

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 8 月 6 日 (06.08.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/156467 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/56 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
C12N 15/21 (2006.01) *A61P 31/20* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/073903

(22) 国际申请日: 2020 年 1 月 22 日 (22.01.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910090516.2 2019 年 1 月 30 日 (30.01.2019) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路 220 号,
Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 袁正宏 (YUAN, Zhenghong); 中国上海市
医学院路 138 号, Shanghai 200032 (CN)。
陈捷亮 (CHEN, Jieliang); 中国上海市医学院
路 138 号, Shanghai 200032 (CN)。李亚明
(LI, Yaming); 中国上海市医学院路 138 号,
Shanghai 200032 (CN)。

(74) 代理人: 上海东亚专利商标代理有限公司
(SHANGHAI EAST ASIA PATENT & TRADEMARK
AGENCY CO., LTD.); 中国上海市长乐路 672 弄 33
号 A 座 4 层董梅, Shanghai 200040 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,

AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2 (a))。

(54) Title: HUMAN α INTERFERON RECEPTOR BINDING-RELATED SITE MUTANT AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 人 α 干扰素受体结合相关位点突变体及其用途

(57) Abstract: Provided is a human α interferon receptor binding-related site mutant IFN- α 2-EIFK. The mutant has stronger anti-hepatitis B virus activity than IFN- α 2, and has no cytotoxic effect at an antiviral concentration. An anti-hepatitis B virus drug can be prepared therefrom.

(57) 摘要: 提供一种人 α 干扰素受体结合相关位点突变体 IFN- α 2-EIFK, 所述突变体较 IFN- α 2 具有更强的抗乙型肝炎病毒活性, 且在抗病毒浓度下无细胞毒效应, 可制备抗乙型肝炎病毒药物。



WO 2020/156467 A1

人 α 干扰素受体结合相关位点突变体及其用途

技术领域

本发明属医药和生物工程学技术领域，涉及人 α 干扰素受体结合相关位点突变体及其用途，尤其涉及通过改造人类 α 干扰素及纯化制备的 α 干扰素突变体及其在制备抗乙型肝炎病毒制剂中的用途，所述制剂降低或清除乙肝病毒感染肝细胞中病毒表面抗原（HBsAg）及DNA。

背景技术

乙型肝炎病毒（HBV）是严重危害人类健康的重要病原体。据有关统计，全球大约有2.4亿HBV携带者，其中我国慢性HBV感染者近8000万人；虽然目前已有可预防HBV感染的乙肝疫苗，但是，每年仍有几十万的新发乙肝慢性感染病例，同时，每年有几十万人死于慢乙肝导致的肝脏疾病。由于特异性治疗手段的缺乏，如何达到慢乙肝功能性治愈，即乙肝表面抗原（HBsAg）转阴和cccDNA持久沉默，乃至完全治愈即病毒基因组DNA（cccDNA）清除，仍是本技术领域中的难题，其中，如，若干患者为控制病毒感染及治疗疾患需长期乃至终身服用核苷（酸）类抗病毒药物，造成严重的经济负担及降低了生活质量。

干扰素（Interferon, IFN）是一类具有直接抗病毒效应、免疫调节作用的细胞因子，于1957年最初被发现并命名，在宿主抗病毒免疫应答过程中发挥着关键作用。目前已鉴定的IFNs有十几种，根据所结合受体的不同，IFNs大致被分为I和II两型：I型干扰素主要包括IFN- α 和IFN- β （IFN- λ 一般归为III型干扰素），II型干扰素则主要是IFN- γ ，其中，随着基因工程技术的出现及发展，重组人IFN- α 于上世纪被克隆及生产应用于治疗病毒性肝炎等疾病；相较另一大类用于治疗慢乙肝的药物—核苷（酸）类似物，研究显示，IFN- α 及其PEG化产物（PEG-IFN- α ）除了具有直接抗病毒作用外还兼具免疫调节作用，因此具有相对更高的HBsAg转阴及持续应答率更高的优势；然而，临床统计表明，IFN- α 治疗慢乙肝的效率仍较低，如，长效干扰素治疗48个月HBe抗原（HBeAg）阳性患者仅约三成可出现HBeAg转阴，而HBsAg的转阴率则更低于5%，为此，业内共识，亟待优化提升干扰素抗乙肝病毒效率和应答率。

研究显示,干扰素通过特异性结合到细胞表面的 IFNAR 启动下游 JAK-STAT 信号通路的转导进而诱导干扰素刺激基因(ISGs)的转录表达而发挥抗病毒作用;目前已知包括 IFN- α 2 在内,有 13 种人类 IFN- α 亚型被陆续鉴定,它们的编码基因均位于人 9 号染色体,各亚型 α 干扰素间具有较多相似的结构域,但有 30% 左右序列为非保守;部分报道表明,虽然不同亚型 IFN- α 均通过与 I 型干扰素受体的两个亚基 IFNAR1 和 IFNAR2 结合而发挥作用,但由于与两受体亚基的结合亲和力各异,各亚型 IFN- α 激活下游经典或旁路信号通路的方式及程度存在差异;同时,不同病毒及不同细胞对于 IFN 亚型的敏感性也存在不同;有通过对干扰素及其受体亲和力的研究发现,干扰素通常对 IFNAR2 的结合力高,而对 IFNAR1 的结合力低,而干扰素氨基酸序列中与干扰素受体结合相关的氨基酸位点已基本被解析。

