

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02807891.8

[51] Int. Cl.

C07K 14/57 (2006.01)  
C12N 5/10 (2006.01)  
C12N 15/23 (2006.01)  
C12N 15/63 (2006.01)  
A61K 38/21 (2006.01)  
A61P 11/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 5 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 1257186C

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/12 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.4.4 [21] 申请号 02807891.8  
[30] 优先权

[32] 2001. 4. 6 [33] DK [31] PA200100579  
[32] 2001. 5. 7 [33] DK [31] PA200100714  
[32] 2002. 2. 11 [33] DK [31] PA200200198

[86] 国际申请 PCT/DK2002/000226 2002. 4. 4  
[87] 国际公布 WO2002/081507 英 2002. 10. 17  
[85] 进入国家阶段日期 2003. 10. 8

[71] 专利权人 马克西根控股公司  
地址 英属开曼群岛  
[72] 发明人 安妮·D·詹森  
审查员 汪波莉

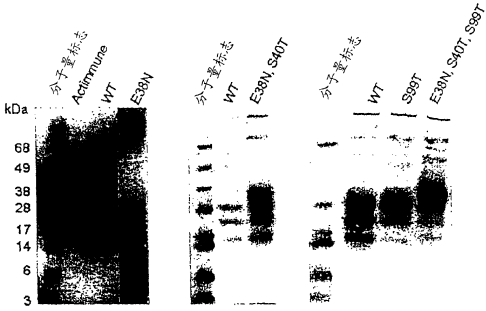
[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所  
代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 85 页 附图 3 页

[54] 发明名称  
干扰素  $\gamma$  多肽变体

[57] 摘要

本发明涉及具有干扰素  $\gamma$  (IFNG) 活性的新的干扰素  $\gamma$  多肽变体, 其制备方法, 含有该多肽变体的药物组合物及其在疾病治疗中的用途, 尤其是在治疗间质性肺疾病, 如自发性肺纤维化中的用途。这些新的多肽变体与 huIFNG 的氨基酸序列或其片段相比, 全都包含 S99T 取代。该突变导致第 97 位的天然 N-糖基化位点得到显著更好的利用。优选地, 所述变体包含其它修饰, 例如, 当皮下给药时可增加所述变体的 AUC。



- 1.具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的干扰素  $\gamma$  S99T 多肽变体或其  
C 末端截短 1-15 个氨基酸残基后所得的片段, 其中所述多肽变体或其片段  
5 具有干扰素  $\gamma$  活性。
2. 权利要求 1 的多肽变体, 其中所述多肽变体具有 SEQ ID NO:1 所  
示氨基酸序列。
3. 权利要求 1 的多肽变体, 其中所述多肽变体是 SEQ ID NO:1 所示  
氨基酸序列的片段, 它在 C-末端除去了 1-15 个氨基酸残基。
- 10 4. 权利要求 3 的多肽变体, 其中所述在 C 末端除去了 1-15 个氨基酸残  
基后所得的片段具有选自 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4,  
SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9,  
SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID  
NO:14, SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16 的氨基酸序列。
- 15 5. 权利要求 1-4 之一的多肽变体, 其中所述多肽变体被糖基化。
6. 权利要求 5 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 97 位被 N-糖基化。
7. 权利要求 5 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 25 位被 N-糖基化。
8. 权利要求 5 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 25 和 97 位被 N-  
糖基化。
- 20 9.具有干扰素  $\gamma$  活性并且相对于 SEQ ID NO:1 而言包含 1-10 个残基修  
饰的干扰素  $\gamma$  S99T 多肽变体, 或其具有干扰素  $\gamma$  活性的羧基端截短型片段,  
其中所述修饰选自由取代、插入和缺失组成的组中。
10. 权利要求 9 的多肽变体, 其中所述多肽变体相对于 SEQ ID NO:1  
所示氨基酸序列而言包含 1-10 个残基修饰。
- 25 11. 权利要求 9 的多肽变体, 其中所述多肽变体相对于羧基端截短型片  
段包含 1-10 个残基修饰, 其中所述羧基端截短型片段具有选自 SEQ ID NO:  
2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID  
NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ  
ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:  
30 16 的氨基酸序列。
12. 权利要求 11 的多肽变体, 其中所述多肽变体与 SEQ ID NO:12 所

示氨基酸序列相比, 包含 1-10 个修饰。

13. 权利要求 9-12 之一的多肽变体, 其中所述多肽变体包含至少一个引入的和/或至少一个除去的氨基酸残基, 所述氨基酸残基包含对应于非多肽组分的连接基团。

5        14. 权利要求 13 的多肽变体, 其中所述多肽变体包含至少一个引入的糖基化位点。

15. 权利要求 14 的多肽变体, 其中所述糖基化位点为 N-糖基化位点。

16. 权利要求 15 的多肽变体, 其中所述 N-糖基化位点被引入这样一个位置, 该位置包含具有至少 25% 其侧链暴露在表面的氨基酸残基。

10        17. 权利要求 16 的多肽变体, 其中所述 N-糖基化位点被引入这样一个位置, 该位置包含具有至少 50% 其侧链暴露在表面的氨基酸残基。

18. 权利要求 15-17 之一的多肽变体, 其中所述 N-糖基化位点通过取代而引入。

15        19. 权利要求 18 的多肽变体, 其中所述取代选自 K12S, K12T, G18S, G18T, E38N, E38N+S40T, K61S, K61T, N85S, N85T, K94N, Q106S 或 Q106T。

20. 权利要求 19 的多肽变体, 其中所述取代选自 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T, N85T, K94N 或 Q106T。

21. 权利要求 20 的多肽变体, 其中所述取代是 E38N+S40T。

20        22. 权利要求 13 的多肽变体, 其中所述多肽变体包含至少一个引入的半胱氨酸残基。

23. 权利要求 22 的多肽变体, 其中所述半胱氨酸残基被引入这样一个位置, 该位置包含具有至少 25% 其侧链暴露在表面的氨基酸残基。

24. 权利要求 23 的多肽变体, 其中所述半胱氨酸残基被引入这样一个位置, 该位置包含具有至少 50% 其侧链暴露在表面的氨基酸残基。

25        25. 权利要求 22-24 之一的多肽变体, 其中所述半胱氨酸残基通过取代而引入。

26. 权利要求 25 的多肽变体, 其中所述取代选自 N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C, N104C 或 A124C。

30        27. 权利要求 22-26 之一的多肽变体, 其中所述半胱氨酸残基与非多肽组分共价相连。

28. 权利要求 27 的多肽变体, 其中所述非多肽组分是聚合物分子。

29. 权利要求 28 的多肽变体, 其中所述聚合物分子是线性或支链聚乙二醇。
30. 权利要求 9 的多肽变体, 其中所述多肽包含至少一个引入的 N-糖基化位点和至少一个引入的半胱氨酸残基。
- 5        31. 权利要求 30 的多肽变体, 其中所述 N-糖基化位点被引入权利要求 16-21 任一项所述的位置, 而所述半胱氨酸残基被引入权利要求 23-26 任一项所述的位置。
32. 一种多核苷酸, 它编码权利要求 1-31 之一的多肽变体。
33. 一种表达载体, 它包含权利要求 32 的多核苷酸。
- 10       34. 一种糖基化宿主细胞, 它包含权利要求 32 的多核苷酸或权利要求 33 的表达载体。
35. 权利要求 34 的宿主细胞, 它是 CHO 细胞或 BHK 细胞。
36. 一种药物组合物, 它包含权利要求 1-31 之一的多肽变体和可药用的稀释剂, 载体或辅助剂。
- 15       37. 权利要求 1-31 之一的多肽变体或权利要求 36 的药物组合物在制备用于治疗间质性肺疾病的药物中的用途。
38. 权利要求 37 的用途, 其中所述间质性肺疾病是自发性肺纤维化。
39. 制备权利要求 1-31 之一的干扰素  $\gamma$  多肽变体的方法, 该方法包括
- (a) 培养糖基化宿主细胞, 该细胞含有编码权利要求 1-31 之一所述干
- 20    扰素  $\gamma$  多肽变体的核苷酸序列, 所用培养条件有利于该多肽变体的表达;
- (b) 任选使所述多肽变体与非多肽组分在有利于发生偶联的条件下进行体外反应; 和
- (c) 回收所述多肽变体。
40. 权利要求 9-12 和 14-21 之一的多肽变体, 其中所述多肽变体被糖
- 25    基化。
41. 权利要求 40 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 97 位被 N-糖基化。
42. 权利要求 40 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 25 位被 N-糖基化。
- 30       43. 权利要求 40 的多肽变体, 其中所述多肽变体在第 25 和 97 位被 N-糖基化。

- 
44. 权利要求 40 的多肽变体, 其中所述多肽变体包含 E38N 取代并在第 38 位被 N-糖基化。
45. 权利要求 44 的多肽变体, 其中所述多肽变体还包含 S40T 取代。
46. 权利要求 44 的多肽变体, 其中所述多肽变体进一步在第 97 位被 N-糖基化。
47. 权利要求 46 的多肽变体, 其中所述多肽变体进一步在第 25 位被 N-糖基化。
48. 权利要求 45 的多肽变体, 其中所述多肽变体进一步在第 97 位被 N-糖基化。
49. 权利要求 48 的多肽变体, 其中所述多肽变体进一步在第 25 位被 N-糖基化。
50. 权利要求 3 的多肽变体, 是在羧基端通过除去 11 个氨基酸残基而截短的形式。
51. 权利要求 9 的多肽变体, 是在羧基端通过除去 11 个氨基酸残基而截短的形式。

干扰素 $\gamma$ 多肽变体

## 5 发明领域

本发明涉及具有干扰素 $\gamma$ (IFNG)活性的新的干扰素 $\gamma$ 多肽变体,其制备方法,含有该多肽变体的药物组合物及其在疾病治疗中的用途,尤其是在治疗间质性肺疾病,如自发性肺纤维化中的用途。

## 发明背景

10 干扰素- $\gamma$ (IFNG)是由 T-淋巴细胞和天然杀伤细胞产生的一种细胞因子且以两个非共价结合的多肽亚基的同型二聚体存在。每一二聚体的成熟形式含有 143 个氨基酸残基(SEQ ID NO 2 所示),其前体形式包括 166 个氨基酸残基的信号序列(SEQ ID NO 1 所示)。

各亚基具有两个潜在的 N-糖基化位点(Aggarwal 等,人类细胞因子, 15 Blackwell 科学出版社, 1992)在位置 25 和 97。根据糖基化的程度,二聚体形式的 IFNG 分子量是 34-50 kDa (Farrar 等,免疫学年鉴,1993, 11: 571-611)。

Gray 等(自然, 298: 859-863, 1982), Taya 等(EMBO J. 1: 953-958, 1982), Devos 等(核酸研究, 10: 2487-2501, 1982)和 Rinderknecht 等(生物学化学杂志, 259: 6790-6797, 1984)及在 EP 77670, EP 89676 和 EP 110044 中已报导了 20 野生型人 IFNG (huIFNG)的一级序列。Ealick 等(科学, 252: 698-702, 1991)报导了 huIFNG 的三维结构。

已报导了 IFNG 亚基多肽的各种天然存在的或突变的形式,包括一种包含 Cys-Tyr-Cys N-末端氨基酸序列(相对于 SEQ ID NO 17 的位置(-3)-(-1))的形式,一种包含 N-末端甲硫氨酸(相对于 SEQ ID NO 17 的位置-1)的形式, 25 和含有 127-134 氨基酸残基的各种 C-末端截短形式。已知可从 C-末端缺失 1-15 个氨基酸残基而不破坏该分子的 IFNG 活性。而且, Pan 等(欧洲生物化学杂志, 166: 145-149, 1987)已描述了 huIFNG C-末端的异质性。

Slodowski 等(欧洲生物学化学杂志, 202: 1133-1140, 1991), Luk 等(生物学化学杂志, 265: 13314-13319, 1990), Seelig 等,(生物化学, 27: 1981-1987, 30 1988), Trousdale 等(Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 26: 1244-1251, 1985), 和在 EP 146354 中报导了 HuIFNG 突变蛋白。Nishi 等(生物化学杂志, 97:

153-159, 1985)报导了天然 huIFNG 变体。

US 6,046,034 公开了插入 4 对半胱氨酸残基使得二硫键形成且因此以同型二聚体的形式稳定 IFNG 变体的耐热重组 huIFNG (rhuIFNG)变体。

WO 92/08737 公开了在野生型人 IFNG 的全长(残基 1-143)或部分(残基  
5 1-132)氨基酸序列的 N 末端含有添加的甲硫氨酸的 IFNG 变体。EP 219 781 公开了含有氨基酸残基 3-124 (SEQ ID NO 17 中)的部分 huIFNG 序列。US 4,832,959 公开了含有氨基酸序列的残基 1-127, 5-146 和 5-127 的部分 huIFNG 序列,该序列与 SEQ ID NO 2 相比具有 3 个添加的 N-末端氨基酸残基(CYC)。US 5, 004, 689 公开了编码无 3 个 N-末端氨基酸残基 CYC 的  
10 huIFNG 的 DNA 序列及其在大肠杆菌中的表达。EP 446582 公开了大肠杆菌产生的不含 N-末端甲硫氨酸的 rhuIFNG。US 6, 120, 762 公开了含有其残基 95-134(相对于 SEQ ID NO 18)的 huIFNG 肽片段。

Wang 等(Sci. Sin. B 24: 1076-1084, 1994)报导了 rhuIFNG 的高水平表达。

Curling 等(生物化学杂志, 272: 333-337, 1990)和 Hooker 等, (干扰素和  
15 细胞因子研究杂志, 1998, 18: 287-295)报导了 rhuIFNG 中的糖基化变体。

Kita 等(Drug Des. Deliv., 6: 157-167, 1990), 和在 EP 236987 和 US 5109120 中报导了 rhuIFNG 的聚合物修饰。

WO 92/22310 报导了干扰素,特别是 huIFNG 的脱唾液酸糖蛋白偶联物的衍生物。

20 IFNG 融合蛋白已有描述。例如, EP 237019 公开了具有表现出干扰素 $\beta$ 活性的区域和一个表现出 IFNG 活性的区域的单链多肽。

EP 0 158 198 公开了具有表现出 IFNG 活性的区域和表现出 IL-2 活性的区域的单链多肽。一些文献描述了单链二聚体 IFNG 蛋白质,例如 Landar 等(分子生物学杂志, 2000, 299: 169-179)。

25 WO 99/02710 公开了单链多肽, 其中的一个例子是 IFNG。

WO 99/03887 公开了属于生长激素超家族的多肽的 PEG 连接的变体, 其中, 位于多肽特定区域的一个非必需氨基酸残基被一个半胱氨酸残基取代。IFNG 作为生长激素超家族成员的一个例子被提及, 但没有详细讨论其修饰。

30 已有建议将 IFNG 用于治疗间质性肺疾病(也称为间质性肺纤维症 (IPF))(Ziesche 等(新英格兰医学杂志, 341: 1264-1269, 1999 和胸科, 110:增

刊: 25S, 1996)和 EP 795332), 为此可将 IFNG 与脱氢皮质甾醇结合使用。除了 IPF 外, 肉芽肿性疾病(Bolinger 等, 临床药理学, 1992, 11: 834-850), 某些分支杆菌感染(新英格兰医学杂志, 330: 1348-1355, 1994), 肾癌(泌尿学杂志, 152: 841-845, 1994), 石骨症(新英格兰医学杂志, 332: 1594-1599, 1995), 硬皮病(风湿病学杂志, 23: 654-658, 1996), 乙型肝炎(肝胃肠学, 45: 2282-2294, 1998), 丙型肝炎(国际肝学通信, 6: 264-273, 1997), 脓毒性休克(自然医学, 3: 678-681, 1997)和类风湿性关节炎也可用 IFNG 治疗。

作为药用化合物, rhuIFNG 被用于, 例如抵抗某些病毒感染和肿瘤取得了一定的成功。rhuIFNG 通常经过肠胃外使用, 优选通过皮下, 注射使用。7 小时后发现最大血清浓度, 血浆半寿期是在静脉注射给药后 30 分钟。因此用 rhuIFNG 进行有效治疗需要经常注射。主要的有害作用包括发烧, 寒战, 出汗, 头痛, 肌痛和嗜睡。这些效应与注射 rhuIFNG 相联系且在注射后第一个小时内观察到。罕见的副作用是局部疼痛和红斑, 肝脏酶升高, 可逆的粒细胞和血小板减少症及心脏毒性。

WO 01/36001 公开了新的 IFNG 偶联物, 它包含与 IFNG 多肽相连的非多肽组分, 其中所述的 IFNG 多肽通过引入和/或删除针对上述非多肽组分(如 PEG)的连接位点和糖基化位点而被修饰。

众所周知, 当 N-糖基化分子(如 IFNG)在糖基化宿主中产生时, 并非所有潜在的糖基化位点都被利用。这意味着常常获得具有不同程度的体内 N-糖基化的蛋白混合物, 导致必需随后进行纯化。而且, 分离具有不同的糖基化程度的相同蛋白常常是耗时且棘手的。现在意外发现, 通过取代体内 N-糖基化位点(无论所述体内 N-糖基化位点是 IFNG 中的天然位点还是如 WO 01/36001 所述的引入的体内 N-糖基化位点)附近的一或多个氨基酸残基, 有可能促进对完整糖基化 IFNG 分子的分级分离。尤其是发现, 将 hIFNG 中第 97, 98 和 99 位的天然 N-糖基化位点 N-Y-S 替换为 N-Y-T, 大大促进对完整糖基化 IFNG 分子的分级分离。

#### 发明简述

因此, 本发明第一方面涉及干扰素 $\gamma$ 多肽变体, 其具有 IFNG 活性, 并具有 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列([S99T]hIFNG), 或其具有 IFNG 活性的片段。

本发明另一方面涉及 SEQ ID NO:1 的变体, 包括 SEQ ID NO:1 的片段

(如 SEQ ID NO:2-16)的变体,其中所述变体包含至少一个另外的修饰并表现出 IFNG 活性。

本发明还有一方面涉及编码本发明变体多肽的核苷酸序列。

5 本发明还有一方面涉及包含本发明核苷酸序列的表达载体,以及包含恩发明核苷酸序列或本发明表达载体的糖基化宿主细胞。

本发明还涉及包含本发明多肽变体的药物组合物,以及本发明多肽变体或本发明药物组合物的医药用途。

本发明还有一方面涉及本发明多肽变体或本发明药物组合物在制备治疗间质性肺疾病的药物中的用途。

10 类似地,本发明还涉及治疗或预防间质性肺疾病的方法,所述方法包括对有相应需要的哺乳动物,尤其是人类,施用有效量的本发明多肽变体或本发明药物组合物。

15 本发明还有一方面涉及 IFNG 多肽变体的群体,或涉及包含 IFNG 多肽变体的群体的组合物,其中所述群体包含至少 70% 的本发明 IFNG 多肽变体。

本发明另一方面涉及增加亲本 IFNG 多肽的体内 N-糖基化程度的方法,所述亲本 IFNG 多肽包含至少一个具有氨基酸序列 N-X-S 的体内 N-糖基化位点,其中 X 是除了脯氨酸以外的任何氨基酸,所述方法包括将所述 N-X-S 氨基酸序列中的丝氨酸残基用苏氨酸残基取代,以获得 IFNG 变体。

20 本发明还有一方面涉及制备本发明 IFNG 多肽变体的方法,该方法包括:

(a) 培养糖基化宿主细胞,该细胞包含编码本发明 IFNG 多肽变体的核苷酸序列,所用的培养条件有利于所述多肽变体的表达;

25 (b) 任选地,使所述多肽变体与一种非多肽组分在体外有利于进行偶联的条件下反应;以及

(c) 回收所述多肽变体。

本发明的其它方面可从以下描述中明显看出。

#### 附图说明

30 图 1 是 rhuIFNG 的经优化的糖基化变体 Western 印迹的结果。左侧 Western 印迹:泳道 1:标准品,泳道 2: Actimmune®,泳道 3: rhuIFNG,泳道 4: [E38N] rhuIFNG。中部 Western 印迹:泳道 1:标准品,泳道 2: rhuIFNG,

泳道 3: [E38N+S40T] rhuIFNG。右侧 Western 印迹: 泳道 1: 标准品, 泳道 2: rhuIFNG, 泳道 3: [S99T] rhuIFNG, 泳道 4: [E38N+S40T+S99T] rhuIFNG。

图 2 显示对大鼠皮下给药后, 血清-时间曲线中的 IFNG 活性。●: Actimmune®, ■: rhuIFNG, ▲: [E38N+S40T+S99T] rhuIFNG。

5 所有化合物施用相同的剂量( $1.15 \times 10^7$  AU/kg)。

图 3 显示对大鼠皮下给药后, 血清-时间曲线中的 IFNG 活性。●: [N16C+S99T] rhuIFNG (与 5 kDa mPEG 相连), ■: [N16C+S99T] rhuIFNG (与 10 kDa mPEG 相连), ▲: [E38N+S40T+S99T] rhuIFNG。

[E38N+S40T+S99T]变体的给药剂量为  $1.15 \times 10^7$  AU/kg, 而两种 PEG 10 化变体的给药剂量为  $4.6 \times 10^6$  AU/kg。

### 发明详述

#### 定义

在本申请和发明的说明书中使用了下列定义:

术语“偶联物”(或可互换的“偶联的多肽”)意指由一个或多个多肽共 15 价连接到一个或多个非多肽组分上形成的杂合的(指复合或嵌合的意义)分子。术语共价连接的意思是多肽和非多肽组分直接共价连接到另一组分上, 或者通过诸如桥, 间隔, 或连接组分等一个或多个间插组分间接共价连接到另一组分上。优选的是, 偶联物在有关浓度和条件下是可溶的, 即在诸如血液等生理学液体中是可溶的。本发明的偶联多肽的例子包括糖基化和/ 20 或 PEG 连接的多肽。对于偶联物的多肽部分可使用术语“未偶联的多肽”。

术语“非多肽组分”意指能偶联到 IFNG 多肽的连接基团上的分子。该分子的优选例子包括聚合物分子, 亲脂性化合物, 糖组分或有机衍生物。当在本发明的偶联物环境中使用时应理解非多肽组分通过多肽的连接基团连接到偶联物的多肽部分上。

25 术语“聚合物分子”定义为由两个或多个单体共价连接形成的分子, 其中没有一个单体是氨基酸残基, 除非该聚合物是人白蛋白或另一高丰度血浆蛋白。术语“聚合物”可与术语“聚合物分子”互换使用。

术语“糖组分”意指通过体内或体外糖基化, 例如 N-或 O-糖基化连接的碳水化合物分子。

30 “N-糖基化位点”具有序列 N-X-S/T/C, 其中 X 是除了脯氨酸以外的任何氨基酸, N 是天冬酰胺, S/T/C 是丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸, 优选丝

氨酸或苏氨酸，最优选苏氨酸。“O-糖基化位点”是丝氨酸或苏氨酸残基的-OH基。

术语“连接基团”意指能偶联到诸如聚合物分子或糖组分的有关非多肽组分上的氨基酸残基基团。有用的连接基团及其匹配的非多肽组分从下表5中是显而易见的。

| 连接基团               | 氨基酸                 | 非多肽组分的实例                                   | 偶联方法/-活化的 PEG                    | 参考文献                                                                                                                    |
|--------------------|---------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| -NH <sub>2</sub>   | N 末端, Lys, His, Arg | 聚合物, 例如 PEG, 带酰胺基或亚胺基                      | mPEG-SPA<br>Tresylated<br>mPEG   | Shearwater Inc. Delgado et al.,<br>Critical reviews in Therapeutic<br>Drug Carrier Systems 9 (3, 4) :<br>249-304 (1992) |
| -COOH              | C 末端, Asp, Glu      | 聚合物, 例如 PEG, 带酯或酰胺基<br><br>寡糖组分            | mPEG-Hz<br><br>体外偶联              | Shearwater Inc.                                                                                                         |
| -SH                | Cys                 | 聚合物, 例如 PEG, 带二硫键, 马来酰亚胺或乙烯砜基团<br><br>寡糖组分 | PEG-乙烯砜<br>PEG-马来酰亚胺<br><br>体外偶联 | Shearwater Inc. Delgado et al.,<br>Critical reviews in Therapeutic<br>Drug Carrier Systems 9 (3, 4) :<br>249-304 (1992) |
| -OH                | Ser, Thr, -OH, Lys  | 寡糖组分<br>具有酯, 乙醚, 氨基甲酸酯, 碳酸盐的 PEG           | 体内 O-连接的糖基化                      |                                                                                                                         |
| -CONH <sub>2</sub> | Asn 作为 N 糖基化位点的一部分  | 寡糖组分<br>聚合物, 例如 PEG                        | 体内 N 糖基化                         |                                                                                                                         |
| 芳香族残基              | Phe, Tyr, Trp       | 寡糖组分                                       | 体外偶联                             |                                                                                                                         |
| -CONH <sub>2</sub> | Gln                 | 寡糖组分                                       | 体外偶联                             | Yan 和 Wold, Biochemistry, 1984, Jul 31;23(16):3759-65                                                                   |
| 醛酮                 | 氧化的寡糖               | 聚合物, 例如 PEG, PEG-酰肼                        | PEG 化                            | Andresz et al., 1978, Makromol. Chem. 179:301, WO92/16555, WO02/23114                                                   |
| 胍                  | Arg                 | 寡糖组分                                       | 体外偶联                             | Lundblad 和 Noyes, Chemical Reagents for Protein Modification, CRC Press Inc., Florida, USA                              |
| 咪唑环                | His                 | 寡糖组分                                       | 体外偶联                             | 与胍相同                                                                                                                    |

