

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
C12P 21/06



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/09 C12N 15/19
C12N 15/21 C07K 14/555
C07K 14/56 A61K 38/21

[21] 申请号 02819937.5

[43] 公开日 2005 年 1 月 19 日

[11] 公开号 CN 1568369A

[22] 申请日 2002. 8. 12 [21] 申请号 02819937. 5
[30] 优先权
[32] 2001. 8. 12 [33] US [31] 60/311,866
[86] 国际申请 PCT/US2002/025691 2002. 8. 12
[87] 国际公布 WO2003/016472 英 2003. 2. 27
[85] 进入国家阶段日期 2004. 4. 8
[71] 申请人 派普根公司
地址 美国加利福尼亚
[72] 发明人 L · H · 维拉雷特 J · 坎波斯
W · 李

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 程 伟

权利要求书 3 页 说明书 37 页 序列表 2 页
附图 13 页

[54] 发明名称 杂合的干扰素/干扰素 Tau 蛋白、组合物和使用方法

[57] 摘要

本发明涉及由干扰素 - α 蛋白组成的杂合干扰素融合蛋白, 其中干扰素 - α 蛋白的 C - 末端区被干扰素 - τ 的 C - 末端区置换。还描述了编码干扰素融合蛋白的核酸序列, 含这种序列的表达载体, 和干扰素融合蛋白的治疗应用。治疗应用包括抗病毒、抗细胞增殖和抗炎应用。本发明的干扰素融合多肽的一个优势是在用于治疗细胞时具有较低的细胞毒副作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白，包括：

干扰素蛋白，其中所述干扰素蛋白的 C-末端区被干扰素- τ 的 C-
5 末端区置换，

其中，杂合蛋白相对于干扰素蛋白具有较低的细胞毒性。

2. 权利要求 1 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素蛋白是 I 型干
扰素蛋白。

3. 权利要求 2 中的杂合蛋白，其中所述的 I 型干扰素蛋白是干扰
10 素- α 。

4. 权利要求 3 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素- α 蛋白是人干扰
素- α 。

5. 权利要求 4 中的杂合蛋白，其中所述的人干扰素- α 是人干扰素
- α D。

15 6. 权利要求 1 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素蛋白中大约 0-30 个
氨基酸之间的 C-末端被置换。

7. 权利要求 6 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素蛋白中大约 0-10 个
氨基酸之间的 C-末端被置换。

20 8. 权利要求 7 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素蛋白的最后 4 个氨
基酸的 C-末端被置换。

9. 权利要求 5 中的杂合蛋白，其中所述的所述人干扰素- α D 的 C-
末端区对应于跨度 163-166 残基的序列。

10. 权利要求 1 中的杂合蛋白，其中所述的干扰素- τ 的 C-末端区对
应于跨度干扰素- τ 163-172 残基的序列。

11. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的干扰素蛋白是人干扰素- α D, 所述人干扰素- α D 的所述 C-末端区跨度 163-166 残基, 所述干扰素- τ 的 C-末端区对应于跨度干扰素- τ 163-172 残基的序列。

12. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的杂合蛋白相对于干扰素蛋白具有较低的细胞毒性。

13. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的杂合蛋白在 MDBK/VSV 抗病毒系统中具有至少大约 1×10^8 抗病毒单位/mg 的抗病毒活性。

14. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的 I 型干扰素是干扰素- β 。

15. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的干扰素- τ 是羊或牛干扰素- τ 。

16. 权利要求 1 中的杂合蛋白, 其中所述的杂合蛋白是长效的 (pegylated)。

17. 编码按照权利要求 1-16 中任一项的杂合蛋白的核酸分子。

18. 制造干扰素杂合蛋白的方法, 包括:

15 将按照权利要求 17 的核酸分子置于重组表达系统中;

影响核酸分子的表达以产生杂合蛋白; 和

回收杂合蛋白。

19. 权利要求 18 中的方法, 其中所述的重组表达系统包括 P. pastoris。

20. 一个药物组合物, 包括按照权利要求 1 的杂合蛋白, 和药学上可接受的载体。

21. 权利要求 20 中的组合物, 其中所述的组合物进一步含有病毒唑。

22. 一种在感染病毒的细胞中抑制病毒复制的方法，包括将细胞与按照权利要求 1 的杂合蛋白以有效抑制病毒在细胞内复制的剂量接触。

23. 一种抑制肿瘤细胞生长的方法，包括将细胞与按照权利要求 1 的杂合蛋白以有效抑制其生长的剂量接触。

5 24. 一种治疗患者自体免疫疾病的方法，包括以有效治疗该疾病的剂量给予患者按照权利要求 1 的杂合蛋白。

25. 一种治疗患者慢性炎症的方法，包括以有效治疗炎症的剂量给予患者按照权利要求 1 的杂合蛋白。

26. 一种治疗对干扰素有反应的疾病状态的方法，包括以有效治疗
10 该疾病状态的剂量给予患者按照权利要求 1 的杂合蛋白。

27. 权利要求 22-26 中的任何方法，其中所述的给药通过以下给药方法进行：口服、局部、吸入、经鼻和注射。

杂合的干扰素/干扰素 Tau 蛋白、组合物和使用方法

本申请要求享有在 2001 年 8 月 12 日提交的美国临时申请号
5 60/311,866 的优先权, 其在此合并为参考文献。

发明领域

本发明涉及由干扰素- τ 的 C-末端区和另一个干扰素的一个区组成的杂合干扰素蛋白。

参考文献

- 10 Akiyama, K. 等人(1993) 重组牛干扰素 $\alpha 1$ 控制小牛呼吸道疾病的临床试验. *J. Vet. Med. Sci.* 55:3, 449-452.
- Ausubel, F.M. 等人(1992) 见 现代分子生物学方法。
- Babiuk, L.A. (1987) 应用重组牛 α 干扰素减少由 1 型牛疱疹病毒引起的呼吸道疾病. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:5, 752-757.
- 15 Bacila 等人主编(1978) *酵母的生物化学和遗传学*.
- Balzarini, J, 等人, *Biochem. Biophys. Res. Common.* 178:563-569 (1991).
- Bartol, F.F. 等人, *Biol. Reprod.* 33:745-759 (1985).
- Bayne, M.L 等人, *Gene* 66:235-244 (1988).
- 20 Bazer, F.W. 和 Johnson, H.M., *Am. J. Reprod. Immunol.* 26:19-22 (1991).
- Bazer, F.W. 等人, PCT 出版物 WO/94/10313, 1994 年 5 月 11 日出版.
- Beames 等人, *Biotechniques* 11:378 (1991).
- Benvegna, L. 等人, *Cancer* 83:901-909 (1998).
- 25 Berenguer M. 等人. *Adv. Gastroenterol. Hepatol. Clin. Nutr.* 1:2-21 (1996).

- Bitter 等人(1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:5330-5334.
- Brake, A. J. 等人(1984)成熟的外源蛋白在酿酒酵母中 α -因子引导的合成和分泌. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:4642-4646.
- Breitling, R 等人(1989)由链激酶信号引导的人干扰素 α 基因在大肠杆菌和枯草杆菌中的分泌性表达. Mol. Gen. Genet. 217:2-3, 384-91.
- 5 Brierley, R. A. (1998) 重组人胰岛素-样生长因子 1(IGF-1)的分泌. Methods Mol. Biol. 103, 149-177.
- Brocca, S. 等人(1998)编码主要工业脂酶的 *rugos* 念珠菌 *lip1* 基因的设计、总合成和功能性过度表达. Protein Sci. 7, 1415-1422.
- 10 Cereghino, J. L 和 Cregg, J. M. (2000) 杂合蛋白在甲基营养型酵母 *Pichia pastoris* 中的表达. FEMS Microbiology Reviews 24, 45-66.
- Charlier, M. 等人, Mol. Cell Enotechnol. 76:161-171 (1991).
- Cheng 等人(1997)通过 IFN- α 1 和中药制剂治疗 B 型肝炎肝纤维化的临床研究. Chung Kuo Chung Hsi I Chieh Ho Tsa Chih 17:8, 453-455.
- 15 Choo, Q. -L 等人. Science 244, 359-362 (1989).
- Choo, Q. -L. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 2451-2455 (1991).
- Clarke, B. E., Baillieres Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 14:293-305 (2000).
- 20 Cohen 等人(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078.
- Cotler, S. J. 等人, J. Viral Hepatitis 7:211-217 (2000).
- Crawford-Miksza, L. 和 David Schnurr, D. (1994) 表征腺病毒的定量比色微量中和法试验, J. Clinical Microbiology 32(9):2331-2334.
- Cregg, J. M. 和 Madden, K. R. (1989) 使用位点特异的重组以再生可选择的标记物. Mol. Gen. Genet. 219, 320-323.
- 25 Cregg, J. M. 和 Russell, K. A. (1998) 转化方法. Mol. Biol. 103, 27-39.
- Cregg, J. M. 等人(1985) *Pichia pastoris* 作为转化的宿主系统. Mol. Cell. Biol. 5, 3376-3385.

- Cregg, J.M. 等人(1988)开发甲基营养型酵母, *Pichia pastoris*, 作为生产外源蛋白的宿主系统. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 33-41.
- Cregg, J.M. 等人(1989)来自酵母 *Pichia pastoris* 的两个醇氧化酶基因的功能特性. *Mol. Cell. Biol.* 5, 111-1121.
- 5 Cregg, J.M. 等人(1993)在 *Pichia pastoris* 中表达外源基因的新近进展. *Bio/Technology* 11:905-910.
- Clare, J.J. 等人(1991)在酵母中生产小鼠表皮生长因子: 采用含多基因拷贝的 *Pichia pastoris* 株高水平地分泌. *Gene* 105, 205-212.
- Cross, J.C. 和 Roberts, R.M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
10 86:3817-3821 (1991).
- Dayhoff 等人(1978)见 蛋白序列和结构图谱集(Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).
- De Maeyer, E. 等人(1982)化学合成的人 $\alpha 1$ 干扰素基因的表达. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:14, 4256-4259.
- 15 Deutscher, (1990) *Methods in Enz.* 182.
- Di Bisceglie, A.M. 等人, *Hepatology* 16:649-654 (1992).
- Dieperink, E. 等人, *Am. J. Psychiatry* 157-876 (2000).
- Ecker, D.J. 等人, *J. Biol. Chem.* 264:7715-7719 (1989).
- Elliott 等人(1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7080-7084
- 20 Ellis, S.B. 等人(1985)从酵母 *Pichia pastoris* 中分离醇氧化酶和两个甲醇可调节的其它基因. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1316-1323.
- Feher, Z. 等人, *Curr. Genet.* 16:461 (1989).
- Fernandez H. 等人, *Eur. J. Epidemiol.* 2:1-14 (1986),
- Godkin, J.D. 等人, *J. Reprod. Fertil.* 65:141-150 (1982).
- 25 Gnatek, G.G. 等人, *Biol. Reprod.* 41:655-664 (1989).
- Henikoff 等人(1981) *Nature* 283:835.
- Higgins, D.R. 等人(1998)以直接多拷贝选择基于药物抗性显性的小表达载体. *Methods Mol. Biol.* 103, 41-53.

- Hitzeman, R.A. 等人, 美国专利 4,775,622 号, 于 1988 年 10 月 4 日发布.
- Helmer, S.D. 等人, *J. Reprod. Fert.* 79:83-91 (1987).
- Hollenberg 等人(1981) *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96:119.
- 5 Horiike N. 等人, *C. Oncol. Rep.* 5:1171 -1174 (1998).
- Houglum, *Clin. Pharm.* 2:20-28 (1983).
- Imakawa, K. 等人, *Nature* 330:377-379 (1987).
- Imakawa, K. 等人, *Mol. Endocrinol.* 3:127 (1989).
- Jarpe, M.A. 等人, *Protein Engineering* 7:863-867 (1994).
- 10 Jimenez-Saenz, M. 等人, *J. Gastroenterology and Hepatology* 15:567-569 (2000).
- Jin, X.Y. (1992) rHulFN α -1 治疗单纯疱疹病毒角膜炎的临床研究. *Chung Hua Yen Ko Tsa Chin* 28:3, 134-137.
- Julius 等人(1983) *Cell* 32:839-852
- 15 Klemann, S.W. 等人, *Nuc. Acids Res.* 18:6724 (1990).
- Koskinas J. 等人., *J. Med. Virol.* 45:29-34 (1995).
- Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492.
- Kunkel 等人(1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382.
- Lechner, F. 等人. *J. Exp. Med.* 191: 1499-1512 (2000).
- 20 Liu, H. 等人(1992) *Pichia pastoris* 过氧化物酶体缺陷突变体的有效筛选. *J. Bacteriol.* 174, 4943-4951.
- Liu, H. 等人(1995) *PER3*, *Pichia pastoris* 中过氧化物酶体生物发生所需的基因, 编码涉及蛋白输入的过氧化物酶膜蛋白. *J. Biol. Chem.* 270, 10940-10951.
- 25 Ludwig, D.L, 等人, *Gene* 132:33 (1993).
- Magrin, S. 等人, *Hepatology* 19, 273-279 (1994).
- Maniatis, T. 等人, 见 分子克隆: 实验室手册, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982).

- Martal, J. 等人, *J. Reprod. Fertil.* 56:63-73 (1979).
- Martin, E.W., 见 药物配制: 制剂和药学产品配制实用手册 (Mack Publishing Co., Easton, PA), 1976.
- Mercereau-Puigalon 等人(1980) *Gene* 11:163.
- 5 Mullis, K.B., 美国专利 4,683,202 号, 1987 年 7 月 28 日发布.
- Mullis, K.B. 等人, 美国专利 4,683,195 号, 1987 年 7 月 28 日发布.
- Noisakran, S. 和 Carr, D.J.J. (2000) 编码 IFN- α 1 的质粒 DNA 经 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞抗 1 型单纯疱疹病毒性眼感染. *Journal of Immunology* 164(12):6435-43.
- 10 Noisakran, S. 等人(1999) 编码 IFN- α 1 的 DNA 在角膜中的异常表达防护小鼠患 1 型单纯疱疹病毒引起的脑炎. *J Immunology* 162(7):4184-90.
- Oeda, K. 等人, 美国专利 4,766,068 号, 1988 年 8 月 23 日发布.
- Ott, T.L, 等人, *J. IFN Res.* 11: 357-364 (1991).
- 15 Panthier 等人(1980) *Curr. Genet.* 2:109.
- Pawlotsky, J-M. 等人., *J. Interferon and Cytokine Res.* 15:857-862 (1995).
- Pearson, W.R. 和 Lipman, D.J., *PNAS* 85:2444-2448 (1988).
- Pearson, W.R., *Methods in Enzymology* 183:63-98 (1990).
- 20 Pontzer C.H. 等人(1995) 干扰素测定. *Meth. Neurosci.* 24:3-9.
- Raemaekers, R.J.M. 等人(1999) *Pichia pastoris* 中表达的功能性植物凝集素(PHA)和雪花凝集素(GNA): 正确的 N-末端加工和采用 PHA-E 信号肽分泌表达的异源蛋白. *Eur. J. Biochem.* 65, 394-403.
- Reilly, P.R. 等人. 杆状病毒表达载体: 实验室手册, 1992.
- 25 Riesenber, D. 等人(1990) 表达人干扰素 α 1 的重组大肠杆菌的高细胞密度发酵. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:1, 77-82.
- Roberts, R.M. 等人, *Endocrin. Rev.* 13:432-452 (1992).
- Rose and Harrison, 主编(1987) 酵母(第二版).
- Rutter, W.J. 等人, 美国专利 4,769,238 号, 1988 年 9 月 6 日发布.

