



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103642898 A

(43) 申请公布日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201310157513. 9 *A61P 31/14* (2006. 01)
(22) 申请日 2006. 05. 03 *A61P 31/16* (2006. 01)
(30) 优先权数据 *A61P 31/18* (2006. 01)
60/677, 680 2005. 05. 04 US *A61P 31/20* (2006. 01)
(62) 分案原申请数据 *A61P 31/22* (2006. 01)
200680022089. 5 2006. 05. 03 *A61P 35/00* (2006. 01)
(71) 申请人 基尼塔图有限责任公司 *G01N 33/573* (2006. 01)
地址 美国华盛顿州
(72) 发明人 S. P. 伊多纳托 C. L. 马格内斯
C. A. 谢勒 P. C. 费林 T. 哈根
A. 奥尔森
(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006. 01)
C12N 9/12 (2006. 01)
C12N 15/54 (2006. 01)
A61K 38/45 (2006. 01)
A61K 45/00 (2006. 01)
A61K 48/00 (2006. 01)
A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书29页
序列表13页 附图10页

(54) 发明名称
OAS1 基因中的突变

(57) 摘要
本发明涉及 OAS1 基因中的突变, 具体的提供了非人灵长类动物中 OAS1 蛋白的经修饰的氨基酸序列, 和与其相关的基因。

OAS1的治疗形式中有用的氨基酸置换的列表

位置	氨基酸置换
1	M 或-(缺失)
31	D 或 N
115	L 或 F
127	G 或 R
162	S 或 G
295	R 或 T
315	G 或 R

1. 用于鉴别寡腺苷酸合成酶基因 (OAS1) 突变的人遗传筛查方法,其包含,检测核酸样品中 OAS1 突变的存在,其中所述突变会导致所编码的 OAS1 蛋白中的至少一处氨基酸修饰。

2. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315 和 335 处具有至少一处氨基酸修饰。

3. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽,所述氨基酸序列具有在位置 363 处的氨基酸修饰。

4. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有与 Genbank 登录号 NP_058132.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 347,350,352,353,354,356,357,361,363,364,365,369,371,373,374,375,378,379,382,388,389 和 394 处具有至少一处氨基酸修饰。

5. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 347,361,364,372,384,385 和 399 处具有至少一处氨基酸修饰。

6. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315,335,347,350,352,353,354,356,357,361,363,364,365,369,371,373,374,375,378,379,382,388,389 和 394 处具有至少一处氨基酸修饰。

7. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315,335 和 363 处具有至少一处氨基酸修饰。

8. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315,335,347,361,364,372,384,385 和 399 处具有至少一处氨基酸修饰。

9. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:5-16 中任一的氨基酸序列的多肽。

10. 多核苷酸,其编码权利要求 2-9 中任一项的多肽。

11. 用于治疗或预防哺乳动物中病毒感染的治疗组合物,其中所述组合物是与药学可接受的载体在一起的权利要求 2-9 中任一项的多肽。

12. 权利要求 11 的治疗组合物,其中所述病毒是黄病毒。

13. 权利要求 12 的治疗组合物,其中所述病毒是丙型肝炎病毒。

14. 用于治疗哺乳动物癌症的治疗组合物,其中所述组合物是与药学可接受的载体在一起的权利要求 2-9 中任一项的多肽。

15. 权利要求 14 的治疗组合物,其中所述癌症是前列腺癌。

16. 用于治疗或预防哺乳动物中病毒感染的治疗化合物,其中所述化合物是权利要求

2-9 中任一项的多肽的活性的抑制剂。

17. 权利要求 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是反义分子。

18. 权利要求 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是 RNAi 分子。

19. 权利要求 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是核酶。

20. 权利要求 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是抗体。

21. 用于测定对病毒感染的抗性的诊断试剂盒,其包含至少一种权利要求 2-9 中任一项的多肽。

22. 权利要求 21 的诊断试剂盒,还包含下述一种或多种:

(a) 关于使用至少一种多肽用于筛选、诊断、预测、治疗监测或这些应用的任意组合的说明书;和

(b) 指示对用于筛选、诊断、预测或治疗应用或其任意组合的政府批准的标签或插入物。

23. 权利要求 21 的诊断试剂盒,其中所述至少一种多肽被可检测地标记。

24. 治疗哺乳动物受试者的病毒性疾病的方法,其包含,给需要这种治疗的受试者提供权利要求 11 的治疗组合物。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述病毒性疾病选自:黄病毒科,小核糖核酸病毒科,肝 DNA 病毒科,冠状病毒科,副粘病毒科,逆转录病毒科,弹状病毒科,乳头瘤病毒科,疱疹病毒科。

26. 权利要求 25 的方法,其中所述病毒性疾病选自:丙型肝炎病毒,黄热病病毒,西尼罗病毒,日本脑炎病毒,登革热病毒,牛病毒性腹泻病毒,乙型肝炎病毒,脑炎心肌炎病毒,人鼻病毒,甲型肝炎病毒,人免疫缺陷病毒,猴免疫缺陷病毒,人嗜 T 淋巴细胞病毒,劳斯肉瘤病毒, SARS 冠状病毒,狂犬病病毒,水泡性口膜炎病毒,呼吸道合胞体病毒,副流感病毒,人乳头瘤病毒和单纯疱疹病毒。

27. 治疗哺乳动物受试者的癌症的方法,其包含,给需要这种治疗的受试者提供权利要求 14 的治疗组合物。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述癌症选自:肾上腺皮质癌,AIDS 相关的癌症,卡波西肉瘤, AIDS- 相关的淋巴瘤,肛门癌,星形细胞瘤,基底细胞癌,胆管癌,膀胱癌,骨癌,骨肉瘤,恶性纤维组织细胞瘤,脑干神经胶质瘤,脑肿瘤,神经胶质瘤,星形细胞瘤,恶性神经胶质瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤,神经母细胞瘤,幕上原发性神经外胚层瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤,乳腺癌,支气管腺瘤,伯基特淋巴瘤,类癌瘤,中枢神经系统淋巴瘤,子宫颈癌,白血病,毛细胞性白血病,急性成淋巴细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病和慢性髓细胞性白血病,慢性骨髓增生障碍,结肠直肠癌,皮肤 T- 细胞淋巴瘤,子宫内膜癌,食管癌,尤因家族肿瘤,颅外生殖细胞肿瘤,性腺外生殖细胞肿瘤,眼癌,眼内黑素瘤,视网膜母细胞瘤,胆囊癌,胃癌,妊娠性滋养层细胞瘤,头颈癌,肝细胞癌,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,原发性 CNS 淋巴瘤,鼻咽癌,胰岛细胞癌,肾(肾细胞)癌,喉癌,唇和口腔癌,肝癌,肺癌,非小细胞和小细胞肺癌,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,梅克尔细胞癌,间皮瘤,转移性鳞状颈癌,多发性内分泌瘤病,多发性骨髓瘤,浆细胞肿瘤,蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征,骨髓增生性疾病,鼻腔和鼻窦癌,卵巢癌例如生殖细胞和上皮性低恶性潜能卵巢肿瘤,胰腺癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,嗜铬细胞瘤,垂体肿瘤,胸膜肺母细

胞瘤,前列腺癌,横纹肌肉瘤,唾液腺癌,肉瘤,塞扎里综合征,皮肤癌例如黑素瘤和鳞状上皮细胞癌,睾丸癌,胸腺瘤,胸腺癌,甲状腺癌,移行细胞癌,滋养层细胞瘤,尿道癌,子宫癌,阴道癌,外阴癌和肾母细胞瘤。

OAS1 基因中的突变

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 05 月 03 日,申请号为 200680022089.5(国际申请号为 PCT/US2006/016983),名称为“OAS1 基因中的突变”的发明专利申请的分案申请。

1. 技术领域

[0002] 本发明涉及检测人或非人灵长类动物寡腺苷酸合成酶基因中的突变的方法,和具有至少一处氨基酸修饰的 OAS1 蛋白。

[0003] 2. 发明背景

[0004] 迄今为止已鉴别出其中人群中存在天然的感染抗性的多种疾病。Alter 和 Moyer, J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol. 18Suppl. 1:S6-10(1998) 报导在诸如注射药物使用者的高危群组中的丙型肝炎病毒感染(HCV) 率高达 90%。然而,尚未有文献确认剩余的 10% 明显对抗感染的机制。在 HCV 感染中起作用的蛋白包括 2'-、5'- 寡腺苷酸合成酶。OAS 是干扰素诱导蛋白,其特征为能催化 2'-、5'- 腺苷寡聚物(2-5A) 的合成。Hovanessian 等,EMBOJ. 6:1273-1280(1987) 发现,经干扰素处理的人类细胞含有数种对应于 40(OAS1)、46(OAS1)、69 及 100kD 的蛋白的 OAS。Marie 等, Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:580-587(1989) 制备了高度特异性的抗 p69(69-kD OAS) 多克隆抗体。通过以抗 -p69 抗体筛选经干扰素处理的人类细胞表达文库, Marie 和 Hovanessian, J. Biol. Chem. 267:9933-9939(1992) 分离出了部分 OAS2 cDNA。他们以该部分 cDNA 筛选其它文库,并回收了编码两个 OAS2 同种型的 cDNA。较小的同种型由 3'- 非翻译区长度不同的两种 mRNA 编码。

[0005] RNA 印迹分析揭示, OAS2 在人类细胞中表达为四种由干扰素诱导的 mRNA。预测的 OAS2 蛋白具有共同的 683- 氨基酸序列和不同的 3'- 末端。根据体外转录 / 翻译产物的 SDS—PAGE, 两个同种型的分子质量为 69 和 71kD。两个同种型在体外均显示出 OAS 活性。序列分析表明, OAS2 含有两个由富含脯氨酸的推定连接区所分隔的 OAS1- 同源域。N 末端及 C 末端域分别与 OAS1 有 41% 和 53% 同一性。

[0006] 通过荧光原位杂交和通过包含于作图克隆(mapped clones) 之内, Hovanian 等, Genomics 52:267-277(1998) 确定 OAS1、OAS2 和 OAS3 基因与 12q24.2 上的 130-kb 区域簇集在一起。2-5A 会结合至降解病毒及细胞 RNA 的 RNA 酶 I, 并将它激活, 从而导致细胞蛋白合成的抑制和病毒复制的削弱。

[0007] 被称为 OASL 的第四种人类 OAS 基因与 OAS1、OAS2 和 OAS3 的不同在于 OASL 缺乏酶活性。OASL 基因编码双域蛋白, 后者由融合至与泛素的串联重复同源的 164 个氨基酸 C 末端域的 OAS 单元组成。(Eskildsen 等, Nuc. Acids Res. 31:3166-3173, 2003; Kakuta 等, J. Interferon & Cytokine Res. 22:981-993, 2002.)

[0008] 由于它们在抑制病毒复制和病毒感染中的作用, 本领域需要与 OAS1 活性有关的抑制病毒复制的方法和组合物, 包括十分需要抑制 HCV 复制的基于抑制剂的疗法。

发明内容

[0009] 本发明涉及检测与丙型肝炎抗性有关的突变,所述突变可以表征为寡腺苷酸合成酶 1 基因中的突变。

[0010] 在一个实施方案中,包括遗传筛查方法。该方法包含,测定从人或非人灵长类动物分离的核酸样品中是否存在寡腺苷酸合成酶 1 基因突变,该突变造成所有寡腺苷酸合成酶 1(OAS1)形式(包括但不限于 SEQ ID NO:1)在下述一个或多个位置处的氨基酸修饰:1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 和 335。

[0011] 在另一个实施方案中,包括遗传筛查方法。该方法包含,测定从人或非人灵长类动物分离的核酸样品中是否存在寡腺苷酸合成酶 1 基因突变,该突变造成与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID NO:3)在位置 363 处的氨基酸修饰。

[0012] 在另一个实施方案中,包括遗传筛查方法。该方法包含,测定从人或非人灵长类动物分离的核酸样品中是否存在寡腺苷酸合成酶 1 基因突变,该突变造成与 Genbank 登录号 NP_058132.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID NO:2)在下述一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰:347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 或 394。

[0013] 在另一个实施方案中,包括遗传筛查方法。该方法包含,测定从人或非人灵长类动物分离的核酸样品中是否存在寡腺苷酸合成酶 1 基因突变,该突变造成与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID NO:4)在下述一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰:347, 361, 364, 372, 384, 385 或 399。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种蛋白,其具有在所有寡腺苷酸合成酶 1(OAS1)形式(包括但不限于 SEQ ID NO:1)的位置 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 和 335 处的至少一处氨基酸修饰,和所述蛋白在制备对病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎感染的抗性的诊断剂中的应用。在具体的实施方案中,所述诊断剂是抗体。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种 OAS1 蛋白,其具有与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID NO:3)的位置 363 处的氨基酸修饰,和所述蛋白在制备对病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎感染的抗性的诊断剂中的应用。在具体的实施方案中,所述诊断剂是抗体。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种 OAS1 蛋白,其具有与 Genbank 登录号 NP_058132.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID NO:2)的位置 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 和 394 处的至少一处氨基酸修饰,和所述蛋白在制备对病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎感染的抗性的诊断剂中的应用。在具体的实施方案中,所述诊断剂是抗体。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种 OAS1 蛋白,其具有与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的所有寡腺苷酸合成酶 1 形式(包括但不限于 SEQ ID

NO:4) 的位置 347,361,364,372,384,385 或 399 处的至少一处氨基酸修饰,和所述蛋白在制备对病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎感染的抗性的诊断剂中的应用。在具体的实施方案中,所述诊断剂是抗体。

[0018] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或抑制病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎病毒感染的治疗化合物,其中所述治疗化合物是具有至少一处根据本发明的氨基酸修饰的蛋白。在其它实施方案中,所述治疗化合物是编码该蛋白的多核苷酸,例如 DNA 或 RNA。

[0019] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或抑制病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎病毒感染的治疗化合物,其中所述治疗化合物是本发明的 OAS1 编码的具有至少一处或多处所公开的氨基酸修饰的蛋白。

[0020] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或抑制病毒感染、优选黄病毒感染、最优选丙型肝炎病毒感染的治疗化合物,其中所述治疗化合物会模拟至少一种本发明突变的有益作用。所述治疗化合物可以是小分子,蛋白,肽, DNA 或 RNA 分子,或抗体。

[0021] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或治疗癌症、优选前列腺癌的治疗化合物,其中所述治疗化合物是具有至少一种本发明突变的 OAS1 基因编码的蛋白。在其它实施方案中,所述治疗化合物是编码该蛋白的多核苷酸,例如 DNA 或 RNA。

[0022] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或治疗癌症、优选前列腺癌的治疗化合物,其中所述治疗化合物是 OAS1 蛋白,其具有至少一处本发明的氨基酸修饰。

[0023] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于预防或治疗癌症、优选前列腺癌的治疗化合物,其中所述治疗化合物会模拟至少一种本发明突变的有益作用。所述治疗化合物可以是小分子,蛋白,肽, DNA 或 RNA 分子,或抗体。

[0024] 在其它实施方案中,所述治疗化合物能抑制 OAS1 或完整蛋白的至少一个亚区或子功能的活性,这样的化合物由能特异性地结合 OAS1 多核苷酸的反义分子、核酶和 RNAi 分子代表,也由能特异性地结合 OAS1 蛋白和多肽的抗体和其片段代表。

[0025] 在另一个实施方案中,本发明提供了 OAS1 的抑制剂。本发明的抑制剂包括但不限于,反义分子,核酶, RNAi, 抗体或抗体片段, 蛋白或多肽以及小分子。示例性的反义分子包含编码具有至少一处本发明氨基酸修饰的 OAS1 的多核苷酸的至少 10、15 或 20 个连续核苷酸,或会在严格条件下与所述多核苷酸杂交的连续核苷酸。

[0026] 在另一个实施方案中,预见到 OAS1 的抑制剂,其会特异性地结合具有本发明氨基酸修饰的 OAS1 多肽限定的蛋白区域。本发明的抑制剂包括但不限于抗体,抗体片段,小分子,蛋白,或多肽。

[0027] 在另一个实施方案中,预见到 OAS1 的抑制剂,其包含反义或 RNAi 分子,其会特异性地结合或杂交编码具有至少一处本发明氨基酸修饰的 OAS1 蛋白的多核苷酸。

