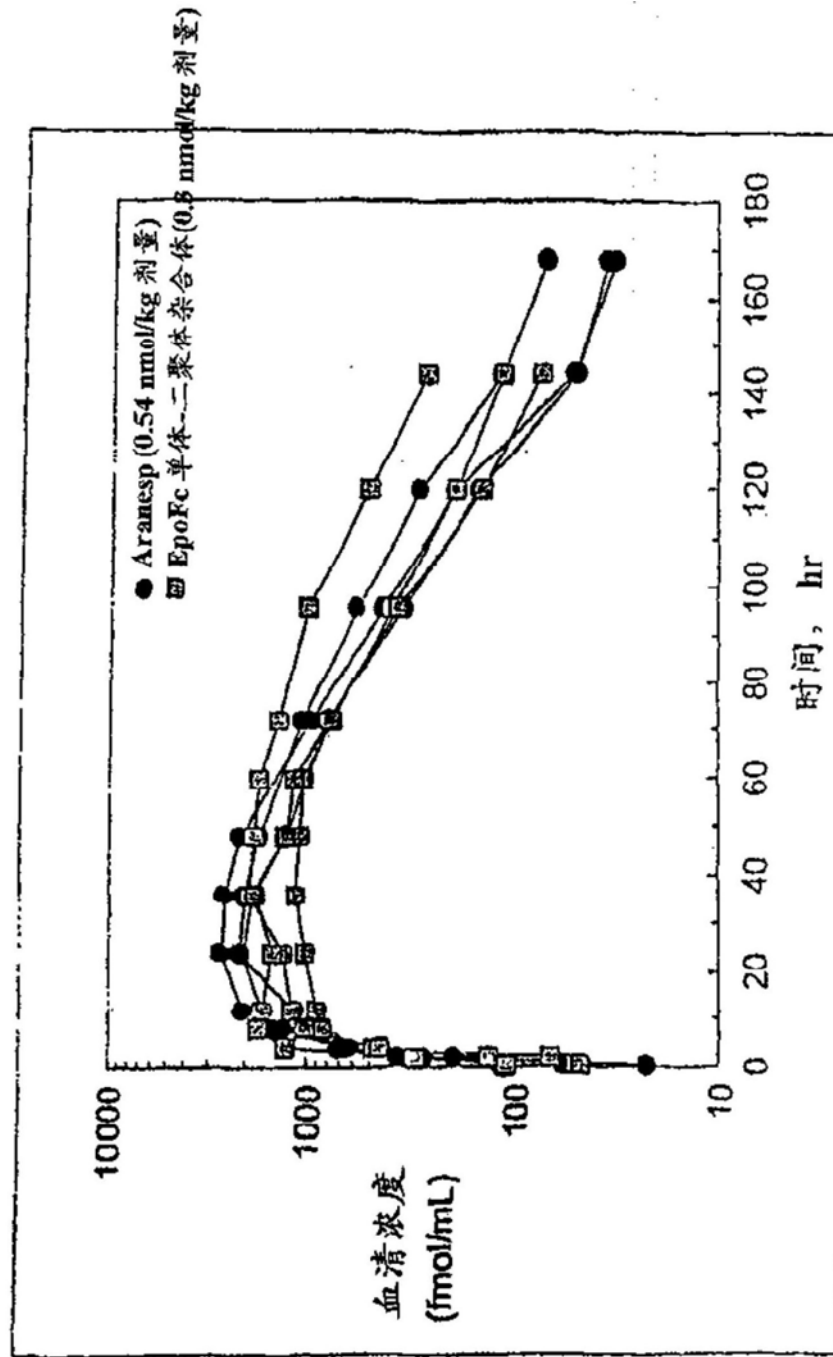


图12

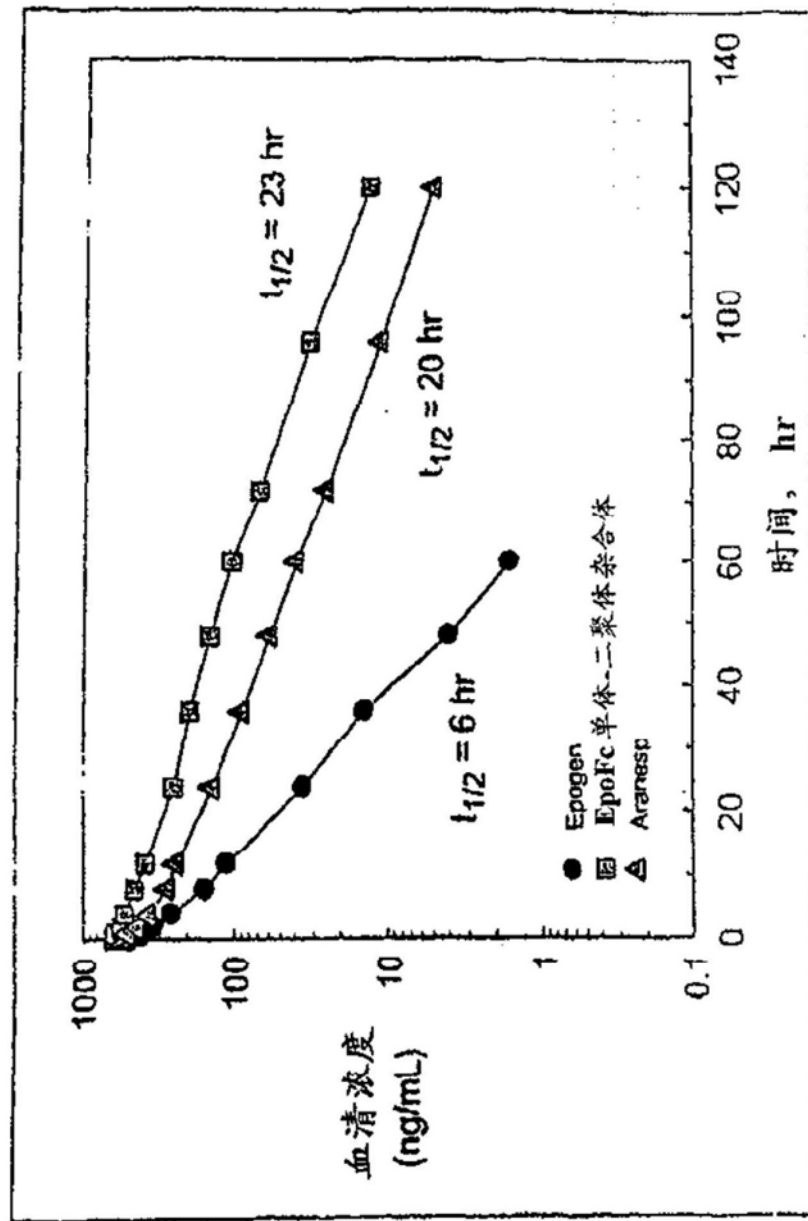


图13

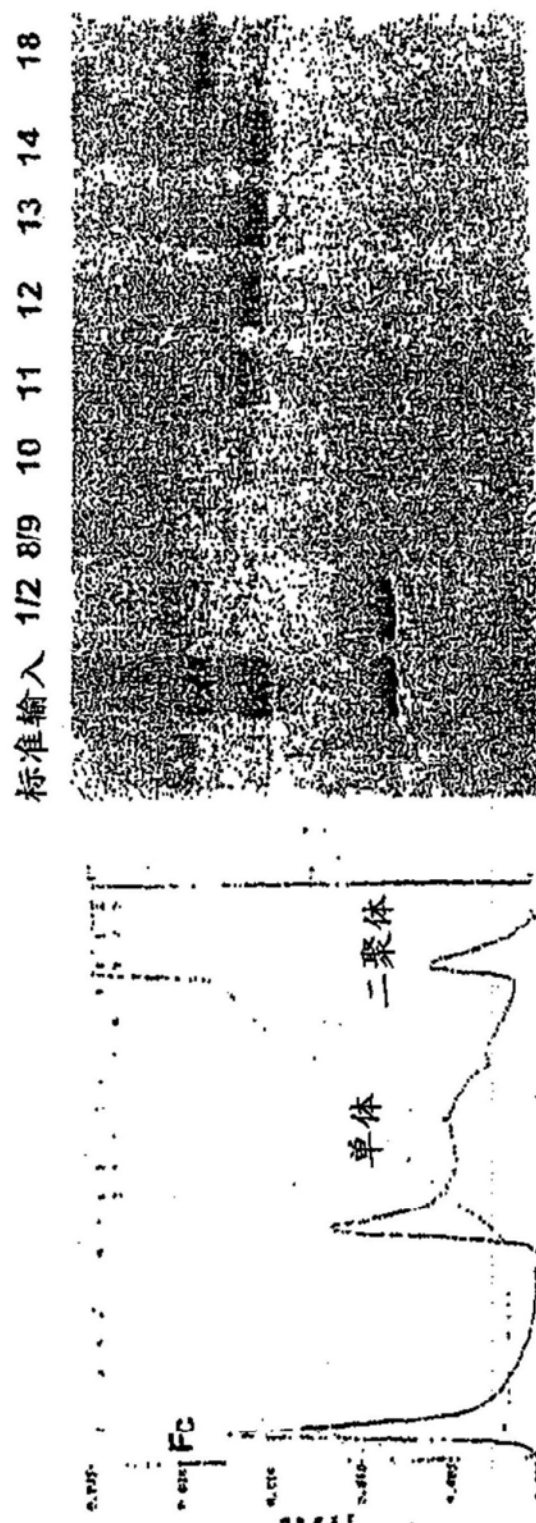


图14



单剂量肺部给药(20 $\mu$ g/kg)后猕猴血清中  
IFN $\beta$ -008 (IFN $\beta$ -Fc wt 二聚体)和 IFN $\beta$ -009/Fc-014  
(IFN $\beta$ -Fc N297A 单体)的药物动力学

