



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102038938 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 04

(21) 申请号 201010256064. X

(22) 申请日 2003. 09. 26

(30) 优先权数据

60/414, 307 2002. 09. 27 US

(62) 分案原申请数据

03825372. 0 2003. 09. 26

(71) 申请人 比奥根艾迪克 MA 公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 艾尔弗雷德·桑德罗克

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 闵丹

(51) Int. Cl.

A61K 38/21 (2006. 01)

A61P 25/02 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 32 页 序列表 14 页
附图 6 页

(54) 发明名称

利用 IFN- β 治疗慢性炎性脱髓鞘性多神经病

(57) 摘要

本发明提供了用于治疗患有或易患慢性脱髓鞘性神经病例如 CIDP 的受试哺乳动物的方法以及用于所述治疗的药物。所述方法包括给药 IFN- β 治疗剂。

1. IFN- β 治疗剂在制备用于治疗慢性脱髓鞘性运动神经病的药物中的用途。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂是经由非皮下的胃肠外途径给药的治疗剂。
3. 权利要求 2 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂是经肌肉内给药的治疗剂。
4. 权利要求 1-3 之一的用途,其中所述慢性脱髓鞘性运动神经病是慢性炎性脱髓鞘性神经病 (CIDP)。
5. 权利要求 1-4 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包含成熟 IFN- β 。
6. 权利要求 1-5 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂缺乏第一个蛋氨酸。
7. 权利要求 1-6 之一的用途,其中所述 IFN- β 是人 IFN- β 。
8. 权利要求 7 的用途,其中所述 IFN- β 与具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 具有至少约 95% 的同一性。
9. 权利要求 8 的用途,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:4。
10. 权利要求 1-9 之一的用途,其中所述 IFN- β 是糖基化的。
11. 权利要求 1-9 之一的用途,其中所述 IFN- β 是非糖基化的。
12. 权利要求 7 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1a。
13. 权利要求 7 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1b。
14. 权利要求 1-13 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括与免疫球蛋白分子恒定区融合的 IFN- β 。
15. 权利要求 14 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是人免疫球蛋白分子。
16. 权利要求 15 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是 IgG1 的重链。
17. 权利要求 16 的用途,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:14。
18. 权利要求 1-17 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括 PEG 化的 IFN- β 。
19. 权利要求 1-18 之一的用途,其中所述药物包含稳定剂。
20. 权利要求 19 的用途,其中所述稳定剂是酸性氨基酸。
21. 权利要求 20 的用途,其中所述稳定剂是精氨酸。
22. 权利要求 1-21 之一的用途,其中所述药物的 pH 为约 4.0 到 7.2。
23. 权利要求 1-2 及 4-22 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂通过静脉内 (i. v.) 给药。
24. 权利要求之 1-23 之一的用途,包括将数个剂量的 IFN- β 治疗剂给药哺乳动物。
25. 权利要求 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周施用一次。
26. 权利要求 24 的用途,其中所述 IFN- β 以约 6MIU 的剂量每周施用两次。
27. 权利要求 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用一次。
28. 权利要求 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用两次。
29. 权利要求 1-28 之一的用途,其中所述药物是施用于人的药物。
30. 权利要求 1-29 之一在制备药物中的用途,所述药物是施用于下述个体的药物,其中以前没有发现所述个体抵抗慢性脱髓鞘性神经病的其它治疗。
31. 权利要求 1-30 之一的用途,其中所述药物与包含免疫抑制剂或血浆置换的治疗联合给药。
32. 权利要求 30 的用途,其中所述药物与包含免疫抑制剂的治疗联合给药,所述免疫

治疗剂选自类固醇, 硫唑嘌呤, 环孢霉素, 环磷酰胺或霉酚酸酯。

33. 权利要求 2-32 之一的用途, 其中所述药物给药与包含第二种 CIDP 疗法的治疗联合, 其中 IFN- β 治疗剂是经由非皮下的胃肠外途径给药的治疗剂。

34. 权利要求 2-32 之一的用途, 其中所述药物与包含第二种 CIDP 疗法的治疗联合给药, 其中每周给药 IFN- β 治疗剂一次。

35. 权利要求 33 或 34 的用途, 其中所述第二种 CIDP 疗法选自给药 IVIg; 给药类固醇; 给药抗炎药或血浆置换。

36. 权利要求 1-30 之一的用途, 其中将所述药物给药正接受另一种疗法的个体以便治疗慢性脱髓鞘性运动神经病, 且上述治疗还包括停用所述另一种疗法。

37. IFN- β 治疗剂在制备治疗慢性脱髓鞘性运动神经病的药物中的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂是与包含免疫抑制剂、抗炎药或血浆置换的治疗联用给药的治疗剂。

38. 权利要求 37 的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂是与包含免疫抑制剂或血浆置换的治疗联用给药的治疗剂。

39. 权利要求 37 的用途, 其中所述联合治疗是给药 IFN- β 治疗剂和免疫抑制剂。

40. 权利要求 39 的用途, 其中所述免疫抑制剂选自类固醇, 硫唑嘌呤, 环孢霉素, 环磷酰胺或霉酚酸酯。

41. 权利要求 37 的用途, 其中所述联合治疗是给药 IFN- β 治疗剂和抗炎药。

42. 权利要求 37 的用途, 其中所述联合治疗是血浆置换和给药 IFN- β 治疗剂。

43. 权利要求 37-42 之一的用途, 其中所述药物是施用于下述个体的药物, 其中以前没有发现所述个体抵抗慢性脱髓鞘性神经病的其它治疗。

44. 权利要求 37-43 之一的用途, 所述 IFN- β 治疗剂是经由非皮下的胃肠外途径给药的治疗剂。

45. 权利要求 44 的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂是经肌内给药的治疗剂。

46. 权利要求 44 的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂是通过静脉内给药的治疗剂。

47. 权利要求 37-46 之一的用途, 其中所述慢性脱髓鞘性神经病是慢性炎性脱髓鞘性神经病。

48. 权利要求 37-47 之一的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂包含成熟 IFN- β 。

49. 权利要求 37-48 之一的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂缺乏第一个蛋氨酸。

50. 权利要求 37-49 之一的用途, 其中所述 IFN- β 是人 IFN- β 。

51. 权利要求 37-50 之一的用途, 其中所述与具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 具有至少约 95% 的同一性。

52. 权利要求 51 的用途, 其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:4。

53. 权利要求 37-52 之一的用途, 其中所述 IFN- β 是糖基化的。

54. 权利要求 37-52 之一的用途, 其中所述 IFN- β 是非糖基化的。

55. 权利要求 50 的用途, 其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1a。

56. 权利要求 50 的用途, 其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1b。

57. 权利要求 37-56 之一的用途, 其中所述 IFN- β 治疗剂包括与免疫球蛋白分子恒定区融合的 IFN- β 。

58. 权利要求 57 的用途, 其中所述免疫球蛋白分子是人免疫球蛋白分子。

59. 权利要求 57 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是 IgG1 的重链。
60. 权利要求 59 的用途,所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:14。
61. 权利要求 37-60 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括 PEG 化的 IFN- β 。
62. 权利要求 37-61 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包含稳定剂。
63. 权利要求 62 的用途,其中所述稳定剂是酸性氨基酸。
64. 权利要求 63 的用途,其中所述稳定剂是精氨酸。
65. 权利要求 37-64 之一的用途,其中所述药物的 pH 为约 4.0 到 7.2。
66. 权利要求 37-65 之一的用途,包括将数个剂量的 IFN- β 治疗剂给药哺乳动物。
67. 权利要求 37-66 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周施用一次。
68. 权利要求 37-67 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周施用两次。
69. 权利要求 37-68 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用一次。
70. 权利要求 37-69 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用两次。
71. 权利要求 37-70 之一的用途,其中所述药物是施用于人的药物。
72. 权利要求 1-71 之一的用途,其中所述药物是施用于人的药物,所述人是指以前未发现抵抗慢性脱髓鞘性运动神经病的其它治疗的人。

利用 IFN- β 治疗慢性炎性脱髓鞘性多神经病

[0001] 本申请是中国申请 03825372.0 的分案申请,该母案于 2003 年 9 月 26 日以国际申请号 PCT/US2003/030532 提交,于 2005 年 5 月 25 日进入中国国家阶段,本分案采用了与该母案一致的发明名称。

背景技术

[0002] 慢性炎性脱髓鞘性多神经病 (chronic inflammation demyelinating polyneuropathy) (CIDP) 是神经疾病,其特征是腿和臂的慢性进行性无力和感觉功能障碍。这种疾病是对外周神经髓鞘破坏的结果。神经根肿胀也是该疾病的特征。尽管所述疾病出现在任何年龄和性别, CIDP 更常见于年轻成年人,且在男性中比女性更为常见。症状包括麻刺感 (tingling) 或麻木 (从脚趾和手指开始), 臂和腿的无力 (weakness), 肌肉疼痛 (aching pain in the muscle), 深肌腱反射丧失 (无反射 (areflexia)), 疲劳以及感觉异常。

[0003] CIDP 与一些其它疾病相关。例如,发现在三分之一的人免疫缺陷病毒 (HIV)- 血清阳性患者中可将炎性脱髓鞘性神经病 (例如 CIDP) 诊断为外周神经疾病。发现 CIDP 出现在患有狼疮 (lupus), 副蛋白血症 (paraproteinemia), 淋巴瘤或糖尿病的个体中。

[0004] 未经治疗的 CIDP 的特征是累积性失能 (accumulating disability), 并需要物理和专业治疗, 矫形器, 以及长期治疗。医学知识丰富的医师的密切随诊观察对于调整治疗而言是必要的。

[0005] 目前治疗 CIDP 的方法包括给药皮质类固醇诸如泼尼松, 其可单独给药或与免疫抑制药物联合给药。免疫抑制药物也可在缺乏类固醇的条件下给药。血浆置换 (plasmapheresis) (血浆交换 (plasma exchange)) 以及静脉内免疫球蛋白 (IVIg) 疗法也相对有效并且是目前使用的。IVIg 甚至可用作一线治疗。同样, 物理治疗可也改善肌肉力量, 功能和活动性, 并使挛缩 (contracture) 发展最小化。

[0006] CIDP 的病程在不同个体之间差异很大。一些人发作 CIDP 然后自愈, 而另一些人可出现多次发作并在复发间期部分恢复。该疾病是获得性神经病的可治疗病因, 且推荐早期开始治疗以预防神经细胞的丢失。然而, 一些个体仍遗留有一些残留的麻木或无力。

[0007] 因此, 目前治疗 CIDP 的方法包括有害的方法 (例如类固醇或免疫抑制剂); 昂贵的方法 (例如, IVIg 和血浆置换); 或不方便的方法 (例如, 血浆置换)。因此, 非常需要治疗慢性脱髓鞘性神经病例如 CIDP 的有效治疗方法, 所述方法与现有的方法相比毒性较低, 较不昂贵并且更为方便。

发明内容

[0008] 一个实施方案中, 本发明提供治疗哺乳动物中慢性脱髓鞘性运动神经病的方法。所述方法可包括给药哺乳动物治疗有效量的 IFN- β 治疗剂。IFN- β 治疗剂可经由非皮下的胃肠外途径, 例如经肌肉内给药。优选实施方案中, 所述神经病是慢性炎性脱髓鞘性神经病 (CIDP)。

[0009] IFN- β 治疗剂可包括人 IFN- β 。例如,所述 IFN- β 治疗剂可包括与具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 至少约 95% 同一性的蛋白。所述 IFN- β 治疗剂可包括具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 。所述 IFN- β 治疗剂还可包括与异源多肽例如人免疫球蛋白分子恒定区融合的、具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 。所述免疫球蛋白分子可为 IgG1 的重链。IFN- β 治疗剂可包括 SEQ ID NO:14。IFN- β 治疗剂还可包括 PEG 化的 IFN- β 。

[0010] IFN- β 治疗剂或包含它的组合物可包含稳定剂诸如蛋白与氨基酸等,例如,所述稳定剂可为精氨酸。IFN- β 治疗剂或包含它的组合物可具有约 4.0-7.2 的 pH。

[0011] IFN- β 治疗剂可每周给药一次,两次或三次。在具体实施方案中,IFN- β 治疗剂以约 6 或 12 百万国际单位 (MIU) 给药。IFN- β 治疗剂可经肌肉或经皮下给药。优选实施方案中,所述个体是哺乳动物,优选为人。

[0012] 本发明还提供治疗神经病例如 CIDP 的方法,包括给药患有神经病的个体治疗有效量的 IFN- β 治疗剂,并给药所述个体免疫抑制剂或对所述个体进行血浆置换。所述方法可包括将选自下组的免疫抑制剂给药所述个体:类固醇 (steroid),硫唑嘌呤 (azothioprine),环孢霉素 (cyclophosphamide),环磷酰胺 (cyclophosphamide) 或霉酚酸酯 (mycophenolate)。

[0013] 本发明还包括治疗神经病例如 CIDP 的方法,包括对患有神经病的个体联合给药治疗有效量的 IFN- β 治疗剂以及第二种针对所述神经病的治疗,其中所述 IFN- β 治疗剂的给药经由非皮下的胃肠外途径。所述 IFN- β 治疗剂的给药可经肌肉给药。如果所述 IFN- β 治疗剂是 CIDP,所述第二种治疗可选自给药类固醇;给药 IVIg;给药抗炎药或血浆置换。

[0014] 另一实施方案中,本发明提供治疗神经病例如 CIDP 的方法,包括对患有神经病的个体联合给药治疗有效量的 IFN- β 治疗剂以及第二种针对所述神经病的治疗,其中每周给药 IFN- β 治疗剂一次。如果所述神经病是 CIDP,所述第二种 CIDP 疗法可选自给药类固醇;给药 IVIg;给药抗炎药或血浆置换。

[0015] 另一实施方案中,本发明提供治疗接受第一种 CIDP 疗法的个体中的 CIDP 的方法,所述第一种 CIDP 疗法选自给药类固醇;给药 IVIg;给药抗炎药以及血浆置换,其中改进包括除给药所述个体第一种 CIDP 疗法以外,给药 IFN- β 治疗剂以有效缓解 CIDP 的症状,其中所述 IFN- β 治疗剂的剂量可有效明显减少第一种 CIDP 疗法的剂量或频率,且所述 IFN- β 治疗剂经由非皮下的胃肠外途径给药。在治疗 CIDP 的另一方法中,个体接受选自给药类固醇;给药 IVIg;给药抗炎药或血浆置换的第一种 CIDP 疗法,所述改进包括除给药所述个体第一种 CIDP 疗法以外,每周给药一次 IFN- β 治疗剂以有效缓解 CIDP 的症状,所述 IFN- β 治疗剂的剂量可有效地明显减少第一种 CIDP 疗法的剂量或频率。患有 CIDP 的个体可通过接受选自给药类固醇;给药 IVIg;给药抗炎药或血浆置换的第一种 CIDP 疗法来进行治疗,其中的改进包括除给药所述个体第一种 CIDP 疗法以外,给药 IFN- β 治疗剂以有效缓解 CIDP 的症状,所述 IFN- β 治疗剂的剂量可有效明显减少第一种 CIDP 疗法的剂量或频率。

[0016] 更具体地,本发明涉及:

[0017] 73. IFN- β 治疗剂在制备用于治疗慢性脱髓鞘性运动神经病的药物中的用途。

[0018] 74. 项 1 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂经由非皮下的胃肠外途径给药。

- [0019] 75. 项 2 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂是经肌肉给药的治疗剂。
- [0020] 76. 项 1-3 之一的用途,其中所述慢性脱髓鞘性运动神经病是慢性炎性脱髓鞘性神经病 (CIPD)。
- [0021] 77. 项 1-4 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包含成熟 IFN- β 。
- [0022] 78. 项 1-5 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂缺乏第一个蛋氨酸。
- [0023] 79. 项 1-6 之一的用途,其中所述 IFN- β 是人 IFN- β 。
- [0024] 80. 项 7 的用途,其中所述 IFN- β 与具有 SEQ ID NO:4 的全长成熟人 IFN- β 具有至少约 95% 的同一性。
- [0025] 81. 项 8 的用途,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:4。
- [0026] 82. 项 1-9 之一的用途,其中所述 IFN- β 是糖基化的。
- [0027] 83. 项 1-9 之一的用途,其中所述 IFN- β 是非糖基化的。
- [0028] 84. 项 7 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1a。
- [0029] 85. 项 7 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1b。
- [0030] 86. 项 1-13 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括与免疫球蛋白分子恒定区融合的 IFN- β 。
- [0031] 87. 项 14 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是人免疫球蛋白分子。
- [0032] 88. 项 15 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是 IgG1 的重链。
- [0033] 89. 项 16 的用途,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO:14。
- [0034] 90. 项 1-17 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括 PEG 化的 IFN- β 。
- [0035] 91. 项 1-18 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包含稳定剂。
- [0036] 92. 项 19 的用途,其中所述稳定剂是酸性氨基酸。
- [0037] 93. 项 20 的用途,其中所述稳定剂是精氨酸。
- [0038] 94. 项 1-21 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂的 pH 为约 4.0 到 7.2。
- [0039] 95. 项 1-2 及 4-22 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂通过静脉内 (i. v.) 给药。
- [0040] 96. 项 1-23 之一的用途,包括将数个剂量的 IFN- β 治疗剂给药哺乳动物。
- [0041] 97. 项 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周施用一次。
- [0042] 98. 项 24 的用途,其中所述 IFN- β 以约 6MIU 的剂量每周施用两次。
- [0043] 99. 项 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用一次。
- [0044] 100. 项 24 的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用两次。
- [0045] 101. 项 1-28 之一的用途,其中所述哺乳动物是人。
- [0046] 102. 项 1-29 之一在制备药物中的用途,所述药物施用于个体,其中以前没有发现所述个体抵抗慢性脱髓鞘性神经病的其它治疗。
- [0047] 103. 项 1-30 之一的用途,其中所述药物与包含免疫抑制剂或血浆置换的治疗联合给药。
- [0048] 104. 项 30 的用途,其中所述药物与包含免疫抑制剂的治疗联合给药,所述免疫治疗剂选自类固醇,硫唑嘌呤,环孢霉素,环磷酰胺或霉酚酸酯。
- [0049] 105. 项 2-32 之一的用途,其中所述药物给药与包含第二种 CIDP 疗法的治疗联合,其中 IFN- β 治疗剂经由非皮下的胃肠外途径给药。
- [0050] 106. 项 2-32 之一的用途,其中所述药物与包含第二种 CIDP 疗法的治疗联合给药,