前期研究显示,HBV 对不同 IFN- α 亚型的敏感性不同,其中同等作用浓度下 IFN- α 14 抑制 HBV 复制的效果最为显著。另有研究报道 IFN- α 的 13 种亚型与干扰素受体两亚基的结合解离常数不同,据此对各 IFN- α 亚型抑制 HBV 分泌到血清中的病毒抗原及细胞内的 HBV RNA 水平进行回归性分析,发现不同亚型的 IFN- α 抑制 HBV 的效应与其对 IFNAR1 的亲和力而非 IFNAR2 呈正相关;进一步通过比对 IFN- α 2 和 IFN- α 14 的氨基酸序列,分析 IFN- α 与 IFNAR1 结合的氨基酸位点,发现两者间有 4 个氨基酸位点存在差异,将 IFN- α 2 上这 4 个氨基酸位点突变为相应的 IFN- α 14 的氨基酸,进而对该 IFN- α 2 突变体进行抗病毒功能和信号通路激活上的检测,发现其具有了类似 IFN- α 14 的抗病毒效果和信号通路激活效应;该研究结果一方面从科学认知上丰富了对 α 干扰素抗病毒机制的认识,另一方面为开发基于干扰素受体结合相关位点突变体的新型治疗慢乙肝手段提供了理论和技术基础。

基于现有技术的现状与基础,本申请的发明人拟提供人 α 干扰素受体结合相关位点突变体及其用途,通过改造人类 α 干扰素及纯化制备的 α 干扰素突变体及其在制备抗乙型肝炎病毒制剂中的用途。

发明内容

本发明目的是基于现有技术的现状与基础,提供人 α 干扰素受体结合相关位

点突变体，

本发明的再一目的在于提供所述人 α 干扰素受体结合相关位点突变体的用途。通过突变特定人 IFN- α 2 与干扰素受体 1 亚基相互作用位点的氨基酸，提升其直接抗 HBV 效应。

本发明研究显示，突变个别特定氨基酸位点得到的干扰素突变体相较目前临床所使用的 IFN- α 2 抗 HBV 效应更强而工作浓度更低，能降低或清除乙肝病毒感染肝细胞中病毒表面抗原（HBsAg）及 DNA。

本发明为开发基于特定 α 干扰素突变体的新型治疗慢乙肝的制剂提供了新的思路和理论技术支撑。

基于本申请前期研究，HBV 对不同 IFN- α 亚型的敏感性不同，其中同等作用浓度下 IFN- α 14 抑制 HBV 复制的效果最为显著；和有研究报道的 IFN- α 的 13 种亚型与干扰素受体两亚基的结合解离常数不同，及对各 IFN- α 亚型抑制 HBV 分泌到上清中的病毒抗原及细胞内的 HBV RNA 水平进行回归性分析显示，不同亚型的 IFN- α 抑制 HBV 的效应与其对 IFNAR1 的亲合力而非 IFNAR2 呈正相关，以及比对 IFN- α 2 和 IFN- α 14 的氨基酸序列和分析 IFN- α 与 IFNAR1 结合的氨基酸位点发现两者间有 4 个氨基酸位点存在差异，将 IFN- α 2 上这 4 个氨基酸位点突变为相应的 IFN- α 14 的氨基酸，对该 IFN- α 2 突变体进行抗病毒功能和信号通路激活上的检测，发现其具有了类似 IFN- α 14 的抗病毒效果和信号通路激活效应，等研究基础；本发明通过构建原核表达的人 IFN- α 及其突变质粒，通过原核表达纯化蛋白的方法制得有生物学活性的人 IFN- α 亚型及相应突变体重组蛋白。

具体的，本发明中，在关于不同亚型 IFN- α 抗 HBV 差异及该差异与干扰素-IFNAR1 亲合力呈正相关的研究基础上，通过比较抗 HBV 效应更强的 IFN- α 14 的氨基酸序列与临床使用的 IFN- α 2 氨基酸序列，发现 4 个与 IFNAR1 结合相关的氨基酸位点在两种亚型的 IFN- α 中存在差异；针对此，本发明将人 IFN- α 2 的第 82 位天冬氨酸突变为谷氨酸，第 86 位苏氨酸突变为异亮氨酸，第 89 位酪氨酸突变为苯丙氨酸，及第 120 位精氨酸突变为赖氨酸，获得一个对 IFNAR1 亲合力提升的干扰素突变体 IFN- α 2-EIFK。继而，在 HBV 感染细胞模型 HepG2-NTCP