- Saito, H. 等人, *J. Viral Hepatitis* 7:64-74 (2000).
- Sambrook, J. 等人(1989) 分子克隆: 实验室手册. Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scopes, (1982) 蛋白纯化: 原理和实践. Springer-Verlag, New York.
- 5 Sears, I. B. 等人(1998) 结构和调节基因在 *Pichia pastoris* 中表达的多用载体系列. *Yeast* 14, 783-790.
- Shaw, K. J. 等人, *DNA* 7:117 (1988).
- Shen, L. P. 等人, *Sci. Sin.* , 29:856 (1986).
- Shen, S. 等人. (1998) 控制外源基因在酵母 *Pichia pastoris* 中表达的
- 10 强氮源调节的启动子. *Gene* 216, 93-102.
- Shepherd, 等人(1998) 双剂量水平的干扰素 α 和叠氮胸苷治疗人免疫缺陷病毒感染伴随的卡波济氏肉瘤的前瞻性随机化试验: 加拿大 HIV 临床试验 Network 研究. *J. Clin. Oncol.* 16:5, 1736-1742.
- Shindo, M. 等人, *Hepatology* 9:715-719 (1989)
- 15 Singh 等人(1983) *Nucleic Acids Res.* 11:4049-4063
- Singh, A. 等人(1984) 在酵母中合成、分泌和加工 α -因子干扰素融合蛋白. *Nucleic Acids Res.* 12:23, 8927-8938.
- Smith 等人(1985) *Science* 229:1219-1229.
- Skinner 等人主编(1980) *酵母的生物学和活性* (Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No. 9).
- 20 Stewart, H. J. 等人, *Mol. Endocrinol.* 2:65 (1989).
- Strathern 等人主编(1981) 酵母菌属酵母的分子生物学.
- Thill, G. P. 等人(1990) 多拷贝整合的表达载体对 *Pichia pastoris* 中蛋白表达的正性和负性作用. 见: 第六届国际微生物遗传学讨论会论文集 (Heslot, H. 等人编辑), 第 2 卷, 477-490 页. Societe Francaise de
- 25 Microbiologie, Paris.
- Trepo, C., *J. Viral Hepatitis* 7:250-257 (2000).
- Tyring, 等人, 干扰素: 原理和医学应用, 第 1 版, VI11 节, 399-408 页, 1992.

- Tschopp, J. F. 等人(1987). *Pichia pastoris* 中来自两个甲醇调节的启动子的 LacZ 基因表达. *Nucleic Acids Res.* 15, 3859-3876.
- Vallet, J. L, 等人, *Biol. Reprod.* 37:1307 (1987).
- Van Heeke, G. 等人(1996) 绵羊妊娠识别激素干扰素- τ 在 *Pichia pastoris* 中的高产量表达和分泌. *J. Interferon and Cytokine Res.* 16:119-126.
- Walker 和 Gaastra 主编(1983), 分子生物学技术 (MacMillan Publishing Company, New York).
- Walter, M. R. 等人(1998) 在发现干扰素 40 周年之际回顾重组 α 干扰素分子特征的新近进展. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* 13:3, 143-154.
- Waterham, H. R. 等人(1996). *Pichia pastoris* PER6 基因产物是过氧化物酶体生物发生必要的过氧化物酶的整合膜蛋白, 与 Zeilweger 综合症蛋白 PAF-1 具有序列相似性. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2527-2536.
- 15 Waterham, H. R., 等人(1997) *Pichia pastohs* 甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶基因的分离和调节及其启动子的使用. *Gene* 186, 37-44.
- Whaley, A. E., 等人, *J. Biol. Chem.* 269:10864-10868 (1994).
- White, C. E., 等人(1995) 小片段血栓调节素的大规模表达、纯化和定性: 第六功能区和蛋氨酸 388 的作用. *Protein Eng.* 8, 1177-1187.
- 20 Wu. D. A., 等人. *DNA* 10 :201 (1991).

背景技术

- 干扰素 (IFNs) 是对多种细胞类型的生长和功能具有多效性作用的一族结构和功能相关的蛋白。自从 1957 年发现其作为抗病毒剂以来, IFNs 已显示具有多种有力的免疫调节作用, 包括自然杀伤细胞活性调节和主要组织相容性抗原表达的调节, 以及抗恶性细胞的抗增殖活性 (Walter 等人, 1998).
- 25

IFN 的主要类型是 IFN- α 、- β 、- τ 和- ω , 它们也叫做 I 型 (酸稳定的), IFN- γ 被命名为 II 型 (酸不稳定的)。下面的表 1 总结了主要

类型 IFNs 的情况。

表 1
干扰素概观

方面	I 型	I 型	I 型	II 型
类型	α & ω	β	τ	γ
产自:	白细胞	成纤维细胞	滋养层细胞	淋巴细胞
抗病毒	+	+	+	+
抗增殖	+	+	+	+
妊娠信号	-	-	+	-

5 现在已知蛋白的 IFN-α 家族由至少 14 个基因组成，包括一个假基因和两个编码相同蛋白的基因。因此，由 14 个基因产生有 12 种单独的 IFN α 蛋白。各种 IFN-α 亚型在氨基酸序列水平具有大约 80%的同一性。

干扰素 α-1(IFN α 1)，也通称干扰素 α-D(IFN α D)，是被广泛研究和有临床兴趣的 I 型干扰素。新近的报告显示了重组 IFN α D 在人和
10 动物中治疗各种病毒性疾病的有效性(Noisakran 和 Carr, 2000; Noisakran 等人, 1999)。出于对人 IFN α D 的临床和研究目的，已开发和使用了不同的表达系统。

重组人 IFN α D(rHuIFN α D)的表达在 1982 年描述为 *马德普制剂甲基营养系统和大肠杆菌系统*，均使用 *lac* 启动子(De Maeyer, 1982)。
15 1984 年，Genentech 科学家报告了*酿酒酵母系统*，其中 IFN α D 基因与 α-因子 prepro 信号序列融合产生了具有相对低生物学活性的分泌的 IFN α D 蛋白(Singh, 1984)。几年后，1989 年，形成了采用链激酶异源表达-分泌信号在大肠杆菌和*枯草杆菌(B. subtilis)*中分泌性表达人干扰素基因(Breitling, 1989)。在这些研究中，只有 *B. subtilis* 系统
20 而非大肠杆菌系统能够分泌 rHuIFNαD 进入培养基。rHuIFN α D 在大肠杆菌中细胞内表达的显著改进报道于 1990 年，通过在发酵过程中使用限定成分的培养基以成批饲养的模式，使得以减少的特异性生长速率在大肠杆菌中更有效地表达蛋白。但是，在过去的 11 年中，人 IFN α D 的生产没有其他的显著改进。

25 第一个被鉴定的 IFN-τ 是绵羊 IFN-τ (OvIFN-τ)，为 18-19kDa 的

蛋白。在孕体(胚胎及周围的膜)匀浆中鉴定了几个异构体(Martal 等人, 1979)。随后, 释放进孕体培养基的低分子量蛋白被纯化并显示是热不稳定且对蛋白酶敏感的(Godkin 等人, 1982)。OvIFN- τ 最初被称为绵羊滋养层细胞蛋白-1(oTP-1), 因为它是主要的分泌性蛋白, 最初在羊母性识别的关键时期由羊孕体滋养外胚层产生。后来的实验确定, OvIFN- τ 是妊娠识别激素, 对于建立反刍动物如羊和牛的妊娠生理反应是必要的(Bazer 和 Johnson, 1991)。

用代表 N-末端氨基酸序列(Imakawa 等人, 1987)的合成寡核苷酸探测羊胚胎库获得了 IFN- τ cDNA, 其预测的氨基酸序列与人、小鼠、大鼠和猪的 IFN- α 45-55%同源, 与牛 IFN- α 11 70%同源, 现称作 IFN- Ω 。已经报道, 几个 cDNA 序列可表现不同的异构体(Stewart 等人, 1989; Klemann 等人, 1990; 和 Charlier, M. 等人, 1991)。所有均大约 1kb, 具有 585 个碱基的开放阅读框, 编码 23 个氨基酸的引导序列和 172 个氨基酸的成熟蛋白。预测的 IFN- τ 结构为与氨基和羧基末端并列的 4 个螺旋状束, 进一步支持其分类为 I 型 IFN(Jarpe 等人, 1994)。

虽然 IFN- τ 显示许多典型地 I 型 IFNs 相关的活性(见上面的表 1), 但其与其它 I 型 IFNs 之间存在相当大的不同。最突出的不同是其在妊娠中的作用, 详见上。还不同的是病毒诱导作用。所有 I 型 IFNs, 除 IFN- τ 外, 都容易地被病毒和 dsRNA 诱导(Roberts 等人, 1992)。诱导的 IFN- α 和 IFN- β 表达是短暂的, 持续大约数小时。相反, IFN- τ 的合成, 一旦诱导则维持几天(Godkin 等人, 1982)。以每个细胞为基础, IFN- τ 比其它 I 型 IFNs 多产生 300 倍以上(Cross 和 Roberts, 1991)。

其它不同可存在于 IFN- τ 基因的调控区。例如, 用牛 IFN- τ 基因转染人滋养层细胞细胞系 JAR 引起抗病毒活性而用牛 IFN- Ω 基因转染则不能。这暗示有独特的处理因子涉及 IFN- τ 的基因表达。与此一致的观察是, 虽然 IFN- τ 与 IFN- α 和 IFN- β 的近端启动子区(从 126 至转录起始位点)高度同源; 但-126 至-450 区不同源并仅增强 IFN- τ 的表达(Cross 和 Roberts, 1991)。因此, 与其它 I 型 IFNs 相比, IFN- τ 的表达显示有不同的调控因子参与。

IFN- τ 的表达在种属之间也可以不同。例如, 尽管 IFN- τ 的表达在反刍动物限于孕体发育的特定阶段(主要在 13-21 天)(Godkin 等人,

1982), 但初步研究提示, 人型 IFN- τ 在整个妊娠过程中结构性表达 (Whaley 等人, 1994)。

显著地, 干扰素类的效用被其毒性所限。在癌症和病毒性疾病的治疗中应用干扰素类引起了严重的副作用。IFN- α 在美国于 1991 年、在日本于 1992 年被引入慢性 C 型肝炎的治疗 (Saito 等人, 2000)。但是, 应用足以产生临床功效的 IFN- α 剂量 (即, 大约 1×10^6 单位/治疗剂量及以上) 通常伴有“流感样”综合症, 其特征为发热、头痛、无力、关节痛和肌痛 (Tyring 等人, 1992)。在 $5-10 \times 10^6$ 单位/治疗剂量及以上时, 更经常出现其它毒性如恶心、呕吐、腹泻和食欲减退。也有报道伴随 IFN- α 的治疗有神经精神症状 (Dieperink 等人, 2000)。此外, 一些研究提示, IFN- α 的治疗功效不是剂量依赖的 (Saito 等人, 2000), 在肿瘤或病毒性肝炎患者中用 IFN- α 治疗与自体免疫紊乱的形成和恶化相关 (Jimenez-Saenz 等人, 2000)。

因此, 需要一种具有高抗病毒活性和低细胞毒性的干扰素蛋白。本发明意图满足这些需求。

发明概述

因此, 在一个方面, 本发明的目的是提供干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白, 包括其 C-末端区被干扰素- τ 的 C-末端区置换的干扰素蛋白。在一个实施例中, 本发明提供了非- τ 干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白, 即包括非- τ 干扰素蛋白, 其中所述非- τ 干扰素蛋白的 C-末端区被干扰素- τ 的 C-末端区置换。在另一个实施例中, 干扰素蛋白是 I 型干扰素蛋白。I 型干扰素蛋白可以是干扰素- α 。优选地, 干扰素- α 是人干扰素- α 。在一个实施例中, 人干扰素- α 是人干扰素- α D。而在另一个实施例中, 干扰素蛋白是干扰素- β 。

在一个实施例中, 杂合蛋白能够显示相对于天然干扰素较低的毒性, 如干扰素- α 的检测, 包括在含有至少 2000 抗病毒单位/ml 杂合体的培养基中孵育第一个 PBMCs 样本 7 天; 在具有相同抗病毒单位/ml 天然 IFN- α 的培养基中孵育第二个 PBMCs 样本 7 天; 比较第一和第二个样本中残存的活细胞百分比, 由此较高百分比的活细胞预示着培养基中 IFN 种类的相对较低毒性。

在本发明的一个实施例中，干扰素蛋白没有任何 C-末端区的置换，而是干扰素- τ 的 C-末端区加在全长干扰素蛋白上。因此，干扰素蛋白可能有 0 个氨基酸的 C-末端被置换。在另一个实施例中，干扰素蛋白中大约 1-30 个氨基酸之间的 C-末端被置换。而在另一个实施例中，干扰素蛋白中大约 1-10 个氨基酸之间的 C-末端被置换。优选地，干扰素蛋白的最后 4 个氨基酸的 C-末端被置换。在相关的实施例中，人干扰素- α D 的 C-末端区对应于跨度 163-166 残基的序列。

在一个实施例中，杂合蛋白包括干扰素- τ 的 C-末端区，对应于干扰素- τ 的跨度 163-172 残基的序列。优选地，干扰素蛋白是人干扰素- α D，人干扰素- α D 的 C-末端区跨度残基 163-166，及干扰素- τ 的 C-末端区对应于跨度干扰素- τ 163-172 残基的序列。

在一个实施例中，杂合蛋白相对于干扰素或非- τ 干扰素蛋白的细胞毒性低。在另一个实施例中，杂合蛋白相对于干扰素或非- τ 干扰素蛋白具有增加的抗病毒活性。在相关的实施例中，杂合蛋白在 MDBK/VSV 抗病毒系统中具有至少大约 1×10^8 抗病毒单位/mg 的抗病毒活性。在另一个相关的实施例中，杂合蛋白在 MDBK/VSV 抗病毒系统中具有至少大约 2×10^8 抗病毒单位/mg 的抗病毒活性。

本发明设想干扰素- τ 蛋白是反刍动物干扰素- τ 。在一个实施例中，干扰素- τ 是绵羊或牛干扰素- τ 。本发明还设想上述的任何杂合蛋白可以是长效的 (pegylated)。

在另一个方面，本发明包括编码上述任何杂合蛋白的核酸分子。而在另一个方面，本发明包括制造干扰素杂合蛋白的方法。实施本方法中涉及的步骤包括将上述的任何核酸分子置入重组表达系统中；影响核酸分子的表达以产生杂合蛋白；回收杂合蛋白。在一个实施例中，重组表达系统包括 *P. pastoris*。

而在另一个方面，本发明包括药物组合物，含有如上所述制备的杂合蛋白，以及药学可接受的载体。组合物还可含有病毒唑。

在一个方面，本发明还包括在感染病毒的细胞中抑制病毒复制的方法。该方法包括将细胞与可有效抑制病毒在细胞内复制的剂量的杂合蛋白接触。

还设想了抑制肿瘤细胞生长的方法。该方法包括使肿瘤细胞与有效

抑制其生长的剂量的杂合蛋白接触。

本发明的另一个方面包括治疗患者自体免疫疾病的方法。该方法包括以有效治疗该疾病的剂量给予患者任何如上所述制备的杂合蛋白。

而发明的另一个方面包括治疗患者慢性炎症的方法。该方法包括以
5 有效治疗炎症的剂量给予患者任何如上所述制备的杂合蛋白。

还在发明的另一个方面，包括治疗对干扰素有反应的疾病状态的方法。该方法包括以有效治疗该疾病状态的剂量给予患者任何如上所述制备的杂合蛋白。

在上述任何方法中，可以通过以下给药方法进行给药：口服、局部、
10 吸入、经鼻和注射。

本发明的这些和其它目的和特征在结合附图阅读以下的发明详述时会更充分地理解。

附图的简要描述

图 1 显示用于产生 HVV 片段 1 的寡核苷酸序列和最终连接产物；
15 图 2 显示用于产生 HVV 片段 2 的寡核苷酸序列和最终连接产物；
图 3 显示用于产生 HVV 片段 3 的寡核苷酸序列和最终连接产物；
图 4 显示用于产生 HVV 片段 4 的寡核苷酸序列和最终连接产物；
图 5A-5C 显示 HVV-pPICZ- α 构建物的序列和选择的限制性位点；
图 6A-6B 显示了已选择的 HVV 蛋白资料；