其中每周给药 IFN- β 治疗剂一次。

[0051] 107. 项 33 或 34 的用途,其中所述第二种 CIDP 疗法选自给药 IVIg ;给药类固醇 ;给药抗炎药或血浆置换。

[0052] 108. 项 1-30 之一的用途,其中将所述药物给药正接受另一种疗法的个体以便治疗慢性脱髓鞘性运动神经病,且上述治疗还包括停用所述另一种疗法。

[0053] 109. 治疗哺乳动物中慢性脱髓鞘性运动神经病的方法,包括将治疗有效量的 IFN- β 治疗剂给药所述哺乳动物。

[0054] 110. 项 37 的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂经由非皮下的胃肠外途径给药。

[0055] 111. 项 37 的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂是经肌肉内给药的制剂。

[0056] 112. 项 37 的方法,其中所述慢性脱髓鞘性运动神经病是慢性炎性脱髓鞘性神经病 (CIDP)。

[0057] 113. 项 37-40 之一的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂包括成熟 IFN- β 。

[0058] 114. 项 37-41 之一的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂缺乏第一个蛋氨酸。

[0059] 115. 项 37-42 之一的方法,其中所述 IFN- β 是人 IFN- β 。

[0060] 116. 项 43 的方法,所述 IFN- β 与具有 SEQ ID NO :4 的全长成熟人 IFN- β 具有至少约 95% 的同一性。

[0061] 117. 项 44 的方法,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO :4。

[0062] 118. 项 37-45 之一的用途,其中所述 IFN- β 是糖基化的。

[0063] 119. 项 37-46 之一的用途,其中所述 IFN- β 是非糖基化的。

[0064] 120. 项 43 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1a。

[0065] 121. 项 43 的用途,其中所述 IFN- β 是 IFN- β -1b。

[0066] 122. 项 37-49 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括与免疫球蛋白分子恒定区融合的 IFN- β 。

[0067] 123. 项 50 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是人免疫球蛋白分子。

[0068] 124. 项 51 的用途,其中所述免疫球蛋白分子是 IgG1 的重链。

[0069] 125. 项 52 的用途,其中所述 IFN- β 包含 SEQ ID NO :14。

[0070] 126. 项 37-53 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包括 PEG 化的 IFN- β 。

[0071] 127. 项 37-54 之一的用途,其中所述 IFN- β 治疗剂包含稳定剂。

[0072] 128. 项 55 的用途,其中所述稳定剂是酸性氨基酸。

[0073] 129. 项 56 的用途,其中所述稳定剂是精氨酸。

[0074] 130. 项 37-57 之一的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂的 pH 为约 4.0 到 7.2。

[0075] 131. 项 37-38 及 40-58 之一的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂通过静脉内 (i. v.) 给药。

[0076] 132. 项 37-60 之一的方法,包括将数个剂量的 IFN- β 治疗剂给药哺乳动物。

[0077] 133. 项 60 的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周施用一次。

[0078] 134. 项 60 的方法,其中所述 IFN- β 以约 6MIU 的剂量每周施用两次。

[0079] 135. 项 60 的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用一次。

[0080] 136. 项 60 的方法,其中所述 IFN- β 治疗剂以约 12MIU 的剂量每周施用两次。

[0081] 137. 项 37-64 之一的方法,其中所述哺乳动物是人。

[0082] 138. 治疗 CIDP 的方法,包括将药物有效量的 IFN- β 治疗剂给药患有 CIDP 的个体,以及进一步将免疫抑制剂给药所述个体或对所述个体进行血浆置换。

[0083] 139. 项 66 的方法,包括给药所述个体选自类固醇,硫唑嘌呤,环孢霉素,环磷酰胺或霉酚酸酯的免疫抑制剂。

[0084] 140. 治疗 CIDP 的方法,包括将药物有效量的 IFN- β 治疗剂与第二种 CIDP 疗法联合给药患有 CIDP 的患者,其中所述 IFN- β 治疗剂经由非皮下的胃肠外途径给药。

[0085] 141. 项 68 的方法,其中所述第二种 CIDP 疗法选自给药 IVIg ;给药类固醇 ;给药抗炎药或血浆置换。

[0086] 142. 治疗 CIDP 的方法,包括将药物有效量的 IFN- β 治疗剂与第二种 CIDP 疗法联合给药患有 CIDP 的患者,其中每周给药所述 IFN- β 治疗剂一次。

[0087] 143. 项 70 的方法,其中所述第二种 CIDP 疗法选自给药 IVIg ;给药类固醇 ;给药抗炎药或血浆置换。

[0088] 144. 在选自给药类固醇 ;给药抗炎药 ;给药 IVIG 或血浆置换的、用于治疗正在接受第一种 CIDP 疗法的个体中 CIDP 的方法中,其中的改进包括给药该个体所述第一种 CIDP 疗法以及一定剂量的 IFN- β 治疗剂以便有效缓解 CIDP 的症状,所述一定剂量的 IFN- β 治疗剂可有效地明显降低该第一种 CIDP 疗法的剂量或频率,其中所述 IFN- β 治疗剂的给药经由非皮下的胃肠外途径。

[0089] 145. 在选自给药类固醇 ;给药抗炎药 ;给药 IVIG 或血浆置换的、用于治疗正在接受第一种 CIDP 疗法的患者中 CIDP 的方法中,其中的改进包括给药该个体所述第一种 CIDP 疗法以及每周一次一定剂量的 IFN- β 治疗剂以便有效缓解 CIDP 的症状,所述一定剂量的 IFN- β 治疗剂可有效地明显降低该第一种 CIDP 疗法的剂量或频率。

[0090] 146. 在选自给药类固醇 ;给药抗炎药 ;给药 IVIG 或血浆置换的、用于治疗正在接受第一种 CIDP 疗法的患者中 CIDP 的方法中,其中的改进包括给药该个体所述第一种 CIDP 疗法以及一定剂量的 IFN- β 治疗剂以便有效缓解 CIDP 的症状,所述一定剂量的 IFN- β 治疗剂可有效地明显降低该第一种 CIDP 疗法的剂量或频率。

[0091] 附图简述

[0092] 图 1A-C 显示一种融合蛋白的核苷酸序列 (SEQ ID NO :11) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :12),该融合蛋白的组成为 :VCAM 信号序列与成熟全长人 IFN- β (SEQ ID NO :3 和 4) 融合,该成熟全长人 IFN- β 与人 IgG1Fc (ZL5107) 的铰链区、CH2 和 CH3 区融合,其中 SEQ ID NO :4 的第 162 位甘氨酸被半胱氨酸取代。

[0093] 图 2A-C 显示一种融合蛋白的核苷酸序列 (SEQ ID NO :13) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO :14) 序列,该融合蛋白的组成为 :VCAM 信号序列与成熟全长人 IFN- β (SEQ ID NO :3 和 4) 融合,该成熟全长人 IFN- β 与 G4S 连接体 (linker) 融合,该 G4S 连接体与人 IgG1Fc (ZL6206) 的铰链区、CH2 和 CH3 区融合,其中 SEQ ID NO :4 的第 162 位甘氨酸被半胱氨酸取代。

发明内容

[0094] 本发明提供了治疗慢性脱髓鞘性神经病,例如 CIDP 的方法,包括给药治疗有效量的 IFN- β 治疗剂。

[0095] 1. 定义：

[0096] 为更清楚和简明地指出本发明的主题，对本说明书和所附权利要求中所使用的术语给出如下定义。

[0097] 除非文中另有清楚的描述，说明书和所附权利要求中所使用的单数形式“一种”，“该”和“所述”包括指称对象的复数。

[0098] “慢性炎性脱髓鞘性多神经病”可与“CIDP.”互换使用。以下疾病与 CIDP 相同或基本相同，并由此用于本文时包括在术语“CIDP”中：“慢性复发性 (relapsing) 多神经病”，“慢性特发性 (idiopathic) 脱髓鞘性多神经病”，“慢性炎性脱髓鞘性多发性神经根病 (polyradiculoneuropathy)，”和“慢性获得性 (acquired) 脱髓鞘性多神经病”(“CADP”)。CIDP 具有慢性渐进性、逐步或复发性病程 (见，例如，Dyck 等 (1993)，Dyck, P. J., Thomas, Plk., Griffin, J. W., Low, P. A., Poduslo, J. F. (Eds), Peripheral Polyneuropathy, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp. 1498-1517)。CIDP 的病理特点是神经内膜中的节段性脱髓鞘和髓鞘再生 (remyelination) 以及单核细胞浸润 (Dyck 等，见上文)。CIDP 有时称为多发性硬化 (MS) 的周围神经对应疾病 (peripheral counterpart) (Toyka and Hartung (1996) Curr. Opin. Neurol. 9, 240-250)。有时也称其为格林-巴利综合征 (Guillain-Barre syndrome) 的慢性形式。诊断 CIDP 的标准包括临床的，电生理学的以及脑脊液 (CSF) 标准，其描述见于 ad hoc subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS task force (1991) Neurology 41:617。诊断实验包括 9 孔圆柱实验 (nine hole peg test)；10 米行走实验 (10 meters walking test)；Rankin 评分 (scale) 或其改进形式；以及 MRC 总分 (MRC sum score) 或其改进形式 (Mathiowetz 等 (1985) Occupational Therapy J. of Res. 5:24；Thompson 等 (1996) J. Neurol. 243:280；Collen 等 (1990) Int. Disability Studies 12:6；van Swieten 等 (1988) Stroke 19:604 and Kleyweg 等 (1991) Muscle Nerve 14:1103)。神经学评估还包括神经学失能评分 (Neurologic Disability Scale) (NDS)；失能评分 (disability scale) (0, 健康；1, 较少指征；2, 能无需辅助行走但不能跑；3, 能在帮助下行走 5 米；4, 轮椅/卧床)；Hammersmith 运动能力实验 (Hammersmith Motor Ability Test) (HMAT) (Dyck P. J., In “Peripheral Neuropathy” (1993), 见上文, 686-697 页；Scott 等 (1982) Muscle Nerve 5:291)；以及神经传导实验 (testing of nerve conduction)。肌肉评估包括运动功能评估，例如如本领域已知的通过测定最大主动等长收缩 (maximal voluntary isometric contractions) (MVIC)；以及测定肌肉力量。其它失能测定还包括行走指数 (Ambulation Index)；功能独立性测定 (the Functional Independence Measure)；Guy's 神经失能评分 (Guy's Neurological Disability Scale) (GNDS)；医学研究会总分 (the Medical Research Council sum score)；感觉总分 (the sensory sum score)；以及 Hughes 功能评分 (the Hughes functional scale) (Hauser 等 (1983) N. Engl. J. Med. 308:173；Hall 等 (1993) J. Head Trauma Rehabilitation 8:60；Sharrack 等 (1996) J. Neurol. 243:S32 and Merkies 等 (2002) Neurology 59:84)。CIDP 的电生理标准由美国神经学会专门小组委员会 (Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology) (AAN) 于 1991 年提出，并在最近进行了修订 (Nicolas 等 (2002) Muscle Nerve 25:26)。用于感觉-运动免疫介导的多神经病 (sensory-motor immune-mediated polyneuropathy)，例如 CIDP 和格林巴利综合征 (GBS) 的另一实验是炎性神经病病因以及治疗 (INCAT) 感觉

总分 (sensory sumscore) (ISS) 的心理测量评估 (psychometric evaluation) (Merkies 等 (2000) *Neurology* 54 :943)。CIDP 患者中出现人白细胞抗原 Dw3, DRw3, A1 和 B8 的频率高于健康人群 (Zvartau-Hind 等 (2002) *Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy*, at www.emedicine.com/neuro/)。

[0099] “IFN- β -1a”指 IFN- β 分子,其具有野生型人 IFN- β 的氨基酸序列并且是糖基化的。

[0100] “IFN- β -1b”是指具有野生型人 IFN- β 的氨基酸序列的 IFN- β 分子,其中第 17 位的半胱氨酸被丝氨酸取代;第 1 位的甲硫氨酸 (“起始物甲硫氨酸”) 缺失,且该分子未被糖基化。

[0101] “IFN- β 变体”是指这样的野生型 IFN- β 蛋白质,其具有一或多种修饰,例如氨基酸缺失、添加、取代、翻译后修饰,或包括一或多个非天然存在的氨基酸残基或残基之间的连接。术语“IFN- β 变体”还包括 IFN- β 的一部分。“生物活性 IFN- β 变体”是对神经病,例如 CIDP 具有至少部分治疗活性的 IFN- β 变体。例如,IFN- β 变体可以是相对于野生型 IFN- β 而言含有一个或多个氨基酸的插入、缺失或取代的天然存在的 IFN- β ,即天然存在的变体或多态性变体,或者可以是非天然存在的 IFN- β 。

[0102] IFN- β 的“国际单位”或 (IU) 指世界卫生组织 (WHO) 干扰素国际标准 (World Health Organization (WHO) International Standard for Interferon) 定义的单位。

[0103] “分离的”(可以与“基本上纯的”互换使用)在用于多肽时,是指这样的多肽,借助其来源或操作,其可:(i) 作为部分表达载体的表达产物存在于宿主细胞中;或(ii) 连接于蛋白质或其它化学部分,所述物质不包括与其天然连接的蛋白质或其它化学部分;或(iii) 不存在于自然界,例如,通过将至少一个疏水性部分附加或添加到蛋白质来通过化学方法操作所述蛋白质,从而使该蛋白质成为非天然形式。“分离的”蛋白质还包括:(i) 化学合成的;或(ii) 在宿主细胞中表达并通过纯化从相结合的污染蛋白质中分离。该术语一般指已经同与其天然结合的其它蛋白质和核酸分开的多肽。优选的,所述多肽还与诸如用于纯化它的抗体或凝胶基质(聚丙烯酰胺)等物质分开。当应用于核酸时,“分离的”(可以与“基本上纯的”互换使用)是指 RNA 或 DNA 多核苷酸、部分基因组多核苷酸、cDNA 或合成多核苷酸,由于其起源或操作,其:(i) 不和与其天然结合的所有核苷酸相结合(如作为表达载体或其一部分存在于宿主细胞中);或(ii) 与自然状况下并不与之连接的核酸或其它化学部分连接;或(iii) 为天然不存在的。“分离的”还指下列多核苷酸序列,所述序列:(i) 通过例如聚合酶链式反应 (PCR) 在体外扩增;(ii) 通过化学方法合成;(iii) 通过克隆而重组地产生;或(iv) 通过切割和凝胶分离来纯化。

[0104] “多灶性运动神经病”或“MMN”是慢性免疫介导的脱髓鞘性神经病,其特征是定位于周围神经解剖分布区域的不对称性肌肉无力和肌萎缩的逐渐进展 (Pestronk 等 (1988) *Ann. Neurol.* 24 :73 and Kornberg 等 (1995) *Ann. Neurol.* (suppl. 1) S43)。多灶性运动神经病的电生理特点是持续性传导阻滞。临床上,这种疾病也描述为伴随多灶性运动传导阻滞的、CIDP 不对称性纯运动变体。在多灶性运动神经病的发展过程中,其多灶性特征以基本对称的模式逐渐发展,临床上与 CIDP 的运动形式相似。病理研究将这两种疾病联系在一起 (Krendel 等 (1996) *Ann. Neurol.* 40 :948 and Oh 等 (1995) *Neurology* 45 :1828)。大多数患有多灶性运动神经病的患者具有较高滴度的抗神经节苷酯 GM1 抗体 (Pestronk 等,见上文

and Kornberg 等,见上文)。

[0105] 当核酸与另一核酸序列发生功能上的关系时,该核酸即为“可操作地连接于”另一核酸。例如,如果 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白,则编码前序列或分泌型前导序列(例如,信号序列或信号肽)的 DNA 与编码该多肽的 DNA 可操作性地连接;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则启动子或增强子可操作地连接于该序列;如果核糖体结合位点的位置有利于翻译,则该核糖体结合位点可操作地连接于编码序列。一般而言,“可操作地连接于”是指被连接的 DNA 序列是连续的,并且在例如分泌型前导序列的情况下为邻接的并处于阅读相。连接(linking)通过在方便的限制性位点进行接合(ligation)来完成。若这样的位点不存在,可依照常规实施方法使用合成的寡核苷酸接头(adaptor)或连接体(linker)。

[0106] “同一性百分比”或“相似性百分比”指两种多肽、分子之间或两种核酸之间的序列相似性。如果所比较的两种序列中的同一位置被相同碱基或氨基酸单体亚基所占据,则所述两个分子在该位置上是相同的。两种序列之间的同一性百分比是两种序列的匹配性或同一性位置的数目除以所比较的位置数目之后再 $\times 100$ 的函数。例如,如果在两种序列中,10个位置中的6个是匹配的或同一的,则这两种序列具有60%的同源性。作为例示,DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 享有 50%同源性(所有6个位置中有3个匹配)。一般而言,比较是在对两种序列进行比对以产生最大同一性时进行的。使用例如下面详细描述 Karlin 和 Altschul 的方法可以提供这种比对。当涉及核酸时,“同源性百分比”和“同一性百分比”可互换使用,而在涉及多肽时,“同源性百分比”是指相似性的程度,其中表示其它氨基酸的保守性取代的氨基酸被认为与这些其它氨基酸是同一的。参照序列中残基的“保守取代”是用与相应的参照残基在物理或功能上相似的氨基酸进行的取代,所述氨基酸例如具有相似的大小,形状,电荷,化学性质,包括形成共价键或氢键的能力等。特别优选的保守取代是满足 Dayhoff 等,5:Atlas of Protein Sequence And Structure,5:Suppl. 3,chapter 22:354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D. C. (1978) 中定义的“可接受的点突变”标准的那些取代。两个氨基酸序列或两个核酸序列的同源性百分比和同一性百分比可采用如 Karlin 和 Altschul (Proc. Nat. Acad. Sci., USA 90:5873(1993)) 所改进的 Karlin 和 Altschul 的比对算法 (Proc. Nat. Acad. Sci., USA 87:2264(1990)) 进行确定。将所述算法纳入 Altschul 等, J. Mol. Biol. 215:403(1990) 等的 NBLAST 或 XBLAST 程序中。BLAST 搜索采用 NBLAST 程序,评分=100,字长(wordlength)=12 来实施,以获得与本发明的核酸同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白分搜索采用 XBLAST 程序,评分=50,字长=3 来实施,以获得与对照多肽同源的氨基酸序列。为得到用于比较的缺口比对,使用如 Altschul 等, Nucleic Res., 25:3389(1997) 中所述的有缺口的 BLAST(gappedBLAST)。当使用 BLAST 和有缺口的 BLAST 时,使用各程序(XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0107] 生活质量可通过 EuroQoL visual analogue scale 和 EuroQoL 调查问卷总分(questionnaire sum score); the Medical Outcome Study 36-item short-form health status scale(SF-36); 以及 Visual Analogue Scale(VAS) (EuroQoL Group(1990) Health Policy 16:199 and Merckies 等 (2002) Neurology 59:84) 评估。