和原代肝细胞 (primary human hepatocytes, PHH) 中, 对人 IFN- α 及相应突变体的抗 HBV 效果进行了比较, 检测人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 对 HBeAg, HBsAg 及 HBV DNA 的抑制效果, 结果显示, 所述的干扰素突变体 IFN- α 2-EIFK 具有类似 IFN- α 14 的强效抗 HBV 效果, 与同等浓度 IFN- α 2 相比较, 其对病毒 HBs 与 HBe 抗原和病毒 DNA 的抑制效果强 2-10 倍, 并且在工作浓度下均无细胞毒性。

本发明中, 相关 IFN- α 2 重组蛋白的氨基酸序列获取自人基因组, 序列为 SEQ ID NO. 1;

本发明中, 与 IFN- α 2 进行氨基酸序列对比的 IFN- α 14 序列为 SEQ ID NO. 3;

本发明中, 对 IFN- α 2 的 4 个 IFNAR1 受体结合相关氨基酸位点进行突变的 IFN- α 2-EIFK 的序列为 SEQ ID NO. 2。

本发明中通过下述方法制备与纯化人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK:

将人 IFN- α 2 基因编码序列 (SEQ ID No. 1), IFN- α 2-EIFK (SEQ ID NO. 2) 干扰素突变体序列 (如图 1A 所示), 及 IFN- α 14 序列 (SEQ ID No. 3) 克隆到原核表达载体上, 进行重组蛋白原核表达后获得干扰素, 再进行蛋白浓缩, 去除干扰素中的内毒素, 获得纯化后的稀释不同倍数的干扰素, 分装, 保存于 -80 °C。

本发明进行了原核表达系统纯化干扰素及其纯度评价; 以及人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素在 HBV 感染复制模型中抑制 HBV 抗原及 DNA 水平的比较实验, 以及人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素对经典 JAK-STAT1/STAT2 通路激活效应比较, 和人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素诱生部分干扰素刺激基因的差异比较。

本发明在 HepG2-NTCP 细胞中, 通过免疫印迹、干扰素刺激反应原件 (ISRE) 荧光报告系统及定量 PCR 实验数据表明, 相较于人 IFN- α 2, 所述的干扰素突变体 IFN- α 2-EIFK 对干扰素经典通路 JAK-STAT 通路具有更强的激活效应, 对 ISRE 具有更强的活化效应, 可诱生更高水平的 ISGs, 其中, 较现有技术的与干扰素抗 HBV 疗效相关的 ISGs 亚群有更高的诱生效应。

本发明的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体, 经试验及检测, 结果表明, 所述的干扰素突变体 IFN- α 2-EIFK 在抑制 HBV 表面抗原、e 抗原和病毒 DNA 含量上具有优于当前所使用 IFN- α 2 的活性, 且无细胞毒效应; 类似抗病毒效应下,

所述 IFN- α 2-EIFK 比 IFN- α 2 工作浓度低 10 倍以上。进一步，所述的 IFN- α 突变体可用于制备治疗慢性乙肝新型药物。

为便于理解，以下将通过具体的附图对本发明所述 IFN- α 2-EIFK 突变体相较于 IFN- α 2 具有更优抗 HBV 活性进行详细地描述。需指出的是，该附图仅是为了说明，显然本领域的普通技术人员可根据本文说明，在本发明的范围内对本发明做出个别位点和流程等的修改，这些修改也纳入本发明的范围内。

附图说明

图 1. 原核表达系统纯化干扰素及其纯度评价；

其中，A， 人 IFN- α 2、IFN- α 14 和 IFN- α 2-EIFK 突变体序列比对示意图；
B， 人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 纯化干扰素的考马斯亮蓝结果；

图 2. 人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素在 HBV 感染复制模型中，抑制 HBV 抗原及 DNA 水平的比较，其中，A， IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素在 HepG2-NTCP 细胞中的抗病毒效应；B， IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素在 PHH 细胞中的抗病毒效应；

图 3. 人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素对经典 JAK-STAT1/STAT2 通路激活效应比较，其中，A IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 刺激 STAT1 和 STAT2 磷酸化水平的差异；B， IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 活化 ISRE 的差异；

图 4. 人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 两种干扰素诱导部分干扰素刺激基因的差异比较。

具体实施方式

实施例 1 人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 的制备与纯化

将人 IFN- α 2 基因编码序列 (SEQ ID No. 1)，IFN- α 2-EIFK (SEQ ID NO. 2) 干扰素突变体序列 (如图 1A 所示)，及 IFN- α 14 序列 (SEQ ID No. 3) 克隆到原核表达载体上，随后进行重组蛋白原核表达；

(1) 将重组质粒转化入 E. coli BL-21，涂布于含干扰素的固体 LB 培养基，37℃ 待 16h 后，挑取单菌落到 3-4ml LB 重进行小摇，过夜。以 1:100 的比例将菌接入大摇，待 OD600 读数在 0.5-0.6 之间时，IPTG 终浓度 10 μ M 进行诱导，温度 16℃ 表达 20 小时，蛋白诱导表达完成后，将菌液加入到 50 ml 离心管，5000g，

4℃离心 10 min, 弃上清;