对于体内 N-糖基化而言, 术语“连接基团”以非传统的方式使用, 指

组成 N-糖基化位点(具有序列 N-X-S/T/C, 其中 X 是除脯氨酸外的任意氨基酸残基, N 是天冬酰胺, S/T/C 是丝氨酸, 苏氨酸或半胱氨酸, 优选丝氨酸或苏氨酸, 且最优选苏氨酸)的氨基酸残基。尽管 N-糖基化位点的天冬酰胺残基是糖基化期间连接糖组分的残基, 但除非存在 N-糖基化位点的其它氨基酸残基, 否则将不能实现该连接。因此, 当非多肽组分是糖组分, 且偶联是通过 N-糖基化实现时, 与 IFNG 多肽的氨基酸序列改变相联使用的术语“含有非多肽组分连接基团的氨基酸残基”应理解为, 组成 N-糖基化位点的一个, 两个或所有氨基酸残基以这样的方式改变, 即将功能性 N-糖基化位点引入氨基酸序列或从所述序列中去掉该位点, 或在所述氨基酸序列中保留了一个功能性 N-糖基化位点(例如, 通过用苏氨酸残基取代作为 N-糖基化位点一部分的丝氨酸残基, 反之亦然)。

氨基酸的命名和原子的命名(如, CA、CB、CD、CG、SG、NZ、N、O、C 等)按蛋白数据库(PDB)(www.pdb.org)的定义来用, 这些名称是根据 IUPAC 命名法命名的(IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur.J.Biochem. 138, 9-37 (1984), 并在 Eur.J.Biochem.152, 1 (1985)中对它们进行更正。术语“氨基酸残基”表示包含在下组中的氨基酸残基: 丙氨酸(Ala 或 A)、半胱氨酸(Cys 或 C)、天冬氨酸(Asp 或 D)、谷氨酸(Glu 或 E)、苯丙氨酸(Phe 或 F)、甘氨酸(Gly 或 G)、组氨酸(His 或 H)、异亮氨酸(Ile 或 I)、赖氨酸(Lys 或 K)、亮氨酸(Leu 或 L)、甲硫氨酸(Met 或 M)、天冬酰胺(Asn 或 N)、脯氨酸(Pro 或 P)、谷氨酰胺(Gln 或 Q)、精氨酸(Arg 或 R)、丝氨酸(Ser 或 S)、苏氨酸(Thr 或 T)、缬氨酸(Val 或 V)、色氨酸(Trp 或 W)和酪氨酸(Tyr 或 Y)残基。

在本文中氨基酸残基的编号从不含信号肽的[S99T]huIFNG(即 SEQ ID NO 1)的 N-末端开始, 或相当于从不含信号肽的 huIFNG(即 SEQ ID NO 17)的 N-末端开始。

用于鉴定氨基酸位置/取代的术语举例说明如下: G18 表示 SEQ ID NO.1 或 17 所示氨基酸序列中第 18 位的氨基酸。G18N 表示第 18 位的 Gly 残基被 Asn 取代。多重取代用“+”表示, 如 G18N+S20T 表示一种氨基酸序列, 其中第 18 位的 Gly 残基被 Asn 取代, 且第 20 位的 Ser 残基被 Thr 取代。备选取代可用“/”表示, 如 G18S/T 表示以下各个取代: G18S 和 G18T。缺失以星号表示。例如, G18\*表示第 18 位的 Gly 缺失。插入如下表示: 在第

18 位的 Gly 残基之后插入一个 Ser 残基, 表示为 G18GS。取代和插入的组合如下表示: 第 18 位的 Gly 残基被 Ser 残基取代, 且在第 18 位之后插入 Ala 残基, 表示为 G18SA。

5 术语“核苷酸序列”意指两个或多个核苷酸分子的连续链。核苷酸序列可以是基因组, cDNA, RNA, 半合成的, 合成来源, 或其任意组合的核苷酸序列。

术语“聚合酶链式反应”或“PCR”一般指体外扩增所需核苷酸序列的方法, 例如, 如 US 4,683,195 所述。一般来说, PCR 方法涉及使用能与模板核酸优先杂交的寡核苷酸引物进行引物延伸合成的重复循环。

10 “细胞”, “宿主细胞”, “细胞系”和“细胞培养物”在本文中可互换使用且所有这些术语应理解为包括细胞生长或培养产生的后代。

“转化”和“转染”可互换使用, 指将 DNA 引入细胞的过程。

“可操作地连接”指通过酶连接或者互相之间的构型使得可行使序列的正常功能的方式将两个或多个核苷酸序列共价连接。例如, 如果编码前  
15 序列或分泌先导序列的核苷酸序列作为参与多肽分泌的前蛋白表达则它与多肽的核苷酸序列可操作地连接; 如果启动子或增强子影响序列的转录则它与编码序列可操作地连接; 如果核糖体结合位点的位置有助于翻译, 则它与编码序列可操作地连接。一般来说, “可操作地连接”意味着连接的核苷酸序列是连续的, 且对于分泌的先导序列而言是连续的且在阅读相  
20 (reading phase)中。经过在方便的限制性位点连接来实现该连接。如果不存在该位点, 那么可结合标准重组 DNA 方法使用合成寡核苷酸连接物或接头。

术语“修饰”在本文中包括取代, 插入和缺失。

术语“突变”和“取代”在本文中可互换使用。

25 术语“引入”首先是指现有氨基酸残基的取代, 但也可指插入其它的氨基酸残基。

术语“去掉”首先是指被去掉的氨基酸残基被另一氨基酸残基取代, 但也指缺失(没有取代)去掉的氨基酸残基。

术语“含有非多肽组分连接基团的氨基酸残基”是与非多肽组分结合的氨基酸残基(对于引入的氨基酸残基而言), 或曾经与之结合的氨基酸残基  
30 (对于除去的氨基酸残基而言)。

术语“一个区别”或“区别于”与特定修饰连用时, 是指允许除制定

的氨基酸区别以外还存在其它的区别。因此，除了本文中公开的旨在优化糖基化位点的利用或者除去和/或引入带有非多肽组分连接基团的氨基酸残基的一些改变以外，必要时，IFNG 多肽变体可包含与上述改变无关的其他修饰。这可能包括，例如，C-末端截短一或多个氨基酸残基，N-和/或 C-末端添加一或多个额外的残基，例如，在 N-末端添加一个 Met 残基，在 N-末端添加氨基酸序列 Cys-Tyr-Cys，以及“保守氨基酸取代”，即，在具有相似特性的氨基酸组团内进行的取代，所述组团如小分子氨基酸，酸性氨基酸，极性氨基酸，碱性氨基酸，疏水氨基酸和芳香族氨基酸。本发明保守取代的实例具体可选自下表。

|   |         |         |                |
|---|---------|---------|----------------|
| 1 | 丙氨酸(A)  | 丝氨酸(S)  | 苏氨酸(T)         |
| 2 | 天冬氨酸(D) | 谷氨酸(E)  |                |
| 3 | 天冬酰胺(N) | 谷氨酰胺(Q) |                |
| 4 | 精氨酸(R)  | 赖氨酸(K)  |                |
| 5 | 异亮氨酸(I) | 亮氨酸(L)  | 甲硫氨酸(M) 缬氨酸(V) |
| 6 | 苯丙氨酸(F) | 酪氨酸(Y)  | 色氨酸(W)         |

术语“至少一个”用于非多肽组分，氨基酸残基，取代等情况时，是指一或多个。

术语“AUCsc”或“皮下给药的曲线下面积”用其常规含义，即血清-时间曲线中 IFNG 活性以下的面积，这里所述的 IFNG 多肽变体为皮下给药，具体是在大鼠中皮下给药。一旦通过实验测定了 IFNG 活性-时间点，就可利用计算机程序，如 GraphPad Prism 3.01，常规计算 AUCsc。

术语“功能性体内半寿期”使用其通常的含义，即多肽在体内/靶器官中仍具有 50% 生物活性的时间，或者多肽的活性为最初活性的 50% 的时间。

作为功能性体内半寿期测定法的备选方法，可测定“血清半寿期”，即，50% 的多肽或偶联物分子在被清除之前在血浆或血流中循环的时间。血清半寿期的测定常常比功能性体内半寿期的测定简单，并且血清半寿期的大小通常可以很好地说明功能性体内半寿期大小。血清半寿期的其它可替换术语包括“血浆半寿期”、“循环半寿期”、“血清清除”、“血浆清除”和“清除半寿期”。血清半寿期可按照常规方法在大鼠中测定，参见本文材料和方法章节。重要的是应注意：本文中，给定的 IFNG 多肽变体的“血清半寿期”必须用静脉(iv)给药的样品来测定。

术语“血清”使用其通常的含义，即不含纤维蛋白原和其它凝血因子

的血浆。

多肽一般通过网状内皮系统(RES)、肾、脾或肝中一个或多个的作用，或通过特异或非特异的蛋白水解作用而清除。术语“肾清除”使用其通常的含义，即发生在肾的任何清除，例如，通过肾小球过滤、肾小管排泄或在肾小管细胞中的降解来完成。通常，肾清除取决于多肽的物理特性，包括分子量、大小(相对于肾小球过滤的截留值而言)、对称性、形状/刚性和电荷，与之相连的糖链，以及该多肽的细胞性受体的存在。肾清除的截留值一般认为是分子量约 67kDa。肾清除可通过任何合适的试验来测定，如已建立的体内试验。例如，可将标记(如，放射标记或荧光标记)的偶联多肽给予患者，并测定所收集的患者尿液中的标记物活性来测定肾清除。肾清除的减少可经过与参照分子，如 huIFNG，[S99T]huIFNG 或 Actimmune®进行比较而确定。将要保留的功能通常选自抗病毒活性、抗增殖活性，免疫调节活性或 IFNG 受体结合活性。

涉及功能性体内半寿期或血清半寿期的术语“增加”用于指，IFNG 变体当静脉给药并且在可比条件下测定时，相应半寿期相对于参照分子有统计学显著的增加，所述参照分子如糖基化 huIFNG (SEQ ID NO:17)，糖基化 [S99T]huIFNG (SEQ ID NO:1)或 Actimmune®(SEQ ID NO:34，产于大肠杆菌中)。因此，有兴趣的 IFNG 多肽变体是，与上述参照分子相比，功能性体内半寿期或血清半寿期增加的变体。

更具体地，所需 IFNG 变体是这样的变体，当静脉给药，尤其当在大鼠中静脉给药时，它们与 huIFNG 或[S99T]huIFNG 在糖基化形式时血清半寿期(或功能性体内半寿期)的比率至少为 1.25，更优选至少 1.5，如至少 1.75，例如至少 2，更优选至少 3，如至少 4，例如至少 5。

有兴趣的 IFNG 变体的其它实例是这样的变体，当静脉给药，尤其当在大鼠中静脉给药时，它们与 Actimmune® (SEQ ID NO:34，产于大肠杆菌中)的血清半寿期(或功能性体内半寿期)之比至少为 2，优选至少为 3，如至少为 4，例如至少为 5，还优选至少为 6，如至少为 7，例如至少为 8，最优选至少为 9，如至少为 10。

涉及 AUCsc 的术语“增加”用于指，当静脉给药并且在可比条件下测定时，本发明 IFNG 变体的曲线下面积相对于参照分子的面积有统计学显著的增加，所述参照分子如糖基化 huIFNG (SEQ ID NO:17)，糖基化

[S99T]huIFNG (SEQ ID NO:1)或 Actimmune®(SEQ ID NO:34, 产于大肠杆菌中)。因此, 优选的 IFNG 变体是, 与上述参照分子相比, AUC<sub>sc</sub> 增加的变体。显然, 施用本发明 IFNG 变体的 IFNG 活性水平应该与施用参照分子的相同。结果是, 为了直接比较不同的 IFNG 分子, 可将 AUC<sub>sc</sub> 值标准化,

5 即它们可表示为 AUC<sub>sc</sub>/施用剂量。

特别优选的 IFNG 变体是这样的变体, 它们与糖基化 huIFNG 或糖基化 [S99T]huIFNG 的 AUC<sub>sc</sub> 之比至少为 1.25, 更优选至少 1.5, 如至少 2, 更优选至少 3, 如至少 4, 例如至少 5 或至少 6, 更优选至少 7, 如至少 8, 例如至少 9 或至少 10, 最优选至少 12, 如至少 14, 例如至少 16, 至少 18 或  
10 至少 20, 尤其当在大鼠中(皮下)给药时。

特别优选的 IFNG 变体的其它实例是这样的变体, 它们与 Actimmune® (SEQ ID NO:34, 产于大肠杆菌中)的 AUC<sub>sc</sub> 之比至少为 100, 更优选至少为 150, 如至少为 200, 例如至少为 250, 还优选至少为 300, 如至少为 400, 例如至少为 500, 最优选至少为 750, 如至少为 1000, 例如至少 1500 或至  
15 少 2000, 尤其当在大鼠中静脉给药时。

术语“T<sub>max,sc</sub>”用于指 IFNG 活性的血清-时间曲线中, 观察到血清中最高水平 IFNG 活性的时间。本发明优选的 IFNG 变体是这样的变体, 它们与 Actimmune®或与糖基化 huIFNG 相比, T<sub>max,sc</sub> 增加。更具体地, 所述优选的变体的 T<sub>max,sc</sub>(大鼠皮下给药以后测定)至少为 200 分钟, 如至少为 250 分钟,  
20 例如至少为 300 分钟, 更优选至少为 350 分钟, 如至少为 400 分钟。

术语“降低的免疫原性”是指本发明的 IFNG 多肽变体比在相当条件下测定的参照分子, 例如 huIFNG 或 Actimmune®产生可测定的更低的免疫反应。免疫应答可以是细胞或抗体介导的反应(参见, 例如, Roitt: 基础免疫学(第 8 版, Blackwell), 可得到免疫原性的进一步定义)。一般情况下, 抗  
25 体的反应性降低表明免疫原性降低。免疫原性降低可通过应用本领域已知的任何合适的方法, 如体内或体外方法来测定。

本文中术语“糖基化增加”, “体内 N-糖基化程度增加”或“N-糖基化程度增加”是指所连接的糖分子的水平增加, 这通常是对糖基化位点的利用增加的结果。众所周知(Hooker 等, 1998, J. Interferon 和 Cytokine Res. 18, 287-295; Sarenva 等, 1995, Biochem J., 308, 9-14), 当 huIFNG 在 CHO 细胞  
30 中表达时, 仅约 50%的 IFNG 分子利用全部两种糖基化位点, 约 40%利用一

种糖基化位点(IN), 约 10%未被糖基化(ON)。体内 N-糖基化程度的增加可通过本领域任何合适的方法, 如 SDS-PAGE 来测定。测定增加的糖基化作用的一个便利试验是本文中材料和方法部分的“测定增加的糖基化”章节所述。

- 5       本文中术语“IFNG 多肽变体群”或“包含本发明 IFNG 多肽的同质群体的组合物”是指包含至少两种有不同成都糖基化的 IFNG 多肽的组合物。正如所理解的那样, 本发明提供了获得 IFNG 多肽群体的手段(means), 其中所述群体中不断增多的 IFNG 分子被彻底糖基化。

10       因此, 本发明还涉及本发明 IFNG 多肽的同质群体(即这样一个群体, 其中大多是 IFNG 多肽都彻底糖基化)或包含本发明 IFNG 多肽的同质群体的组合物。例如, 所述 IFNG 多肽群体可能包含至少 70%的本发明 IFNG 多肽, 优选至少 75%, 如至少 80%, 例如至少 85%, 更优选至少 90%, 如至少 95%, 例如至少 96%, 还更优选至少 97%, 如至少 98%, 例如至少 99%。

- 15       术语“表现出 IFNG 活性”是指多肽具有天然 huIFNG 或 rhuIFNG 的一种或多种功能, 包括体外或体内测定的结合 IFNG 受体的能力和通过 huIFNG 与其受体结合而导致信号转导的能力(即体外或体内生物活性)。Aguet 等(Cell, 55: 273-280, 1988)和 Calderon 等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4837-4841, 1988)描述了 IFNG 受体。一个适于检验 IFNG 活性的试验是
- 20       本文中的“初步试验”。利用本文所述的“初步试验”时, “表现出 IFNG 活性”的多肽的比活性为 rhuIFNG 的至少 5%。应该理解, 由于具体修饰的不同(例如所述变体是否 PEG 化), 活性可以在一个较宽的范围内。因此, 相对于 rhuIFNG 的比活性可以低至 5%或者高至 150%。例如, 所述比活性可以是 rhuIFNG 的 10%(例如 10-125%), 如至少 15%(例如 15-125%), 如至少
- 25       20%(如 20-125%), 至少 25%(例如 25-125%), 至少 30%(例如 30-125%), 至少 35%(例如 35-125%), 至少 40%(例如 40-125%), 至少 45%(例如 45-125%), 至少 50%(例如 50-125%), 至少 55%(例如 55-125%), 至少 60%(例如 60-125%), 至少 65%(例如 65-125%), 至少 70%(例如 70-125%), 至少
- 30       75%(例如 75-125%), 至少 80%(例如 80-125%)或至少 90%(例如 90-110%)。

“IFNG 多肽”是表现出 IFNG 活性的多肽, 即, 术语“IFNG 多肽”

用于指任何 IFNG 分子(无论该分子是 huIFNG, 其截短型, 或其变体), 只要该 IFNG 分子表现出本文所述的 IFNG 活性。术语“IFNG 多肽”在本文中按需要用于表示单体或二聚体形式的多肽。例如, 当表示具体的取代时, 它们通常表示 huIFNG 多肽单体的取代。当涉及本发明 IFNG 分子时, 一般是二聚体形式(且因此, 例如, 包含两个按所述修饰的 IFNG 多肽单体)。IFNG 多肽的二聚体形式可通过两个单体的正常结合来提供, 或者以单链二聚体 IFNG 多肽的形式来提供。

术语“亲本”是指根据本发明改进了糖基化位点的 IFNG 多肽。通过本发明进行修饰的亲本多肽可以是任何 IFNG 多肽, 并因此可以源自任何来源, 例如非人哺乳动物来源, 但优选亲本多肽是具有氨基酸序列 SEQ ID NO:17 或其片段的 huIFNG 多肽。

“片段”是全长 IFNG 多肽序列中表现 IFNG 活性的一部分(例如, 全长 huIFNG 多肽的一种片段如 SEQ ID NO: 17 所示, 全长[S99T] huIFNG 多肽变体的一种片段如 SEQ ID NO: 1 所示), 例如其 C-末端或 N-末端截短型。

IFNG 多肽变体片段的具体实例包括, C-末端截短 1-15 个氨基酸残基的 [S99T] huIFNG, 例如截短 1 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 2), 2 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 3), 3 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 4), 4 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 5), 5 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 6), 6 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 7), 7 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 8), 8 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 9), 9 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 10), 10 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 11), 11 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 12), 12 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 13), 13 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 14), 14 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 15)或 15 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 16), 和/或 N-末端截短 1-3 个氨基酸残基的[S99T] huIFNG。huIFNG 片段的具体实例包括, C-末端截短 1-15 个氨基酸残基的 huIFNG, 例如截短 1 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 19), 2 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 20), 3 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 21), 4 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 22), 5 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 23), 6 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 24), 7 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 25), 8 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 26), 9 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 27), 10 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 28), 11 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 29), 12 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 30), 13 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 31), 14 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 32)或 15 个氨基酸残基(SEQ ID NO: 33), 和/或 N-末

端截短 1-3 个氨基酸残基的 huIFNG。

如上所述, IFNG 多肽变体除了 S99T 取代以外, 还可包含至少一个另外的修饰, 只要该变体表现出 IFNG 活性, 即所述变体可以是[S99T] huIFNG 的变体, 或[S99T] huIFNG 的片段的变体。这类变体的具体实例包括引入和  
5 /或去除了氨基酸残基、包含非多肽组分连接基团的变体。[S99T] huIFNG (及其片段)的变体的其它实例包括以上“背景技术”章节中所述的变体, 例如包括 N-末端添加了的 Cys-Tyr-Cys 或添加了 Met 的[S99T] huIFNG, 以及 US 6,046,034 中公开的半胱氨酸修饰的变体。

一般情况下, 本发明的变体由核苷酸序列编码, 该核苷酸序列与亲本  
10 IFNG 多肽的编码序列相比, 已经按照本发明进行了修饰。

但并不总是如此, 因为所述变体多肽可以在翻译后加工过程中进行 C-末端或 N-末端截短, 例如在细胞中、表达介质中、纯化期间等被蛋白酶从 C-末端或 N-末端裂解, 导致所得变体多肽为最初产生的变体多肽的截短型(例如, 尽管最初产生的是全长变体, 但由于对该全长变体多肽的翻译后加  
15 工, 可以获得 C-末端截短的变体多肽)。在这种情况下, 术语“亲本”应理解为将要按照本发明进行修饰的截短形式。

“变体”是一种多肽, 它与其亲本多肽(正常情况下是 SEQ ID NO: 17 或其截短型, 如 SEQ ID NOS: 19-33 所示)具有一个或多个氨基酸残基的区别, 一般是 1-15 个氨基酸残基(如 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或  
20 15 个氨基酸残基)的区别, 例如 1-10 个氨基酸残基, 1-5 个氨基酸残基, 或 1-3 个氨基酸残基。

术语“功能性位点”是指 IFNG 的功能或功效所必需的或者与之相关的一个或多个氨基酸残基。该氨基酸残基“位于”功能性位点。功能性位点可用本领域已知的方法测定且优选经过分析与诸如 IFNG 受体的相关受体  
25 复合的多肽结构来鉴定。

术语“huIFNG”是指野生型人 IFNG 的具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 17 的成熟形式。

术语“rhuIFNG”是指通过重组手段制备的、野生型人 IFNG 的具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 17 的成熟形式。

30 术语“[S99T] huIFNG”是指野生型人 IFNG 中第 99 位的丝氨酸残基已经被苏氨酸残基取代了的成熟形式(见 SEQ ID NO: 1)。

本文中术语“糖基化 huIFNG”是指所述 huIFNG 多肽中能使其糖基化的细胞中产生，并因此在其天然 N-糖基化位点(SEQ ID NO: 17 的第 25 和 97 位)被糖基化。

类似地，术语“糖基化 huIFNG 变体”是指所述 IFNG 多肽变体中能使其糖基化的细胞中产生。

本文中术语“Actimmune®”是指 IFNG 的 140 个氨基酸的形式 (Actimmune®在 C-末端截短了 4 个氨基酸并且在 N-末端包括一个 Met 残基) (见 SEQ ID NO : 34)，它通过使遗传工程化大肠杆菌发酵而获得。关于 Actimmune®的进一步信息见 [www.actimmune.Com](http://www.actimmune.Com)。

## 10 本发明的干扰素 $\gamma$ 多肽变体

### 具有优化的体内糖基化位点的本发明 IFNG 变体

如上文所述，意外发现，通过将 huIFNG(或其片段)第 99 位的丝氨酸残基替换为苏氨酸残基，可以使 huIFNG 第 97 位的天然 N-糖基化位点的糖基化增多，即可使彻底糖基化或基本上彻底糖基化的 IFNG 分子所占比例增加。图 1 显示，衬底糖基化的 IFNG 多肽的显著增加是可以实现的。在[S99T] huIFNG (SEQ ID NO : 1)多肽变体的情况中可以观察到，培养基中收获的这种多肽变体约 90%利用了全部两种 N-糖基化位点，而培养基中收获的 rhuIFNG 多肽仅有约 60%被彻底糖基化。

相应地，本发明一个方面涉及表现出 IFNG 活性并具有氨基酸序列 SEQ ID NO : 1 的 IFNG 多肽变体(即[S99T] huIFNG)，或其具有 IFNG 活性的片段。