[0108] 如果联合给药中的 IFN- β 治疗剂的量相对于没有 IFN- β 治疗而言足以导致疾病

的至少一个症状在临床上显著性改善,则该 IFN- β 治疗剂被称为具有“疗效”,且该 IFN- β 治疗剂的量被称为“治疗上有效的”。在优选实施方案中,给药患 CIDP 患者治疗有效量的 IFN- β 治疗剂导致 CIDP 的至少一种症状例如肌肉或神经障碍的改善。

[0109] “野生型 IFN- β ”指天然或重组的 IFN- β ,其具有天然 IFN- β 的通常存在的氨基酸序列。SEQ ID NO:1 和 2 中分别列出野生型天然存在的人 IFN- β 的核苷酸和氨基酸序列,其分别与 GenBank 登录号 M28622 和 AAA36040 的序列相同。

[0110] 2. IFN- β 治疗剂

[0111] 可根据本发明使用的 IFN- β 治疗剂包括野生型 IFN- β 及其生物活性变体,例如,天然存在的和非天然存在的变体。SEQ ID NO:1 和 2 中分别列出野生型天然存在的人 IFN- β 的核苷酸和氨基酸序列,其分别与 GenBank 登录号 M28622 和 AAA36040 的序列相同。这些 IFN 还被描述于,例如,Seghal (1985) J. Interferon Res. 5:521 中。全长人 IFN- β 蛋白质的长度为 187 个氨基酸,SEQ ID NO:1 的编码序列对应于 76-639 位核苷酸。信号序列对应于 1-21 位氨基酸。该 IFN- β 的成熟形式的氨基酸序列对应于 22-187 位氨基酸 (SEQ ID NO:1 的 139-639 位核苷酸)。SEQ ID NO:4 和 3 中分别列出了成熟人 IFN- β 蛋白质及编码所述蛋白质的核苷酸序列。

[0112] 哺乳动物细胞中产生的 IFN- β 是糖基化的。天然存在的野生型 IFN- β 在 SEQ ID NO:4 的成熟多肽的残基 80 (Asn 80) 或 SEQ ID NO:2 的未成熟多肽的残基 101 (Asn 101) 处是糖基化的。

[0113] IFN- β 治疗剂还包括非人 IFN- β ,例如,来自脊椎动物,诸如哺乳动物,例如,非人灵长类,牛,羊,猪,马,猫,犬,大鼠和小鼠;或鸟类或两栖动物。来自这些物种的 IFN- β 序列可获自 GenBank 和/或公开出版物,或可通过这样的核酸来确定,所述核酸与来自其它物种的 IFN- β 发生低严谨度杂交而被分离。

[0114] 野生型 IFN- β 蛋白质的变体包括含有与野生型 IFN- β 具有至少约 70%、80%、90%、95%、98%或 99%同一性或同源性的氨基酸序列的蛋白质,例如含有 SEQ ID NO:2 或 4 的人 IFN- β 。变体可具有一个或多个氨基酸取代、缺失或添加。例如,可以使用野生型 IFN- β 蛋白质的生物活性片段。所述片段可具有在蛋白质的 C-或 N-末端缺失的、添加的或取代的 1、2、3、5、10 或 20 个氨基酸。变体还可具有 1、2、3、5、10 或达 20 个氨基酸的取代、删除或添加。一些变体可具有低于约 50、40、30、25、20、15、10、7 或 5 个氨基酸的取代、缺失或添加。取代可以用天然存在的氨基酸或用其类似物例如 D-立体异构氨基酸来进行。

[0115] 本发明的范围还包括由在严谨条件下与编码天然存在 IFN- β 的核酸或其互补链发生杂交的核酸所编码的 IFN- β 变体,所述核酸例如,SEQ ID NO:1 或 3 所示。促进 DNA 杂交的适宜的严谨条件,例如,6.0 $\times$ 氯化钠/枸酸钠 (SSC),约 45 $^{\circ}$ C,随后在 50 $^{\circ}$ C 用 2.0 $\times$ SSC 进行洗涤是本领域技术人员所已知的,或可见于 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6; Sambrook 等, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; S. Agrawal (ed.) Methods in Molecular Biology, volume 20; and Tijssen (1993) Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes, 例如, part I chapter 2 “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays”, Elsevier, New York。例如,洗涤步骤中的盐浓度可选自

低严谨度的约 $2.0 \times \text{SSC}$, 50°C 至高严谨度的约 $0.2 \times \text{SSC}$, 50°C 。此外,洗涤步骤中的温度可从低严谨条件即室温(约 22°C) 增至高严谨条件即约 65°C 。温度和盐均可改变,或者温度或盐浓度可保持恒定而其它变量改变。示例性杂交条件包括约 50°C 、在 $6.0 \times$ 氯化钠/柠檬酸钠(SSC) 中杂交,然后在室温、 $0.2 \times \text{SSC}$ 中洗涤。洗涤步骤的温度可增加到约 45°C , 50°C , 55°C , 60°C 或 65°C 从而增加杂交的严谨度。杂交也可在 $5 \times \text{SSC}$, $4 \times \text{SSC}$, $3 \times \text{SSC}$, $2 \times \text{SSC}$, $1 \times \text{SSC}$ 或 $0.2 \times \text{SSC}$ 中进行。杂交可进行至少约 1 小时,2 小时,5 小时,12 小时或 24 小时。杂交也可包括另一种影响严谨度的试剂,例如甲酰胺。例如严谨性杂交可在存在 50% 甲酰胺的条件下进行,其中的甲酰胺可增加给定温度条件下杂交的严谨度。洗涤步骤可在清洁剂例如 SDS 诸如 0.1 或 0.2% SDS 的存在下进行。杂交后可进行洗涤,所述洗涤可包括单个洗涤步骤或至少两步洗涤(可在相同或不同盐度和温度下进行)。例如,杂交后可在 65°C 进行两步洗涤,每一步都为在 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 中、约 20 分钟,然后在 65°C 进行两步洗涤,每一步都在 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 中、约 20 分钟。示例性严谨性杂交条件包括在溶液中进行 65% 杂交过夜,所述溶液包含 50% 甲酰胺,10xDenhardt (0.2% Ficoll, .2% 聚乙烯吡咯烷酮,0.2% 牛血清白蛋白) 和 $200 \mu\text{g/ml}$ 变性载体 DNA (例如,剪切过的鲑精 DNA), 然后在 65°C 进行两步洗涤,每一步都为在 $2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 中、约 20 分钟,然后在 65°C 进行两步洗涤,每一步都在 $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 中、约 20 分钟。杂交可由以下步骤组成:在溶液中进行两种核酸杂交,或将溶液中的核酸与附着在固相支持物(例如滤膜)上的核酸进行杂交。在具体的条件下,例如当一种核酸位于固相支持物上时,杂交前可进行预杂交步骤,所述预杂交步骤进行至少约 1 小时,3 小时或 10 小时,并可在与所述杂交溶液(不含探针)相同的溶液中和相同的温度条件下进行。在优选的实施方案中,编码 IFN- β 变体的核酸与 SEQ ID NO:1 或 3 之一或其互补体在中等严谨条件下例如在约 $2.0 \times \text{SSC}$ 和约 40°C 杂交并进行洗涤。在具体优选的实施方案中,编码 IFN- β 变体的核酸与 SEQ ID NO:1 或 3 之一或其互补体在高严谨条件下例如在约 $0.2 \times \text{SSC}$ 和约 65°C 杂交并进行洗涤。

[0116] 示例性修饰是对蛋白质的二级和三级结构影响最小的保守性修饰。示例性保守性取代包括 Dayhoff 在 Atlas of Protein Sequence and Structure⁵(1978), 以及 Argos 在 EMBO J., 8, 779-785 (1989) 中所公开的那些取代。例如,属于下组之一的氨基酸代表保守性改变:ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr; cys, ser, tyr, thr; val, ile, leu, met, ala, phe; lys, arg, his; 和 phe, tyr, trp, his。

[0117] 其它修饰包括用一种氨基酸取代另一种,所述取代不一定代表保守性取代。例如,可进行基本上不影响 IFN- β 三维结构的取代。非糖基化人 IFN- β 的三维结构描述于,例如 Radhakrishnan 等. (1996) Structure 4:1453 中,而糖基化 IFN- β 的三维结构描述于,例如 Karpusas 等. (1997) PNAS 94:11813 中。基本上,IFN- β 包括五个螺旋:螺旋 A (由 SEQ ID NO:4 的大约 2-22 位氨基酸组成);螺旋 B (由 SEQ ID NO:4 的大约 51-71 位氨基酸组成);螺旋 C (由 SEQ ID NO:4 的大约 80-107 位氨基酸组成);螺旋 D (由 SEQ ID NO:4 的大约 118-136 位氨基酸组成) 和螺旋 E (由 SEQ ID NO:4 的大约 139-162 位氨基酸组成) (Karpusas 等,如上)。螺旋 A, B, C 和 E 构成左旋的、2 型四-螺旋束。长的反手环 (overhand loop) (AB 环) 连接螺旋 A 和 B,而三个较短的环 (称为 BC, CD 和 DE) 连接剩余的螺旋 (Karpusa 等,如上)。在先的研究已经显示出 IFN- β 分子的 N-末端, C-末端和糖基化 C 螺旋区不位于受体结合位点内 (参见, WO 00/23472 和 USSN 09/832,659)。由此,

这些区域中的突变不会对 IFN 分子的生物活性产生显著的不利作用。先前还已知螺旋 C 中的突变（成熟人 IFN- β 的 81,82,85,86 和 89 位氨基酸）导致相对于野生型 IFN- β 具有较高抗病毒活性分子（参见，WO 00/23472 和 USSN09/832,659）。相似地，已经显示出螺旋 A 中的突变（成熟人 IFN- β 的 2,4,5,8 和 11 位氨基酸）和 CD 环（110,11,113,116 和 119 位氨基酸）相对于天然存在的野生型人 IFN- β 具有较高的受体结合活性以及较高的抗病毒和抗增殖活性（参见，WO 00/23472 和 USSN 09/832,659）。

[0118] 其它优选的修饰或取代消除了分子间交联或错误二硫键形成的位点。例如，已知 IFN- β 具有三个 cys 残基（位于 SEQ ID NO:4 的野生型位点 17,31 和 141）。一种 IFN 变体是其中 17 位 cys(C) 被 ser(S) 取代的 IFN，例如美国专利 4,588,585 所述。其它 IFN- β 变体包括，在根据野生型 IFN- β （具有，例如 SEQ ID NO:4）编号时，具有例如，17 位的 cys(C) 被一个或多个 ser(S) 取代以及 101 位 val(V) 被 phe(F)、trp(W)、tyr(Y) 或 his(H)，优选为 phe(F) 所取代的 IFN- β 变体，诸如美国专利 6,127,332 中所述。其它优选的变体包括含有野生型 IFN- β 的序列（例如，含有 SEQ ID NO:4）的多肽，其中当根据野生型 IFN- β 编号时，101 位 val(V) 被 phe(F)、tyr(Y)、trp(W)、his(H) 或 phe(F) 所取代，这同样在例如美国专利 6,127,332 中所述。

[0119] 其它 IFN- β 变体是缺少起始物甲硫氨酸的成熟 IFN- β 分子，例如，SEQ ID NO:4 的甲硫氨酸 1。示例性 IFN- β 变体缺少起始物甲硫氨酸并具有至少一个氨基酸取代，例如在成熟形式的 17 位，如美国专利号 4,588,585 中所述。

[0120] IFN- β 分子还可通过用一个或多个衍生化氨基酸（可以是天然或非天然的氨基酸，其中正常存在的侧链或末端基团通过化学反应进行修饰）取代一个或多个氨基酸进行修饰。所述修饰包括，例如， γ -羧基化， β -羧基化，PEG 化，硫酸化，磺化，磷酸化，酰胺化，酯化，N-乙酰化，苄基酰化（carbobenzoylation），甲苯磺酰化（tosylation）和本领域已知的其它修饰。

[0121] 其它修饰包括使用氨基酸类似物或衍生的氨基酸，其中侧链被延长或缩短，同时仍能提供羧基、氨基或其它反应性前体官能团用于进行环化反应，以及具有包含适宜官能团的变体侧链的氨基酸类似物。例如，受试化合物可包括氨基酸类似物，例如氰基丙氨酸、刀豆氨酸（canavanine）、S-亚甲胱氨酸（djenkolic acid）、正亮氨酸、3-磷酸丝氨酸、高丝氨酸、二羟基苯丙氨酸、5-羟色氨酸、1-甲基组氨酸、3-甲基组氨酸、二氨基庚二酸、鸟氨酸或二氨基丁酸。其它适用于此处的具有侧链的天然存在的氨基酸代谢产物或前体可被本领域技术人员所识别，且包含在本发明的范围内。

[0122] 其它 IFN- β 变体包括反转或逆向（retro）肽序列。“反转”或“逆向”肽序列是指共价结合的氨基酸残基（或其类似物或模拟物）的全部序列的一部分，其中氨基酸主链中肽键结构的正常羧基至氨基方向被反转从而，以常规的左至右方向进行阅读时，肽的氨基部分在羧基部分之前（而非之后）。一般参见，Goodman, M. 和 Chorev, M. Accounts of Chem. Res. 1979, 12, 423。此处描述的反转方向的肽包括 (a) 其中一个或多个氨基端残基被改为反转（“rev”）方向（由此在分子的最左部产生第二个“羧基端”）的那些肽，和 (b) 其中一个或多个羧基端残基被改为反转（“rev”）方向（在分子的最右部产生第二个“氨基端”）的那些肽。在正常方向的残基和反转方向的残基之间的交界处不能形成肽（酰胺）键。因此，本发明的一些反转的多肽可通过使用适宜的氨基酸模拟物部分，采用反转的肽

(反转的酰胺)键来连接序列两个相邻部分而形成。在上述(a)的情况下,二酮化合物的中心残基可方便地用于连接含有两个酰胺键的结构从而得到肽模拟物结构。在上述(b)的情况下,二酮化合物的中心残基也可用于连接含有两个酰胺键的结构从而得到肽模拟物结构。此外,在所述多肽中键合的反转方向一般还需要反转的氨基酸残基的对映结构体构型的反转,以便保持与非反转的肽的侧链空间定向相似。肽反转部分中氨基酸的构型优选为(D),而非反转部分的构型优选为(L)。当适于优化结合活性时,相反或混合的构型也是可接受的。多肽的修饰进一步描述于,例如,美国专利号 6,399,075 中。

[0123] IFN- β 治疗剂还包括与一或多种异源多肽融合的 IFN- β 蛋白质及其变体(例如,成熟蛋白质)。例如,为了延长 IFN- β 蛋白质的半寿期或增加其产生,可加入异源多肽。示例性异源多肽包括免疫球蛋白(Ig)分子或其部分,例如,Ig分子的轻链或重链的恒定区。在一个实施方案中,IFN- β 蛋白质或其变体与免疫球蛋白轻链和/或重链的铰链区和恒定区的全部或部分融合或连接。因此,本发明描述了包括如下部分的分子的特征:(1) IFN- β 蛋白质部分(即,IFN- β 或其变体),(2) 第二个肽,例如,能增加 IFN- β 部分的可溶性或体内寿命的肽,例如,免疫球蛋白超家族成员或其片段或一部分,例如,IgG的一部分或片段,例如,人 IgG1 重链恒定区,例如,CH₂, CH₃ 及铰链区。具体来说,“IFN- β /Ig 融合体”是包含与免疫球蛋白链的 N-末端连接的具有生物活性的 IFN- β 部分的蛋白质。一种 IFN- β /Ig 融合体是“IFN- β /Fc 融合体”,其是包含与至少部分免疫球蛋白恒定区连接的 IFN- β 部分的蛋白质。优选的 Fc 融合体包括与含有免疫球蛋白重链 C 末端区的抗体片段连接的 IFN- β 部分。

[0124] 融合蛋白可包括 IFN- β 多肽或其变体,异源多肽可与其 N 及其 C 末端连接。异源多肽对于 IFN- β 多肽或其变体而言也可是内部的。

[0125] 一个实施方案中,融合蛋白的通式为 X-Y-Z,其中 X 是含有 IFN- β 的氨基酸序列的多肽,或其一部分或变体;Y 是任选的连接体部分;而 Z 是一种多肽,其包含除 X 部分的干扰素 β 以外的至少部分多肽。在其它实施方案中,融合蛋白具有式 Z-Y-X,其中非 IFN- β 多肽融合至连接体的 N 末端部分,所述连接体被融合至 IFN- β 多肽或其部分或变体的 N 末端部分。Z 部分可以是包含免疫球蛋白样区的部分多肽。所述其它多肽的实例包括 CD1, CD2, CD4 以及 I 类和 II 类主要组织相容性抗原的成员。所述多肽的实例参见美国专利 5,565,335(Capon 等)。

[0126] Z 部分可以包括例如多个组氨酸残基,或者优选地包括免疫球蛋白的 Fc 区,这里定义的“Fc”是包括免疫球蛋白重链的 C 末端区的抗体的片段。

[0127] Y 部分可以是能使 IFN- β 部分保持其生物活性的任何连接体。Y 部分还可以是约 2-约 5 个氨基酸;约 3-约 10 个氨基酸长或 10 个以上氨基酸。在优选的实施方案中,Y 包括或由 GlyGlyGlyGlySer(SEQ ID NO:6) 所组成,所述序列由例如核苷酸序列 GGCGGTGGTGGCAGC(SEQ ID NO:5) 所编码。Y 还包括或由肠激酶识别位点,例如,AspAspAspAspLys(SEQ ID NO:8) 组成,所述序列由例如 GACGATGATGACAAG(SEQ ID NO:7) 所编码。在其它实施方案中,Y 包括或由 SerSerGlyAspAspAspLys(SEQ ID NO:10) 组成,所述序列由例如 AGCTCCGGAGACGATGATGACAAG(SEQ ID NO:9) 所编码。

