



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104968673 B

(45)授权公告日 2018.11.02

(21)申请号 201480003114.X

(22)申请日 2014.01.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104968673 A

(43)申请公布日 2015.10.07

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.05.20

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2014/070328 2014.01.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/103749 EN 2015.07.16

(73)专利权人 德益阳光生物技术(北京)有限责
任公司
地址 100085 北京市海淀区开拓路5号A418

(72)发明人 刘宏宇 赵明治 孙赫彤

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.

C07K 14/555(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/24(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

(56)对比文件

CN 101031316 A,2007.09.05,第11页表1以
及序列表,第27页最后1段-第31页第2段,第44页
最后1段,第45页最后1段,第70页最后1的段-第
71页第1段,权利要求11-13.

CN 101918440 A,2010.12.15,说明书第10,
38-39,119,174段,权利要求25-30.

US 2010222552 A1,2010.09.02,说明书序
列表.

CN 1219796 C,2005.09.21,全文.

审查员 高赞

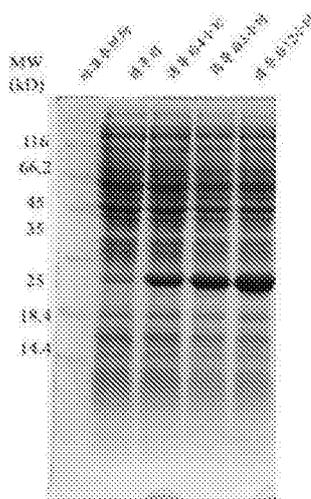
权利要求书1页 说明书31页
序列表21页 附图11页

(54)发明名称

融合多肽及使用方法

(57)摘要

本发明涉及包含来自干扰素λ家族的第一
和第二同种型的片段的融合多肽,编码该融合多
肽的核酸,和包含该核酸的载体和宿主细胞,以
及制备这样的组合物和使用其治疗与干扰素λ
相关的疾病、病症和状况的方法。



SEQ ID NO: 8的克隆和表达

1. 融合多肽,其氨基酸序列选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。
2. 一种宿主细胞,其表达根据权利要求1所述的融合多肽。
3. 根据权利要求2所述的宿主细胞,其中该宿主细胞是原核细胞或真核细胞。
4. 根据权利要求1所述的融合多肽在制备用于在有需要的哺乳动物中治疗病毒感染的药物中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其中所述病毒感染由选自乙型肝炎、丙型肝炎和流感的病毒造成。
6. 根据权利要求1所述的融合多肽在制备用于在有需要的哺乳动物中治疗炎症的药物中的应用。
7. 根据权利要求6所述的应用,其中所述炎症是多发性硬化。
8. 根据权利要求1所述的融合多肽在制备用于在有需要的哺乳动物中治疗癌症的药物中的应用。
9. 根据权利要求8所述的应用,其中所述癌症选自结肠癌、黑素瘤和肝细胞癌。
10. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1所述的融合多肽中的至少一种和药学上可接受的赋形剂。
11. 一种载体,其包含编码根据权利要求1所述的融合多肽的多核苷酸。
12. 一种产生根据权利要求1所述的融合多肽的方法,其包括在适于蛋白质表达的条件下在细胞中表达根据权利要求11所述的载体,从而产生所述融合多肽。

融合多肽及使用方法

背景技术

[0001] IL28B与IL28A和IL29一起代表干扰素家族的亚组(III型)。多种人细胞类型中的病毒感染可诱导它们的表达(Nat Immunol.2003;4(1):69-77.Nat Immunol.2003;4(1):63-68),并且它们进而可以结合并通过由IL28R和IL10R2组成的异二聚体受体复合物发出信号。由IL28B、IL28A和IL29诱导的基因的组库(repertoire)与由干扰素 α 所诱导的基本上相同。它们当中有OAS1和MX1,这两者结合并通过由IFNAR1和IFNAR2组成的异二聚体受体复合物发出信号(Gastroenterology.2006;131(6):1887-1898)。

[0002] 由包括IL28B、IL28A和IL29在内的III型干扰素诱导的抗病毒活性已被证实对抗脑心肌炎病毒(EMCV)、水疱性口炎病毒(VSV)、流感(Eur J Immunol.2004;34(3):796-805.J Virol.2006;80(9):4501-4509)、乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)(J Virol.2005;79(6):3851-3854)。然而,在许多细胞类型中,对III型干扰素的抗病毒应答的幅度通常小于对干扰素 α 的抗病毒应答的幅度。III型干扰素与干扰素 α 系统间的一个显著区别是受体分布的模式。虽然干扰素 α 的受体广泛地表达,但III型干扰素受体的IL28R组分只存在于细胞的有限亚组中,包括肝细胞(Cytokine 2005,31,109-118)。大部分造血细胞显著缺少功能性IL28R(Hepatology.2006;44(4):896-906)。临床前毒理学研究已经表明,不同于聚乙二醇化的干扰素 α ,聚乙二醇化的IL29肽不诱导对骨髓干细胞集落形成的抑制或诱导外周血白细胞中的抗病毒和抗增殖活性(Ann NY Acad Sci.2009;1182:80-87)。

[0003] 全球大约有1.5亿人慢性感染丙型肝炎病毒(HCV),这是肝硬化、肝细胞癌和肝移植的首要原因(WHO.丙型肝炎资料简报第164号(Hepatitis C fact sheet No.164))。在大多数患者中HCV被认为是可治愈的疾病。当前的最前线(topline)治疗方案包括聚乙二醇化干扰素 α 与小分子抗病毒药物如利巴韦林(Health Technology Assessment 2004;Vol.8:No.39)、替拉瑞韦和波普瑞韦(Ther Adv Gastroenterol 2012;5(2)139-151)的组合。遗憾的是,采用聚乙二醇化干扰素 α 的治疗不总是具有良好的耐受性,从而导致较差的患者依从性。与聚乙二醇化干扰素 α 相关的主要毒性包括但不限于:流感样症状,如头痛、疲劳和虚弱;神经精神性异常,如抑郁、焦虑和易怒;且更重要的是血液系统病症,如中性粒细胞减少症和贫血。全球约3.5亿人慢性感染乙型肝炎病毒(HBV)。当前的治疗包括聚乙二醇化干扰素 α 和小分子抗病毒药物,如拉米夫定、阿德福韦、替诺福韦、替比夫定和恩替卡韦。用聚乙二醇化干扰素 α 治疗HBV导致与对于HCV的毒性相类似的毒性。

发明内容

[0004] 因此,对于比现有疗法具有更好的耐受性和/或更有效的用于丙型肝炎以及其它疾病的新抗病毒药物存在相当大的需求。本发明满足了这种需求并且还提供了相关的优点。本发明涵盖修饰的人白介素28B(IL28B)和人白介素29(IL29)融合多肽。本发明还提供了用于生产融合多肽的方法,例如在原核系统如大肠杆菌(E.coli)中。此外,本发明公开了该融合多肽在治疗病毒感染(包括但不限于丙型肝炎、乙型肝炎和流感)、自身免疫性疾病(包括但不限于多发性硬化)和各种类型的癌症(包括但不限于肝细胞癌)中的药学用途。

[0005] 在一个方面,本发明提供了包含来自第一干扰素 λ 同种型的第一片段和来自第二干扰素 λ 同种型的第二片段的融合多肽,其中该第一和第二片段在融合位点处融合在一起,以形成连续的多肽,其中该融合位点包含与该第一和第二干扰素 λ 同种型中的相应序列相同的至少约6个氨基酸的序列。

[0006] 在一些情况下,所述融合多肽可以保留第一或第二同种型的二级结构。在一些情况下,该融合多肽与第一或第二同种型的T-表位相比,可以缺乏任何额外的T-表位。在进一步的情况下,该融合多肽与第一或第二同种型的B-表位相比,可以缺乏任何额外的B-表位。

[0007] 在一些实例中,第一干扰素 λ 同种型可以是IL29同种型。在一些实施例中,第二干扰素 λ 同种型可以是IL28B同种型。在进一步的实例中,第一干扰素 λ 同种型可以是IL29同种型且第二干扰素 λ 同种型可以是IL28B同种型。

[0008] 在一些实例中,所述融合位点可包含与第一和第二干扰素 λ 同种型中的相应序列相同的至少约8个氨基酸的序列。

[0009] 在另一个方面,本发明提供了具有式I的结构的融合多肽:(S1)-(螺旋A)-(S2)-(螺旋C)-(S3)-(螺旋D)-(S4)-(螺旋E)-(S5)-(螺旋F)-(S6)

[0010] 其中:

[0011] a.螺旋D包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约V98至Q112或IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约V89至Q103的残基的片段展现出至少90%同源性的氨基酸序列;

[0012] b.螺旋E包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约R130至E145或IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约R121至E136的残基的片段展现出至少90%同源性的氨基酸序列;

[0013] c.S1、S2、S3、S4、S5和S6中的每一个独立地是具有1至约50个氨基酸残基的间隔序列;