如上文所述，已知 huIFNG 的 C-末端截短形式与 huIFNG 相比，仍保留活性，在有些情况下甚至还增强活性。因此，本发明一个优选实施方案中，本发明的 IFNG 多肽变体是 SEQ ID NO : 1 的片段，该片段在 C-末端截短了 1-15 个氨基酸残基，通常在 C-末端截短 1-10 个氨基酸残基。SEQ ID NO : 1 的这类 C-末端截短形式的具体实例参见 SEQ ID NOS: 2-16。本发明这一实施方案中的 IFNG 多肽片段具有 IFNG 活性。

应理解，这方面的糖基化 IFNG 多肽变体应在糖基化宿主细胞中重组表达，优选哺乳动物宿主细胞，如在“与糖组分的偶联”一节中提到的那些细胞。

如上文所解释的，rhuIFNG 在 CHO 细胞中时，所表达的 IFNG 多肽群体中仅约 50-60%被彻底糖基化。因此，本发明 IFNG 多肽变体的主要优点

之一是对第 97 位的体内糖基化位点的高度利用,这导致获得相对于 huIFNG 更均一的群体。由于该更均一的群体,包含这样的 IFNG 多肽变体群体的组合物(如收获在培养基中的)无需象 rhuIFNG 那样进行繁琐而耗时的纯化。

因此,本发明另一方面涉及 IFNG 多肽变体的群体,或包含 IFNG 多肽变体群体的组合物,其中所述群体包含至少约 70%的本发明 IFNG 多肽变体。优选所述组合物包含至少 75%,更优选至少 80%,还更优选至少 85%,如至少约 90%的本发明 IFNG 多肽变体。

更尤其,本发明涉及 IFNG 多肽变体的群体,或包含 IFNG 多肽变体群体的组合物,其中所述群体包含至少 70%,优选至少 75%,更优选至少 80%,还更优选至少 85%,如至少约 90%的具有氨基酸序列 SEQ ID NO:1 的本发明 IFNG 多肽变体。

类似地,本发明还涉及 IFNG 多肽变体的群体,或包含 IFNG 多肽变体群体的组合物,其中所述群体包含至少 70%,优选至少 75%,更优选至少 80%,还更优选至少 85%,如至少约 90%的具有选自下组的氨基酸序列的本发明 IFNG 多肽变体: SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 或 SEQ ID NO:16。

除了上文提到的、优化 rhuIFNG 中第 97 位的体内糖基化位点所需的 S99T 突变,还可优化已引入 SEQ ID NO:1 或其片段(例如,为了增加血清半寿期和/或增加 AUC<sub>sc</sub>)的其它体内糖基化位点。一般情况下,所述体内糖基化位点为 N-糖基化位点,但本发明也涉及 O-糖基化位点。所述优化可通过在靠近糖基化位点(尤其靠近体内糖基化位点)的位置进行修饰(优选取代)而实现。通常,这样的体内 N-糖基化位点是引入的体内 N-糖基化位点。适于引入体内 N-糖基化位点的合适位置可参见 WO 01/36001,并将在下文描述。

“靠近”糖基化位点的氨基酸残基通常位于位置-4,-3,-2,-1,+1,+2,+3 或+4(相对于与糖相连的糖基化位点的氨基酸残基而言),优选位置-1,+1,或+3,尤其位置+1 或+3。靠近体内 N-糖基化位点(具有序列 N-X-S/T/C)的氨基酸残基可以位于位置-4,-3,-2,-1,+1,+2,+3 或+4(相对于 N-残基而言)。

当相对于 N-残基而言的位置+2 被修饰时,应理解仅有限量的修饰有可

能发生, 因为为了维持/引入体内 N-糖基化位点, 该位置的氨基酸残基必需是 Ser, Thr 或 Cys。

在本发明特别优选的实施方案中, 在相对于 N-残基而言的位置+2 进行的修饰是取代, 其中目标氨基酸残基被 Thr 残基取代。但如果该氨基酸残基已经是 Thr 残基, 通常并不优选或必需在该位置进行任何取代。当 X 被修饰, X 应不是 Pro, 优选不是 Trp, Asp, Glu 或 Leu。被引入的氨基酸残基优选选自 Phe, Asn, Gln, Tyr, Val, Ala, Met, Ile, Lys, Gly, Arg, Thr, His, Cys 或 Ser, 更优选 Ala, Met, Ile, Lys, Gly, Arg, Thr, His, Cys 或 Ser, 尤其 Ala 或 Ser。

当相对于 N-残基而言的位置+3 被修饰时, 将要引入的氨基酸残基优选选自 His, Asp, Ala, Met, Asn, Thr, Arg, Ser 或 Cys, 更优选 Thr, Arg, Ser 或 Cys。当 X 残基是 Ser 残基时, 特别优选上述修饰。

因此, 在天然体内 N-糖基化方面, 第 97 位的 N-糖基化位点可以通过在选自下组的位点进行修饰(如取代)而被进一步优化: E93, K94, L95, T96, Y98, V100 或 T101 (即, 相对 N97 而言的位置-4,-3,-2,-1, +1, +3 或+4)。在 SEQ ID NO: 1 (或其片段) 的第 98 位进行取代的具体实例包括 Y98F, Y98N, Y98Q, Y98V, Y98A, Y98M, Y98I, Y98K, Y98G, Y98R, Y98T, Y98H, Y98C 或 Y98S, 优选 Y98A, Y98M, Y98I, Y98K, Y98G, Y98R, Y98T, Y98H, Y98C 或 Y98S, 尤其 Y98S。在 SEQ ID NO: 1 (或其片段) 的第 100 位进行取代的具体实例包括 V100H, V100D, V100A, V100M, V100N, V100T, V100R, V100S, 或 V100C, 尤其 V100T, V100R, V100S 或 V100C。

类似地, 第 25 位的体内 N-糖基化位点可以通过在选自下组的位点进行修饰(如取代)而被进一步优化: D21, V22, A23, D24, G26, L28 或 F29 (即, 相对于 N25 而言的位置-4,-3,-2,-1, +1, +3 或+4)。在 SEQ ID NO: 1 (或其片段) 的第 26 位进行取代的具体实例包括 G26F, G26N, G26Y, G26Q, G26V, G26A, G26M, G26I, G26K, G26R, G26T, G26H, G26C 或 G26S, 优选 G26A, G26M, G26I, G26K, G26R, G26T, G26H, G26C 或 G26S, 更优选 G26A 或 G26S, 尤其 G26A。在 SEQ ID NO: 1 (或其片段) 的第 28 位进行取代的具体实例包括 G28H, G28D, G28A, G28M, G28N, G28T, G28R, G28S, 或 G28S, 尤其 G28A, G28T, G28R, G28S 或 G28C。

显然, 上述与优化位置 97 的糖基化相关的任何修饰可以与上述与优化位置 25 的糖基化相关的任何修饰组合。

AUC<sub>sc</sub> 增加和/或血清半寿期增加的本发明 IFNG 变体

本发明另一方面涉及具有氨基酸序列 SEQ ID NO : 1 的 IFNG 多肽变体, 所述变体具有 IFNG 活性。

本发明还涉及 IFNG 多肽片段的变体, 它具有选自下列的氨基酸序列  
5 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 5, SEQ ID NO : 6,  
SEQ ID NO : 7, SEQ ID NO : 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO :  
11, SEQ ID NO : 12, SEQ ID NO : 13, SEQ ID NO : 14, SEQ ID NO : 15 或 SEQ  
ID NO : 16, 其中所述变体具有 IFNG 活性。

因此, 所述变体与 SEQ ID NOS: 1-16 相比包含至少一个进一步的修饰。

10 为了避免过多破坏 [S99T] huIFNG 多肽变体(或其片段)的结构和功能,  
按照本发明修饰的氨基酸残基的总数一般不超过 15 个。通常, IFNG 多肽  
变体相对于氨基酸序列 SEQ ID NO 1 有 1-10 个修饰, 例如 1-8, 2-8, 1-5,  
1-3 或 2-5 个修饰。优选所述修饰为取代。应理解, 类似的考虑对于具有氨  
基酸序列 SEQ ID NO : 1 的 IFNG 多肽变体的片段的变体也是适用的。因此,  
15 当所述变体是 SEQ ID NOS: 2-16 中任一种序列的变体时, 这样的变体与  
SEQ ID NOS: 2-16 所示的相关氨基酸序列相比, 常常有不到 15 处修饰, 通  
常 1-10 处修饰, 例如 1-8, 2-8, 1-5, 1-3 或 2-5 个修饰。优选所述修饰是  
取代。

因此, 正常情况下 IFNG 多肽变体(即除了 S99T 取代以外还包含至少一个  
20 个修饰的变体)包含下述氨基酸序列, 该序列与氨基酸序列 SEQ ID NO : 1  
(或其片段)有 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个氨基酸残基不  
同。

在本发明一个优选是实施方案中, 所述 IFNG 变体(进一步)引入和/或除  
去至少一个氨基酸残基, 该残基含有非多肽组分的连接基团。

25 通过除去或引入包含非多肽组分连接基团的氨基酸残基, 有可能使该  
多肽进行特别适应, 以便制备出更易于与所选非多肽组分进行偶联的分子,  
从而优化偶联模式(如确保非多肽组分在 IFNG 多肽变体表面的优化分布),  
并因此获得具有 IFNG 活性的新偶联分子, 此分子具有另外一或多种比基于  
huIFNG 或 rhuIFNG 的现有分子改进的特性。例如, 通过引入连接基团, IFNG  
30 多肽变体可强化或改变与相关非多肽组分结合的特异性氨基酸残基的含  
量, 从而获得更有效、更专一和/或更广泛的偶联。通过除去一或多个连接

基团,有可能在多肽上与非多肽组分偶联有不利后果的部位避免这样的偶联,所述部位如该多肽的功能性位点或其附近的氨基酸残基(因为在这样的位点进行偶联可能导致所得偶联多肽由于受体识别能力受损而失活或 IFNG 活性减弱)。此外,将靠近另一连接基团的连接基团除去可能有利于避免与这种基团发生不均一性偶联。在优选实施方案中,IFNG 多肽的不止一个氨基酸残基被改变,例如所述改变涉及除去或引入带有所选非多肽组分的连接基团的氨基酸残基。该实施方案特别优选,因为它有可能特异性设计 IFNG 多肽变体,从而获得与非多肽组分的优化偶联。

除了引入和/或除去氨基酸残基,所述多肽变体还可包含不改变带有非多肽组分连接基团的氨基酸残基的引入和/或去除的其它修饰,如取代。这类修饰的实例包括保守氨基酸取代和/或将 Cys-Tyr-Cys 或 Met 引入 N-末端。

可用于偶联的以及出现在二聚化 IFNG 多肽变体中的连接基团的确切数目取决于偶联所要达到的效果。而所要达到的效果取决于,例如偶联的性质和程度(例如,非多肽组分的同一性,在应进行偶联或应避免偶联的情况下希望或可能与多肽偶联的非多肽组分的数量,等)。

应理解,带有非多肽组分连接基团的氨基酸残基,无论是被除去还是被引入,对它的选择都基于所选非多肽组分的特性,并且在大多数情况中,基于所用的偶联方法。例如,当非多肽组分是聚合物分子如聚乙二醇-衍生的或聚环氧乙烷验收的分子时,能作为连接基团的氨基酸残基选自半胱氨酸,赖氨酸,天冬氨酸,谷氨酸或精氨酸。特别优选半胱氨酸。当非多肽组分是糖组分时,连接基团例如是体内糖基化位点,优选 N-糖基化位点。

每当在具有氨基酸序列 SEQ ID NO: 1 (或其片段)的 IFNG 多肽中引入或除去非多肽组分的连接基团时,需修饰的多肽位置按如下进行适当选择:

该位置优选位于 IFNG 多肽的表面,更优选该位置由有至少 25% 的侧链暴露于溶剂(优选至少 50% 的侧链暴露于溶剂的氨基酸残基占据,该氨基酸残基),如基于二聚化 IFNG 的三维结构或模型所测定的那样,该结构或模型任选进一步包含一个或两个 IFNG 受体分子。这样的位置列于本文实施例 1 中。

另外感兴趣的是修饰亲本 IFNG 的任意 23 个 C-末端氨基酸残基(尤其通过引入含有非多肽组分的连接基团的氨基酸残基),因为据信这样的残基位于 IFNG 多肽的表面。

另外,优选对 IFNG 多肽环区的一或多个氨基酸残基进行修饰,因为这些环区中的大多数氨基酸残基都暴露在表面且离功能性位点足够远,远到引入非多肽组分(如聚合物分子,尤其 PEG 分子)和/或 N-糖基化位点不会影响该分子的功能。这样的环区可以通过观察 huIFNG 的三维结构来确定。组成所述环区的氨基酸残基是残基 N16-K37(A-B 环), F60-S65(B-C 环), N83-S84 (C-D 环)和 Y98 L103 (D-E 环)。

组成 IFNG 受体结合位点的氨基酸残基是 Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119 (见本文实施例 2)。通常优选不将一个非多肽组分的多个连接基团(如额外的 N-糖基化位点和/或半胱氨酸残基)引入该分子的这一位点。

为了测定连接基团的优化分布,根据 IFNG 二聚体多肽的三维结构计算位于 IFNG 多肽表面的氨基酸残基之间的距离。更具体地,测定含有所述连接基团的氨基酸残基的 CB 之间的距离,或者测定其中一个氨基酸残基的官能团(赖氨酸的 NZ, 天冬氨酸的 CG, 谷氨酸的 CD, 半胱氨酸的 SG)与含有连接基团的另一氨基酸残基的 CB 之间的距离。在甘氨酸的情况中,用 CA 代替 CB。在本发明的 IFNG 多肽部分中,任何所述的距离优选超过 8Å,特别是超过 10Å,以避免或减少不均一性偶联。

另外,IFNG 多肽变体的氨基酸序列与 SEQ ID NO: 1 (或其片段)的区别在于,除去了组成表位的一部分的一个或多个氨基酸残基,优选通过取代含有非多肽组分连接基团的氨基酸残基来除去,以便破坏或灭活该表位。通过使用本领域已知的方法,也称为表位定位法,可鉴定[S99T] huIFNG, huIFNG 或 rhuIFNG 的表位,参见,例如 Romagnoli et al., Biol Chem, 1999,380 (5): 553-9, DeLisser EN, Methods Mol Biol, 1999,96: 11-20, Van de Water et al., Clin Immunol Immunopathol, 1997,85 (3): 229-35, Saint-Remy JM, Toxicology, 1997, 119 (1): 77-81, and Lane DP 和 Stephen CW, Curr Opin Immunol, 1993,5 (2): 268-71。一种方法是建立表达例如 9 个氨基酸残基的随机寡肽的噬菌体展示文库。通过免疫沉淀法从抗[S99T] huIFNG, huIFNG 或 rhuIFNG 的特异性抗血清纯化 IgG1 抗体,通过免疫印迹鉴定反应性噬菌体。通过测定纯化的反应性噬菌体的 DNA 序列,可测定寡肽的序列,随后在 IFNG 的三维结构上定位该序列。由此鉴定的该结构上的区域构成表位,然后可选择该表

位作为导入非多肽组分的连接基团的靶区域。

功能性体内半寿期和血清半寿期取决于，例如，多肽变体的分子量，而使半寿期增加所需的连接基团数目取决于所选非多肽组分的分子量。在一个实施方案中，经 Laemmli, U. K., Nature Vol 227 (1970), p680-85 所述的 SDS-PAGE 测定，本发明的 IFNG 多肽变体具有至少 67 kDa 的分子量，尤其至少 70 kDa。IFNG 的分子量范围是大约 34-50 kDa，因此还需要约 20-40kDa 以获得所需的效果。这可以，例如，由 2-4 个 10kDa 的 PEG 分子或组合额外的体内糖基化位点和额外的 PEG 分子来提供，如本文其它部分所述。

10 优选本发明的偶联的 IFNG 多肽变体有 1-10 个(额外的)非多肽组分，如 1-8, 2-8, 1-5, 1-3 或 2-5 个(额外的)非多肽组分。通常，偶联的变体有 1-3 个(额外的)非多肽组分，如 1, 2 或 3 个(额外的)非多肽组分。

如上所述，在生理条件下，huIFNG 为二聚体多肽。所述多肽通常是同型二聚体形式(例如，通过与按本文所述制备的两个 IFNG 多肽分子结合来制备)。然而，如果需要，IFNG 多肽变体可以以单链形式提供，其中两个 IFNG 多肽单体可通过肽键或肽接头连接。以单链形式提供 IFNG 多肽变体的优势在于，其中的两个 IFNG 多肽可以不同，这种不同有利于，例如，允许多肽的不对称诱变。例如，从其中一个单体的受体结合位点去掉 PEG 化位点，但保留另一个单体的位点。这样一来，PEG 化后，一个单体具有完整的受体结合位点，而另一个被彻底 PEG 化(且因此提供显著增大的分子量)。

#### 非多肽组分是糖组分时的本发明 IFNG 变体

在本发明的优选实施方案中，SEQ ID NO: 1 (或其片段)所示 IFNG 变体至少引入和/或除去至少一个糖基化位点。优选该糖基化位点为体内糖基化位点，即非多肽组分是糖组分，例如 O-连接的或 N-连接的糖组分，优选 N-连接的糖组分。

在本发明一个感兴趣的实施方案中，所述变体引入至少一个糖基化位点，尤其一个体内 N-糖基化位点。优选引入的糖基化位点通过取代而引入。

例如，可将体内 N-糖基化位点引入 SEQ ID NO: 1 (或其片段)所示 IFNG 多肽中的一个位置，所述多肽有暴露在表面的氨基酸残基，优先该氨基酸残基有至少 25% 的侧链暴露于表面，尤其至少 50% 的侧链暴露于表面。对

这类位置的测定详见本文实施例 1。

引入 N-糖基化位点,所用的引入方式使该位点的 N-残基位于所述位置中。类似地,引入 O-糖基化位点,使组成该位点的 S 或 T 残基位于所述位置中。应理解,术语“至少 25%(或至少 50%)的侧链暴露在表面”当与体内 N-糖基化位点的引入联用时,它表示实际上与糖组分连接的位置中氨基酸侧链的表面可接近特性。在很多情况下,必须在相对于实际上与糖组分相连的天冬酰胺残基而言为+2 的位置上引入丝氨酸或苏氨酸残基(当然,除非此位置已被丝氨酸或苏氨酸残基占据),这些引入了丝氨酸或苏氨酸残基的位置可以被掩盖,即它有不到 25%的侧链暴露在表面。

另外,为了保证有效糖基化,优选体内糖基化位点,特别是 N-糖基化位点的 N 残基或 O-糖基化位点的 S 或 T 残基位于 IFNG 多肽的 118 个 N-末端氨基酸残基内,更优选在 97 个 N-末端氨基酸残基内。另外更优选的是,体内糖基化位点引入的位置是只需要一个突变就可产生该位点的位置(即,产生功能性糖基化位点所需的任何其它氨基酸残基已存在于该分子中)。

例如,导致在暴露于 IFNG 多肽表面并被有至少 25%的侧链暴露于该表面的氨基酸残基占据的位置引入另一 N-糖基化位点的取代包括: Q1N+P3S/T, P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, E9N+L11S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, Y14N+N16S/T, G18S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40T, E39N+D41S/T, S40N+R42S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, K61N+D63S/T, D62N+Q64S/T, D63N, D63N+S65T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, Q67N, Q67N+S69T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, T72N+K74S/T, K74N+D76S/T, E75N+M77S/T, K80S/T, V79N+F81S/T, K80N+F82S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K87S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, D90N+F92S/T, E93N+L95S/T, K94N, K94N+T96S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, E119N, E119N+S121T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N 或 R140N+S142T, 所示的取代相

对于具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1 的[S99T] huIFNG (或相对于其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的相关片段)。S/T 表示取代为丝氨酸或苏氨酸残基, 优选苏氨酸残基。

导致在暴露于 IFNG 多肽(其具有至少 50% 的侧链暴露于表面(在具有受体分子的结构中))表面的位置导入另一 N-糖基化位点的取代包括:

P3N+V5S/T, K6N+A8S/T, K12S/T, K13N+F15S/T, G18S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, G31N+L33S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E38N, E38N+S40S, E39N+D41S/T, K55N+F57S/T, K58N+F60S/T, K61S/T, D62N+Q64S/T, Q64N+I66S/T, S65N+Q67S/T, K68N+V70S/T, E71N+I73S/T, E75N+M77S/T, N85S/T, S84N+K86S/T, K86N+K88S/T, K87N+R89S/T, K94N, K94N+T96S, T101N+L103S/T, D102N+N104S/T, L103N+V105S/T, Q106S/T, P122N+A124S/T, A123N+K125S/T, A124N, A124N+T126S, K125N+G127S/T, T126N+K128S/T, G127N+R129S/T, K128N+K130S/T, R129N+R131S/T, K130N, K130N+S132T, R131N+Q133S/T, S132N+M134S/T, Q133N+L135S/T, M134N+F136S/T, L135N+R137S/T, F136N+G138S/T, R137N+R139S/T, G138N+R140S/T, R139N+A141S/T, R140N 和 R140N+S142T, 所示的取代相对于具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1 的[S99T] huIFNG (或相对于其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的相关片段)。S/T 表示取代为丝氨酸或苏氨酸残基, 优选苏氨酸残基。

导入一个 N-糖基化位点时仅需要一个氨基酸突变的那些取代包括 K12S/T, G18S/T, G18N, K37S/T, E38N, M45N, I49N, K61S/T, D63N, Q67N, V70N, K80S/T, F82N, N85S/T, K87S/T, K94N, Q106S/T, E119N, A124N, K130N 和 R140N, 尤其 K12S/T, G18N, G18S/T, K37S/T, E38N, K61S/T, D63N, Q67N, K80S/T, N85S/T, K94N, Q106S/T, A124N, K130N, 和 R140N (具有超过 25% 的侧链暴露于表面(在不含受体分子的结构中)的位置), 或更优选 G18N, E38N, D63N, Q67N, K94N, S99N, A124N, K130N 和 R140N (在不含受体分子的结构中具有超过 50% 的侧链暴露于表面)。

通常, 不优选将 N-糖基化位点引入构成受体结合位点的区域中(除了在特殊情况下, 参见题为“受体亲和力降低了的变体”)。相应地, 通常不应实施突变 Q1N+P3S/T, E9N+L11S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, D21N+A23S/T, G26N+L28S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, E119N 或

E119N+S121T, 除非希望受体亲和力降低。

本发明特别优选的变体包括 SEQ ID NO: 1 (或其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的片段), 其中所述变体具有 IFNG 活性并包含至少一个选自下组的取代: K12S, K12T, G18S, G18T, E38N, E38N+S40T, K61S, K61T, N85S, N85T, K94N, Q106S 或 Q106T, 更优选选自 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T, N85T, K94N 或 Q106T, 还更优选选自 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T 或 N85T, 尤其 E38N+S40T。

在本发明另一感兴趣的实施方案中, SEQ ID NO: 1 (或其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的片段)包含至少两个引入的糖基化位点, 尤其至少两个引入的 N-糖基化位点。导致引入至少两个 N-糖基化位点的至少两个修饰 (尤其取代) 优选选自 K12S, K12T, G18S, G18T, E38N, E38N+S40T, K61S, K61T, N85S, N85T, K94N, Q106S 或 Q106T, 更优选选自 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T, N85T, K94N 或 Q106T, 还更优选选自 K12T, G18T, E38N+S40T, K61T 或 N85T。产生变体 (其包含至少两个额外的 N-糖基化位点) 的这类取代的具体实例包括: K12T+G18T, K12T+E38N+S40T, K12T+K61T, K12T+N85T, G18T+E38N+S40T, G18T+K61T, G18T+N85T, E38N+S40T+K61T, E38N+S40T+N85T 和 K61T+N85T。

从上面所列的取代中, 优选选择位于 118 个 N-末端氨基酸残基内的取代, 特别是位于 97 个 N-末端氨基酸残基内的取代。

本发明的 IFNG 多肽变体每个单体可含有单个体内糖基化位点 (与 SEQ ID NO: 1 或其片段相比)。然而, 为了变成足够大小以增加血清半寿期, 通常需要该多肽包含不止一个额外的体内 N-糖基化位点, 特别是 2-7 个或 2-5 个额外的体内 N-糖基化位点, 例如 2, 3, 4, 5, 6 或 7 个体内 N-糖基化位点。这样的体内 N-糖基化位点优选通过上文所列的一或多个取代来引入。