(2) 离心后的菌体用缓冲液 A (20 mM 磷酸盐缓冲液, 0.5 M 氯化钠, 20 mM 咪唑) 重悬, 重悬液的体积是菌液量的 1/50-1/100; 重悬菌块, 将其充分吹散后, 转移至 2 ml 离心管, 冰上超声: 超声破碎仪 high 档, 破碎 10 s, 冷却 10 s, 循环 6 次; 该步骤重复 3 次。10 000g, 4℃离心 25 min, 收集上清。将收集到的菌体裂解液上清用缓冲液 A 稀释到摇菌体积的 1/20, 对稀释好的样品进行过滤, 首先过 0.45 μm 的滤膜, 然后再过 0.22 μm 的滤膜, 样品置 4℃备用;

(3) 使用 GE 公司 AKTA avant 机器配合 GE Histrap HP (货号: 17524701) 进行亲和纯化。随后使用 GE 公司 AKRA avant 机器配合 GE HiTrap Q HP (货号: 17115401) 进行离子交换;

(4) 收集后的样品进行考马斯亮蓝染色, 对干扰素纯度进行鉴定 (如图 1B 所示);

(5) 将纯化好的干扰素用超滤管进行蛋白浓缩, 并将干扰素的缓冲液置换为 PBS;

(6) 为排除内毒素对实验结果的影响, 随后用 Triton X-114 对干扰素中的内毒素进行去除。干扰素与 10% Triton X-114 以 9:1 的比例进行混合, 4 °C 磁力搅拌 60 min, 充分混匀。30℃金属浴, 1000 rpm 振荡, 20 min; 拿出来颠倒混匀一下, 再 30℃金属浴, 1000 rpm 振荡, 20 min。25℃, 14000 g 离心 15 min, 小心移出上层水相到新拆封的 tube 管中, 以上步骤再重复一次;

(7) 将上述干扰素转移至预处理过的透析袋中, 透析袋外侧缓冲液为预冷过的 PBS, 透析过夜;

(8) 将纯化完成后的干扰素稀释不同的倍数, 进行 BCA 定量。全部完成后, 将干扰素分装, 保存在-80℃冰箱。

实施例 2 HBV 感染系统

将纯化的人 IFN-α 2 和 IFN-α 2-EIFK 重组蛋白处理感染有乙肝病毒颗粒的 HepG2-NTCP (图 2A) 或 PHH (图 2B) 细胞, 乙肝病毒 e 抗原 (HBeAg) 和 DNA 的产生受不同程度抑制:

(1) HepG2-NTCP 细胞的培养: 普通培养采用 DMEM 培养液 (Gibco 公司, 加 10%

胎牛血清、100U/ml 青霉素、100 mg/ml 链霉素)在 5% CO₂ 饱和水蒸气环境下 37 °C 恒温培养。进行乙肝病毒感染实验时,感染用培养基:普通培养基 + 2.5% DMSO, PHH 细胞的培养:购自上海瑞德生物并采用专用商业培养基培养;

(2) 感染所用的乙型肝炎病毒,由本室纯化。将 HepAD38 上清收集后,采用 PEG8000 沉淀的方法浓缩上清约 100 倍,感染时以 200 copies/cell 的浓度进行感染;

(3) 细胞感染 3 天后,向各组细胞分别加入人 IFN- α 2 或 IFN- α 2-EIFK 突变体干扰素 (HepG2-NTCP 系统中干扰素浓度为 0.2 或 1 ng/ml, PHH 系统中干扰素浓度为 0.04 或 0.2 ng/ml), 每孵育 72 小时进行换液及再处理;

(4) 感染后第 9 天,收集细胞上清 ELISA 检测病毒抗原标志物 HBeAg,用特异性 HBV 引物 qPCR 检测上清中病毒 DNA 的产生情况;

(5) 在两种 HBV 感染细胞模型中,结果均显示 IFN- α 2-EIFK 具有优于 IFN- α 2 的抗 HBV 抗原及病毒 DNA 产生的效果 (如图 2 所示);

(6) Western Blot 检测结果进一步显示,IFN- α 2-EIFK 相较 IFN- α 2 可更有力地激活经典 JAK-STAT1/STAT2 通路,即更高地刺激 STAT1 和 STAT2 的磷酸化水平;还可以更高水平的活化干扰素刺激原件 ISRE (如图 3 所示);

(7) 进一步检测 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 处理 HepG2-NTCP 细胞 6 小时后细胞内 ISGs 诱生情况,结果显示 IFN- α 2-EIFK 相较 IFN- α 2,可诱生更高幅度的 ISGs (如图 4 所示),分析认为这可能与具有更好的抗病毒效果相关。

上述实例说明本发明通过克隆及纯化制备野生型和突变体干扰素,比较了人 IFN- α 2 和 IFN- α 2-EIFK 突变体在抗 HBV 中的效应,实验结果表明,通过突变与 IFNAR1 相关的氨基酸位点,改变 IFN- α 2 与 IFNAR1 的亲合力所得到的 IFN- α 2-EIFK 在抑制 HBV 抗原和 DNA 水平上具有更为显著的抗 HBV 效应。这种效应与其可刺激更高水平的 STAT1 和 STAT2 磷酸化,活化更高水平的 ISRE 以及诱生更高水平的抗病毒相关 ISGs 相关。这种突变 IFN- α 干扰素受体结合相关位点的方法,将为开发新的用于抗病毒的干扰素提供新的思路,所述新型干扰素的开发具有良好的应用和发展前景。