20 图 7 是用 1%甲醇诱导 72 小时后 *P. pastoris* HVV 重组体培养上清的 SDS-PAGE 凝胶；

图 8 是显示来自 *P. pastoris* 上清的 HVV 蛋白部分纯化的 SDS-PAGE 凝胶。

图 9 图示流式细胞仪分析的 PBMC 细胞特异性细胞死亡的百分比。

25 图 10 显示了已选择的干扰素蛋白的氨基酸序列排列。

发明的详细描述

I. 定义

除非另有说明，这里所用的所有技术和科学术语具有与本发明领域技术人员所用相同的含意。从业者特别地关注于 Sambrook 等人，1989，和 Ausubel FM 等人，1993，中本领域的定义和术语。应当理解，此发明不限于所描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些是可变化的。

5 为了描述和公开可能与本发明联合使用的组合物和方法学，所有这里引用的出版物和专利均特别地在此合并为参考文献。

“杂合”核酸构建物或序列含有的一部分序列是表达其的细胞非固有的。就调控序列而言，杂合是指调控序列(即启动子或增强子)对其目前调节的相同基因的表达在天然情况下没有调节作用。通常，杂合核酸序列不是它们存在的细胞内源的或基因组的一部分，并通过感染、转染、
10 微注射、电穿孔或类似方法被加入细胞中。“杂合”核酸构建物可包含调控序列/DNA 编码序列组合，与天然细胞中发现的调控序列/DNA 编码序列组合相同或不同。

如这里所用的，术语“载体”是指为在不同宿主细胞间传递而设计的核酸构建物。“表达载体”是指能够在异源细胞中掺入和表达异源 DNA 片段的载体。许多原核的和真核的表达载体可从商业渠道获得。适合表达载体的选择在本领域技术人员的知识范围内。

如这里所用的，“表达基因盒”或“表达载体”是由一系列可在靶细胞或体外转录特定核酸的特定性核酸元件重组地或合成地产生的核酸构建物。重组表达基因盒可被插入质粒、染色体、线粒体 DNA、质体 DNA、
20 病毒或核酸片段中。典型地，在其它序列中，表达载体的重组表达基因盒部分包括要转录的核酸序列和启动子。

如这里所用的，术语“质粒”是指用作克隆载体的双链(ds)环状 DNA 构建物，它在许多细菌和某些真核细胞中形成染色体外的自我-复制遗传元件。
25

如这里所用的，术语“编码可选择标记物的核苷酸序列”是指能够在宿主细胞中表达的核苷酸序列，其中可选择标记物的表达赋予含表达基因的细胞在有相应选择剂的情况下生长的能力。

如这里所用的，术语“启动子”和“转录起始子”指作用于引导下游基因转录的核酸序列。启动子通常将适合于要表达靶基因的宿主细胞。启动子与其它转录和翻译调节核酸序列(也称作“调控序列”)一起对于指
30

定基因的表达是必要的。大体上，转录和翻译调控序列包括但不限于，启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列，以及增强子或活化子序列。

“嵌合基因”或“异源核酸构建物”，如这里所定义，是指可由不同基因部分，包括调控元件组成的非天然基因(即，已被导入宿主的)。转化宿主细胞的嵌合基因构建物典型地由与异源蛋白编码序列可操作连接的转录调控区(启动子)组成，或在可选择标记物的嵌合基因中可操作地与可选择标记物基因相连，该基因编码的蛋白为转化的宿主细胞赋予抗生素抗性。本发明典型的转化进宿主细胞的嵌合基因包括结构性或可诱导的转录调控区，蛋白编码序列和终止子序列。如果需要分泌靶蛋白，嵌合基因构建物还可包括编码信号肽的第二个 DNA 序列。

当核酸被置于与另一个核酸序列功能相关时，即是“可操作地连接”。例如，如果多肽以参与多肽分泌的前蛋白被表达，那么编码分泌性引导子的 DNA 可操作地与多肽 DNA 相连；如果启动子或增强子影响序列的转录，那么它们可操作地与编码序列相连；或如果为促进翻译安置核糖体结合位点，那么它可操作地与编码序列相连。一般地，“可操作地连接”是指要连接的 DNA 序列是相邻的，就分泌性引导子来说是相邻和在阅读相内。但增强子不一定是相邻的。通过在方便的限制性位点连接完成结合。如果不存在这种位点，按常规惯例使用合成的寡核苷酸接合器或连接子。

如这里所用的，术语“基因”是指与产生多肽链相关的 DNA 片段，它可包括或不包括编码区前和后的区域，如 5' 非翻译区(5' UTR)或“引导子”序列和 3' UTR 或“拖尾”序列，以及在单个编码片段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

如这里所用的，就细胞或载体而言，“重组”包括通过导入异源核酸序列而被修饰，或来自如此修饰的细胞。因此，例如，重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞中没有发现相同形式的基因，或另外地作为人为干预的结果，天然基因异常表达、表达不足或完全不表达。

术语“导入”在将核酸序列插入细胞的情况下，是指“转染”或“转化”或“转导”，包括涉及将核酸序列插入真核或原核的细胞，其中核酸序列可插入细胞基因组(例如染色体、质粒、质体或线粒体 DNA)，转换成自

发复制子，或短暂地表达(例如转染的 mRNA)。

如这里所用的，术语“表达”是指根据基因的核酸序列产生多肽的过程。该过程包括转录和翻译。

术语“信号序列”是指蛋白 N-末端部分的氨基酸序列，它促进成熟型蛋白分泌出细胞。成熟型的细胞外蛋白缺少信号序列，后者是在分泌过程中分裂开的。

术语“宿主细胞”是指含有载体并支持表达构建物复制、和/或转录或转录和翻译(表达)的细胞。用于本发明的宿主细胞可以是原核细胞如大肠杆菌，或真核细胞如酵母、植物、昆虫、两栖动物或哺乳动物细胞。

如这里所用的，术语“活性”和“生物学活性”是指与特定靶蛋白相关的生物学活性，如酶活性。因而断定，指定蛋白的生物学活性是指被本领域技术人员典型地归因于该蛋白的任何生物学活性。

“C 型肝炎病毒或 HCV”是指一些病毒种属，其致病型导致非 A 非 B 型肝炎(NANBH)，以及指从那里来源的减毒型或有缺陷的干扰颗粒。HCV 基因组由 RNA 组成。含 RNA 的病毒类具有相当高的自发突变率，据报道每个插入的核苷酸在 10^{-3} 至 10^{-4} 的数量级。由于基因型异质性和流动性是 RNA 病毒固有的，在 HCV 种属中有多个类型/亚型，它们可以是有病毒性或无病毒性的。各种 HCV 类型或游离体的繁殖、鉴定、检测和分离记录在文献中。

“治疗”病症是指给予治疗物质有效地减少病症的症状和/或减轻病症的严重性。

“口服”是指涉及通过口腔给药或直接胃或肠内给药包括胃用药的任何途径。

“OAS 水平”是指血液中 2', 5'-寡腺苷酸合成酶(OAS)蛋白的浓度或活性。

“酵母”意指产子囊酵母类(内孢霉目)，担子孢子属酵母和属于不完全菌纲(芽孢纲)的酵母。产子囊酵母被分成两个家族，Spermothoraceae 和 Saccharomycetaceae。后者由 4 个亚家族组成，裂殖酵母菌(如，裂殖酵母菌属)、Nadsonioideae、Lipomycoideae 和 Saccharomycoideae (如毕赤属，克鲁维酵母属和酵母菌属)。担子孢子属酵母包括白冬孢酵母属、红冬孢酵母属、Sporidiobolus、丝状担子

属和线状黑粉菌属。属于不完全菌纲的酵母分成两个家族，Sporobolomycetacea(如，孢子全霉菌属，布勒掷孢酵母属)和隐球菌科(如念珠菌属)。本发明特别感兴趣的是以下种属：毕赤属，克鲁维酵母属，酵母菌属，裂殖酵母菌属和念珠菌属。特别感兴趣的是毕赤属 *P. pastoris*。由于酵母的分类在将来可能改变，对此发明来说，酵母应当限定为 Skinner 等人所描述。除前述以外，本领域普通技术人员估计对酵母生物学和酵母遗传学操作是熟悉的。见例如 Bacila 等人，Rose 和 Harrison; Strathern 等人，在此合并为参考文献。

本发明的核苷酸序列当可操作地与酵母启动子连接时，可用于在酵母宿主细胞中产生有生物学活性的成熟目的异源蛋白。以此方式，编码本发明的杂合前体多肽的核苷酸序列在导入进酵母宿主细胞的表达基因盒中提供。这些表达基因盒将包含与编码杂合前体多肽的核苷酸序列相连的转录起始区。这种表达基因盒提供了多个限制位点以插入需要调控区转录调节的核苷酸序列。表达基因盒可另外含有可选择的标记物基因。

克隆或表达载体可含有另外的组成部分，例如，表达载体可有两个复制系统，因而使它可以在两个生物体中操作，例如在人或昆虫细胞中表达和在原核宿主中克隆和扩增。

克隆和表达载体均含有核酸序列，使载体能够在一个或多个选择的宿主细胞中复制。此外，为整合表达载体，表达载体含有至少一个与宿主细胞基因组同源的序列，优选地两个与表达构建物侧面相接的同源序列。整合载体可通过选择适合的同源序列含入载体来定向于宿主细胞的特定位置。整合载体的构建为本领域熟知。

克隆和表达载体典型地将含有可选择的标记物。典型的可选择标记物基因编码的蛋白可以(a)赋予对抗生素或其它毒素的抗性，例如氨比西林、新霉素、甲氨喋呤、zeocin 或四环素，(b)补足营养缺陷的不足，或(c)提供不能从复合培养基中获得的关键营养素，例如，编码细菌 D-丙氨酸消旋酶的基因。

"IFN- τ "是指干扰素蛋白家族任何之一，与美国专利 5,939,286 显示的 IFN- τ 序列具有超过 70%，或优选地超过大约 80%，或更优选地超过大约 90%，以及更优选地超过大约 95%的氨基酸同源性，该专利特别

地在此整体合并为参考文献, 或与图 10 给出的 IFN- τ 和绵羊 IFN- τ 序列同源。氨基酸同源性可以采用例如 ALIGN 程序, 用默认参数测定。此程序见于 FASTA 1.7 版序列比较程序组 (Pearson 和 Lipman, 1988; Pearson, 1990; 程序可获取自 William R. Pearson, Department of
5 Biological Chemistry, Box 440, Jordan Hall, Charlottesville, VA)。

“IFN- α ”是指包括图 10 所示的 IFN- α D 氨基酸序列的干扰素蛋白家族任何之一, 以及指具有氨基酸取代和改变的蛋白, 如不显著影响蛋白活性的中性氨基酸取代。优选地, 该序列包括图 10 的 IFN- α D 序列和具有与其超过大约 70%, 或优选地超过大约 80%, 或更优选地超过大约
10 约 90%, 以及更优选地超过大约 95%氨基酸序列同源性的蛋白。同源性可以采用例如 ALIGN 程序, 用默认参数如上所述测定。

如这里所用的, 术语“IFN 表达”是指上述 IFN 基因的转录和翻译, 其产物包括前体 RNA、mRNA、多肽、翻译后加工的多肽及其衍生物。根据实例, IFN 表达的检测包括标准的细胞病变保护试验。Western 和
15 Northern 印迹分析及逆转录酶聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测 IFN mRNA。

如这里所用的, 术语“IFN 的生物学活性”和“生物学上有活性的 IFN”指与 IFN 或任何片段、IFN 衍生物或类似物相关的任何生物学活性, 如酶活性, 特别地包括可以采用标准的细胞病变保护试验检测的抗病毒活性。

如这里所用的, 术语“修饰”形式, 相对于 IFN 相关蛋白是指天然蛋白的衍生物或变异体。即, “修饰”形式的蛋白具有含至少一个氨基酸取代、删除或插入的衍生多肽序列, 其中氨基酸取代是特别优选的。氨基酸取代、插入或删除可出现在多肽序列中的任何残基上, 它干扰蛋白的生物学活性。因此, 编码变异体或衍生蛋白的相应核酸序列被认为
20 是“变异的”或“修饰”形式的基因或编码序列, 并包括在本发明的范围内。

“变异体”意指通过以下方法从天然多肽衍生的多肽: 通过在天然蛋白的 N-末端和/或 C-末端删除(所谓的截断)或添加一个或多个氨基酸; 在天然多肽的一个或多个位点上删除或添加一个或多个氨基酸; 或在天然多肽的一个或多个位点上取代一个或多个氨基酸。这种变异体可起因于例如遗传多态性, 或由于人工操纵。这种操纵的方法通常为本领域已
30

知。

例如，多肽的氨基酸序列变异体可以通过任何杂合 IFNs 的编码克隆 DNA 序列的突变而制备。诱变和核苷酸序列改造的方法是本领域熟知的。见例如，Walker 和 Gastra, 主编(1983); Kunkel(1985); Kunkel
5 等人. (1987); 和 Sambrook 等人(1989)。关于不影响目的蛋白生物学活性的适合氨基酸取代的指导可见于 Dayhoff 等人(1978)的模型，在此合并为参考文献。可以优选保守性取代，如用另一个具有相似特性的氨基酸交换一个氨基酸。保守性取代的实例包括但不限于，Gly<=>Ala, Val<=>Ile<=>Leu, Asp<=>Glu, Lys<=>Arg, Asn<=>Gln, 和
10 Phe<=>Trp<=>Tyr。

在构建杂合 IFN 的变异体时，可以进行修饰使变异体继续具有所需的活性。明显地，对编码变异体蛋白的 DNA 所做的任何突变不必置序列于阅读框外，优选地将不产生能够引起二级 mRNA 结构的互补区。

因此，本发明的蛋白包括杂合 IFN/IFN-T 蛋白及其变异体。这些变
15 异体将实质上与天然蛋白同源，在功能上与天然蛋白相当。当天然蛋白变异体的氨基酸序列与天然蛋白的氨基酸序列至少大约 80%、更优选地至少大约 90%、最优选地至少大约 95%相同时，它们是“实质上同源”的。变异体可少至 1、2、3 或 4 个氨基酸不同。“功能上相当”意指变异体序列限定的链产生与天然 IFN 具有实质上相同的生物学活性的蛋白。这种
20 含有实质上序列变化的功能上相当的变异体也包含在本发明中。因此，杂合 IFN 蛋白的功能上相当的变异体具有的生物学活性将足以作为治疗应用。“治疗应用”意指在获得治疗目标上是有效的，例如防护 1 型单纯疱疹病毒引起的脑炎。

测定功能等效的方法在本领域可以得到。生物学活性可以采用为检测
25 测 IFN 蛋白活性而特别设计的试验测定，包括本发明描述的试验和美国专利 No. 6, 204, 022 描述的试验，在此特别地整体合并为参考文献。另外，产生的抗具有生物学活性的天然蛋白的抗体可因其与功能相当变异体的结合能力而被检测，有效的结合表示该蛋白具有的构造与天然蛋白相似。

30 II. 杂合干扰素融合蛋白

本发明对由 IFN- τ 的 C-末端区引起的毒性降低进行了一些观察，以支持嵌合 DNA 构建物，该构建物用来产生具有来自 IFN- τ 的 C-末端部分和来自非- τ 干扰素 I 型多肽的 N-末端的杂合干扰素融合蛋白。这样的非- τ 干扰素 I 型多肽的实例包括 IFN- β 和各种亚型的 IFN- α 。

5 根据图 10，这样的杂合干扰素融合蛋白或多肽 HW，由嵌合的核酸分子编码或通过天然的化学连接反应产生，它具有的 N-末端包括 IFN- α D 的氨基酸 1 位至氨基酸 163 位，C-末端包括 IFN- τ 的氨基酸 163 位至氨基酸 172 位。N-末端片段含有非- τ 干扰素多肽的 N-末端氨基酸序列，它由嵌合核酸分子的 5' 端片段编码。C-末端片段含有 IFN- τ 多肽的 C-末端氨基酸序列，它由嵌合核酸分子的 3' 端片段编码。