[0028] 在其它实施方案中,提供了组合物,其包含在药学可接受的载体中的一种或多种 OAS1 抑制剂。

[0029] 其它实施方案提供了降低 OAS1 基因表达或生物活性的方法。

[0030] 其它实施方案提供了特异性地增加或减少具有至少一个本发明所公开突变的某些形式 OAS1 基因的表达的方法。

[0031] 本发明提供了包含至少一处经修饰的核苷间键合的反义寡核苷酸。

- [0032] 本发明还提供了具有硫代磷酸键合的反义寡核苷酸。
- [0033] 本发明还提供了包含至少一个修饰的糖部分的反义寡核苷酸。
- [0034] 本发明也提供了包含至少一个修饰的糖部分的反义寡核苷酸，所述修饰的糖部分是 2' 0 甲基糖部分。
- [0035] 本发明还提供了包含至少一个修饰的核酸碱基(nucleobase)的反义寡核苷酸。
- [0036] 本发明还提供了具有一个修饰的核酸碱基的反义寡核苷酸，其中所述修饰的核酸碱基是 5 甲基胞嘧啶。
- [0037] 本发明也提供了反义化合物，其中所述反义化合物是嵌合寡核苷酸。
- [0038] 本发明提供了抑制人细胞或组织中 OAS1 的表达的方法，其包含，使细胞或组织体内接触靶向编码人 OAS1 的核酸分子的反义化合物或核酶(长度为 8-35 核苷酸)，从而抑制人 OAS1 的表达。
- [0039] 本发明还提供了使用反义或 RNAi 化合物或核酶，减少或增加特定形式的 OAS1 体内表达的方法，这样的形式由具有至少一个在根据本发明的位置处的突变来定义。
- [0040] 本发明还提供了调控癌细胞的生长的方法，其包含，使癌细胞体内接触靶向编码人 OAS1 的核酸分子的反义化合物或核酶(长度为 8-35 核苷酸)，从而抑制人 OAS1 的表达。
- [0041] 本发明还提供了 OAS1 多核苷酸靶区的鉴别。本发明也提供了标记的探针，其用于通过原位杂交鉴别 OAS1 多核苷酸。
- [0042] 本发明提供了根据本发明的 OAS1 抑制剂在制备用于预防或抑制 HCV 感染的药物中的应用。
- [0043] 本发明还提供了将 OAS1 抑制剂导向 OAS1 蛋白的特定区域或该蛋白的特定功能。
- [0044] 本发明也提供了一种用于抑制 OAS1 的表达的药物组合物，其包含与生理上可接受的载体或稀释剂相混合的根据本发明的反义寡核苷酸。
- [0045] 本发明还提供了一种能特异性切割 OAS1RNA 的核酶，和包含该核酶的药物组合物。
- [0046] 本发明也提供了 OAS1 的小分子抑制剂，其中所述抑制剂能降低 OAS1 的活性，或减少或阻止 OAS1mRNA 的表达。
- [0047] 本发明还提供了 OAS1 的抑制剂，其会修饰该蛋白的除合成 2' -5' 寡核苷酸以外的特定功能，这样的功能包括与其它蛋白(例如丙型肝炎病毒 NS5A 蛋白)的相互作用。
- [0048] 本发明还提供了改变 OAS1 的翻译后修饰的化合物，所述翻译后修饰包括但不限于糖基化和磷酸化。
- [0049] 本发明还提供了用于鉴别寡核苷酸合成酶基因突变的人遗传筛查方法，其包含：(a) 在扩增条件下，用聚合酶链式反应(PCR)引物对处理来自人的基因组 DNA 样品，以扩增含有至少一个根据本发明的 OAS1 基因突变的人基因组 DNA 区域，所述处理会产生含有所述区域的扩增产物；和 (b) 检测步骤 (a) 的扩增产物中是否存在在本发明的核苷酸位置处的核苷酸突变，从而鉴别所述突变。
- [0050] 本发明也涉及检测人中包含突变的丙型肝炎感染抗性基因等位基因的方法，所述突变包含，在与寡核苷酸合成酶(OAS1)基因编码的 OAS1 蛋白中本发明氨基酸修饰相对应的核苷酸位置处，用非野生型核苷酸置换野生型核苷酸，该方法包含：(a) 通过在 PCR 缓冲液中混合来自所述人的基因组 DNA 样品和寡核苷酸合成酶基因-特异性的 PCR 引物对，形

成聚合酶链式反应 (PCR) 混合物; (b) 对该 PCR 混合物进行多个 PCR 热循环, 生产寡腺苷酸合成酶基因扩增产物; 和 (c) 在杂交条件下, 用能检测所述突变的探针, 处理在步骤 (b) 中生成的产物。

[0051] 也提供了分离的 OAS1 抑制剂, 其选自: 反义寡核苷酸, 核酶, 小抑制 RNA (RNAi), 蛋白, 多肽, 抗体和小分子。所述分离的抑制剂可以是反义分子或其互补物, 其包含与本发明氨基酸置换相关的 OAS1 基因突变相对应的多核苷酸序列的至少 15 个连续核酸。

[0052] 分离的 OAS1 抑制剂可以选自抗体和抗体片段。也提供了组合物, 其包含在药学可接受的载体中的治疗有效量的至少一种 OAS1 抑制剂。

[0053] 本发明也涉及抑制哺乳动物细胞中 OAS1 表达的方法, 其包含, 给所述细胞施用选自下述的 OAS1 抑制剂: 反义寡核苷酸, 核酶, 蛋白, RNAi, 多肽, 抗体和小分子。

[0054] 本发明还涉及抑制受试者中 OAS1 基因表达的方法, 其包含, 给所述受试者施用药学有效载体中的一定量的反义寡核苷酸, 其能有效地特异性杂交源自所述 OAS1 基因的选定靶核酸序列的全部或一部分。

[0055] 本发明还涉及预防对黄病毒感染易感的人受试者中黄病毒感染的方法, 其包含, 给所述人受试者施用选自下述的 OAS1 抑制剂: 反义寡核苷酸, 核酶, RNAi, 蛋白, 多肽, 抗体和小分子, 其中所述 OAS1 抑制剂会预防所述黄病毒的感染。

[0056] 本发明还涉及如下方面:

[0057] 1. 用于鉴别寡腺苷酸合成酶基因 (OAS1) 突变的人遗传筛查方法, 其包含, 检测核酸样品中 OAS1 突变的存在, 其中所述突变会导致所编码的 OAS1 蛋白中的至少一处氨基酸修饰。

[0058] 2. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白, 其包含具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽, 例外是在位置 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315 和 335 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0059] 3. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白, 其包含具有与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽, 所述氨基酸序列具有在位置 363 处的氨基酸修饰。

[0060] 4. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白, 其包含具有与 Genbank 登录号 NP_058132.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽, 例外是在位置 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 和 394 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0061] 5. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白, 其包含具有与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白的氨基酸序列的多肽, 例外是在位置 347, 361, 364, 372, 384, 385 和 399 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0062] 6. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白, 其包含具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽, 例外是在位置 1, 24, 25, 28, 31, 36, 47, 53, 54, 64, 69, 74, 104, 108, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 127, 130, 139, 142, 160, 161, 162, 166, 175, 179, 226, 242, 246, 248, 250, 254, 274, 279, 282, 284, 288, 289, 292, 295, 314, 315, 335, 347, 350, 352, 353, 354, 356, 357, 361, 363, 364, 365, 369, 371, 373, 374, 375, 378, 379, 382, 388, 389 和 394 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0063] 7. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315,335 和 363 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0064] 8. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的多肽,例外是在位置 1,24,25,28,31,36,47,53,54,64,69,74,104,108,112,113,114,115,116,117,118,119,127,130,139,142,160,161,162,166,175,179,226,242,246,248,250,254,274,279,282,284,288,289,292,295,314,315,335,347,361,364,372,384,385 和 399 处具有至少一处氨基酸修饰。

[0065] 9. 寡腺苷酸合成酶 1 蛋白,其包含具有 SEQ ID NO:5-16 中任一氨基酸序列的多肽

[0066] 10. 多核苷酸,其编码项 2-9 中任一项的多肽。

[0067] 11. 用于治疗或预防哺乳动物中病毒感染的治疗组合物,其中所述组合物是与药学可接受的载体在一起的项 2-9 中任一项的多肽。

[0068] 12. 项 11 的治疗组合物,其中所述病毒是黄病毒。

[0069] 13. 项 12 的治疗组合物,其中所述病毒是丙型肝炎病毒。

[0070] 14. 用于治疗哺乳动物癌症的治疗组合物,其中所述组合物是与药学可接受的载体在一起的项 2-9 中任一项的多肽。

[0071] 15. 项 14 的治疗组合物,其中所述癌症是前列腺癌。

[0072] 16. 用于治疗或预防哺乳动物中病毒感染的治疗化合物,其中所述化合物是项 2-9 中任一项的多肽的活性的抑制剂。

[0073] 17. 项 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是反义分子。

[0074] 18. 项 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是 RNAi 分子。

[0075] 19. 项 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是核酶。

[0076] 20. 项 16 的治疗化合物,其中所述治疗化合物是抗体。

[0077] 21. 用于测定对病毒感染的抗性的诊断试剂盒,其包含至少一种项 2-9 中任一项的多肽。

[0078] 22. 项 21 的诊断试剂盒,还包含下述一种或多种:

[0079] (a) 关于使用至少一种多肽用于筛选、诊断、预测、治疗监测或这些应用的任意组合的说明书;和

[0080] (b) 指示对用于筛选、诊断、预测或治疗应用或其任意组合的政府批准的标签或插入物。

[0081] 23. 项 21 的诊断试剂盒,其中所述至少一种多肽被可检测地标记。

[0082] 24. 治疗哺乳动物受试者的病毒性疾病的方法,其包含,给需要这种治疗的受试者提供项 11 的治疗组合物。

[0083] 25. 项 24 的方法,其中所述病毒性疾病选自:黄病毒科,小核糖核酸病毒科,肝 DNA 病毒科,冠状病毒科,副粘病毒科,逆转录病毒科,弹状病毒科,乳头瘤病毒科,疱疹病毒科。

[0084] 26. 项 25 的方法,其中所述病毒性疾病选自:丙型肝炎病毒,黄热病病毒,西尼罗

病毒,日本脑炎病毒,登革热病毒,牛病毒性腹泻病毒,乙型肝炎病毒,脑炎心肌炎病毒,人鼻病毒,甲型肝炎病毒,人免疫缺陷病毒,猴免疫缺陷病毒,人嗜 T 淋巴细胞病毒,劳斯肉瘤病毒, SARS 冠状病毒,狂犬病病毒,水泡性口膜炎病毒,呼吸道合胞体病毒,副流感病毒,人乳头瘤病毒和单纯疱疹病毒。

[0085] 27. 治疗哺乳动物受试者的癌症的方法,其包含,给需要这种治疗的受试者提供项 14 的治疗组合物。

[0086] 28. 项 27 的方法,其中所述癌症选自:肾上腺皮质癌,AIDS 相关的癌症,卡波西肉瘤,AIDS- 相关的淋巴瘤,肛门癌,星形细胞瘤,基底细胞癌,胆管癌,膀胱癌,骨癌,骨肉瘤,恶性纤维组织细胞瘤,脑干神经胶质瘤,脑肿瘤,神经胶质瘤,星形细胞瘤,恶性神经胶质瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤,神经母细胞瘤,幕上原发性神经外胚层瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤,乳腺癌,支气管腺瘤,伯基特淋巴瘤,类癌瘤,中枢神经系统淋巴瘤,子宫颈癌,白血病,毛细胞性白血病,急性成淋巴细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病和慢性髓细胞性白血病,慢性骨髓增生障碍,结肠直肠癌,皮肤 T- 细胞淋巴瘤,子宫内膜癌,食管癌,尤因家族肿瘤,颅外生殖细胞肿瘤,性腺外生殖细胞肿瘤,眼癌,眼内黑素瘤,视网膜母细胞瘤,胆囊癌,胃癌,妊娠性滋养层细胞瘤,头颈癌,肝细胞癌,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,原发性 CNS 淋巴瘤,鼻咽癌,胰岛细胞癌,肾(肾细胞)癌,喉癌,唇和口腔癌,肝癌,肺癌,非小细胞和小细胞肺癌,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,梅克尔细胞癌,间皮瘤,转移性鳞状颈癌,多发性内分泌瘤病,多发性骨髓瘤,浆细胞肿瘤,蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征,骨髓增生性疾病,鼻腔和鼻旁窦癌,卵巢癌例如生殖细胞和上皮性低恶性潜能卵巢肿瘤,胰腺癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,嗜铬细胞瘤,垂体肿瘤,胸膜肺母细胞瘤,前列腺癌,横纹肌肉瘤,唾液腺癌,肉瘤,塞扎里综合征,皮肤癌例如黑素瘤和鳞状上皮细胞癌,睾丸癌,胸腺瘤,胸腺癌,甲状腺癌,移行细胞癌,滋养层细胞瘤,尿道癌,子宫癌,阴道癌,外阴癌和肾母细胞瘤。

[0087] 附图简述

[0088] 图 1 是优选治疗形式的 OAS1 蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)。

[0089] 图 2 是在所有治疗形式的 OAS1 中有用的氨基酸置换的列表。

[0090] 图 3 是在治疗形式的 OAS1 中有用的灵长类动物 OAS1 氨基酸修饰的列表。标有 * 的位置表示与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的 OAS1 形式(例如 SEQ ID NO:3)。标有 + 的位置表示与 Genbank 登录号 NP_058132.1 在羧基末端同源的 OAS1 形式(例如 SEQ ID NO:2)。标有 ^ 的位置表示与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的 OAS1 形式(例如 SEQ ID NO:4),所有其它未标记的位置涉及所有 OAS1 形式。

[0091] 图 4 中的图表标明了灵长类动物 OAS1 基因的突变位置和对应的氨基酸修饰。氨基酸位置参照所有 OAS1 形式(例如,SEQ ID NO:1-4 和 Genbank 登录号 NP_002525.1 和 NP_058132.1),除了 * 表明仅相对于 NP_002525.1 同源形式的位置,+ 表明仅相对于 NP_058132.1 同源形式的位置,而 ^ 表明仅相对于 NP_001027581.1 同源形式的位置。

[0092] 图 5 列出了本发明的其它 OAS1 同种型,包括人和非人灵长类动物形式。也提供了灵长类动物同种型的突变。这些同种型无论是单独还是与在本发明中鉴别出的任何突变一起,都可以用于本文所述的诊断、治疗、和其它目的。

[0093] 发明详述

[0094] 本发明涉及寡核苷酸合成酶 1 基因中的新突变,这些突变在诊断对病毒感染的易感性或抗性中的应用,具有根据本发明的突变的基因编码的蛋白,和使用所述蛋白、抗体和相关核酸预防或抑制病毒感染。这些突变与载体对黄病毒感染、尤其丙型肝炎病毒感染的抗性有关。

[0095] 许多当前的医学研究集中于鉴别引起或促成疾病的突变和缺陷。所述研究意在产生针对疾病状态的化合物和治疗方法。对于尽管暴露于感染剂及其它危险因素但仍然使人们保持健康的遗传影响的研究则较少关注。本发明代表了发明者所研发的方法的成功应用,由此确定并分析人受试者的特定群体,以便揭示赋予对疾病的抗性的遗传变异或突变。对具有对特定疾病或生物学状况的天然抗性的亚群体部分的鉴别,进一步使得能鉴别对于药物干预、诊断评估或预防(诸如预防性接种)为适合靶标的基因和蛋白。

[0096] 先前在共同未决申请系列号 10/972,135 中,鉴别和公开了亚群体部分,其包含尽管反复暴露于丙型肝炎病毒(HCV)但是仍保持血清阴性(而同类者已受感染(血清阳性))的个体。所研究的群体包括经受反复输血的血友病患者,和由于共用针头及其它危险因素而暴露的静脉内药物使用者。

[0097] 本公开内容提供了在非人灵长类动物 OAS1 基因中鉴别出的突变,如实施例 1 所述。

[0098] 申请系列号 10/972,135 提供了与以下有关的公开内容:HCV 感染;定义;发明的实现方式;多核苷酸分析;多核苷酸引物的制备;聚合酶链式反应;核酸序列分析;膜固定化的靶序列的检测;用于检测碱基置换的扫描技术;用于恢复和/或增强 OAS1 功能的治疗剂;抑制 OAS1 功能的治疗剂;核酶;RNAi;蛋白和多肽;小分子;评价 OAS1 抑制剂功效的方法;和药物组合物。申请系列号 10/972,135 在此整体通过参考并入本文。

[0099] 作为它们的天然功能的一部分,本发明的多肽能跨细胞膜转导,并在没有递送载体或表达介质的情况下介导它们的抗病毒作用。以前已经描述了碱性的带正电荷的蛋白的细胞转导性质,且是本领域技术人员众所周知的(Ryser 和 Hancock, Science. 1965 Oct 22; 150(695):501-3)。

[0100] 在多肽制备成液体制剂并通过注射给药的情况下,优选溶液为含有 140mM 氯化钠和 10mM 钙的 pH 值为 7.4 的等渗盐溶液。例如可以以治疗有效量给予注射,考虑到给药途径、患者健康状况等因素,优选的剂量为每日约 1 μ g/kg 体重至约 5mg / kg 体重。

[0101] 本发明的多肽可与合适的药用载体联合使用。这样的组合物包含治疗有效量的蛋白和药学可接受的载体或赋形剂。所述载体包括但不限于盐水、缓冲盐水、右旋糖、水、甘油、乙醇及其组合。制剂应适于给药模式。

[0102] 本发明的多肽也可通过将多肽化学连接至一个或多个部分或缀合物而进行修饰,以增强多肽的活性、细胞分布或细胞摄入。所述部分或缀合物包括脂质诸如胆固醇、胆酸、硫醚、脂族链、磷脂及其衍生物,多元胺,聚乙二醇(PEG),棕榈基部分和其它,例如于美国专利 5,514,758,5,565,552,5,567,810,5,574,142,5,585,481,5,587,371,5,597,696 和 5,958,773 中公开的。

[0103] 也可修饰本发明的多肽,以靶向于特定疾病适应症的特定细胞类型,包括但不限于丙型肝炎感染情况中的肝细胞。如本领域技术人员所能了解的,已经描述了达成所述靶向目标的适当方法,这些方法包括但不限于脂质体靶向、受体介导的胞吞作用和抗体-抗

原结合。在一个实施方案中,可通过将半乳糖部分加到多肽,将脱唾液酸糖蛋白受体用于靶向肝细胞。在另一个实施方案中,可将甘露糖部分缀合到多肽上,以便靶向存在于巨噬细胞和肝细胞上的甘露糖受体。如本领域技术人员已知的,可以组合多种递送和靶向方法。例如,通过包封在脂质体内,本发明的多肽可以靶向肝细胞,这样的脂质体缀合到用于靶向脱唾液酸糖蛋白受体的半乳糖上。