[0128] 此外,还可采用将两种分子结合在一起的任何化学反应实施 IFN- β 部分(X)与第二、非 IFN- β 部分 Z(例如免疫球蛋白的 Fc 区)之间的偶联,只要 X 和 Z 部分保持其各自

的活性即可。所述化学结合可包括很多化学机制,例如共价键结合,亲和性结合,嵌入,配位结合和络合作用。在 IFN- β 部分和 Z 部分之间形成共价结合的代表性偶联剂(即通式中的连接体“Y”)可以包括有机化合物,例如硫酯类,碳化二亚酰胺,琥珀酰亚胺酯类,二异氰酸酯,例如甲苯-2,6-二异氰酸酯,谷二醛(gluteraldehydes),重氮苯和六亚甲基二胺类,例如双-(对重氮苯甲酰基(p-diazonium-benzoyl))-乙二胺,亚氨酸酯类的双功能衍生物,例如己二酰亚胺酸二甲酯(diamethyladipimide),和双活性氟化合物(bis-active fluorine compounds)诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯等。所列出的物质并非意在穷尽本领域公知的多种类别的化学偶联剂。其中的很多种是可通过商业途径获得的,例如N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP),1-乙基-3-(3-二甲基氨基-丙基)碳化二亚胺盐酸盐(EDC);4-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)-甲苯(SMPT;Pierce Chem. Co., Cat. #21558G)。

[0129] 优选的 IFN- β /Ig 融合蛋白包括或由 SEQ ID NO:12 所组成,其中 SEQ ID NO:12 包含与人 IgG1Fc(ZL5107) 融合的全长成熟形式的人 IFN- β (即,SEQ ID NO:4)(参见 WO 00/23472 和 USSN 09/832,659)(参见图1)。SEQ ID NO:11 中列出了相应的核苷酸序列。编码人 IFN- β 的 DNA 终止于核苷酸三联体 568-570(编码精氨酸的 AAC),而编码人 IgG1 恒定区 DNA 开始于三联体(编码门冬氨酸的 GAC),核苷酸号始于 SEQ ID NO:11 的 574 位。

[0130] SEQ ID NO:14 中列出了另一优选的 IFN- β /Ig 融合蛋白,其由 SEQ ID NO:13 编码(参见 WO 00/23472 和 USSN 09/832,659)(参见图2)。这种融合蛋白包含与 G4S 连接体相连接的人 IFN- β 。G4S 连接体(由 SEQ ID NO:7 的 571-585 位核苷酸所编码)包含氨基酸序列 GGGGS(SEQ ID NO:9)。制备这些蛋白质的方法描述于 WO 00/23472 和 USSN 09/832,659 中。

[0131] 在优选的实施方案中,IFN- β 多肽经其 C-末端与免疫球蛋白 Fc 区的至少一部分融合。IFN- β 形成氨基端部分,而 Fc 区形成羧基端部分。在这些融合蛋白中,Fc 区优选限于恒定区的铰链区以及 CH2 和 CH3 区。这些融合体中的 Fc 区还可限于能形成分子间二硫键的铰链区部分、以及 CH2 和 CH3 区或其功能等效体。这些恒定区可来源于任何哺乳动物性来源(优选人类),并可源于任何适宜的类型和/或同种型,包括 IgA, IgD, IgM, IgE 和 IgG1, IgG2, IgG3 和 IgG4。

[0132] 编码 Ig 融合体的重组核酸分子可通过本领域已知的任何方法获得(Maniatis 等, 1982, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.),或获自公众可得到的克隆。例如,Robinson, R. 等, PCT 申请,公开号 W087/02671 中教导了编码免疫球蛋白的重或轻链恒定区的基因的制备方法。编码干扰素分子或片段的 cDNA 序列可直接与编码重 Ig 恒定区的 cDNA 相连或可借助连接序列与之相连。在本发明的其它实施方案中,可制备重组载体系统以使编码干扰素 β 的序列适应于含有合成铰链区的正确的阅读框。此外,需要包括与免疫球蛋白基因的 3' 侧翼区相对应的核酸其作为重组载体系统的一部分,所述基因包含 RNA 切割/多腺苷酸化位点和下游序列。此外,可能需要改造位于编码免疫球蛋白融合蛋白的序列上游的信号序列以易于从用重组载体转化的细胞中分泌融合分子。

[0133] 本发明提供了包括融合蛋白在内的二聚体融合分子以及单体或多聚体分子。所述多聚体可通过使用通常为多价的 Ig 分子(诸如 IgM 五聚体或 IgA 二聚体)的 Fc 区或其一

部分来生成。应当理解,可能需要 J 链多肽来形成和稳定 IgM 五聚体和 IgA 二聚体。可选地,IFN- β 融合蛋白的多聚体可采用对 Ig 分子的 Fc 区具有亲和力的蛋白质,诸如蛋白 A 来形成。例如,可将多个 IFN- β / 免疫球蛋白融合蛋白与蛋白质 A- 琼脂糖珠结合。

[0134] 这些多价形式是可以使用的,因为其具有多个干扰素 β 受体结合位点。例如,二价可溶性 IFN- β 可由被连接体区(Y 部分)隔离的 SEQ ID NO:4 的 1-166 位氨基酸(或由 SEQ. ID. NO:3 的 1-498 位核酸所编码的氨基酸)(通式中的 X 部分)的两个串联重复所组成,该重复与免疫球蛋白恒定区(Z 部分)的至少一部分相结合。可选的多价体形式还可通过,例如,采用常规偶联技术通过化学方法将 IFN- β /Ig 融合体与任何临床上可接受的载体分子相偶联来构建,所述载体为选自 Fico11、聚乙二醇或葡聚糖的聚合物。可选地,IFN- β 可通过化学方法与生物素偶联,然后使生物素-干扰素 β Fc 结合物与抗生物素蛋白结合,结果产生四价抗生物素蛋白 / 生物素 / 干扰素 β 分子。IFN- β /Ig 融合体还可与二硝基苯酚(DNP)或三硝基苯酚(TNP)共价偶联,结果得到用抗-DNP 或抗-TNP-IgM 沉淀的结合物,以形成具有对干扰素 β 受体结合位点的效价为 10 的十聚结合物。

[0135] 本发明的蛋白质的衍生物还包括保持生物活性的初级蛋白的多种结构形式。由于存在可电离的氨基和羧基,例如,IFN- β 蛋白质及其变体可以是酸性或碱性盐形式,或可以是中性形式。各氨基酸残基还可通过氧化或还原进行修饰。此外,IFN- β 的一级氨基酸结构(包括 N- 和 / 或 C- 末端)或 IFN- β 聚糖可通过以下方式进行修饰(“衍生”):与其它化学部分,诸如糖基基团、聚亚烷基二醇聚合物诸如聚乙二醇、脂类、磷酸盐、乙酰基等形成共价的或聚集的结合物,或形成氨基酸序列突变体。

[0136] 干扰素 β /Ig 的其它衍生物包括干扰素 β 或其片段与其它蛋白质或多肽形成的共价或聚集结合物,诸如通过在重组培养中作为附加的 N- 末端或 C- 末端而合成。例如,结合的肽可以是在蛋白质 N- 末端区的信号(或前导)多肽序列,其在共翻译或翻译后水平上指导蛋白质从其合成位点转至其在细胞膜或细胞壁内或外的功能位点(例如,酵母 α - 因子前导序列)。例如,信号肽可以是 IFN- β 的信号肽,即 SEQ ID NO:2 的 1-21 位氨基酸(对应于 SEQID NO:1 的 76-138 位核苷酸)。信号肽还可以是 VCAM 的信号肽,即,SEQID NO:12 的 1-24 位氨基酸(由 SEQ ID NO:11 的 1-72 核苷酸所编码)。

[0137] 异源多肽(例如肽)或其它分子还可以用作标记或用于辅助 IFN- β 治疗剂的纯化。所述肽是本领域众所周知的。例如,本发明的多核苷酸可在框内与标记序列(本文也称编码“Tag 肽”的“Tag 序列”)融合,其能允许本发明的多肽的标记和 / 或纯化。在优选的实施方案中,标记序列是六组氨酸标记,例如,由 PQE-9 载体所提供的。许多其它 Tag 肽可经商业途径获得。其它经常使用的 Tags 包括 myc- 表位(例如,参见 Ellison 等. (1991) J Biol Chem 266:21150-21157),其包括来自 c-myc 的 10 个残基的序列, pFLAG 系统(International Biotechnologies 公司), pEZZ- 蛋白 A 系统(Pharmacia, NJ), 和流感嗜血杆菌(haemophilus influenza)血凝素蛋白质的 16 个氨基酸的部分。此外,只要试剂,例如与 Tag 多肽特异性相互作用的抗体能够获得或可被制备或鉴定,可将任何多肽用作 Tag。

[0138] 在一个实施方案中, IFN- β 蛋白质或其变体在 N- 或 C- 端与下述肽之一融合: HisHisHis HisHisHis(SEQ ID NO:16),其可由核苷酸序列 CATCATCATCATCATCAT(SEQ ID NO:15) 编码; SerGlyGlyHisHisHisHisHisHis(SEQ ID NO:18),其可由核苷酸序列 TCCGGGGCCATCATCATCATCATCAT(SEQ ID NO:15) 所编码和 SerGlyGlyHisHisHisHisHisHis

SerSerGlyAspAspAsp AspLys (SEQ ID NO :20), 其可由核苷酸序列 TCCGGGGGCCATCATCATCATCATCATAGCTCCGAGACG ATGATGACAAG (SEQ ID NO :19) 所编码。

[0139] 干扰素 β 的氨基酸序列还可以连接于肽 AspTyrLysAspAspAspAspLys (DYKDDDDK) (SEQ ID NO :21) (Hopp 等, Bio/Technology 6 :1204, 1988)。后一序列是高度抗原性的并提供与特异性单克隆抗体可逆性结合的表位, 使得可以进行所表达的重组蛋白的快速测定和便易的纯化。该序列还可被牛粘膜肠激酶在紧接 Asp-Lys 对之后的残基进行特异性切割。

[0140] 在其它实施方案中, IFN- β 治疗剂包括与白蛋白、其变体或一部分融合的 IFN- β 蛋白质或其变体。可按, 例如, WO 01/77137 中所述制备融合蛋白。

[0141] IFN- β 治疗剂还可包括不是多肽的分子, 例如, 与聚合物如生物可降解的聚合物共价或非共价连接的 IFN- β 蛋白质或其变体。例如, IFN- β 蛋白质或其变体可以是 PEG 化的, 例如, 与聚乙二醇 (PEG) 连接, 如 W000/23114 中所述。

[0142] 在本发明的宽范围中, 单个聚合物分子可用于与 IFN- β 的结合。应当理解, 只要适于最终应用, 结合的聚合物可使用任何基团、部分或其它结合的种类。例如, 在一些应用中, 将能够赋予聚合物 UV- 降解抗性、或抗氧化或其它性质或特性的功能性部分与聚合物共价结合是有用的。作为另一例子, 在一些应用中, 使聚合物功能化以使其具有反应性或可交联性, 有利于增强整个结合后的物质的多种性质或特性。由此, 该聚合物可包含任何官能度、重复基团、连接或其它构成性结构, 所述构成特性不会妨碍结合的 IFN- β 组合物对其预期目的的功效的其它构成结构。

[0143] 虽然偶联也可通过非末端反应基团的分枝形成, 但 IFN- β 最优选经聚合物上的末端反应性基团进行偶联。此处将具有反应性基团的聚合物命名为“活化的聚合物”。反应性基团选择性地与蛋白质上的游离氨基或其它反应性基团反应。活化的聚合物发生反应, 从而可在任何可用的 IFN- β 氨基诸如赖氨酸的 α 氨基或 ϵ 氨基处发生结合。IFN- β 的游离的羧基基团, 适宜活化的羰基, 羟基, 胍基, 氧化的碳水化合物部分和巯基 (若可用) 也可用作结合位点。

[0144] 虽然聚合物可结合于 IFN- β 分子或其变体或者与 IFN- β 分子直接或间接连接的其它氨基酸的任何地方, 用于聚合物偶联的最优选的位点是 IFN- β 分子的 N- 末端。第二位点位于或邻近 C- 末端, 且通过糖部分。因此, 本发明预期了其最优选的实施: (i) IFN- β 方案或其变体的 N- 末端偶联的聚合物结合物 (polymer conjugate); (ii) IFN- β 或其变体的 C- 末端偶联的聚合物结合物; (iii) 聚合物结合物的糖 - 偶联的结合物; (iv) 以及 IFN- β 蛋白质或其变体的 N-, C- 和糖偶联的聚合物结合物。

[0145] 根据蛋白质浓度, 一般采用大约 1.0 至大约 10 摩尔的活化的聚合物 / 每摩尔蛋白质。最终的量平衡在使反应程度最大化和产物非特异修饰最小化之间, 同时, 在维持最佳活性的同时 (如果可能) 使蛋白质半寿期最优化。优选的, 蛋白质的生物学活性保留至少大约 50%, 最优选保留 100%。

[0146] 可以通过使生物学活性物质与惰性聚合物发生反应的任何合适方法进行反应, 如果反应基团位于 N 末端的 α - 氨基上, 则优选 pH 大约 5-7。一般而言, 该过程涉及制备活化的聚合物 (其可能具有至少一个末端羟基), 然后使蛋白质与活化的聚合物发生反应, 以产生适合于配制的可溶性蛋白质。上述修饰反应可以通过可能涉及一个或多个步骤的多种方法进行。

[0147] 如上所述,本发明最优的实施方案利用了 IFN- β N 末端与聚合物的连接。选择性得到 N 末端修饰的 IFN- β 的适宜方法是可以获得。还原性烷基化法例示了一种方法,该方法利用了 IFN- β 上可用于衍生化的不同种类伯氨基团(赖氨酸的 ϵ -氨基对 N 末端甲硫氨酸的氨基)的不同反应性。在适当的选择条件下,可以实现含羰基的聚合物在 IFN- β 的 N 末端对其基本上选择性地进行衍生化。该反应在能够利用赖氨酸 ϵ -氨基和 IFN- β 的 N 末端残基的 α -氨基之间的 pKa 差异的 pH 条件下进行。该类化学方法是本领域普通技术人员所熟知的。

[0148] 例如,可以使用这样的反应方案,其中所述选择性通过在低 pH(一般 5-6),在可使 PEG-醛聚合物与 IFN- β 在氰基硼氢钠存在时发生反应的条件下进行反应而得以维持。在对 PEG-IFN- β 进行纯化并用 SDS-PAGE, MALDI 质谱和肽测序/作图进行分析后,产生了 N 末端由 PEG 部分特异性靶向的 IFN- β 。

[0149] IFN- β 的晶体结构显示出 N 和 C 末端彼此接近(参见 Karpusas 等,1997, Proc. Natl. Acad. Sci. 94 :11813-11818)。由此,IFN- β 的 C 末端的修饰也应当对活性具有最小的影响。在没有简单的化学策略可以将聚亚烷基二醇聚合物(诸如 PEG)靶向在 C 末端时,可直接通过基因改造产生可用于靶向聚合物部分的位点。例如,在 C 末端或其附近的位点掺入 Cys 允许使用马来酰亚胺、乙烯砜或卤代醋酸酯活化的聚亚烷基二醇(如 PEG)进行特异修饰。由于这些试剂具有对 Cys 的高选择性,故这些衍生物可特异性用于改造的半胱氨酸的修饰。其它策略,诸如掺入可被靶向的组氨酸标记(Fancy 等,(1996) Chem. & Biol. 3 : 551)或附加的糖基化位点,代表了用于修饰 IFN- β 的 C 末端的其它选择。

[0150] IFN- β 上的聚糖也位于允许进一步修饰而不改变活性的位置。用于靶向糖作为化学修饰位点的方法也是已知的,因此可以将聚亚烷基二醇聚合物直接且特异性添加到 IFN- β 上经氧化而活化的糖。例如,可以产生聚乙二醇-酰肼,其可通过与醛和酮缩合形成相对稳的腙连接。此特性已经用于通过氧化的寡糖连接对蛋白质进行修饰。参见 Andresz, H. 等,(1978), Makromol. Chem. 179 :301。具体而言,用亚硝酸盐(酯)处理 PEG-羧甲基酰肼产生的 PEG-羧甲基氮化物是能与氨基发生反应的亲电子活性基团。此反应也可以用于制备聚亚烷基二醇修饰的蛋白质。参见美国专利 4,101,380 和 4,179,337。

[0151] 巯基连接体介导的化学方法能进一步促进蛋白质的交联。该过程例如,可通过使用诸如高碘酸钠在碳水化合物部分上产生反应性醛基,通过醛形成腙胺结合体,并通过腙胺上的巯基诱导交联等步骤进行实施(参见 Pepinsky, B. 等,(1991), J. Biol. Chem., 266 : 18244-18249 和 Chen, L. L. 等,(1991) J. Biol. Chem., 266 :18237-18243)。由此,这类化学方法被认为也适于用聚亚烷基二醇聚合物进行的修饰,其中向糖中掺入连接体并将聚亚烷基二醇聚合物附于该连接体上。虽然含有氨基巯基(aminothiol)或肼的连接体能够用于加入单个聚合物基团,连接体的结构可以有所变化以便加入多个聚合物,和/或改变聚合物相对于 IFN- β 的空间取向。

[0152] 示例性聚合物包括水溶性聚合物诸如聚亚烷基二醇聚合物。所述聚合物的非限制性实例包括其它聚环氧烷同聚物,诸如聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物。适宜的水溶性和非肽聚合物主链的其它实例包括聚(氧乙烯化多元醇)、聚(烯醇)、聚(乙烯基吡咯烷酮)、聚(羟基丙基甲基丙烯酰胺(hydroxypropylmethacrylamide))、聚(α -羟酸(hydroxyacid))、聚(烯醇)、聚磷腈、聚唑啉、聚(N-丙烯酰吗啉)及其共聚

物、三元共聚物,及其混合物。在一个实施方案中,聚合物主链是平均分子量为约 200Da 至约 400,000Da 的聚(乙二醇)或一甲氧基聚乙二醇(monomethoxypolyethylene glycol)(mPEG)。应当理解,其它相关的聚合物也适用于实施本发明,而术语 PEG 或聚(乙二醇)的使用意在包括而非排除该方面。术语 PEG 包括任何形式的聚(乙二醇),包括烷氧基 PEG,双功能 PEG、多臂(multi-armed)PEG、叉状(forked)PEG、分枝(branched)PEG、悬垂(pendent)PEG 或其中具有可降解键的 PEG。