使用 IFN- τ (163-172) 内或延伸其外的更长或更短的区域所对应的肽或编码肽的 DNA 序列，结合在此描述的功能试验，如在实例 5 中描述的抗病毒实验，和在实例 6 中描述的毒性实验，通过上述的方法可鉴定最佳的连接或氨基酸残基位置，在其上游，序列与非- τ 干扰素对应，
15 在其下游，对应于 IFN- τ 。要考虑的，例如含有人 IFN- α D 的氨基酸 1-166 和 IFN- τ 的 10 个最后 C-末端氨基酸的本发明杂合或嵌合干扰素具有与干扰素 τ 有关的低毒性，以及与 IFN- α 有关的生物学活性或通常被认为是 IFN- α 的生物学活性。例如，IFN- α / IFN- τ 杂合体可降低 IFN- α 的毒性，但不干扰，或甚至增加 IFN- α 的抗病毒特性。

20 本发明优选的实施方案是一些融合蛋白，其中 N-末端片段来自人 IFN- α D，C-末端片段来自羊 IFN- τ 。其他合适的 IFN 序列可从 GenBank 或其他公共序列库中获得。

如在上面所指出的，要考虑的本发明杂合干扰素融合蛋白组合物的一个很重要优点是天然非- τ I 型干扰素有关的成分的毒性降低了，例如该成分已经被批准为治疗药物。杂合的组合物具有与已批准的非- τ I 型 IFN 相同的生物学活性，具有降低的 IFN- τ 细胞毒性。

III. 杂合干扰素蛋白的产生

在一个方面，发明包括一种产生非- τ 干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白的方法。已经发现当 *P. pastoris* 表达宿主被含有正确核酸分子序列的载体转化时，可能产生大量相对纯的和功能活性的非- τ 干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白。下面所考虑的是实施本发明的步骤。

在本发明中可使用的序列，方法和组合物可见美国专利第 5,958,402，1999 年 9 月 28 日发布；5,942,223，1999 年 8 月 24 日发布；5,738,845，1998 年 4 月 14 日发布；5,939,286，1999 年 8 月 17 日发布；6,204,022，2001 年 3 月 20 日发布；5,906,816，1999 年 5 月 25 日发布；6,060,450，2000 年 5 月 9 日发布；和 6,372,206，2003 年 5 月 16 日发布；每一个在此整体合并为参考文献。在本发明中可使用的其他序列，方法和组合物可见审查中的美国专利申请号第 09/910,406，于 2001 年 7 月 19 日归档；和 10/137,127，2002 年 5 月 日归档，每一个在此整体合并为参考文献。

10 A. P. pastoris 宿主细胞

选择表达非 τ 干扰素/干扰素- τ 杂合蛋白的宿主将优选酵母。用于本发明方法中的酵母包括在毕赤酵母属内。特别感兴趣的是毕赤酵母属 *P. pastoris*。 *P. pastoris* 株的一个实例是 X-33。

P. pastoris 能够通过诱导产生乙醇氧化酶代谢甲醇，因为它是其唯一碳源(Cregg, 1993)。大多数 *P. pastoris* 表达株具有一种或多个营养缺陷型的突变株，可在转化中允许选择含有合适可筛选标记物基因的表达载体。在转化前，这些菌株生长在复合培养基中，但在限制性培养基中生长需要添加合适的营养物。本发明的 *P. pastoris* 株包括那些以野生型(Mut⁺)的速率生长在甲醇中的菌株，也包括那些根据利用甲醇的能力而变化的菌株，因为缺失了一个或两个 AOX 基因。也可考虑的是蛋白酶缺陷的菌株，它可有效的减少外源蛋白的降解(Brierley, 1998; 和 W 等人, 1995)。

为实施本发明选择合适的酵母和其他微生物宿主包含在本领域专业技术人员范围内。当选择表达的酵母宿主时，合适的宿主尤其包括那些显示良好的分泌能力，较低的蛋白分解活性，和良好活力的菌株。酵母和其他微生物一般可从许多来源获得，包括 Yeast Genetic Stock Center, 生物物理学和医学物理学系，加利福尼亚大学 (Berkeley, CA); American Type Culture Collection (Manassas, VA); Northern Regional Research Laboratories (Peoria, IL); 和供应商如 Invitrogen (San Diego, CA)。

30 B. 酵母表达载体

用于本发明的表达载体含有 achimeric 基因(或表达基因盒), 设计在酵母中操作, 在表达基因盒的上游和下游有伴随序列。伴随序列可以是质粒或病毒来源的, 可对载体提供必须的特性, 使载体能够将 DNA 从细菌转移至所需的酵母宿主中。合适的转化载体如下所述。表达质粒的合适成分, 包括转录和翻译起始密码子, 信号序列, 杂合 IFN 的编码序列, 和合适的转录和翻译终止密码子也在下面讨论。一个实例构建物是在图 5A-5C 中显示的 pPICZ α -HVV 质粒序列。

i. 转录& 翻译起始密码子

本发明的核苷酸序列当可操作地连接于酵母启动子时, 可用于在酵母宿主细胞中产生生物学活性的成熟的目的异源蛋白。以这种方式, 提供了编码发明的杂合前体多肽的核苷酸序列以表达基因盒的方式导入进酵母宿主细胞中。这些表达基因盒含有与编码杂合前体多肽连接的转录起始区。这样一种表达基因盒提供了多个限制性位点以在调控区的转录调控下插入核苷酸序列。

转录起始区, 酵母启动子提供了 RNA 聚合酶的结合位点以启动编码序列的下游(3')翻译。启动子可以是结构性或诱导性启动子, 可以特殊酵母宿主天然的或类似的或外源性的或异源性的。另外, 启动子可以是天然的序列或可选择性的是合成序列。关于外源意指在被导入了转录起始区的目的天然酵母中未发现转录起始区。

合适的天然酵母启动子包括但不限于, 野生型 α 因子启动子, 在下面详述, 以及其他酵母启动子。优选启动子选自下面所列的, 包括 *P. pastoris* 甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (*GAP*), 甲醛脱氢酶 (*FLD1*), 过氧化酶基质蛋白 (*PEX8*), 和编码 *YPT1* 启动子的 GTP 酶。更优选的启动子是乙醇氧化酶 AOX1 启动子。

a. AOX1 启动子

尽管毕赤编码两个乙醇氧化酶基因 *AOX1* 和 *AOX2*, *AOX1* 基因对于酵母细胞中大多数乙醇氧化酶活性是很重要的 (Tschopp 等人, 1987; Ellis 等人, 1985; 和 Cregg 等人, 1989)。AOX1 基因的表达严格地受 AOX1 启动子转录的水平控制。在甲醇中生长的细胞中, 约 5% poly(A)⁺RNA 来自 *AOX1*; 但在生长在大多数其他碳源中的细胞中, 无法检测到 *AOX1* 的信息 (Cregg 等人, 1988)。

AOX1 基因的调控似乎涉及两个机制：抑制/脱抑制机制以及诱导机制，类似于酿酒酵母 *GAL1* 基因的调节。不象 *GAL1* 的调节，缺少抑制的碳源，如培养基中的葡萄糖，不能引起 AOX1 的实际转录。甲醇的存在对诱导高水平转录是很必要的 (Tschopp 等人, 1987)。

5 b. GAP 启动子

Northern 和报告子活化的结果均表明 *P. pastoris* GAP 基因启动子可在葡萄糖中提供很强的结构性表达，其水平可与 AOX1 启动子所观察到的相比 (Waterham 等人, 1997)。在甘油和甲醇生长细胞中 GAP 启动子活性水平大约分别为葡萄糖中所观察到的水平的三分之二和三分之一。使用 GAP 启动子的优势是对于诱导甲醇是不需要的，在从一种碳源至另一种的培养变换中也是不需要的，使菌株的生长更为顺利。但因为 GAP 启动子是结构性表达的，可能不是产生对酵母有毒性的蛋白的很好的选择。

15 c. FLD1 启动子

FLD1 基因编码谷胱甘肽依赖的甲醛脱氢酶，它是某些甲基化胺作为氮源和甲醇作为碳源的代谢所需的关键酶 (Shen 等人, 1998)。*FLD1* 启动子的诱导可以甲醇作为单一碳源 (和硫酸铵作为氮源) 或甲胺作为单一氮源 (和葡萄糖作为碳源)。用甲醇或甲胺诱导后，*P_{FLD1}* 能够表达 β -内酰胺酶报告子基因的水平类似于 AOX1 启动子用甲醇诱导后获得的水平。*FLD1* 启动子使用甲醇或甲胺，一种便宜的非毒性氮源，对诱导高水平的表达提供了一定的灵活性。

20 d. PEX8 和 YPT1 启动子

对于一些 *P. pastoris* 株，AOX1, GAP, 和 *FLD1* 启动子可以是非常强的，可以非常高的水平表达基因。有证据表明，对某些外源基因，来自 P_{AOX1} 的高水平表达可超过细胞的翻译后加工，导致显著比例的外源蛋白未被折叠，未被加工或未被定位 (Thill 等人, 1990; Brierley, 1998)。对于这些和其他的应用，需要适度表达的启动子。对于这种目标，可使用 *P. pastoris* PEX8 和 YPT1 启动子。PEX8 基因编码过氧化物酶生物合成过程中很重要的过氧化物酶基质蛋白 (Liu 等人, 1995)。它以很低但非常明显的水平在葡萄糖中表达，并当细胞转移至甲醇中时被适度诱导。YPT1 基因编码参与分泌的 GTP 酶，其启动子可提供在含有葡萄糖，或甲醇或甘露醇作为碳源的培养基中较低但基本水平的表达 (Sears 等

人, 1998)。

e. 可选择的启动子

含有可提供诱导性表达的一种酵母启动子的上游激活物序列和另一种酵母启动子的转录活化区的合成杂合启动子也可在酵母宿主中作为功能性启动子。

酵母识别启动子也可包括天然非酵母启动子, 它与酵母 RNA 聚合酶结合, 并启动编码序列的翻译。这样的启动子在本领域中是可以获得的。见, 如 Cohen 等人(1980); Mercereau-Puigalon 等人(1980); Panthier 等人(1980); Henikoff 等人(1981); 和 Hollenberg 等人(1981), 每一篇文献在此合并为参考文献。

ii. 信号序列和引导序列

除了编码目的蛋白, 表达基因盒的嵌合基因可编码信号肽, 后者适当时可加工和易位杂合的 IFN 蛋白。

为了本发明的目的, 信号肽是一种前体序列, 它是一种酵母分泌蛋白成熟形式的前体多肽的 N 末端序列。当编码杂合前体多肽的核苷酸序列在被转化的酵母宿主细胞中表达时, 信号肽序列的功能是含有成熟异源目的蛋白的杂合前体多肽进入内质网(ER)中。移动进入内质网腔内代表进入了酵母宿主细胞的分泌通路的起始步骤。发明的信号肽可以是酵母宿主细胞异源的或天然的。发明的信号肽序列可以是已知的天然信号序列或如上所述的不反向影响信号肽功能的其任何变异体。

在进入 ER 的过程中, 信号肽在加工的位点被切断为前体多肽。加工的位点含有在体内可被酵母蛋白水解酶识别的任何肽序列。这种加工位点可以是信号肽的天然加工位点。更优选的是, 天然加工位点可被修饰, 或加工位点可以是合成来源的, 以便称为优选的加工位点。就所要获得的“优选的加工位点”而言, 在体内被酵母蛋白水解酶切断的加工位点较天然位点更为有效。优选的加工位点的实例包括但不限于二元肽, 特别是两种碱性残基 Lys 和 Arg 的任何组合, 即 Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Lys, 或 Arg-Arg, 更优选 Lys-Arg。这些位点可被 *P. pastoris* KEX2 基因编码的肽链内切酶切断(Julius 等人(1983))。其结果是 KEX2 肽链内切酶将在肽序列内部切断获得成熟的目的异源蛋白, 可使用其他优选的加工位点, 这样目的肽序列仍然是完整的(见如 Sambrook 等人

(1989))。

功能性信号肽序列对异源蛋白从酵母细胞的细胞外分泌是非常重要的。另外，杂合的前体多肽可含有酵母分泌蛋白的分泌前导肽序列以进一步加速这种分泌过程。当存在时，前导肽一般立即定位在信号肽序列加工位点的 3'。就要获得的“分泌前导肽序列”而言，可引导前体多肽移动的肽，对于本发明的目的来说，是含有要被分泌的成熟异源蛋白的杂合前体多肽，从 ER 移动至高尔基体，从那里在移动至分泌小泡中，使其经过细胞膜分泌至细胞壁区域中和/或生长培养基中。前导肽序列对酵母宿主细胞来说可以是天然的或异源的。

10 本发明的前导肽序列可以是可作为信号肽序列来源的同一酵母分泌蛋白的天然序列，不同的酵母分泌蛋白的天然序列，或合成的序列，或不反向影响前导肽功能的任何其变异体。

a. 酿酒酵母 α -因子 prepro 肽

为了本发明的目的，当存在时，前导肽序列优选来自可作为信号肽序列来源的同一酵母分泌蛋白，更优选是来自 α 因子蛋白。大量编码前体 α -因子蛋白的基因已经被克隆，其组合的信号-前导肽序列也已被鉴定。见，例如 Singh 等人(1983)。 α -因子信号-前导肽序列已经被用来在酵母中表达异源蛋白。见，例如 Elliott 等人(1983)；Bitter 等人(1984)；和 Smith 等人(1985)。

20 α -因子，大约长度为 11 个残基的杂交了信息素的寡肽，可从更大的前体多肽中产生，其长度为大约 100 和 200 个残基之间，更典型是大约 120-160 个残基。这种前体(pre)多肽含有信号序列，大约 19-23 (更典型地 20-22 个残基)，前导序列(pro)，大约 60-66 个残基，典型地是成熟的信息素序列的 2-6 个串联重复区。尽管可使用信号肽序列和全长的 α 因子前导肽序列，发明也可考虑缩短的 α 因子前导肽序列，当两种元件均存在于杂合前体分子中时可与信号肽一起使用。

这种信号序列的加工涉及三个步骤。第一个步骤是通过内质网中的信号肽酶去掉 pre 信号。第二步，Kex2 肽链内切酶在 pro 前导序列的 Arg-Lys 之间切断。如果存在，则通过 Ste13 蛋白迅速切断 Glu-Ala 重复区(Brake 等人，1984)。

30 当本发明的杂合前体多肽序列含有前导肽序列时，如 α 因子前导

序列，就有一个与前导肽序列的 3' 末端紧紧相邻的加工位点。当存在目的成熟异源蛋白时，这个加工位点可使酵母宿主细胞固有的蛋白水解酶从其天然 N 末端前肽序列的 5' 末端，或从成熟的异源杂合 IFN 的肽序列 5' 末端切掉酵母分泌前导肽序列。加工位点可含有在体内可被酵母蛋白水解酶识别的任何肽序列，这样目的成熟异源蛋白可被正确地加工。这个加工位点的肽序列可以是前导肽序列天然加工位点的天然肽序列。更优选的，天然加工序列可被修饰，或加工位点可通过合成获得，以便称为如上所述的优选加工位点。

b. 可选择的信号序列

10 适合的信号序列也包括 *P. pastoris* 酸性磷酸酶 (PHO 1) 和来自植物凝集素菜豆凝集素的 PHA-E (Cereghino 和 Cregg, 2000; 和 Raemaekers 等人, 1999)。另外，信号序列可以通过合成获得，或采用本领域已有的杂交探针技术从基因组或 cDNA 文库中确定 (见 Sambrook 等人, (1989))。