[0014] 且其中该融合多肽的特征在于:

[0015] i.螺旋A包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约P27至L44的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列;或

[0016] ii.螺旋A包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列;或

[0017] iii.螺旋A包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约P27至L44的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列;或

[0018] iv.螺旋A包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列;或

[0019] v.螺旋A包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约P27至L44的残基的片段展现出至

少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列;或

[0020] vi. 螺旋A包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C包含与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F包含与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0021] 在一些情况下,螺旋A可以与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约P27至L44的残基的片段相同。在其它情况下,螺旋A可以与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约P20至L37的残基的片段相同。

[0022] 在一些情况下,螺旋C可以与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约R63至A87的残基的片段相同。在其它情况下,螺旋C可以与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约R56至A80的残基的片段相同。

[0023] 在一些情况下,螺旋F可以与具有IL28B (SEQ ID NO:2) 的从约G148至A170的残基的片段相同。在其它情况下,螺旋F可以与具有IL29 (SEQ ID NO:1) 的从约G139至A161的残基的片段相同。

[0024] 在一些情况下,S2可进一步包含螺旋B。

[0025] 在一些情况下,所述融合多肽可进一步在与IL28B (SEQ ID NO:2) 相对应的氨基酸残基中包含至少一个修饰,其中该至少一个修饰选自dV2、dP3、dV4、dA5、dR6、dL7、dR8、G9K、A10P、L11T、P12T、D13T、A14G、R15K、A20G、Q21R、Q31A、A32S、R35K、K37R、L45K、D48N、C49W、K50S、R52S、R54P、L55V、R58G、T59N、Q64L、T88A、dD90、dT91、D92P、G96E、R114Q、T127P、C168S、C175S、P3G、V4P、A5V、R6P、L7T和R8S。

[0026] 在一些情况下,所述融合多肽还可在与IL29 (SEQ ID NO:1) 相对应的氨基酸残基中包含至少一个修饰,其中该至少一个修饰选自R14Q、L57Q、A81T、82aD、82bT、G83D、E87G、Q105R、P118T和D162E。

[0027] 在一些情况下,所述融合多肽可包含融合位点,该融合位点包含与IL28B (SEQ ID NO:2) 和IL29 (SEQ ID NO:1) 中的相应序列相同的至少约6个氨基酸的序列。在进一步的情况下,该融合位点可包含与IL28B (SEQ ID NO:2) 和IL29 (SEQ ID NO:1) 中的相应序列相同的至少约8个氨基酸的序列。在一些实例中,该融合位点可包含与所述至少两种干扰素 λ 同种型的相应序列相同的至少约6-25个氨基酸的序列。

[0028] 在一些情况下,所述融合多肽可保留IL28B (SEQ ID NO:2) 或IL29 (SEQ ID NO:1) 的二级结构。在一些情况下,该融合多肽与IL28B (SEQ ID NO:2) 或IL29 (SEQ ID NO:1) 的T-表位相比,可以缺乏任何额外的T-表位。在一些情况下,该融合多肽与IL28B (SEQ ID NO:2) 或IL29 (SEQ ID NO:1) 的B-表位相比,可以缺乏任何额外的B-表位。

[0029] 在一些情况下,所述融合多肽可展现出与IL28B (SEQ ID NO:2) 或IL29 (SEQ ID NO:1) 的至少90%的序列同源性。在进一步的情况下,该融合多肽可展现出与IL28B (SEQ ID NO:2) 或IL29 (SEQ ID NO:1) 的至少95%的序列同源性。

[0030] 在一些情况下,所述融合多肽的N末端可进一步被聚乙二醇 (PEG) 修饰。在一些实例中,该聚乙二醇可以是单甲氧基PEG丙醛。在一些实例中,该聚乙二醇可具有约12Kd至

40Kd的分子量。在进一步的情况下,该聚乙二醇化的融合多肽与IL28B(SEQ ID NO:2)或IL29(SEQ ID NO:1)相比,可展现出延长的体内半衰期。

[0031] 在一些情况下,所述融合多肽与IL28B(SEQ ID NO:2)或IL29(SEQ ID NO:1)相比,可展现增强的化学稳定性。

[0032] 在一些实例中,所述融合多肽可包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0033] 在又一方面,本发明提供了表达所述融合多肽的宿主细胞。在一些情况下,该宿主细胞可以是原核细胞。在一些实例中,该原核细胞可以是大肠杆菌。在其它情况下,该宿主细胞可以是真核细胞。

[0034] 在一方面,本发明提供了在有需要的哺乳动物中治疗病毒感染的方法,该方法包括向该哺乳动物施用治疗有效量的所述融合多肽。在一些情况下,该病毒感染可以由选自乙型肝炎、丙型肝炎和流感的病毒造成。

[0035] 在另一方面,本发明提供了在有需要的受试者中治疗炎症的方法,该方法包括向该哺乳动物施用治疗有效量的所述融合多肽。在一些情况下,该炎症可以是多发性硬化。

[0036] 在又一方面,本发明提供了在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括向该哺乳动物施用治疗有效量的所述融合多肽。在一些情况下,该癌症可选自结肠癌、黑素瘤和肝细胞癌。

[0037] 在一方面,本发明提供了包含所述融合多肽中的至少一种和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0038] 在另一方面,本发明提供了包含所述融合多肽中的至少一种和第二治疗剂的药物组合物。

[0039] 在又一方面,本发明提供了包含编码所述融合多肽的多核苷酸的载体。

[0040] 在进一步的方面,本发明提供了产生所述融合多肽的方法,该方法包括在适于蛋白质表达的条件下在细胞中表达所述载体,从而产生所述融合多肽。

[0041] 通过下列详细描述,本公开内容的其它方面和优点对本领域技术人员而言将会变得显而易见,详细描述中仅示出和描述了本公开内容的说明性实施方案。如将会意识到的,本公开内容能够具有其它和不同的实施方案,并且其若干细节能够在各个明显的方面进行修改,所有这些都不脱离本公开内容。因此,附图和说明书本质上将被视为说明性的而不是限制性的。

[0042] 援引并入

[0043] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同特别地和单独地指出每个单独的出版物、专利或专利申请均通过引用而并入。

附图说明

[0044] 本发明的新颖特征特别地在所附权利要求书中阐述。通过参考以下对其中利用了本发明的原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述及其附图,将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解,在附图中:

[0045] 图1说明了使用本发明的方法进行融合多肽 (SEQ ID NO:8) 的蛋白质表达后的 SDS-PAGE 分析。

[0046] 图2说明了使用本发明的方法进行融合多肽 (SEQ ID NO:12) 的蛋白质表达后的 SDS-PAGE 分析。

[0047] 图3说明了使用本发明的方法进行融合多肽 (SEQ ID NO:8) 的重折叠和纯化后的 SDS-PAGE 分析。

[0048] 图4说明了使用本发明的方法进行融合多肽 (SEQ ID NO:12) 的重折叠和纯化后的 SDS-PAGE 分析。

[0049] 图5说明了使用本发明的方法进行融合多肽 (SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:13) 的 N-末端聚乙二醇化和 SP-HP 纯化后的 SDS-PAGE 分析。

[0050] 图6说明了融合多肽 (SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15) 在 C168 巯基部分处的聚乙二醇化后的 SDS-PAGE 分析。

[0051] 图7说明了在用参考 IL29 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 和四种 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12) 处理后 12 小时, 在 Hep G2 细胞中的 Mx 的剂量依赖性诱导。

[0052] 图8说明了在用参考 IL29 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 和四种 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12) 处理后 12 小时, 在 Hep G2 细胞中的 OAS 的剂量依赖性诱导。

[0053] 图9说明了在用 10ng/mL 的参考 IL29 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 和四种 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12) 处理后, 在 Hep G2 细胞中的 Mx 的时间依赖性诱导。

[0054] 图10说明了在用 10ng/mL 的参考 IL29 蛋白质 (SEQ ID NO:1) 和四种 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7 和 SEQ ID NO:12) 处理后, 在 Hep G2 细胞中的 OAS 的时间依赖性诱导。

[0055] 图11说明了在参考 IL29 (SEQ ID NO:1) 和 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:12) 的变性后, Mx-诱导的损失。

[0056] 图12说明了在参考 IL29 (SEQ ID NO:1) 和 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:12) 的变性后, OAS-诱导的损失。

[0057] 图13说明了参考 IL29 肽 (SEQ ID NO:1)、IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:3)、修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17) 和 N-末端聚乙二醇化的修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17) 的 Mx 诱导性质。

[0058] 图14说明了参考 IL29 肽 (SEQ ID NO:1)、IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:12 和 SEQ ID NO:3)、修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17) 和 N-末端聚乙二醇化的修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:16 和 SEQ ID NO:17) 的 Mx 诱导性质。

[0059] 图15说明了聚乙二醇化的干扰素 a2b (派罗欣 (Pegasys))、参考 N-末端聚乙二醇化的 IL29 肽 (SEQ ID NO:1)、N-末端聚乙二醇化的修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:16) 和 N-末端聚乙二醇化的修饰的 IL28B/IL29 融合多肽 (SEQ ID NO:17) 的 HCV 复制抑制性质。