[0104] 本发明也提供了一种药物包或试剂盒,其包含一个或多个容器,其中装有本发明药物组合物的一种或多种成分。所述容器可伴随有管理药品或生物产品的制备、使用或销售的政府机构规定形式的公告,此公告反映该机构对用于人给药的制备、使用或销售的批准。另外,本发明的多肽可与其它治疗性化合物联合使用。

[0105] 当本发明的多肽用作药物时,其可在适当介质中施用给哺乳动物。当本发明的多肽用作如上所述的药物时,考虑到给药途径、患者健康状况等因素,其例如以每日约 10 μ g/kg 体重至约 10mg/kg 体重的治疗有效剂量来给药。给药量优选地足以实现预防或抑制病毒感染、优选黄病毒感染、最优选 RSV 和 HCV 感染,预防或治疗癌症、炎症、糖尿病、或其它疾病。

[0106] 蛋白、它们的片段或其它衍生物、或其类似物、或表达它们的细胞,可以用作免疫原来生产抗它们的抗体。这些抗体可以是,例如,多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链、Fab 片段或 Fab 表达文库的产物。本领域已知的多种方法可用于产生多克隆抗体。

[0107] 通过将多肽直接注射进动物,或通过多肽施用给动物(优选为非人类),可获得针对本发明的多肽而产生的抗体。由此获得的抗体随后将结合多肽本身。以此方式,甚至仅编码多肽片段的序列也可用于产生结合整个天然多肽的抗体。此外,也可以使用对大量多肽特异性的一组这样的抗体。

[0108] 关于单克隆抗体的制备,可以使用通过连续细胞系培养物产生抗体的任何技术。实例包括杂交瘤技术(Kohler 和 Milstein, 1975, Nature, 256:495-597)、三源杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等, 1983, Immunology Today 4:72)和用以生产人单克隆抗体的 EBV- 杂交瘤技术(Coe 等, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. 第 77-96 页)。

[0109] 用于产生单链抗体所述的技术(美国专利第 4,946,778 号)可适于产生抗本发明的免疫原性多肽产物的单链抗体。

[0110] 所述抗体可用于涉及本发明的蛋白序列定位和活性的方法中,例如,用于这些蛋白的成像、测量其在适当生理样品中的水平等。

[0111] 本发明提供了与图 1-5 的多肽有 1-34 个氨基酸的差异的多肽,这样的差异可以包括置换,插入,缺失,修饰的氨基酸或氨基酸衍生物的掺入,从多肽的 C- 末端或 N- 末端添加或删除氨基酸。本发明提供了这些多肽的治疗性和预防性应用,包括但不限于治疗病毒感染、肿瘤、癌症、糖尿病,和促进细胞生长和分化和组织再生。本发明提供了编码本发明多肽的多核苷酸和其应用,包括但不限于在生产所述多肽中的应用,用作基因治疗,用作诊断工具等。

[0112] 药物组合物

[0113] 本发明提供了所述多肽作为活性成分的用于治疗应用的药物组合物。这些组合物也可以用于本发明的方法中。一般而言,用于抑制哺乳动物或受试者的病毒感染、癌症、肿

瘤、炎症或其它疾病的药物组合物,包含有效量的至少一种用于实施本发明所需的上述多肽,或其显示出具有相同作用的片段,和药理学和生理上可接受的载体或稀释剂。根据本发明,药物组合物可以包含组合的 2 种或多种图 1-5 多肽。药物组合物还可以包含单一多肽,后者在连续(contiguous)分子内含有一处或多处图 1-5 的修饰。

[0114] 组合物可以经口地、皮下地、或肠胃外地施用,后者包括静脉内的,动脉内的,肌肉内的、腹腔内的和鼻内的给药以及根据需要使用鞘内和输注技术。药理学可接受的载体、稀释剂、辅剂和介质以及植入载体通常指不与本发明活性成分反应的惰性的、无毒的固体或液体填充剂、稀释剂或包封材料。在组合物中也可以包含阳离子脂质,以促进多肽摄入。化合物的埋植剂也是有用的。一般而言,药物组合物是无菌的。

[0115] 本发明涉及多肽的组合物,所述多肽上结合有检测标记,例如荧光、化学发光或放射性分子。

[0116] 另一个实例是使用已知材料通过已知技术可以配制的药物组合物,参见,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pp. 1435-1712,其通过参考并入本文。通常,配方将取决于许多因素,例如给药、稳定性、生产问题和其它因素。图 1-5 的多肽可以注射给药,或通过吸入进行肺给药。也可以使用肠剂型,因此经口给药可能是有效的。本发明的多肽可以插入脂质体或其它微载体中递送,且可以配制在凝胶或其它用于持续释放的组合物中。尽管优选的组合物会随组合物的目标用途而异,一般而言,对于本发明的多肽,优选的药物组合物是为皮下注射或通过吸入进行肺给药而制备的组合物,尽管每种类型的给药的特定制剂取决于特定多肽的特征。

[0117] 本发明的多肽或多肽缀合物的治疗性制剂通常在组合物中施用,所述组合物包含一种或多种药理学可接受的载体或赋形剂。这样的药物组合物可以以本领域本身已知的方式制备,以产生保藏上足够稳定的且适合施用给人或动物的多肽药物。

[0118] 本发明多肽或多肽缀合物可以“原样”和 / 或以其盐形式使用。合适的盐 包括但不限于,与碱金属或碱土金属的盐,例如钠、钾、钙和镁以及例如锌盐。这些盐或复合物可以作为晶体和 / 或无定形结构存在。

[0119] “药理学可接受的”指在使用的剂量和浓度不会对施用的患者造成任何不良反应的载体或赋形剂。这样的药理学可接受的载体和赋形剂是本领域众所周知的(参见 Remington's Pharmaceutical Sciences,第 18 版, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Company (1990); Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, S. Frokjaer 和 L. Hovgaard, Eds., Taylor & Francis (2000); 和 Handbook of Pharmaceutical Excipients,第 3 版, A. Kibbe, Ed., Pharmaceutical Press (2000))。

[0120] 本发明的组合物可以单独施用,或与其它治疗剂联合施用。例如,已经证实,利巴韦林和干扰素 α 在联合使用时,会有效地治疗 HCV 感染。它们的联合功效超过了单独使用任一种药物产品时的功效。本发明的组合物可以单独施用,或与干扰素、利巴韦林和 / 或针对病毒靶物(病毒蛋白酶,病毒聚合酶,病毒复制复合物的装配)和宿主靶物(病毒加工所需的宿主蛋白酶,病毒靶物(例如 NS5A)磷酸化所需的宿主激酶和有效利用病毒 IRES 所需的宿主因子的抑制剂)开发的许多小分子联合施用。细胞因子可以共同施用,例如 IL-2, IL-12, IL-23, IL-27, 或 IFN- γ 。这些试剂可以作为同一药物组合物的一部分而掺入,或可

以与本发明的多肽或缀合物分开施用,无论是同时并行还是根据另一个治疗方案。另外,本发明的多肽、多肽缀合物或组合物可以用作其它治疗的辅助。

[0121] 用于本发明目的的“患者”包括人和其它哺乳动物。因而,该方法适用于人治疗和兽医应用。

[0122] 包含本发明的多肽或缀合物的药物组合物可以配制成多种形式,例如,液体,凝胶,低压冻干,或压缩固体。优选的形式取决于待治疗的具体适应症,且是本领域技术人员显而易见的。

[0123] 本发明的制剂的施用可以以多种途径进行,包括但不限于,经口地,皮下地,静脉内地,大脑内地,鼻内地,透过皮肤地,腹腔内地,肌肉内地,肺内,鞘内地,阴道地,直肠地,眼内地,或以任何其它可接受的方式。尽管快速推注是可接受的,制剂可以通过输注连续施用,其中使用本领域众所周知的技术,例如泵(例如,皮下渗透泵)或植入。在有些情况下,制剂可以作为溶液或喷雾剂直接应用。

[0124] 药物组合物的一个实例是设计用于肠胃外给药的溶液。尽管在许多情况下,药物溶液制剂以适合立即使用的液体形式提供,这样的肠胃外制剂也可以以冷冻或低压冻干形式提供。在前一种情况下,组合物必须在使用前融化。后一种形式经常用于提高组合物中包含的活性化合物在更宽范围的保藏条件下的稳定性,如本领域技术人员所认识到的,低压冻干制品通常比它们的液体对应物更稳定。通过加入一种或多种合适的药学可接受的稀释剂,例如无菌注射用水或无菌生理盐水溶液,在使用前重配这样的低压冻干制品。

[0125] 根据需要,通过混合具有希望纯度的多肽和一种或多种药学可接受的本领域常用的载体、赋形剂或稳定剂(它们都称作“赋形剂”),例如缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子型去污剂、抗氧化剂和/或其它各种添加剂,可以制备作为低压冻干制剂或含水溶液保藏的肠胃外制剂。

[0126] 缓冲剂有助于将 pH 维持在接近生理条件的范围内。它们通常以约 2mM 至约 50mM 的浓度存在。用于本发明的合适的缓冲剂包括有机和无机酸和其盐,例如柠檬酸盐缓冲剂(例如,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(例如,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(例如,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),延胡索酸缓冲剂(例如,延胡索酸-延胡索酸单钠混合物,延胡索酸-延胡索酸二钠混合物,延胡索酸单钠-延胡索酸二钠混合物等),葡糖酸盐缓冲剂(例如,葡糖酸-葡糖酸钠混合物,葡糖酸-氢氧化钠混合物,葡糖酸-葡糖酸钾混合物等),草酸盐缓冲剂(例如,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(例如,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)和醋酸盐缓冲剂(例如,醋酸-醋酸钠混合物,醋酸-氢氧化钠混合物等)。其它可能性是磷酸盐缓冲剂,组氨酸缓冲剂和三甲胺盐例如 Tris。

[0127] 加入防腐剂来阻止微生物生长,通常加入量是约 0.2%-1%(w/v)。用于本发明的合适的防腐剂包括苯酚,苯甲醇,间甲酚,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯,氯化十八烷基二甲基苄基铵,苄烷铵卤化物(例如苯扎氯铵,苯扎溴铵或苯扎碘铵),氯己双铵,对羟基苯甲酸烷基酯例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯,儿茶酚,间苯二酚,环己醇和 3-戊醇。

[0128] 加入等渗剂来确保液体组合物的等渗性,包括多羟基糖醇,优选三羟基 或更高的糖醇,例如丙三醇,赤藓醇,阿拉伯糖醇,木糖醇,山梨醇和甘露醇。考虑其它成分的相对量,多元醇可以以 0.1%-25% (按重量计)、通常 1%-5% 的量存在。

[0129] 稳定剂指一大类赋形剂,其功能范围从填充剂到溶解治疗剂或有助于防止变性或与容器壁粘附的添加剂。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(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、鸟氨酸、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、 α -单硫代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(即<10个残基);蛋白如人血清白蛋白、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。基于活性蛋白重量计算,稳定剂通常的存在范围为 0.1-10000 重量份。

[0130] 可以存在非离子表面活性剂或去污剂(也称作“润湿剂”),以有助于溶解治疗剂以及保护治疗性多肽避免搅拌诱导的聚集,其也允许制剂暴露于剪切表面应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酯(polysorbates)(20, 80等)、泊洛沙姆(polyoxamer)(184, 188等)、Pluronic®多元醇、聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(Tween®-20, Tween®-80等)。

[0131] 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。

[0132] 活性组分也可以包裹在通过例如凝聚(coascervation)技术或通过界面聚合所制备的微囊中,如羟甲基纤维素、明胶或聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊中,包裹在胶体态药物运送体系(例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米胶囊)中,或包裹在粗滴乳剂中。在 Remington's Pharmaceutical Sciences(同上)中公开了这些技术。

[0133] 在本发明的一个方面,组合物是液体组合物,例如含水组合物,且包含磺烷基醚环糊精衍生物。

[0134] 用于体内给药的肠胃外制剂必须是无菌的。这可以容易地实现,例如,通过无菌过滤膜过滤。

[0135] 持续释放制剂的合适实例包括含有多肽或缀合物的固体疏水聚合物的半透基质,基质具有合适形式如膜或微囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)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烯酯、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-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能长时间释放分子,如长达或超过100天,而某些水凝胶释放蛋白时间较短。当包封的多肽长时间保留在体内时,它们可因暴露于37℃潮湿环境中而变性或聚集,导致生物活性丧失和可能的免疫原性改变。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巯基-二硫化物互换形成分子间S-S键,那么可通过修饰巯基、从酸性溶液冻干、控制含湿量、使用适宜的添加剂和开发特

定的聚合物基质组合物来实现稳定作用。

[0136] 肽和肽缀合物的口服给药是本发明的预期实践。对于口服给药,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确定。

[0137] 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。如正常实践中,该剂型还可包含添加物质,例如润滑剂,如硬脂酸镁。对于胶囊、片剂和丸剂,剂型还可包含缓冲剂。片剂和丸剂还可制备有肠衣。

[0138] 所述多肽或缀合物可与辅剂混合,所述辅剂例如乳糖,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,并作成片剂或包成胶囊用于常规给药。或者,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。其它辅剂和给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。

[0139] 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辅剂,例如防腐剂,稳定剂,润湿剂,乳化剂,缓冲剂,填充物等,例如在本文别处所述。

[0140] 口服用药的液体剂型可包括含有诸如水的本领域常用惰性稀释剂的可药用乳剂、溶液、悬液、糖浆和酏剂。该组合物还可包含辅剂,例如润湿剂,甜味剂,调味剂和香味剂。

[0141] 适用于肺部给药的制剂也是本发明的一部分。适合用喷射喷雾器或者超声喷雾器使用的制剂通常包含溶于水的多肽或缀合物,其浓度为,例如每mL溶液含有约0.01到25mg缀合物,优选约0.1-10mg/mL。制剂还可包括缓冲剂和单糖(例如,用于蛋白稳定化和渗透压调节),和/或浓度范围从0.1到10mg/mL的人血清白蛋白。可使用的缓冲剂的实例是乙酸钠,柠檬酸盐和甘氨酸。优选地,缓冲剂具有适于将溶液调到pH3-9范围的组成和摩尔浓度。一般来说,从1mM到50mM的缓冲剂摩尔浓度适合于该目的。可使用的糖类的实例是乳糖,麦芽糖,甘露糖醇,山梨糖醇,海藻糖,和木糖,通常的含量范围是制剂重量的1%到10%。

[0142] 喷雾制剂还可含有表面活性剂,以降低或防止在形成气溶胶时由溶液的雾化引起蛋白质发生表面诱导的聚集。可使用各种常规表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇以及聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯。其含量范围一般为制剂重量的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乙烯失水山梨糖醇单油酸酯。

[0143] 具体制剂和产生本发明液体颗粒合适分散体的方法,在W094/20069,美国专利号5,915,378,美国专利号5,960,792,美国专利号5,957,124,美国专利号5,934,272,美国专利号5,915,378,美国专利号5,855,564,美国专利号5,826,570和美国专利号5,522,385中描述,它们在此通过参考并入本文。

[0144] 与计量剂量吸入器装置一起使用的制剂一般包含细碎的粉末。该粉末可通过冻干然后磨制液体缀合物制剂来生产,且还可含有稳定剂,例如人血清白蛋白(HSA)。一般来说,加入超过0.5%(w/w)的HSA。另外,如果需要,可向制剂中加入一种或多种糖或糖醇。实

例包括乳糖,麦芽糖,甘露糖醇,山梨糖醇,山梨糖,海藻糖,木糖醇,和木糖。加入制剂中的量的范围可从占缀合物含量的约 0.01 到 200% (w / w),优选从约 1 到 50%。然后低压冻干该制剂,并磨制成所需的颗粒大小。

[0145] 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,例如氯氟烃,氢氯氟烷,氢氟烷,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计量剂量吸入器的实例是由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C., USA 生产的 Ventolin 计量剂量吸入器。

[0146] 用于粉末吸入器的制剂包含含有多肽或多肽缀合物的细碎的干粉,且还可包括膨胀剂,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,占制剂重量的 50%到 90%。粉末颗粒在肺中应具有空气动力学特性,相应于密度约 1g/cm³ 具有小于 10 微米的中间粒径(优选在 0.5-5 微米之间,最优选在 1.5-3.5 微米之间)的颗粒。根据本文的教导适用的粉末吸入器的实例是由 Fisons Corp., Bedford, Mass., USA 生产的 Spinhaler 粉末吸入器。以美国专利号 5,997,848,美国专利号 5,993,783,美国专利号 5,985,248,美国专利号 5,976,574,美国专利号 5,922,354,美国专利号 5,785,049 和美国专利号 5,654,007 公开的方法,可产生和 / 或递送这些装置中的粉末。

[0147] 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,计量剂量吸入器,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实例是由 Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Mo., USA 生产的 Ultravent 喷雾器;由 Marquest Medical Products, Englewood, Colo., USA 生产的 Acorn II 喷雾器;由 Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C., USA 生产的 Ventolin 计量剂量吸入器;由 Fisons Corp., Bedford, Mass., USA 生产的 Spinhaler 粉末吸入器;Nektar Therapeutics, Inc., San Carlos, Calif., USA 的“standing cloud”装置;Alkermes, Cambridge, Mass., USA 生产的 AIR 吸入器;和 Aradigm Corporation, Hayward, Calif., USA 生产的 AERx 肺部药物递送系统。