序列表

SEQ ID NO. 1

IFN- α 2 的氨基酸序列

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST
KDSSAAWDETLLDKFYTELYQQINDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRA
EIMRSFSLSTNLQESLRSKE

SEQ ID NO. 2

IFN- α 2-EIFK 的氨基酸序列

CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST
KDSSAAWDETLLKIFYIELFQQINDLEACVIQGVGVTTETPLMKEDSILAVKKYFQRITLYLKEKKYSPC
AWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE

SEQ ID NO. 3

IFN- α 14 的氨基酸序列

CNLSQTHSLNNRRTLMLMAQMRRISPFSLKDRHDFEFPQEEFDGNQFQKAQAISVLHEMMQQTFNLFS
TKNSSAAWDETLLKIFYIELFQQMNDLEACVIQEVGVEETPLMNEDSILAVKKYFQRITLYLMEKKYSP
CAWEVVRAEIMRSLSFSTNLQKRLRRKD

权 利 要 求

1. 人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，通过将人 IFN- α 2 的第 82 位天冬氨酸突变为谷氨酸，第 86 位苏氨酸突变为异亮氨酸，第 89 位酪氨酸突变为苯丙氨酸，及第 120 位精氨酸突变为赖氨酸，获得 IFN- α 2 受体结合相关突变体 IFN- α 2-EIFK；

所述的 IFN- α 2 重组蛋白的氨基酸序列获取自人基因组，序列为 SEQ ID NO. 1；

所述的 IFN- α 2-EIFK 的序列为 SEQ ID NO. 2。

2. 按权利要求 1 所述的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，所述的 IFN- α 2 受体结合相关突变体在用于制备治疗慢性乙肝病毒感染药物中的应用。

3. 按权利要求 2 所述的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，所述的 IFN- α 2-EIFK 在制备降低和清除乙肝病毒表面抗原 HBsAg，HBeAg 及病毒基因组 DNA 制剂中的应用。

4. 按权利要求 3 所述的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，所述的 IFN- α 2-EIFK 抑制感染乙肝病毒的肝细胞中病毒表面抗原 HBsAg，e 抗原 HBeAg 病毒蛋白及病毒 DNA 产生的效应比 IFN- α 2 强。

5. 按权利要求 2 所述的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，所述的 IFN- α 2-EIFK 在于相同工作浓度下，抗乙肝病毒活性较 IFN- α 2 显著；类似抗病毒效应下，IFN- α 2-EIFK 较 IFN- α 2 工作浓度低 10 倍以上。

6. 按权利要求 2 所述的人 α 干扰素受体结合相关位点突变体，其特征在于，所述的 IFN- α 2-EIFK 突变体重组蛋白显著降低及清除感染乙肝病毒的肝细胞中的病毒表面抗原（HBsAg），e 抗原（HBeAg）病毒蛋白及病毒 DNA 的产生同时激活 JAK-STAT1/STAT2 和 ISRE 的活化、诱导高水平的抗病毒分子 ISGs。

A

```

FN-α2  CRLDQYFSLCSRRPTMILANSTRISLPSCLNDREHFCPTQEEF-CNQFQKASTIPLVLETHIQILNLFYKSSAANDETLLK
FN-α4  CMLSQITLILNRTILMLVQMRISGCGCMPLLETFQEEFDGQFQSAQALGVLEHMQDPLNFSTNGSSAANDETLLK
FN-α2-6SK CQLFQYHSLGSRCTMLLAQMRISLPSCLNDREHFGFTQEEF-GSFSQKASTIPLVLETHIQILNLFYKSSAANDETLLK

FN-α2  LK LQGLNITLACQWVATEPIHNRISLAVLQYFQRLYMKRYSKAPVVEKTHPSFRTNLCNTRSKK
FN-α4  LK LQGLNITLACQWVATEPIHNRISLAVLQYFQRLYMKRYSKAPVVEKTHPSFRTNLCNTRSKK
FN-α2-6SK LK LQGLNITLACQWVATEPIHNRISLAVLQYFQRLYMKRYSKAPVVEKTHPSFRTNLCNTRSKK