15 根据上面所述的发明，酵母信号肽和分泌前导肽序列代表了发明的杂合前体多肽的一些部分，这些部分可引导成熟的异源 IFN α D 的序列通过酵母宿主细胞的分泌通路。

iii. 杂合 IFN 肽编码序列

20 杂合 IFN 编码序列的实例在表 2 - HVV 中显示。编码序列的起始点在实例 1 中讨论，在图 1-4 中说明。

合适时，编码杂合 IFN 肽的核苷酸序列和任何其他的目的核苷酸序列可被优化以增加在转化酵母中的表达。即，为提高表达这些序列可采用酵母优选的密码子合成核苷酸序列。本领域中有许多适合合成酵母优选的核苷酸目的序列的方法 (见，如美国专利第 5,219,759 和 25 5,602,034，在此整体合并为参考文献)。

其他的序列修饰已知可在酵母宿主中增强核苷酸编码序列的表达。这些包括消除编码假多腺苷酸化信号，外显子-内含子剪接位点信号，转座子样重复区的序列和其他类似特性的对基因表达不利的序列。序列的 G-C 含量可被调整至特定细胞宿主的平均水平，可根据宿主细胞中表达的已知基因的参照来计算。可能时，核苷酸编码序列可被修饰以避免 30 预计形成的发夹二级 mRNA 结构。

iv. 转录和翻译终止子

表达基因盒的终止调控区可以是转录起始区所固有的，或来自其他来源，如果它可被酵母宿主识别。终止区可以是天然 α 因子转录终止序列的，或是另一个酵母识别终止序列的，如上面提到的酶的区域。可选择转录终止区，特别是为了 mRNA 的稳定性，以增强表达。

优选转录终止子是 Mat- α (α -因子) 转录终止子。更优选的转录终止序列是如图 1 所示的 *AOX1* 转录终止区。

v. 可选择的标记物

可选择的标记物包括来自 *P. pastoris* 或 *S. cerevisiae* 的生物合成通路基因 *HIS4*，来自 *S. cerevisiae* 的 *ARG4*，和来自 *Streptoalloteichus hindustanus* 的 *Sh ble* 基因，可赋予对博来霉素相关药物 Zeocin 的抗性 (Cregg 等人, 1985; Cregg 和 Madden, 1989; 和 Higgins 等人, 1998)。最近开发的一系列生物合成标记物包括 *P. pastoris* *ADE1* (PR-氨基咪唑琥珀酰咪唑羧酰胺合成酶)，*ARG4* (精氨酰琥珀酸盐裂解酶)，和 *URA3* (乳清酸核苷 5'-磷酸脱羧酶) 基因。

vi. 构建转化载体

对于异源杂合 IFN 蛋白的情况，在杂合前体多肽中存在的每种其他元件可以是已知的天然多肽序列或可通过合成获得，包括如在此所述的不反向影响元件功能的任何其变异体。就“反向影响”而言，是指相对于含有元件天然形式的杂合前体多肽，含有元件变异体形式可导致分泌的目的成熟异源蛋白的生物活性降低。

在制备表达基因盒的过程中，可操作多个核苷酸序列片段，以便以正确的方向，适当时，在正确的可读框架内提供序列。为了这个目标，可使用接头或连接子来连接核苷酸片段或其他操作，涉及提供方便的限制性位点，去掉多余的核苷酸，去掉限制性位点，或类似操作。为此目的，可涉及体外诱变，引物修复，限制，复性，再取代，如转换和颠换。特别地参见 Sambrook 等人 (1989)。

本发明的表达基因盒可被连接进复制子中 (如，质粒，粘粒，病毒，微小染色体)，因此形成了能在体内自我 DNA 复制的表达载体。优选的复制子是质粒。这样的质粒可在一套或多套复制系统中保留，优选两套复制系统，可使原核细胞宿主中获得稳定的生存以进行克隆，在酵母宿

主细胞中整合以进行表达。

另外，质粒表达载体可以很高或很低的质粒拷贝数目被整合。含有多个已整合拷贝的表达基因盒的菌株有时可较单一拷贝菌株产生更多的异源蛋白(Clare 等人, 1991)。

5 B. 转化酵母细胞

酵母细胞用上述的表达构建物转化，使用多种标准的技术包括但不限于，电穿孔，微粒轰击，原生质球生产法，或整细胞的方法，如涉及氯化锂和聚乙二醇的方法(Cregg 等人, 1985; Liu 等人, 1992; Waterham 等人, 1996; 和 Cregg 和 Russell, 1998)。

10 C. 培养和获得分泌的杂合 IFN 蛋白

转化株生长在合适的培养基中，适当时，可在选择的压力下维持生长以保证保留内源 DNA。当表达是诱导性的时候，酵母宿主生长产生高密度的细胞，然后诱导表达。实例的杂合 IFN 蛋白，HVV 的重组产生在实例 2 中描述。HVV 的部分纯化在实例 3 中描述。

15 本发明的一个重要的方面，已经发现转化的 *P. pastoris* 能够表达和分泌杂合的 IFN 蛋白，它的特异活性如在实例 4 中所公开的在大约 2.75×10^8 U/mg 至大约 3×10^8 U/mg 之间。特异活性的测定可通过本领域专业技术人员已知的抗病毒试验来进行。抗病毒试验的实例在实例 5 中进行描述。另一个抗病毒试验的描述见 Pontzer 和 Johnson, 1985,
20 在此整体合并为参考文献。

25 D. 分离分泌的人 IFN α D

作为毕赤 *pastoris* 中的一种分泌蛋白，表达 rHuIFN α D 的主要优势之一是毕赤酵母分泌至培养基中的污染天然蛋白的水平非常低。组合使用具有很低蛋白含量的最小限制毕赤酵母培养基，可引起有生物学活
25 性的 rHuIFN α D 有效地分泌，它构成了培养基中总蛋白的绝大部分。

实质上，这种分泌表达系统的真正特性仅可使蛋白分泌至培养基中，作为纯化过程中的第一步。这样形成了直接和简单的步骤以进一步使用如分子筛和离子交换色谱，电泳，透析，溶剂-溶剂提取，和类似方法进行纯化。这种方法在本领域中是已知的，其描述例如见 Deutscher,
30 1990 和 Scopes, 1982。

如在实例 3 中所述，经过一轮分子筛色谱实质上可消除高分子量的

污染蛋白，留下非常纯的杂合 IFN（图 8），具有非常高的抗病毒活性。

IV. 应用

本发明的杂合 IFN 蛋白发现可用于治疗多种癌症和病毒疾病包括以前其他干扰素显示有活性的那些疾病。见，例如美国专利第 4, 885, 166, 4, 975, 276, 和 5, 939, 286，每一篇在此都整体合并为参考文献。本发明考虑治疗的病毒疾病的一个实例是丙型肝炎病毒 (HCV)。

HCV 是一种主要的公共健康难题，影响全世界估计 1.7 亿人，以及一些国家超过 10% 的人群 (Lechner 等人，2000)。HCV 基本通过输注已感染的血液和血液制品而被传播 (Cuthbert, 等人，1994; Mansell 等人，1995)。疾病控制和预防中心估计在美国每年有 160,000 个急性肝炎新发病例是 HCV 引起的。因此，对有效的抗 HCV 药物仍存在着急迫的医疗需求。

HCV 是一种黄病毒家族的正义链，脂质包被的 RNA 病毒，长度大约为 10000 个核苷酸 (Choo 等人，1989)。不象乙型肝炎病毒，HCV 没有 DNA 中间体，因此不能被整合进宿主基因组中 (Berenguer 等人，1996)。尽管 HCV 已经被克隆，氮病毒仍然很难在体外培养 (Trepo, 2000)。HCV 几乎是持久存在的，在被感染的个体中产生 85% 的慢性感染，尽管其持久性的机制还未知 (Trepo, 2000)。

治疗 HCV 主要着重于减少炎症和肝细胞损害，因此可防止肝硬变和肝细胞癌 (Horiike 等人，1998; Benvegnu 等人，1998)。目前对于 HCV 可使用的治疗方法仅对小部分已感染病人的亚群有效 (Magrin 等人，1994; Choo 等人，1991; Choo 等人，1989)。在美国 1991 年 IFN- α 被介绍用于慢性丙型肝炎的治疗，日本是在 1992 年 (Saito 等人，2000)。但如上所述，使用产生临床效应的足够剂量的 IFN- α (即，其量为大约 1×10^6 单位/治疗和上述的量) 通常与大量的严重副作用有关。

本发明杂合蛋白的更低的细胞毒性决定了它们可作为治疗如 HCV 的疾病的引人注目的候选者。

V. 药物组合物

本发明的杂合干扰素融合蛋白可根据已知的方法配制以制备可应用的药物组合物。含有干扰素或干扰素样化合物的剂型以前已经有所描述。通常，本发明组合物的配制是有效量的杂合干扰素与合适的载体组

合在一起以促进组合物的有效给药。

用于这些治疗中的组合物也可以各种形式。例如包括固体，半固体和液体剂量形式，如片剂，丸剂，粉末，液体溶液或悬液，脂质体，栓剂，可注射的和可输注的溶液。优选的形式依赖于所需要的给药和治疗应用模式。组合物也优选包括本领域专业技术人员已知的传统的药物学可接受的载体和佐剂。优选，发明的组合物可以单位剂量的形式，通常以一天一次或多次的方式给与病人。

杂合的干扰素融合多肽或相关多肽，可以任何药物学可接受的形式给与病人，如口服摄取，吸入，鼻内喷雾，静脉，肌肉，病灶内或皮下注射。特别的是，用于其他干扰素化合物的组合物和方法可用于输送这些化合物。

但本发明化合物的一个根本的优势是，发明的杂合 IFN 蛋白的极低的细胞毒性。因为其低的细胞毒性，可能使用杂合干扰素组合物的浓度要高于通常其他干扰素化合物所应用的浓度(如，IFN α)。因此，考虑本发明的杂合干扰素组合物给药的速度从大约 5×10^4 至 2×10^7 单位/天至大约 5×10^7 单位/天，或优选至大约 1×10^8 单位/天，或更为优选的至大约 1×10^{10} 单位/天。在另一个实施例中，本发明的杂合干扰素组合物使用的剂量为大约 5×10^{11} 单位/天，或优选大约 5×10^{12} 单位/天。

优选高剂量用于全身用药。当然，应该理解的是本发明的组合物和方法可与其他疗法组合应用，例如利巴韦林。

利巴韦林(1- β -D-呋喃核糖基-1, 2, 4-三唑-3-咪唑羧酰胺)是一种嘌呤核苷类似物，已经发现可干扰病毒 mRNA 的合成，并在体内和体外抑制很宽范围的 RNA 和 DNA 病毒的复制 (Fernandez 等人, 1986; Balzarini 等人, 1991)。利巴韦林已经显示可有效的使转氨酶水平正常化，但对慢性丙型肝炎病人中血清 HCV RNA 滴度的活性很小 (Di Bisceglie 等人, 1992)。但利巴韦林的有效作用是短暂的 (Clarke, 2000; Koskinas 等人, 1995)，并因为其严重的副作用，利巴韦林和 IFN- α 的联合应用是很难被耐受的 (Cotler 等人, 2000)。因此，利巴韦林和本发明的杂合 IFN 蛋白联合应用是优于利巴韦林和天然 IFN- α 的联合应用。

一旦病人的状态发生改善，如果需要可以给予维持剂量。然后，以症状为函数，剂量或给药的频率或两者都可减少至维持改善状态的水平。当症状缓解至所需的水平，治疗应该终止。但病人长时间内以任何疾病复发的症状为基础，需要间歇疗法。

5 从前面可以发现已满足了发明的多种目的和特点。

VI. 表 2

支持本发明所提供的序列

描述	SEQ ID NO.
<u>HVV 氨基酸序列</u> CDLPETHSLDNRRITLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGN QFQKAPAIISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLN DLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWE WRAEIMRSLSLSTNLQERLTKMGDLNSP	
<u>HW 核苷酸序列</u> TGTGATTTGCCAGAGACTCACTCTTTGGACAACAGAAGAACTTTGA TGCTTTTGGCCCAAATGTCTAGAATCTCTCCATCCTCTTGTTTGAT GGATAGACACGATTTTCGGTTTCCCACAAGAAGAATTTGACGGTAA CCAATTCCAAAAGGCTCCTGCTATTTCTGTTTTGCACGAGTTGATT CAACAAATTTTCAACTTGTTCACTTAAGGACTCTTCTGCTGCCT GGGACGAAGACTTGTTGGACAAGTTCTGTACTGAGCTTTACCAAC AATTGAACGACTTGAGGCTTGTGTTATGCAAGAGGAGAGAGTCG GTGAGACCCCATTGATGAACGCTGATTCCATCTTGGCTGTCAAGA AGTACTTCAGAAGAATTACCTTGACTTGACCGAAAAGAAGTACTC CCCATGTGCCTGGGAAGTCGTTAGAGCCGAAATCATGAGATCTTT	2

GTCCTTGTCCACTAACTTGCAAGAGAGACTTACCAAGATGGGTGG AGACTTGA ACTCTCCATAA	
---	--

VII. 实施例

下面的实施例进一步说明了在此所述的发明，并不以任何方式来限制本发明的范围。

5 实施例 1

HVV 克隆策略

HVV 分子是一种杂合分子，它含有 Hu1FN α D 分子，C 末端最后 4 个氨基酸被来自羊 IFN- τ 的 10 个 6C 末端氨基酸取代。得到的氨基酸编码序列用于产生相应的 DNA 编码序列，其密码子选择为在毕赤 *pastoris* 中表达已被优化。DNA 编码序列的构建可通过将寡核苷酸片段(长度大约为 150 个碱基对；图 1-4)连续克隆进称为 G2(Operon Technologies, Alameda, CA)的细菌载体中而被合成。4 个 150 个碱基对片段的每一个(HVV Fragments 1-4)都通过连接重叠合成的寡核苷酸(长度< 40 bp)而被创建，所述的寡核苷酸设计具有特殊限制性酶 5' 或 3' 悬突以简化克隆进载体的过程。

A. 克隆步骤 #1

要切割的载体： G2

用酶切断： XbaI 和 BamHI

连接的片段： 片段 1 (图 1)

新载体的名称: G2HV1 F1

B. 克隆步骤 #2

要切割的载体: G2HW1 F1

用酶切断: EcoRI 和 BamHI

5 连接的片段: 片段 2 (图 2)

新载体的名称: G2HV1 F2

C. 克隆步骤 #3

要切割的载体: G2HV1 F2

用酶切断: Sac I 和 BamHI

10 连接的片段: 片段 3 (图 3)

新载体的名称: G2HV1 F3

D. 克隆步骤#4

要切割的载体: G2HV1 F3

15 用酶切断: EcoRI 和 BamHI

连接的片段: 片段 4 (图 4)

新载体的名称: G2HV1 F4

E. 最终检查

用酶切断: Sac II

20 HVV 基因从 G2HV1 F4 载体中被切除, 并连接进入 pPICZ- α 载体 (Invitrogen, San Diego) 中, 使用质粒上的 XhoI 和 NotI 位点。HV1-pPICZ- α 构建物的序列在图 5A - 5 中描述。

实施例 2

P. pastoris 中重组产生 HV1

25 已选择的阳性 *P. pastoris* HV1 转化株在 BMGY 培养基中生长过夜, 然后细胞在 BMMY 含甲醇的培养基中被诱导, 使用的 OD₆₀₀ 为 2。培养物

使用 1ml 10%甲醇在诱导后 24 和 48 小时进行培养。培养 72 小时后，收获整个培养上清液，无菌过滤，通过 14%Tris-甘氨酸 SDS-PAGE 分析，用胶体金考马斯染色 (Novex, San Diego, CA)。来自 pPICZ α 对照质粒转化株的上清液用作阴性对照。结果在图 7 中显示，表明克隆 HVV-6 可产生最强的 HVV 表达。

实施例 3

HVV 的纯化

图 8 举例说明了从 *P. pastoris* 上清液中部分纯化 HVV 蛋白。培养上清液 (20 ml 体积) 用 10mM Tris, 150 mM NaCl 缓冲交换，并在负载至 aHiPrep Sephacryl 26/60 S-100 尺寸分离柱之前浓缩至终体积 2ml (Pre-fraction)。以 1ml/min 的速度收集在注射标本后的第一个 120 ml 流出物，称为馏分 1。收集 3 个馏分，每个 20ml，分别称为馏分 2, 3 和 4。馏分 2, 3 和 4 被浓缩至 1，并在 14%SDS-PAGE 凝胶上泳动，用 Novex 胶体金兰染色试剂盒染色。