[0060] 图16说明了H3N2感染的A549细胞在96孔板中的多种处理条件。

[0061] 图17说明了依循多种处理条件对A549细胞的H3N2感染的抑制。

[0062] 发明详述

[0063] 在描述本发明的实施方案之前,应当理解,这些实施方案仅通过举例给出,并且本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下将会想到许多变化、改变和替换。

[0064] 除非另有定义,本文所用的所有技术和科学术语所具有的含义与本发明所属领域的普通技术人员普遍理解的相同。尽管与本文所述类似或等同的方法和材料可用于实施或测试本发明,但下文仍描述了合适的方法和材料。在冲突的情况下,以本专利说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的,并非旨在进行限制。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下将会想到许多变化、改变和替换。

[0065] 如在本说明书和权利要求书中所用,单数形式“一种”、“一个”和“该”包括复数指代,除非上下文另有明确规定。

[0066] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指的是任何长度的氨基酸聚合物。该聚合物可以是线性的或分支的,它可以包括修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸打断。该术语还涵盖已通过例如二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作(例如与标记组分的偶联)而修饰的氨基酸聚合物。

[0067] 术语“氨基酸”是指天然的和/或非天然的或合成的氨基酸,包括但不限于D或L旋光异构体,以及氨基酸类似物和拟肽。标准的单字母或三字母代码用来指称氨基酸。

[0068] 术语“天然的L-氨基酸”意指甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的L旋光异构体形式。

[0069] 用于序列并在本文中使用的术语“非天然存在的”意指与在哺乳动物中发现的野生型或天然存在的序列不具有对应物、不互补或者不具有高度同源性的多肽或多核苷酸序列。例如,当适当比对时,与天然序列相比,非天然存在的多肽或片段可享有不超过99%、98%、95%、90%、80%、70%、60%、50%或甚至更低的氨基酸序列同一性。

[0070] 术语“亲水性”和“疏水性”是指物质所具有的与水的亲和性程度。亲水性物质对水具有强亲和性,倾向于在水中溶解、与水混合或被水润湿,而疏水性物质基本上缺乏对水的亲和性,倾向于排斥及不吸收水并倾向于不在水中溶解或不与水混合或不被水润湿。氨基酸可以根据它们的疏水性来表征。已经开发了多个标度(scale)。一个实例是在Hopp,TP等,Proc Natl Acad Sci U S A(1981)78:3824中列出的、由Levitt,M等,J Mol Biol(1976)104:59开发的标度。“亲水性氨基酸”的实例为精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。特别感兴趣的是亲水性氨基酸天冬氨酸、谷氨酸和丝氨酸以及甘氨酸。“疏水性氨基酸”的实例是色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

[0071] “片段”当用于蛋白质时为天然生物活性蛋白质的截短形式,其可能保留或可能不保留至少一部分治疗性和/或生物活性。“变体”当用于蛋白质时为与天然生物活性蛋白质具有序列同源性的蛋白质,其保留该生物活性蛋白质的至少一部分治疗性和/或生物活性。例如,与参考生物活性蛋白质相比,变体蛋白质可以享有至少70%、75%、80%、85%、90%、

95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列同一性。如本文所用,术语“生物活性蛋白质部分”包括例如通过定点诱变、编码基因的合成、插入而有意修饰的或通过突变而偶然修饰的蛋白质。

[0072] “偶联的”、“连接的”、“融合的”和“融合”在本文中可互换使用。这些术语是指通过包括化学偶联或重组手段在内的任何手段将两个或更多个化学元件、序列或组分连接在一起。例如,如果启动子或增强子影响序列的转录,则它与编码序列有效连接。通常,“有效连接的”意指所连接的DNA序列是连续的并且在阅读相内或符合读框。“符合读框的融合”是指两个或更多个开放阅读框(ORF)以保持原始ORF的正确阅读框的方式连接,以形成连续的更长的ORF。因此,所得到的“融合多肽”是含有与由原始ORF(这些区段在自然界中通常不如此连接)编码的多肽相对应的两个或更多个片段的单一蛋白质。“融合位点”是指其中两个或更多个片段连接在一起的序列。在一些情况下,融合位点可以是两个或更多个片段中相同的序列。例如,该融合位点可以是在连接的片段中相同的约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的序列。在具体的实例中,融合位点可以是在连接的片段中相同的约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个氨基酸的序列。

[0073] 在多肽的情况下,“线性序列”或“序列”是在多肽中的氨基酸在氨基至羧基末端方向上的顺序,其中在该序列中彼此相邻的残基在多肽的一级结构中是连续的。“部分序列”是已知在一个或两个方向上包含额外的残基的多肽一部分的线性序列。

[0074] 术语“多核苷酸”、“核酸”、“核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸)或其类似物的聚合形式。多核苷酸可具有任何三维结构,并且可以执行任何已知或未知的功能。以下为多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析确定的基因座、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任意序列的分离的DNA、任意序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包含修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在的话,可在聚合物组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可以被非核苷酸组分打断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记组分偶联。

[0075] 术语“基因”和“基因片段”在本文中可互换使用。它们是指包含至少一个开放阅读框的多核苷酸,其在转录和翻译后能够编码特定蛋白质。基因或基因片段可以是基因组DNA或cDNA,只要所述多核苷酸含有至少一个可覆盖整个编码区或其区段的开放阅读框。“融合基因”是由连接在一起的至少两个异源多核苷酸组成的基因。

[0076] “同源性”或“同源的”或“序列同一性”是指在两个或更多个多核苷酸序列之间或在两个或更多个多肽序列之间的序列相似性或可互换性。当使用诸如Emboss Needle或BestFit等程序确定两个不同氨基酸序列之间的序列同一性、相似性或同源性时,可以使用默认设置,或者可以选择适当的打分矩阵,例如blosum45或blosum80,来优化同一性、相似性或同源性得分。优选地,同源的多核苷酸是那些在如本文所定义的严格条件下杂交并且与这些序列相比具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选95%、更优选97%、更优选98%并且甚至更优选99%的序列同一性的多核苷酸。当对可比长度的序列进行最佳比对时,同源的多肽优选具有至少80%,或至少90%,或至少95%,或至少97%,或至少98%

的序列同一性,或具有至少99%的序列同一性。

[0077] 用于多核苷酸序列的术语“同一性百分比”和“%同一性”是指在使用标准化算法比对的至少两个多核苷酸序列之间的残基匹配的百分比。这样的算法可以以标准化和可再现的方式在所比较的序列中插入缺口,以便优化两个序列之间的比对,并由此实现两个序列的更有意义的比较。同一性百分比可以在整个定义的多核苷酸序列的长度上进行测量,或者可以在较短的长度上,例如在从较大的、定义的多核苷酸序列取得的片段的长度上进行测量,该片段例如是至少45、至少60、至少90、至少120、至少150、至少210或至少450个连续残基的片段。这些长度只是示例性的,并且应该理解,由本文的表格、附图或序列表中所示的序列支持的任何片段长度可以用来描述在其上可以测量同一性百分比的长度。

[0078] 就本文所确定的多肽序列而言,“序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列并在必要时引入缺口以获得最大序列同一性百分比后,并且不把任何保守置换视为序列同一性的一部分,查询序列中与第二、参考多肽序列或其部分的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。可以以本领域技术内的各种方式,例如使用可公开获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、NEEDLE或Megaalign (DNASTAR) 软件,来实现旨在确定氨基酸序列同一性百分比的比对。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适的参数,包括在所比较的序列的全长上获得最大比对所需的任何算法。同一性百分比可以在整个定义的多核苷酸序列的长度上进行测量,或者可以在较短的长度上,例如,在从较大的、定义的多核苷酸序列取得的片段的长度上进行测量,该片段例如是至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少70或至少150个连续残基的片段。这些长度只是示例性的,并且应该理解,由本文的表格、附图或序列表中所示的序列支持的任何片段长度可以用来描述在其上可以测量同一性百分比的长度。

[0079] “宿主细胞”包括可以是或已经是本发明载体的接受体的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代。该后代因天然的、偶然的或有意的突变而可能不一定与原始亲本细胞完全相同(在总DNA互补体的形态学上或基因组上)。宿主细胞包括在体外用本发明的载体转染的细胞。在一些情况下,宿主细胞是原核细胞。在一些实例中,该原核细胞是大肠杆菌。在另一些情况下,宿主细胞是真核细胞。

[0080] “载体”是优选地在适当的宿主中自我复制的核酸分子,其将插入的核酸分子转移至宿主细胞之内和/或之间。该术语包括主要起到将DNA或RNA插入至细胞内的作用的载体,主要起到DNA或RNA复制的作用的载体复制,以及起到DNA或RNA转录和/或翻译的作用的表达载体。还包括提供多于一种上述作用的载体。“表达载体”是当被引入至合适的宿主细胞中时可以被转录并翻译成多肽的多核苷酸。“表达系统”通常意指包含能够用以产生所需表达产物的表达载体的合适的宿主细胞。