此外, 应理解, 上述任一种修饰可与 “具有优化的体内糖基化位点的本发明 IFNG 变体” 一节所公开的任何修饰组合, 尤其与取代 G26A 组合。

本发明的 IFNG 变体, 其中非多肽组分是具有半胱氨酸作为连接基团的分子

在另一优选实施方案中, SEQ ID NO: 1 (或其片段) 所示本发明 IFNG 变体包含至少两个引入的半胱氨酸残基。例如, 可将半胱氨酸残基引入具有 SEQ ID NO: 1 (或其片段) 且有暴露在表面的氨基酸残基的 IFNG 多肽中。优

选所述暴露在表面的氨基酸残基有至少 25% 的侧链暴露在表面, 尤其至少 50% 的侧链暴露在表面。对这类位置的确定详见本文实施例 1。

例如, 导致在暴露于 IFNG 多肽表面并被有至少 25 % 的侧链暴露于该表面的氨基酸残基占据的位置(在具有受体分子的结构中)引入一个半胱氨酸残基的取代包括: Q1C, D2C, P3C, K6C, E9C, N10C, K13C, Y14C, N16C, G18C, H19C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, N35C, K37C, E38C, E39C, S40C, K55C, K58C, N59C, K61C, D62C, D63C, Q64C, S65C, Q67C, K68C, E71C, T72C, K74C, E75C, N78C, V79C, K80C, N83C, S84C, N85C, K86C, K87C, D90C, E93C, K94C, T101C, D102C, L103C, N104C 或 E119C, 所示的取代相对于具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1 的[S99T] huIFNG (或相对于其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的相关片段)。

导致在暴露于 IFNG 多肽表面并被有至少 50 % 的侧链暴露于该表面的氨基酸残基占据的位置(在具有受体分子的结构中)引入一个半胱氨酸残基的取代包括: P3C, K6C, N10C, K13C, N16C, D21C, N25C, G26C, G31C, K34C, K37C, E38C, E39C, K55C, K58C, N59C, D62C, Q64C, S65C, K68C, E71C, E75C, N83C, S84C, K86C, K87C, K94C, T101C, D102C, L103C 或 N104C, 所示的取代相对于具有氨基酸序列 SEQ ID NO 1 的[S99T] huIFNG (或相对于其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的相关片段)。

通常, 不优选将半胱氨酸残基引入构成受体结合位点的区域中(并随后将该半胱氨酸残基与非多肽组分连接)(除了在特殊情况下, 参见题为“受体亲和力降低了的变体”)。相应地, 通常不应实施突变 Q1C, E9C, G18C, H19C, D21C, G26C, K34C, K37C 和 E119C, 除非希望降低受体亲和力。

更优选所述半胱氨酸残基通过选自 N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C, N104C 或 A124C 的取代来引入。

在本发明另一感兴趣的实施方案中, SEQ ID NO: 1 (或其具有氨基酸序列 SEQ ID NOS: 2-16 的片段)包含至少两个引入的半胱氨酸残基。导致引入至少两个半胱氨酸残基的至少两个修饰(尤其取代)优选选自 N10C, N16C, E38C, N59C, N83C, K94C, N104C 或 A124C。产生变体(其包含至少两个引入的半胱氨酸残基)的这类取代的具体实例包括: N10C+N16C, N10C+E38C, N10C+N59C, N10C+N83C, N10C+K94C, N10C+N104C, N10C+A124C, N16C+E38C, N16C+N59C, N16C+N83C, N16C+K94C, N16C+N104C,

N16C+A124C, E38C+N59C, E38C+N83C, E38C+K94C, E38C+N104C, E38N+A124C, N59C+N83C, N59C+K94C, N59C+N104C, N59C+A124C, N83C+K94C, N83C+N104C, N83C+A124C, K94C+N104C, K94C+A124C 和 N104C+A124C。

- 5 可以理解, 优选使引入的半胱氨酸残基与非多肽组分(PEG 或更优选 mPEG)偶联。含半胱氨酸的多肽变体与聚合物分子的偶联可用任何适当的方式实现, 如“与聚合物分子的偶联”一节所述的方式, 例如该节所述的一步法或逐步的方式。使 IFNG 多肽变体 PEG 化的优选方法是, 用半胱氨酸反应性 PEG 使 PEG 与半胱氨酸残基共价连接。目前市场上已有多种带有不同基团的高特异性、半胱氨酸反应性 PEG(如, 正吡啶基-二硫化物, 马来酰亚胺和乙烯砜)和大小不同的 PEG(2-20 kDa, 如 5 kDa, 10 kDa, 12 kDa 或 15 kDa), 例如 Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, USA 的产品。

应理解, 上述任一种修饰可与“具有优化的体内糖基化位点的本发明 IFNG 变体”一节所公开的任何修饰组合, 尤其与取代 G26A 组合。

- 15 本发明的 IFNG 变体, 其中第一种非多肽组分是糖组分, 第二种非多肽组分是具有半胱氨酸残基作为连接基团的分子

- 在优选实施方案中, SEQ ID NO: 1 (或其片段)所示的本发明 IFNG 变体包含至少一个引入的 N-糖基化位点和至少一个引入的半胱氨酸残基。所述变体可通过选择前两节中所述、分别适于引入 N-糖基化位点和半胱氨酸残基的残基来制备。但在本发明一个优选实施方案中, 所述变体包含选自以下的取代: K12T+N16C, K12T+E38C, K12T+N59C, K12T+N83C, K12T+K94C, K12T+N104C, K12T+A124C, G18T+N10C, G18T+E38C, G18T+N59C, G18T+N83C, G18T+K94C, G18T+N104C, G18T+A124C, E38N+S40T+N10C, E38N+S40T+N16C, E38N+S40T+N59C, E38N+S40T+N83C, E38N+S40T+K94C, E38N+S40T+N104C, E38N+S40T+A124C, K61T+N10C, K61T+N16C, K61T+E38C, K61T+N83C, K61T+K94C, K61T+N104C, K61T+A124C, N85T+N10C, N85T+N16C, N85T+E38C, N85T+N59C, N85T+K94C, N85T+N104C, N85T+A124C, K94N+N10C, K94N+N16C, K94N+E38C, K94N+N59C, K94N+N83C, K94N+N104C, K94N+A124C, Q106T+N10C, Q106T+N16C, Q106T+E38C, Q106T+N59C, Q106T+N83C, Q106T+K94C 或 Q106T+A124C, 更优选选自

E38N+S40T+N10C, E38N+S40T+N16C, E38N+S40T+N59C,  
E38N+S40T+N83C, E38N+S40T+K94C 或 E38N+S40T+N104C。

可以理解, 优选使引入的半胱氨酸残基与非多肽组分(PEG 或更优选 mPEG)偶联。含半胱氨酸的多肽变体与聚合物分子的偶联可用任何适当的方式实现, 如, “与聚合物分子的偶联”一节所述的方式, 例如该节所述的一步法或逐步的方式。适当的聚合物是 VS-mPEG 或 OPSS-mPEG。

此外, 应理解, 上述任一种修饰可与“具有优化的体内糖基化位点的本发明 IFNG 变体”一节所公开的任何修饰组合, 尤其与取代 G26A 组合。

#### 具有降低的受体亲和力的 IFNG 变体

10 增加 IFNG 多肽的血清半寿期的一种方法是减少受体介导的内化作用并因此降低受体介导的清除。

受体介导的内化作用取决于 IFNG 二聚体与 IFNG 受体复合物的亲和力, 因此预计, 与 IFNG 受体复合物的亲和力降低了的 IFNG 变体被内化并因此被清除的程度减弱。

15 IFNG 二聚体与其受体复合物的亲和力可通过在 IFNG 多肽的受体结合位点进行一或多个修饰(尤其取代)而降低。构成受体结合位点的氨基酸残基见本文实施例 2。有可能实施的一类取代是保守的氨基酸取代。在另一实施方案中, 所述取代导致引入 N-糖基化位点。

故, 在一个特别优选的实施方案中, SEQ ID NO: 1 (或其片段)所示本  
20 发明 IFNG 变体在受体结合位点(如本文所述)包含至少一个修饰, 如取代。更具体地, IFNG 多肽在所述受体结合位点包含至少一个能产生体内 N-糖基化位点的修饰, 如取代。例如, 所述取代选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, Y4N+K6S/T, V5N+E7S/T, E9N+L11S/T, K12N+Y14S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, V22N+D24S/T, D24N+G26S/T,  
25 G26N+L28S/T, L30N+I32S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, K108N+I110S/T, H111N+L113S/T, E112N+I114S/T, I114N+V116S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 或 E119N+S121T, 优选选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, E9N+L11S/T, K12N+Y14S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T,  
30 H111N+L113S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 或 E119N+S121T (将 N-糖基化位点引入包含下述氨基酸残基的位置, 该氨基酸残基有至少

25% 的侧链暴露在表面), 更优选选自 Q1N+P3S/T, D2N+Y4S/T, E9N+L11S/T, G18N, G18N+S20T, H19N+D21S/T, S20N+V22S/T, D21N+A23S/T, K34N+W36S/T, K37N+E39S/T, Q115N+M117S/T, A118N+L120S/T, E119N 或 E119N+S121T (将 N-糖基化位点引入包含下述氨基酸残基的位置, 该氨基酸残基有至少 50% 的侧链暴露在表面), 还更优选选自 Q1N+P3T, D2N+Y4T, E9N+L11T, G18N+S20T, H19N+D21T, S20N+V22T, D21N+A23T, K34N+W36T, K37N+E39T, Q115N+M117T, A118N+L120T 或 E119N+S121T, 最优选选自 G18N+S20T, H19N+D21T, D21N+A23T 或 E119N+S121T, 尤其 D21N+A23T。

10 所述变体被认为与 huIFNG 或 Actimmune® 相比受体亲和力降低。受体亲和力可通过任何合适的试验和本领域已知的试验来测定。适于测定受体结合亲和力的一种试验是 Michiels et al. Int. J. Biochem. Cell Biol. 30: 505-516 (1998) 所述的 BIAcore® 试验。通过利用上述试验, 被认为可用于本发明目的的 IFNG 变体是这样的 IFNG 变体, 其结合亲和力(K<sub>d</sub>)是糖基化  
15 [S99T] huIFNG 或 Actimmune® 的 K<sub>d</sub> 值的 1-95%。例如, IFNG 多肽的 K<sub>d</sub> 值是糖基化[S99T] huIFNG 或 Actimmune® 的 K<sub>d</sub> 值的 1-75% 或 1-50%, 如 1-25%, 例如 1-20% 或甚至低至 1-15%, 1-10% 或 1-5%。

通常, 当在, 例如, 本文所述“初步试验”中检测时, 这种降低了受体亲和力的 IFNG 变体具有减弱的 IFNG 活性。例如, 这种 IFNG 多肽变体  
20 具有 Actimune® 或 rhuIFNG 的比活性的 1-95%, 例如 1-75%, 如 1-50%, 例如 1-20% 或 1-10%。

如上所述, 这样的 IFNG 变体被认为由于受体介导的清除而导致其血清半寿期增加。因此, 本发明这一方面的 IFNG 多肽变体被认为符合前文对增加的血清半寿期的定义中关于增加的血清半寿期的要求。

25 显然, 导致受体结合亲和力的上述任一种修饰可与本文公开的任一种其它修饰组合, 尤其与在下述章节中提到的修饰组合: “具有优化的 N-糖基化位点的本发明 IFNG 变体”, “本发明的 IFNG 变体, 其中的非多肽组分是具有半胱氨酸残基作为连接基团的分子” 以及 “本发明的 IFNG 变体, 其中  
30 第一种非多肽组分是糖组分, 第二种非多肽组分是具有半胱氨酸残基作为连接基团的分子”, 如与 G26A, E38N+S40T 及其组合的组合。

#### 偶联方法

### 非多肽组分

如上所述, 本发明偶联物的非多肽组分优选选自聚合物分子、亲脂性化合物、糖组分(通过体内糖基化的方式)和有机衍生剂。所有这些物质都可为 IFNG 多肽变体提供所需特性, 特别是增加 AUC<sub>sc</sub>, 增加血清半寿期和/或减弱免疫原性。所述多肽变体通常仅与一种类型的非多肽组分偶联, 但也可以与两种或多种不同类型的非多肽组分偶联, 例如, 与聚合物分子和糖组分偶联, 与亲脂性基团和糖组分偶联, 与有机衍生剂和糖组分偶联, 与亲脂性基团和聚合物分子偶联, 等。当与两种不同类型的非多肽组分偶联时, 优选糖组分和聚合物组分。在下列章节“与亲脂化合物的偶联”, “与聚合物分子的偶联”, “与糖组分的偶联”和“与有机衍生剂的偶联”中描述与各种类型非多肽组分的偶联。

#### 与亲脂化合物的偶联

多肽和亲脂化合物可直接或者通过使用接头互相偶联。亲脂化合物可以是天然化合物, 例如饱和或不饱和脂肪酸, 脂肪酸二酮, 萜烯, 前列腺素, 维生素, 类胡萝卜素或类固醇, 或者是合成化合物, 例如具有一个或多个烷基, 芳香基, 链烯基或其他多个不饱和化合物的羧酸, 醇, 胺和磺酸。多肽和亲脂化合物之间任选通过接头的偶联可按照本领域已知的方法进行, 例如, Bodanszky 在肽的合成, John Wiley, 纽约, 1976 和在 WO 96/12505 中所述。

#### 与聚合物分子的偶联

与多肽变体偶联的聚合物分子可以是任意合适的聚合物分子, 例如天然或合成同型聚合物或杂聚物, 一般具有的分子量范围是 300-100,000 Da 或 1000-50,000 Da, 如 2000-40,000 Da 或 2000-30,000 Da, 例如 2000-20,000 Da, 2000-10,000 或 10005000 Da。更优选, 所述聚合物分子, 如 PEG, 尤其 mPEG 通常的分子量约为 2,5,10,12,15,20,30,40 或 50 kDa, 尤其约 5 kDa, 约 10 kDa, 约 12 kDa, 约 15 kDa 或约 20 kDa。

本文中提提到聚合物分子时的“约”是指近似平均分子量, 它反映了在给定的聚合物制剂中通常有一定程度的分子量分布的事实。

均聚物的实例包括聚醇(即, 聚-OH)、聚胺(即, 聚-NH<sub>2</sub>)和聚羧酸(即, 聚-COOH)。杂聚物是含不同偶联基团(如羟基和氨基)的聚合物。

合适的聚合物分子的实例包括选自以下的聚合物分子: 聚环氧烷

(PAO), 包括聚亚烷基二醇(PAG), 如聚乙二醇(PEG)和聚丙二醇(PPG), 分支的 PEG, 聚乙烯醇(PVA), 聚碳酸酯, 聚乙烯吡咯烷酮, 聚乙烯共马来酸酐, 聚苯乙烯共马来酸酐, 葡聚糖包括羧甲基葡聚糖, 或任何其它适于减小免疫原性和/或增加功能性体内半寿期和/或血清半寿期的生物聚合物。聚  
5 合物分子的另一实例是人白蛋白或另一丰富的血浆蛋白。一般来说, 聚亚烷基二醇衍生的聚合物是生物相容的、无毒的、无抗原性的、无免疫原性的, 具有各种水溶性特性并易于从活的生物中分泌。

PEG 是优选的聚合物分子, 因为其与, 例如多糖如葡聚糖相比仅仅具有极少量的能交联的反应基团。特别感兴趣的是单功能 PEG, 如单甲氧基  
10 聚乙二醇(mPEG), 因为它的偶联化学相对简单(仅仅一个反应基团可用于与多糖上的连接基团偶联)。因此, 消除了交联的风险, 所得的偶联型多肽变体均一性更好且聚合物分子与该多肽的反应更易于控制。

为了实现聚合物分子与多肽变体的共价连接, 聚合物分子的羟基末端基团必须以活化形式提供, 即, 具有反应性官能团(该基团的例子包括伯胺  
15 基团, 酰肼(HZ), 巯基, 琥珀酸酯(SUC), 琥珀酰亚胺基琥珀酸酯(SS), 琥珀酰亚胺基琥珀酰胺(SSA), 琥珀酰亚胺基丙酸酯(SPA), 羧甲基化琥珀酰亚胺(SCM), 苯并三唑碳酸酯(BTC), N-羟基琥珀酰亚胺(NHS), 醛, 硝基苯碳酸酯(NPC), 和 tresylate (TRES))。适当活化的聚合物分子是商业上可获得的, 例如从 Shearwater Polymer, Inc., Huntsville, AL, USA 获得。另外, 聚合  
20 物分子可通过本领域已知的常规方法活化, 例如按 WO 90/13540 公开的方法。用于本发明的活化的线性或分支聚合物分子的具体例子在 Shearwater Polymer, Inc. 1997 和 2000 年产品目录 (用于研究和制药的功能化生物相容性聚合物, 聚乙二醇和衍生物, 本文引用以供参考)中描述。活化的 PEG 聚合物的具体例子包括下列线性 PEGs: NHS-PEG (例如 SPA-PEG, SSPA-PEG,  
25 SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, 和 SCM-PEG), 和 NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, IODO-PEG 和 MAL-PEG, 以及分支 PEGs, 例如 PEG2-NHS 和在 US 5, 932, 462 和 US 5, 643, 575 中公开的那些分子, 本文引用这两篇文献以供参考。另外, 本文作为参考文献引用的下列文献公开了  
30 有用的聚合物分子和/或 PEG 连接的化学性质: US 5, 824, 778, US 5, 476, 653, WO 97/32607, EP 229, 108, EP 402, 378, US 4, 902, 502, US 5, 281, 698,

US 5, 122, 614, US 5, 219, 564, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, W095/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, 5 WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439, 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921, 131, US 5, 736, 625, WO 98/05363, EP 809 996, US 5, 629, 384, WO 96/41813, WO 96/07670, US 5, 473, 034, US 5, 516, 673, EP 605 963, US 5, 382, 657, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 和 EP 154 316。

10 特别优选与半胱氨酸残基偶联的活化型 PEG 聚合物分子的具体实例, 包括以下线性 PEG: 乙烯砜-PEG (VS-PEG), 优选乙烯砜-mPEG (VS-mPEG); 马来酰亚胺-PEG (MAL-PEG), 优选马来酰亚胺-mPEG (MAL-mPEG)以及正吡啶基-二硫化物-PEG (OPSS-PEG), 优选正吡啶基-二硫化物-mPEG (OPSS-mPEG)。所述 PEG 或 mPEG 聚合物的大小通常约 5 kDa, 约 10 kD, 15 约 12 kDa 或约 20 kDa。

多肽变体与活化的聚合物分子的偶联可用任何常规方法进行, 例如, 按下列参考文献所述(所述参考文献中也描述了活化聚合物分子的适宜方法)进行: R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N. Y.; S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and 20 Crosslinking", CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson 等, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, N. Y.)。为了使半胱氨酸残基 PEG 化(见上文), 所述 IFNG 通常先用还原剂, 如二硫苏糖醇 (DDT)处理, 然后再进行 PEG 化。还原剂随后通过任何常规方法, 如脱盐法除去。PEG 与半胱氨酸通常在合适的缓冲液中, 在 pH 6-9、4-25℃保持 25 最多 16 小时而发生偶联。

技术人员知道, 将要使用的活化方法和/或偶联化学取决于所述多肽的连接基团(以上已给出实例)以及聚合物的功能基(例如, 是胺、羟基、羧基、醛, sulfydryl, 琥珀酰亚胺, 马来酰亚胺, viny sulfone 或卤代醋酸盐)。PEG 化可涉及与多肽上的所有可利用的连接基团(即, 暴露于多肽表面的连接基 30 团)偶联, 或可与一个或多个特定的连接基团如, N-末端胺基直接偶联(如 US 5,985,265 所述)。而且, 偶联可以在一步中完成或以多步方式来完成(如,

WO 99/55377 所述)。

应理解, PEG 化作用可设计为, 使所得分子在连接的 PEG 分子的数目、这些分子的大小和形式(如, 线性还是分支), 以及多肽分子的连接位点各方面最佳。例如, 可根据需达到的效果来选择所使用的聚合物的分子量。。

- 5 例如, 如果偶联的首要目的是实现具有高分子量的偶联(例如, 以便降低肾脏清除率), 通常需要偶联尽可能少的高分子量的聚合物分子以获得所需分子量。当需要高度屏蔽表位时, 可通过使用足够多数量的低分子量聚合物(例如, 具有大约 5,000 Da 的分子量)以有效屏蔽该多肽的所有或大多数表位来获得。例如, 可使用 2-8 个, 例如 3-6 个该聚合物。

- 10 仅与蛋白质上的单个连接基团偶联时(如 US 5,985,265 中所述), 优选线性或分支的聚合物分子具有高分子量, 例如, 大约 20 kDa。

一般来说, 在能使聚合物的所有可利用的连接基团与聚合物分子反应的条件下进行聚合物偶联。典型的是, 活化型聚合物分子与多肽的摩尔比是 1000-1, 特别是 200-1, 优选 100-1, 例如 10-1 或 5-1 以便获得最佳反应。

- 15 然而, 也可使用等摩尔比率。

根据本发明还包括通过接头偶联聚合物分子与多肽。合适的接头是技术人员熟知的。优选的例子是氰尿酸氯(Abuchowski 等, (1977), 生物学化学杂志, 252, 3578-3581; US 4,179,337; Shafer 等, (1986), 高分子科学和高分子化学杂志, 编辑, 24, 375-378)。

- 20 偶联后, 按照本领域已知的方法, 例如, 通过向反应混合物中加入伯胺以封闭残余的活化型聚合物分子, 并通过合适的方法去除所得的失活型聚合物分子。

#### 与糖组分的偶联

- 糖组分的偶联可在体内或者体外发生。为了实现经过修饰已导入一个或多个体内糖基化位点(见“本发明的偶联物, 其中非多肽组分是糖组分”部分)的具有 IFNG 活性的多肽的体内糖基化, 将编码偶联物的多肽部分的核苷酸序列插入糖基化的真核表达宿主中。表达宿主细胞可选自真菌(丝状真菌或酵母), 昆虫或动物细胞或者选自转基因植物细胞。另外, 当在基因治疗中使用编码本发明的偶联物的多肽部分或本发明的多肽的核苷酸序列
- 30 时可在人体内实现糖基化。在一个实施方案中, 宿主细胞是哺乳动物细胞, 例如 CHO 细胞, BHK 或者 HEK 细胞, 例如 HEK293, 或昆虫细胞, 例如

SF9 细胞,或者酵母细胞,例如啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), *Pichia pastoris* 或者任何其他合适的糖基化宿主,例如,如下所述。任选的是,经过体内糖基化连接到 IFNG 多肽上的糖组分可通过使用糖基转移酶,例如,使用 Neose, Horsham, PA, USA 上市的 glycoAdvance™ 技术进一步修饰。从而可以增加,例如表达后糖基化的 IFNG 多肽的唾液酸化和 CHO 细胞的体内糖基化。

可使用糖苷与 IFNG 多肽的氨基酸残基的共价体外偶联来修饰或增加糖组分的数目或特性。根据使用的偶联方式,糖类可连接到 a)精氨酸和组氨酸上, b)游离羧基上, c)游离巯基,例如半胱氨酸的游离巯基上, d)游离羟基,例如丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸或羟脯氨酸的游离羟基上, e)芳香族残基,例如苯丙氨酸或色氨酸的芳香基上或者 f)谷氨酰胺的酰胺基上。这些氨基酸残基组成糖组分的连接基团的例子,可在本发明的偶联物的 IFNG 多肽中导入和/或去掉该残基。体外偶联的合适方法在例如, WO 87/05330 和 Aplin 等, CRC 生物化学的重点回顾,第 259-306 页,1981 中描述。糖组分或 PEG 与蛋白质和肽结合的 Gln-残基的体外偶联可通过转谷氨酰胺酶(TGases)实现,例如,按 Sato 等,1996,生物化学,35,13072-13080 或在 EP 725145 中所述。

#### 与有机衍生试剂的偶联

IFNG 多肽变体的共价修饰可通过使多肽的连接基团与有机衍生试剂反应来进行。合适的衍生剂和方法在本领域中是已知的。例如,半胱氨酰基残基最常与  $\alpha$ -卤代乙酸酯(和相应的胺),如氯乙酸或氯乙酰胺反应,产生羧甲基或羧基酰胺基甲基衍生物。半胱氨酰基残基也可与以下物质反应而衍生:溴三氟丙酮、 $\alpha$ -溴- $\beta$ -(4-咪唑基)丙酸、氯乙酰基磷酸酯、N-烷基马来酰亚胺、3-硝基-2-吡啶二硫化物、甲基 2-吡啶二硫化物、对氯汞基苯甲酸盐、2-氯汞基-4-硝基酚或氯-7-硝基苯并-2-噁-1,3-二唑。组氨酰基残基通过与二乙基焦碳酸酯在 pH5.5-7.0 反应进行衍生,因为该试剂相对特异于组氨酰基侧链。对溴苯甲酰甲基溴化物也有效;该反应优选在 pH6.0 的 0.1M 卡可酸钠中反应。赖氨酰基和氨基末端残基可与琥珀酸酐或其它羧酸酐反应。用这些试剂进行衍生具有使赖氨酰基残基的电荷逆转的作用。适于使含  $\alpha$ -氨基的残基衍生的其它试剂包括亚氨基酯如甲基吡啶亚酰胺(methyl picolinimide)、磷酸吡多醛、吡多醛、氯代氢硼化物、三硝基苯磺酸、邻