实施例 4

HVV 抗病毒特异活性

HVV 蛋白如实施例 3 所述，从 HVV 克隆 16 (图 7) *P. pastoris* 重组培养上清液中使用尺寸分离凝胶色谱部分纯化。来自 4 个不同的纯化试验中的馏分 3 (图 8) (标本 ID: S-0018; S-0019; S-0063; 和 S-0064) 每个都浓缩至 1 ml，如下面实施例 5 所述测定每个标本的总蛋白浓度和抗病毒活性。结果在下面的表 3 中显示。

表 3

HVV-16 抗病毒特异活性

标本 ID	蛋白浓度 (MG/ML)	抗病毒单位 (AVU/ML)	抗病毒特异活 性 (AVU/MG)	均 数 AVU/MG $\pm$ S TD (N)

S-0018	0.751	2.22×10^8	2.96×10^8	$2.86 \times 10^8 \pm 0.09$ (N=4)
S-0019	0.696	1.92×10^8	2.76×10^8	
S-0063	1.102	3.11×10^8	2.82×10^8	
S-0064	1.422	4.10×10^8	2.88×10^8	

实施例 5

定量抗病毒试验

Madin Darby 牛肾 (MDBK) 细胞在 96 孔变平底培养板中使用添加了 10% 胎牛血清 (FBS) 和抗生素的 Eagle' s MEM 生长至汇合。一旦细胞汇合，测定的培养基是添加了 2% FBS 和抗生素的 Eagle' s MEM。VSV 的激

5 发病毒制剂预先对数连续稀释液中进行检测以测定最佳的工作稀释度，在单独孵育病毒过夜后 (即 16-24 小时) 对汇合的 MDBK 细胞得到 100% CPE。VSV 稀释度的范围是从 10^{-1} 至 10^{-6} 每 50 μ l/孔，每个稀释度使用 4 个重复的孔，在 96 孔板中的最终总体积为 200 μ l/孔。根据可建立

10 100% CPE 的病毒的稀释度，测定 TCID₅₀。现在，使用的种病毒具有 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml。在测定中使用的感染病毒颗粒的实际数字是 $10^{3.5}$ TCID₅₀/孔。

为了检测干扰素，在去掉生长培养基之前，MDBK 细胞生长至汇合，细胞用无菌 PBS 冲洗一次。然后加入作为对照的含有干扰素或没有干扰素标本的培养基三份，使用上述的试验培养基以 100 μ l/孔，使用连续 10

15 倍的稀释液 (如 10^{-1} 至 10^{-10})。然后细胞在 37° C 孵育 18 小时。重组 HulFN α A (Biosource Intl., Camarillo, CA) 可用作标准的干扰素对照。干扰素孵育步骤后，在向每孔加入 100 μ l 预定的病毒稀释液 @ $10^{3.5}$ TCID₅₀/孔之前，细胞用 PBS 冲洗两次。向干扰素处理的检测孔和未处理的孔中加入病毒，并在 37° C 另外孵育 16-24 小时。然后从每孔中去到

20 100 μ l 培养基，用 100 μ l 0.2% 中性红溶液 (Gibco-BRL) 替代，在 37° C 孵育 1 小时。去掉所有培养基，在加入 100 μ l 酸性酒精 (50% 乙醇，1% 乙酸) 之前，轻轻用 PBS 冲洗 2 次。溶解染料的 A₅₅₀ 用 Bio-Kinetics 读数仪 (Bio-Tek Instruments, Winooski VT) 读数。采用下列的公式计算

25 保护的百分比：

$$\text{保护百分比} = \frac{[\text{AVG} (A_{550} \text{ 检测孔}) - \text{AVG} (A_{550} \text{ 病毒对照孔})]}{[\text{AVG} (A_{550} \text{ 未处理细胞对照孔})]} \times 100$$

1 个抗病毒单位(U)被定义为 50% 的保护。干扰素效价(单位/ml)将以代
5 表保护 50%细胞单层的稀释度(每 0.1 ml 标本)的倒数进行读数,乘以因
子 10。

一旦使用 10 倍稀释范围测定了干扰素的抗病毒单位/ml,这个数据
被用来测定试验中干扰素两倍稀释范围(最大 10 倍稀释)的起始稀释度。
这将使被检测的干扰素获得更准确的抗病毒单位/ml 值。注意这种比色
10 法是 Crawford-Miksza and (1994)发表的测定法的一种改进。

实施例 6

在外周血单核细胞中体外毒性测定中检测 IFN α 类似物

HuIFN α , OvIFN τ 和 IFN 杂合蛋白的体外毒性可采用外周血单核细
15 胞(PBMC)来比较。全血的浅黄色表层部分用 PBS 稀释 1:4,并覆盖在
Nycoprep 1.077 (Nycomed Pharma, Oslo, Norway)上。在 20° C 600 x
g 离心 20 分钟后,可在界面上形成带的,使用吸管去掉。然后细胞用
PBS 冲洗 1 次,以 5×10^5 细胞/孔的浓度接种在 96 孔板中。接种后,
细胞用 2000 U/ml 至 128,000 U/ml 的 IFN α , IFN τ 或 IFN 杂合蛋白处
20 理,重复三次。孵育 12 天后,细胞可准备使用 Annexin V 测定(Pharmingen)
进行检测。注意这些测定是常规在实验室中使用的,可给我们一致的,
可信的定量结果。

Annexin V 测定:

Annexin V 是一个 35-36 kD 的 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,与磷脂酰
25 丝氨酸(PS)具有很高的亲和性。在凋亡细胞中,细胞膜 PS 是从浆膜的
内侧转位至外侧小叶上。Annexin V 结合的细胞正在经历凋亡的早期,
其膜 PS 是暴露的。因此,用 Annexin V 结合一种活力染料,亚丙基染
色可鉴定早期的凋亡细胞。这种测定并不能区分已经经历凋亡的细胞和

坏死引起的已经死亡的细胞。

PBMC 从 3 个孔中收获，并如 Pharmingen 测定手册中所规定的制备进行 Annexin V 测定。与 Annexin V 检测试剂盒一起提供了所有细胞染色所需的试剂。获得染色的细胞，使用 Becton Dickinson FACScan 和 CellQuest 软件分析。重要的是要注意在 PBMC 群中有一定基础水平的凋亡(Annexin V 阳性，亚甲基阴性)和坏死(Annexin V 和亚甲基均阳性)，每个供体这种个水平有轻微的不同。因此，未处理的细胞群用来确定凋亡和死亡细胞的基础水平。每个标本的数据以特异细胞死亡百分比来表示(Annexin V⁺ 或亚甲基⁺)，使用下面的公式从获得的总共 10,000 细胞进行计算：

% 特异细胞死亡= $\frac{\text{未处理孔中\%AnnexinV}^+ \text{ 阳性细胞}}{\text{处理孔中的\%AnnexinV}^+ \text{ 阳性细胞}} \times 100$

(处理孔中的%AnnexinV 阳性细胞)

*注意：当根据亚甲基染色计算%特异细胞死亡时，用亚甲基的值来替代 Annexin V 值。

15 实施例 7

用 rHuIFN α 或 rHuIFN β 以 1.5×10^5 抗病毒 U/ml 孵育人 PBMC (5×10^5 /孔)12 天。然后用 AnnexinV-FlTC 和亚甲基双重染色。特异细胞死亡百分比采用下列的公式进行计算：[(对照孔中%AV⁺ 或 PI⁺细胞) / (处理孔中%AV⁺ 或 PI⁺ 细胞) x 100]。

20 表 4

以 Annexin V 阳性细胞为基础的特异细胞死亡百分比

	HVV-16	rHuIFN α D (Biosource)	rHuIFN α D (Pepgen)	BSA 对照
AVG $\pm$ STD	12.88 $\pm$ 15.44	65.00 $\pm$ 22.49	45.46 $\pm$ 23.64	7.67 $\pm$ 14.57
MEDIAN	4.88	65.78	43.95	0.00
N	6	10	10	10

表 5

以亚丙基阳性细胞为基础的特异细胞死亡百分比

	HVV-16	rHulFN α D (Biosource)	rHulFN α D (Pepgen)	BSA 对照
AVG ±1STD	2.08 ±3.85	32.88 ±15.69	19.32 ±12.55	3.78 ±8.19
MEDIAN	0.56	34.59	15.27	0.00
N	6	10	9	10

实施例 8

通过流式细胞仪分析特殊细胞死亡的百分比

5 图 9 显示了通过流式细胞仪分析的特异细胞死亡百分比。用 rHulFNα 或 rolFNτ 以 1.5 x 10⁵ 抗病毒 U/ml 孵育人 PBMC (5 x10⁵/孔)9, 10 和 12 天, 然后用 AnnexinV-FITC 和亚甲基双重染色。使用下列公式计算特异细胞死亡百分比: [(对照孔中%AV+ 或 PI+细胞) / (未处理孔中%AV+ 或 PI+细胞) x 100]。圆柱和符号分别表示 Annexin V 和
10 亚甲基的计算值。

在此说明书中所提到的所有出版物和专利申请均代表了发明所属领域专业技术人员的水平。在此所有出版物和专利申请合并为参考文献, 其程度与每个单独的出版物或专利申请被特别地和个别地指明作为参考文献是相同的。

15 尽管本发明已经根据特殊的实施例进行了描述, 但本领域专业技术人员应该理解的, 各种改变和修饰是不背离本发明的精神的。

<110> 派普根公司

<120> 杂合的干扰素/干扰素 Tau 蛋白、组合物和使用方法

<130> 556008008W000

<140> Not Yet Assigned

<141> Filed Herewith

<150> US 60/311,866

<151> 2001-08-12

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 172

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合干扰素

<400> 1

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

115	120	125
Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val		
130	135	140
Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu		
145	150	155
Arg Leu Thr Lys Met Gly Gly Asp Leu Asn Ser Pro		160
165	170	

<210> 2

<211> 519

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 杂合干扰素

<400> 2

tgtgatttgc cagagactca ctctttggac aacagaagaa ctttgatgct tttggcccaa	60
atgtctagaa tctctccatc ctcttgtttg atggatagac acgatttcgg tttcccacaa	120
gaagaatttg acggtaacca attccaaaag gctcctgcta tttctgtttt gcacgagttg	180
attcaacaaa ttttcaactt gttcaccact aaggactctt ctgctgcctg ggacgaagac	240
ttgttggaca agttctgtac tgagctttac caacaattga acgacttgga ggcttgtgtt	300
atgcaagagg agagagtcgg tgagacccca ttgatgaacg ctgattccat cttggctgtc	360
aagaagtact tcagaagaat taccttgtag ttgaccgaaa agaagtactc cccatgtgcc	420
tgggaagtcg ttagagccga aatcatgaga tctttgtcct tgtccactaa cttgcaagag	480
agacttacca agatgggtgg agacttgaac tctccataa	519

HVV 片段 1

合成的寡核苷酸列表:

HVV1F1T1 5' -PCTAGGCTCGAGAA-3'
 HVV1F1T2 5' -PGAGATGTGATTTGCCAGAGACTCACTCTT-3'
 HVV1F1T3 5' -PTGGACAACAGAAGAACTTTGATGCTTTT-3'
 HVV1F1T4 5' -PGGCCCCAAATGTCTAGAATCTCTCCATCCTC-3'
 HVV1F1T5 5' -PTTGTTTGATGGATAGACACGATTTTCGGTTT-3'
 HVV1F1T6 5' -PCCCACAAGAAGAATTCCCTGCTCGCG-3'
 HVV1F1B1 5' -PGATCCGCGAGCA-3'
 HVV1F1B2 5' -PGGGAATTCTTCTTGTGGGAAACCGAAATCGT-3'
 HVV1F1B3 5' -PGTCTATCCATCAAACAAGAGGATGGAGA-3'
 HVV1F1B4 5' -PGATTCTAGACATTTGGGCCAAAAGCATCA-3'
 HVV1F1B5 5' -PAAGTTCTTCTGTTGTCCAAAGAGTGAGTCT-3'
 HVV1F1B6 5' -PCTGGCAAATCACATCTCTTCTCGAGC-3'

最终的连接产物:

[HVV1F1T1] [HVV1F1T2] [HVV1F1T3
 5' -CTAGGCTCGAGAAGAGATGTGATTTGCCAGAGACTCACTCTTTGGACAACAGAAGAACTT
 3' -CGAGCTCTTCTCTACACTAAACGGTCTCTGAGTGAGAAACCTGTTGTCTTCTTGAA
 [HVV1F1B6] [HVV1F1B5]
 [HVV1F1T4] [HVV1F1T5]
 TTTGGCCCCAAATGTCTAGAATCTCTCCATCCTCTTGTGTTGATGGATAGACACGATTTTCGGTTT
 AAACCGGGTTTACAGATCTTAGAGAGGTAGGAGAACAACTACCTATCTGTGCTAAAGCCAAA
 F1B4] [HVV1F1B3] [HVV1F1B2
 1T6]
 GAAGAATTCCCTGCTCGCG-3'
 CTTCTTAAGGGACGAGCGCCTAG-5'
 [HVV1F1B1]

图1

HVV 片段 2

合成的寡核苷酸列表:

```

HVV1F2T1 5'-PAATTTGACGGTAAC-3'
HVV1F2T2 5'-PCAATTCCTGCTATTTCTGT-3'
HVV1F2T3 5'-PTTTGCACGAGTTGATTCAACAAATTT-3'
HVV1F2T4 5'-PTCAACTTGTTCACTAAGGACTCTT-3'
HVV1F2T5 5'-PCTGCTGCCTGGGACGAAGACTTGTGGAC-3'
HVV1F2T6 5'-PAAGTTCTGTACTGAGCTCAGCGCGAATG-3'
HVV1F2B1 5'-PGATCCATTTCGCGCT-3'
HVV1F2B2 5'-PGAGCTCAGTACAGAACTTGTTCAACAA-3'
HVV1F2B3 5'-PGTCTTCGTCCCAGGCAGCAGAAGAGTCCT-3'
HVV1F2B4 5'-PTAGTGGTGAACAAGTTGAAAATTTGTTG-3'
HVV1F2B5 5'-PAATCAACTCGTGCAAAACAGAAATA-3'
HVV1F2B6 5'-PGCAGGAGCCTTTTGAATTGGTTACCGTCA-3'

```

最终的连接产物:

```

[ HVV1F2T1 ] [ HVV1F2T2 ] [ HVV1F2T3
5'-AATTTGACGGTAACCAATTCCTGCTATTTCTGTTTGCACGAGTTGAT
3'-ACTGCCATTGGTTAAGGTTTCCGAGGACGATAAAGACAAAACGTGCTCAACTA
[ HVV1F2B6 ] [ HVV1F2B5

[ HVV1F2T4 ] [ HVV1F2T5 ] [ HV
TTTCAACTTGTTCACTAAGGACTCTTCTGCTGCCTGGGACGAAGACTTGTGGACAAG
AAAGTTGAACAAGTGGTGAATTCCTGAGAAGACGACGACCCTGCTTCTGAACAACCTGTT
2B4 ] [ HVV1F2B3 ] [ HVV1F2B2

]
GAGCTCAGCGCGAATG-3'
CTCGAGTCGCGCTTACCTAG-5'
[ HVV1F2B1 ]