[0081] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指本文所述化合物足以实现下文所定义的预期应用(包括但不限于疾病治疗)的量。治疗有效量可根据预期的应用(体外或者体内)或者所治疗的受试者和疾病状况,例如受试者的体重和年龄、疾病状况的严重程度、施用方式等不同,其可容易地由本领域普通技术人员来确定。该术语也适用于将会诱导靶细胞中的特定响应,例如靶基因诱导和/或细胞凋亡的剂量。具体剂量将根据所选择的特定化合物、将遵循的给药方案、是否与其它化合物联合施用、施用时机、施用的组织和将其携带的物理递送系统而不同。

[0082] 如本文所用,“治疗”或“进行治疗”或“减轻”或“改善”在本文中可互换使用。这些术语是指用于获得有益或期望的结果(包括但不限于治疗益处和/或预防益处)的方法。所谓治疗益处意指正在治疗的潜在病症的根除或改善。另外,如下所述也获得治疗益处:一种或多种与潜在病症相关的生理学症状根除或改善,使得在受试者中观察到改善,尽管该受试者可能仍受潜在病症的折磨。对于预防益处,可以将组合物施用于具有发展成特定疾病的风险的受试者或报告了疾病的一个或多个生理症状的受试者,即使可能还没有作出该疾病的诊断。

[0083] 在本文中使用时,术语“治疗效果”涵盖上文所述的治疗益处和/或预防益处。预防效果包括延迟或消除疾病或状况的出现,延迟或消除疾病或状况的症状发作,减缓、停止或逆转疾病或状况的进展,或它们的任意组合。

[0084] 如本文所用,术语“共同施用”、“联合施用”及其语法等同词涵盖向动物施用两种或更多种药剂,使得药剂和/或其代谢物同时存在于受试者中。共同施用包括在分开的组合物中同时施用,在分开的组合物中在不同时间施用,或在存在两种试剂的组合物中施用。

[0085] 术语“药学上可接受的盐”是指由多种本领域公知的有机和无机抗衡离子衍生的盐,并且包括,仅举例而言,当分子包含酸性官能团时,钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等的盐;和当分子包含碱性官能团时,有机或无机酸的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐(甲烷磺酸盐)、乙磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐、磷酸盐等。在具有多于一个碱性部分的化合物中,多于一个碱性部分可转化成盐形式,包括但不限于双盐或三盐。或者,具有多于一个碱性部分的化合物可仅在一个碱性部分处形成盐。

[0086] 术语“拮抗剂”和“抑制剂”可互换使用,并且它们是指具有抑制靶蛋白质的生物功能的能力的化合物,无论是通过抑制靶蛋白质的活性或表达。因此,术语“拮抗剂”和“抑制剂”在靶蛋白质的生物学作用的背景中定义。尽管本文优选的拮抗剂特异性地与靶标相互作用(例如结合),但是通过与信号转导途径(该靶蛋白质是该途径的成员)的其它成员相互作用来抑制靶蛋白质的生物活性的化合物也特别地包含于该定义内。被拮抗剂抑制的优选生物活性与肿瘤的发展、生长或扩散相关。

[0087] 如本文所用的术语“激动剂”是指具有启动或增强靶蛋白质的生物功能的能力的化合物,无论是通过抑制还是增强靶蛋白质的活性或表达。因此,术语“激动剂”在靶多肽的生物学作用的背景中定义。尽管本文优选的激动剂特异性地与靶标相互作用(例如结合),但通过与信号转导途径(该靶多肽是该途径的成员)的其它成员相互作用来启动或增强靶多肽的生物活性的化合物也特别地包含于该定义内。

[0088] 如本文所用,“药剂”或“生物活性剂”是指生物学的、药学的或化学的化合物或其它部分。非限制性实例包括简单的或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、碳水化合物、毒素或化学治疗化合物。可以基于各种核心结构合成各种化合物,例如,小分子和寡聚体(例如寡肽和寡核苷酸)以及合成的有机化合物。另外,各种天然来源可以提供用于筛选的化合物,例如植物或动物提取物等。

[0089] “抗癌剂”、“抗肿瘤剂”或“化疗剂”是指在瘤状况的治疗中有用的任何药剂。一类抗癌剂包括化疗剂。“化疗”意指通过各种方法,包括静脉内、口服、肌内、腹膜内、膀胱内、皮下、经皮、经颊或吸入或以栓剂的形式,向癌症患者施用一种或多种化疗药物和/或其它药剂。

[0090] 术语“细胞增殖”是指因分裂而改变细胞数目的现象。此术语也涵盖细胞生长,该细胞生长使得细胞形态学发生与增殖信号一致的改变(例如,尺寸增加)。

[0091] 术语“选择性抑制”或“选择性地抑制”是指生物活性剂,其是指该试剂通过与靶标的直接或间接相互作用,与脱靶信号活性相比,优先降低靶信号活性的能力。

[0092] 术语“体内”是指在受试者体内发生的事件。

[0093] 术语“体外”是指在受试者体外发生的事件。例如,体外试验涵盖在受试者试验之外运行的任何试验。体外试验涵盖基于细胞的试验,其中采用活细胞或死细胞。体外试验还涵盖无细胞试验,其中不采用完整的细胞。

[0094] 多肽的命名法

[0095] 本文中可互换地使用多肽命名法、有机化学命名法、化学式、氨基酸序列或其混合来命名多肽。例如,IL28B的类似物中的置换也可表示为“原始氨基酸-位置-置换的氨基酸”。

[0096] 因此,符号“C175S IL28B”或“Cys175Ser IL28B”的意思是,当类似物与IL28B如下所述进行比对(“比对”)时,该IL28B类似物在与IL28B(SEQ ID NO:2)中的第175位氨基酸相对应的类似物氨基酸位置处包含半胱氨酸至丝氨酸的置换。多个置换可以用逗号隔开(逗号后有空格)并用括号环绕,以清楚地表明它们属于同一类似物。因此,“(C168S,C175S) IL28B”的意思是,该IL28B类似物在与IL28B(SEQ ID NO:2)中的第168和175位氨基酸相对应的类似物氨基酸位置处包含两个半胱氨酸至丝氨酸的置换。

[0097] IL28B的类似物中的延伸可以如下描述:参照SEQ ID NO:2,向所讨论的化合物上添加位置编号(在C末端使用连续的正数而在N末端使用负数),或者更简单地,使用其正确的序列添加所讨论的延伸的氨基酸。因此,M-IL28B表示参照SEQ ID NO:2在位置-1处具有M的SEQ ID NO:2的多肽。

[0098] IL29的类似物中的插入可描述为:“插入前的氨基酸位置编号-索引-插入的氨基酸”。插入前的氨基酸位置编号是指IL29(SEQ ID NO:1)中恰在缺口前的氨基酸位置,该缺口在插入类似物与IL29如下所述进行比对(“比对”)时产生。该索引是按字母顺序的小写字母,例如,“a”表示第一个插入的氨基酸,“b”表示第二个插入的氨基酸,等等。因此,“82aD IL29”表示在IL29(SEQ ID NO:1)中的氨基酸位置82后插入甘氨酸的IL29的类似物。

[0099] IL28B的类似物中的缺失可描述为:“des缺失的氨基酸-缺失的氨基酸位置”或“d缺失的氨基酸-缺失的氨基酸位置”。缺失的氨基酸位置是指IL28B(SEQ ID NO:2)中在缺口处的氨基酸位置,该缺口在该类似物与IL28B如下所述进行比对(“比对”)时产生。因此,“des V2IL28B”表示在IL28B(SEQ ID NO:2)的第2位处缺失缬氨酸残基的IL28B的类似物。

[0100] 如果需要的话,两个氨基酸序列的比对可以通过使用来自EMBOSS软件包的Needle程序(http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)来进行。Needle程序执行全局比对算法(J.Mol.Biol.1970,48:443-453)。使用的取代矩阵是BLOSUM62,空位开启罚分是50且空位延伸罚分是0.5。

[0101] 融合多肽、宿主细胞和载体

[0102] 本发明涉及可用于治疗哺乳动物中的疾病状况的融合多肽。该融合多肽可以包含来自蛋白质家族的第一同种型的第一片段和来自第二同种型的第二片段。在一些情况下,第一和第二同种型都可以是相同蛋白质家族的成员。在另一些情况下,第一和第二同种型

可以属于不同的蛋白质家族。在一些实例中,该融合多肽可以包含来自第一和第二干扰素 λ 同种型的片段。干扰素 λ 同种型的实例包括但不限于IL28A、IL28B和IL29的各种同种型。在一些实例中,第一干扰素 λ 同种型是IL28B同种型,包括但不限于SEQ ID NO:2中描述的那些。在一些实例中,第二干扰素 λ 同种型是IL29同种型,包括但不限于SEQ ID NO:1中描述的那些。在进一步的实例中,第一干扰素 λ 同种型是IL28B同种型且第二干扰素 λ 同种型是IL29同种型。