[0153] 在一个实施方案中,在兴趣聚合物系统中掺入 C1-C4 烷基聚亚烷基二醇的聚亚烷基二醇残基,优选聚乙二醇(PEG),或这种二醇的聚(氧)烯二醇残基。由此,蛋白质所附着的聚合物可以是聚乙二醇(PEG)的同聚物或聚氧乙烯化多元醇,条件是在所有情况中该聚合物在室温均可溶于水。所述聚合物的非限制性实例包括聚环氧烷同聚物,诸如 PEG 或聚丙二醇、聚氧乙烯化二元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,条件是维持该嵌段共聚物的水溶性。聚氧乙烯化多元醇的实例包括,例如,聚氧乙烯化甘油、聚氧乙烯化山梨醇、聚氧乙烯化葡萄糖等等。聚氧乙烯化甘油的甘油主链与天然存在于例如动物或人中的单、二、和三甘油酯的主链相同。因此,这种分支化不必视为机体的外来试剂。

[0154] 作为聚环氧烷的替代,可以使用葡聚糖、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯酰胺、聚乙烯醇、基于碳水化合物的聚合物等等。本领域普通技术人员将领会,前文所列均为示例,本发明涵盖具有本文所述性质的所有聚合物材料。

[0155] 聚合物可为任何具体分子量,但是其分子量优选大约 300 至 100,000,更优选 10,000 至 40,000。具体而言,20,000 以上的分子量对于防止由于肾过滤导致的蛋白质损失而言最佳。

[0156] 在本发明的实践中,在聚亚烷基二醇衍生化聚合物-IFN- β 缀合物的配制中具有很多有利性,这与聚亚烷基二醇衍生物的下列特性相关:水溶性的改进,同时不诱发抗原性或免疫原性应答;高度生物相容性;聚亚烷基二醇衍生物不存在体内生物降解;和易于被活有机体排泄。

[0157] 此外,在本发明的其它方面,可以利用与聚合物组分共价键合的 IFN- β ,其中结合的性质波及可切割的共价化学键。这使得能够在从 IFN- β 上切割下聚合物的过程中进行控制。IFN- β 药物和聚合物之间的这种共价键可以通过化学或酶反应切割。聚合物-IFN- β 产物保留了可接受量的活性。同时,结合的聚合物中存在的聚乙二醇部分赋予聚合物-IFN- β 结合物高水溶性和长时间在血液中循环的能力。作为这些改进特征的结果,本发明涵盖了活性聚合物-IFN- β 种类经胃肠外、经鼻、和经口的递送和前述 IFN- β 经水解切割后在体内应用中的生物利用度。

[0158] 可使用多种反应方案而很容易地实施聚合物与 IFN- β 的反应而得到各种结合物,例如在 N 末端结合的产物,IFN- β 结合物的活性和稳定性可以使用不同分子大小的聚合物通过多种方式进行改变。缀合物的溶解性可以通过改变掺入聚合物组合物中的聚乙二醇片段的比例和大小进行改变。

[0159] 在一个实施方案中,通过蛋白质与活化的聚亚烷基二醇化合物(PCG)制备根据本发明的结合物。例如,在存在还原剂(例如,氰基硼氢化钠)时,IFN 可经由还原型烷基化而与 PEG-醛反应以产生 PEG-蛋白质结合物(经由胺键连接)。参见,例如,欧洲专利 0154316B1 和国际专利申请号 PCT/US03/01559。

[0160] 在本发明的一些实施方案中,人 IFN- β 用下述活化的聚亚烷基二醇进行 PEG 化: 20kDa mPEG-O-2- 甲基丙醛, 20kDa mPEG-O-p- 甲基苯基 -O-2- 甲基丙醛, 20kDa mPEG-O-m- 甲基苯基 -O-2- 甲基丙醛, 20kDa mPEG-O-p- 苯乙醛, 20kDa mPEG-O-p- 苯基丙醛和 20kDa mPEG-O-m- 苯乙醛, 从而分别得到 20kDa mPEG-O-2- 甲基丙醛 - 修饰的 IFN- β , 20kDa mPEG-O-p- 甲基苯基 -O-2- 甲基丙醛 - 修饰的 IFN- β , 20kDa mPEG-O-m- 甲基苯基 -O-2- 甲基丙醛 - 修饰的 IFN- β , 20kDa mPEG-O-p- 苯乙醛 - 修饰的 IFN- β , 20kDa mPEG-O-p- 苯基丙醛 - 修饰的 IFN- β 和 20kDa mPEG-O-m- 苯乙醛 - 修饰的 IFN- β 。下面给出用 20kDa mPEG-O-2- 甲基丙醛和 20kDa mPEG-O-p- 苯乙醛修饰的人 IFN- β 的制备和特征的详细叙述, 其还公开于国际专利申请 PCT/US03/01559 中。

[0161] 在一个实施方案中, PEG 化的 IFN- β 的制备如下。将 100mM 磷酸钠 pH 7.2, 200mM NaCl 中的、250 μ g/ml 的 IFN- β , 例如未经配制的 **AVONEX®** (IFN- β -1a 批量中间体 (bulk intermediate) (已通过所有为用于人体进行的试验的临床大批量药物)) 用等体积 100mM MES pH 5.0 稀释, 然后用 HCl 将 pH 调整至 5.0。将样品以 6mg IFN- β /ml 树脂加入 SP-**Sepharose®** FF 柱 (Pharrnacia, Piscataway, NJ)。用 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 75mM NaCl 洗柱, 然后用 30mM 磷酸钠 pH 6.0, 600mM NaCl 洗脱产物。分析洗脱级分在 280nm 的吸光度值, 采用 1mg/ml 溶液的消光系数为 1.51 而从吸光度来估计样品中干扰素的浓度。

[0162] 在来自 SP 洗脱物的 1mg/ml 溶液中, 将 0.5M 磷酸钠 pH 6.0 加至 50mM, 将氰基硼氢化钠 (Aldrich, Milwaukee, WI) 加至 5mM, 而将 20K PEG 醛 (Shearwater Polymers, Huntsville, AL) 加至 5mg/ml。将样品于室温保温 20 小时。通过在 **Superose®** 6FPLC 分离柱 (sizing column) (Pharmacia) (用 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 150mM NaCl 作为流动相) 和 SP-**Sepharose®** FF 上进行顺序层析步骤以从反应产物中纯化 PEG 化的干扰素。分离柱导致修饰的和未修饰的 IFN- β 的基线分离。来自凝胶过滤的含 PEG-干扰素 β 的洗脱合并物用水按 1 : 1 进行稀释, 然后以 2mg 干扰素 β /ml 树脂加入 SP-Sepharose 柱。用 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 75mM NaCl 洗柱, 然后用 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 800mM NaCl 从柱洗脱 PEG 化干扰素 β 。通过 280nm 的吸光度分析蛋白质含量。由于 PEG 部分对 280nm 的吸光度不产生影响, 报道了干扰素等效物中 PEG 化干扰素的浓度。所得 PEG 化的 IFN- β 的这些方法和特征描述被进一步描述在 WO 00/23114 中。IFN- β 的 PEG 的结合未显示出改变了其抗病毒活性。此外, 发现 PEG 化的 IFN- β 的比活性远高于 (约 10 倍) 非 PEG 化 IFN- β 的比活性 (WO 00/23114)。

[0163] IFN- β 还可用可以购买的 (例如, 购自 Fluka 公司 (目录号 75936, Ronkonkoman, NY)) 5K PEG-醛部分按照上述与 20K PEG 醛相同的方案进行 PEG 化。

[0164] 20kDa mPEG-O-2- 甲基丙醛 - 修饰的 IFN- β 的制备如下。将 100mM 磷酸钠 pH 7.2, 200mM NaCl 中、10ml 250 μ g/ml 未经配制的 **AVONEX®** (IFN- β -1a 批量中间体 (已通过所有为用于人体进行的试验的临床大批量药物)) 用 12ml 的 165mM MES pH 5.0 和 50 μ l 的 5N HCl 稀释。将样品加入 300 μ l SP-Sepharose FF 柱 (Pharmacia)。用 3 $\times$ 300 μ l 的 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 75mM NaCl 洗柱, 然后用 5mM 磷酸钠 pH 5.5, 600mM NaCl 洗脱蛋白质。分析洗脱级分在 280nm 的吸光度, 采用 1mg/ml 溶液的消光系数为 1.51, 而从吸光度来估计样品中 IFN- β 的浓度。合并洗脱峰级分以得到 3.66mg/mL 的 IFN- β 浓度, 其随后用水稀释至 1.2mg/mL。

[0165] 在来自洗脱的 SP-Sepharose 洗脱合并物的 0.8mL IFN- β 中,将 0.5M 磷酸钠 pH 6.0 加至 50mM,将氰基硼氢化钠 (Aldrich) 加至 5mM,而将 20kDa mPEG-0-2- 甲基丙醛加至 5mg/ml。将样品在黑暗中于室温保温 16 小时。通过 0.5mL SP-Sepharose FF 柱如下从反应混合物中纯化 PEG 化 IFN- β 如下:用 2.4mL 20mM MES pH 5.0 稀释 0.6ml 的反应混合物,然后将其加入 SP-Sepharose 柱。用磷酸钠 pH 5.5,75mM NaCl 洗柱,然后用 25mM MES pH 6.4,400mM NaCl 从柱洗脱 PEG 化的 IFN- β 。以 5mM 磷酸钠 pH 5.5,150mM NaCl 作为流动相在 Superose 6HR 10/30FPLC 分离柱上进一步纯化 PEG 化 IFN- β 。以 20mL/h 在分离柱 (25mL) 上进行分离,收集 0.5mL 级分。通过 280nm 的吸光度来分析洗脱级分的蛋白质含量,合并所述级分,并确定合并物的蛋白质浓度。由于 PEG 部分对 280nm 的吸光度不产生影响,报道了 IFN 等效物中 PEG 化的 IFN- β 浓度。取合并物样品进行分析,剩余部分可用含 HAS 的配制缓冲液稀释至 30 μ g/mL,以 0.25mL/管进行等分,保存于 -70 $^{\circ}$ C。

[0166] 20kDa mPEG-0-p- 苯乙醛 - 修饰的 IFN- β 的制备如下。将 100mM 磷酸钠 pH 7.2, 200mM NaCl 中、250 μ g/ml 20ml 未经配制的 **AVONEX[®]** (IFN- β -1a 批量中间体 (已通过所有为用于人体进行的试验的临床大批量药物)) 用 24ml 的 165mM MES pH 5.0,100 μ l 的 5N HCl,和 24mL 水进行稀释。将样品加入 600 μ l SP-Sepharose FF 柱 (Pharmacia)。用 2 $\times$ 900 μ l 的 5mM 磷酸钠 pH 5.5,75mM NaCl 洗柱,然后用 5mM 磷酸钠 pH 5.5,600mM NaCl 洗脱蛋白质。分析洗脱级分的 280nm 的吸光度,采用 1mg/ml 溶液的消光系数为 1.51 而从吸光度来估计样品中 IFN- β 的浓度。合并洗脱峰级分以得到 2.3mg/mL 的 IFN- β 浓度,其随后用水稀释至 1.2mg/mL。在来自 SP-Sepharose 洗脱合并物的 1.2mL IFN- β -1a 中,将 0.5M 磷酸钠 pH 6.0 加至 50mM,将氰基硼氢化钠 (Aldrich) 加至 5mM,而将 20kDa mPEG-0-p- 苯乙醛加至 10mg/ml。将样品在黑暗中于室温保温 18 小时。在 0.75mL SP-Sepharose FF 柱上如下从反应混合物中纯化 PEG 化的 IFN- β 如下:用 7.5mL 20mM MES pH 5.0,7.5mL 水,和 5 μ l 的 5N HCl 稀释反应混合物,然后将其加入 SP-Sepharose 柱。用磷酸钠 pH 5.5,75mM NaCl 洗柱,然后用 20mM MES pH 6.0,600mM NaCl 从柱洗脱 PEG 化的 IFN- β 。以 5mM 磷酸钠 pH 5.5,150mM NaCl 作为流动相在 Superose 6HR 10/30FPLC 分离柱上进一步纯化 PEG 化的 IFN- β 。以 20mL/h 在分离柱 (25mL) 上进行分离,收集 0.5mL 级分。通过在 280nm 的吸光度来分析洗脱级分的蛋白质含量,合并所述级分,并确定合并物的蛋白质浓度。根据 1mg/mL PEG 化 IFN- β 溶液的消光系数为 2,调节 PEG (1mg/mL 溶液中 20kDa mPEG-0-p- 苯乙醛在 280nm 的消光系数为 0.5) 对 280nm 的吸光度后,报道了 IFN 等效物中 PEG 化 IFN- β 的浓度。取合并物样品进行分析,剩余部分可用含 HAS 的配制缓冲液稀释至 30 μ g/mL,以 0.25mL/管进行等分,保存于 -70 $^{\circ}$ C。

[0167] 与非天然存在的聚合物偶联的糖基化 IFN- β 可用于本发明的方法。聚合物可包括聚亚烷基二醇部分。聚亚烷基部分可通过选自醛基,马来酰亚胺基,乙烯砜基,卤代乙酸酯基,多个组氨酸残基,胍基和氨硫醇基的基团而与干扰素- β 偶联。IFN- β 可与聚乙二醇部分偶联,其中 IFN- β 通过不稳定性键而与聚乙二醇部分偶联,其中不稳定性键可被生物化学性水解和 / 或蛋白酶解作用断裂。聚合物的分子量可以是约 5- 约 40 千道尔顿。其它可用的 IFN- β 是包含 N- 末端与含有聚亚烷基二醇部分的聚合物偶联的生理活性糖基化干扰素- β 的生理活性干扰素- β 组合物,其中将生理活性干扰素- β 和聚亚烷基二醇部分进行排列,以便在通过抗病毒测定时,生理活性干扰素- β 组合物中的生理活性干扰素- β

具有相对于缺少所述部分的生理活性干扰素- β 基本上相似的活性。

[0168] 异源多肽或其它分子可与 IFN- β 蛋白质或其变体共价或非共价连接。“共价偶联的”是指本发明的不同部分或互相直接共价结合,或经一或多个插入部分,诸如桥接、间隔子或接合部分或多个部分而间接地共价连接。插入部分或多个部分被称为“偶联基团”。术语“结合的”可与“共价偶联的”互换使用。

[0169] 用于本发明的 IFN- β 可以是糖基化或非糖基化(或未糖基化的)。非糖基化 IFN- β 可在例如原核宿主细胞中制备。

[0170] IFN- β 蛋白质或其变体还可通过附着正常情况下 IFN- β 上不存在的多糖而进行修饰。

[0171] 3. 产生 IFN- β 治疗剂的方法

[0172] 本发明的 IFN- β 治疗剂可通过任何适宜的方法进行制备,诸如包括构建编码 IFN- β 治疗剂的核酸和在适宜的转化的宿主中表达该核酸的方法。该方法将制备重组 IFN- β 治疗剂。IFN- β 治疗剂还可通过化学合成或化学合成与重组 DNA 技术的联合进行制备。

[0173] 在一个实施方案中,通过分离或合成编码 IFN- β 或其变体的 DNA 序列来构建编码 IFN- β 治疗剂的核酸。例如,IFN- β 融合蛋白可按照,例如本文所述进行制备。天然存在的 IFN- β 核酸可根据本领域众所周知的方法获得。例如,核酸可利用从已知表达 IFN- β 的细胞(例如,白细胞)中获得的 RNA,和基于 IFN- β 基因序列(例如,SEQ ID NO:1)的引物,通过逆转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)进行分离。编码 IFN- β 蛋白质的核酸还可通过利用探针(例如,包含部分 IFN- β 序列的寡核苷酸)筛选文库而进行分离,所述文库例如从表达 IFN- β 的细胞中制备的 cDNA 文库。

[0174] 可选地,可将完整氨基酸序列用于构建反-翻译(back-translated)的基因。可以合成包含编码 IFN- β 治疗剂的核苷酸序列的 DNA 寡聚体。例如,可以合成编码部分所需多肽的小寡核苷酸,然后将其连接在一起。各寡核苷酸通常包含用于互补装配的 5' 或 3' 突出端。

[0175] 通过本领域众所周知的方法可在编码 IFN- β 蛋白质的核酸中引入改变。例如,改变可通过定点诱变,如 Mark 等,“Site-specific Mutagenesis Of The Human Fibroblast Interferon Gene”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, pp. 5662-66 (1984) 和美国专利 4,588,585 中所述的方法产生。

[0176] 构建编码 IFN- β 治疗剂的核酸的另一方法是通过化学合成方法。例如,通过采用寡核苷酸合成仪的化学方法可以合成编码所需 IFN- β 治疗剂的基因。所述寡核苷酸根据 IFN- β 治疗剂的氨基酸序列进行设计。

[0177] 当选择用于在表达系统中表达的核酸时,需要选择在产生重组 IFN- β 治疗剂的宿主细胞或表达系统中优先(favor)的那些密码子。例如,已知在原核细胞中特定密码子比其它密码子优先表达(“密码子优选性”)。

[0178] 编码 IFN- β 治疗剂的 DNA 序列还可以包括或者不包括编码信号序列的 DNA 序列。所述信号序列(如果存在)应可被为表达 IFN- β 治疗剂所选的细胞识别。信号序列可以是原核生物的和/或真核生物的。信号序列是本领域众所周知的,本领域中描述了一些不同的信号序列。信号序列可以是天然的(即,天然存在的)IFN- β 的信号序列。信号序列

所包含的内容依赖于其是否需要从产生分泌信号序列的重组细胞分泌 IFN- β 治疗剂。如果所选择的细胞是原核生物的,一般优选所述 DNA 序列不编码信号序列。如果所选择的细胞是真核生物的,一般优选所述 DNA 序列编码信号序列而最优选使用野生型 IFN- β 信号序列。

[0179] 一经装配(通过合成、定点诱变或其它方法),编码 IFN- β 治疗剂的核酸被插入至表达载体中,并可操作地连接于适于在所需转化的宿主中表达 IFN- β 治疗剂的表达控制序列。适当的转配可通过核苷酸测序,限制性作图和生物活性的多肽在适宜的宿主或宿主细胞中的表达得到证实。本领域已知,为了获得转染的基因在宿主或宿主细胞中的高表达水平,基因必须可操作地连接于在所选定表达宿主中具有功能的转录和翻译表达控制序列。