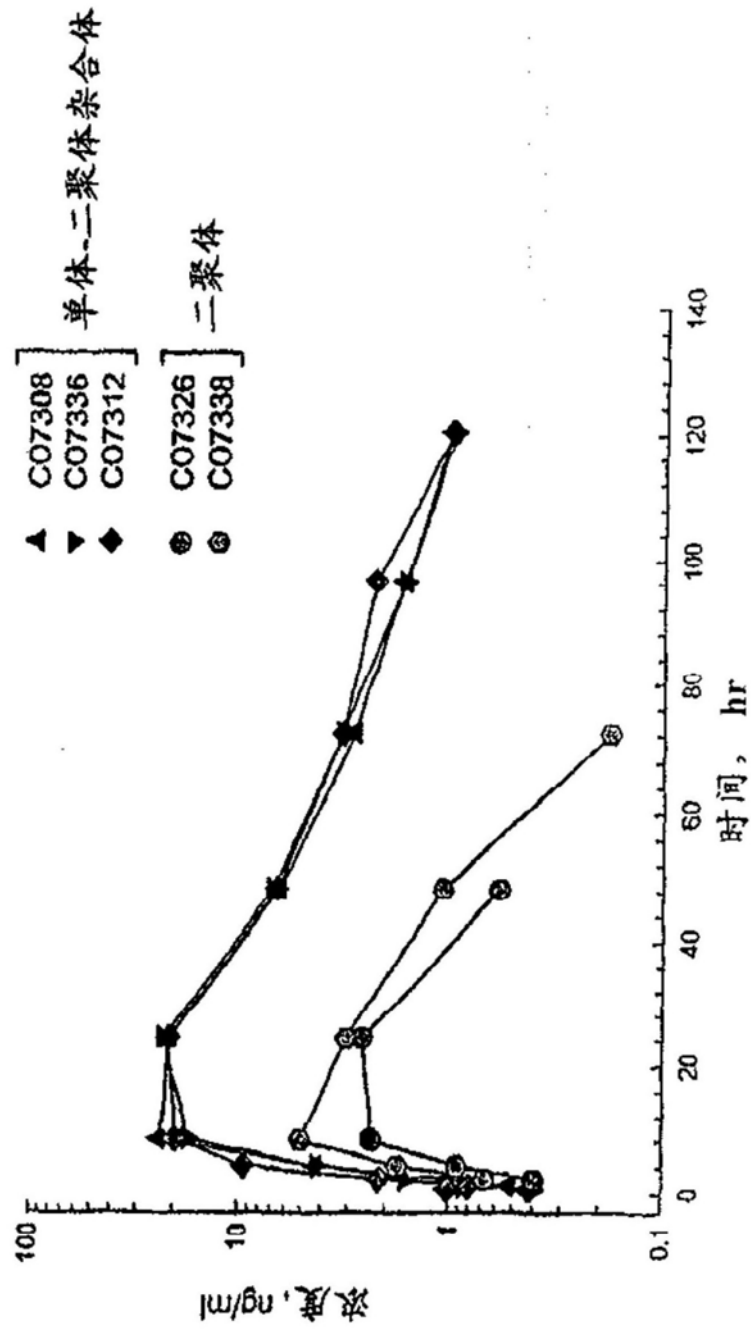


图15

单剂量肺部给予 IFN $\beta$ -008 (IFN $\beta$ -Fc wt 二聚体)  
或 IFN $\beta$ -009/Fc-014 (IFN $\beta$ -Fc N297A 单体)(20 $\mu$ g/kg)  
后猕猴血清中的新喋呤水平