[0148] 本发明也提供了试剂盒,其包含本发明的多肽、缀合物、多核苷酸、表达载体、细胞、方法、组合物和系统,和装置。本发明的试剂盒任选地包含本发明的下述至少一种:(1) 本文所述的装置、系统、系统组分、或装置组分;(2) 至少一种包含本发明的多肽或缀合物或多核苷酸的试剂盒组分;编码本发明多肽的质粒表达载体;表达本发明多肽的细胞;或包含至少一种任何这类组分的组合物;(3) 关于实现本文所述任何方法(包括治疗或预防方法)的说明书,关于使用在(2)中所述的任何组分、或任何这样的组分的任意组合物的说明书;和 / 或关于操作本文所述任何装置、系统或组分的说明书;(4) 用于容纳所述至少一种这样的组分或组合物的容器;和(5) 包装材料。

[0149] 在另一个方面,本发明提供了上面和本文所述的任何装置、组分、组合物、或试剂盒的应用,本文所述任何方法或测定的实施,和 / 或任何装置、组分、组合物、或试剂盒在实施本文所述任何测定或方法中的应用。

[0150] 化学修饰,缀合物和融合体

[0151] 本发明的任何多肽可以作为更多肽序列例如融合蛋白的一部分而存在,所述融

合蛋白例如在添加一个或多个用于稳定或检测或纯化所述多肽的域或亚序列后产生。多肽纯化亚序列可以包括,例如,表位标记, FLAG 标记, 多组氨酸序列, GST 融合体, 或本领域已知的任何其它检测 / 纯化亚序列或 “标记”。这些附加域或亚序列对本发明多肽的活性具有微小影响或无影响, 或可以通过合成后加工步骤来去除, 例如通过用蛋白酶处理、包含内蛋白等。

[0152] 本发明包括融合蛋白, 其包含本发明的多肽(例如如本文所述), 该多肽融合到 Ig 分子上, 例如, 人 IgG Fc (“可结晶的片段”, 或结合补体的片段) 铰链, CH2 域和 CH3 域; 和编码这样的融合蛋白的核苷酸序列。Fc 是负责结合细胞上的抗体受体和补体的 C1q 组分的抗体部分。这些融合蛋白和它们的编码核酸可以用作预防和 / 或治疗药物或诊断工具 (也参见, 例如, Challita-Eid, P. 等 (1998) J. Immunol 160:3419-3426; Sturmhoefel, K. 等 (1999) Cancer Res 59:4964-4972)。本发明也包括融合蛋白, 其包含本发明的多肽, 该多肽融合到白蛋白分子例如人血清白蛋白 (HSA) 上, 例如如美国专利号 5, 876, 969 所述; 和编码该融合蛋白的核苷酸序列。Ig 和白蛋白融合蛋白可以表现出增加的多肽血清半衰期和 / 或功能体内半衰期, 减少的多肽抗原性, 提高的多肽保藏稳定性, 或增加的生物利用度, 例如增加的 AUCsc, 因而可以用作预防和 / 或治疗药物。

[0153] 本发明的所有多肽都具有跨细胞膜转导和影响细胞内的治疗功能的内在固有能力和。本发明因此提供了本发明多肽增强任何其它分子的细胞渗透性或转导能力的用途。本发明还提供了本发明多肽的任何片段或亚片段增强任何其它分子的细胞渗透性的用途, 这样的片段或亚片段的长度是约 5 个氨基酸, 约 10 个氨基酸, 例如 15 个氨基酸, 例如约 20 个氨基酸, 约 25 个氨基酸, 约 30 个氨基酸, 例如 35 个氨基酸, 约 35-50 个氨基酸, 约 50-100 个氨基酸, 例如 75 个氨基酸, 例如 100-125 个氨基酸。

[0154] 本发明的任何多肽也可以包含一个或多个修饰的氨基酸。修饰的氨基酸可以是, 例如, 糖基化的氨基酸, PEG 化的氨基酸, 法尼基化的氨基酸, 乙酰化的氨基酸, 生物素化的氨基酸, 缀合到脂类部分上的氨基酸, 或缀合到有机衍生剂上的氨基酸。修饰的氨基酸的存在, 可以有利地用于, 例如: (a) 增加多肽血清半衰期和 / 或功能体内半衰期, (b) 减少多肽抗原性, (c) 增加多肽保藏稳定性, 或 (d) 增加生物利用度, 例如增加 AUCsc。氨基酸在例如重组生产过程中与翻译同时或在翻译后被修饰 (例如, 在哺乳动物细胞中表达过程中, 在 N-X-S/T 基序处的 N-连接的糖基化), 或通过合成方式修饰。

[0155] 术语 “缀合物” (或可互换的 “多肽缀合物” 或 “缀合的多肽”) 意指由一种或多种本发明的多肽共价连接到一个或多个非多肽部分上形成的异质 (复合的含义) 分子。术语 “共价连接” 的意思是, 多肽和非多肽部分直接彼此共价连接, 或者通过诸如桥接、间隔物或连接部分等的一个或多个间插部分间接地彼此共价连接。优选地, 缀合的多肽在相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。本发明缀合的多肽的实例包括糖基化的和 / 或 PEG 化的多肽。术语 “非缀合的多肽” 可以用于指缀合的多肽的多肽部分。

[0156] 术语 “非多肽部分” 意指能与多肽的连接基团缀合的分子。非多肽部分的优选实例包括聚合物分子, 糖部分, 亲脂性化合物, 或有机衍生剂, 尤其是聚合物分子或糖部分。应当理解, 非多肽部分经由多肽的连接基团而与该多肽连接。除了与多肽连接的非多肽部分 (例如聚合物分子) 的数目被特别指明的情况, 每次提及与多肽连接的或本发明中其它使用

的“非多肽部分”均应指与多肽连接的一个或多个非多肽部分。

[0157] 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。术语“聚合物”可与术语“聚合物分子”互换使用。

[0158] 术语“糖部分”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。“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”包含丝氨酸或苏氨酸残基的 OH—基。

[0159] 术语“连接基团”意指能偶联到相关非多肽部分(诸如聚合物分子或糖部分)上的氨基酸残基基团。

[0160] 对于体内 N—糖基化而言,术语“连接基团”以非常规的方式使用,指组成 N—糖基化位点(具有序列 N-X-S/T/C,其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸残基, 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部分在糖基化期间所连接的残基,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,当非多肽部分是糖部分,且缀合是通过 N—糖基化实现时,与本发明多肽的氨基酸序列的改变关联使用的术语“含有非多肽部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将以下述方式改变,即将功能性 N—糖基化位点导入氨基酸序列,从所述序列中去掉该位点,或在所述氨基酸序列中保留了功能性 N—糖基化位点(例如,通过用苏氨酸残基置换已经构成 N—糖基化位点的一部分的丝氨酸残基,反之亦然)。

[0161] 术语“导入”(即,导入的”氨基酸残基,氨基酸残基的“导入”)主要是指现有氨基酸残基被置换为另一氨基酸残基,但也可指插入另外的氨基酸残基。

[0162] 术语“去除”(即,“去除的”氨基酸残基,氨基酸残基的“去除”)主要是指待去除的氨基酸残基被置换为另一氨基酸残基,但也指待去除的氨基酸残基的缺失(没有置换)。

[0163] 术语“含有非多肽部分连接基团的氨基酸残基”是指与非多肽部分结合的氨基酸残基(对于导入的氨基酸残基而言),或否则会与非多肽部分结合的氨基酸残基(对于去除的氨基酸残基而言)。

[0164] 术语“功能体内半衰期”使用其通常的含义,即在机体/靶器官中仍存在 50%多肽生物活性的时间,或者多肽的活性为最初值的 50%的时间。功能体内半衰期可在实验动物(诸如大鼠,小鼠,兔,犬或猴)中测定。优选地,功能体内半衰期在非人灵长类动物(诸如猴)中测定。此外,可对已经静脉内或皮下施用的样品测定功能体内半衰期。

[0165] 作为测定功能体内半衰期的替代方案,可测定“血清半衰期”,即,50 %的多肽在被清除之前在血浆或血流中循环的时间。血清半衰期的测定常常比功能体内半衰期的测定简单,并且血清半衰期的大小通常可以很好地指示功能体内半衰期的大小。血清半衰期的其它可替换术语包括“血浆半衰期”、“循环半衰期”、“血清清除”、“血浆清除”和“清除半衰期”。

[0166] 多核苷酸和诱变方法

[0167] 本发明包括编码本发明多肽的核酸和多核苷酸。本发明包括用限制性内切核酸酶、RNA 酶、或 DNA 酶消化一种或多种本发明的任何多核苷酸所生成的组合物(例如,以在本说明书其它地方的某些重组形式进行的);和通过机械方式(例如,超声处理,涡旋等)断

裂或剪切一种或多种本发明的多核苷酸所生成的组合物,其也可以用于为本文所述方法中的重组提供底物。本发明也提供了通过切割至少一种本发明的任何多核苷酸所生成的组合物。切割可以包含机械的、化学的、或酶的切割,酶切割可以包含用限制性内切核酸酶、RNA 酶、或 DNA 酶切割。

[0168] 本发明还包括通过包括在有三磷酸核糖核苷酸或三磷酸脱氧核糖核苷酸和核酸聚合酶的存在下温育一种或多种断裂的本发明的多核苷酸的方法而产生的组合物。所得组合物形成重组混合物,可用于上述多种重组形式。核酸聚合酶可以是 RNA 聚合酶, DNA 聚合酶或 RNA- 指导的 DNA 聚合酶(例如“逆转录酶”);聚合酶可以是例如热稳定的 DNA 聚合酶(例如 VENT, TAQ 等)。

[0169] 类似地,含有多组对应于一种以上本发明核酸的寡核苷酸的组合物也可用作重组底物,并且也是本发明的特征。为了方便起见,将这些经断裂、经剪切的或寡核苷酸合成的混合物称为断裂的核酸集合。

[0170] 本发明还提供了编码多肽的分离的或重组的核酸,其通过突变或重组至少一种本发明的多核苷酸产生。

[0171] 可根据已知的合成方法,通过标准的固相方法制备本发明的多核苷酸、寡核苷酸、和核酸片段。典型地,单独合成最高达约 100 个碱基的片段,然后将它们连接起来(例如,通过酶促或化学连接法,或聚合酶介导的重组方法),以形成基本上任何所需的连续序列。例如,本发明的多核苷酸和寡核苷酸可通过化学合成制备,其使用例如 Beaucage 等 (1981) Tetrahedron Letters 22:1859-69 所述的经典亚磷酰胺法,或 Matthes 等 (1984) EMBO J 3:801-05 所述的方法,例如通常在自动合成方法中实施的。根据亚磷酰胺法,在例如自动化的 DNA 合成仪中合成寡核苷酸,然后进行纯化,退火,连接,并克隆入适当的载体。

[0172] 另外,基本上任何多核苷酸都可从多种商业来源中的任何一家订购得到,诸如 Operon Technologies Inc. (Alameda, Calif.) 和很多其它的公司。类似地,肽和抗体也可从多个商家中的任何一家订购得到,例如 Celtek Peptides (Nashville, Tenn.); Washington Biotechnology, Inc. (Baltimore Md.); Global Peptide Services (Ft. Collin Colo.) 和很多其它的公司。

[0173] 也可通过使用寡核苷酸探针筛选 cDNA 文库(例如通过在典型递推序列重组法中重组同源核酸而产生的文库),得到本发明的某些多核苷酸,所述寡核苷酸探针可以杂交或 PCR- 扩增编码 OAS 多肽和这些多肽的片段的多核苷酸。筛选和分离 cDNA 克隆的方法是本领域技术人员众所周知的。这些技术描述于,例如:Berger 和 Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymol. Vol. 152, Acad. Press, Inc., San Diego, Calif. (“Berger”); J. Sambrook 和 D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, (“Sambrook”); 和 F. M. Ausubel 等 (1987-2005) Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, New York, NY (“Ausubel”)。一些本发明的多核苷酸可通过改变(例如通过诱变,递推序列重组(例如改组),或寡核苷酸重组)天然存在的序列而获得。在其它情况下,所述多核苷酸可在计算机中(in silico)制备,或通过本文引用的参考文献所述的寡核苷酸重组方法制备。

[0174] 如本文所详述,本发明的多核苷酸包括编码本发明多肽的多核苷酸,与这些多核

核苷酸序列互补的多核苷酸序列,和在至少严格条件下与本文定义的序列杂交的多核苷酸。编码序列是指编码特定多肽或所述多肽的结构域、区域、或片段的多核苷酸序列。本发明的多核苷酸可以是 RNA 的形式,或者是 DNA 的形式,且包括 mRNA, cRNA, 合成的 RNA 和 DNA, 和 cDNA。多核苷酸可以是双链或单链,如果是单链,则可以是编码链或非-编码(反义,互补)链。本发明的多核苷酸包括本发明多肽的编码序列的(i)分离形式,(ii)与一种或多种其它编码序列联合,以编码例如融合蛋白、前-蛋白、前蛋白原等,(iii)与能在适宜宿主中有效表达编码序列的非编码序列联合,例如内含子,控制元件,例如启动子(例如,天然存在的或重组的或改组的启动子),终止元件,或 5' 和 / 或 3' 非翻译区,和 / 或 (iv) 在载体、细胞或宿主环境中,在其中编码序列是异源基因。

[0175] 本发明多核苷酸还可与核酸常见组合物制剂联合,包括存在载体、缓冲剂、辅剂、赋形剂等,如本领域技术人员所已知的。多核苷酸片段通常包含至少约 200 个核苷酸碱基,诸如至少约 250, 300, 350, 400, 450, 460, 470 或更多个碱基。本发明的多核苷酸的核苷酸片段可在高严格条件下与本文所述多核苷酸序列杂交,和 / 或编码具有本文所述本发明多肽的至少一种特性的氨基酸序列。

[0176] 本发明的多核苷酸具有许多用途,例如,用于本发明多肽的重组生产(即,表达),通常通过包含编码所述多肽或其片段的序列的质粒表达载体的表达;用作治疗剂;用作预防剂;用作诊断工具;用作免疫原;用作佐剂;用作判断互补或部分互补的核酸是否存在的诊断探针(包括检测野生型寡核苷酸合成酶核酸);用作其它反应的底物,所述其它反应例如递推序列重组反应或突变反应,以生产新的和 / 或改进的变体等。

[0177] 表达载体,生产方法,基因治疗

[0178] 本文描述了用于生产和分离本发明多肽的重组方法。除了重组生产以外,可以使用固相技术,通过直接的肽合成来生产多肽(参见,例如,Stewart 等 (1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co, San Francisco; Merrifield J. (1963) J Am Chem Soc 85:2149-2154)。肽合成可以使用手工技术或通过自动化来进行。自动化的合成可以使用例如 Applied Biosystems 431A 肽合成仪(Perkin Elmer, Foster City, Calif.) 根据生产商提供的说明书来实现。例如,可以使用化学方法,分别化学合成亚序列并合并,以提供全长多肽或其片段。或者,可以从许多专门生产多肽的公司定制这样的序列。最常见地,通过表达编码核酸和回收多肽,例如,如下文所述,可以生产本发明的多肽。

[0179] 也包括生产本发明多肽的方法。一种这样的方法包括,向一群细胞中导入本发明的任何核酸,所述核酸可操作地连接到能有效地生产编码的多肽的调控序列上,在培养基中培养细胞以表达多肽,和从细胞或培养基中分离多肽。使用足以促进细胞摄入(转染)和 / 或表达多肽的量的核酸。通过本领域已知的任何递送方法,包括例如注射、基因枪、被动摄入等,将核酸导入这样的细胞。如本领域技术人员会认识到的,所述核酸可以是载体的一部分,所述载体例如重组表达载体,包括 DNA 质粒载体或本领域已知的任何载体。通过本领域已知的标准的重组 DNA 技术和分离方法,可以制备和配制核酸或包含本发明核酸的载体。可以将这样的核酸或表达载体体内地导入哺乳动物细胞群体中,或可以从哺乳动物取出选定的哺乳动物细胞(例如,肿瘤细胞),将核酸表达载体以足以摄入和表达编码的多肽的量离体地导入这样的细胞群中。或者,使用培养的细胞,体外生产核酸或包含本发明核酸的载体。在一个方面,生产本发明多肽的方法包含,向一群细胞中导入包含本文所述本发

明任何核酸的重组表达载体,其量和形式允许摄入该载体和表达编码的多肽;通过本文所述的任何的导入/递送形式,将表达载体施用进哺乳动物;和从所述哺乳动物或哺乳动物副产物分离所述多肽。

[0180] 本发明提供了编码本发明多肽的分离的或重组的核酸(在本文中也称作多核苷酸),它们统一称作“本发明的核酸(或多核苷酸)”。本发明的多核苷酸可以用于许多应用。如上所述,所述多核苷酸可以用于生产本发明的多肽。另外,可以将本发明的多核苷酸掺入用于基因治疗、DNA 疫苗接种、和免疫治疗的表达载体中,如本申请其它地方所述。

[0181] 本发明的任何多核苷酸(包括上述那些)可编码包含至少一种其它氨基酸序列的融合蛋白,所述其它序列例如分泌/定位序列,用于增溶或固定(例如,用于细胞表面展示)多肽的序列,用于检测和/或纯化多肽的序列(例如,多肽纯化亚序列,诸如表位标记,多组氨酸序列等)。另一方面,本发明提供了包含一种或多种本发明多核苷酸的细胞。所述细胞可以表达一种或多种由本发明多核苷酸编码的多肽。