[0180] 表达控制序列和表达载体的选择依赖于宿主细胞的选择。可以使用多种表达宿主/载体组合。可用于真核宿主,例如真核宿主细胞的表达载体为例如含有来自 SV40,牛乳头瘤病毒,腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体,例如,下述载体:pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG, pSVT7, pko-neo 和 pHyg 来源的载体。可选地,病毒诸如牛乳头瘤病毒(BPV-1),或 Epstein-Barr 病毒(pHEBo, pREP- 来源的和 p205) 的衍生物可用于在真核细胞中瞬时表达蛋白质。质粒制备和宿主生物体的转化中所用的多种方法是本领域众所周知的。关于其它适宜的表达系统可以参见 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch 和 Maniatis(Cold Spring Harbor Laboratory Press:1989) 第 16 和 17 章。

[0181] 可用于细菌宿主的表达载体包括已知的细菌质粒,诸如来自大肠杆菌的质粒,包括 col E1, pCR1, pBR322, pMB9 及其衍生物;宿主范围较宽的质粒,诸如 RP4,噬菌体 DNA,例如, λ 噬菌体的多种衍生物(例如 NM989) 和其它 DNA 噬菌体,诸如 M13 和丝状单链 DNA 噬菌体等。可用于酵母细胞的表达载体包括 2. μ . 质粒及其衍生物。可用于昆虫细胞的载体包括 pVL941。同样参见, Cate 等, " Isolation Of The Bovine And Human Genes For Mullerian Inhibiting Substance And Expression Of The Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98(1986)。

[0182] 此外,这些载体中可使用任意的各种表达控制序列。所述可用的表达控制序列包括与前面表达载体的结构基因相关联的表达控制序列。可用的表达控制序列的实例包括,例如,SV40 或腺病毒的早期和晚期启动子, lac 系统, trp 系统, TAC 或 TRC 系统,噬菌体 λ 的主要操纵子和启动子区,例如 PL, fd 外壳蛋白质的控制区,3- 磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子,酸性磷酸酶的启动子,例如, Pho5, 酵母 α - 交配系统的启动子和已知控制原核或真核细胞或其病毒及其多种组合的基因表达的其它序列。

[0183] 任何适宜的宿主均可用于制备 IFN- β 治疗剂,所述宿主包括细菌、真菌(包括酵母)、植物、昆虫、哺乳动物或其它适宜的动物细胞或细胞系,以及转基因动物或植物。示例性宿主包括大肠杆菌、假单胞菌(pseudomonas)、芽孢杆菌(Bacillus)、链霉菌(Streptomyces)、真菌、酵母的菌株、昆虫细胞诸如 Spodoptera frugiperda(SF9),动物细胞诸如中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞和小鼠细胞诸如 NS/0,非洲绿猴细胞诸如 COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 和 BMT 10,人细胞,以及组织培养中的植物细胞。所述细胞可获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。优选用于动物细胞表达的宿主细胞包括培养的 CHO 细胞和 COS 7

细胞,特别是 CHO-DDUKY- β 1 细胞系。

[0184] 当然,应当理解的是并非所有载体和表达控制序列表达本文所述的 DNA 序列的功能是完全相同的。所有含有相同表达系统的宿主的宿主的功能也不完全相同。但是,本领域技术人员无需大量实验即可在这些载体,表达控制序列和宿主中作出选择。还应当考虑载体的拷贝数,控制拷贝数的能力,和由该载体编码的任何其它蛋白质(诸如抗生素标记)的表达。例如,用于本发明的优选载体包括那些能使编码 IFN- β 治疗剂的 DNA 的拷贝数扩增的载体。所述可扩增的载体是本领域众所周知的。它们包括,例如,能通过 DHFR 扩增(参见,例如,Kaufman,美国专利 4,470,461,KaOufman and Sharp, "Construction Of A Modular Dihydrate Reductase cDNA Gene:Analysis Of Signals Utilized For Efficient Expression", Mol. Cell. Biol., 2, pp. 1304-19(1982)) 或谷氨酰胺合成酶("GS") 扩增(参见,例如,美国专利 5,122,464 和欧洲公开的申请 338,841) 而被扩增的载体。

[0185] 在选择表达控制序列时,还应考虑多种因素。它们包括,例如,序列的相对强度(strength),其可控性,及其与编码 IFN- β 治疗剂的实际 DNA 序列的相容性,特别要考虑可能的二级结构。宿主的选择应当考虑其对所选载体的相容性,本发明的 DNA 序列所编码产物的毒性,其分泌特性,其使多肽正确地折叠的能力,其发酵或培养需要以及 DNA 序列所编码产物的纯化容易程度。

[0186] 根据这些参数,本领域技术人员可选择能够例如,利用 CHO 细胞或 COS 7 细胞,在发酵或大规模动物培养中表达所需 DNA 序列的多种载体/表达控制序列/宿主组合。美国专利 6,127,332 中进一步描述了 CHO 细胞系 CHO-KUKX-B1DHFR sup 在表达 IFN- β 变体中的用途。

[0187] IFN- β 治疗剂还可在体外系统中制备,例如,在体外翻译系统,例如,细胞裂解物(例如,网织红细胞(reticulocyte)裂解物)中。术语“体外翻译系统”(其在本文中可与术语“无细胞翻译系统”互换使用)是指这样的翻译系统,其为至少包含 RNA 分子翻译为蛋白质所需最少元件的无细胞提取物。体外翻译系统通常包括大分子,诸如酶,翻译,起始和延长因子,化学试剂和核糖体。例如,体外翻译系统可至少包括核糖体,^tRNA,起始物甲硫氨酰-^tRNA^{Met},翻译所涉及的蛋白质或复合物,例如,eIF₂, eIF₃, 包含帽结合蛋白(CBP)的帽结合(cap-binding(CB))复合物和真核起始因子 4F(eIF_{4F})。多种体外翻译系统在本领域中是众所周知的,包括可购得的试剂盒。体外翻译系统的实例包括真核裂解物,诸如兔网织红细胞裂解物,兔卵母细胞裂解物,人细胞裂解物,昆虫细胞裂解物和麦胚提取物。裂解物可经商业途径从制造厂商处获得,诸如 Promega 公司, Madison, Wis.; Stratagene, LaJolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill.; 和 GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. 用于体外翻译系统的 RNA 可在体外、例如采用 SP6 或 T7 启动子、根据本领域已知的方法来制备。

[0188] 在其它方法中,在宿主细胞中由内源基因表达 IFN- β 治疗剂。该方法可包括在 IFN- β 基因的编码区上游插入导源启动子,例如,诱导型启动子,表达内源 IFN- β 基因和回收制备的 IFN- β 。异源启动子可根据本领域已知的方法通过“敲入(knock-in)”,或可选地,通过在 IFN- β 基因中插入启动子而被导入细胞中。

[0189] 根据用于制备的该治疗剂的宿主生物体,按照本发明得到的 IFN- β 治疗剂可以是糖基化的或非糖基化的。如果选用细菌作为宿主,则制备的 IFN- β 治疗剂将是非糖基化的。另一方面,真核细胞需要糖基化的 IFN- β 治疗剂。

[0190] 由转化的宿主制备的 IFN- β 治疗剂可根据任何适宜的方法进行纯化。纯化 IFN- β 的多种方法均为已知的。参见,例如,美国专利号 4,289,689,4,359,389,4,172,071,4,551,271,5,244,655,4,485,017,4,257,938,4,541,952 和 6,127,332。在优选的实施方案中,IFN- β 治疗剂通过免疫亲合作用进行纯化,如例如,Okamura 等,“Human Fibroblastoid Interferon:Immunosorbent Column Chromatography And N-Terminal Amino Acid Sequence.”Biochem.,19, pp.3831-35(1980) 中所述。

[0191] 例如,根据常规方法,诸如提取,沉淀,层析,亲合层析,电泳等,可以分离和纯化所述 IFN- β 蛋白质或其变体。例如,通过将其溶液通过其上固定有干扰素受体的柱子可以纯化干扰素蛋白和片段(参见美国专利 4,725,669)。然后通过用离液序列高的盐处理或者通过用含水乙酸洗脱可以洗脱结合的干扰素分子。通过使含有融合蛋白的溶液通过含有选择性结合该融合蛋白的 Fc 部分的固定化蛋白质 A 或蛋白质 G 的柱子,可以纯化免疫球蛋白融合蛋白。参见,例如,Reis, K. J.,等, J. Immunol. 132 :3098-3102(1984);PCT 申请,申请号 W087/00329。然后用离液序列高的盐处理或者通过用含水乙酸洗脱可以洗脱嵌合的抗体。

[0192] 可选地,可以在抗干扰素抗体柱上,或者在抗免疫球蛋白抗体柱上,纯化干扰素蛋白和免疫球蛋白-融合分子,得到基本上纯的蛋白质。术语“基本上纯的”意指所述蛋白质不含与其天然结合的杂质。通过电泳的单一条带可以证实基本上纯。

[0193] 已制备和纯化的 IFN- β 可通过,例如肽谱法(peptide mapping)进行特征描述。例如,IFN- β 治疗剂样品可按照例如,美国专利号 6,127,332 中所述用内蛋白酶 Lys-C 消化然后在反相 HPLC 上分析。

[0194] 在优选的实施方案中,IFN- β 治疗剂基本上不含其它细胞性物质,例如,蛋白质。术语“基本纯的”或“纯的 IFN- β 治疗剂制备物”是指这样的 IFN- β 治疗剂制剂,其含有低于约 20% (以干重计) 的污染性细胞性物质,例如,核酸,蛋白质和脂质,优选含有低于约 5% 污染性细胞性物质。优选的 IFN- β 治疗剂制剂含有低于约 2% 的污染性细胞性物质;甚至更优选低于约 1% 的污染性细胞性物质和最优选低于约 0.5%;0.2%;0.1%;0.01%;0.001% 的污染性细胞性物质。

[0195] 优选的 IFN- β 治疗剂组合物也基本上不含其它细胞性蛋白质(本文也称为“污染性蛋白质”),即,该组合物含有低于约 20% (以干重计) 的污染性蛋白质,优选含有低于约 5% 的污染性蛋白质。优选的目的多肽的制剂含有低于约 2% 的污染性蛋白质;甚至更优选低于约 1% 的污染性蛋白质和最优选低于约 0.5%;0.2%;0.1%;0.01%;0.001% 的污染性蛋白质。

[0196] IFN- β 制剂的纯度和浓度可根据本领域已知的方法进行测定,例如,通过对样品进行凝胶电泳,如例如,Robert K. Scopes, Protein Purification, Principles And Practice, Third Ed., Springer Verlag New York, 1993 的描述(引入此处作为参考)。

[0197] IFN- β 治疗剂的生物活性可采用本领域已知的任何适宜方法进行测定,例如,抗病毒活性的抗中和,诱导蛋白激酶,寡腺苷酸 2,5-A 合成酶或磷酸二酯酶活性,例如,EP-B1-41313 和 W0 00/23472 中所述。所述测定法还包括免疫调节测定法(参见,例如,美国专利 4,753,795),生长抑制分析和与表达干扰素受体的细胞的结合的检测。美国专利 6,127,332 和 W000/23472 中进一步描述了示例性抗病毒实验。

[0198] IFN- β 治疗剂治疗肾小球肾炎的能力还可在动物模型中进行评估,例如,实施例

和本文进一步描述的那些动物模型。测试可按照,例如实施例所述进行实施。

[0199] IFN- β 治疗剂还可以按下述商品名购得:**AVONEX®** (IFN- β -1a) (Biogen 公司, Cambridge, MA); **REBIF®** (IFN- β -1a) (Serono, S.A., Geneva, Switzerland) 以及 **BETAFERON®** 或 Bferon (IFN- β -1b) (Schering Aktiengesellschaft, Berlin, Germany), 其也作为 **BETASERON®** 或 Bseron (Berlex, Montville, NJ; IFN- β -1b) 出售。**AVONEX®** **REBIF®** 是在中国仓鼠卵巢细胞中制备的重组野生型人糖基化 IFN- β 。**BETAFERON®** 和 **BETASERON®** 是在细菌中制备的。

[0200] 4. 用 IFN- β 治疗剂进行治疗的方法

[0201] 本发明提供治疗或预防个体中的神经病的方法, 包括给药所述个体治疗有效量的 IFN- β 治疗剂, 可选作为另一种治疗的辅助治疗。一个实施方案中, 所述神经病是脱髓鞘性神经病, 诸如慢性脱髓鞘性神经病。慢性脱髓鞘性神经病的实例包括 CIDP 和多灶性运动神经病。优选实施方案中, 所述神经病是 CIDP。

[0202] 所这个体可以是已经被鉴定为患有神经病的个体。可根据本领域已知方法诊断个体患有神经病。具体地, CIDP 的诊断可根据本领域已知方法例如本文进一步所述的进行。用 IFN- β 治疗剂进行治疗可在任何时间在被诊断患有神经病的人中开始。治疗可在没有神经病表现, 但很可能患神经病的个体中进行。所述个体可例如通过遗传标准鉴定。很可能患神经病的个体还包括具有一些但不是全部通常与神经病相关的症状的个体, 诸如在不清楚所述个体是否事实上将患神经病的一些情况下。治疗可进行至少约 1 月, 至少约 3 月, 至少约 6 月, 至少约 1 年, 至少约 3 年, 至少约 5 年或更长。

[0203] 个体可以是动物, 诸如哺乳动物。哺乳动物的实例包括人, 牛, 绵羊, 猪, 马, 犬, 猫, 非人灵长类, 小鼠和大鼠。

[0204] 一些实施方案中, IFN- β 治疗剂作为辅助治疗给药个体, 即给药正在接受另一种治疗的个体。例如, 患有 CIDP 的人可通过给药 IVIg; 类固醇, 诸如泼尼松龙 (prednisolone); 或免疫抑制剂, 诸如硫唑嘌呤, 环孢霉素或环磷酰胺; 或通过血浆交换, 并接受 IFN- β 治疗剂来进行治疗。与 IFN- β 治疗剂联合治疗可最小化其它治疗的使用, 所述其它治疗可更有害 (例如, 类固醇), 更昂贵 (例如, IVIg) 或更不方便 (血浆交换)。因此, 在一些实施方案中, 给药个体 IFN- β 治疗剂允许降低其它治疗的剂量和 / 或频率。例如, 剂量和 / 或频率可降低至少约 10%, 30%, 50%, 75%, 100% (即, 两倍), 5 倍, 10 倍或更多。上下文中给出了 CIDP 目前的治疗标准。

[0205] 因此, 一个实施方案中, 本发明提供治疗个体中慢性脱髓鞘性神经病, 例如 CIDP 的方法, 所述个体正在接受选自下组的第一种 CIDP 疗法: 给药类固醇; 给药抗炎药; 给药 IVIg; 或血浆置换, 其中的改进包括给药患者所述第一种 CIDP 疗法以及一定剂量的 IFN- β 治疗剂以便有效缓解 CIDP 的症状, 所述一定剂量可有效地明显降低所述第一种 CIDP 疗法的剂量或频率。

[0206] 免疫抑制剂目前用于治疗 CIDP。例如, 发现类固醇对 CIDP 有益。通常在 4 周内见到有利反应。常用的一种类固醇是泼尼松 (Prednisone) (Deltasone, Orasone, Meticorten)。泼尼松是口服皮质类固醇, 其抑制炎症和免疫反应, 并据信改变炎症位点的介质功能并抑制 CIDP 中的免疫反应。尽管剂量不同, 大多数成年患者的开始剂量为 0.5-1mg/kg/天 PO (即, 经口) (约 30-40 到 60-80mg/天)。在随后的两个月中预期出现改善。随后, 所述

剂量可改为隔天治疗,并精确地减少到允许维持患者不住院的最低有效剂量。

[0207] 另一种对治疗 CDP 有效的免疫抑制剂是咪唑硫嘌呤 (Azathioprine) (Imuran),其为嘌呤类似物,并减少嘌呤代谢以及抑制 DNA 和 RNA 合成。据信咪唑硫嘌呤通过抑制对神经的免疫介导的损伤来减轻 CIDP 的失能以及症状。初始剂量为约 50mg PO qd(通过口服,每天一次),通常逐渐增加到每日剂量 2-3mg/kg/天 PO。尽管咪唑硫嘌呤的治疗剂量难以针对每个患者确定;一些证据提示评估红细胞体积 (MCV) 可指示治疗剂量。治疗反应在 6 个月以后显示。

[0208] 另一种目前用于治疗 CIDP 的免疫抑制剂是霉酚酸酯 (CellCept),其为免疫治疗剂霉酚酸 (mycophenolic acid) 的前体药物。据信霉酚酸酯通过抑制酶次黄嘌呤核苷单磷酸脱氢酶 (inosine monophosphate dehydrogenase) 来抑制淋巴细胞嘌呤合成。成年人常用剂量为 250mg-3g/天,可根据临床效果调整。

[0209] 由 11 个氨基酸组成的环状多肽环孢霉素 (Sandimmune, Neoral) 也可用于治疗 CIDP。环孢霉素抑制 T 细胞活化的第一阶段并且不影响体液免疫。据信通过抑制 T 细胞,环孢霉素可抑制炎症/免疫反应位点细胞介导的神经损伤。通常,其初始剂量为 5mg/kg/天 PO 分开 bid(口服,一天两次),并根据反应增加剂量。监测谷值和峰值水平以记录有效性并避免毒性;尽管没有鉴定到明确的 CIDP 特异性所需谷值水平,通常用于免疫疾病的谷值水平为 100-250。

[0210] 另一免疫抑制剂是环磷酰胺 (Cytosan),其为细胞周期非特异性抗肿瘤剂,以及作为烷化剂的免疫抑制剂。所述剂量通常为 1-2mg/kg/d PO。

[0211] 治疗 CIDP 患者的另一种标准方法为通过静脉内给药免疫球蛋白 (IVIg)。用于 IV 输注的溶液通常主要包含异源人 IgG,但也包含少量的 IgA 和 IgM。一些实施方案中,所述 IV 溶液对于抗体识别的表位而言是异源的,例如所述溶液不是用具体抗原免疫动物所得抗体的制备物。推定作用的基质基于 IVIg 含有可中和免疫因子的随机抗体组,导致 CIDP 中的周围神经破坏。平均而言,在第 10 天见到改善并持续到第 42 天。其血清半寿期约为 21-29 天。患者通常需要每数周或月进行重复治疗以便维持疾病缓解或者治疗复发情况。通常剂量为 0.4-2g/kg,通常分为每天 5 次,每次 400mg/kg。治疗可在较高的剂量(例如 2g/kg)开始,随后降低到较低剂量(例如 0.5-1g/kg)。给药频率各不相同,大多数患者每 2-8 周接受剂量。例如 IVIG 给药可为在数天中、0.4g/kg 到每 1-4 周给药 1-2g/kg。