甲基异脲、2,4-戊二酮和转氨酶催化的与乙醛酸盐的反应。精氨酸残基通过与一种或多种常规试剂的反应来修饰,所述试剂包括苯基乙二醛、2,3-丁二酮、1,2-环己二酮和茚三酮。精氨酸残基的衍生要求反应在碱性条件下进行,因为脲功能基的 pKa 较高。此外,这些试剂可与赖氨酸以及精氨酸脲基反应。羧基侧基(天冬氨酸酯基或谷氨酸酯基)通过与碳二亚胺(R-N=C=N-R')反应来进行选择性修饰,其中 R 和 R'是不同的烷基,如 1-环己基-3-(2-吗啉基-4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮杂-4,4-二甲基戊基)碳二亚胺。而且,天冬氨酸酯基和谷氨酸酯基通过与铵离子反应转化为天冬酰胺基(asparaginyl)和谷氨酰胺基(glutaminyl)。

#### 10 功能性位点的封闭

已有报道:过多的聚合物偶联可导致与聚合物偶联的多肽丧失活性。该问题可通过例如,去掉位于功能性位点的连接基团或者通过在偶联前封闭功能性位点而消除。在后的策略组成本发明的其他实施方案,第一种策略在上文举例说明,例如方法是去掉靠近功能性位点的赖氨酸残基和/或在

15 不干扰功能性位点的位置引入半胱氨酸残基和/或体内糖基化位点。

更具体的说,根据第二种策略,多肽变体和非多肽组分之间的偶联在能与 IFNG 多肽变体的功能性位点结合的辅助分子封闭该多肽变体的功能性位点的条件下进行。优选的,辅助分子是特异性识别多肽变体的功能性位点的分子,例如受体。或者,辅助分子可以是抗体,特别是识别该多肽变体的单克隆抗体。具体地说,辅助分子可以是具有中和作用的单克隆抗体。

20

然后,在实现偶联前使多肽变体与辅助分子相互作用。这样保证多肽变体的功能性位点被屏蔽或保护且随后不能被诸如聚合物等非多肽组分衍生化。其从辅助分子洗脱后,可回收非多肽组分和多肽变体之间的偶联物,

25 其至少具有部分地保守的功能性位点。

随后,具有已封闭的功能性位点的多肽与聚合物,亲脂化合物,糖组分,有机衍生试剂或任意其他化合物以正常方式偶联,例如,按标题为“与....偶联”的上述部分所述进行。

在另一实施方案中,辅助分子首先共价偶联到诸如柱填充材料,例如交联葡聚糖或琼脂糖珠的固相上,或者表面上,例如反应器表面。随后,将多肽上样到携带辅助分子的柱材料上且按照本领域已知的方法进行偶

30

联,例如,按标题为“与...偶联”的上述部分所述进行。该方法允许通过洗脱从辅助分子分离多肽偶联物。在不导致多肽偶联物大量降解的物理化学条件下以常规技术洗脱该多肽偶联物。含有多肽偶联物的液相从辅助分子保持共价连接在其上的固相上分离。分离可用其他方式实现:例如,用可被特异性结合剂(例如链霉抗生物素蛋白)识别的第二分子(例如生物素)衍生生化辅助分子。特异性结合剂可连接到固相上,从而允许通过在随后洗脱时滞留辅助分子-第二分子复合物而不是多肽偶联物的第二辅助分子固相柱中过柱从辅助分子-第二分子复合物中分离多肽偶联物。可用任何合适的方式从辅助分子释放多肽偶联物。通过提供辅助分子从其结合的 IFNG 功能性位点解离的条件实现去保护。例如,偶联聚合物的抗体与抗独特型抗体之间的复合物可通过将 pH 调到酸性或碱性 pH 来解离。

#### 经标记的多肽变体的偶联

在另一实施方案中,IFNG 多肽变体可以表达为与标记物的融合蛋白,即通常由 1-30,如 1-20 个氨基酸残基构成的氨基酸序列或肽段。除了能快速和容易地进行纯化,标记物是完成标记多肽和非多肽组分之间偶联的便利工具。特别是,标记物可用于在微滴定板或其它载体如顺磁珠上完成偶联,这样标记的多肽可通过标记物来固定。在,例如,微滴定板上与标记的多肽偶联的优点是,标记的多肽可从培养肉汤直接固定到微滴定板上(原则上不经任何纯化)并进行偶联。因此,可减少操作步骤(从表达到偶联)的总数。而且,标记物可起间隔臂分子的作用以确保使固定的多肽更易于偶联。使用标记多肽进行的偶联可以是与本文中公开的任何非多肽组分的偶联,如与聚合物分子如 PEG 的偶联。

使用何种具体标记物不是关键,只要该标记物能与多肽一起表达并且能固定在适宜的表面或载体物质上即可。许多适宜的标记物可通过商业渠道获得,例如,可购于 Unizyme Laboratories, 丹麦。例如,所述标记物可以是下列任一序列:

His-His-His-His-His-His (SEQ ID NO:35)

Met-Lys-His-His-His-His-His (SEQ ID NO:36)

Met-Lys-His-His-Ala-His-His-Gln-His-His (SEQ ID NO:37)

Met-Lys-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln-His-Gln (SEQ ID NO:38)

(都可从丹麦, Unizyme 实验室获得)或下列任一序列:

EQKLI SEEDL(SEQ ID NO:39) (描述于 Mol. Cell. Biol. 5:3610-16, 1985 的 C-端标记物)

DYKDDDDK(SEQ ID NO:40) (C-或 N-端标记物)

5 YPYDVDPDYA(SEQ ID NO:41)

抗上述标记物的抗体通常可通过商业渠道获得, 例如购于 ADI, Aves Lab 和 Research Diagnostics。

随后可用市售酶从多肽上将标记物切离。

#### 制备本发明 IFNG 多肽变体的方法

10 以本领域已知的任何合适的方法可生产 IFNG 多肽变体, 任选以糖基化形式生产。该方法包括构建编码该多肽的核苷酸序列并在合适的转化或转染的宿主细胞中表达该序列。然而, 尽管效率不高, 经过化学合成或化学合成的组合或者化学合成与重组 DNA 技术的组合也可生产本发明的多肽。

编码 IFNG 多肽变体(单体或单链形式)的本发明的核苷酸序列可如下构建: 分离或合成编码亲本 IFNG(例如具有氨基酸序列 SEQ ID NO 17 或其片段的 huIFNG)的核苷酸序列, 然后改变核苷酸序列以实现相关氨基酸残基的引入(即插入或取代)或缺失(即去掉或取代)。

按照熟知的方法, 参见例如, Mark 等, “人成纤维细胞干扰素基因的定点诱变”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 第 5662-66 页 (1984); 和 US 20 4,588,585 的方法经过定点诱变可常规修饰核苷酸序列。

或者, 经过化学合成可制备核苷酸序列, 例如, 经过使用寡核苷酸合成仪, 其中根据目的多肽的氨基酸序列设计寡核苷酸, 且优选选择那些在生产该重组多肽的宿主细胞中有利的密码子。例如, 经过 PCR, 连接或者连接链反应(LCR)可合成和组装编码目的多肽之部分的一些小寡核苷酸。单个寡核苷酸一般含有用于互补组装的 5'或 3'突出端。

一旦组装(经过合成, 定点诱变或另一方法), 编码多肽的核苷酸序列可插入重组载体且与在所需转化宿主细胞中表达 IFNG 所必需的调控序列可操作地连接。

当然应明白为了表达编码本文所述的 IFNG 多肽变体的核苷酸序列, 并不是所有的载体和表达调控序列都能同样较好地发挥功能。也不是所有的宿主用同一表达系统都能同样较好地发挥功能。然而, 本领域的技术人员

在这些载体，表达调控序列和宿主中不需过多的实验就可作出选择。例如，在选择载体时，必须考虑到宿主，因为载体必须在宿主中复制或者能整合进染色体中。还应考虑载体的拷贝数，控制该拷贝数的能力，和由该载体编码的任何其他蛋白质，例如抗生素标记的表达。在表达调控序列的选择中，也应考虑各种因素。这些包括，例如，序列的相对长度，其调控能力，其与编码多肽的核苷酸序列的相容性，特别是要考虑到潜在的二级结构。宿主的选择应考虑到其与选定载体的相容性，该核苷酸序列编码的产物的毒性，其分泌特征，其正确折叠多肽的能力，其发酵或培养要求，和该核苷酸序列编码的产物的纯化简便性。

- 5 重组载体可以是自主复制载体，即作为染色体外实体存在的载体，其复制独立于染色体的复制，例如质粒。作为选择，载体是引入宿主细胞时整合进宿主细胞基因组且与其整合进的染色体一起复制的载体。

- 该载体优选是一种表达载体，其中编码 IFNG 多肽变体的核苷酸序列可操作地连接到该核苷酸序列转录所需的其他片段上。该载体一般从质粒或病毒 DNA 衍生。本文提及的用于在宿主细胞中表达的许多合适的表达载体是商业上可获得的或在文献中描述的。用于真核宿主的有用的表达载体包括，例如，含有来自 SV40，牛乳头瘤病毒，腺病毒和巨细胞病毒的表达调控序列的载体。具体载体是，例如， pCDNA3.1(+)\Hyg (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)和 pCI-neo (Stratagene, La Jolla, CA, USA)。用于细菌宿主的有用表达载体包括已知的细菌质粒，例如来自大肠杆菌的质粒，包括 pBR322, pET3a 和 pET12a (两者都来自 Novagen Inc., WI, USA)，广谱宿主范围的质粒，例如 RP4，噬菌体 DNAs，例如， $\lambda$ 噬菌体的众多衍生物，如 NM989，和其他 DNA 噬菌体，如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体。酵母细胞的有用的表达载体包括 2 $\mu$ 质粒及其衍生物，POT1 载体(US4, 931, 373)，在(Okkels, 纽约科学院年报, 782, 202-207, 1996)中所述的 pJSO37 载体和 pPICZ A, B 或 C (Invitrogen)。用于昆虫细胞的有用的载体包括 pVL941, pBG311(Cate 等, “牛和人 Mullerian 抑制物质基因的分离和在动物细胞中表达人基因”, 细胞, 45, 第 685-98 页(1986), pBluebac 4.5 和 pMelbac (两者都可从 Invitrogen 获得)。

- 25 用于本发明的其他载体包括允许编码 IFNG 多肽变体的核苷酸序列以拷贝数扩增的那些载体。这些可扩增的载体是本领域熟知的。它们包括，例如，能经过 DHFR 扩增(参见，例如 Kaufman, 美国专利号 4, 470, 461,

Kaufman 和 Sharp, “模块二氢叶酸还原酶 cDNA 基因的构建: 用于有效表达的信号分析”, 分子细胞生物学, 2, 第 1304-19 页(1982))和谷氨酰胺合成酶(“GS”)扩增(参见, 例如, US 5, 122, 464 和 EP 338, 841)被扩增的载体。

重组载体可进一步包含能使载体在所述宿主细胞中复制的 DNA 序列。

- 5 该序列的一个例子(当宿主细胞是哺乳动物细胞时)是 SV40 的复制起点。当宿主细胞是酵母细胞时, 能使载体复制的合适序列是酵母质粒 2 $\mu$ 复制基因 REP 1-3 和复制起点。

- 载体也可包含选择标记, 例如其产物补充宿主细胞缺陷的基因, 例如编码二氢叶酸还原酶(DHFR)的基因或粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的 TPI 基因(P. R. Russell, 基因, 40, 1985, 第 125-130 页所述), 或者, 提供对药物, 例如氨基青霉素, 卡那霉素, 四环素, 氯霉素, 新霉素, 潮霉素, 或氨基蝶呤抗性的基因。对于丝状真菌, 选择标记包括 amdS, pyrG, arcB, niaD, sC。
- 10

- 本文定义的术语“调控序列”包括表达 IFNG 多肽变体必须的或者有利的  
15 的所有元件。各调控序列可以是天然的或者相对于编码该多肽的核酸序列是外源的。该调控序列包括, 但不限于前导序列, 多聚腺苷化序列, 前肽序列, 启动子, 增强子或上游活化序列, 信号肽序列, 和转录终止子。最少, 调控序列包括启动子。

- 本发明可使用各种各样的表达调控序列。这种有用的表达调控序列包  
20 括与上述表达载体的结构基因相联系的表达调控序列以及已知控制原核或真核细胞或其病毒基因表达的任意序列, 及其各种组合。

- 用于指导哺乳动物细胞中的转录的合适的调控序列的例子包括 SV40 和腺病毒的早期和晚期启动子, 例如, 腺病毒 2 主要晚期启动子, MT-1 (金属硫蛋白基因)启动子, 人巨细胞病毒立即早期基因启动子(CMV), 人延伸  
25 因子 1 $\alpha$ (EF-1 $\alpha$ )启动子, 果蝇属最小型热休克蛋白 70 启动子, 劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子, 人遍在蛋白质 C(UbC)启动子, 人生长激素终止子, SV40 或腺病毒 Elb 区域多聚腺苷化信号和 Kozak 共有序列(Kozak, M., 分子生物学杂志, 1987 年 8 月 20 日; 196 (4): 947-50)。

- 为了提高在哺乳动物细胞中的表达, 可将合成的内含子插入编码 IFNG  
30 多肽变体的核苷酸序列的 5' 非翻译区。合成内含子的例子是来自质粒 pCI-Neo (可从 Promega Corporation, WI, USA 获得)的合成内含子。

用于指导在昆虫细胞中转录的合适的调控序列的例子包括多角体蛋白启动子, P10 启动子, 苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)多角体病毒碱性蛋白启动子, 杆状病毒立即早期基因 1 启动子和杆状病毒 39K 延迟-早期基因启动子, 和 SV40 多聚腺苷化序列。

- 5       用于酵母宿主细胞的合适调控序列的例子包括酵母 $\alpha$ -交配系统的启动子, 酵母丙糖磷酸异构酶(TPI)启动子, 来自酵母糖酵解基因或乙醇脱氢酶基因的启动子, ADH2-4c 启动子和诱导型 GAL 启动子。

- 10       用于丝状真菌宿主细胞的合适的调控序列的例子包括 ADH3 启动子和终止子, 来自编码米曲霉(*Aspergillus oryzae*) TAKA 淀粉酶丙糖磷酸异构酶或碱性蛋白酶, 黑色曲霉(*A. niger*) $\alpha$ -淀粉酶, 黑色曲霉或构巢曲霉(*A. nidulans*)葡糖淀粉酶, 构巢曲霉乙酰胺酶, 米赫根毛霉(*Rhizomucor miehei*)天冬氨酸蛋白酶或脂酶基因的启动子, TPI1 终止子和 ADH3 终止子。

用于细菌宿主细胞的合适的调控序列的例子包括 *lac* 系统, *trp* 系统, *TAC* 或 *TRC* 系统的启动子,  $\lambda$ 噬菌体的主要启动子区域。

- 15       本发明的核苷酸序列, 不论是以定点诱变, 合成还是以其它方法制备, 都可以包含或者不含编码信号肽的核苷酸序列。当多肽需要从表达它的细胞中分泌时存在信号肽。如果存在的话, 该信号肽应是可被选择表达该多肽的细胞识别的信号肽。信号肽可以是与该多肽同源的(例如一般与 huIFNG 相联)或异源的(即来自不同于 huIFNG 的另一来源)或者可以与宿主细胞是  
20       同源的或异源的, 即从该宿主细胞正常表达的信号肽或一般不从该宿主细胞表达的信号肽。因此, 信号肽可以是原核的, 例如来自诸如大肠杆菌的细菌, 或者可以是真核的, 例如来自哺乳动物, 或昆虫或酵母细胞。

- 25       信号肽是否存在依赖于, 例如用于生产该多肽的表达宿主细胞, 所要表达的蛋白质(是细胞内还是细胞外蛋白)和是否需要获得分泌。为了用于丝状真菌, 信号肽可方便地来自于编码曲霉属种类淀粉酶或葡糖淀粉酶的基因, 编码米赫根毛霉脂酶或蛋白酶或者 *Humicola lanuginosa* 脂酶的基因。信号肽优选来自编码米曲霉 TAKA 淀粉酶, 黑色曲霉中性 $\alpha$ -淀粉酶, 黑色曲霉酸稳定淀粉酶, 或者黑色曲霉葡糖淀粉酶的基因。为了用于昆虫细胞, 信号肽可方便地来自于昆虫基因(参见 WO 90/05783), 例如鳞翅目昆虫的烟草天蛾(*Manduca sexta*) 脂动激素前体(参见 US 5,023,328), 蜜蜂的蜂毒肽  
30       (Invitrogen), 蛻皮甾类 UDP 葡萄糖基转移酶(egt) (Murphy 等, 蛋白质表达

和纯化, 4, 349-357 (1993))或人胰腺脂酶(hpl) (酶学方法, 284, 第 262-272 页, 1997)。

用于哺乳动物细胞的优选信号肽是 huIFNG 的信号肽或鼠 Ig  $\kappa$  轻链信号肽(Coloma, M (1992), 免疫学方法杂志, 152: 89-104)。为了用于酵母细胞, 5 已发现合适的信号肽是来自啤酒糖酵母 $\alpha$ -因子的信号肽(参见 US 4, 870, 008), 小鼠唾液淀粉酶的信号肽(参见 O.Hagenbuchle 等, 自然, 289, 1981, 第 643-646 页), 修饰的羧肽酶信号肽(参见 L. A. Valls 等, 细胞, 48, 1987, 第 887-897 页), 酵母 BAR1 信号肽(参见 WO 87/02670), 和酵母天冬氨酸蛋白酶 3 (YAP3)信号肽(参见 M. Egel-Mitani 等, 酵母 6, 1990, 第 127-137 页)。

10 可以使用任何合适的宿主产生本发明的多肽或本发明偶联物的多肽部分, 包括细菌、真菌(包括酵母)、植物、昆虫、哺乳动物或其它合适的动物细胞或细胞系、以及转基因动物或植物。细菌宿主细胞的实例包括革兰氏阳性细菌如芽孢杆菌属, 如短芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌、假单胞菌属或链霉菌属, 或革兰氏阴性细菌, 如大肠杆菌菌株。将载体引入细菌宿主细胞 15 可通过, 例如, 原生质体转化(参见如 Chang 和 Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168:111-115)、使用感受态细胞(参见如 Young 和 Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81:823-829, 或 Dubnau 和 Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56:209-221)、电穿孔(参见如 Shigekawa 和 Dower, 1988, Biotechniques 6:742-751)、或偶联(参见如 Koehler 和 Thorne, 1987, 20 Journal of Bacteriology 169:5771-5278)来进行。

合适的丝状真菌宿主细胞的实例包括曲霉属菌株, 如米曲霉、黑曲霉或构巢曲霉, 镰刀菌属或木霉菌属。真菌细胞可以通过涉及以下的过程转化: 原生质体形成、原生质体转化和细胞壁通过本身已知的方式再生。在 EP238023 和 US5679543 中描述了转化曲霉属宿主细胞的合适方法。在 25 Malardier 等人 1989, Gene 78:147-156 和 WO96/00787 中描述了转化镰刀菌属的合适方法。合适的酵母宿主细胞的实例包括糖酵母属的菌株(如酿酒酵母)、裂殖酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属(如巴斯德毕赤酵母或 *P. Methanolica*)、汉逊酵母属(如多形汉逊酵母)、或 *Yarrowia*。酵母可使用 Becker 和 Guarente, In Abelson, J. N.和 Simon, M. I., editors, Guide to Yeast Genetics 30 和 Molecular Biology, Methods in Enzymology Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito 等人, 1983, Journal of Bacteriology

153:163; 和 Hinnen 等人 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1920; 以及由 Clontech Laboratories, Inc, Palo Alto, CA, USA (Yeastmaker<sup>TM</sup> 酵母转化系统试剂盒的产品手册)中所述的方法来转化。

5 适的酵母宿主细胞的实例包括糖酵母属的菌株(如酿酒酵母)、裂殖酵母属、克鲁维酵母属、毕赤酵母属(如巴斯德毕赤酵母或 *P. Methanolica*)、汉逊酵母属(如多形汉逊酵母)、或 *Yarrowia*。用异源性 DNA 转化酵母细胞并从中生产异源性多肽的方法由 Clontech 实验室公司, Palo Alto, CA, USA (在 Yeastmaker<sup>TM</sup> 酵母转化系统试剂盒的产品说明中), 和由 Reeves 等, FEMS Microbiology Letters, 99, (1992) 193-198, Manivasakam 和 Schiestl, Nucleic  
10 Acids Research, 1993, Vol.21, No. 18, 第 4414-4415 页和 Ganeva 等, FEMS Microbiology Letters 121 (1994) 159-164 公开。

合适的昆虫宿主细胞的例子包括鳞翅目细胞系, 例如草地贪夜蛾(Sf9 或 Sf21)或粉纹夜蛾细胞(High Five) (US 5, 077, 214)。昆虫细胞的转化和异源性多肽在其中的生产可按 Invitrogen 所述进行。

15 合适的哺乳动物宿主细胞的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系, (例如 CHO-K1 ; ATCC CCL-61), 绿猴细胞系(COS) (例如 COS 1 (ATCC CRL-1650), COS 7 (ATCC CRL-1651)); 小鼠细胞 (例如 NS/O), 幼小仓鼠肾(BHK)细胞系(例如 ATCC CRL-1632 或 ATCC CCL-10), 和人细胞(例如, HEK 293 (ATCC CRL-1573)), 以及组织培养物中的植物细胞。其它合适的  
20 细胞系是本领域已知的且可从公共保藏单位获得, 例如美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland。另外, 可修饰诸如 CHO 细胞的哺乳动物细胞以表达唾液酸转移酶, 例如, 1, 6-唾液酸转移酶, 例如, 按 US 5, 047, 335 所述, 以便提高 IFNG 多肽变体的糖基化。

将外源 DNA 引入哺乳动物宿主细胞的方法包括磷酸钙介导的转染、电  
25 穿孔、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、病毒载体和由 Life Technologies Ltd, Paisley, UK 所述的使用 Lipofectamin2000 进行的转染方法。这些方法在本领域中是已知的, 例如在 Ausbel 等人(eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA 中所述。哺乳动物细胞的培养按建立的方法进行, 例如参见 Animal Cell Biotechnology,  
30 Methods 和 Protocols, Nigel Jenkins 编, 1999, Human Press Inc, Totowa, New Jersey, USA 和 Harrison MA 和 Rae IF, General Techniques of Cell Culture,

Cambridge University Press 1997.