[0182] 本发明还提供了包含本发明任何多核苷酸的载体。所述载体可包含质粒,粘粒,噬菌体,病毒,或病毒片段。所述载体可包含表达载体,如有需要,核酸可操作地连接于启动子上,包括此处或以下描述的。此外,另一方面,本发明提供了组合物,其包含赋形剂或载体和至少一种本发明的任何多核苷酸,或载体,细胞,或包含所述核酸的宿主。所述组合物可以是药物组合物,且赋形剂或载体可以是药学可接受的赋形剂或载体。

[0183] 本发明还包括组合物,其包含两种或多种本发明的核酸,或其片段(例如,作为重组底物)。该组合物可包含重组核酸的文库,其中文库包含至少 2 种,至少 3 种,至少 5 种,至少 10 种,至少 20 种,至少 50 种,或至少 100 种或更多种上述核酸。所述核酸可任选地克隆至表达载体中,来提供表达文库。

[0184] 本发明的多核苷酸及其片段,以及包含所述多核苷酸的载体,可与适宜的载体(诸如药用载体)联用,用于治疗性或预防性用途。所述组合物包含治疗上和/或预防上有效量的化合物,以及可药用的载体或赋形剂。所述载体或赋形剂包括(但不限于)盐水,缓冲的盐水,葡萄糖,水,甘油,乙醇,及其组合。制剂应与给药模式相适应。施用核酸、多肽和蛋白的方法是本领域众所周知的。

[0185] 描述用于本文的分子生物学技术(包括载体、启动子的使用,和许多其它相关的主题)的一般教科书,包括 Berger,同上;Sambrook(1989),同上和 Ausubel,同上。足以指导技术人员完成体外扩增方法(包括聚合酶链式反应(PCR),连接酶链式反应(LCR),Q β -复制酶扩增和其它 RNA 聚合酶介导的技术(例如,NASBA))(例如用于生产本发明的同源核酸)的技术实例,参见 Berger, Sambrook 和 Ausubel,都同上,以及 Mullis 等(1987)美国专利号 4,683,202;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis 等,编.)Academic Press Inc.San Diego,Calif.(1990)(“Innis”);Arnheim&Levinson(Oct.1,1990)C&EN36-47;The Journal Of NIH Research(1991)3:81-94;(Kwoh 等(1989)Proc Natl Acad Sci USA86:1173-1177;Guatelli 等(1990)Proc Natl Acad Sci USA87:1874-1878;Lomeli 等(1989)J Clin Chem35:1826-1831;Landegren 等(1988)Science241:1077-1080;Van Brunt(1990)Biotechnology8:291-294;Wu 和 Wallace(1989)Gene4:560-569;Barringer 等(1990)Gene89:117-122 和 Sooknanan 和 Malek(1995)Biotechnology13:563-564。改进的克隆体外扩增的核酸的方法,描述于 Wallace 等,

美国专利号 5,426,039。改进的 PCR 扩增核酸的方法,总结在 Cheng 等 (1994) Nature 369:684-685 和其中的参考文献中,其中制备了最高达 40 千碱基 (kb) 的 PCR 扩增子。技术人员会明白,使用反转录酶和聚合酶,可以将基本上任何的 RNA 转化成适用于限制酶消化、PCR 扩增和测序的双链 DNA。参见 Ausubel, Sambrook 和 Berger, 都同上。

[0186] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用许多表达系统,例如基于病毒的系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,任选将编码序列连接至腺病毒转录 / 翻译复合物中,所述复合物由晚期启动子和三联前导序列组成。插入病毒基因组中非必需的 E1 或 E3 区域,会产生能在被感染的宿主细胞中表达本发明多肽的活病毒 (Logan 和 Shenk (1984) Proc Natl Acad Sci USA 81:3655-3659)。另外,可使用转录增强子如劳斯肉瘤病毒 (RSV) 增强子来增加在哺乳动物宿主细胞中的表达。宿主细胞、培养基、表达系统和制备方法包括已知用于克隆和表达多种哺乳动物蛋白的那些。通过包含适合所使用的细胞系统的增强子,可以提高表达效率 (参见,例如, Scharf D. 等 (1994) Results Probl Cell Differ 20:125-62; 和 Bittner 等 (1987) Methods in Enzymol 153:516-544)。

[0187] 特定的起始信号可有助于本发明多核苷酸编码序列和 / 或其片段的有效翻译。这些信号包括例如 ATG 起始密码子和邻接的序列。当将编码序列、其起始密码子和上游序列插入适当表达载体时,可无需其它的翻译控制信号。然而,当仅插入编码序列 (如成熟蛋白编码序列) 或其一部分时,必须提供外源核酸转录控制信号,包括 ATG 起始密码子。另外,起始密码子必须位于正确的读码框内,以确保整个插入物的转录。外源转录元件和起始密码子可以是多种不同的来源,可以是天然的和合成的。

[0188] 通过磷酸钙转染, DEAE-葡聚糖介导的转染,电穿孔,基因或疫苗枪、注射或其它用于体内、离体或体外方法的普通技术 (参见,例如, Davis, L., Digner, M. 和 Battey, I. (1986) Basic Methods in Molecular Biology), 可将构建体导入宿主细胞。

[0189] 如上所述,可以得到许多关于许多细胞的培养和生产的文献,包括细菌、植物、动物 (尤其哺乳动物) 和古细菌来源的细胞。参见,例如, Sambrook, Ausubel 和 Berger (都同上), 以及 Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 第 3 版, Wiley-Liss, New York 和其中引用的参考文献; Doyle 和 Griffiths (1997) Mammalian Cell Culture: Essential Techniques John Wiley and Sons, New York; Humason (1979) Animal Tissue Techniques, 第 4 版 W. H. Freeman and Company; 和 Ricciardelli 等 (1989) In vitro Cell Dev Biol 25:1016-1024。关于植物细胞培养和再生,参见,例如, Payne 等 (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y.; Gamborg 和 Phillips (编.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York) and Plant Molecular Biology (1993) R. R. D. Croy (ed.) Bios Scientific Publishers, Oxford, U. K. ISBN 0121983706。细胞培养基总地描述于 Atlas and Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, Fla。关于细胞培养的其它信息,参见可商业得到的文献,例如来自 Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) 的 Life Science Research Cell Culture Catalogue ("Sigma-LSRCCC"), 和例如也来自 Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, Mo.) 的 Plant Culture Catalogue 和增刊 ("Sigma-PCCS")。

[0190] 可通过本领域众所周知的多种方法中的任一种,从重组细胞培养物中回收和纯化本发明的多肽,所述方法包括:硫酸铵或乙醇沉淀,酸提取,阴离子或阳离子交换层析,磷酸纤维素层析,疏水相互作用层析,亲和层析(例如,使用本文所述的任何标记系统),羟基磷灰石层析和凝集素层析。需要时,在完成成熟蛋白或其片段的构型时,可以利用蛋白重折叠步骤。最终,在最后的纯化步骤中可以使用高效液相层析(HPLC)。除了上文提及的参考文献外,多种纯化方法是本领域众所周知的,包括例如下述文献所述的那些:Sandana(1997)Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag 等(1996)Protein Methods, 2. sup. nd Edition Wiley-Liss, New York; Walker(1996)The Protein Protocols Handbook Humana Press, New Jersey; Harris 和 Angal(1990)Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris 和 Angal Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes(1993)Protein Purification: Principles and Practice 3. sup. rd Edition Springer Verlag, New York; Janson 和 Ryden(1998)Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, New York; 和 Walker(1998)Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, New Jersey。

[0191] 适用于生物体体内转导和表达的许多病毒载体是已知的。这样的载体包括逆转录病毒载体(参见,例如, Miller, Curr Top Microbiol Immunol(1992)158:1-24; Salmons 和 Gunzburg(1993)Human Gene Therapy4:129-141; Miller 等(1994)Methods in Enzymology217:581-599)和腺伴随病毒载体(综述见 Carter(1992)Curr Opin Biotech3:533-539; Muzyczka(1992)Curr Top Microbiol Immunol. 158:97-129)。使用的其它病毒载体包括腺病毒载体,疱疹病毒载体和新培斯病毒载体,一般描述见,例如, Jolly(1994)Cancer Gene Therapy1:51-64; Latchman(1994)Molec Biotechnol2:179-195; 和 Johanning 等(1995)Nucl Acids Res23:1495-1501。

[0192] 在一个方面,可使用痘病毒载体。用编码本发明的多肽的多核苷酸序列转染痘病毒载体,并用于需要增强免疫应答(诸如增加的或改善的 T 细胞增殖)的预防性、治疗性和诊断性应用中。参见在例如, Berencsi 等, J Infect Dis(2001)183(8):1171-9; Rosenwirth 等, Vaccine2001February8;19(13-14):1661-70; Kittlesen 等, J Immunol(2000)164(8):4204-11; Brown 等 Gene Ther20007(19):1680-9; Kanasa-thasan 等, Vaccine(2000)19(4-5):483-91; Sten(2000)Drug60(2):249-71 中所讨论的病毒载体。包含所述载体和可接受的赋形剂的组合物也是本发明的特征。

[0193] 基因治疗和基因疫苗提供了方法来抵抗慢性感染性疾病(例如 HIV 感染, 病毒性肝炎),以及非-感染性疾病,包括癌症和一些形式的先天性缺陷,如酶缺陷,所述方法可使用本发明的多核苷酸,包括,例如,包含所述多核苷酸的载体和细胞。已使用了数种方法来体内、离体和体外地将核酸和载体导入细胞,所述方法可用于本发明的多核苷酸和包含所述多核苷酸的载体。这些方法包括:基于脂质体的基因递送(Debs 和 Zhu(1993)W093/24640 和美国专利号 5,641,662; Mannino 和 Gould-Fogerite(1988)BioTechniques6(7):682-691; Rose, 美国专利号 5,279,833; Brigham(1991)W091/06309; 和 Felgner 等(1987)Proc Natl Acad Sci USA84:7413-7414; Brigham 等(1989)Am

J Med Sci 298:278-281; Nabel 等 (1990) Science 249:1285-1288; Hazinski 等 (1991) Am J Resp Cell Molec Biol 4:206-209; 和 Wang 和 Huang (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:7851-7855; 腺病毒载体介导的基因递送, 例如, 用于治疗癌症 (参见, 例如, Chen 等 (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:3054-3057; Tong 等 (1996) Gynecol Oncol 61:175-179; Clayman 等 (1995) Cancer Res. 5:1-6; O'Malley 等 (1995) Cancer Res 55:1080-1085; Hwang 等 (1995) Am J Respir Cell Mol Biol 13:7-16; Haddada 等 (1995) Curr Top Microbiol Immunol. 1995 (Pt. 3):297-306; Addison 等 (1995) Proc Natl Acad Sci USA 92:8522-8526; Colak 等 (1995) Brain Res 691:76-82; Crystal (1995) Science 270:404-410; Elshami 等 (1996) Human Gene Ther 7:141-148; Vincent 等 (1996) J Neurosurg 85:648-654) 和许多其它方法。还已使用复制-缺陷型逆转录病毒载体, 其含有治疗性的多核苷酸序列作为逆转录病毒基因组的一部分, 特别是简单的 MuLV 载体。参见例如 Miller 等 (1990) Mol Cell Biol 10:4239 (1990); Kolberg (1992) J NIH Res 4:43 和 Cornetta 等 (1991) Hum Gene Ther 2:215)。另外, 还使用了与配体-特异性的、基于阳离子的转运系统相偶联的核酸转运 (Wu 和 Wu (1988) J Biol Chem, 263:14621-14624)。也已描述了裸 DNA 表达载体 (Nabel 等 (1990), 同上); Wolff 等 (1990) Science, 247:1465-1468)。通常, 通过将编码本发明多肽的核酸掺入适当载体中, 可以使这些方法适用于本发明。

[0194] 描述基因治疗方案 (其可以通过将本发明的核酸导入患者而适用于本发明) 的普通教科书包括, 例如, Robbins (1996) Gene Therapy Protocols, Humana Press, New Jersey 和 Joyner (1993) Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England。

[0195] 抗病毒治疗

[0196] 本发明的多核苷酸和多肽可以治疗性地或预防性地用于治疗或预防病毒感染。示例性的病毒包括但不限于, 黄病毒科的病毒, 例如, 丙型肝炎病毒, 黄热病病毒, 西尼罗病毒, 日本脑炎病毒, 登革热病毒和牛病毒性腹泻病毒; 肝 DNA 病毒科的病毒, 例如, 乙型肝炎病毒; 小核糖核酸病毒科的病毒, 例如, 脑炎心肌炎病毒, 人鼻病毒和甲型肝炎病毒; 逆转录病毒科的病毒, 例如, 人免疫缺陷病毒, 猴免疫缺陷病毒, 人嗜 T 淋巴细胞病毒和劳斯肉瘤病毒; 冠状病毒科的病毒, 例如, SARS 冠状病毒; 弹状病毒科的病毒, 例如, 狂犬病病毒和水泡性口膜炎病毒, 副粘病毒科的病毒, 例如, 呼吸道合胞体病毒和副流感病毒, 乳头瘤病毒科的病毒, 例如, 人乳头瘤病毒, 和疱疹病毒科的病毒, 例如, 单纯疱疹病毒。

[0197] 本发明的另一个目的是, 提供缀合物, 所述缀合物包含一个或多个连接到本发明多肽上的非多肽部分, 该缀合物会表现出抗病毒性质, 且其任选地表现出其它希望的性质, 例如与非缀合的多肽相比提高的血清半衰期和 / 或功能体内半衰期, 和 / 或降低的抗原性。与参照寡核苷酸合成酶相比, 有些这样的缀合物可以表现出增强的从受病毒感染的细胞清除病毒的功效。与参照寡核苷酸合成酶相比, 有些这样的缀合物还可以具有降低的毒性。

[0198] 本发明的另一个目的是, 提供抑制病毒感染的细胞中的病毒复制的方法, 该方法包含, 给病毒感染的细胞施用能有效抑制所述细胞中病毒复制的量的本发明的多肽或缀合物。本发明也提供了减少病毒感染的细胞中的病毒拷贝数的方法, 其包含给病毒感染的细胞施用能有效减少所述细胞中的病毒拷贝数的量的本发明的多肽或缀合物。细胞可以是培养的, 或以其它方式从哺乳动物分离 (即, 体外或离体), 或可以是体内的, 例如, 在受试者中, 在哺乳动物中, 在灵长类动物中, 或在人类中。

[0199] 抗癌和炎症治疗

[0200] 已经证实,本发明多肽可以使某些细胞类型和细胞系发生细胞凋亡或影响所述细胞系或细胞类型的生长延迟。在示例性的实施方案中,这样的细胞系或细胞类型包括源自前列腺和乳腺的那些。

[0201] 本发明提供了抑制细胞群体增殖的方法,其包含使细胞群体接触能有效降低所述细胞群体增殖的量的本发明多肽。细胞群体可以是培养的,或以其它方式从哺乳动物分离(即,体外或离体),或可以是体内的,例如,在受试者中,在哺乳动物中,在灵长类动物中,或在人类中。

[0202] 本发明提供了使用本发明的多肽和多核苷酸治疗癌症和肿瘤性疾病。示例性的癌症和肿瘤性疾病包括但不限于:肾上腺皮质癌,AIDS 相关的癌症,例如,卡波西肉瘤,AIDS- 相关的淋巴瘤,肛门癌,星形细胞瘤,基底细胞癌,胆管癌例如肝外性质的那些,膀胱癌,骨癌,例如骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤,脑干神经胶质瘤,脑肿瘤例如神经胶质瘤,星形细胞瘤,恶性神经胶质瘤,室管膜瘤,成神经管细胞瘤和神经母细胞瘤,幕上原发性神经外胚层瘤,视通路和下丘脑神经胶质瘤,乳腺癌,支气管腺瘤,伯基特淋巴瘤,类癌瘤,中枢神经系统淋巴瘤,子宫颈癌,白血病例如毛细胞性白血病,急性成淋巴细胞性白血病,急性髓细胞性白血病,慢性淋巴细胞性白血病和慢性髓细胞性白血病,慢性骨髓增生障碍,结肠直肠癌,皮肤 T- 细胞淋巴瘤,子宫内膜癌,食管癌,尤因家族肿瘤,颅外生殖细胞肿瘤,性腺外生殖细胞肿瘤,眼癌例如眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤,胆囊癌,胃癌,妊娠性滋养层细胞瘤,头颈癌,肝细胞癌,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,原发性 CNS 淋巴瘤,鼻咽癌,胰岛细胞癌,肾(肾细胞)癌,喉癌,唇和口腔癌,肝癌,肺癌,例如非小细胞和小细胞肺癌,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,梅克尔细胞癌,间皮瘤,转移性鳞状颈癌,多发性内分泌瘤病,多发性骨髓瘤,浆细胞肿瘤,蕈样肉芽肿病,骨髓增生异常综合征,骨髓增生性疾病,鼻腔和鼻窦癌,卵巢癌例如生殖细胞和上皮性低恶性潜能卵巢肿瘤,胰腺癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,嗜铬细胞瘤,垂体肿瘤,胸膜肺母细胞瘤,前列腺癌,横纹肌肉瘤,唾液腺癌,肉瘤,塞扎里综合征,皮肤癌例如黑素瘤和鳞状上皮细胞癌,睾丸癌,胸腺瘤,胸腺癌,甲状腺癌,移行细胞癌,滋养层细胞瘤,尿道癌,子宫癌,阴道癌,外阴癌和肾母细胞瘤。