```

B

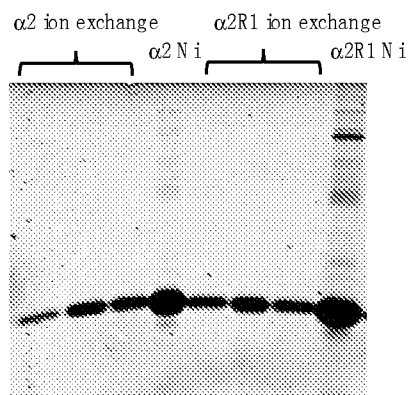


图 1

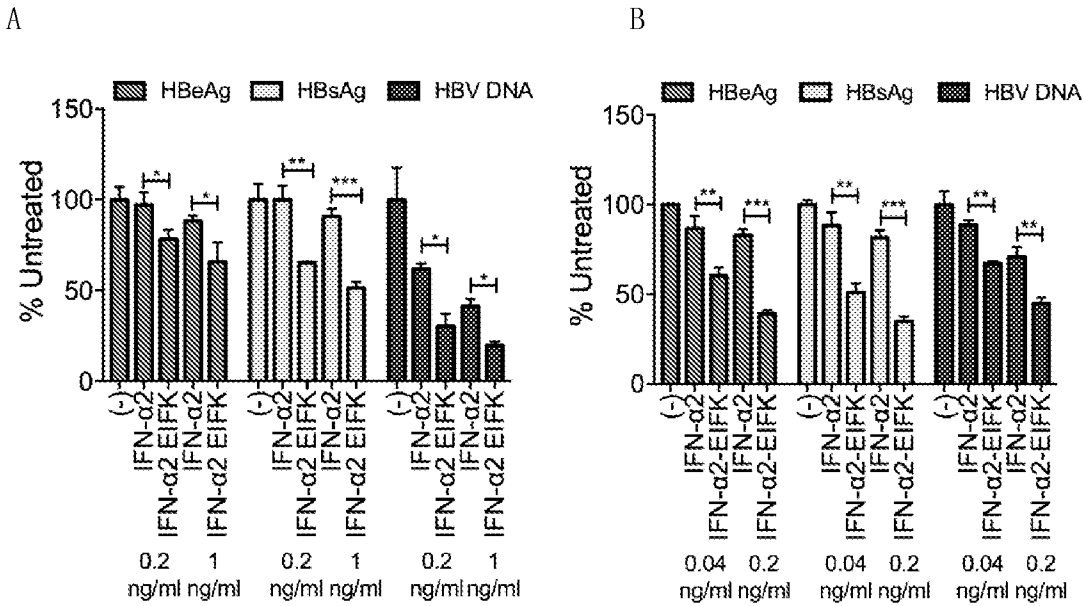


图 2

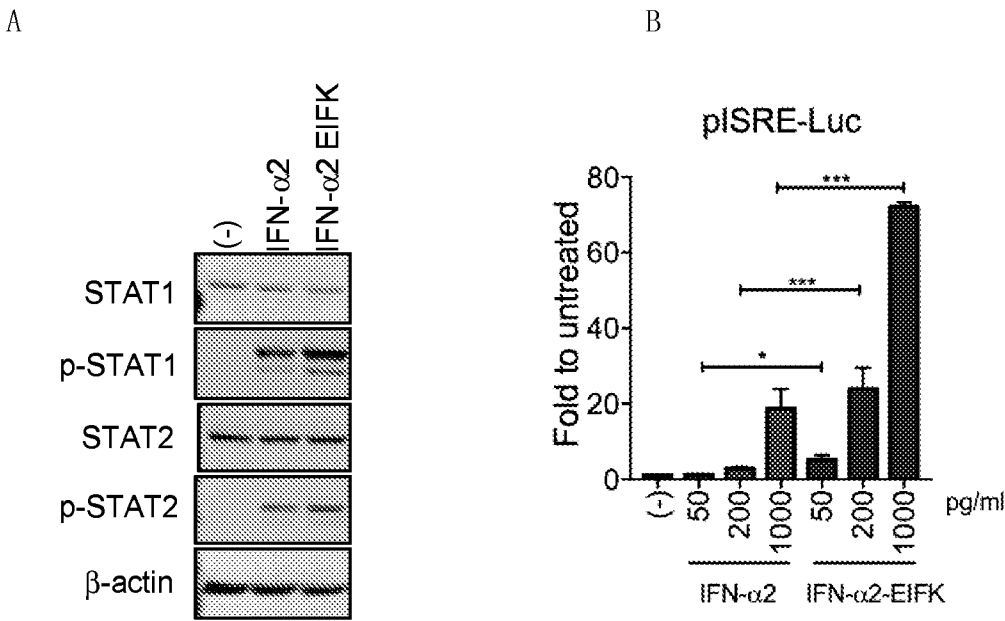


图 3

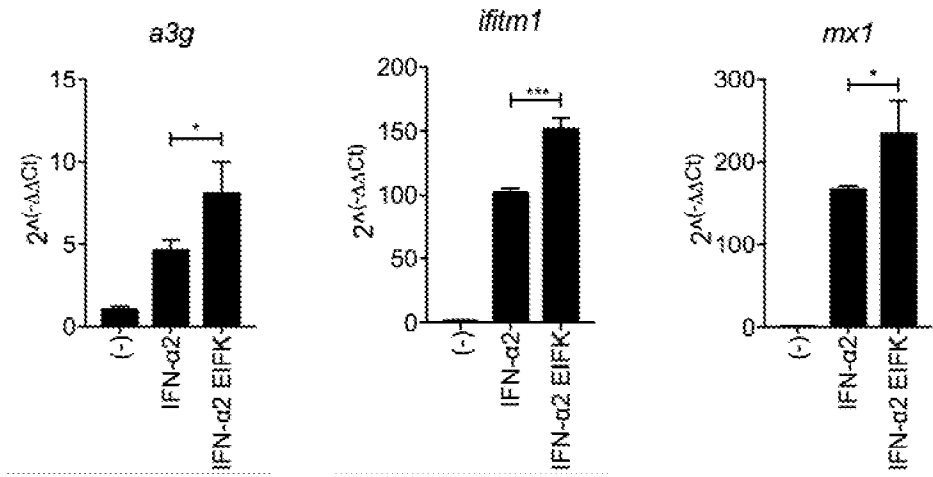


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/073903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/56(2006.01)i; C12N 15/21(2006.01)i; A61K 38/21(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K C12N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System, Genbank, EMBL, STN: 干扰素, 突变, Interferon, IFN alpha, IFN- α 2, mutant, mutat+, substitution, 82, 86, 89, 120, SEQ ID Nos: 1 and 2**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104470536 A (IMMUNOGEN INC.) 25 March 2015 (2015-03-25) description, paragraph 85 and 86, and table 1	1-6
A	CN 105658669 A (VIB VZW; UNIV GENT; CENTRE NAT RECH SCIENT; UNIV MONTPELLIER II; CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIV DE MONTPELLIER) 08 June 2016 (2016-06-08) claims 5, 11, and 13	1-6
A	CN 109071632 A (ORIONIS BIOSCIENCES NV; VIB VZW; UNIV GENT) 21 December 2018 (2018-12-21) claims 15-18	1-6
A	WO 2014194100 A1 (UNIV CALIFORNIA et al.) 04 December 2014 (2014-12-04) claims 25-36	1-6
A	WO 0006735 A8 (US HEALTH et al.) 06 April 2000 (2000-04-06) claim 1	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 March 2020

Date of mailing of the international search report

17 April 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/073903

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104470536	A	25 March 2015	US	8980267	B2	17 March 2015
				US	2015139951	A1	21 May 2015
				EP	2822575	A4	06 July 2016
				US	2017073388	A1	16 March 2017
				WO	2013134138	A1	12 September 2013
				JP	2015515453	A	28 May 2015
				IN	8236DEN2014	A	15 May 2015
				AU	2013230484	B2	27 April 2017
				US	10259854	B2	16 April 2019
				US	2013230517	A1	05 September 2013
				EP	2822575	A1	14 January 2015
				US	9534057	B2	03 January 2017
				JP	6195855	B2	13 September 2017
				CA	2866126	A1	12 September 2013