[0212] 另一种认可的 CIDP 疗法为血浆置换(或血浆交换)。这种治疗据信去除负责免疫介导的周围神经损伤的抗体和补体成分。血浆通过与透析类似的方法从血液中去掉。其效力似乎与 CIDP 的 IVIg 治疗类似。通常患者在前两周每周经 3 次血浆交换;然后,治疗的数量和频率根据临床反应确定。

[0213] 因此,IFN- β 治疗剂可与以下治疗联合用药:给药免疫治疗剂(例如类固醇);给药 IVIg 和/或血浆置换。IFN- β 治疗剂和辅助药物可同时或序贯给药。如果序贯给药,可在同一天或不同日子给药。当 IFN- β 治疗与血浆置换联合时,IFN- β 治疗剂可在血浆置换后给药,使得在血浆置换中没有去除 IFN- β 治疗剂。当 IFN- β 与 IVIg 治疗联用时,所述两种不同药物的给药优选分隔至少 1 或 2 小时。

[0214] 另一实施方案中,将 IFN- β 治疗剂给药被发现难以用另一种 CIDP 治疗(诸如上文所述的那些)控制的个体。在其它情况下,IFN- β 治疗可给药没有发现其难以用另一种

CIDP 治疗控制的个体。例如, IFN- β 治疗剂可给药对一或多种其它治疗有反应的个体。在另一实施方案中, 将 IFN- β 治疗剂给药初始 (**naïve**) 个体, 即其以前没有使用任何 CIDP 治疗。当个体以前没有接受过 CIDP 治疗时, 用 IFN- β 治疗剂的治疗包括首先鉴定患有 CIDP 或很可能患 CIDP 的个体。

[0215] 治疗也可如下进行: 将 IFN- β 治疗剂给药正接受第一种 CIDP 疗法, 诸如 IVIG 的人, 并持续所述联合治疗一段时间, 然后停用所述第一种 CIDP 疗法。所述第一种 CIDP 疗法可逐渐停用, 诸如通过降低所述第一种 CIDP 疗法的剂量和 / 或频率。在说明性实施方案中, 患者每两周或每四周接受一次 IVIG。所述个体随后接受 IFN 与 IVIG 的联合治疗, 诸如每周给药 IFN- β 治疗剂一次或两次。所述联合治疗可持续约 10-20 周, 例如约 16 周。在联合治疗期间, 优选 IVIg 和 IFN- β 治疗剂的给药相隔至少约 1-3 小时, 诸如至少约 2 小时。约 16 周后, 中断或减少所述第一种 CIDP 疗法。例如, 所述个体随后接受较小剂量的 IVIg 或降低给药频率。在停用或减量所述第一种 CIDP 疗法后没有改善的个体中, 可恢复所述第一种 CIDP 疗法, 并继续与 IFN- β 治疗剂一起联合治疗。

[0216] 通常, IFN- β 治疗剂可通过任何途径给药。例如, IFN- β 治疗剂可直接给药个体, 例如经局部 (如通过注射或局部给药组织位点) 或经系统给药 (例如经胃肠外或口服)。局部给药包括, 例如, 直接给药受影响的肌肉。胃肠外给药包括气雾剂 (aerosol)、经皮下、经静脉内、经肌肉内、经关节内、经滑膜腔内、经胸骨内 (intrasternal)、经鞘内 (intrathecal)、经肝内、经损伤内 (intralesional) 和经颅内注射或输注技术。可以通过周期性注射本文所述药物 (即, IFN- β 治疗剂) 的药团 (bolus) 来给药, 或可经由外部容器 (例如, 静脉注射袋) 或内部容器 (例如, 可生物降解的植入物或植入的泵) 通过静脉内或腹膜内更连续地给药。

[0217] IFN- β 治疗剂优选作为包含可药用载体的无菌药物组合物给药。本文术语“载体”包括可接受的佐剂和载体。可用于本发明的药物组合物中的可药用载体包括 (但不限于) 离子交换剂、铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白 (诸如人血清白蛋白)、缓冲物质诸如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质类, 诸如硫酸谷醇溶蛋白 (prolamine sulfate)、磷酸氢二钠, 磷酸氢钾, 氯化钠, 锌盐, 胶体硅, 三硅酸镁, 聚乙烯吡咯烷酮, 基于纤维素的物质, 聚乙二醇, 羧甲基纤维素钠, 聚丙烯酸酯, 蜡, 聚乙烯-聚氧苯烯-嵌段聚合物, 聚乙二醇和羊毛脂 (wool fat), 葡聚糖, 甘油, 乙醇等及其组合物。IFN- β 治疗剂可被制成包含一种或多种其它蛋白质 (例如用于稳定 IFN- β 治疗剂) 的组合物。例如, IFN- β 治疗剂可与白蛋白混合。

[0218] 当经胃肠外 (诸如通过静脉内、皮下或肌肉内) 施用 IFN- β 治疗剂时, 其优选包括部分水溶液。该溶液是生理学上可接受的, 以便除将所需药物递送给该个体外, 该溶液不会另外地对该个体的电解质和 / 或容量平衡产生不利作用。因此, 用于药物的水介质可包括普通生理盐水 (例如, 0.9% NaCl, 0.15M, pH 7-7.4)。用于胃肠外给药的溶液可通过制药领域已知的任何方法制备, 其在例如 Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, A., ed.), Mack Pub., 1990 中描述。

[0219] 根据本发明的, 药物组合物可以是无菌注射剂形式, 例如无菌注射水性混悬剂或油性混悬剂。该混悬剂可按照本领域已知的方法采用适宜的分散剂或湿润剂和混悬剂进行配制。无菌注射剂还可以是在无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或混

悬剂,例如 1,3-丁二醇溶液。可使用的可接受的载体和溶剂是水,林格液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌、非挥发油通常可被用作溶剂或悬浮介质。为这一目的,可使用任何温和的非挥发油,包括合成甘油一酯或甘油二酯。和天然药物学上可接受的油诸如橄榄油或蓖麻油(具体为所述油的聚氧乙烯形式)一样,脂肪酸诸如油酸及其甘油酯衍生物也可用于制备注射剂。这些油溶液或混悬剂还可包括长链醇稀释剂或分散剂。

[0220] 包含 IFN- β 治疗剂的药物组合物还可以经口服给药。例如,其可通过任何口服可接受的剂型,包括(但不限于)胶囊、片剂、水混悬剂或溶液进行施用。在用于口服使用的片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。通常,还要加入润滑剂,诸如硬脂酸镁。对于以胶囊剂形式的口服施用,可用的溶剂包括乳糖和干玉米淀粉。当口服使用需要水混悬剂时,将活性成分与乳化剂和悬浮剂联合。如需要,还可以加入一些甜味剂、调味剂或着色剂。还可以使用局部透皮贴剂。

[0221] 本发明的药物组合物还可通过鼻气雾剂进行施用或使用雾化器、干粉吸入器或压力定量气雾剂来吸入。所述组合物可根据药物配制领域众所周知的技术进行制备,并可制备为盐水溶液,其可使用苯甲醇或其它适宜的保存剂,增强生物利用度的吸收促进剂,碳氟化合物和/或其它常规增溶剂或分散剂。

[0222] IFN- β 或其变体还可以采用脂质体递送系统(诸如小型单层泡,单层大泡和多层泡)的形式进行施用。脂质体可由多种磷脂制得,所述磷脂包括胆固醇、硬脂酰胺(stearylamine)或磷脂酰胆碱。在一些实施方案中,脂质部分的膜通过与水溶液水合从而形成包封药物的脂质层,如美国专利 5,262,564 中所述。脂质体可含有指导它们到达具体细胞或组织的表面分子。这种修饰的脂质体可根据本领域已知方法制备。

[0223] IFN- β 或其变体还可以与作为可靶向的药物载体的可溶性聚合物偶联。所述聚合物可包括聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone)、吡喃共聚物、聚羟丙基-甲基丙烯酸胺-苯酚(polyhydroxypropyl-methacrylamide-phenol)、聚羟基乙基天冬酰胺苯酚(polyhydroxyethylaspanaidephenol)或软脂酰(palmitoyl)残基取代的聚氧化乙烯聚赖氨酸(polyethyleneoxidepolylysine)。IFN- β 或其变体还可以与蛋白质,诸如受体蛋白质和白蛋白等偶联。此外,IFN- β 或其变体可与用于实现药物的控制性释放的生物可降解聚合物类偶联,所述聚合物例如,聚乳酸,聚 ϵ -己内酯(polyepsilon caprolactone),聚羟基丁酸,聚原酸酯(polyorthoester),聚缩醛(polyacetals),聚二氢吡喃,聚氰基丙烯酸酯(polycyanoacrylates)和水凝胶的交联的或两亲性嵌段共聚物相偶联。

[0224] IFN- β 也可提供为包含稳定剂的液体组合物。稳定剂的存在量可以是 IFN- β 或其变体重量比的 0.3%至 5%。稳定剂可以是氨基酸,诸如酸性氨基酸(例如,谷氨酸和门冬氨酸)或精氨酸或甘氨酸。如果稳定剂是精氨酸-HCl,其浓度将优选为 0.5%(w/v)至 5%,最优选为 3.13%(等效于 150mM 精氨酸-HCl)。如果稳定剂是甘氨酸,其浓度将优选为 0.5%(w/v)至 2.0%,最优选为 0.52%(等效于 66.7mM 至 266.4mM,最优选 70mM)。如果稳定剂是谷氨酸,其浓度将优选为 100mM 至 200mM,最优选为 170mM(等效于 1.47%至 2.94%的 w/v 百分数且最优选为 2.5%)。液体制剂中 IFN- β 或其变体的优选浓度范围为约 30 μ g/ml 至约 250 μ g/ml。优选浓度范围为 48 至 78 μ g/ml,例如约 60 μ g/ml。所述量有赖于,例如具体 IFN- β 治疗剂的比活性。通常,剂量范围为约 1 百万国际单位(MIU)-约 50MIU,例如,约 3,6,9 或 12MIU 每剂。

[0225] 一个实施方案中,氨基酸稳定剂是精氨酸,所述精氨酸以其酸性形式(精氨酸-HCl)掺入约 pH 5.0 的溶液中。由此,优选多离子型(poly-ionic)赋形剂。优选地,液体组合物被包含在容器例如注射器内,其中所述容器具有与液体接触的表面,该表面已涂覆了对 IFN- β 惰性的物质,例如,硅酮或聚四氟乙烯。更优选的组合物的 pH 为 4.0-7.2。一些实施方案中,包含稳定剂的溶液优选未被冻干和/或在制备和保存期间未被置于包含氧气的气体中。

[0226] 用于在本发明中将 pH 保持在约 4.0-约 7.2 的范围,诸如约 4.5-约 5.5,例如 5.0 的有机酸和磷酸盐缓冲液可以是有机酸及其盐的常规缓冲液,诸如枸橼酸盐缓冲液(例如,枸橼酸一钠-枸橼酸二钠混合物,枸橼酸-枸橼酸三钠混合物,枸橼酸-枸橼酸一钠混合物,等),琥珀酸盐缓冲液(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),酒石酸盐缓冲液,延胡索酸盐缓冲液,葡萄糖酸盐缓冲液,草酸盐缓冲液,乳酸盐缓冲液,磷酸盐缓冲液,和醋酸盐缓冲液,如 WO 98/28007 中所述。

[0227] 示例性制剂(按 WO 98/38007 中所述进行制备)包括:

[0228] (i) pH 5.0 的 20mM 醋酸盐缓冲液,该缓冲液优选预先未被冻干,其中缓冲液包含 IFN- β 和至少一种选自如下的成分:(a) 150mM 精氨酸-HCl;(b) 100mM 氯化钠和 70mM 甘氨酸;(c) 150mM 精氨酸-HCl 和 15mg/ml 人血清白蛋白;(d) 150mM 精氨酸-HCl 和 0.1% Pluronic F-68;(e) 140mM 氯化钠;(f) 140mM 氯化钠和 15mg/ml 人血清白蛋白;和 (g) 140mM 氯化钠和 0.1% Pluronic F-68;

[0229] (ii) 包含 IFN- β 或其变体,170mM L-谷氨酸和 150mM 氢氧化钠的 pH5.0 的液体,该液体优选预先未被冻干;和

[0230] (iii) pH 7.2 的 20mM 磷酸盐缓冲液,该缓冲液优选预先未被冻干,其中缓冲液包含 IFN- β 和至少一种选自如下的成分:(a) 140mM 精氨酸-HCl 和 (b) 100mM 氯化钠和 70mM 甘氨酸。

[0231] 优选的组合物还包括聚山梨醇酯,例如,0.005% w/v 的聚山梨醇酯 20。

[0232] IFN- β 或其变体还可与可溶性 IFN I 型受体或其一部分,诸如该受体的 IFN-结合链联合施用,诸如,例如美国专利 6,372,207 中所述。如该专利所述,以 I 型 IFN 与所述受体的 IFN 结合链的复合物形式给药改善了 IFN 的稳定性并增强了 IFN 的效力。该复合物可以是非共价复合物或共价复合物。

[0233] IFN- β 可被配制为干粉形式,其在施用于个体之前可被或可不被溶解或混悬。具体而言,已经显示出与聚合物(例如,PEG)结合的 IFN- β 在干燥形式下特别稳定(参见,例如,WO 00/23114 和 PCT/US/95/06008)。

[0234] 配制的组合物包含治疗有效量的 IFN- β 治疗剂。即,它们包含这样的 IFN- β 治疗剂的量,所述 IFN- β 治疗剂的量在足以防止、抑制、延缓或减轻持久或进行性肌肉功能丧失、或者提供有效治疗的时间内,为肌肉组织或其它适宜的组织提供适宜浓度的 IFN- β 治疗剂。本领域技术人员应能理解,治疗剂组合物中 IFN- β 治疗剂的浓度将根据很多因素,包括所选 IFN- β 治疗剂的生物效能,所使用 IFN- β 治疗剂的化学特性(例如,疏水性),IFN- β 治疗剂赋形剂的配制,给药途径和所拟定的治疗(包括将 IFN- β 治疗剂直接施用于组织还是将其系统给药)。优选的给药物量也可有赖于诸如个体的组织的状况,肌肉丧

失程度和具体个体的整体健康状态等变量。其也可依赖患者年龄,体重,性别,总体健康,饮食和排泄速率,以及所述个体对副作用的敏感性,以及 IFN- β 治疗剂是否与其它药物共同给药。普通熟练医师或兽医可很容易地确定并给出有效预防、逆转或阻止病症进展所需的 IFN- β 治疗剂有效量。

[0235] 所述剂量可连续,或每日施用,但目前优选的是只要能维持满意的反应(如例如,通过测定适宜的医学指标和/或生命质量指征所检测到的疾病的稳定和/或改善),即可每周一次、两次或三次施用所述剂量。还可以采用频率较低的剂量(例如每月剂量)。为易于频繁输注,可植入半-永久性支架(例如,静脉内、腹膜内或囊内(intracapsular))。

[0236] 任何上述药物组合物可包含 0.1-99%,1-70%,或优选,1-50% IFN- β 治疗剂作为活性成分。

[0237] 对于任何施用途径,可使用分开的(divided)或单次剂量。例如,IFN- β 治疗剂可每日或每周以单次剂量施用,或将总剂量以二、三或四个分开的剂量进行施用。

[0238] IFN- β 治疗剂给药的剂量水平可为约 0.001-约 100mg/kg 体重每剂,例如,约 0.1-约 50mg/kg 体重;约 0.1mg/kg 体重-约 20mg/kg 体重;或约 1mg/kg 体重-约 3mg/kg 体重。这些剂量可以每 1-14 天的间隔给药,诸如每天,每隔一天,每隔两天,每隔四天,每周一次或每周两次。根据具体 IFN- β 治疗剂的比活性,也可以约 10-约 100 μ g/剂,诸如约 20-约 50 μ g/剂,例如,约 30 μ g/剂给药。

[0239] 对于国际单位,IFN- β 治疗剂给药可为约 1-30MIU/剂,诸如 3-20MIU/剂,例如,3-12MIU,优选剂量包括约 3MIU,6MIU 和 12MIU 每剂。所述给药剂量优选约每周给药一或两次。剂量的优化可,例如,通过给药 IFN- β 治疗剂,然后评估 IFN- β 治疗剂的循环或局部浓度来进行。

[0240] 在具体实施方案中,当 IFN- β 治疗剂的给药通过在一周中采用皮下注射来递送 0.01-100 μ g/kg,或更优选 0.01-10 μ g/kg 的 IFN- β ,例如,PEG 化 IFN- β 时,分别在 0 和 72 小时注射 0.005-50 μ g/ μ g,或更优选 0.005-5 μ g/kg。此外,根据美国专利 3,710,795(引入此处作为参考),胃肠外施用的一种途径采用了植入缓释或持续释放系统,其能确保剂量水平恒定。

[0241] 本发明的口服剂量(优选对于 PEG 化 IFN- β 治疗剂而言)为约 0.01-100 μ g/kg/日,口服;或更优选 0.01-10 μ g/kg/日,口服。组合物优选以包含 0.5-5000 μ g,或更优选 0.5-500 μ g IFN- β 治疗剂的刻痕片(seored tablet)的形式提供。优选实施方案中,患有神经病例如 CIDP 的个体通过肌肉内给药 IFN- β 治疗剂而用 IFN- β 治疗剂治疗。IFN- β 治疗剂可每周给药一次。在更为优选的实施方案中,IFN- β 治疗剂以约 6MIU 的剂量每周给药所述个体一次。其它实施方案中,通过每周给药约 6MIU 的 IFN- β 治疗剂一次治疗个体,所述给药不必是经肌内的。

[0242] 一些实施方案中,IFN- β 治疗剂在一定时间内按一种方案给药,随后按另一种方案给药。例如,个体每周接受一次 IFN- β 治疗剂,持续两个月,然后下一个月中每周接受两次。个体可首先通过皮下给药治疗,然后经肌肉内给药治疗。其它方案中,具体剂量、给药方式或 IFN- β 治疗剂在下次给药中可改变为不同剂量、给药方式或 IFN- β 治疗剂。