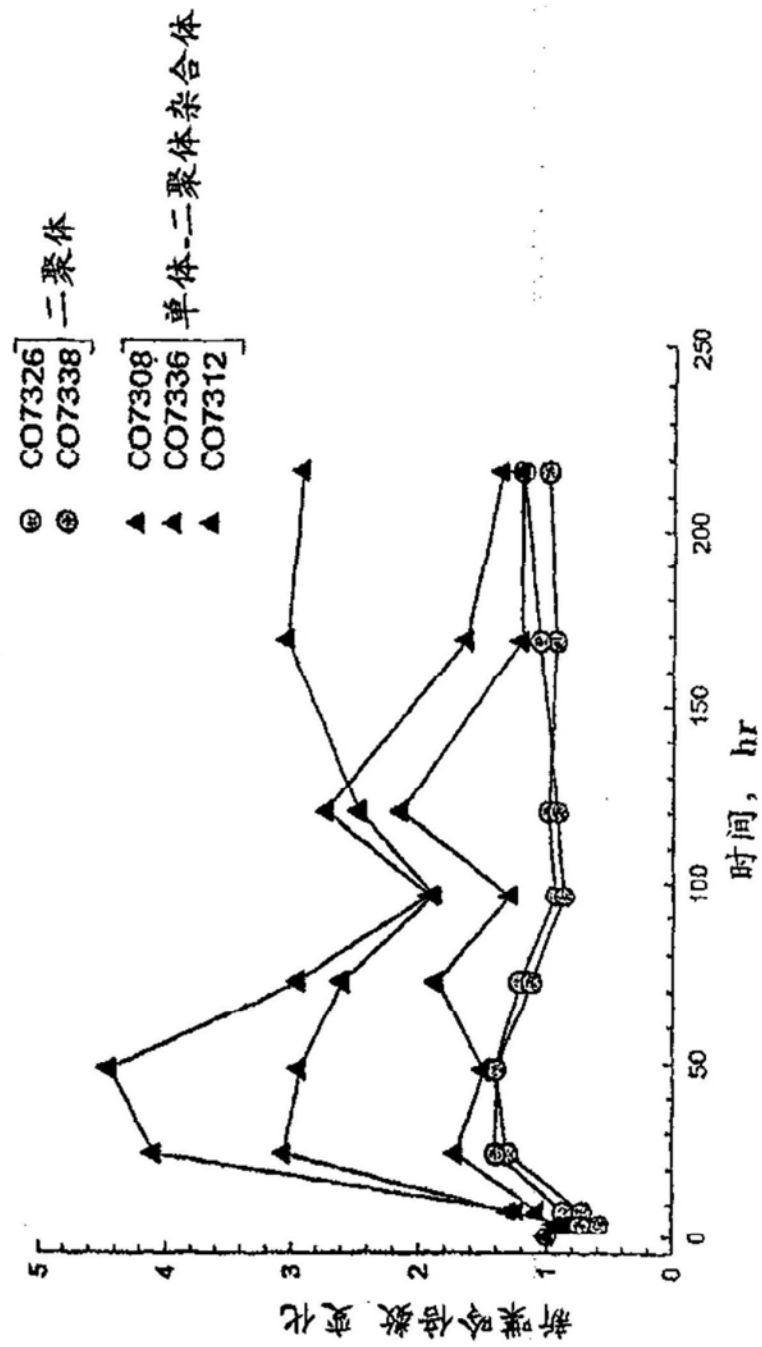


图16

IFN $\beta$ -Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽)

atgaccaacaagtggtctcctccaaattgctctcctgttggtgcttctccactacagctctttcca  
tgagctacaacttgcttggattcctacaaagaagcagcaattttcagtgtcagaagctcctgtg  
gcaattgaatgggaggcttgaatattgectcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggag  
attaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgcgcattgaccatctatgagatgctccaga  
acatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaa  
cctcctggctaatagtctatcatcagataaaccatctgaagacagtcctggaagaaaaactggag  
aaagaagatttcaccaggggaaaactcatgagcagctctgcacctgaaaagatattatgggagga  
ttctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgcctggaccatagtcagagtggaat  
cctaaggaaacttttacttcattaacagacttacaggttacctccgaaacgagttcgccggcgcc  
gctgcggtcgacaaaactcacacatgccaccgtgccagctccggaactcctgggcggaccgt  
cagtccttctcttcccccccaaaacccaaggacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcac  
atgcgtggtggtggaagctgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggaacg  
gtggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagcacgtacctgtgg  
tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctc  
caacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaa  
ccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct  
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgga  