[0103] 在一些情况下,该片段可以在融合位点处融合在一起,从而形成连续的多肽。在一些实例中,该融合位点可包含与在第一和第二同种型中发现的相应序列相同的至少约6个氨基酸的序列。在进一步的实例中,该融合位点可包含与在第一和第二同种型中发现的相应序列相同的至少约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的序列。在第一和第二同种型各自为干扰素 λ 同种型的情况下,融合位点可包含与在第一和第二干扰素 λ 同种型中发现的相应序列相同的至少约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的序列。

[0104] 不希望受到任何特定理论的束缚,使融合位点享有与第一和第二同种型的序列同一性特别有利于避免由融合事件导致的新表位,从而避免不期望的免疫原性。一般来说,针对存活对T细胞进行严格筛选,并且它们经受阳性和阴性选择,以产生识别自身的主要组织相容性复合体(MHC)分子但不识别天然肽的T细胞。由MHC I类分子呈现的T细胞表位通常是8至11个氨基酸长度的肽,而MHC II类分子呈现13-17个氨基酸长度的较长的肽。如果代表T细胞表位的所有可能的肽序列是天然的,则融合多肽尽管在整体上是非天然的,但可因此成为非免疫原性的或较低免疫原性的。通过在具有在两个融合配偶体中相同的至少6个连续氨基酸(以避免主要的非天然MHC I类结合性9聚体T表位)、在两个融合配偶体中相同的至少10个连续氨基酸(以避免大部分非天然MHC I类结合性T表位)或在两个融合配偶体中相同的至少16个连续氨基酸(以便除MHC I类结合性T表位外还避免大部分非天然MHC II类结合性T表位)的氨基酸片段中间选择融合位点,可能以可预测的方式产生具有最小免疫原性的融合多肽。

[0105] 在一些情况下,所述融合多肽可具有式I的结构:

[0106] (S1)-(螺旋A)-(S2)-(螺旋C)-(S3)-(螺旋D)-(S4)-(螺旋E)-(S5)-(螺旋F)-(S6)

[0107] 其中,螺旋A、螺旋C、螺旋D、螺旋E和螺旋F中的每一个独立地是 α 螺旋,并且其中S1、S2、S3、S4、S5和S6中的每一个独立地是间隔序列。

[0108] 在一些情况下,螺旋A可包含与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44或IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。在一些实例中,螺旋A可以与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段相同。在其它实例中,螺旋A可以与具有IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段相同。

[0109] 在一些情况下,螺旋C可包含与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87或IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。在一些实例中,螺旋C可以与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段相同。在其它实例中,螺旋C可以与具有IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段相同。

[0110] 在一些情况下,螺旋D可包含与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约V98至Q112或IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约V89至Q103的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。在一些实例中,螺旋D可以与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约V98至Q112的残基的片段相同。在其它实例中,螺旋D可以与具有IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约V89至Q103的残基的片段相同。

[0111] 在一些情况下,螺旋E可包含与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约R130至E145或IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约R121至E136的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。在一些实例中,螺旋E可以与具有IL28B肽(SEQ ID NO:2)的从约R130至E145的残基的片段相同。在其它实例中,螺旋E可以与具有IL29肽(SEQ ID NO:1)的从约R121至E136的残基的片段相同。

[0112] 在一些情况下,螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170或IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。在一些实例中,螺旋F可以与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段相同。在其它实例中,螺旋F可以与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段相同。

[0113] 在一些情况下,S1、S2、S3、S4、S5和S6中的每一个可独立地具有1个至约5个、1个至约10个、1个至约15个、1个至约20个、1个至约30个、1个至约40个、1个至约50个、1个至约60个、1个至约80个或1个至约100个的氨基酸残基。在一些实例中,S2可进一步包含螺旋B。

[0114] 在一些实施方案中,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少约80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少约80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少约80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0115] 在其它实施方案中,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0116] 在又一些其它实施方案中,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的

氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0117] 在一些实施方案中,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0118] 在其它实施方案中,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约P27至L44的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约R56至A80的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约G148至A170的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0119] 在又一些其它实施方案中,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少约50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%同源性的氨基酸序列。例如,螺旋A可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约P20至L37的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,螺旋C可包含与具有IL28B(SEQ ID NO:2)的从约R63至A87的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列,且螺旋F可包含与具有IL29(SEQ ID NO:1)的从约G139至A161的残基的片段展现出至少95%同源性的氨基酸序列。

[0120] 在一些情况下,所述融合多肽可保留第一和/或第二同种型的二级结构。同种型的

二级结构可由包括但不限于 α -螺旋和 β -折叠在内的二级单元的数目和/或顺序来定义。在一些实例中,该融合多肽可包含与第一和/或第二同种型的这些相同的二级单元的数目和顺序。在第一和第二同种型各自是干扰素 λ 同种型的情况下,该融合多肽可保留IL28B肽(SEQ ID NO:2)或IL29肽(SEQ ID NO:1)的二级结构。

[0121] 在一些情况下,该融合多肽可基本上不含被人T细胞识别的表位。先前已经公开了旨在产生免疫原性较低的蛋白质的此类表位的消除;参见例如通过引用并入本文的W0 98/52976、W0 02/079232和W0 00/3317。对人T细胞表位的测定已经进行了描述(Stickler, M.等(2003) *J Immunol Methods*, 281:95-108)。特别感兴趣的是可以被寡聚化而不产生T细胞表位或非人序列的肽序列。这通过以下步骤来实现:检测这些序列的直接重复中T细胞表位的存在和6至15-mer的出现,特别是非人的9-mer序列的出现,然后改变XTEN序列的设计以消除或破坏该表位序列。随着能够与MHC受体结合的表位数目的减少,存在T细胞激活以及T细胞辅助功能的潜力的伴随降低、降低的B细胞激活或上调和减少的抗体产生。预测的T细胞表位的低程度可通过表位预测算法,例如TEPITOPE (Sturniolo, T.等(1999) *Nat Biotechnol*, 17:555-61) 来确定。

[0122] 在一些情况下,该融合多肽与IL28B肽(SEQ ID NO:2)或IL29肽(SEQ ID NO:1)的T-表位相比,可以缺乏任何额外的T-表位。在进一步的情况下,该融合多肽与IL28B肽(SEQ ID NO:2)或IL29肽(SEQ ID NO:1)的T-表位相比,可以具有较少的T-表位。

[0123] 在一些情况下,该融合多肽与IL28B肽(SEQ ID NO:2)或IL29肽(SEQ ID NO:1)的B-表位相比,可以缺乏任何额外的B-表位。在进一步的情况下,该融合多肽与IL28B肽(SEQ ID NO:2)或IL29肽(SEQ ID NO:1)的B-表位相比,可以具有较少的B-表位。

[0124] 在各种情况下,该融合多肽可进一步在与IL28B肽(SEQ ID NO:2)相对应的氨基酸残基中包含至少一个修饰,其中该至少一个修饰选自dV2、dP3、dV4、dA5、dR6、dL7、dR8、G9K、A10P、L11T、P12T、D13T、A14G、R15K、A20G、Q21R、Q31A、A32S、R35K、K37R、L45K、D48N、C49W、K50S、R52S、R54P、L55V、R58G、T59N、Q64L、T88A、dD90、dT91、D92P、G96E、R114Q、T127P、C168S、C175S、P3G、V4P、A5V、R6P、L7T和R8S。

[0125] 在各种情况下,该融合多肽可进一步在与IL29肽(SEQ ID NO:1)相对应的氨基酸残基中包含至少一个修饰,其中该至少一个修饰选自R14Q、L57Q、A81T、82aD、82bT、G83D、E87G、Q105R、P118T和D162E。

[0126] 在一些情况下,该融合多肽可进一步包含融合位点,该融合位点包含与IL28B(SEQ ID NO:2)和IL29(SEQ ID NO:1)中的相应序列相同的至少约2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸的序列。在其它情况下,该融合位点可包含与IL28B(SEQ ID NO:2)和IL29(SEQ ID NO:1)中的相应序列相同的约11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸的序列。

[0127] 在一些情况下,该融合位点可以包含与至少两个干扰素 λ 同种型的相应序列相同的至少约2至30、约3至25、约4至20、约5至15或约6至10个氨基酸的序列。

[0128] 在一些情况下,该融合多肽可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。例如,该融合多核苷酸可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)的至少约90%的序列同源性。进一步地,融合多肽可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)

的至少约95%的序列同源性。

[0129] 在一些情况下,该融合多肽可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)的小于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列同源性。例如,该融合多肽可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)的小于约80%的序列同源性。进一步地,该融合多肽可以展现出与IL28B(SEQ ID NO:2)的小于约50%的序列同源性。

[0130] 在一些情况下,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。例如,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的至少约90%的序列同源性。进一步地,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的至少约95%的序列同源性。

[0131] 在一些情况下,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的小于约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列同源性。例如,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的小于约90%的序列同源性。进一步地,该融合多肽可以展现出与IL29(SEQ ID NO:1)的小于约50%的序列同源性。