为了产生糖基化多肽, 优选使用真核宿主细胞, 例如上述类型的真核宿主细胞。

在本发明的生产方法中, 用本领域已知的方法在适于生产多肽变体的营养培养基中培养细胞。例如, 细胞可以在实验室中通过摇瓶培养、小规模或大规模发酵(包括连续、成批、补料分批或固态发酵)或在合适培养基和允许表达和/或分离所述多肽变体的条件下进行工业发酵。培养在含有碳源和氮源和无机盐的合适营养培养基中使用本领域已知的方法来进行。合适的培养基可商购或可以按公开的组成来制备(例如, 在美国典型培养物保藏中心的目录中所述的)。如果多肽变体分泌在营养培养基中, 该多肽变体可从培养基中直接回收。如果多肽变体不被分泌, 可从细胞裂解物中回收。

可通过本领域已知的方法来回收所得多肽变体。例如, 可通过常规方法, 包括但不限于离心、过滤、超滤、提取或沉淀, 从营养培养基中回收多肽变体。

所述多肽变体可以用本领域已知的各种方法, 包括但不限于, 色谱法(例如, 离子交换, 亲和, 疏水, 色谱聚焦, 和大小排阻), 电泳方法(例如, 制备型等电聚焦), 不同溶解性(例如, 硫酸铵沉淀), SDS-PAGE, 或提取(参见, 例如, *Protein Purification*, J.-C. Janson 和 Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989)来纯化。表现出 IFNG 活性的多肽的具体纯化方法在 EP 110044 和未审日本专利申请 186995/84 中公开。

IFNG 多肽变体的生物学活性可用本领域已知的任何合适的方法测定。该测定法包括对抗病毒活性的抗体中和, 对蛋白激酶, 寡聚腺苷酸 2, 5-A 合成酶或磷酸二酯酶活性的诱导, 如 EP 41313 B 1 所述。该测定法还包括免疫调制测定法(参见, 例如, US4, 753, 795), 生长抑制测定法, 和测量与表达干扰素受体的细胞的结合。具体测定法在本文材料和方法部分描述。

#### 药物组合物及其用途

本发明还涉及治疗或预防疾病, 尤其炎症性疾病的改进方法, 所述疾病, 例如间质性肺疾病, 如自发性肺纤维化; 也包括肉芽肿疾病; 癌症, 尤其卵巢癌; 感染, 如肺非典型分枝杆菌感染; 骨疾病(例如, 骨代谢病, 如恶性骨硬化病); 自身免疫病, 如类风湿性关节炎; 以及其它疾病, 如多重耐药性结核; 隐球菌性脑膜炎; 囊性纤维化和肝纤维化, 尤其继发于丙

型肝炎的肝纤维化，所述方法包括对有相应需要的哺乳动物，尤其人类，施用有效量的本发明多肽变体或本发明组合物；最主要的优势是以较小频率的低侵入性用药实现更加有效的治疗，而且还可能降低与治疗性活性化合物发生免疫反应的危险。

- 5        本发明的分子优选在包含可药用载体或赋形剂的组合物中用药。在上下文中，“可药用”意指在给药的患者中不引起任何不想要或有害的作用的载体或赋形剂。这类可药用载体和赋形剂在本领域中是已知的(参见，如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company [1990]; Pharmaceutical Formulation Development of Peptides 和 Proteins, S. Frokjaer 和 L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis [2000]; 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd edition, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press [2000])。

- 15        本发明的分子可“以其原本的形式”和/或以其盐的形式使用。合适的盐包括但不限于，与碱金属或碱土金属，例如钠，钾，钙和镁的盐以及例如锌形成的盐。这些盐或复合物可以以结晶和/或无定形的结构存在。。

- 20        本发明的偶联物以大约相似于在用诸如 Actimmune®等已知的 IFNG 商业制剂实施的疗法中所用的剂量或者按 EP 795332 中限定的剂量用药。用药的精确剂量依赖于具体情况。一般来说，该剂量应能够防止或减轻所要治疗的症状或适应征的严重性或传播。对本领域的技术人员而言显而易见的是本发明的偶联物或组合物的有效量依赖于，特别是疾病，剂量，用药计划，多肽或偶联物或组合物是单独还是与其它治疗剂结合用药，组合物的血清半寿期，和病人的总体健康状态。

本发明还涉及本发明 IFNG 多肽变体，或本发明药物组合物，作为药物的用途。

- 25        本发明还涉及，i)本发明 IFNG 多肽变体或 ii)本发明药物组合物，在制备药物，药物组合物或组配药盒的用途，所述药物，药物组合物或组配药盒用于治疗间质性肺疾病，尤其自发性肺纤维化；癌症，尤其卵巢癌；感染，如肺非典型分枝杆菌感染；骨疾病(例如，骨代谢病，如恶性骨硬化病)；肉芽肿疾病；自身免疫病，如类风湿性关节炎；多重耐药性结核；隐球菌性脑膜炎；囊性纤维化和肝纤维化，尤其继发于丙型肝炎的肝纤维化。最优选所述疾病是间质性肺疾病，尤其自发性肺纤维化。
- 30

本发明还公开了运送所述分子或制剂(任选还含有糖皮质激素)的改进方法(means)。

优选的剂量是每千克病人体重每剂量的多肽成分为 1-4 微克, 更优选 2-3 微克。优选的剂量是每千克病人体重每剂量 100-350 微克, 更优选 5 100-150 微克糖皮质激素。

本发明还涉及适用于治疗间质性肺疾病的组配药盒, 它包括含有上述活性成分 i)或 ii)的第一药物组合物和含有至少一种糖皮质激素的第二药物组合物, 每种组合物任选与可药用载体和/或赋形剂一起。

本发明的变体可用熟知的方法配制成药物组合物。合适的配制剂由 E. 10 W. Martin 的 Remington's Pharmaceutical Sciences 和 US 5, 183, 746 描述。

药物组合物可配制成各种形式, 包括液体, 胶体, 冻干品, 粉末, 压缩固体, 或任何其它合适形式。优选的形式依赖于所治疗的具体适应征且对本领域的技术人员而言是显而易见的。

药物组合物可通过口服, 皮下, 静脉内, 大脑内, 鼻内, 经皮肤, 腹 15 膜内, 肌肉内, 肺内, 阴道内, 直肠, 眼内或任何其它可接受的方式, 例如使用 PowderJect 或 ProLease 技术来施用。尽管使用本领域熟知的技术, 例如泵或植入进行大丸药注射是可接受的, 但该配制剂可通过输注连续用药。在某些情况下配制剂可作为溶液或喷雾剂直接应用。优选的用药方式依赖于所治疗的具体适应征且对本领域的技术人员而言是显而易见的。

20 可结合其它治疗剂施用本发明的药物组合物。这些试剂可作为同一药物组合物的部分掺入或者可同时或按照任何其它可接受的治疗程序与本发明的多肽或偶联物分开用药。另外, 本发明的多肽变体或药物组合物可作为其它治疗的辅助手段。特别是 EP 795332 所述与糖皮质激素的组合。

在另一方面, 本发明涉及治疗具有抗 huIFNG 或 rhuIFNG 的循环抗体 25 的哺乳动物的方法, 该方法包括施用具有 IFNG 生物活性且不与所述抗体反应的化合物。该化合物优选是本文所述的偶联物且哺乳动物优选是人类。所要治疗的哺乳动物可患有 IFNG 用作治疗剂的任何上述疾病。另外, 本发明涉及制备用于治疗具有抗 huIFNG 或 rhuIFNG 循环抗体的哺乳动物的药物产品的方法, 其中具有 IFNG 生物活性且不与其反应的化合物配制成可注射的或其它合适的配制剂。术语“循环抗体”是指在哺乳动物中相应于用 30 任何商业上可获得的 IFNG 制剂进行治疗而形成的自体抗体。

本发明还涉及编码本发明 IFNG 多肽变体的核苷酸序列在基因治疗应用中的用途。具体地说,令人感兴趣的是使用编码上文标题为“非多肽组分是糖组分时的本发明 IFNG 变体”一节所述的 IFNG 多肽变体的核苷酸序列。多肽变体的糖基化因此在基因治疗的过程中,即在人体中表达该核苷酸序列后实现。

涉及的基因治疗应用包括治疗预期该多肽可提供有效治疗的那些疾病。

使用基因疗法的 IFNG 变体的局部递送可针对目标区域提供治疗剂,从而避免与非特异性用药有关的潜在毒性问题。

10 体外和体内基因治疗方法都是所涉及的。

向确定的细胞群体转移潜在的治疗性基因的一些方法是已知的。对于进一步的参考文献,可参见例如, Mulligan, “The Basic Science Of Gene Therapy”, Science, 260, 第 926-31 页(1993)。这些方法包括:

直接基因转移,例如按 Wolff 等, “Direct Gene transfer Into Mouse Muscle In vivo”, Science 247, 第 1465-68 页(1990)所述;

脂质体介导的 DNA 转移,例如按 Caplen 等, “Liposome-mediated CFTR Gene Transfer to the Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis”, Nature Med., 3, 第 39-46 页(1995); Crystal, “The Gene As A Drug”, Nature Med., 1, 第 15-17 (1995); Gao 和 Huang, “A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection of Mammalian Cells”, Biochem. Biophys Res. Comm., 179, 第 280-85 页(1991)所述;

逆转录病毒介导的 DNA 转移,例如按 Kay 等, “In vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs”, Science, 262, 第 117-19 页(1993); Anderson, “Human Gene Therapy”, Science, 256, 第 808-13 页 (1992)所述;

DNA 病毒介导的 DNA 转移。这种 DNA 病毒包括腺病毒 (优选基于 Ad-2 或 Ad-5 的载体), 疱疹病毒(优选基于单纯疱疹病毒的载体), 和细小病毒属(优选基于“缺陷型”或非自主型细小病毒的载体, 更优选基于腺伴随病毒的载体, 最优选基于 AAV-2 的载体)。参见例如, Ali 等, “The Use Of DNA Viruses as Vectors for Gene Therapy”, Gene Therapy, 1, 第 367-84 页(1994); US 4, 797, 368, 和 US 5, 139, 941。

### 非胃肠道给药剂(Parentals)

药物组合物的实例是设计成非胃肠道给药的溶液。尽管在很多情况下，药物溶液配制剂可以以适用于立即使用的液体形式提供，但所述非胃肠道配制剂也可以以冷冻或冻干形式提供。在前者情况下，所述组合物在使用前必须解冻。后一剂型通常用于增强组合物中所包含的活性组分在各种贮存条件下的稳定性，正如本领域技术人员已知的那样，冻干制剂通常比其液体相应物更稳定。所述冻干制剂在使用前通过加入一种或多种适宜的可药用稀释剂如无菌注射用水或无菌生理盐水溶液重新配制。

在非胃肠道给药的情况下，它们被制成冻干的配制剂或水溶液的形式，方法是根据需要，将具有所需纯度的多肽与一种或多种本领域常用的可药用载体、赋形剂或稳定剂(统称为“赋形剂”)适当混合，赋形剂如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子表面活性剂、抗氧化剂和/或其它各种添加剂。

缓冲剂有助于将 pH 维持在接近生理条件的范围内。它们通常以大约 2mM-50mM 的浓度范围存在。本发明使用的合适缓冲剂包括有机和无机酸及其盐如柠檬酸盐缓冲剂(如，柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物、柠檬酸-柠檬酸三钠混合物、柠檬酸-柠檬酸一钠混合物等)、琥珀酸盐缓冲剂(如，琥珀酸-琥珀酸一钠混合物、琥珀酸-氢氧化钠混合物、琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等)、酒石酸盐缓冲剂(如，酒石酸-酒石酸钠混合物、酒石酸-酒石酸钾混合物、酒石酸-氢氧化钠混合物等)、富马酸盐缓冲剂(如，富马酸-富马酸一钠混合物、富马酸-富马酸二钠混合物、富马酸一钠-富马酸二钠混合物等)、葡萄糖酸盐(gluconate)缓冲剂(如，葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物、葡萄糖酸-氢氧化钠混合物、葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等)、草酸盐缓冲剂(如，草酸-草酸钠混合物、草酸-氢氧化钠混合物、草酸-草酸钾混合物等)、乳酸盐缓冲剂(如，乳酸-乳酸钠混合物、乳酸-氢氧化钠混合物、乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸盐缓冲剂(如，乙酸-乙酸钠混合物、乙酸-氢氧化钠混合物等)。其它可能的缓冲剂是磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐如 Tris。

可以加入防腐剂来阻滞微生物生长，加入的量通常约为 0.2 %-1 % (w/v)。本发明使用的合适防腐剂包括酚、苯甲醇、间甲酚、羟苯甲酸(paraben)甲酯、羟苯甲酸丙酯、十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、苯亚甲基 镱 卤化物(如苯亚甲基 镱 氯化物、溴化物或碘化物)、氯化己烷双胺、羟苯甲酸烷基

酯如甲酯或丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇和 3-戊醇。

可以加入等渗剂来确保液体组合物的等渗性，等渗剂包括多羟糖醇，优选三羟或更高级糖醇，如甘油、赤藓醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露糖醇。多羟基醇的量可为 0.1 %-25 % 重量比，通常为 1 %-5 %，以  
5 相对其它组分的量计算。

稳定剂涉及一大类赋形剂，其功能范围从膨胀剂到溶解治疗剂的或有助于防止变性或与容器壁粘附的添加剂。通常的稳定剂可以是多羟糖醇(上文列举的)；氨基酸如精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、丙氨酸、omithine、L-亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸、苏氨酸等，有机糖或糖醇，如乳糖、海藻糖、水苏糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌醇、半乳糖醇、甘油等，包括环醇如环己六醇；聚乙二醇；氨基酸聚合物；含硫还原剂，如脲，谷胱甘肽、硫辛酸、巯基乙酸钠、硫代甘油、 $\alpha$ -单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量多肽(即<10 个残基)；蛋白质如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物如聚  
10 乙烯吡咯烷酮；单糖如木糖、甘露糖、果糖和葡萄糖；二糖如乳糖、麦芽糖和蔗糖；三糖如棉子糖，和多糖如葡聚糖。基于活性蛋白质重量计算，稳定剂通常的存在范围为 0.1-10000 重量份。

可以存在非离子表面活性剂或去污剂(也称作“湿润剂”)以有助于溶解治疗剂以及保护治疗性多肽以避免搅拌诱导的聚集，其也允许配制剂暴露于剪切表面压力而不导致多肽变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨酸酯(polysorbate)(20,80 等)、polyoxamer(184, 188 等)、Pluronic®多元醇、聚  
20 氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(Tween®20、Tween®80 等)。

其它各种赋形剂包括膨胀剂或填充剂(如淀粉)、螯合剂(如 EDTA)、抗氧化剂(如抗坏血酸、甲硫氨酸、维生素 E)和共溶剂。

25 活性组分也可以被包裹在通过，例如 coascervation 技术或通过界面聚合所制备的微囊，如羟甲基纤维素、明胶或聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊中，包裹在胶体状药物运送体系(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米胶囊)中，或包裹在大乳剂中。在 Remington's Pharmaceutical Sciences(同上)中公开了这些技术。

30 体内给药所使用的非胃肠道制剂必须是无菌的。该过程可通过，例如，除菌滤膜的过滤而轻易完成。

在本发明一个优选实施方案中，所述药物组合物包含 i) 本发明的 IFNG 变体，ii) 缓冲剂，尤其有机酸的盐，它能将稳定 pH 在 5.0-6.5，iii) 稳定剂，尤其有机糖或糖醇，iv) 非离子表面活性剂，和 v) 无菌水。更具体地，缓冲剂选自乙酸盐，琥珀酸盐，和柠檬酸盐；稳定剂为甘露醇或山梨醇，非离子表面活性剂为 Tween®-20 或 Tween®-80。优选药物组合物不包括任何防腐剂。

#### 持续释放制剂

持续释放制剂的合适例子包括含有多肽或偶联物的固体疏水聚合物的半渗透基质、具有合适形式如膜或微囊的基质。持续释放基质的例子包括  
10 聚酯、水凝胶(例如，聚(2-羟乙基丙烯酸甲酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯、L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物、不可降解的乙烯乙酸乙酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 ProLease® 技术或 Lupron Depot® (由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。聚合物如乙烯乙酸乙酯和乳酸-乙醇酸能长时间释放分子如长达或超过 100 天，某些水凝  
15 胶在较短时间内释放蛋白质。当包囊中的多肽长时间保留在体内时，它们因在 37°C 潮湿的环境中暴露而变性或聚集，导致生物活性丧失并且可能改变免疫原性。合理的稳定策略可根据所涉及的机理设计。例如，如果发现聚集机理是通过硫代二硫化物相互交换形成分子内 S-S 键，那么可通过修饰巯基、将酸性溶液冻干、控制湿度、使用适宜的添加剂和开发特异性聚合物基质组合物来达到稳定。  
20

#### 口服用药

对于口服用药，药物组合物可以是固体或液体形式，例如，以胶囊，片剂，悬液，乳剂或溶液的形式。药物组合物优选以含有给定量活性成分的剂量单位的形式制备。用于人或其它哺乳动物的合适的每日剂量可根据  
25 病人的情况和其它因素大幅度变化，但本领域的技术人员可使用常规方法测定。

口服用药的固体剂型可包括胶囊，片剂，栓剂，粉末和颗粒。在该固体剂型中，活性化合物可与至少一种惰性稀释剂，例如蔗糖，乳糖或淀粉混合。该剂型也可包括，如正常实践中的添加物质，例如润滑剂，例如硬  
30 脂酸镁。对于胶囊，片剂和丸剂，剂型也可包括缓冲剂。片剂和丸剂还可用于肠衣制备。

所述变体可与诸如乳糖，蔗糖，淀粉粉末，链烷酸的纤维素酯，硬脂酸，滑石，硬脂酸镁，氧化镁，磷酸和硫酸的钠和钙盐，阿拉伯胶，明胶，藻酸钠，聚乙烯-吡咯烷，和/或聚乙烯醇的佐剂混合，并作成片剂或包成胶囊用于常规用药。作为选择，它们可溶于盐水，水，聚乙二醇，丙二醇，乙醇，油类(例如玉米油，花生油，棉子油或芝麻油)，黄芪胶，和/或各种缓冲液中。其它佐剂和用药方式是制药领域熟知的。载体或稀释剂可包括时间延迟材料，例如单独或与蜡一起的甘油单硬脂酸酯或甘油二硬脂酸酯，或者本领域熟知的其它材料。

5 可对药物组合物进行诸如灭菌的常规制药操作和/或药物组合物可含有常规佐剂，例如防腐剂，稳定剂，润湿剂，乳化剂，缓冲液，填充物，等，例如，如在本文别处所述。

口服用药的液体剂型可包括含有诸如水的本领域常用的惰性稀释剂的可药用乳剂，溶液，悬液，糖浆和酏剂。该组合物也可佐剂，例如润湿剂，甜味剂，调味剂和香味剂。

#### 15 局部用药

适用于局部用药的配制剂包括适合于穿透皮肤的液态或半液态制剂(例如，擦剂，洗剂，软膏，乳膏，或糊剂)和适合于眼，耳或者鼻给药的滴剂。

#### 肺部递送

20 适合于用喷射或者超声喷雾器使用的配制剂一般包含溶于水的多肽变体，它的浓度为，例如每 mL 溶液大约 0.01 到 25 mg 变体，优选大约 0.1 到 10 mg/mL。配制剂也可包括缓冲剂和简单糖类(例如，用于蛋白质稳定化和渗透压调节)，和/或浓度范围从 0.1 到 10 mg/ml 的人血清白蛋白。可使用的缓冲剂的例子是乙酸钠，柠檬酸盐和甘氨酸。优选缓冲剂具有适合于将溶液调到 pH 为 3 至 9 范围的组成成分和摩尔浓度。一般来说，从 1 mM 到 50 mM 的缓冲剂摩尔浓度适合于该目的。可使用的糖类的例子是乳糖，麦芽糖，甘露糖醇，山梨糖醇，海藻糖，和木糖，通常的含量范围是配制剂重量的 1% 到 10%。

30 喷雾配制剂也可含有表面活性剂以降低或防止在形成气溶胶时由溶液的雾化引起的表面诱导的蛋白质聚集。可使用各种常规表面活性剂，例如聚氧化乙烯脂肪酸酯和醇，聚氧化乙烯山梨聚糖脂肪酸酯。其含量范围一

一般为配制剂重量的 0.001 % 和 4 % 之间。用于本发明目的的特别优选的表面活性剂是聚氧化乙烯山梨聚糖单油酸酯。

具体配制剂和产生合适分散的本发明的液体颗粒的方法在 WO 94/20069, US 5, 915, 378, US 5, 960, 792, US 5, 957, 124, US 5, 934, 272, US 5, 915, 378, US 5, 855, 564, US 5, 826, 570 和 US 5, 522, 385 中描述, 在此引用以供参考。

与带有剂量刻度的吸入器装置一起使用的配制剂一般包含精细区分的粉末。该粉末可通过冻干并然后磨制液体偶联物配制剂来生产且也可含有稳定剂, 例如人血清白蛋白(HSA)。一般来说, 加入超过 0.5 % (w/w) 的 HAS。另外, 如果需要可向制剂中加入一种或多种糖或糖醇。其例子包括乳糖, 麦芽糖, 甘露糖醇, 山梨糖醇, 山梨糖, 海藻糖, 木糖醇, 和木糖。加入配制剂中的该偶联物的量的范围从大约 0.01 到 200 % (w/w), 优选从大约 1 到 50 %。然后冻干该配制剂并磨制成所需的颗粒大小。

然后将合适大小的颗粒借助于表面活性剂悬浮于推进剂中。推进剂可以是用于该目的的任何常规材料, 例如氯氟碳, 氢氯氟碳, 氢氟碳, 或碳氢化合物, 包括三氯氟甲烷, 二氯二氟甲烷, 二氯四氟乙醇, 和 1, 1, 1, 2-四氟乙烷, 或其组合。合适的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯和大豆卵磷脂。油酸也可用作表面活性剂。然后将该混合物装入递送装置中。适用于本发明的商业上可获得的测定剂量的吸入器例子是由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, N. C 生产的 Ventolin 测定剂量的吸入器。

用于粉末吸入器的配制剂包含含有偶联物的精细区分的干粉且也可包括膨胀剂, 例如乳糖, 山梨糖醇, 蔗糖, 或甘露糖醇, 其含量可帮助粉末从装置中散布, 例如, 占配制剂重量的 50 % 到 90 %。粉末的颗粒在肺中应具有空气动力学特性, 相应于具有大约  $1 \text{ g/cm}^2$  密度的颗粒, 具有小于 10 微米的平均直径, 优选在 0.5 和 5 微米之间, 最优选在 1.5 和 3.5 微米之间。根据本文的教导适用的粉末吸入器的例子是由 Fisons Corp., Bedford, Mass 生产的 Spinhaler 粉末吸入器。

以 US 5, 997, 848, US 5, 993, 783, US 5, 985, 248, US 5, 976574, US 5, 922, 354, US 5, 785, 049 和 US 5, 654, 007 公开的方法可产生和/或递送这些装置中的粉末。

设计用于治疗产品的肺部递送的机械装置包括但不限于喷雾器, 测定

剂量的吸入器, 和粉末吸入器, 所有这些都是本领域的技术人员所熟悉的。适用于本发明实践的商业上可获得的装置的具体例子是由 Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri 生产的 Ultravent 喷雾器; 由 Marquest Medical Products, Englewood, Colorado 生产的 Acorn II 喷雾器; 由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, North Carolina 生产的 Ventolin 测定剂量的吸入器; 由 Fisons Corp., Bedford, Massachusetts 生产的 Spinhaler 粉末吸入器; Inhale Therapeutic Systems, Inc., San Carlos, California 的 “standing cloud” 装置; Alkermes, Cambridge, Massachusetts 生产的 AIR 吸入器; 和 Aradigm Corporation, Hayward, California 生产的 AERx 肺部药物递送系统。

- 10 在下面实施例中进一步描述本发明。该实施例不应以任何方式理解为本说明书和权利要求书范围的限制。

#### 材料和方法

##### 材料

CHO-K1 细胞(获自美国典型培养物保藏中心(ATCC #CCL-61))。

- 15 HeLa 细胞(获自美国典型培养物保藏中心(ATCC #CCL-2))。

ISRE-Luc 获自 Stratagene, La Jolla USA。

pCDNA 3. 1/hygro 获自 Invitrogen, Carlsbad USA。

限制酶和聚合酶获自 New England Biolabs Inc., Beverly, USA。

- 20 DMEM 培养基: Dulbecco 改良型 Eagle 培养基(DMEM), 10%胎牛血清和潮霉素 B 获自 Life Technologies A/S, Copenhagen, Denmark。

LucLite 底物获自 Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands。

TopCount 发光仪获自 Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands。

生物素化多克隆抗-人 IFNG 抗体 BAF285 获自 R & D Systems Inc., Minneapolis, USA。

- 25 辣根过氧化物酶偶联型链亲和素 P0397 获自 DAKO, Copenhagen, Denmark。

TMB 印迹试剂获自 KEM-EN-TEC, Copenhagen, Denmark。

##### 方法

##### 干扰素试验概述

- 30 以前已经公开了: IFNG 与 HeLa 细胞上的 IFNG 受体相互作用并激活该受体。其结果是, 在含有干扰素刺激应答元件(ISRE)的启动子处激活转录。

因此通过在 HeLa 细胞中使用与萤光素酶报告基因偶联的 ISRE(ISRE-luc)可筛选干扰素受体的激动剂。

#### 初步试验(primary assay)

用 ISRE-Luc 和 pCDNA 3.1/hygro 共转染 HeLa 细胞, 通过在含有潮霉素 B 的 DMEM 培养基中进行选择可建立转化灶(细胞克隆)。在存在或不存在 IFNG 的条件下筛选细胞克隆的萤光素酶活性。显示出刺激与未刺激的萤光素酶活性比率最高的那些克隆用于进一步的试验。

为了筛选多肽变体, 在 96 孔培养板中接种 15,000 个细胞/孔并在 DMEM 培养基中保温过夜。在第二天以各种浓度向细胞中加入多肽变体以及已知的标准品。用 Actimmune®作为“已知的标准品”; 将一小瓶 Actimmune®用 DMEM, 5% FBS 稀释至 300 IU/ml, 贮存于-80℃备用。