gaacaactacaagaccaagcctccctggttggaactcgaagcctccttctctacagcaag  
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctcctgatgcagagg  
ctctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

图17A

IFN $\beta$ -Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头序列, 粗体下划线为 N297)

1	<u>MTNKCLLQIA</u>	<u>LLLCFSTTAL</u>	<u>SMSYNLLGFL</u>	<u>QRSSNFQCQK</u>	<u>LLWQLNGRLE</u>
51	<u>YCLKDRMNFD</u>	<u>IPEEIKQLQQ</u>	<u>FQKEDAALTI</u>	<u>YEMLQNI</u>	<u>FAI</u>
101	<u>NETIVENLLA</u>	<u>NVYHQINHLK</u>	<u>TVLEEKLEKE</u>	<u>DFTRGKLMSS</u>	<u>LHLKRYYGRI</u>
151	<u>LHYLKAKBYS</u>	<u>HCAWTIVRVE</u>	<u>ILRNFYFINR</u>	<u>LTGYLRNEFA</u>	<u>GAAAVDKTHT</u>
201	<u>CPPCPAPELL</u>	<u>GGPSVFLFPP</u>	<u>KPKDTLMISR</u>	<u>TPEVTCVVVD</u>	<u>VSHEDPEVKF</u>
251	<u>NWYVDGVEVH</u>	<u>NAKTKPREEQ</u>	<u>YNSTYRVVSV</u>	<u>LTVLHQDWLN</u>	<u>GKEYKCKVSN</u>
301	<u>KALPAPIEKT</u>	<u>ISKAKGQPRE</u>	<u>PQVYTLPPSR</u>	<u>DELTKNQVSL</u>	<u>TCLVKGFYPS</u>
351	<u>DIAVEWESNG</u>	<u>QPENNYKTP</u>	<u>PVLDSGGSFF</u>	<u>LYSKLTVDKS</u>	<u>RWQQGNVFSC</u>
401	<u>SVMHEALHNNH</u>	<u>YTQKSLSLSP</u>	<u>GK</u>		

图17B

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 99).

图18A

NNLRAIEAQQHLLQLTWGKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO: 100)

图18B

WQEWKQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 101)

图18C