[0203] 本发明还提供了使用本发明的多肽和多核苷酸治疗自身免疫病和炎症,所述自身免疫病和炎症性疾病包括但不限于:哮喘,克罗恩病,格林-巴利综合征,多发性硬化,重症肌无力,视神经炎,银屑病,类风湿性关节炎,格雷夫斯病,桥本病(甲状腺炎),Ord 氏甲状腺炎,糖尿病,糖尿病(拉),莱特尔氏综合征,自身免疫性肝炎,原发性胆汁性肝硬变,肝硬化,肝纤维化,抗磷脂抗体综合征,视性眼阵挛肌阵挛综合征,颞动脉炎,急性播散性脑脊髓炎,肺出血肾炎综合征,韦格纳氏肉芽肿病,腹部疾病,天疱疮,多关节炎,warm 自身免疫性溶血性贫血,大动脉炎,冠状动脉疾病,子宫内膜异位,间质性膀胱炎,神经性肌强直,硬皮病,白癜风,外阴痛,查加斯病,结节病,慢性疲乏综合征,急性呼吸窘迫综合征,腱炎,滑囊炎,风湿性多肌痛,炎性肠病,慢性阻塞性肺病,变应性鼻炎,心血管疾病,慢性胆囊炎,支气管扩张,尘肺病例如硅肺病,骨关节炎,动脉粥样硬化,家族性自主神经机能异常,强直性脊柱炎,急性前色素层炎,系统性红斑狼疮,胰岛素依赖型糖尿病,寻常型天疱疮,实验性变应性脑脊髓炎,实验性自身免疫性 uveoreinitis,混合性结缔组织病,Sjorgen 氏综合征,自身免疫性溶血性贫血,自身免疫性血小板减少性紫癜,急性风湿热,混合性特发性冷球蛋白

血症,青少年类风湿性关节炎,退行性关节病,强直性脊柱炎,银屑病关节炎,神经痛,滑膜炎,肾小球肾炎,血管炎,作为流感、普通感冒和其它病毒感染的后遗症发生的炎症,痛风,接触性皮炎,腰背部和颈部疼痛,痛经,头痛,牙痛,扭伤,劳损,肌炎,烧伤,损伤,以及受试者手术和牙科操作之后的疼痛和炎症。

[0204] 细胞生长和组织再生治疗

[0205] 已经证实,本发明多肽会刺激特定细胞类型和细胞系(例如, Huh7 肝癌细胞和 MRC5 胎儿肺成纤维细胞)中的促有丝分裂的、促进细胞生长的程序。使用表达微阵列分析和以本发明多肽处理的细胞和细胞系的细胞存活力测定,可以鉴别该促有丝分裂程序。本发明提供了本发明多肽在体外、体内和离体刺激细胞生长和组织再生的应用,其中使用源自受试者或哺乳动物的组织和细胞。

[0206] 本发明多肽的衍生物

[0207] 本发明提供了与图 1-5 的任何多肽差别在于 1-34 个氨基酸的多肽,这样的差别可以包括置换,插入,缺失,修饰的氨基酸或氨基酸衍生物的掺入,从多肽的 C-末端或 N-末端添加或删除氨基酸。根据例如,置换组(例如,保守置换组),例如下述的组,可以对本发明多肽进行一个或多个氨基酸置换。或者,或此外,可以在多肽中进行一个或多个氨基酸置换,以导入或删除包含非多肽部分连接基团的氨基酸残基。实例包括,导入一个或多个 N-糖基化位点,导入一个或多个半胱氨酸残基或赖氨酸残基,去除一个或多个 N-糖基化位点和/或去除一个或多个赖氨酸或组氨酸。有些这样的多肽会表现出寡腺苷酸合成酶活性。保守置换组包括:组 1,丙氨酸(A) 甘氨酸(G) 丝氨酸(S) 苏氨酸(T),组 2,天冬氨酸(D) 谷氨酸(E),组 3,天冬酰胺(N) 谷氨酰胺(Q),组 4,精氨酸(R) 赖氨酸(K) 组氨酸(H),组 5,异亮氨酸(I) 亮氨酸(L) 蛋氨酸(M) 缬氨酸(V),和组 6,苯丙氨酸(F) 酪氨酸(Y) 色氨酸(W)。可以预见到其它氨基酸置换组。例如,根据类似的功能或化学结构或组成(例如,酸性的,碱性的,脂族的,芳族的,含硫的),可以将氨基酸分组。例如,脂族组可以包含:甘氨酸(G),丙氨酸(A),缬氨酸(V),亮氨酸(L),异亮氨酸(I)。含有被视作可以彼此保守置换的氨基酸的其它分组包括:芳族组:苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);含硫组:蛋氨酸(M),半胱氨酸(C);碱性组:精氨酸(R),赖氨酸(K),组氨酸(H);酸性组:天冬氨酸(D),谷氨酸(E),天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q)。关于氨基酸的其它分组,也参见 Creighton(1984) *Proteins*, W. H. Freeman 和 Company。本文多肽序列的列表,以及上述置换组,提供了所有保守置换的多肽序列的特别列表。

[0208] 在一个方面,本发明提供了分离的或重组的多肽,其各自包含与图 5 任何一种多肽具有至少 90% 序列同一性(例如,至少约 91%,至少约 92%,至少约 93%,至少约 94%,至少约 95%,至少约 96%,至少约 97%,至少约 98%,或至少约 99% 氨基酸序列同一性)的序列。在有些情况下,所述多肽表现出寡腺苷酸合成酶活性。

[0209] 序列(多肽或核酸)彼此相似的程度,提供了 2 个序列的类似结构和功能性质的指标。因此,在本发明的上下文中,具有与任何给定示例序列相似序列的序列,是本发明的特征。更具体地,具有下面定义的序列同一性百分比的序列,是本发明的特征。可以使用许多确定序列关系的方法,包括手工比对、计算机辅助的序列比对和分析。可以得到许多用于进行序列比对的计算机程序,或技术人员可以手工进行比对。

[0210] 如上所述,在本发明中使用的多肽和核酸的序列不需要与本发明多肽或 本发明

核酸的对应序列相同,但是可以基本上相同。例如,本发明多肽可以发生多种不同的变化,例如一个或多个氨基酸插入、缺失、和/或置换,保守或非保守的,包括例如这样的变化可能提供在它们应用中的某些优点,例如,在它们的治疗性或预防性用途或给药或诊断应用中。本发明的核酸也可以发生多种不同的变化,例如在一个或多个密码子中一个或多个核酸的一处或多处置换,使得特定密码子编码相同或不同的氨基酸,导致沉默变异(如本文所定义的)或非沉默变异,或序列中一个或多个核酸(或密码子)的一处或多处缺失。也可以修饰核酸,以包含一个或多个在表达系统(例如,细菌或哺乳动物)中提供最适表达的密码子,如果需要,所述一个或多个密码子仍然编码相同的氨基酸。这样的核酸变化可能提供在它们的治疗性或预防性用途或给药或诊断应用中的某些优点。可以以许多方式修饰核酸和多肽,只要它们包含与本发明各相应核酸或多肽的序列基本上同一(如下所定义)的序列。

[0211] 在2个或多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“同一的”或“同一性”指,当比较和对比最大相似性时,使用序列对比算法或通过目检测得,2个或多个序列是相同的,或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸。

[0212] 主题序列与参照(即查询)序列的“百分比序列同一性”(“%同一性”)指,主题序列在对比长度上与查询序列的同一性(即,对于多肽序列,以逐个氨基酸为基础;或对于多核苷酸序列,以逐个核苷酸为基础)是指定的百分比。

[0213] 定点诱变来创建本发明的多肽

[0214] 使用任何定点诱变的标准方法,可以改造本发明多肽。使用特异性的寡核苷酸引物和高保真度DNA聚合酶,可以合成与本发明多肽相对应的核酸序列。靶序列包含在从甲基化-感受态大肠杆菌菌株分离的双链质粒中。合成含有目标突变的互补寡核苷酸,并使用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯化。使用热循环仪来控制下述交替循环的温度:双链质粒模板的变性(94°C 30秒),寡核苷酸引物的退火(55°C 1分钟)和用高保真度聚合酶延伸引物(68°C 1分钟/kb质粒长度)。约15个循环后,用对甲基化的残基特异性的限制酶(Dpn I)处理新合成的和输入的DNA的混合物,以消化亲本质粒。将得到的DNA导入化学或电感受态的细菌菌株中,用于筛选和分离含有目标突变的质粒。从转化体分离质粒DNA,并通过荧光染料-终止子测序进行筛选,以证实突变序列。

[0215] 大批药物产物表达,发酵和纯化

[0216] 用编码与一种或多种本发明多肽相对应的核酸序列的、含有IPTG-诱导型启动子的细菌表达载体,转化含有 λ DE3溶素原、并因此携带在lacUV5启动子控制下的T7RNA聚合酶基因的染色体拷贝的大肠杆菌菌株。在37°C,在添加了34 μ g/mL氯霉素和15 μ g/mL卡那霉素的luria肉汤培养基中培养。当OD600达到>0.4时,将温度降至18°C,用0.5mM IPTG诱导细胞17小时。然后,将细菌细胞重新悬浮于缓冲液中,所述缓冲液含有50mM NaH₂PO₄, pH8, 300mM NaCl, 20mM 咪唑, 10%甘油, 0.1%NP40, 2mM DTT和蛋白酶抑制剂(VWR),在Gaulin匀浆器中裂解,离心去除细胞碎片,然后进行蛋白纯化。

[0217] 在一个实施方案中,使用在氨基末端的多组氨酸标记,可进行本发明多肽的纯化。在多组氨酸标记的亲和纯化中,使用镍柱,例如,对于从4L大肠杆菌制备的裂解物,使用5mL柱。将裂解物装载到柱上,然后用缓冲液A(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 30%甘油, 20mM 咪唑, 2mM DTT, pH7.5)洗涤。然后,分步洗脱(step elution)到7%缓冲液B(50mM NaH₂PO₄,

300mM NaCl, 30% 甘油, 2M 咪唑, 2mM DTT, pH6.8), 进行 3.2 倍柱体积。然后, 经 3 倍柱体积实现梯度到 100% 缓冲液 B。然后, 可以将本发明多肽凝胶过滤到缓冲液 C (50mM NaH₂PO₄, 150mM NaCl, 40% 甘油, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH6.8) 中, 并装载上阳离子交换柱, 用于进一步纯化。装载蛋白后, 用缓冲液 C 洗涤柱, 其后是分步洗脱到 75% 缓冲液 D (50mM NaH₂PO₄, 1M NaCl, 40% 甘油, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH6.8), 然后是 5 倍柱体积梯度至 100% 缓冲液 D。然后将蛋白凝胶过滤到缓冲液 E (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 40% 甘油, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH6.8) 中, 并保藏在 -20°C。

[0218] 本发明多肽的不同实施方案(包括但不限于: 缺少多组氨酸标记的多肽, 具有多精氨酸标记的多肽, 具有减小的半胱氨酸含量的多肽, 具有设计用于使药物候选物更热稳定的氨基酸序列变化的多肽, 具有用于增强或减小药物候选物的特定活性的修饰的多肽), 可能需要其它备选纯化策略。缺少多组氨酸标记的多肽药物候选物的实施方案, 例如, 可以直接应用于阳离子交换柱上。可以使用其它步骤, 例如疏水相互作用层析的应用, 其中将蛋白置于缓冲液 F (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 1M (NH₄)₂SO₄, 30% 甘油, 1mM EDTA, 2mM DTT, pH6.8) 中, 并运行 10 倍柱体积梯度至 100% 缓冲液 E。可以使用其它亲和柱或区分大小的柱, 来纯化多肽药物候选物的不同实施方案。

[0219] 替代技术也可以用于缓冲液的交换、药物候选物的浓缩和药物候选物的纯化。它们包括但不限于, 超滤, 正切流动过滤和渗滤, 用于浓缩药物候选物和交换缓冲液。也可以使用诸如用 (NH₄)₂SO₄ 或有些其它化学试剂沉淀药物候选物的技术。也可以在脲或有些其它变性剂中使药物候选物变性, 并重新折叠它。

[0220] 用含有盐的赋形剂, 可以稳定化本发明多肽; 在 300mM NaCl 稳定的溶液, 可以在 150mM NaCl 开始沉淀。鉴于该原因, 赋形剂混合物将有利于这些稳定盐浓度, 这包括但不限于磷酸钠, 氯化钠, 氯化钙和氯化镁。

[0221] 已经证实, 加入基于氨基酸的赋形剂, 例如精氨酸, 会稳定本发明的多肽。10% 蔗糖溶液会使本发明多肽在 1mg/mL 稳定, 加入 2%w/v 精氨酸会使多肽的有些实施方案在 3mg/mL 稳定。鉴于该原因, 可以使用其它基于氨基酸的化合物(包括但不限于组氨酸, 谷氨酰胺, 甘氨酸和人白蛋白) 作为赋形剂。

[0222] 加入赋形剂(例如甘油)会稳定本发明的多肽。例如, 在一个实施方案中, 10% 甘油(v/v) 会使多肽具有 1mg/mL 的最大浓度; 而在 40% 甘油, 药物候选物保持稳定最高达 12mg/mL。预见到含有具有类似化学性质的化合物的赋形剂混合物, 它们包括但不限于多元醇例如甘露醇, 木糖醇和山梨醇。已经发现二糖(例如蔗糖)在 10%w/v 起稳定作用; 也可以使用其它二糖, 包括但不限于麦芽糖和海藻糖。在本发明中也可以使用单糖。聚山梨酯、聚乙二醇和类似的化合物, 也可以用于实现本发明。

[0223] 如本领域技术人员会认识到的, 也可以使用抗氧化剂和防腐剂, 来确保保藏过程中多肽的稳定性。抗氧化剂, 包括但不限于柠檬酸钠, 可以发挥稳定作用使本发明多肽长期保藏。防腐剂, 包括但不限于苯甲醇, 也可以在保藏过程中稳定多肽, 且可以用于最后的赋形剂混合物中。

[0224] 多肽的寡腺苷酸合成酶活性的测量

[0225] 根据以前公开的方法(Justesen, J. 等 Nuc Acids Res. 8:3073-3085, 1980), 测量本发明多肽的寡腺苷酸合成酶活性。简而言之, 用在含有 20mM Tris-HCl pH7.8、50mM

Mg(OAc)₂、1mM DTT、0.2mM EDTA、2.5mM ATP、 α [32P]ATP、0.5mg/ml BSA、和10%甘油的缓冲液中的200 μ g/ml 聚肌苷酸：聚胞苷酸，激活蛋白。反应在37℃进行30分钟至24小时，通过加热至90℃3分钟终止。将2-4 μ l 反应混合物点到PEI-纤维素薄层平板上。干燥后，用0.4M Tris-HCl, 30mM MgCl₂, pH8.7将平板显影。将平板干燥，通过磷成像仪分析进行观察。或者，可以使反应化合物与0.05U/ μ l 小牛肠磷酸酶进一步温育，以去除末端磷酸。使用0.76M KH₂PO₄, pH3.6显影缓冲系统，进行薄层色谱分离。然后干燥平板，通过磷成像仪分析进行观察。

[0226] 多肽的抗病毒活性的测量

[0227] 使用鼠脑炎心肌炎病毒(EMCV, ATCC株VR-129B)感染模型，证实了本发明多肽保护培养的细胞免受细胞毒性病毒的能力。其它体外病毒感染模型包括但不限于黄病毒例如牛腹泻病毒，西尼罗病毒和GBV-C病毒，其它RNA病毒例如呼吸道合胞体病毒和HCV复制子系统(例如Blight, K. J. 等2002. J. Virology, 76:13001-13014)。在抗病毒测定中，可以使用对病毒复制感受态的任何适当的培养细胞。

[0228] 以1x10⁴细胞/孔的密度，将人Huh7肝癌细胞接种进96孔培养板，在完全培养基(含有10%胎牛血清的DMEM)中温育过夜。次日早晨，将培养基替换为含有0-10 μ M蛋白或等同量的蛋白稀释缓冲液的完全培养基。当需要时，加入浓度为100IU/ml的 α -干扰素。在病毒感染之前，预处理细胞2-8小时。预处理后，向孔中加入相等体积的培养基，其中含有EMC病毒在完全培养基中的稀释液。在本文所述实验中，每个孔中加入范围为50-500的噬斑形成单位(pfu)。

[0229] 使病毒感染持续过夜(约18小时)，使用任何可得到的细胞存活力或细胞毒性试剂，计算存活细胞的比例。使用测量活细胞中四唑盐化合物[3-(4,5-二甲基-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-硫代苯基)-2H-四唑盐，内盐；MTS]向有色甲化合物的转化的细胞存活力测定，得到本文所述的结果。在492nm吸光度，在96-孔平板读数器中检测MTS向甲的转化。将得到的光密度直接绘图，以估计细胞存活力，或通过对照处理样品标准化，以计算处理后存活细胞的百分比。

[0230] 多肽PEG化；巯基

[0231] 通过以0.5-10:1的摩尔比，混合不含二硫苏糖醇(DTT)的纯化的多肽和活化的mPEG-MAL(Nektar Therapeutics)，实现聚乙二醇(PEG)向本发明多肽的缀合。反应在室温进行5分钟至2小时，通过加入2mM DTT来淬灭。使用线性的20kDa和分支的40kDa PEG(图6A和6B)，在多个半胱氨酸位点进行缀合。使用本领域技术人员已知的许多色谱方法，可以将非-PEG化形式和含有一个或多个PEG的形式彼此分离。在本发明的示例性实施方案中，可以使用单独的或彼此组合的离子交换柱、疏水相互作用柱、凝胶过滤和大小排阻层析，来分离不同的PEG形式。