[0243] 在最优选的实施方案中,对需要的个体施以 AVONEX®。AVONEX®作为包含下述物质的冻干粉售卖:

[0244] 每 1ml 剂量的配制：

[0245] 30mcg 干扰素 -b-1a (6 百万国际单位 (MIU))

[0246] 50mM 磷酸钠

[0247] 100mM 氯化钠

[0248] 15mg 人血清白蛋白

[0249] pH 7.2

[0250] **AVONEX®** 干扰素的比活为 2×10^8 单位 /mg, 即, 200MU 抗病毒活性 / 每毫克的 IFN-b-1a 蛋白质。患者用无菌水重新溶解该粉剂, 然后每周一次通过肌肉内注射 1ml。

AVONEX® 还可按包含下述物质的液体制剂进行制备：

[0251] 每 0.5ml 剂量的配制：

[0252] 30mcg (μ g) IFN-b-1a (6 百万国际单位 (MIU))

[0253] 20mM 醋酸盐 (醋酸钠和醋酸)

[0254] 150mM 精氨酸 HCl

[0255] 0.005% w.v 聚山梨醇酯 20

[0256] 注射用水

[0257] pH 4.8

[0258] 该制剂可包装在载药 (pre-filled) 注射器内。患者可手动使用所提供的注射器或与自动注射器 (autoinjector) 联合使用。给药方案为每周一次通过肌肉内注入 6MIU (即, 30mcg)。

[0259] 在另一实施方案中, IFN- β 是 REBIF, 其作为冻干粉和液体制剂提供。冻干粉包含下列物质：

[0260] 每 2.0ml 剂量的配制：

[0261] 3MIU IFN-b-1a

[0262] 甘露醇

[0263] HSA

[0264] 醋酸钠

[0265] pH 5.5

[0266] REBIF 干扰素的比活为 2.7×10^8 单位 /mg, 即, 270MU 抗病毒活性 / 每毫克 IFN-b-1a 蛋白质。患者用氯化钠溶液 (0.9% NaCl) 重新溶解该粉剂, 随后每周三次通过皮下注射。液体 REBIF 的配制如下：

[0267] 每 0.5ml 剂量的配制：

[0268] 6 或 12MIU IFN-b-1a

[0269] 4 或 2mg HSA

[0270] 27.3mg 甘露醇

[0271] 0.4mg 醋酸钠

[0272] 注射用水

[0273] 该液体制剂可包装在载药注射器内, 可以用或不用自动注射器装置 (Rebiject) 每周三次 (6 或 12MIU, 分别对应于 66μ g/周或 132μ g/周) 经皮下施用。

[0274] 而在另一实施方案中, IFN- β 是 **BETASERON®** (获自 Berlex), 其为在大肠杆

菌中制备的包含 cys-17 至 ser 突变的 IFN- β 。该非糖基化 IFN- β 的效力低于在 CHO 细胞中产生的 **AVONEX®** 或 **REBIF®**。以 250mcg (8MIU) 的剂型 (包括冻干和液体制剂) 售卖所述药剂, 其用于每隔一日经皮下注射。 **BETAFERON®** 为另一可购得的 IFN- β , 其可根据制造商说明书经皮下施用。

[0275] 除了 IFN-beta 治疗剂以及可选的另一种治疗, 个体也可接受治疗神经性疼痛 (neuropathic pain) 的药物, 例如抗癫痫药物。最常用的药物是加巴喷丁 (gabapentin) (Neurontin) 和卡马西平 (carbamazepine) (Tegretol)。可选, 三环类抗抑郁药 (例如, 阿米替林 (amitriptyline) (Elavil)) 也可用于治疗神经性疼痛。

[0276] 所述疾病的病程及其对药物的反应可通过临床检验和实验室发现随诊。本发明治疗的有效性可通过前述病症和疾病症状缓解的程度以及干扰素的正常副作用 (即流感样症状, 例如发烧, 头痛, 寒战, 肌痛, 疲劳等, 以及中枢神经系统相关症状诸如抑郁, 感觉异常 (paresthesia), 注意力集中障碍 (impaired concentration) 等) 被消除或基本减轻的程度来确定。

[0277] 本发明通过下述实施例 (非限制性的) 进一步进行描述。所有引用的参考文献 (包括如本申请全文引用的参考文献, 公布的专利, 公开的专利申请) 的内容清楚地包含在本文中作为参考。

[0278] 除非另有所指, 本发明的实施将采用细胞生物学, 细胞培养, 分子生物学, 转基因生物学, 微生物学, 重组 DNA 和免疫学的常规技术, 其为本领域的常规技术。现有文件中对所述技术有详细的解释。参见, 例如, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch 和 Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis 等, 美国专利: 4,683,195; Nucleic Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu 等 eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986)。

[0279] 实施例

[0280] 实施例 1: 用 IFN- β -1a 治疗 CIDP 患者

[0281] 用 IVIg 治疗的 CIDP 患者将如下改为用 IFN- β -1a 治疗。

[0282] 经由肌内注射将 IFN- β -1a 给药确诊为 CIDP 并稳定地每两周一次或每四周一次用 IVIg 治疗的患者: 30mcg (6MIU) **AVONEX®** 每周一次; 30mcg (6MIU) **AVONEX®** 每周两次; 60mcg (12MIU) **AVONEX®** 每周一次; 或 60mcg (12MIU) **AVONEX®** 每周两次。当在同一天给药 IVIg 和 IFN- β -1a 时, 所述给药分隔至少 2 小时。所述患者将接受所述联合

治疗 16 周,在此期间,约每四周评估患者的疾病状态一次。在第 16 周,停用 IVIg 并按如前述方案进行 IFN- β -1a 治疗。

[0283] 在患者内持续检测所述疾病。如果患者经过联合治疗后好转,将保持 (reinstate) IVIg 治疗。随后通过逐渐降低 IVIg 给药的量或频率来减量 IVIg。

[0284] 等同物

[0285] 本领域技术人员应理解,或能够确定利用常规实验,可获得所述本发明的具体实施方案的多种等同物。所述等同物意在包含在权利要求内。

[0001]

序列表

<110> 比奥根艾迪克 MA 公司 (BIOGEN IDEC MA INC.)
SANDROCK, ALFRED

<120> 利用 IFN- β 治疗慢性炎性脱髓鞘性多神经病

<130> BII-002.25

<140> PCT/US03/30532
<141> 2003-09-26

<150> 60/414,307
<151> 2002-09-27

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1
<211> 840
<212> DNA
<213> 人 (Homo sapiens)

<220>
<221> CDS
<222> (76).. (639)

<400> 1
acatttctaac tgcaaccttt cgaagccttt gctctggcac aacaggtagt aggcgacact 60
gttcgtgttg tcaac atg acc aac aag tgt ctc ctc caa att gct ctc ctg 111
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu
1 5 10
ttg tgc ttc tcc act aca gct ctt tcc atg agc tac aac ttg ctt gga 159
Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly
15 20 25
ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa 207
Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln
30 35 40
ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac 255
Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp
45 50 55 60
atc cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc 303
Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala
65 70 75
gca ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga 351
Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg
80 85 90
caa gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc 399
Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu
95 100 105
ctg gct aat gtc tal cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa 447

[0002]

```

Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu
 110                      115                      120

gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt 495
Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser
125                      130                      135                      140

ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc 543
Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala
                      145                      150                      155

aag gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta 591
Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu
                      160                      165                      170

agg aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga 639
Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                      175                      180                      185

agaatctccta gccigtgcct ctgggactgg acaattgctt caagcattct tcaaccagca 699

gatgctgttt aagtgactga tggctaattgt actgcatatg aaaggacact agaagatttt 759

gaaatttttta ttaaattatg agttattttt atttatttaa attttatttt ggaaaaataaa 819

ttatttttgg tgcaaaagtc a 840

<210> 2
<211> 187
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 2
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
 1                      5                      10                      15

Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg
 20                      25                      30

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
 35                      40                      45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
 50                      55                      60

Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile
 65                      70                      75                      80

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
 85                      90                      95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
 100                      105                      110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
 115                      120                      125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
 130                      135                      140

```

[0003]

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
 145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
 165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
 180 185

<210> 3
 <211> 501
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (501)

<400> 3
 atg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa aga agc agc aat ttt cag 48
 Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
 1 5 10 15

tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc 96
 Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
 20 25 30

aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag gag att aag cag ctg cag 144
 Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
 35 40 45

cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc atc tat gag atg ctc cag 192
 Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
 50 55 60

aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca tct agc act ggc tgg aat 240
 Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
 65 70 75 80

gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat gtc tat cat cag ata aac 288
 Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
 85 90 95

cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc 336
 His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
 100 105 110

agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg aaa aga tat tat ggg agg 384
 Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
 115 120 125

att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac agt cac tgt gcc tgg acc 432
 Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
 130 135 140

ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt tac ttc att aac aga ctt 480
 Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
 145 150 155 160

[0004]

aca ggt tac ctc cga aac tga 501
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 4
<211> 166
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
50 55 60
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110
Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 5
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的说明性寡核苷酸

<400> 5
ggcgggtggtg gcagc 15

<210> 6
<211> 5

[0005]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的接头肽

<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 7
<211> 15
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的说明性寡核苷酸

<400> 7
gacgatgatg acaag

15

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的肠激酶识别位点

<400> 8
Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的说明性寡核苷酸

<400> 9
agctccggag acgatgatga caag

24

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的接头肽

<400> 10
Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

[0006]

<210> 11
 <211> 1257
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 合成的核苷酸构建体序列

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (1254)

<400> 11
 atg cct ggg aag atg gtc gtg atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg 48
 Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1 5 10 15
 ata atg ttt gca gct tct caa gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc 96
 Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
 20 25 30
 cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg 144
 Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
 35 40 45
 aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc 192
 Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
 50 55 60
 cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca 240
 Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa 288
 Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
 85 90 95
 gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg 336
 Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
 100 105 110
 gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa 384
 Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
 115 120 125
 aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg 432
 Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 130 135 140
 cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag 480
 His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg 528
 Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 165 170 175
 aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac gtc gac 576
 Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp

[0007]

180	185	190	
aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly 195 200 205			624
ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile 210 215 220			672
tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu 225 230 235 240			720
gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His 245 250 255			768
aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg 260 265 270			816
gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys 275 280 285			864
gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu 290 295 300			912
aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr 305 310 315 320			960
acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu 325 330 335			1008
acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp 340 345 350			1056
gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val 355 360 365			1104
ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp 370 375 380			1152
aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His 385 390 395 400			1200
gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccc Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 405 410 415			1248
ggg aaa tga Gly Lys			1257

[0008]

```

<210> 12
<211> 418
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的融合蛋白序列

<400> 12
Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp
 1             5             10             15

Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe
                20             25             30

Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu
 35             40             45

Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile
 50             55             60

Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala
 65             70             75             80

Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln
                85             90             95

Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu
 100            105            110

Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu
 115            120            125

Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu
 130            135            140

His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys
 145            150            155            160

Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg
 165            170            175

Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Val Asp
 180            185            190

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 195            200            205

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 210            215            220

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 225            230            235            240

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 245            250            255

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

```

[0009]

260	265	270
Val Val Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp	Leu Asn Gly Lys
275	280	285
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Leu Pro	Ala Pro Ile Glu
290	295	300
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg Glu	Pro Gln Val Tyr
305	310	315
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp	Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu
325	330	335
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp Ile	Ala Val Glu Trp
340	345	350
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr	Thr Pro Pro Val
355	360	365
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu Thr Val Asp
370	375	380
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His
385	390	395
Glu Ala Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro
405	410	415

Gly Lys

<210> 13

<211> 1272

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的核苷酸构建体序列

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1269)

<400> 13

atg cct ggg aag atg gtc gtg atc ctt gga gcc tca aat ata ctt tgg 48

Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp

1

5

10

15

ata atg ttt gca gct tct caa gcc atg agc tac aac ttg ctt gga ttc 96

Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe

20

25

30

cta caa aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg 144

Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu

35

40

45

aat ggg agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc 192

Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile

50

55

60

[0010]

cct gag gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca	240
Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
ttg acc atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa	288
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln	
85 90 95	
gat tca tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg	336
Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu	
100 105 110	
gct aat gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa	384
Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu	
115 120 125	
aaa ctg gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg	432
Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu	
130 135 140	
cac ctg aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag	480
His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys	
145 150 155 160	
gag tac agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg	528
Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg	
165 170 175	
aac ttt tac ttc att aac aga ctt aca tgt tac ctc cga aac ggc ggt	576
Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Cys Tyr Leu Arg Asn Gly Gly	
180 185 190	
ggg ggc agc gtc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca gca cct	624
Gly Gly Ser Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	
195 200 205	
gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa ccc aag	672
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
210 215 220	
gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg gtg gtg	720
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
225 230 235 240	
gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac gtg gac	768
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
245 250 255	
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag tac	816
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr	
260 265 270	
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac	864
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
275 280 285	
tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa gcc ctc	912
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	

[0011]

290	295	300	
cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga			960
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg			
305	310	315	320
gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg acc aag			1008
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys			
325	330	335	
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc agc gac			1056
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp			
340	345	350	
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag			1104
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys			
355	360	365	
acc acg cct ccc gtg ttg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc			1152
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
370	375	380	
aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc ttc tca			1200
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser			
385	390	395	400
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag aag agc			1248
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
405	410	415	
ctc tcc ctg tct ccc ggg aaa tga			1272
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
420			
<210> 14			
<211> 423			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 人工序列的描述: 合成的融合蛋白序列			
<400> 14			
Met Pro Gly Lys Met Val Val Ile Leu Gly Ala Ser Asn Ile Leu Trp			
1 5 10 15			
Ile Met Phe Ala Ala Ser Gln Ala Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe			
20 25 30			
Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu			
35 40 45			
Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile			
50 55 60			
Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala			
65 70 75 80			
Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln			

[0012]

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

[0013]

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
405 410 415

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
420

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

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 15
catcatcatc atcatcat 18

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的 6X-His 标记

<400> 16
His His His His His His
1 5

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 17
tccgggggcc atcatcatca tcatcat 27

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 18
Ser Gly Gly His His His His His His
1 5

<210> 19
<211> 51
<212> DNA

[0014]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成的寡核苷酸

<400> 19

tccgggggcc atcatcatca tcatcatagc tccggagacg atgatgacaa g 51

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 20

Ser Gly Gly His His His His His Ser Ser Gly Asp Asp Asp Asp
1 5 10 15

Lys

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成肽

<400> 21

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

IFN β G162C-Ig 直接融合构建体开放阅读框

```

1  ATGCCTGGGAAGATGGTCGTGATCCCTTGGAGCCTCAAAATATACATTGGATAATGTTGCA 60
   M P G K M V I L G A S N I L W I M F A

61  GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAGAAGCAGCAATTTTCAG 120
   A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q

121  TGTCAAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGAGGGCTTGAATACTGCCCTCAAGGACAGGATG 180
   C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M

181  AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCA 240
   N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A

241  TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGC 300
   L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S

301  ACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAAACCTCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360
   T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I N

361  CATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAATACTGGAGAAAGAAGATTTCACCGGGGAAACTC 420
   H L K T V L E E K L E K E D F F R G K L

421  ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAGATATTATGGAGGATTCTTGCAATTACCTGAGGCCAAG 480
   M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K

```

图 1A

```

481 GAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAATCCTAAGGAACCTTTTACTTC 540
    E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F

541 ATTAACAGACTTACATGTGTACCTCCGAAACGTCGACAAACTCACACATGCCACCGTGC 600
    I N R L T C Y L R N V D K T H T C P P C

601 CCAGCACTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTCAAAACCAAGGAC 660
    P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D

661 ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAA 720
    T L M I S R T P E V T C V V D V S H E

721 GACCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA 780
    D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T

781 AAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTCTCCACCGTCTCTG 840
    K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L

841 CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAAGCCCTCCCA 900
    H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P

901 GCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGAGCCCGAGAACCCACAGGTGTAC 960
    A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y

```

图 1B

961 ACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTC 1020
T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V

1021 AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCAGCCGGAGAAC 1080
K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N

1081 AACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG 1140
N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K

1141 CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT 1200
L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H

1201 GAGGCTCTGCACACCACTACCGCAGAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA 1257
E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K *

图 1C

IFN β G162C-Ig 融合G4S连接体构件体开放阅读框

```

1  ATGCTTGGGAAGATGGTCGTGATCCTTTGGAGCCTCAATATACTTTGGATAATGTTTGA 60
   M P G K M V V I L G A S N I L W I M F A

61  GCTTCTCAAGCCATGAGCTACAACTTGCTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGCAATTTCAG 120
   A S Q A M S Y N L L G F L Q R S S N F Q

121  TGTCAAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG 180
   C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R M

181  AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCAGAAAGGAGGACGCCGCA 240
   N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A A

241  TTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAAGATTCTATCAGC 300
   L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S S

301  ACTGGCTGGAATGAGACTATGTGTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAAC 360
   T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I M

361  CATCTGAAGACAGTCTCTGGAAGAAAACCTGGAGAARGAAGATTTCACCAGGGGAAACTC 420
   H L K T V L E E K L E K E D F T R G K L

```

图 2A

```

421 ATGAGCAGTCTGCACCTGAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAG 480
    M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A K
481 GAGTACAGTCACTGTGCTTGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGAACTTTACTTC 540
    E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y F
541 ATTAACAGACTTACATGTTACCTCCGAAACGGCGGTGGTGCGAGCGTCGACAAACTCAC 600
    I N R L T C Y L R N G G G S V D K T H
601 ACATGCCCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTCTCTTCCCC 660
    T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P
661 CCAAAACCCAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAATGCGTGGTGGTG 720
    P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V
721 GACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG 780
    D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
781 CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCACGTACCGTGTGTGTCAGC 840
    H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
841 GTCCTCACCGTCTCGACCCAGGACTGGCTGAATGSCAAGGAGTACAGTCAAGGTCTCC 900
    V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
901 AACAAAGCCCTGCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCGAGCCCCGA 960
    N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R

```

图 2B

```

961 GAACCAAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTCAGC 1020
    E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S

1021 CTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT 1080
    L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N

1081 GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGTTGGACTCCGACGGCTCCTTC 1140
    G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F

1141 TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA 1200
    F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S

1201 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACCTACAGCAGAGAGCCCTCCCTGTCT 1260
    C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S

1261 CCCGGGAAATGA 1272
    P G K *

```

图 2C