```

图2

HVV 片段 3

合成的寡核苷酸列表：

HVV1F3T1 5' - PTTACCAACAATT - 3'
 HVV1F3T2 5' - PGAACGACTTGGAGGCTTGTGTTATGC - 3'
 HVV1F3T3 5' - PAAGAGGAGAGAGTCGGTGAGACCCCATGATG - 3'
 HVV1F3T4 5' - PAACGCTGATTCCATCTTGGCTGTCAAGAAGT - 3'
 HVV1F3T5 5' - PACTTCAGAAGAATTCAGCTCATTTG - 3'
 HVV1F3B1 5' - PGATCCAAATGAGC - 3'
 HVV1F3B2 5' - PTGAATTCTTCTGAAGTACTTCTTGACAGCCAA - 3'
 HVV1F3B3 5' - PGATGGAATCAGCGTTCATCAATGGGGT - 3'
 HVV1F3B4 5' - PCTCACCGACTCTCTCCTCTTGCATAACACA - 3'
 HVV1F3B5 5' - PAGCCTCCAAGTCGTTCAATTGTTGGTAAAGCT - 3'

最终的连接产物：

[HVV1F3T1] [HVV1F3T2] [HVV1F3T3
 5' - TTACCAACAATTGAACGACTTGGAGGCTTGTGTTATGCAAGAGGAGAGAGTCGGTG/
 3' - TCGAAATGGTTGTAACTTGCTGAACCTCCGAACACAATACGTTCTCCTCTCTCAGCCAC/
 [HVV1F3B5] [HVV1F3B4
] [HVV1F3T4] [HVV1F3T5]
 ATTGATGAACGCTGATTCCATCTTGGCTGTCAAGAAGTACTTCAGAAGAATTCAGCTCATTTG
 TAACTACTTGCGACTAAGGTAGAACCGACAGTTCTTCATGAAGTCTTCTTAAGTCGAGTAAAC/
 V1F3B3] [HVV1F3B2] [HVV1F3B1

图3

HVV 片段 4

合成的寡核苷酸列表:

HVV1F4T1 5'-PAATTACCTTGTACT-3'
HVV1F4T2 5'-PTGACCGAAAAGAAGTACTCCCCATGTGCC-3'
HVV1F4T3 5'-PTGGGAAGTCGTTAGAGCCGAAATCAT-3'
HVV1F4T4 5'-PGAGATCTTTGTCCTTGTCCACTAACTT-3'
HVV1F4T5 5'-PGCAAGAGAGACTTACCAAGATGGGTGGAG-3'
HVV1F4T6 5'-PACTTGAACCTCTCCATAAGCGGCCGCG-3'
HVV1F4B1 5'-PGATCCGCGGCCGCT-3'
HVV1F4B2 5'-PTATGGAGAGTTCAAGTCTCCACCCAT-3'
HVV1F4B3 5'-PCTTGGTAAGTCTCTCTTGCAAGTTAGTGG-3'
HVV1F4B4 5'-PACAAGGACAAAGATCTCATGATTTCGGC-3'
HVV1F4B5 5'-PTCTAACGACTTCCCAGGCACATGGGGAGTA-3'
HVV1F4B6 5'-PCTTCTTTTCGGTCAAGTACAAGGT-3'

最终的连接产物:

[HVV1F4T1][HVV1F4T2][HVV1F4T3
5'-AATTACCTTGTACTTGACCGAAAAGAAGTACTCCCCATGTGCCTGGGAAGTCGTTAGAGC
3'-TGGAACATGAACTGGCTTTTCTTCATGAGGGGTACACGGACCCTTCAGCAATCTCC
[HVV1F4B6][HVV1F4B5][
][HVV1F4T4][HVV1F4T5][HVV1F4T6
ATGAGATCTTTGTCCTTGTCCACTAACTTGCAAGAGAGACTTACCAAGATGGGTGGAGACTTC
TACTCTAGAAACAGGAACAGGTGATTGAACGTTCTCTCTGAATGGTTCTACCCACCTCTGAA
B4][HVV1F4B3][HVV1F4B2
]
CATAAGCGGCCGCG-3'
GTATTCGCGGCCGCTAG-5'
][HVV1F4B1]

图4

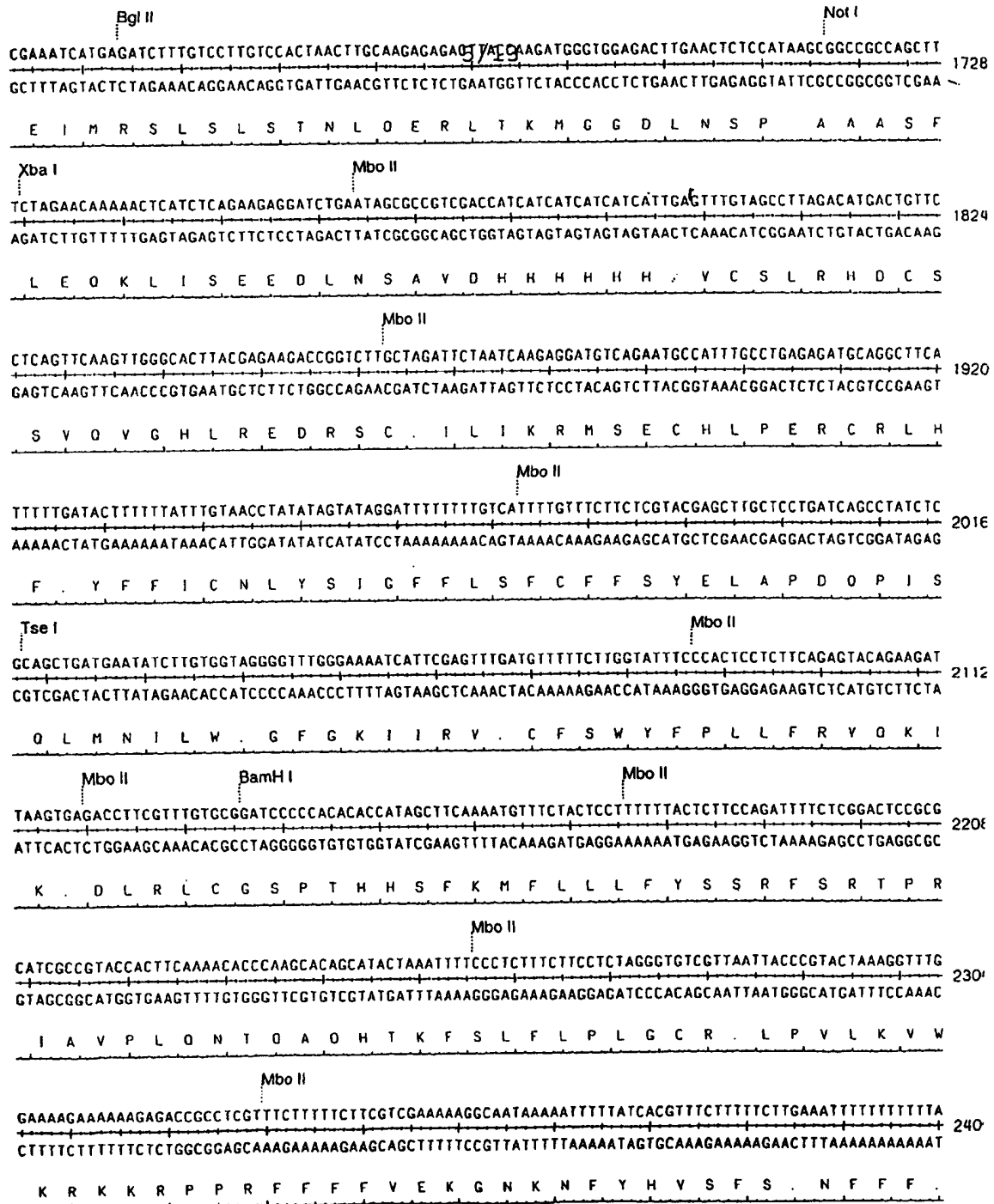


图5A

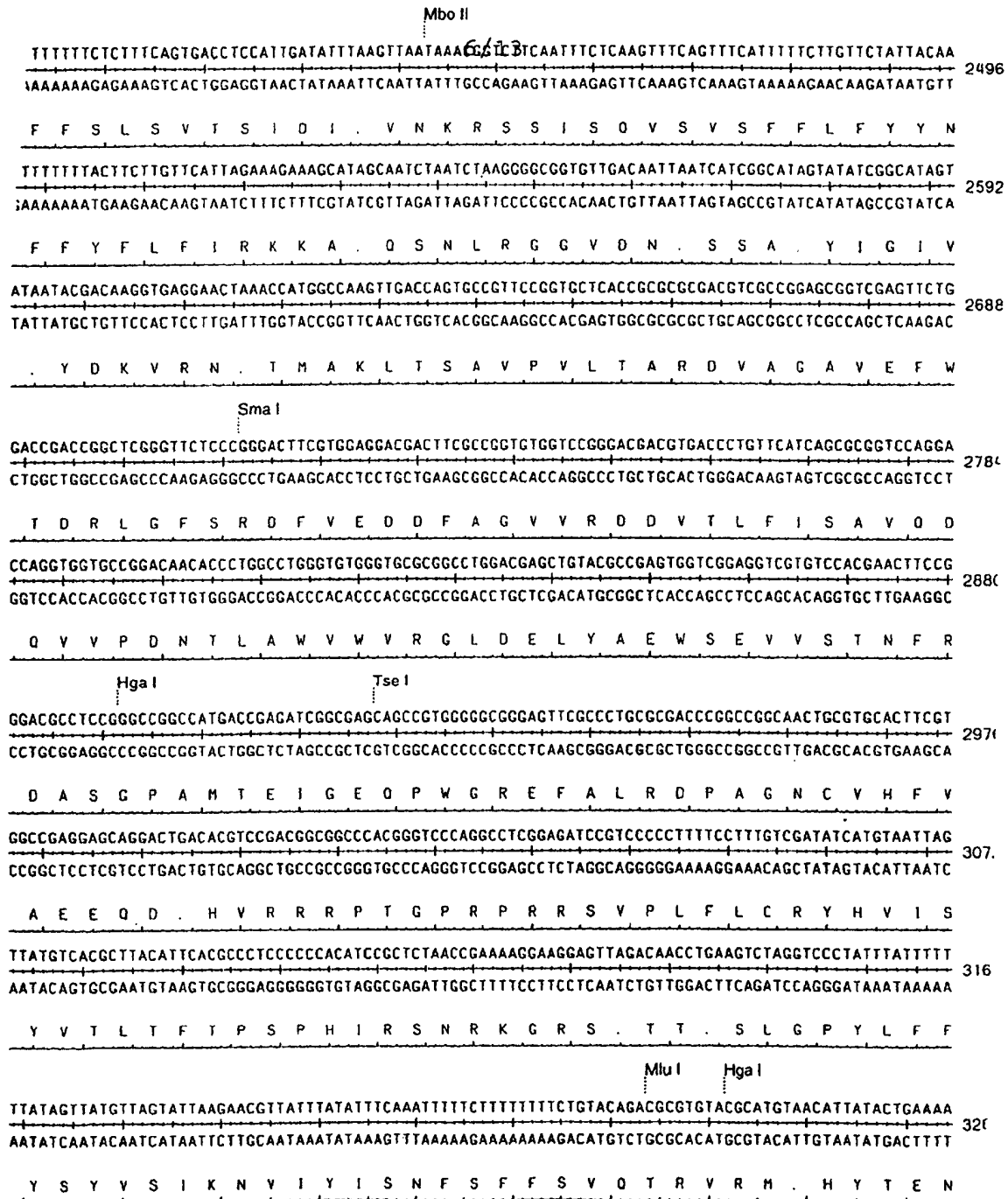


图5B

Friday, July 6, 2001 5:20 PM

HVV+pPICZ-alphaB Map (1 > 4051) 位点和序列

第5页

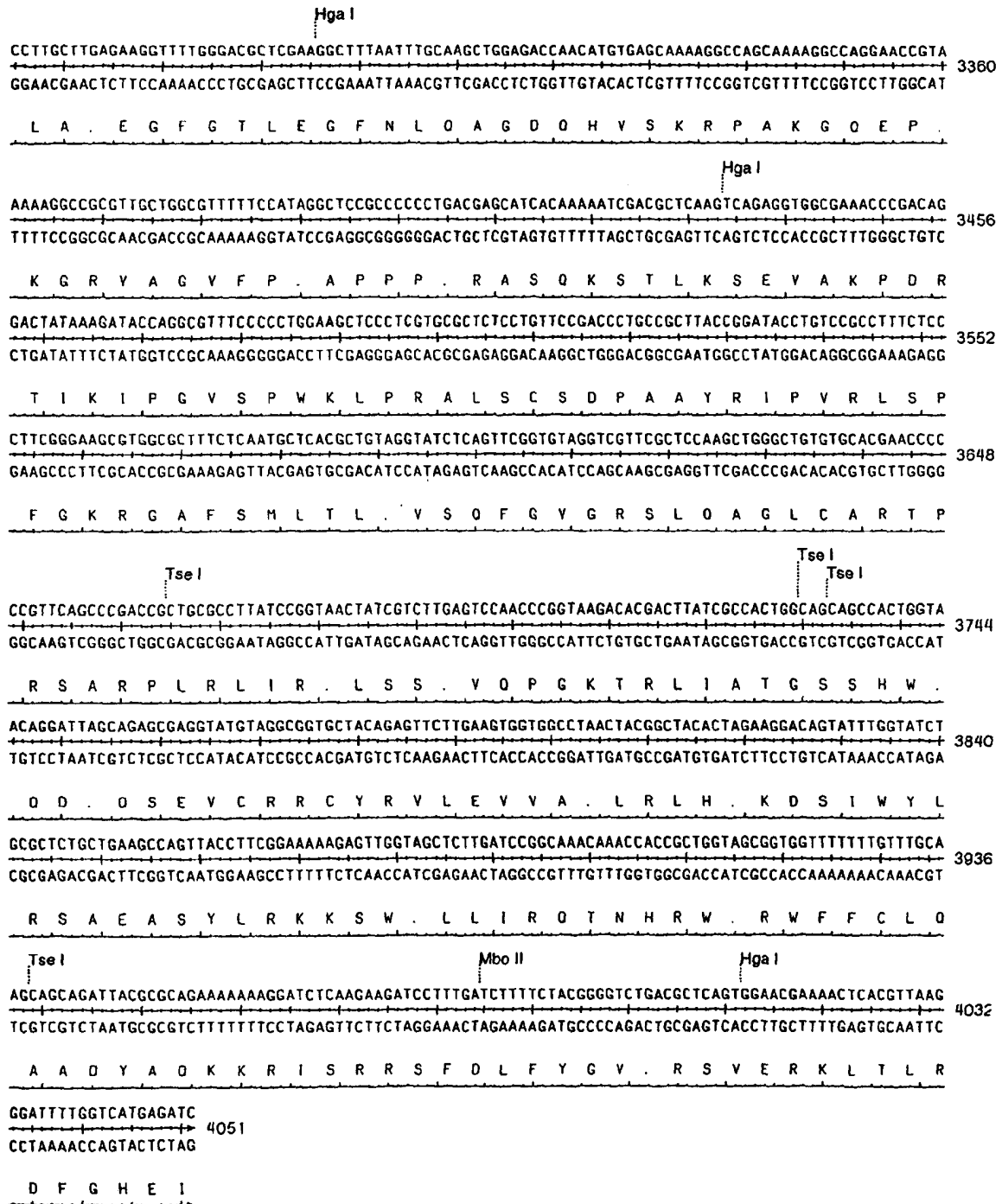


图5C

HVV 蛋白信息

HVV 氨基酸序列

CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPASVLEHLI
QIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKI
YFRRLTYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLTKMGGDLNSP.