[0232] 多肽PEG化；N-末端

[0233] 可以在N-末端胺处，PEG化本发明的多肽。向多肽中加入5-倍过量的mPEG butyrALD-40K，所述多肽在含有20mM 氰基硼氢化钠的50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、30%甘油、1mM EDTA、2mM DTT、pH5中，并在冰浴中搅拌。使反应进行最长达10小时，然后通过加入50-倍过量的甘氨酸来淬灭。通过SDS-PAGE，分析反应产物。

[0234] 提供下面的实施例来进行解释，而不是限制。

实施例

[0235] 实施例 1

[0236] 非人灵长类动物 OAS1 蛋白中的氨基酸修饰

[0237] 对来自非人灵长类动物的 OAS1 基因测序,并与在人 OAS1 基因中发现的突变相对比。这样的突变会提供关于 OAS1 基因和蛋白的进化的另外洞察。进化保守的氨基酸提示着对于 OAS1 功能或酶活性重要的或关键的位点。相反地,最近突变的(例如仅在人类中)或在灵长类动物中表现出多种氨基酸置换的 OAS1 氨基酸位点,指示着对于功能或酶活性不太关键的位点。在 OAS1 蛋白的特定基序内突变的位点的丰度,与该功能域对修饰的耐受性相关。优化这样的位点和基序,以提高蛋白功能或比活性。类似地,假定类似于 OAS1 的具有免疫或病毒防御功能的基因和蛋白中的突变,源自病毒感染的历史攻击。在此基础上,假定灵长类动物 OAS1 蛋白中的突变会提高抗病毒功效,且是优化人治疗性 OAS1 蛋白的机会。

[0238] 在一个示例性的实施方案中,可以将 OAS1 内特定位点的祖先灵长类动物氨基酸恢复成人治疗形式的 OAS1 蛋白,以优化蛋白比活性或抗病毒功效。在其它实施方案中,将在非人灵长类动物 OAS1 中识别出的、但是不一定在祖先中保守的备选氨基酸,置换到人治疗形式的 OAS1 中,以便提高蛋白比活性或抗病毒功效。编码天然灵长类动物蛋白以及灵长类动物-人杂种形式的 DNA 和 mRNA 序列是新的,且具有效用。它们的效用的几个实例是:用于检测它们各自的 DNA 或 mRNA 对应物的试剂;用于在治疗性蛋白的制备中使用的表达载体中;和用于检测结合各 mRNA 的新化合物中。

[0239] 图 1 提供了一种治疗形式的 OAS1 (SEQ ID NO:1)。使用至少一种图 2 提供的氨基酸修饰,对该形式进行修饰,以便提供其它治疗形式。如图 2 所示,一种有用的修饰是,从 SEQ ID NO:1 和其它形式的 OAS1,去除原始蛋氨酸。如图 3 所示进行其它修饰。图 2 和 3 所示的前述修饰也适用于图 5 提供的其它治疗性 OAS1 同种型。图 3 也提供了与 Genbank 登录号 NP_002525.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白(例如,SEQ ID NO:3)的特异性修饰,与 Genbank 登录号 NP_0058132.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白(例如,SEQ ID NO:2)的特异性修饰,和与 Genbank 登录号 NP_001027581.1 在羧基末端同源的 OAS1 蛋白(例如,SEQ ID NO:4)的特异性修饰。在图 4 中列出了在非人灵长类动物(包括大猩猩,黑猩猩,猩猩和猕猴)中鉴别出的示例性突变。图 5 中列出了可以用于本发明的诊断和治疗目的的其他人和非人灵长类动物 OAS1 同种型,以及本发明所述的特定灵长类动物突变。

[0240] 实施例 2

[0241] cDNA 的制备和测序

[0242] 从来自具有丙型肝炎抗性表型的患者的经培养的淋巴母细胞或成纤维细胞,纯化总细胞 RNA。如 Chomczynski 等,Anal. Biochem., 162:156—159(1987)所述,执行纯化程序。在 10 毫升 (ml) 含有 4.0M 硫氰酸胍、pH 值为 7.5 的 0.1M Tris-HCl 和 0.1M β -巯基乙醇的变性溶液中,将所述细胞均质化,形成细胞裂解物。随后将十二烷基肌氨酸钠混合至细胞裂解物中,直至最终浓度为 0.5%,其后将混合物在室温以 5000Xg 离心 10 分钟。将所得含有总 RNA 的上清液铺到 pH 值为 7.5 的 5.7M 氯化铯和 0.01M EDTA 缓冲垫上,并离心沉淀。将所得 RNA 沉淀溶解于含有 0.1% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 pH 值为 7.6 的 10mM Tris-HCl 与 1mM EDTA (TE) 的溶液中。在苯酚氯仿提取和乙醇沉淀之后,通过测量 260nm 的光密

度,估计纯化的总细胞 RNA 浓度。

[0243] 以上制备的总 RNA 用作使用逆转录酶进行第一链合成的 cDNA 合成的模板,并使用设计的寡核苷酸引物进行 PCR,以便扩增 cDNA (以命名为 5' 和 3' 片段的两个重叠片段)。按照厂商说明书,在 Applied Biosystems381A DNA 合成仪上合成用于实施本发明的寡核苷酸。使用本领域已知的方法进行 PCR。PCR 扩增方法详细描述于美国专利号 4,683,192,4,683,202,4,800,159 和 4,965,188 中,且至少描述于若干教科书中,包括 PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification,H.Erlich,ed.,Stockton Press,New York(1989);和 PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis 等人编,Academic Press,San Diego,Calif.(1990),和基于编码本文公开的氨基酸修饰区域的核苷酸序列的引物。

[0244] 分析直接来自有或无 HCV 感染的患者的经 PCR 扩增的 DNA 测定的序列。在尽管反复暴露于病毒但仍呈 HCV 血清阴性的患者中可检测到 OAS 基因编码区上游突变的存在。

[0245] 上述包括特定实施方案和实施例的说明书,用以阐明而非限制本发明。在不偏离本发明的真实精神和范围的情况下,可进行许多其它改变和修改。引用的所有专利、专利公开和非专利出版物都通过参考并入本文。

[0001]

序列表

<110> Illumigen Biosciences Inc.

<120> OAS1 基因中的突变

<130> 55382-52

<140> PCT/US06/016983

<141> 2006-05-03

<150> 60/677,680

<151> 2005-03-04

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 346

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1           5           10           15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
          20           25           30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35           40           45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50           55           60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
 65           70           75           80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
          85           90           95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
          100          105          110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
          115          120          125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
          130          135          140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
          145          150          155          160
Gly Ser Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
          165          170          175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
          180          185          190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
          195          200          205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
          210          215          220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
          225          230          235          240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
          245          250          255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
          260          265          270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
          275          280          285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
          290          295          300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
          305          310          315          320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
          325          330          335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu
          340          345

```

<210> 2

<211> 400

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

```

Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1           5           10           15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His

```

[0002]

```

      20      25      30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
      35      40      45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
      50      55      60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
      65      70      75      80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
      85      90      95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
      100      105      110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
      115      120      125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
      130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
      145      150      155      160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
      165      170      175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
      180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
      195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
      210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
      225      230      235      240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
      245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
      260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
      275      280      285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
      290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
      305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
      325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asn Ser Ala
      340      345      350
Asp Asp Glu Thr Asp Asp Pro Arg Arg Tyr Gln Lys Tyr Gly Tyr Ile
      355      360      365
Gly Thr His Glu Tyr Pro His Phe Ser His Arg Pro Ser Thr Leu Gln
      370      375      380
Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile Leu
      385      390      395      400

```

<210> 3
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 3
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
  1      5      10      15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
      20      25      30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
      35      40      45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
      50      55      60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
      65      70      75      80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
      85      90      95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
      100      105      110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
      115      120      125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
      130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
      145      150      155      160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
      165      170      175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
      180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu

```

[0003]

```

195          200          205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210          215          220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225          230          235          240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245          250          255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260          265          270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275          280          285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290          295          300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305          310          315          320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325          330          335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser
340          345          350
Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala
355          360

```

<210> 4
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 智人

```

<400> 4
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1          5          10          15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20          25          30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35          40          45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50          55          60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65          70          75          80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85          90          95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
100          105          110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
115          120          125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
130          135          140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
145          150          155          160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
165          170          175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
180          185          190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
195          200          205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210          215          220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225          230          235          240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245          250          255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260          265          270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275          280          285
Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290          295          300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305          310          315          320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325          330          335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro Gly
340          345          350
Ser Ile His Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro Leu
355          360          365
Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp Gln
370          375          380
Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser
385          390          395          400
Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser

```

[0004]

405

410

<210> 5
 <211> 353
 <212> PRT
 <213> 大猩猩 (*Gorilla gorilla*)

<400> 5
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
 85 90 95
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
 100 105 110
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
 115 120 125
 Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
 130 135 140
 Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
 145 150 155 160
 Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu
 165 170 175
 Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
 180 185 190
 Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
 195 200 205
 Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
 210 215 220
 Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
 225 230 235 240
 Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
 245 250 255
 Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
 260 265 270
 Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
 275 280 285
 Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
 290 295 300
 Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
 305 310 315 320
 Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
 325 330 335
 Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser Gly
 340 345 350
 Arg

<210> 6
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 大猩猩

<400> 6
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
 20 25 30
 Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
 50 55 60
 Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
 65 70 75 80
 Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
 85 90 95
 Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
 100 105 110
 Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
 115 120 125
 Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly

[0005]

```

130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
145      150      155      160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu
165      170      175
Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225      230      235      240
Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275      280      285
Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser
340      345      350
Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Lys Ala
355      360

```

<210> 7
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 大猩猩

```

<400> 7
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1      5      10      15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20      25      30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35      40      45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50      55      60
Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65      70      75      80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85      90      95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
100      105      110
Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Gly Asn
115      120      125
Pro Cys Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu Gly
130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
145      150      155      160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asn Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Lys Glu
165      170      175
Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225      230      235      240
Glu Gln Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu Arg
275      280      285
Arg Gln Leu Lys Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro Gly

```

[0006]

```

          340          345          350
Ser Ile His Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro Leu
          355          360          365
Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp Gln
          370          375          380
Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser Ser
          385          390          395          400
Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser
          405          410

```

<210> 8
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> 倭黑猩猩 (Pan paniscus)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 336
 <223> Xaa 是 Trp 或 Cys

```

<400> 8
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1          5          10          15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His
          20          25          30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
          35          40          45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
          50          55          60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
          65          70          75          80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
          85          90          95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu
          100          105          110
Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
          115          120          125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
          130          135          140
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
          145          150          155          160
Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
          165          170          175
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr
          180          185          190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
          195          200          205
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu
          210          215          220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
          225          230          235          240
Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe
          245          250          255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
          260          265          270
Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
          275          280          285
Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
          290          295          300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
          305          310          315          320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa
          325          330          335
Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser
          340          345          350
Ala Asp Asp Glu Thr Asp Asp Pro Arg Arg Tyr Gln Lys Tyr Gly Tyr
          355          360          365
Ile Gly Thr His Glu Tyr Pro His Phe Ser His Arg Pro Ser Thr Leu
          370          375          380
Gln Ala Ala Ser Ala Pro Gln Ala Glu Glu Asp Trp Thr Cys Thr Ile
          385          390          395          400
Leu

```

<210> 9
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> 倭黑猩猩

[0007]

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 336
<223> Xaa 是 Trp 或 Cys

<400> 9
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1      5      10      15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Cys Phe Arg Thr Gln Ile Asn His
20     25     30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35     40     45
Ser Ser Tyr Pro Val Cys Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50     55     60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65     70     75     80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85     90     95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Val Cys Gln Arg Glu
100    105    110
Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
115    120    125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
130    135    140
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
145    150    155    160
Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
165    170    175
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Phe Ser Thr Cys Phe Thr
180    185    190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
195    200    205
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu
210    215    220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
225    230    235    240
Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe
245    250    255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
260    265    270
Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
275    280    285
Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
290    295    300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
305    310    315    320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa
325    330    335
Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala
340    345    350
Ser Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala
355    360    365

```

```

<210> 10
<211> 415
<212> PRT
<213> 倭黑猩猩

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 336
<223> Xaa 是 Trp 或 Cys

```

```

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

```

[0008]

```

Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
115 120 125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
130 135 140
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
145 150 155 160
Ile Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
165 170 175
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr
180 185 190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Glu Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
195 200 205
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu
210 215 220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
225 230 235 240
Trp Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe
245 250 255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
260 265 270
Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
275 280 285
Ser Arg Gln Leu Glu Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
290 295 300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
305 310 315 320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Xaa
325 330 335
Asp Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Thr Gln His Thr Pro
340 345 350
Gly Ser Ile Arg Pro Thr Gly Arg Arg Gly Leu Asp Leu His His Pro
355 360 365
Leu Asn Ala Ser Ala Ser Trp Gly Lys Gly Leu Gln Cys Tyr Leu Asp
370 375 380
Gln Phe Leu His Phe Gln Val Gly Leu Leu Ile Gln Arg Gly Gln Ser
385 390 395 400
Ser Ser Val Ser Trp Cys Ile Ile Gln Asp Arg Thr Gln Val Ser
405 410 415

```

<210> 11
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩 (Pan troglodytes verus)

```

<400> 11
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1 5 10 15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Lys Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His
20 25 30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Gln Gly
35 40 45
Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50 55 60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65 70 75 80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85 90 95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
100 105 110
Glu Arg Ala Phe Ser Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
115 120 125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
130 135 140
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
145 150 155 160
Thr Asp Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
165 170 175
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr
180 185 190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
195 200 205
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu
210 215 220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
225 230 235 240
Trp Glu Gln Gly Ser Met Glu Thr Asp Phe Asn Thr Ala Gln Glu Phe
245 250 255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
260 265 270

```

[0009]

```

Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
    275          280          285
Arg Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
    290          295          300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
    305          310          315          320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn
    325          330          335

```

<210> 12
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 117
 <223> Xaa 是 Ser 或 Ala

```

<400> 12
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
    1          5          10          15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Lys Cys Phe Arg Lys Gln Ile Asn His
    20          25          30
Ala Ile Asp Ile Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Gln Gly
    35          40          45
Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
    50          55          60
Gly Lys Gly Thr Thr Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
    65          70          75          80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
    85          90          95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Arg Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
    100          105          110
Glu Arg Ala Phe Xaa Val Lys Phe Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp
    115          120          125
Asn Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Leu Gln Leu Gly Glu
    130          135          140
Gly Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu
    145          150          155          160
Thr Asp Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu
    165          170          175
Glu Cys Thr Tyr Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr
    180          185          190
Glu Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser
    195          200          205
Leu Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu
    210          215          220
Gly Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala
    225          230          235          240
Trp Glu Gln Gly Ser Met Glu Thr Asp Phe Asn Thr Ala Gln Glu Phe
    245          250          255
Arg Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr
    260          265          270
Trp Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Glu Lys Tyr Leu
    275          280          285
Arg Arg Gln Leu Thr Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp
    290          295          300
Pro Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Lys Gly Trp Arg Gln Leu
    305          310          315          320
Ala Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn
    325          330          335

```

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 猩猩 (Pongo pygmaeus abelii)

```

<400> 13
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
    1          5          10          15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His
    20          25          30
Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
    35          40          45
Ser Ser Tyr Pro Ala Arg Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
    50          55          60
Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val

```

[0010]

```

65          70          75          80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
          85          90          95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
          100          105          110
Ser Ile Phe Arg Glu Val
          115

```

```

<210> 14
<211> 400
<212> PRT
<213> 猩猩

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 113
<223> Xaa 是 Ser 或 Arg

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 114
<223> Xaa 是 Ile 或 Ala

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 116
<223> Xaa 是 Arg 或 Ser

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 117
<223> Xaa 是 Glu 或 Val

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa 是 Val 或 Lys

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa 是 Phe 或终止

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 142
<223> Xaa 是 Arg 或 Gly

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 363
<223> Xaa 是 Pro 或 Gln

```

```

<400> 14
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1          5          10          15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His
          20          25          30
Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
          35          40          45
Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
          50          55          60
Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
          65          70          75          80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
          85          90          95
Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
          100          105          110
Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Xaa Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp Asn
          115          120          125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Phe Gln Leu Xaa Glu Gly
          130          135          140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
          145          150          155          160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
          165          170          175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
          180          185          190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu

```

[0011]

```

195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Lys Leu Gly
210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
225      230      235      240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Lys Asn Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Leu Ser
275      280      285
Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Ile Gly Trp Arg Gln Leu Ala
305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Ala Glu Ser Asp Ser Glu
340      345      350
Asp Asp Glu Thr Tyr Asp Pro Arg Met Tyr Xaa Lys Tyr Gly Tyr Ile
355      360      365
Arg Thr His Glu Tyr Ser His Phe Ser His Ser Pro Ser Thr Leu Gln
370      375      380
Ala Ala Ser Thr Pro Gln Ala Glu Glu Asn Trp Thr Cys Thr Ile Leu
385      390      395      400

```

<210> I5
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 猩猩

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 113
 <223> Xaa 是 Ser 或 Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 114
 <223> Xaa 是 Ile 或 Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 116
 <223> Xaa 是 Arg 或 Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 117
 <223> Xaa 是 Glu 或 Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 118
 <223> Xaa 是 Val 或 Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 119
 <223> Xaa 是 Phe 或终止

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 142
 <223> Xaa 是 Arg 或 Gly

```

<400> I5
Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
1      5      10      15
Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His
20      25      30
Ala Ile Asp Thr Ile Cys Gly Phe Leu Lys Glu Arg Cys Phe Arg Gly
35      40      45
Ser Ser Tyr Pro Val His Val Ser Lys Val Val Lys Gly Gly Ser Ser
50      55      60
Gly Lys Gly Thr Ala Leu Arg Gly Arg Ser Asp Ala Asp Leu Val Val
65      70      75      80
Phe Leu Ser Pro Leu Thr Thr Phe Gln Asp Gln Leu Asn Arg Arg Gly
85      90      95

```

[0012]