				AU	2013230484	A1	12 February 2015
CN	105658669	A	08 June 2016	US	9732135	B2	15 August 2017
				AU	2014292355	A1	04 February 2016
				JP	6475712	B2	27 February 2019
				CA	2918119	A1	22 January 2015
				US	2018334489	A1	22 November 2018
				US	2018334488	A1	22 November 2018
				JP	2016529232	A	23 September 2016
				IL	243459	A	31 October 2019
				EP	3022230	B1	06 November 2019
				US	2016159875	A1	09 June 2016
				SG	11201600165W	A	26 February 2016
				AU	2014292355	B2	01 August 2019
				IL	243459	D0	31 March 2016
				US	10072059	B2	11 September 2018
				US	2018057555	A1	01 March 2018
				WO	2015007520	A1	22 January 2015
				MX	2016000721	A	07 September 2016
				EP	3022230	A1	25 May 2016
				KR	20160108292	A	19 September 2016
CN	109071632	A	21 December 2018	CA	3013551	A1	10 August 2017
				EP	3411065	A1	12 December 2018
				CN	109071627	A	21 December 2018
				CN	109071663	A	21 December 2018
				EP	3411407	A1	12 December 2018
				WO	2017134301	A1	10 August 2017
				JP	2019506867	A	14 March 2019
				CN	108883180	A	23 November 2018
				CA	3013554	A1	10 August 2017
				WO	2017134302	A2	10 August 2017
				CA	3013555	A1	10 August 2017
				JP	2019506869	A	14 March 2019
				WO	2017134302	A3	28 September 2017
				WO	2017134305	A1	10 August 2017
				US	2019352406	A1	21 November 2019
				US	2019367604	A1	05 December 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/073903

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				WO	2017134306	A1	10 August 2017		
				CA	3013558	A1	10 August 2017		
				JP	2019510478	A	18 April 2019		
				US	2019071500	A1	07 March 2019		
				EP	3411398	A2	12 December 2018		
				JP	2019507135	A	14 March 2019		
				EP	3411397	A1	12 December 2018		
WO	2014194100	A1	04 December 2014	US	2019135939	A1	09 May 2019		
				US	10093745	B2	09 October 2018		
				US	2016115242	A1	28 April 2016		
WO	0006735	A8	06 April 2000	AU	4845699	A	21 February 2000		
				WO	0006735	A1	10 February 2000		
				AU	4972299	A	21 February 2000		
				WO	0006596	A2	10 February 2000		