平板在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 气体环境中培养 6 小时。随后向各孔中加入 LucLite 底物(Packard Bioscience, Groningen, The Netherlands)。密封平板并在 TopCount 发光仪(Packard)中以 SPC(单光子计数)方式测量发光。

每个平板含有与 IFNG 一起保温的孔作为受刺激的对照, 含有正常培养基的另一些孔作为未刺激对照。用刺激的和未刺激的萤光素酶活性的比率作为 IFNG 活性和实验间误差的内在标准。计算每一份 IFNG 样品相对于 Actimmune®标准品的单位(unit)数, 表示为 AU。

#### 测定糖基化程度的增加

为了测定 IFNG 变体单体糖基化的不同程度, 在标准条件下进行 SDS PAGE 凝胶电泳, 并转移至硝酸纤维素膜上。按照标准程序进行 Western 印迹, 用生物素化多克隆抗人 IFNG 抗体(BAF285, 来自 R & D Systems)作为第一抗体, 用辣根过氧化物酶偶联的链亲和素(P0397 来自 DAKO)作为第二抗体, 然后用 TMB 印迹试剂(KEM-EN-TEC, Copenhagen, Denmark)染色。糖基化程度不同的 IFNG 变体单体的分布可通过目测已被染色的膜来确定。

#### 测定 AUC<sub>sc</sub>

AUC<sub>sc</sub> 通过以 200μl 大丸剂的形式将等量(基于活性)的本发明 IFNG 多肽变体皮下给与大鼠来测定。

在这些实验中, 使用体重 220-260 g 的雌性 Sprag-Dawley 大鼠。IFNG 多肽用琥珀酸钠(720 mg/l), 甘露醇 40 g/l, polysorbate 20 (100 mg/l), pH 6.0 配制。

皮下给药之前,从尾静脉取一份血样,以便确保不会检测出背景 IFNG 活性。给药后,于 10 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min, 720 min, 1440 min, 1620 min, 1920 min 和 2880 min (有时也包括 3600 min)时从尾静脉取血样。将血样室温静置 20 min, 使其凝固, 然后室温 5000g 离心 20 min, 制得血清。然后分离出血清, -80℃贮存, 以备用上述“初步试验”测定 IFNG 活性。应注意, 当测定 PK 研究的大鼠血清样品中的单位(unit)数时, 将 Actimmune®标准品用 DMEM, 5% FBS 和 5 %大鼠血清稀释。

然后将血清中单位(AU/ml)的数量对时间(min)作图, 用 GraphPad Prism 3.01 计算 AUCsc。

10 对糖基化 huIFNG 和/或 Actimmune®进行类似的实验, 以便评估本发明 IFNG 多肽变体与糖基化 huIFNG 和/或 Actimmune®相比的 AUCsc 的增加。

#### 血清半寿期

15 血清半寿期通过以 200μl 大丸剂的形式将等量(基于活性)的本发明 IFNG 多肽变体皮下给与大鼠来测定。

在这些实验中, 使用体重 220-260 g 的雌性 Sprag-Dawley 大鼠。IFNG 多肽用琥珀酸钠(720 mg/l), 甘露醇 40 g/l, polysorbate 20 (100 mg/l), pH 6.0 配制。

皮下给药之前,从尾静脉取一份血样,以便确保不会检测出背景 IFNG 活性。给药后,于 5min, 10 min, 20 min, 40 min, 60 min, 120 min, 240 min, 480 min, 720 min, 1440 min, 1620 min, 1920 min 和 2880 min 时从尾静脉取血样。将血样室温静置 20 min, 使其凝固, 然后室温 5000g 离心 20 min, 制得血清。然后分离出血清, -80℃贮存, 以备用上述“初步试验”测定 IFNG 活性。应注意, 当测定 PK 研究的大鼠血清样品中的单位数时, 将 Actimmune®标准品用 DMEM, 5% FBS 和 5 %大鼠血清稀释。

然后将血清中单位(AU/ml)的数量对时间(min)作图, 用 WinNonLin Pro 3.3 计算血清半寿期。

对糖基化 huIFNG 和/或 Actimmune®进行类似的实验, 以便评估本发明 IFNG 多肽变体与糖基化 huIFNG 和/或 Actimmune®相比的血清半寿期的增加。

#### 暴露于表面的氨基酸残基的鉴定

### 结构

利用 X-射线晶体学测定的 huIFNG 的实验性 3D 结构见 Ealick 等, Science 252: 698-702 (1991)的报道, 其中指出了 IFNG 同型二聚体的 C- $\alpha$ 轨迹(trace)。Walter 等, Nature 376: 230-235 (1995)报道了与两个可溶性 IFNG 受体分子复合的 IFNG 同型二聚体的结构。该结构的座标从未公开过。Thiel 等, Structure 8: 927-936 (2000)报道了与两个可溶性 IFNG 受体分子复合的 IFNG 同型二聚体的结构, 在该结构中第三个受体分子不与 IFNG 同型二聚体发生相互作用。

### 可接近的表面区域(ASA)

10 用计算机程序 Access (B. Lee 和 F. M. Richards, J. Mol. Biol. 55: 379-400 (1971))版本 2 (Copyright (c) 1983 Yale University)计算该结构中各原子的可接近的表面区域(ASA)。该方法一般使用 1.4Å 的探针大小, 并将可接近的表面区域(ASA)定义为由探针中心形成的区域。计算前, 从坐标系(coordinate set)中去掉与该蛋白质不直接相关的所有水分子, 氢原子和其它原子。

### 15 侧链的分部(fractional)ASA

侧链原子的分部 ASA 通过用侧链中原子的 ASA 总和除以延伸的 ALA-x-ALA 三肽中代表该残基类型的侧链原子的 ASA 值来计算。参见 Hubbard, Campbell & Thornton (1991) J. Mol. Biol. : 220, 507-530。在该实例中, 将 CA 原子视为甘氨酸残基而非其它残基的侧链的一部分。下列值作为

20 侧链的标准 100 % ASA 来用:

|     |        |                |     |        |                |
|-----|--------|----------------|-----|--------|----------------|
| Ala | 69.23  | Å              | Leu | 140.76 | Å              |
| Arg | 200.35 | Å <sup>2</sup> | Lys | 162.50 | Å <sup>2</sup> |
| Asn | 106.25 | Å <sup>2</sup> | Met | 156.08 | Å <sup>2</sup> |
| Asp | 102.06 | Å <sup>2</sup> | Phe | 163.90 | Å <sup>2</sup> |
| Cys | 96.69  | Å <sup>2</sup> | Pro | 119.65 | Å <sup>2</sup> |
| Gln | 140.58 | Å <sup>2</sup> | Ser | 78.16  | Å <sup>2</sup> |
| Glu | 134.61 | Å <sup>2</sup> | Thr | 101.67 | Å <sup>2</sup> |
| Gly | 32.28  | Å <sup>2</sup> | Trp | 210.89 | Å <sup>2</sup> |
| His | 147.00 | Å <sup>2</sup> | Tyr | 176.61 | Å <sup>2</sup> |
| Ile | 137.91 | Å <sup>2</sup> | Val | 114.14 | Å <sup>2</sup> |

该结构中未探测到的残基被定义为 100%暴露, 因为可以认为这些残基

位于弹性区域。

测定原子间的距离:

原子间的距离使用分子图形软件,例如 InsightII v. 98.0, MSI INC 测定。

测定受体结合位点:

- 5 受体结合位点定义为所有下述残基,它们能通过受体结合而改变它们的可接近的表面区域。这通过至少两种 ASA 计算来测定:一种在配体/受体复合物的分离(isolated)的配体上,一种在完整的配体/受体复合物上。

实施例

实施例 1-确定暴露在表面的氨基酸残基

- 10 所用 X-线结构是 IFNG 同型二聚体与两分子可溶性 IFNG 受体复合的结构,在该结构中具有不与 IFNG 同型二聚体发生相互作用的第三个 IFNG 受体分子,参见 Thiel et. al. Structure 8: 927-936 (2000)。所述结构由这样的 IFNG 同型二聚体组成,其中的两个分子用 A 和 B 标记。为了进行构建,将另一个甲硫氨酸置于被 M0 标记的 IFNG 序列之前,并在该序列的 C-末端
- 15 截短 10 个残基(所构建的分子中, Q133 是最后一个残基)。在本实施例的所有计算中,将 M0 从该结构中去掉。两个 IFNG 单体在残基 120 之后的结构具有极弱的电子密度,进行对残基进行建模(modeled),直至残基 T126。因此,在进行本实施例的计算之前,残基 S121-T126 已从该结构中除去。标有 C 和 D 的两个受体片段直接作用于 IFNG 同型二聚体,标有 E 的第三个
- 20 受体分子不与 IFNG 同型二聚体接触,也不包括在这些计算中。

表面暴露:

- 对不含 M0 和 S121-T126 的分子 A 和 B 的同型二聚体进行分部 ASA 计算,结果在至少一个单体中下列残基有超过 25 % 的侧链暴露在表面: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K12, K13, Y14, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25,
- 25 G26, T27, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, H111, Q115, A118 和 E119。

- 在至少一个单体中下列残基有超过 50 % 的侧链暴露在表面: Q1, D2, P3,
- 30 K6, E9, N10, K13, N16, G18, H19, S20, D21, A23, D24, N25, G26, T27, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84,

K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, Q115, A118, E119。

对分子 A 和 B(都不含 M0 和 S121-T126 且包括受体分子 C 和 D)的同型二聚体进行分部 ASA 计算, 结果在至少一个单体中下列残基有超过 25 % 的侧链暴露在表面: Q1, D2, P3, K6, E9, N10, K13, Y14, N16, G18, H19, D21, N25, G26, G31, K34, N35, K37, E38, E39, S40, K55, K58, N59, K61, D62, D63, Q64, S65, Q67, K68, E71, T72, K74, E75, N78, V79, K80, N83, S84, N85, K86, K87, D90, E93, K94, N97, S99, T101, D102, L103, N104, E119。

在至少一个单体中下列残基有超过 50 % 的侧链暴露于表面: P3, K6, N10, K13, N16, D21, N25, G26, G31, K34, K37, E38, E39, K55, K58, N59, D62, Q64, S65, K68, E71, E75, N83, S84, K86, K87, K94, N97, S99, T101, D102, L103 和 N104。

所有上述位置都是本发明修饰所针对的靶。

比较这两列残基发现, 通过受体结合, 从所述超过 25 % 侧链的 ASA 列中去掉了 K12, S20, A23, D24, T27, H111, Q115 和 A118, 从所述超过 50 % 侧链的 ASA 列中去掉了 Q1, D2, E9, G18, H19, S20, A23, D24, T27, Q115, A118 和 E119。

该结构中未测定的残基, 即残基 S121, P122, A123, A124, K125, T126, G127, K128, R129, K130, R131, S132, Q133, M134, L135, F136, R137, G138, R139, R140, A141, S142, Q143, 都按完全暴露在表面来处理。这些残基也组成本发明引入连接基团时的不同靶(或者可将其视为属于暴露在表面的氨基酸残基, 例如具有超过 25 % 或超过 50 % 的暴露侧链)。

### 实施例 2 - 确定受体结合位点:

按上述进行 ASA 计算发现, 在上述复合物的至少一个单体中, IFNG 分子的下列残基与在分离的二聚体上的计算结果相比具有减少的 ASA: Q1, D2, Y4, V5, E9, K12, G18, H19, S20, D21, V22, A23, D24, N25, G26, T27, L30, K34, K37, K108, H111, E112, I114, Q115, A118, E119。

### 实施例 3 - 设计能以经过优化的密码子使用模式表达 IFNG 的表达盒

GenBank 登录号为 X13274 的 DNA 序列包含编码成熟 huIFNG 及其天然信号肽的全长 cDNA, 对该 DNA 序列进行修饰以便帮助在 CHO 细胞中进行高效表达。对 huIFNG 核苷酸序列的密码子进行修饰, 方法是使密码子的应用偏向常用于人(*homo sapiens*)的密码子。随后在该序列中的某些核苷

酸用其它核苷酸取代以便引入 DNA 限制性核酸内切酶的识别位点。设计引物以便合成该基因。

通过一步 PCR 将引物装配成合成基因，其中用到 Platinum *Pfx*-聚合酶试剂盒(Life Technologies)和标准三步 PCR 循环参数。经装配的基因通过使用相同条件的 PCR 进行扩增，它具有 SEQ ID NO:42 所示的序列。将合成的基因克隆进 pcDNA3.1/hygro (InVitrogen)的 BamHI 和 XbaI 位点之间，得到 pIGY-22。

利用 Lipofectaim2000 (Life Technologies)作为转染试剂将 pIGY-22 转染至 CHO KI 细胞中。24 小时后收获培养基，用 ELISA 分析 IFNG 活性和浓度。用上述初步试验测得活性为  $1.4 \times 10^7$  AU/ml。

#### 实施例 4 - 定点诱变

##### 制备糖基化变体

为了将突变引入 IFNG 中，设计寡核苷酸，以便能通过传统的两步 PCR 法将由 PCR 产生的改变引入表达质粒(pIGY-22)中。

用到两种载体引物以及特异性突变引物：

ADJ013 : 5'-GATGGCTGGCAACTAGAAG-3' (反义下游载体引物) (SEQ ID NO : 43)和 ADJ014 : 5'-TGTACGGTGGGAGGTCTAT-3' (SEQ ID NO : 44) (正义上游载体引物)。

S99T 变体通过传统的两步 PCR 法制备，其以 ADJ013 和 ADJ014 为载体引物，以 ADJ093 (5'-GTTCAGGTCTGTACACGGTGTAATTGGTCAGCTT-3') (SEQ ID NO : 45)和 ADJ094 (5'-AAGCTGACCAATTACACCGTGACAGACCTGAAC-3') (SEQ ID NO : 46)为突变引物，并以 pIGY-22 为模板。用 BamHI 和 XbaI 将 447 bp 的 PCR 产物亚克隆至 pcDNA3.1/Hygro (InVitrogen)中，得到质粒 pIGY-48。

用 Lipofectaim2000 (Life Technologies)作为转染试剂，将 pIGY-48 转染至 CHO KI 细胞中。24 小时后收获培养基，分析 IFNG 活性。通过本文所述初步试验测出以下活性： $5.1 \times 10^6$  AU/ml。

E38N+S40T+S99T 变体通过传统的两步 PCR 法制备，其以 ADJ013 和 ADJ014 为载体引物，以 ADJ091 (5'-CATGATCTTCCGATCGGTCTCGTTCTTCCAATT-3') (SEQ ID NO : 47) 和 ADJ092 (5'-AATTGGAAGAACGAGACC GATCGGAAGATCATG-3') (SEQ ID NO : 48)

为突变引物，并以 pIGY-48 为模板。用 BamHI 和 XbaI 将 447 bp 的 PCR 产物亚克隆至 pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) 中，得到质粒 pIGY-54。

用 Lipofectaim2000 (Life Technologies) 作为转染试剂，将 pIGY-54 转染至 CHO K1 细胞中。24 小时后收获培养基，分析 IFNG 活性。通过本文所述  
5 初步试验测出以下活性： $1.3 \times 10^7$  AU/ml。

用类似于上述的标准技术制备出多种全长 IFNG 糖基化变体。这些变体汇编于下表 1 中。

#### 制备 C-末端截短的 IFNG 变体

有一种 C-末端截短型 IFNG 变体在紧接 Leu135 的密码子的下游有一个  
10 终止密码子，它如下制备：以 pIGY-22, pIGY-48 和 pIGY-54 为模板进行一步 PCR，然后用 BamHI 和 XbaI 将 PCR 产物亚克隆至 pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen) 中。用于构建这些变体的引物是：ADJ014 (见上文，上游) 和 5'-GAGTCTAGATTACAGCATCTGGCTTCTCTT-3' (SEQ ID NO : 49) (下游)。将所得质粒称为 pIGY-72 (野生型 IFNG 在 Leu135 之后的部分被截掉)，  
15 pIGY-73 (S99T 变体在 Leu135 之后的部分被截掉) 和 pIGY-74 (E38N+S40T+S99T 在 Leu35 之后的部分被截掉)。

#### 制备含有半胱氨酸的 IFNG 变体

含有半胱氨酸残基的 IFNG 变体用 Stratagene's QuikChange<sup>®</sup>XL 定点诱变试剂盒按照厂家说明进行制备。用 pIGY-48 作为模板得到 7 种 IFNG 变体，  
20 每种包含一个引入的半胱氨酸：N10C+S99T, N16C+S99T, E38C+S99T, N59C+S99T, N83C+S99T, K94C+S99T 和 S99T+N104C。类似地，用 pIGY-54 作为模板得到 6 种 IFNG 变体，每种包含一个引入的半胱氨酸：N10C+E38N+S40T+S99T, N16C+E38N+S40T+S99T, E38N+S40T+N59C+S99T, E38N+S40T+N83C+S99T, E38N+S40T+K94C+S99T 和  
25 E38N+S40T+S99T+N104C。

#### 实施例 5 - 含有半胱氨酸的变体的 PEG 化

所有缓冲液在使用前去离子化。蛋白浓度通过测量 A280 来评估。

#### 利用 OPSS 偶联化学进行 PEG 化

将 1.3 mg/ml 的 IFNG 变体 N16C+S99T (全长) 在 5 mM 琥珀酸钠，4%  
30 甘露醇，0.01% Tween 20, pH 6.0 中的溶液 7.2 ml，与 300  $\mu$ l 0.5 M DTT 室温孵育 30 分钟，使它还原。使 IFNG 变体脱盐，方法是将 3 个 2.5 ml 等份用

缓冲液 A (50 mM 磷酸钠, 1 mM EDTA, pH 8.1)加载 NAP25 凝胶过滤柱 (Pharmacia)。每个等份洗脱为 3.5 ml。

将 mPEG-OPSS (10 KDa)溶于缓冲液 A 中至浓度为 2 mg/ml, 将其以等量加入经还原并脱盐的 IFNG 变体中, 于室温温和振荡孵育 60 min。

- 5 将 11 ml 反应混合物用 Vivaspin20 柱(VivaScience)浓缩为 1-6 ml, 剩余的 mPEG 用经过缓冲液 A 平衡的 Sephacryl S-100 柱(Pharmacia)经凝胶过滤除去。

- 10 将 PEG 化 IFNG 变体用 Vivaspin 6 柱(VivaScience)在 5mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, 0.01% Tween 20, pH 6.0 中渗滤。纯化的 PEG 化 IFNG 变体比活性为  $1.3 \times 10^6$  AU/mg, 如本文的初步试验所测(为相应的未 PEG 化 IFNG 变体比活性的 15%)。

利用 MAL 偶联化学进行 PEG 化

- 15 将 1.5 mg/ml 的 IFNG 变体 N59C+S99T (全长)在 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, 0.01% Tween 20, pH 6.0 中的溶液 1.6 ml, 与 64  $\mu$ l 0.5 M DTT 室温孵育 30 分钟, 使它还原。用缓冲液 A (50 mM 磷酸钠, 1 mM EDTA, pH 8.1)在 NAP25 凝胶过滤柱(Pharmacia)上使 IFNG 变体脱盐。每个等份洗脱为 3.5 ml。

将 mPEG-MAL (5 kDa)溶于缓冲液 A 中至浓度为 0.5 mg/ml, 将其以等量加入经还原并脱盐的 IFNG 变体中, 于室温温和振荡孵育 120 min。

- 20 添加硫酸铵至浓度为 0.9 M, 将这种 PEG 化 IFNG 变体加载至已用缓冲液 B (20 mM 磷酸钠, 0.9 M 硫酸铵, pH 6.6)平衡的 1 ml Resource 苯基柱 (Pharmacia)上。用 5 个柱体积的缓冲液 B 洗柱, 然后用 0-50%线性梯度的缓冲液 C (20 mM 磷酸钠, pH 6.6)以 30 个柱体积洗脱被结合的 PEG 化 IFNG 变体。PEG 化 IFNG 变体在 0.6 M 硫酸铵左右被洗脱。

- 25 将含有 PEG 化 IFNG 变体的级分汇总, 在 5 mM 琥珀酸钠, 4%甘露醇, 0.01% Tween 20, pH 6.0 中用 Vivaspin20 柱(VivaScience)进行渗滤。纯化后的 PEG 化 IFNG 变体的比活性为  $2.4 \times 10^6$  AU/mg, 如本文的初步试验所测(为相应的未 PEG 化 IFNG 变体比活性的 15%)。

#### 实施例 6 - IFNG 和 IFNG 变体在哺乳动物细胞中的表达

- 30 为了瞬时表达 IFNG, 细胞在培养基中生长至 95%铺满, 所述培养基为 Dulbecco's MEM/Nut.-mix F-12 (Ham) L-谷氨酰胺, 15 mM Hepes, 吡哆醇

-HCl (Life Technologies 目录号 31330-038), 其中含有 1:10 的胎牛血清/  
(BioWhittaker 目录号 02-701F)、1:100 的青霉素和链霉素(BioWhittaker 目录  
号 17-602E)。将编码 IFNG 的质粒用 Lipofectaim2000 (Life Technologies)按  
照厂家说明转染至细胞中。24 小时后收获培养基, 分析 IFNG 活性。另外,  
5 为了定量所利用的糖基化位点的相对数量, 用收获的培养基进行 Western 印  
迹。

表达 IFNG 的稳定克隆如下制备: 用编码 IFNG 的质粒转染 CHO K1 细  
胞, 然后将这些细胞在含 0.36 mg/ml 潮霉素的培养基中孵育。分离出稳定  
转染的细胞, 用有限稀释法进行亚克隆。产生高水平 IFNG 的克隆通过  
10 ELISA 鉴定。

#### 实施例 7 - 大规模制备

将表达 IFNG 或变体的稳定细胞系在 1700 cm<sup>2</sup> 滚瓶(Corning, #431200)  
中的培养基中培养至铺满, 所述培养基为 Dulbecco's MEM/Nut.-mix F-12  
(Ham) L-谷氨酰胺, 15 mM Hepes, 吡哆醇-HCl (Life Technologies 目录号  
15 31330-038), 其中含有 1:10 的胎牛血清(BioWhittaker 目录号 02-701F)、1:100  
的青霉素和链霉素(BioWhittaker 目录号 17-602E)。然后将培养基换成含有  
L-谷氨酰胺的 300 ml UltraCHO (BioWhittaker 目录号 12-724Q), 并向其中添  
加 1:500 的 EX-CYTE VLE (Serological Proteins Inc. # 81-129)、1:100 的青  
霉素和链霉素(BioWhittaker 目录号 17-602E)。培养 48 小时后, 将培养基换  
20 成含有相同添加物的新鲜 UltraCHO。再培养 48 小时后, 将培养基换成  
Dulbecco's MEM/Nut.-mix F-12 (Ham) L-谷氨酰胺, 吡哆醇-HCl (Life  
Technologies 目录号 21041-025), 其中添加 1: 100 的 ITS-A (Gibco/BRL #  
51300-044), 1: 500 的 EX-CYTE VLE (Serological Proteins Inc. # 81-129)和  
1:100 的青霉素和链霉素(BioWhittaker 目录号 17-602E)。然后每隔 24 小时  
25 收获培养基, 并代之以具有相同添加物的新鲜无血清培养基。将收集的培  
养基滤过 0.22μm 滤膜以便除去细胞。

#### 实施例 8 - 纯化

过滤物经显微过滤(0.22μm), 然后用 Millipore TFF 系统超滤至约为 1/15  
体积。在同一系统中, 将该浓缩物用 10 mM Tris, pH 7.6 进行渗滤。加入硫  
30 酸铵至浓度为 1.7 M, 搅拌后, 通过在 Sorvall 离心机中用 GS3 转子以 8000  
rpm 离心 25 分钟而将沉淀除去。

将上清加载至已用 10 mM Tris, 1.7 M 硫酸铵, pH 7.6 平衡的 25 ml Phenyl High Performance (Pharmacia)柱中。然后用 3 个柱体积的 10 mM Tris, 1.7 M 硫酸钠, pH 7.6 洗柱, 再用经过 10 个柱体积渐变至 100% 10 mM Tris, pH 7.6 的线性梯度洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及洗脱的 IFNG 变体分级分离。将富含 IFNG 变体的级分汇总, 通过在 10 mM Tris, pH 9.0 中用 Vivaflow200 系统(VivaScience)以分子量截流值 10,000 Da 进行渗滤而更换缓冲液。