```

Glu Phe Ile Gln Glu Ile Arg Lys Gln Leu Glu Ala Cys Gln Arg Glu
      100      105      110
Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Xaa Glu Val Gln Ala Pro Arg Trp Asp Asn
      115      120      125
Pro Arg Ala Leu Ser Phe Val Leu Ser Ser Phe Gln Leu Xaa Glu Gly
      130      135      140
Val Glu Phe Asp Val Leu Pro Ala Phe Asp Ala Leu Gly Gln Leu Thr
      145      150      155      160
Gly Gly Tyr Lys Pro Asp Pro Gln Ile Tyr Val Lys Leu Ile Glu Glu
      165      170      175
Cys Thr Asp Leu Gln Lys Glu Gly Glu Phe Ser Thr Cys Phe Thr Glu
      180      185      190
Leu Gln Arg Asp Phe Leu Lys Gln Arg Pro Thr Lys Leu Lys Ser Leu
      195      200      205
Ile Arg Leu Val Lys His Trp Tyr Gln Asn Cys Lys Lys Leu Gly
      210      215      220
Lys Leu Pro Pro Gln Tyr Ala Leu Glu Leu Leu Thr Val Tyr Ala Trp
      225      230      235      240
Glu Arg Gly Ser Met Lys Thr His Phe Asn Thr Ala Gln Gly Phe Arg
      245      250      255
Thr Val Leu Glu Leu Val Ile Asn Tyr Gln Gln Leu Cys Ile Tyr Trp
      260      265      270
Thr Lys Tyr Tyr Asp Phe Glu Asn Pro Ile Ile Lys Lys Tyr Leu Ser
      275      280      285
Arg Gln Leu Arg Lys Pro Arg Pro Val Ile Leu Asp Pro Ala Asp Pro
      290      295      300
Thr Gly Asn Leu Gly Gly Gly Asp Pro Ile Gly Trp Arg Gln Leu Ala
      305      310      315      320
Gln Glu Ala Glu Ala Trp Leu Asn Tyr Pro Cys Phe Lys Asn Trp Asp
      325      330      335
Gly Ser Pro Val Ser Ser Trp Ile Leu Leu Val Arg Pro Pro Ala Ser
      340      345      350
Ser Leu Pro Phe Ile Pro Ala Pro Leu His Glu Ala
      355      360

```

<210> 16
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> 猩猩

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 113
 <223> Xaa 是 Ser 或 Arg

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 114
 <223> Xaa 是 Ile 或 Ala

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 116
 <223> Xaa 是 Arg 或 Ser

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 117
 <223> Xaa 是 Glu 或 Val

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 118
 <223> Xaa 是 Val 或 Lys

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 119
 <223> Xaa 是 Phe 或终止

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 142
 <223> Xaa 是 Arg 或 Gly

<400> 16
 Met Met Asp Leu Arg Asn Thr Pro Ala Lys Ser Leu Asp Lys Phe Ile
 1 5 10 15
 Glu Asp Tyr Leu Leu Pro Asp Thr His Phe Arg Met Gln Ile Asn His

[0013]

Ala	Ile	Asp	Thr	Ile	Cys	Gly	Phe	Leu	Lys	Glu	Arg	Cys	Phe	Arg	Gly
		35					40					45			
Ser	Ser	Tyr	Pro	Val	His	Val	Ser	Lys	Val	Val	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser
		50				55					60				
Gly	Lys	Gly	Thr	Ala	Leu	Arg	Gly	Arg	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu	Val	Val
65					70				75					80	
Phe	Leu	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Phe	Gln	Asp	Gln	Leu	Asn	Arg	Arg	Gly
				85				90					95		
Glu	Phe	Ile	Gln	Glu	Ile	Arg	Lys	Gln	Leu	Glu	Ala	Cys	Gln	Arg	Glu
			100				105					110			
Xaa	Xaa	Phe	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Glu	Val	Gln	Ala	Pro	Arg	Trp	Asp	Asn
		115				120					125				
Pro	Arg	Ala	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Gln	Leu	Xaa	Glu	Gly
		130				135				140					
Val	Glu	Phe	Asp	Val	Leu	Pro	Ala	Phe	Asp	Ala	Leu	Gly	Gln	Leu	Thr
145					150				155					160	
Gly	Gly	Tyr	Lys	Pro	Asp	Pro	Gln	Ile	Tyr	Val	Lys	Leu	Ile	Glu	Glu
			165				170						175		
Cys	Thr	Asp	Leu	Gln	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Thr	Cys	Phe	Thr	Glu
		180					185					190			
Leu	Gln	Arg	Asp	Phe	Leu	Lys	Gln	Arg	Pro	Thr	Lys	Leu	Lys	Ser	Leu
		195				200					205				
Ile	Arg	Leu	Val	Lys	His	Trp	Tyr	Gln	Asn	Cys	Lys	Lys	Lys	Leu	Gly
	210				215					220					
Lys	Leu	Pro	Pro	Gln	Tyr	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	Trp
225					230				235					240	
Glu	Arg	Gly	Ser	Met	Lys	Thr	His	Phe	Asn	Thr	Ala	Gln	Gly	Phe	Arg
			245					250					255		
Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Val	Ile	Asn	Tyr	Gln	Gln	Leu	Cys	Ile	Tyr	Trp
		260					265					270			
Thr	Lys	Tyr	Tyr	Asp	Phe	Glu	Asn	Pro	Ile	Ile	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ser
		275					280					285			
Arg	Gln	Leu	Lys	Lys	Pro	Arg	Pro	Val	Ile	Leu	Asp	Pro	Ala	Asp	Pro
		290				295					300				
Thr	Gly	Asn	Leu	Gly	Gly	Gly	Asp	Pro	Ile	Gly	Trp	Arg	Gln	Leu	Ala
305					310					315				320	
Gln	Glu	Ala	Glu	Ala	Trp	Leu	Asn	Tyr	Pro	Cys	Phe	Lys	Asn	Trp	Asp
			325						330				335		
Gly	Ser	Pro	Val	Ser	Ser	Trp	Ile	Leu	Leu	Pro	Gln	His	Thr	Pro	Gly
			340					345				350			
Ser	Ile	His	Pro	Thr	Gly	Arg	Arg	Glu	Leu	Asp	Val	His	His	Pro	Leu
		355				360						365			
Asn	Ala	Ser	Ala	Ser	Trp	Gly	Lys	Gly	Leu	Gln	Cys	Tyr	Leu	Asp	His
		370				375					380				
Leu	Leu	His	Phe	Gln	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Gln	Arg	Gly	Gln	Arg	Ser
385					390					395				400	
Ser	Val	Ser	Trp	Cys	Ile	Ile	Gln	Asp	Arg	Thr	Gln	Val	Ser		
			405					410							

SEQ ID NO: 1

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK 60
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE 120
121 VQAPRWGNPRALSFLVSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTGSYKPNPQIYVKLIEECTDL 180
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLKGLPPQYALELLTVYAW 240
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWTKYYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD 300
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEAELNYPCKNWDGSPVSSWILL 346

图 1

位置	氨基酸置换
1	M 或 - (缺失)
31	D 或 N
115	L 或 F
127	G 或 R
162	S 或 G
295	R 或 T
315	G 或 R

图 2

位置	氨基酸置换
24	Lys 或 Thr
25	His 或 Cys
28	Thr 或 Lys 或 Met
36	Thr 或 Ile
47	Gln 或 Arg
53	Ala 或 Val
54	Arg 或 Cys
54	Arg 或 His 或 Cys
64	Phe 或 Ser
69	Ala 或 Thr
69	Ala 或 Ser 或 Thr
74	Ile 或 Ser
104	Lys 或 Arg
108	Val 或 Ala
112	Glu插入
113	Ser 或 Arg
114	Ile 或 Ala
116	Arg 或 Ser 或 Ala
117	Glu 或 Val
118	Val 或 Lys
119	终止或Phe
127	Asp 或 Gly
130	Cys 或 Arg
139	Phe 或 Leu
142	Arg 或 Gly
160	Ile 或 Thr
161	Asp 或 Gly
166	Asp 或 Asn
175	Lys 或 Glu
179	Tyr 或 Asp
200	Glu 或 Gln
226	Pro插入
242	Gln 或 Arg
246	Glu 或 Lys
248	Asp 或 His
250	Ile 或 Asn
254	Glu 或 Gly
274	Val 或 Lys
279	Glu 或 Lys
282	Ser 或 Ile
284	Lys 或 Glu
288	Ser 或 Arg
289	Arg 或 Arg
292	Glu 或 Thr

图 3

292	Arg 或 Thr
292	Ser 或 Thr
314	Ile 或 Lys
335	终止或 Trp
347+	Thr 或 Ala
347^	Pro 或 Thr
349+	Ser 或 Ser
350+	Asp 或 Asn
352+	Gly 或 Glu 或 Ala
353+	Arg 或 Asp
354+	终止或 Asp
356+	Ser 或 Thr
357+	Tyr 或 Asp
361+	Met 或 Arg
361^	Glu 或 Gly
363*	Lys 或 Glu
363+	Pro 或 Gln
364+	Gln 或 Lys
364^	Val 或 Leu
365+	His 或 Tyr
369+	Gln 或 Arg 或 Gly
371+	Tyr 或 His
372^	Ala 或 Ala
373+	Cys 或 Tyr
374+	Ser 或 Pro
375+	Tyr 或 His
378+	Gln 或 His
379+	Ser 或 Arg
382+	Ile 或 Thr
384^	His 或 Gln
385 ^	Leu 或 Phe
388+	Ala 或 Thr
389+	Arg 或 Pro
394+	Asn 或 Asp
399^	Arg 或 Ser

图 4

OAS1 中的灵长类突变

来源 GenBank 登录号 NM_009775.15 克隆中第一个 碱基的位置	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)	Alouatta palliata (alouata01)</
---	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	-------------------------------	---------------------------------

图 4(续)

SEQ ID NO:2(来自 NT-009775.15 染色体 12q24.1 的人类
OAS1 同种型 E18/p46, 核苷酸端点 3914354, 3926867)

```
1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFDQQLNRRGEFIQEIRROLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLAESNSADDETDDPR
361 RYQKYGYIGTHEYPHFSHRPSTLQAASTPQAEEDWTCTIL
```

SEQ ID NO:3(来自 NT-009775.15 染色体 12q24.1 的人类
OAS1 同种型 E16/p40, 核苷酸端点 3914354, 3925071)

```
1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFDQQLNRRGEFIQEIRROLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLVRFPASSLPFIPAP
361 LHEA
```

SEQ ID NO:4(来自 NT-009775.15 染色体 12q24.1 的人类
OAS1 同种型 p48, 核苷酸端点 3914354, 3927007)

```
1  MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61  GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFDQQLNRRGEFIQEIRROLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRQLTKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLINASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTOVS
```

图 5

SEQ ID NO:5大猩猩 (*Gorilla gorilla*) OAS1 同种型 E18 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKG TALGRSDADLVVFLSPLTTFFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLAESDSGR

SEQ ID NO:6大猩猩 (*Gorilla gorilla*) OAS1 同种型 E16 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKG TALGRSDADLVVFLSPLTTFFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHKA

SEQ ID NO:7大猩猩 (*Gorilla gorilla*) OAS1 同种型 p48 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRMQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKG TALGRSDADLVVFLSPLTTFFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQRERAFSVKFE
121 VQAPRWGNPCALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTGGYKPNPQIYVKLIKECTYL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCCKKLGLPPQYALELLTVYAW
241 EQGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLRRLRQLKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNWDGSPVSSWILLTQHTPGSIHPTGRR
361 GLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTQVS

SEQ ID NO:8倭黑猩猩 (*Pan paniscus*) OAS1 同种型 E18 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
61 GGSSGKG TTLGRSDADLVVFLSPLTTFFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
121 EVQAPRWDPNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKPDQIYVKLIBECTY

图 5(续)

181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA
 241 WERGSMKTHENTAQQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNXDGSPVSSWILLAESDSADDETDDP
 361 RRYQKYGYIGTHEYPHFSHRPSTLQAASAPQAEEDWTCTIL

SEQ ID NO:9(倭黑猩猩 (Pan paniscus) OAS1 同种型 E16 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTCFRTQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
 121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKDPQIYVKLIEECTY
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA
 241 WERGSMKTHENTAQQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNXDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPA
 361 PLHEA

SEQ ID NO:10(倭黑猩猩 (Pan paniscus) OAS1 同种型 p48 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFRGSSYPVCVSKVVK
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEVCQREERAFSVKF
 121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLIGGYKDPQIYVKLIEECTY
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKERPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA
 241 WERGSMKTHENTAQQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIEKYLSRQLEKPRPVIL
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKNXDGSPVSSWILLTQHTPGSIRPTGR
 361 RGLDLHHPLNASASWGKGLQCYLDQFLHFQVGLLIQRGQSSSVSWCIIQDRTOVS

SEQ ID NO:11(黑猩猩 (Pan troglodytes verus) OAS1同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFQGSSYPVHVSKVVK
 61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRRQLEACQREERAFSVKF
 121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAPDALGQLTDGYKDPQIYVKLIEECTY
 181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLQRPPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPQYALELLTVYA
 241 WEQGSMEFDNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIEKYLRRLTKPRPVIL
 301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYPCKN

图 5(续)

SEQ ID NO:12(黑猩猩 (*Pan troglodytes*) OAS1同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDKCFRKQINHAIDIICGFLKERCFQGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTTLRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREERAFXVKF
121 EVQAPRWDNPRALS FVLSSLQLGEGVEFDVLPAFDALGQLTDGYKPD PQIYVKLIEECTY
181 LQKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYA
241 WEQGSMTDFNTAQEFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIEKYLRRLTKPRPVIL
301 DPADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYP C FKN

SEQ ID NO:13(猩猩 (*Pongo pygmaeus abelii*) OAS1 短同种型)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPARVSKVVK
61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQRESIFREV

SEQ ID NO:14(猩猩 (*Pongo pygmaeus abelii*) OAS1同种型 B18 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
121 VQAPRWDNPRALS FVLSSFQXEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPD PQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFKNPIIKKYSRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYP C FKNWDGSPVSSWILLAESDSEDDETYDPR
361 MYXKGYIIRTHEYSHFSHPSTLQAASTPQAEENWTCTIL

SEQ ID NO:15(猩猩 (*Pongo pygmaeus abelii*) OAS1同种型 B16 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK
61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
121 VQAPRWDNPRALS FVLSSFQXEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPD PQIYVKLIEECTDL
181 QKEGEFSTCFTELQRDFLKQRPTKLKSLIRLVKHWYQNCKKKLGKLPPQYALELLTVYAW
241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIKKYSRQLRKPRPVILD
301 PADPTGNLGGGDPKGWRQLAQEA EAWLNYP C FKNWDGSPVSSWILLVRPPASSLPFIPAP
361 LHEA

SEQ ID NO:16(猩猩 (*Pongo pygmaeus abelii*) OAS1同种型 p48 同系物)

1 MMDLRNTPAKSLDKFIEDYLLPDTHFRMQINHAIDTICGFLKERCFRGSSYPVHVSKVVK

图 5(续)

61 GGSSGKGTALRGRSDADLVVFLSPLTTTFQDQLNRRGEFIQEIRKQLEACQREXXFXXXXE
 121 VQAPRWDNPRALSFVLSSFQLXEGVEFDVLPAFDALGQLTGGYKPDQIYVKLIEECTDL
 181 QKEGEFSTCFTELQRDFLQQRPTKLKSLIRLVKHWHYQNCCKKLGKLPQYALELLTVYAW
 241 ERGSMKTHFNTAQGFRTVLELVINYQQLCIYWKYYDFENPIIKYLSRQLKKPRPVILD
 301 PADPTGNLGGGDPIGWRQLAQEAELNYPCKNWDGSPVSSWILLPQHTPGSIHPTGRR
 361 ELDVHHPLNASASWGKGLQCYLDHLLHFQVGLLIQRGQRSSVSWCIIQDRTQVS

在上述序列中，X表示由下表所述的可变氨基酸

序列	氨基酸位置	可选的氨基酸
SEQ ID NO:8	336	W 或 C
SEQ ID NO:9	336	W 或 C
SEQ ID NO:10	336	W 或 C
SEQ ID NO:12	117	S 或 A
SEQ ID NO:14	113	S 或 R
SEQ ID NO:15	113	S 或 R
SEQ ID NO:16	113	S 或 R
SEQ ID NO:14	114	I 或 A
SEQ ID NO:15	114	I 或 A
SEQ ID NO:16	114	I 或 A
SEQ ID NO:14	116	R 或 S
SEQ ID NO:15	116	R 或 S
SEQ ID NO:16	116	R 或 S
SEQ ID NO:14	117	E 或 V
SEQ ID NO:15	117	E 或 V
SEQ ID NO:16	117	E 或 V
SEQ ID NO:14	118	V 或 K
SEQ ID NO:15	118	V 或 K
SEQ ID NO:16	118	V 或 K
SEQ ID NO:14	119	终止或 F
SEQ ID NO:15	119	终止或 F
SEQ ID NO:16	119	终止或 F
SEQ ID NO:14	142	R 或 G
SEQ ID NO:15	142	R 或 G
SEQ ID NO:16	142	R 或 G
SEQ ID NO:14	363	P 或 Q

图 5(续)