[0132] 在一些情况下,可以进一步修饰该融合多肽。该修饰可以在N-末端、C-末端或在任意反应性氨基酸侧链处发生。

[0133] 在一些实施方案中,该融合多肽可以进一步用聚乙二醇(PEG)修饰。聚乙二醇的实例包括但不限于单甲氧基PEG马来酰亚胺、单甲氧基PEG碘乙酰胺或单甲氧基PEG丙醛。另外,聚乙二醇可以具有约1Kd至200Kd、约5Kd至200Kd、约5Kd至150Kd、约8Kd至150Kd、约8Kd至100Kd、约10Kd至100Kd、约10Kd至50Kd、约12Kd至50Kd或约12Kd至40Kd的分子量。

[0134] 在一些情况下,聚乙二醇化的融合多肽与蛋白质家族的第一和第二成员相比,可展现出延长的体外半衰期。例如,该融合多肽与IL28B(SEQ ID NO:1)或IL29(SEQ ID NO:2)相比,可展现出延长的体外半衰期。

[0135] 在一些情况下,该融合多肽与蛋白质家族的第一和第二成员相比,可展现出增强的化学稳定性。例如,该融合多肽与IL28B(SEQ ID NO:2)或IL29(SEQ ID NO:2)相比,可展现出增强的化学稳定性。

[0136] 该融合多肽可以包含选自SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0137] 本发明还提供表达本文公开的融合蛋白的宿主细胞。宿主细胞包括单个细胞、细胞培养物或细胞系。宿主细胞包括单一宿主细胞的后代。宿主细胞可以用包括本发明的载体的异源序列转染。宿主细胞可以是原核的或真核的,例如细菌细胞、真菌细胞、动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等。细菌宿主细胞的实例包括属于埃希氏菌属(*Escherichia*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等的微生物。例如,细菌宿主细胞可以包括但不限于大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1-Blue、XL2-Blue、DH1、MC1000、KY3276、W1485、JM109、HB101、No. 49、i W3110、NY49、G1698、BL21或TB1。其它细菌宿主细胞可以包括但不限于无花果沙雷氏菌(*Serratia ficaria*)、居泉沙雷氏菌

(*Serratia fonticola*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、产氨短杆菌(*Brevibacterium ammoniagenes*)、*Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068、解糖短杆菌(*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC 14066、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067、乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032、谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13869、嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC 13870、嗜氨微杆菌(*Microbacterium ammoniophilum*) ATCC15354; 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、假单胞菌(*Pseudomonas sp.*) D-0110等。

[0138] 酵母宿主细胞可以包括属于克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、丝孢酵母属(*Trichosporon*)、酵母属(*Saccharomyces*)、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)、许旺酵母属(*Schwanniomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)等的微生物,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、茁芽丝孢酵母(*Trichosporon pullulans*)、河岸许旺酵母属(*Schwanniomyces alluvius*)、产脲假丝酵母(*Candida utilis*)等的微生物。

[0139] 真核细胞的实例包括动物细胞,如哺乳动物细胞。例如,宿主细胞包括但不限于中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或猴细胞,例如COS细胞、HepG2细胞、A549细胞,和可通过ATCC或其它保藏机构获得的任何细胞。

[0140] 本公开内容的宿主细胞可以在培养物中以及在可以用来使培养物生长的任何设备(包括发酵罐)中生长。它们可以生长为单层或贴附至表面。或者,宿主细胞可以悬浮生长。细胞可以在不含血清的培养基中生长。该培养基可以是商业可得的培养基,例如但不限于用谷氨酰胺如8mM L-谷氨酰胺补充的Opti-CHO (Invitrogen, Catalogue#12681)。

[0141] 本公开内容的宿主细胞可以包含异源序列以实现本发明融合多肽的表达。该异源序列可以包含载体,该载体是优选地自我复制的核酸分子,其将所插入的核酸分子转移到宿主细胞之内和/或之间。载体可以包括主要起到将DNA或RNA插入至细胞内的作用的载体,主要起到DNA或RNA复制的作用的载体复制,以及起到DNA或RNA转录和/或翻译的作用的表达载体。还包括提供多于一种上述作用的载体。表达载体是当被引入到合适的宿主细胞中时可以被转录并翻译成多肽的多核苷酸。

[0142] 编码本发明的融合蛋白的异源序列可以由单种或多种载体表达。核酸序列可以在单个操纵子中或在置于一种或多种载体中的单独的操纵子中以任何顺序布置。当需要时,可以利用2种或更多种表达载体,其各自包含在单个操纵子中有效连接的一个或多个异源序列。连接的是指通过包括化学偶联或重组手段在内的任何手段将两个或更多个化学元件或组分连接在一起。有效连接的是指并置,其中如此描述的组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子序列促进编码序列的转录,则该启动子序列连接或有效连接至该编码序列。本发明载体可以是可附加型复制的,或作为宿主细胞基因组的组成部分。

[0143] 本公开内容的异源序列可以处于单个调节元件的控制下。在一些情况下,异源核酸序列由单个启动子调节。在其它情况下,异源核酸序列被置于单个操纵子内。在又一些情

况下,异源核酸序列被置于单个阅读框内。

[0144] 本发明核酸的制备可以通过多种常规重组技术和合成程序进行。标准的重组DNA和分子克隆技术在本领域中是公知的,并由Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis) 和 T. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) 和 Ausubel, F.M. 等, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) 描述。简言之,本发明核酸可以被制备为基因组DNA片段、cDNA和RNA,其全部可以从细胞中直接提取或通过包括但不限于PCR和rtPCR的多种扩增方法重组地产生。

[0145] 核酸的直接化学合成通常涉及3'-封端的和5'-封端的核苷酸单体向生长的核苷酸聚合物链的末端5'-羟基上的顺序添加,其中各个添加通过生长链的末端5'-羟基对添加的单体的3'-位的亲核攻击而实现,该添加的单体通常是磷衍生物,例如磷酸三酯、亚磷酸酰胺等。此方法是本领域普通技术人员已知的并描述在相关文本和文献中(例如,Matteucci等, *Tet. Lett.* 521:719 (1980); 授予Caruthers等的美国专利4,500,707; 和授予Southern等的美国专利5,436,327和5,700,637)。

[0146] 调节元件包括例如启动子和操纵基因,其还可以被工程化以增加编码糖蛋白的一个或多个异源序列的表达。启动子是启动和控制通过RNA聚合酶的核酸序列转录的核苷酸序列。操纵基因是与启动子相邻的起到控制所需核酸序列的转录的作用的核苷酸序列。操纵基因包含蛋白质结合域,在其中可以结合特定的阻抑蛋白。在缺少合适的阻抑蛋白的情况下,转录通过启动子启动。在存在合适的阻抑蛋白的情况下,阻抑蛋白结合至操纵基因并由此抑制自启动子的转录。

[0147] 在本公开内容的一些实施方案中,表达载体中所用的启动子是诱导型的。在其它一些实施方案中,表达载体中所用的启动子是组成型的。在一些实施方案中,一个或多个核酸序列有效连接至诱导型启动子,而一个或多个其它核酸序列有效连接至组成型启动子。用于真核宿主细胞的合适启动子的非限制实例包括但不限于CMV立即早期启动子、HSV胸苷激酶启动子、早期或晚期SV40启动子、来自逆转录病毒的LTR和小鼠金属硫蛋白-I启动子。

[0148] 表达载体中的基因通常也将编码核糖体结合位点以引导任何编码的mRNA基因产物的翻译(即,合成)。可以在表达载体中使用的其它调节元件包括转录增强子元件和转录终止子。参见,例如Bitter等, *Methods in Enzymology*, 153:516-544 (1987)。

[0149] 表达载体可以适用于特定类型的宿主细胞而非其它宿主细胞。但是,本领域普通技术人员可以通过常规的试验容易地确定特定的表达载体是否适用于给定的宿主细胞。例如,可以将表达载体引入到宿主生物体中,随后监测其存活性和在载体中包含的任何基因的表达。

[0150] 表达载体还可包含一个或多个选择性标记基因,该选择性标记基因经表达,赋予对于选择或以其它方式鉴别携带该表达载体的宿主细胞有用的一种或多种表型性状。用于真核细胞的合适的选择性标记的非限制性实例包括二氢叶酸还原酶和新霉素抗性。

[0151] 可以通过多种已建立的技术将本发明的载体稳定地或暂时地引入宿主细胞中。例如,一种方法涉及氯化钙处理,其中通过钙沉淀引入表达载体。其它盐,例如磷酸钙,也可以

依循相似的程序使用。此外,可以使用电穿孔(即,施加电流以提高细胞对核酸的通透性)。其它转化方法包括显微注射、DEAE葡聚糖介导的转化和在乙酸锂存在下的热激。脂质复合物、脂质体和树状聚体也可以用于转染宿主细胞。