然后将 IFNG 变体加载至已用 10 mM Tris, pH 9.0 平衡的 18 ml Q-sepharose Fast Flow (Pharmacia)柱中。然后用 3 个柱体积的 10 mM Tris, pH 9.0 洗柱, 再用经过 15 个柱体积由 0% 至 100%线性梯度的 10 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 9.0 洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及洗脱的 IFNG 变体分级分离。将富含 IFNG 变体的级分汇总, 通过在 10 mM 磷酸钠, pH 7.0 中用 VivaSpin20 柱(VivaScience)以分子量截流值 10,000 Da 进行渗滤而更换缓冲液。

然后将 IFNG 变体加载至已用 10 mM 磷酸钠, pH 7.0 平衡的 8 ml CHT 陶瓷羟基磷灰石柱(Biorad)中。然后用 5 个柱体积的 10 mM 磷酸钠, pH 7.0 洗柱, 再用经过 30 个柱体积由 0% 至 60%线性梯度的 500 mM 磷酸钠, pH 7.0 洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及洗脱的 IFNG 变体分级分离。将富含 IFNG 变体的级分汇总, 用 VivaSpin20 柱(VivaScience)在 5 mM 琥珀酸钠, 4% 甘露醇, pH 6.0 中更换缓冲液, 随后添加 Tween 20 至浓度为 0.01%。将该 IFNG 变体过滤除菌, 保存在-80℃。

也可以按照下述纯化方案对 IFNG 变体进行纯化:

过滤物经显微过滤(0.22μm), 然后用 Millipore TFF 系统超滤至约 1/15 体积。在同一系统中, 将该浓缩物用 10 mM Tris, pH 7.6 进行渗滤, 然后将 pH 调至 9.0, 并将沉淀通过显微过滤除去。

将样品加载至已用 10 mM Tris, pH 9.0 平衡的 Q-sepharose Fast Flow (Pharmacia)柱中。然后用 3 个柱体积的 10 mM Tris, pH 9.0 洗柱, 再用经过 15 个柱体积由 0% 至 100%线性梯度的 10 mM Tris, 0.5 M NaCl, pH 9.0 洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及洗脱的 IFNG 变体分级分离。将富含 IFNG 变体的级分汇总, 将 pH 调至 7.6。加硫酸铵至 1.5 M, 搅拌后, 通过离心除去沉淀。

然后将 IFNG 变体加载至已用 10 mM Tris, 1.5 M 硫酸铵, pH 7.6 平衡的 Phenyl Sepharose High Performance (Pharmacia) 柱中。然后用 3 个柱体积的 10 mM Tris, 1.5M 硫酸铵, pH 7.6 洗柱, 再用经过 10 个柱体积渐变至 100% 的 10 mM Tris, pH 7.6 线性梯度洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及  
5 洗脱的 IFNG 变体分级分离。将富含 IFNG 变体的级分汇总, 并将硫酸铵调整至 1.7M。

然后将 IFNG 变体加载至已用 10 mM 磷酸钠, 1.7M 硫酸铵, pH 7.6 平衡的 Butyl Sepharose 柱中。然后用 10 mM 磷酸钠, 1.7M 硫酸铵, pH 7.6 洗柱, 再用 10 mM 磷酸钠, pH 6.5 洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及  
10 及洗脱的 IFNG 变体分级分离。

将富含 IFNG 变体的级分汇总, 加载至已用 10 mM 磷酸钠, pH 6.5 平衡的羟基磷灰石柱中。用 5 个柱体积的 10 mM 磷酸钠, pH 6.5 洗柱, 再用经过 30 个柱体积由 0% 至 100% 的 500 mM 磷酸钠, pH 6.5 线性梯度洗脱已被结合的 IFNG 变体。使流出物以及洗脱的 IFNG 变体分级分离。

15 将含 IFNG 变体的级分汇总, 将缓冲液更换为含有 5 mM 琥珀酸钠, 4% 甘露醇, pH 6.0 的缓冲液。随后添加 Tween 20 至浓度为 0.01%。将该 IFNG 变体过滤除菌, 保存在 -80℃。

#### 实施例 9 - 变体和 PEG 化变体的活性

用上述“初步实验”测出以下活性数据(瞬时转染后):

| 突变                       | 活性<br>(AU/ml)     | 相对于全长 wt 活性的 % |
|--------------------------|-------------------|----------------|
| 野生型(全长)                  | $1.4 \times 10^7$ | -              |
| S99T(全长)                 | $5.1 \times 10^6$ | 36%            |
| E38N(全长)                 | $1.4 \times 10^7$ | 100%           |
| E38N+S40T(全长)            | $9.9 \times 10^6$ | 71%            |
| E38N+S40T+S99T(全长)       | $1.3 \times 10^7$ | 93%            |
| E38N+K61T(全长)            | $1.2 \times 10^7$ | 86%            |
| E38N+K61T+S99T(全长)       | $1.4 \times 10^6$ | 10%            |
| N10C+S99T(全长)            | $2.5 \times 10^6$ | 18%            |
| N16C+S99T(全长)            | $1.1 \times 10^7$ | 79%            |
| E38C+S99T(全长)            | $1.0 \times 10^7$ | 71%            |
| S99T+N104C(全长)           | $5.0 \times 10^6$ | 36%            |
| N10C+E38N+S40T+S99T(全长)  | $1.5 \times 10^6$ | 11%            |
| N16C+E38N+S40T+S99T(全长)  | $3.7 \times 10^6$ | 26%            |
| E38N+S40T+N59C+S99T(全长)  | $1.1 \times 10^7$ | 79%            |
| E38N+S40T+N83C+S99T(全长)  | $7.2 \times 10^5$ | 5%             |
| E38N+S40T+K94C+S99T(全长)  | $9.4 \times 10^5$ | 7%             |
| E38N+S40T+S99T+N104C(全长) | $2.3 \times 10^6$ | 16%            |
| 野生型(截短型)                 | $6.3 \times 10^6$ | 45%            |
| S99T(截短型)                | $3.5 \times 10^6$ | 25%            |
| E38N+S40T+S99T(截短型)      | $4.0 \times 10^6$ | 29%            |

表 1: 全长型和截短型 rhuIFNG 多肽变体瞬时转染后的活性

用上述“初步实验”测出以下活性数据(纯化后):

| 突变                        | 比活性<br>(AU/mg)    | 全长 wt 活性的<br>% |
|---------------------------|-------------------|----------------|
| 野生型(全长)                   | $2.1 \times 10^7$ | -              |
| S99T(全长)                  | $2.2 \times 10^7$ | 105%           |
| E38N+S40T+S99T(全长)        | $1.4 \times 10^7$ | 67%            |
| N10C+S99T(全长)             | $3.8 \times 10^6$ | 18%            |
| N16C+S99T(全长)             | $2.3 \times 10^6$ | 11%            |
| N16C+S99T(全长+10 kDa mPEG) | $1.3 \times 10^6$ | 6%             |
| E38C+S99T(全长)             | $3.4 \times 10^6$ | 16%            |
| N59C+S99T(全长)             | $6.3 \times 10^6$ | 30%            |
| N59C+S99T(全长+5 kDa mPEG)  | $2.4 \times 10^6$ | 11%            |
| S99T+N104C(全长)            | $3.5 \times 10^6$ | 17%            |

表 2: 全长 rhuIFNG 多肽变体纯化后的活性

测定多个 PEG 化变体的活性,具体是将 PEG 化产物与经历相同的 PEG 化过程(见实施例 5)、但实际上未向反应介质中添加 PEG 的样品进行比较。结果汇编在以下表 3 中:

| 突变                                      | 相对于经历“PEG 化过程”的未 PEG 化产物的活性(%) |
|-----------------------------------------|--------------------------------|
| N10C+S99T (全长+5 kDa mPEG)               | 23                             |
| N16C+S99T (全长+5 kDa mPEG)               | 59                             |
| E38C+S99T(全长+10 kDa mPEG) <sup>1)</sup> | 41                             |
| S99T+N104C (全长+5 kDa mPEG)              | 42                             |

表 3: 全长 rhuIFNG 多肽的 PEG 化变体的活性

5           1) 利用了 ODSS 偶联化学。所有其它 PEG 化变体利用了 MAL 偶联化学。

应强调,表 1 所示活性数据反映了比活性和 CHO-K1 细胞中表达水平的组合。因此可以得出结论,所有变体与 rhuIFNG 相比,显示出相当的表达水平/比活性。

如表 2 所示,所有半胱氨酸变体与 rhuIFNG 相比,显示降低的比活性,而含有 E38N, S40T 和/或 S99T 突变的变体保留了与 rhuIFNG 相当的比活性。当半胱氨酸变体与 5 或 10 kDa 的 PEG 连接后,发现比活性进一步降低 2-3 倍(表 3)。不受任何具体理论限制,推测比活性的降低可归因于偶联的 PEG 基团造成的空间阻碍导致受体结合降低。

实施例 10 - 评估对 N-糖基化位点的利用

15           为了定量所利用的糖基化位点的相对数量,用收获的培养基进行 western 印迹(见图 1)。估计野生型 rhuIFNG (全长)约有 50%利用了全部两个糖基化位点(2N),约有 40%利用了其中一个糖基化位点(1N),约有 10%未被糖基化(0N)。这些数据与此前由 Hooker et al., 1998, J. Interferon and Cytokine Res. 18,287-295 和 Sarenva et al., 1995, Biochem J., 308,9-14 公开的一致。

20           如图 1 所示, S99T 变体(全长)比相应野生型显著更有效地利用其两个糖基化位点。估计 S99T 变体约有 90%利用了全部两个糖基化位点(2N),约有 7%利用了其中一个糖基化位点(1N),约有 3%未被糖基化(0N)。

还可从图 1 看出,变体 E38N+S40T (全长)对引入第 38 位的糖基化位点的利用显著好于未优化的变体 E38N (全长)对它的利用。

25           这些数据清楚表明,不管糖基化位点是天然的还是引入的,对这些位点的更好利用,都可以通过在相对于天冬酰胺残基而言的位置+2 引入苏氨

酸残基而不是丝氨酸残基来实现。

实施例 11 - 药代动力学研究

大鼠皮下给药的 AUC (AUC<sub>sc</sub>)如前文针对多种 IFNG 变体所述进行测定。结果汇总在表 4 和图 2，图 3。

| 变体                           | AUC <sub>sc</sub> /剂<br>(min x g)/ml | <u>AUC<sub>sc,变体</sub></u><br>AUC <sub>sc,Actimmune</sub><br>® | <u>AUC<sub>sc,变体</sub></u><br>AUC <sub>sc,全长,wf</sub> | T <sub>max, sc</sub><br>(min) |
|------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Actimmune®                   | 0.3-0.4                              | -                                                              | 0.013-0.027                                           | 43                            |
| rhIFNG(全长)                   | 15-24                                | 37-80                                                          | -                                                     | 362-446                       |
| E38N+S40T+S99T <sup>1)</sup> | 111-192                              | 277-640                                                        | 4.6-13                                                | 308-374                       |
| N16C+S99T <sup>2)</sup>      | 37                                   | 92-123                                                         | 1.5-2.5                                               | 247                           |
| N16C+S99T <sup>3)</sup>      | 114                                  | 285-380                                                        | 4.8-7.6                                               | 249                           |

5       表 4: 大鼠皮下给药的药代动力学数据

- 1) 全长
- 2) 全长, 5 kDa mPEG 与引入的半胱氨酸残基相连
- 3) 全长, 10 kDa mPEG 与引入的半胱氨酸残基相连

10       从图 2，图 3 和表 4 可明显看出，当皮下给药时，所述变体(包括 PEG 化变体)与 rhIFNG 相比，尤其与市售 Actimmune®相比，具有显著更高的 AUC。根据图 3 所示，还应注意，两种 PEG 化变体的给药剂量比 [E38N+S40T+S99T]变体减少 2.5 倍。

显然，这开创了一种可能性，即施用更低剂量，从而减小副作用，和/或使实现活性所需的给药次数比目前的更少，从而改善患者的顺应性。

## 序列表

<110> 马克西根控股公司 (Maxygen Holdings)

<120> 干扰素  $\gamma$  多肽变体

<130> 231wo410 - INFG 变体

<140>

<141>

<160> 49

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: [S99T]huIFNG

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 2

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1           5           10           15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20           25           30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35           40           45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln

```

```

      50              55              60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65              70              75              80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85              90              95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100              105              110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115              120              125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser
 130              135              140

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 141

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 3

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1              5              10              15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20              25              30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35              40              45

```

```

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50              55              60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65              70              75              80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85              90              95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100              105              110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115              120              125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala
 130              135              140

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 4

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1              5              10              15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20              25              30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35              40              45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50              55              60

```

```

Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65              70              75              80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
              85              90              95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
              100             105             110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
              115             120             125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg
 130              135              140

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 5

```

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

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 6

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1              5              10              15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
              20              25              30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
              35              40              45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
              50              55              60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65              70              75              80

```

```

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100     105     110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115     120     125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
      130     135

```

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 137

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 7

```

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

```

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 136

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

&lt;400&gt; 8

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1      5      10      15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95

```

```

Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe
      130      135

```

<210> 9  
 <211> 135  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

```

<400> 9
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu
      130      135

```

<210> 10  
 <211> 134  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

```

<400> 10
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110

```

Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
           115                  120                  125  
 Arg Lys Arg Ser Gln Met  
       130

<210> 11  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 11  
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
   1                  5                  10                  15  
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
                   20                  25                  30  
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
           35                  40                  45  
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
           50                  55                  60  
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
   65                  70                  75                  80  
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
                   85                  90                  95  
 Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
           100                  105                  110  
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
           115                  120                  125  
 Arg Lys Arg Ser Gln  
       130

<210> 12  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 12  
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
   1                  5                  10                  15  
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
                   20                  25                  30  
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
           35                  40                  45  
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
           50                  55                  60  
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
   65                  70                  75                  80  
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
                   85                  90                  95  
 Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
           100                  105                  110  
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
           115                  120                  125

Arg Lys Arg Ser  
130

<210> 13  
<211> 131  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 13  
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
1 5 10 15  
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
20 25 30  
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
35 40 45  
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
50 55 60  
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
65 70 75 80  
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
85 90 95  
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
100 105 110  
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
115 120 125  
Arg Lys Arg  
130

<210> 14  
<211> 130  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: C 末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 14  
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
1 5 10 15  
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
20 25 30  
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
35 40 45  
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
50 55 60  
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
65 70 75 80  
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
85 90 95  
Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
100 105 110  
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
115 120 125  
Arg Lys  
130

<210> 15  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 15  
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
 20 25 30  
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
 35 40 45  
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
 50 55 60  
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
 65 70 75 80  
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
 85 90 95  
 Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
 100 105 110  
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
 115 120 125  
 Arg

<210> 16  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 [S99T]huIFNG

<400> 16  
 Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile  
 20 25 30  
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln  
 35 40 45  
 Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln  
 50 55 60  
 Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys  
 65 70 75 80  
 Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr  
 85 90 95  
 Asn Tyr Thr Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu  
 100 105 110  
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
 115 120 125

<210> 17  
 <211> 143

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 17

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
 20          25          30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
 35          40          45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
 50          55          60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65          70          75          8
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
 85          90          95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
100          105          110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
115          120          125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln
130          135          140

```

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 166

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;400&gt; 18

```

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

```

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 142

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

<400> 19

```

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

```

<210> 20

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

<400> 20

```

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

```

<210> 21

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 21

```

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

```

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 139

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 22

```

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

```

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 138

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 23

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1           5           10           15

```

```

Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly
      130      135

```

<210> 24  
 <211> 137  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 24
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
  1      5      10      15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg
      130      135

```

<210> 25  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 25
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
  1      5      10      15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30

```

```

Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35              40              45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50              55              60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65              70              75              80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85              90              95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100             105             110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115             120             125
Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe
      130             135

```

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 135

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 26

```

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

```

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 134

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 27

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
  1              5              10              15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20              25              30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35              40              45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln

```

```

      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln Met
      130

```

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 133

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 28

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1      5      10      15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys Arg Ser Gln
      130

```

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

&lt;400&gt; 29

```

Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1      5      10      15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
 65      70      75      80

```

```

Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85          90          95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100        105        110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115        120        125
Arg Lys Arg Ser
      130

```

<210> 30  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 30
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20        25        30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35        40        45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50        55        60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65        70        75        80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85          90          95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100        105        110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115        120        125
Arg Lys Arg
      130

```

<210> 31  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 31
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
 1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20        25        30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35        40        45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50        55        60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65        70        75        80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr

```

```

      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg Lys
      130

```

<210> 32  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 32
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
  1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu
      100      105      110
Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys
      115      120      125
Arg

```

<210> 33  
 <211> 128  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: C末端被截短的 huIFNG

```

<400> 33
Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn
  1          5          10          15
Ala Gly His Ser Asp Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile
      20      25      30
Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
      35      40      45
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln
      50      55      60
Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys
      65      70      75      80
Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
      85      90      95
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu

```

100 105 110  
 Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys  
 115 120 125

<210> 34

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: Actimmune(r)

<400> 34

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

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 35

His His His His His His  
 1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 36

Met Lys His His His His His His  
 1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 37  
Met Lys His His Ala His His Gln His His  
1 5 10

<210> 38  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 38  
Met Lys His Gln His Gln His Gln His Gln His Gln  
1 5 10

<210> 39  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 39  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
1 5 10

<210> 40  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 40  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5

<210> 41  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列的描述: 标记

<400> 41  
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

<210> 42  
 <211> 498  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：用于使干扰素 $\gamma$ 在CHO细胞中优化表达的表达盒

<400> 42  
 atgaagtaca caagctatat cctggccttt cagctgtgca tcgtgctggg ctccctgggc 60  
 tgctattgcc aggaccctta cgtgaaggag gccgagaacc tgaagaagta cttaaacgcc 120  
 ggccacagcg atgtggccga caatggcaca ctgtttctgg gcatcctgaa gaattggaag 180  
 gagagagcgc atcggaagat catgcagtcc cagatcgtgt cttctatatt caagctgttt 240  
 aagaatttca aggacgatca gtccatccag aagtccgtgg agaccatcaa ggaggacatg 300  
 aacgtgaagt ttttcaatag caataagaag aagagagacg atttcgagaa gctgaccaat 360  
 tactccgtga cagacctgaa cgtgcagaga aaggccatcc acgagctgat ccaggtgatg 420  
 gccgagctgt cccccgccgc caagaccggc aagagaaaga gaagccagat gctgttcaga 480  
 ggacagacggg ccagccag 498

<210> 43  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：引物

<400> 43  
 gatggctggc aactagaag 19

<210> 44  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：引物

<400> 44  
 tgtacggtgg gaggtctat 19

<210> 45  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：引物

<400> 45  
 gttcaggtct gtcacgctgt aattggctcag ctt 33

<210> 46  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 46

aagctgacca attacaccgt gacagacctg aac 33

<210> 47

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 47

catgatcttc cgatcgggtct cgttcttcca att 33

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 48

aattggaaga acgagaccga tcggaagatc atg 33

<210> 49

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 引物

<400> 49

gagtctagat tacagcatct ggcttctctt 30

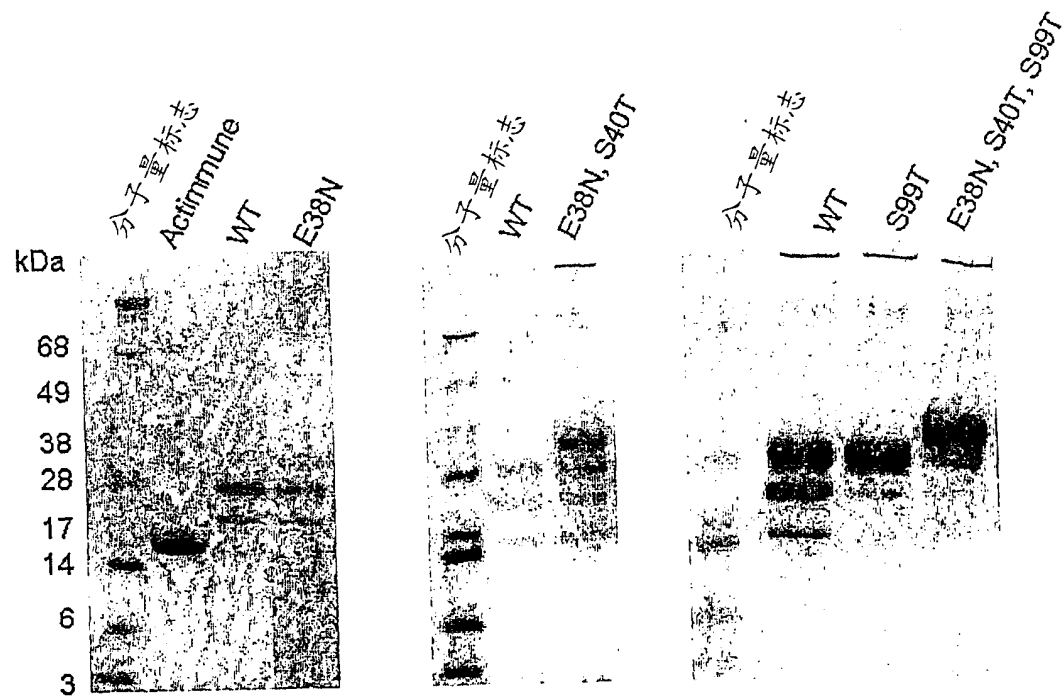


图 1

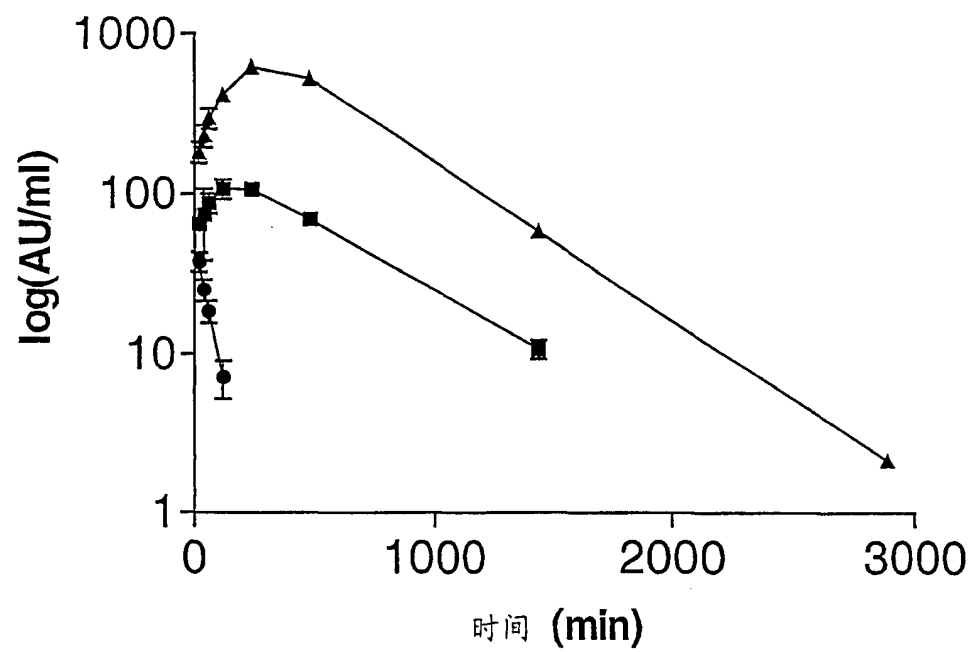


图 2

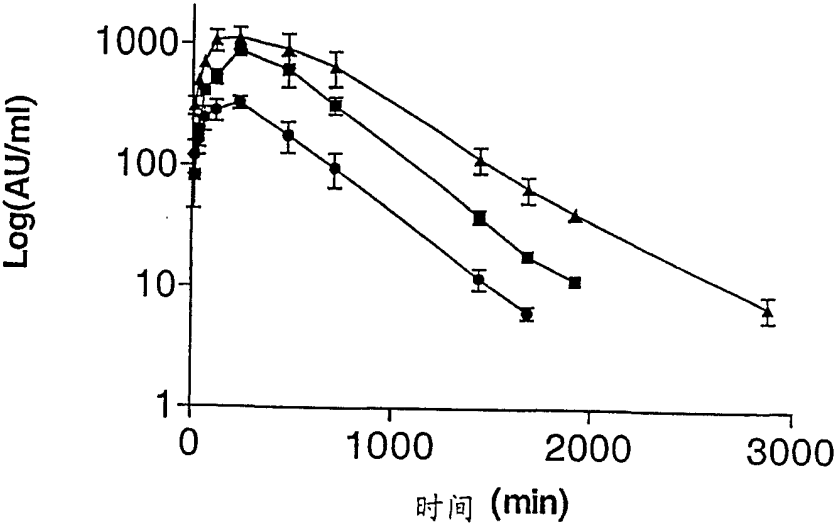


图 3