蛋白信息

分子量 19816.67 Daltons

172 氨基酸

18 强碱性(+)氨基酸 (K,R)

26 强酸性(-)氨基酸 (D,E)

56 疏水氨基酸 (A,I,L,F,W,V)

50 极性氨基酸 (N,C,Q,S,T,Y)

4.800 等电点

在PH7.0时7.714电荷

翻译的碱基的总数目是 519

% A = 27.36 [142]

% G = 21.97 [114]

% T = 28.90 [150]

% C = 21.77 [113]

% Ambiguous = 0.00 [0]

% A+T = 56.26 [292]

% C+G = 43.74 [227]

Davis,Botstein,Roth Melting Temp C. 81.87

Wallace Temp C 1718.00

使用的密码子:

gca	Ala (A)	0	#	cag	Gln (Q)	0	#	uug	Leu (L)	20	#	uua	Ter (.)	1
gcc	Ala (A)	4	#	---	Gln (Q)	10	#	---	Leu (L)	23	#	uag	Ter (.)	0
gcg	Ala (A)	0	#	gaa	Glu (E)	6	#	aaa	Lys (K)	0	#	uga	Ter (.)	0
gcu	Ala (A)	6	#	gag	Glu (E)	8	#	aag	Lys (K)	8	#	---	Ter (.)	1
---	Ala (A)	10	#	---	Glu (E)	14	#	---	Lys (K)	8	#	aca	Thr (T)	0
aga	Arg (R)	10	#	gga	Gly (G)	1	#	aug	Met (M)	7	#	acc	Thr (T)	5
agg	Arg (R)	0	#	ggc	Gly (G)	0	#	---	Met (M)	7	#	acg	Thr (T)	0
cga	Arg (R)	0	#	ggg	Gly (G)	0	#	uuc	Phe (F)	7	#	acu	Thr (T)	5
cgc	Arg (R)	0	#	ggu	Gly (G)	4	#	uuu	Phe (F)	1	#	---	Thr (T)	10
cgg	Arg (R)	0	#	---	Gly (G)	5	#	---	Phe (F)	8	#	ugg	Trp (W)	2
cgu	Arg (R)	0	#	cac	His (H)	3	#	cca	Pro (P)	6	#	---	Trp (W)	2
---	Arg (R)	10	#	cau	His (H)	0	#	ccc	Pro (P)	0	#	uac	Tyr (Y)	4
aac	Asn (N)	7	#	---	His (H)	3	#	ccg	Pro (P)	0	#	uau	Tyr (Y)	0
aau	Asn (N)	0	#	aua	Ile (I)	0	#	ccu	Pro (P)	1	#	---	Tyr (Y)	4

图6A

---	Asn(N)	7	#	auc	Ile(I)	3	#	---	Pro(P)	7	#	gua	Val(V)	0
gac	Asp(D)	8	#	auu	Ile(I)	4	#	agc	Ser(S)	0	#	guc	Val(V)	3
gau	Asp(D)	4	#	---	Ile(I)	7	#	agu	Ser(S)	0	#	gug	Val(V)	0
---	Asp(D)	12	#	cua	Leu(L)	0	#	uca	Ser(S)	0	#	guu	Val(V)	3
ugc	Cys(C)	0	#	cuc	Leu(L)	0	#	ucc	Ser(S)	5	#	---	Val(V)	6
ugu	Cys(C)	5	#	cug	Leu(L)	0	#	ucg	Ser(S)	0	#	nnn	???(X)	0
---	Cys(C)	5	#	cuu	Leu(L)	3	#	ucu	Ser(S)	9	#	TOTAL		173
caa	Gln(Q)	10	#	uua	Leu(L)	0	#	---	Ser(S)	14	#			

图6B

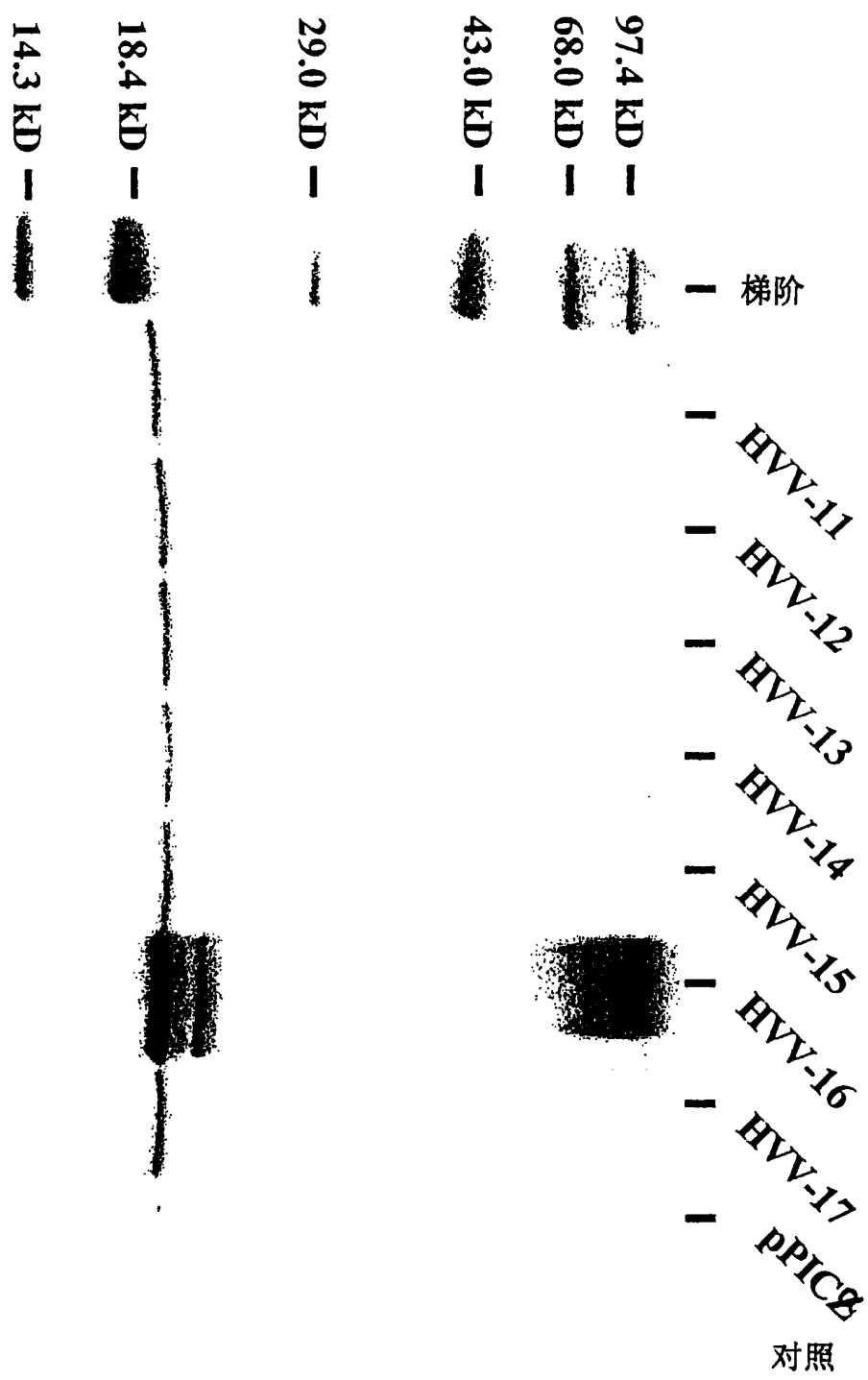


图7

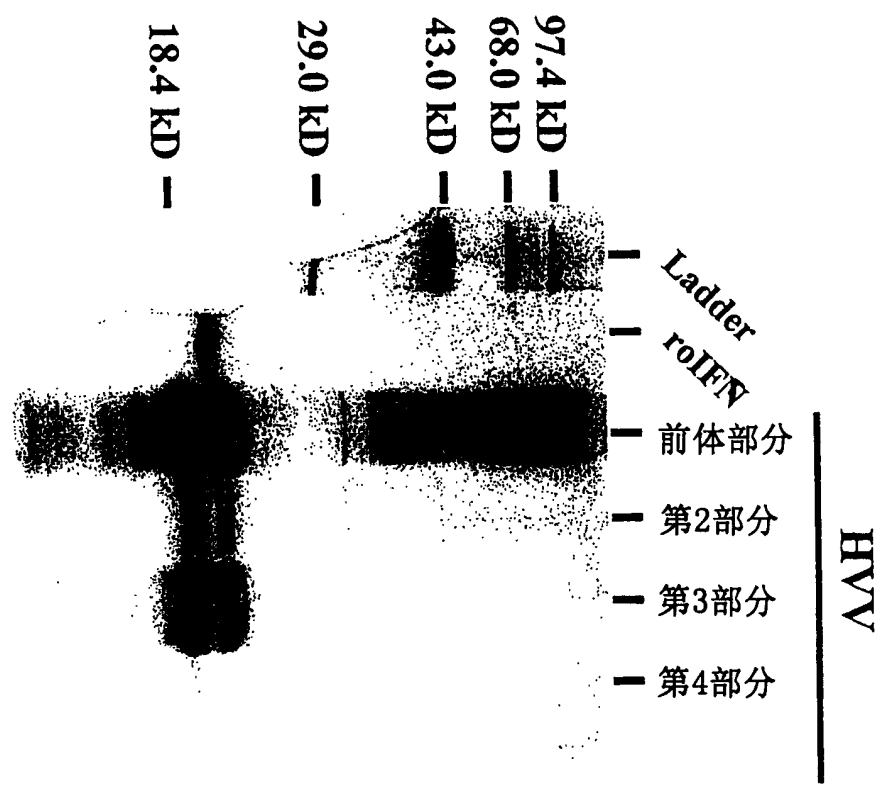


图8

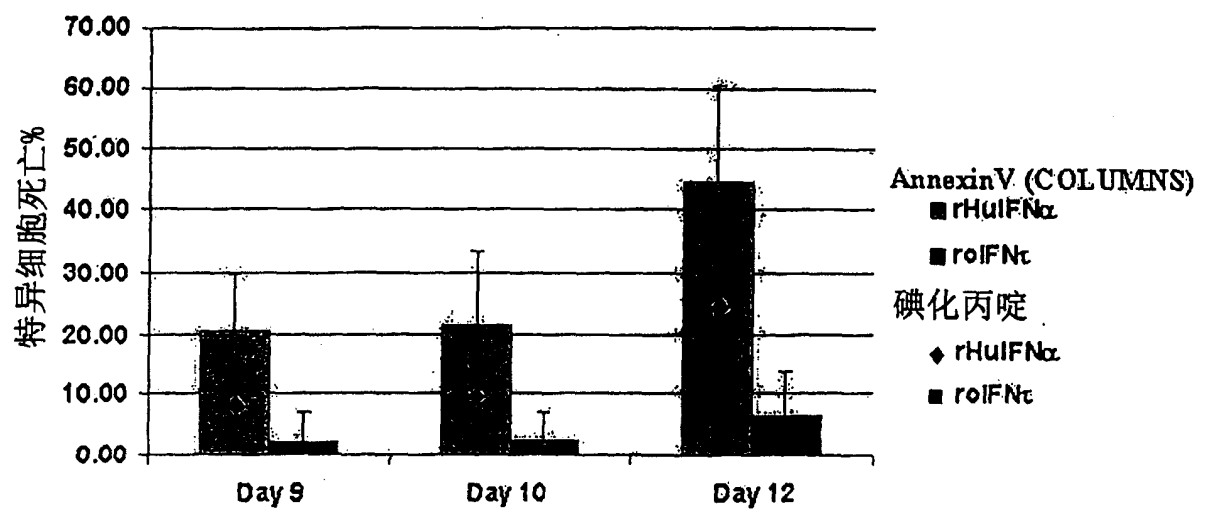


图9

Alignment Report of NLVHVVTAAU.seqal Using Clustal method with PAM250 residue weight table.
Tuesday, May 29, 2001 4:03 PM

CYLSETLMLDARENKLLDRMNRSLSPHSC L																												Majority									
10														20														30									
1	C	Y	L	S	R	K	L	M	L	D	A	R	E	N	L	K	L	L	D	R	M	N	R	L	S	P	H	S	C	L	IFN-T.OTT.AASEQ.ER						
1	C	Y	L	S	R	K	L	M	L	D	A	R	E	N	L	K	L	L	D	R	M	N	R	L	S	P	H	S	C	L	OTP.Y00287.AA						
1	C	D	L	P	E	T	H	S	L	E	N	R	T	L	M	L	L	A	Q	M	S	R	I	S	P	S	S	C	L	IFNalphaD.AA							
1	C	D	L	P	E	T	H	S	L	E	N	R	T	L	M	L	L	A	Q	M	S	R	I	S	P	S	S	C	L	HVV.AA							
1	C	Y	L	S	R	K	L	M	L	D	A	R	E	N	L	K	L	L	D	R	M	N	R	L	S	P	H	S	C	L	NLV.AA						
MDRHDGFGFPQEEFDGNQFQKAPATISVLHEL																												Majority									
40														50														60									
31	Q	D	R	K	D	E	G	L	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	P	A	I	S	V	L	H	E	L	IFN-T.OTT.AASEQ.ER						
31	Q	D	R	K	D	E	G	L	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	P	A	I	S	V	L	H	E	L	OTP.Y00287.AA						
31	M	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	P	A	I	S	V	L	H	E	L	IFNalphaD.AA						
31	M	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	P	A	I	S	V	L	H	E	L	HVV.AA						
31	M	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	P	A	I	S	V	L	H	E	L	NLV.AA						
IQQIFNLF TTKDSSAAWDEDLLDKFCTELY																												Majority									
70														80														90									
61	L	Q	S	F	N	L	F	T	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	D	L	L	D	K	F	C	T	E	L	Y	IFN-T.OTT.AASEQ.ER							
61	L	Q	S	F	N	L	F	T	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	D	L	L	D	K	F	C	T	E	L	Y	OTP.Y00287.AA							
61	I	Q	I	F	N	L	F	T	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	D	L	L	D	K	F	C	T	E	L	Y	IFNalphaD.AA							
61	I	Q	I	F	N	L	F	T	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	D	L	L	D	K	F	C	T	E	L	Y	HVV.AA							
61	I	Q	I	F	N	L	F	T	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	D	L	L	D	K	F	C	T	E	L	Y	NLV.AA							
QQ LNDLEACVMQEERVGETPLMNADSI LAV																												Majority									
100														110														120									
91	Q	Q	L	D	H	L	D	T	C	R	G	Q	V	M	G	E	E	D	S	E	L	G	M	D	P	I	V	T	V	IFN-T.OTT.AASEQ.ER							
91	Q	Q	L	D	H	L	D	T	C	R	G	Q	V	M	G	E	E	D	S	E	L	G	M	D	P	I	V	T	V	OTP.Y00287.AA							
91	Q	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	M	Q	E	E	R	V	G	E	T	P	L	M	N	A	D	S	I	L	A	V	IFNalphaD.AA						
91	Q	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	M	Q	E	E	R	V	G	E	T	P	L	M	N	A	D	S	I	L	A	V	HVV.AA						
91	Q	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	M	Q	E	E	R	V	G	E	T	P	L	M	N	A	D	S	I	L	A	V	NLV.AA						
KKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMR																												Majority									
130														140														150									
121	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	IFN-T.OTT.AASEQ.ER						
121	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	OTP.Y00287.AA						
121	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	IFNalphaD.AA						
121	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	HVV.AA						
121	K	K	Y	F	R	R	I	T	L	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	V	R	A	E	I	M	R	NLV.AA						
SLSLSTNLQERLT KMGGD LNSP -																												Majority									
160														170																							
151	A	L	T	V	S	T	T	L	Q	K	R	L	T	K	M	G	G	D	L	N	S	P	-							IFN-T.OTT.AASEQ.ER							
151	A	L	T	V	S	T	T	L	Q	K	R	L	T	K	M	G	G	D	L	N	S	P	-							OTP.Y00287.AA							
151	S	L	S	L	S	T	N	L	Q	E	R	L	T	K	M	G	G	D	L	N	S	P	-							IFNalphaD.AA							
151	S	L	S	L	S	T	N	L	Q	E	R	L	T	K	M	G	G	D	L	N	S	P	-							HVV.AA							
151	S	L	S	L	S	T	N	L	Q	E	R	L	T	K	M	G	G	D	L	N	S	P	-							NLV.AA							

Decoration 'Decoration #1' 准确符合同源序列的碱基的阴影
(在40%充填时是亮青绿色)

图10