[0152] 在异源序列引入宿主细胞中后,可以实施多种方法来鉴别已经引入本发明载体的宿主细胞。一种示例性选择方法涉及传代培养单个细胞以形成单个群落,接着检测所需蛋白质产物的表达。另一种方法需要基于通过包含在表达载体中的选择性标记基因的表达而赋予的表型性状来选择包含异源序列的宿主细胞。普通技术人员可以使用这些或本领域中可得的其它方法鉴别遗传修饰的宿主细胞。

[0153] 例如,本公开内容的多种异源序列向宿主细胞中的引入可以通过诸如PCR、Southern印迹或Northern印迹等方法来证实。例如,核酸可以由所得宿主细胞制备,且感兴趣的特定序列可以通过使用对感兴趣的序列具有特异性的引物的PCR来扩增。扩增的产物经历琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳或毛细管电泳,接着用溴化乙锭、SYBR Green溶液等染色,或用UV检测来检测DNA。或者,可以在杂交反应中使用对所感兴趣的序列具有特异性的核酸探针。可以通过经由逆转录耦合的PCR、Northern印迹杂交而检测相应的mRNA,或者通过使用对编码的基因产物具有反应性的抗体进行免疫测定,来确定特定基因序列的表达。示例性免疫测定包括但不限于ELISA、放射免疫测定和夹心免疫测定。

[0154] 此外,本公开内容的多种异源序列向宿主细胞中的引入可以通过异源序列所编码的酶的酶活性来证实。所述酶可以通过本领域中已知的多种方法测定。通常,酶活性可以通过所研究的酶反应的产物的形成或底物的转化来确定。该反应可以在体外或在体内发生。

[0155] 在另一个方面,本发明提供了产生融合多肽以实现所需药代动力学、药理学或药理学性质的方法。在一些情况下,该融合多肽可以通过在适于蛋白质表达的条件下在细胞中表达载体而产生。

[0156] 用于蛋白质表达的合适的条件,包括但不限于诸如温育时间、温度和培养基等因素,可以取决于细胞类型并且将由本领域普通技术人员容易地确定。

[0157] 治疗方法

[0158] 在一个方面,本发明提供了使用本发明的融合多肽治疗哺乳动物中的疾病状况的方法,该疾病状况包括但不限于与干扰素 λ 受体(IFN λ R1和/或IL10R2)功能障碍有关的状况。

[0159] 在一些情况下,本发明提供了在有需要的哺乳动物中治疗病毒感染的方法,包括向哺乳动物施用治疗有效量的本发明的融合多肽。在一些实例中,该病毒感染可以由乙型肝炎或丙型肝炎造成。在其它实例中,该病毒感染可以由流感造成。病毒感染的其它实例包括但不限于1型人嗜淋巴细胞病毒(HTLV-1)和人乳头瘤病毒(HPV)。

[0160] 在其它情况下,本发明提供了在有需要的哺乳动物中治疗炎性病症的方法,包括向哺乳动物施用治疗有效量的本发明的融合多肽。在一些情况下,该炎性病症可以是多发性硬化。在其它情况下,该炎性病症可以是自身免疫性疾病。自身免疫性疾病的实例包括但不限于急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、阿狄森病、抗磷脂抗体综合征(APS)、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、腹部疾病、克罗恩病、糖尿病(1型)、古德帕斯彻综合征、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征(GBS)、桥本病、红斑狼疮、多发性硬化、重症肌无力、眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)、视神经炎、奥德甲状腺炎、天疱疮(oemphigus)、多关节炎、原发性胆汁性肝硬变、牛

皮癣、类风湿性关节炎、莱特尔综合征、高安动脉炎、颞动脉炎(也称为“巨细胞性动脉炎”)、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病、普秃、恰加斯病、慢性疲劳综合征、自主神经机能异常(dysautonomia)、子宫内膜异位症、化脓性汗腺炎、间质性膀胱炎、神经性肌强直、肉瘤样病、硬皮病、溃疡性结肠炎、白癜风和外阴痛。其它病症包括骨吸收病症和血栓症。

[0161] 在进一步的情况下,本发明提供了在有需要的哺乳动物中治疗癌症的方法,包括向哺乳动物施用治疗有效量的本发明的融合多肽。在一些情况下,该癌症可以是肝细胞癌。在其它情况下,该癌症可以是急性髓样白血病、胸腺癌、脑癌、肺癌、鳞状细胞癌、皮肤癌、眼癌、视网膜母细胞瘤、眼内黑素瘤、口腔和口咽癌、膀胱癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、头癌、颈癌、肾脏癌症、肾癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、结直肠癌、食道癌、睾丸癌、妇科癌症、甲状腺癌、CNS、PNS、AIDS相关的癌症(例如淋巴瘤和卡波西肉瘤)或病毒诱导的癌症。

[0162] 另外地,本文所述的融合多肽可以用于治疗滑囊炎、狼疮、急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、阿狄森病、抗磷脂抗体综合征(APS)、再生障碍性贫血、自身免疫性肝炎、腹部疾病、克罗恩病、糖尿病(1型)、古德帕斯彻综合征、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征(GBS)、桥本病、炎性肠病、红斑狼疮、重症肌无力、眼阵挛肌阵挛综合征(OMS)、视神经炎、奥德甲状腺炎、骨关节炎、葡萄膜视网膜炎(uveoretinitis)、天疱疮、多关节炎、原发性胆汁性肝硬变、莱特尔综合征、高安动脉炎、颞动脉炎、温型自身免疫性溶血性贫血、韦格纳肉芽肿病、普秃、恰加斯病、慢性疲劳综合征、自主神经机能异常、子宫内膜异位症、化脓性汗腺炎、间质性膀胱炎、神经性肌强直、肉瘤样病、硬皮病、溃疡性结肠炎、白癜风、外阴痛、阑尾炎、动脉炎、关节炎、睑炎、细支气管炎、支气管炎、宫颈炎、胆管炎、胆囊炎、绒毛膜羊膜炎、结肠炎、结膜炎、膀胱炎、泪腺炎、皮炎、心内膜炎、子宫内膜炎、肠炎、小肠结肠炎、上髌炎、附睾炎、筋膜炎、纤维织炎、胃炎、胃肠炎、牙龈炎、肝炎、汗腺炎、回肠炎、虹膜炎、喉炎、乳腺炎、脑膜炎、脊髓炎、心肌炎、肌炎、肾炎、脐炎、卵巢炎、睾丸炎、骨炎、耳炎、胰腺炎、腮腺炎、心包炎、腹膜炎、咽炎、胸膜炎、静脉炎、肺炎、直肠炎、前列腺炎、肾盂肾炎、鼻炎、输卵管炎、鼻窦炎、口炎、滑膜炎、腱炎、扁桃体炎、葡萄膜炎、阴道炎、血管炎或外阴炎。

[0163] 在一些情况下,所述哺乳动物是人。在其它情况下,所述哺乳动物可以是小鼠、大鼠、猫、狗、兔、绵羊、马、牛、山羊、沙鼠、仓鼠、豚鼠、猴或任何其它哺乳动物。许多这样的哺乳动物可以是本领域已知作为针对某些疾病或病症的临床前模型的受试者,所述疾病或病症包括实体肿瘤和/或其它癌症(例如,Talmadge等,2007Am. J. Pathol. 170:793;Kerbel, 2003Canc. Biol. Therap. 2 (4Suppl 1):S134;Man等,2007Canc. Met. Rev. 26:737;Cespedes等,2006Clin. Transl. Oncol. 8:318)。

[0164] 在另一个方面,本发明提供使用本发明的融合多肽治疗哺乳动物中的疾病状况的方法,其中该融合多肽可以与第二药剂一起配制或施用。在一些情况下,第二药剂可以是抗病毒剂。这些药剂包括但不限于替拉瑞韦、波普瑞韦、西美瑞韦(semiprevir)、索非布韦、达卡他韦、阿苏纳帕韦、拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替诺福韦、替比夫定、干扰素 α 和聚乙二醇化干扰素 α 。在其它情况下,第二药剂可以是起到缓解炎性状况如脑脊髓炎、哮喘和本文所述的其它疾病的症状的作用的药剂。这些药剂包括非甾体抗炎药(NSAID),例如乙酰水杨酸、布洛芬、萘普生、吲哚美辛、萘丁美酮、托美汀等。皮质类固醇用于减轻炎症和抑制免疫系统的活性。最常开出的这一类型的药物是泼尼松。在一些患有狼疮的个人中,氯喹

(Aralen)或羟氯喹(Plaquenil)也可以是非常有用的。对于狼疮的皮肤和关节症状,最常开出这两种药物。硫唑嘌呤(Imuran)和环磷酰胺(Cytoxan)抑制炎症并倾向于抑制免疫系统。其它药剂,例如甲氨蝶呤和环孢素,用于控制狼疮的症状。使用抗凝剂防止血液快速凝结。它们的范围是从防止血小板粘的极低剂量的阿司匹林到肝素/香豆素。