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/073903

A. 主题的分类

C07K 14/56(2006.01)i; C12N 15/21(2006.01)i; A61K 38/21(2006.01)i; A61P 31/20(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K C12N A61K A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNKI, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, NCBI, 中国专利生物序列检索系统, Genbank, EMBL, STN和检索项: 干扰素, 突变, Interferon, IFN alpha, IFN- α 2, mutant, mutat+, substitution, 82, 86, 89, 120, SEQ ID Nos: 1-2

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104470536 A (免疫基因公司) 2015年 3月 25日 (2015 - 03 - 25) 说明书第85-86段, 表1	1-6
A	CN 105658669 A (弗拉芒区生物技术研究 所 根特大学 法国国家科学研究中心 蒙彼利埃第二大学 蒙彼利埃大学医疗中心) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 权利要求5、11、13	1-6
A	CN 109071632 A (奥里尼斯生物科学公司 弗拉芒区生物技术研究 所 根特大学) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 权利要求15-18	1-6
A	WO 2014194100 A1 (UNIV CALIFORNIA等) 2014年 12月 4日 (2014 - 12 - 04) 权利要求25-36	1-6
A	WO 0006735 A8 (US HEALTH等) 2000年 4月 6日 (2000 - 04 - 06) 权利要求1	1-6

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 3月 6日

国际检索报告邮寄日期

2020年 4月 17日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王翔宇

电话号码 62411992

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/073903

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	104470536	A	2015年 3月 25日	US	8980267	B2	2015年 3月 17日
				US	2015139951	A1	2015年 5月 21日
				EP	2822575	A4	2016年 7月 6日
				US	2017073388	A1	2017年 3月 16日
				WO	2013134138	A1	2013年 9月 12日
				JP	2015515453	A	2015年 5月 28日
				IN	8236DEN2014	A	2015年 5月 15日
				AU	2013230484	B2	2017年 4月 27日
				US	10259854	B2	2019年 4月 16日
				US	2013230517	A1	2013年 9月 5日
				EP	2822575	A1	2015年 1月 14日
				US	9534057	B2	2017年 1月 3日
				JP	6195855	B2	2017年 9月 13日
				CA	2866126	A1	2013年 9月 12日
				AU	2013230484	A1	2015年 2月 12日
CN	105658669	A	2016年 6月 8日	US	9732135	B2	2017年 8月 15日
				AU	2014292355	A1	2016年 2月 4日
				JP	6475712	B2	2019年 2月 27日
				CA	2918119	A1	2015年 1月 22日
				US	2018334489	A1	2018年 11月 22日
				US	2018334488	A1	2018年 11月 22日
				JP	2016529232	A	2016年 9月 23日
				IL	243459	A	2019年 10月 31日
				EP	3022230	B1	2019年 11月 6日
				US	2016159875	A1	2016年 6月 9日
				SG	11201600165W	A	2016年 2月 26日
				AU	2014292355	B2	2019年 8月 1日
				IL	243459	D0	2016年 3月 31日
				US	10072059	B2	2018年 9月 11日
				US	2018057555	A1	2018年 3月 1日
				WO	2015007520	A1	2015年 1月 22日
				MX	2016000721	A	2016年 9月 7日
				EP	3022230	A1	2016年 5月 25日
				KR	20160108292	A	2016年 9月 19日
CN	109071632	A	2018年 12月 21日	CA	3013551	A1	2017年 8月 10日
				EP	3411065	A1	2018年 12月 12日
				CN	109071627	A	2018年 12月 21日
				CN	109071663	A	2018年 12月 21日
				EP	3411407	A1	2018年 12月 12日
				WO	2017134301	A1	2017年 8月 10日
				JP	2019506867	A	2019年 3月 14日
				CN	108883180	A	2018年 11月 23日
				CA	3013554	A1	2017年 8月 10日
				WO	2017134302	A2	2017年 8月 10日
				CA	3013555	A1	2017年 8月 10日
				JP	2019506869	A	2019年 3月 14日
				WO	2017134302	A3	2017年 9月 28日
				WO	2017134305	A1	2017年 8月 10日
				US	2019352406	A1	2019年 11月 21日
				US	2019367604	A1	2019年 12月 5日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/073903

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
						WO	2017134306	A1	2017年 8月 10日
						CA	3013558	A1	2017年 8月 10日
						JP	2019510478	A	2019年 4月 18日
						US	2019071500	A1	2019年 3月 7日
						EP	3411398	A2	2018年 12月 12日
						JP	2019507135	A	2019年 3月 14日
						EP	3411397	A1	2018年 12月 12日
WO	2014194100	A1	2014年 12月 4日			US	2019135939	A1	2019年 5月 9日
						US	10093745	B2	2018年 10月 9日
						US	2016115242	A1	2016年 4月 28日
WO	0006735	A8	2000年 4月 6日			AU	4845699	A	2000年 2月 21日
						WO	0006735	A1	2000年 2月 10日
						AU	4972299	A	2000年 2月 21日
						WO	0006596	A2	2000年 2月 10日