[0165] 在进一步的情况下,该药剂可以是抗癌剂(例如化疗剂)。该化疗剂可以选自有丝分裂抑制剂、烷化剂、抗代谢药、嵌入抗生素、生长因子抑制剂、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物应答调节剂、抗激素、血管生成抑制和抗雄激素。化疗剂、细胞毒性剂和非肽小分子的非限制性实例包括但不限于: **Gleevec[®]** (甲磺酸伊马替尼)、**Velcade[®]** (硼替佐米)、康士得(Casodex)(比卡鲁胺)、**Iressa[®]** (吉非替尼)和亚德里亚霉素以及众多的化疗剂。化疗剂的非限制性实例包括:烷化剂,如噻替派和环磷酰胺(CYTOXAN[™]);烷基磺酸酯,如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替派;乙烯亚胺和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲蜜胺;氮芥类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥、异环磷酰胺、氮芥(mechlorethamine)、氧化氮芥盐酸盐、美法仑、新恩比星(novembichin)、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、曲磷胺、尿嘧啶氮芥;亚硝基脲类,如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素类,如阿柔比星(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、加利车霉素、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌菌素、Casodex[™]、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢药,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素类,如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺药,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充物,如亚叶酸(frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;安吡啶;贝拉布昔(bestrabucil);比生群;依达曲沙;地磷酰胺(defofamine);地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸(elfomithine);依利醋胺;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;尼曲吡啶;喷司他丁;蛋氨酸氮芥;吡柔比星;鬼臼酸;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK.R[™];雷佐生;西左非兰;锗螺胺;替奴佐酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露醇氮芥;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;加西托星(gacytosine);阿糖胞苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类,例如紫杉醇(TAXOL[™], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)和多西他赛(TAXOTERE[™], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);维A酸;埃斯波霉素;卡培他滨;及任何上述药物的药学上可接受的盐、酸或衍生物。作为合适的化疗细胞调节剂也包括抗激素剂,其用于调节或抑制激素对肿瘤的作用,如抗雌激素类,包括例如他莫昔芬、(Nolvadex[™])、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基泰米芬、曲奥昔芬、雷洛昔芬、LY 117018、奥那司酮和托瑞米芬(法乐通(Fareston));和抗雄激素类,如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;苯

丁酸氮芥;吉西他滨;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物,如顺铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺维本;诺肖林;替尼泊苷;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;喜树碱-11(CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO)。在需要时,本发明的融合多肽可以与如下常开出的抗癌药物联合使用,如

Herceptin[®]、Avastin[®]、Erbix[®]、Rituxan[®]、Taxol[®]、Arimidex[®]、Taxotere[®]、ABVD、AVICINE、阿巴伏单抗、吡啶甲酰胺、阿德木单抗、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素、Alpharadin、阿伏西地、3-氨基吡啶-2-甲醛缩氨基硫脲、氨茶非特、葱二酮、抗CD22免疫毒素、抗肿瘤药、抗肿瘤发生草药、阿帕齐醌、阿替莫德、硫唑嘌呤、贝洛替康、苯达莫司汀、BIBW 2992、比立考达、溴他利星、苔藓抑素、丁硫氨酸硫酸亚胺、CBV(化疗)、花萼海绵诱癌素、细胞周期非特异性抗肿瘤药、二氯乙酸、圆皮海绵内酯、依沙芦星、依诺他滨、爱波喜龙、艾立布林、依维莫司、依沙替康、依昔舒林、铁锈醇、呋咯地辛、磷雌酚、ICE化疗方案、IT-101、伊美克、咪喹莫德、吡啶并咪唑、伊罗夫文、拉尼喹达、拉罗他赛、来那度胺、硫蒽酮、勒托替康、马磷酰胺、米托唑胺、萘福昔定、奈达铂、奥拉帕利、奥他赛、PAC-1、番木瓜、匹克生琼、蛋白酶体抑制剂、蝴蝶霉素、瑞喹莫德、卢比替康、SN-38、盐孢菌素A(Salinosporamide A)、沙帕他滨、Stanford V、苦马豆素、他拉泊芬、他立喹达、替加氟-尿嘧啶、替莫唑胺、替司他赛、四硝酸三铂、三(2-氯乙基)胺、曲沙他滨、乌拉莫司汀、伐地美生、长春氟宁、ZD6126和佐舒喹达。

[0166] 药物组合物

[0167] 本发明的药物组合物一般包含本发明的活性成分(例如,融合多肽、PEG修饰的融合多肽)或其药学上可接受的盐和/或配位复合物,以及一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体,其包括但不限于惰性固体稀释剂和填充剂、稀释剂、无菌水溶液和多种有机溶剂、渗透促进剂、增溶剂和助剂。下面描述了非限制示例性药物组合物及其制备方法。

[0168] 本发明的药物组合物可以例如是适于作为片剂、胶囊、丸剂、粉末、持续释放制剂、溶液、悬浮液口服,适于作为无菌溶液、悬浮液或乳液肠胃外注射,适于作为软膏或乳膏局部给药,或适于作为栓剂直肠给药的形式。该药物组合物可以是适于单次施用精确剂量的单位剂型。该药物组合物可以进一步包含根据本发明的融合多肽和/或PEG修饰的融合多肽作为活性成分,且可以包含常规药物载体或赋形剂。此外,其可以包含其它药用或药物剂、载体、助剂等。

[0169] 示例性的肠胃外给药形式包括活性多肽和/或PEG修饰的多肽在无菌水溶液如丙二醇水溶液或右旋糖溶液中的溶液或悬浮液。如果需要的话,这样的剂型可以用盐如组氨酸和/或磷酸盐适当地缓冲。

[0170] 在一些情况下,本发明提供用于注射的药物组合物,其含有本发明的多肽或PEG修饰的多肽和适于注射的药物赋形剂。组合物中的组分和药剂量如本文所述。

[0171] 可以掺入本发明的新型组合物以供注射给药的形式包括水性或油性悬浮液或乳液,其具有芝麻油、玉米油、棉籽油或花生油,以及酞剂、甘露醇、右旋糖或无菌水溶液以及类似的药物载体。

[0172] 在盐水中的水性溶液也常规用于注射。也可以采用乙醇、甘油、丙二醇、液体聚乙

二醇等(及其合适的混合物)、环糊精衍生物和植物油。适当的流动性可以如下维持:例如,通过使用包衣,如卵磷脂,在分散体的情况下维持所需要的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂。可以用各种抗菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来阻止微生物的作用。

[0173] 无菌注射溶液可通过下列步骤制备:将本发明的多肽和/或PEG修饰的多肽以所需的量掺入至根据需要具有以上列举的各种其它成分的适当溶剂中,然后过滤灭菌。一般而言,通过将各种灭菌的活性成分掺入至包含基本分散介质和来自以上列举的那些的所需其它成分的无菌载体中来制备分散体。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,某些期望的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,该技术从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加任何额外所需成分的粉末。

[0174] 在一些情况下,本发明提供了用于口服给药的药物组合物,其含有本发明的融合多肽和/或PEG修饰的融合多肽以及适于口服给药的药物赋形剂。

[0175] 在一些情况下,本发明提供了用于口服给药的固体药物组合物,其含有:(i)有效量的本发明的多肽或PEG修饰的多肽;任选的(ii)有效量的第二药剂;以及(iii)适于口服给药的药物赋形剂。在一些实施方案中,该组合物进一步含有:(iv)有效量的第三药剂。

[0176] 在一些情况下,该药物组合物可以是适合于口服的液体药物组合物。适于口服给药的发明的药物组合物可以呈现为离散的剂型,例如胶囊、扁囊剂或片剂,或各自含有预定量的活性成分的液体或气溶胶喷雾剂,作为粉末或为颗粒,溶液,或在水性或非水性液体中的悬浮液,水包油型乳液,或油包水型液体乳液。这样的剂型可通过任何药学方法制备,但所有方法都包括将活性成分与构成一种或多种必需成分的载体相组合的步骤。一般而言,该组合物如下制备:均匀地和紧密地将活性成分与液体载体或细碎的固体载体或两者混合,然后,如果需要的话,将产物成形为所需的呈现形式。

[0177] 本发明进一步包括包含活性成分的无水药物组合物和剂型,因为水可以促进一些多肽的降解。例如,在药学领域中可以加入水(例如,5%)作为模拟长期贮存的手段,以确定诸如制剂的贮存期限或随时间的稳定性等特性。本发明的无水药物组合物和剂型可以使用无水或含有低水分的成分和低水分或低湿度条件来制备。如果预计在制造、包装和/或贮存期间与水分和/或湿气发生实质性接触,则含有乳糖的本发明的药物组合物和剂型可制成无水的。无水药物组合物可以这样制备和贮存,以使其无水性质得到保持。因此,无水组合物可以使用已知防止暴露于水的材料进行包装,使得它们可以包含于合适的制剂用药盒(formulary kit)中。合适的包装的实例包括但不限于气密封的箔、塑料等,单位剂量容器、泡罩包装和条带包装。

[0178] 可以按照常规药物配混技术,将融合多肽与药物载体紧密混合地合并。该载体可根据给药所期望的制剂形式而采取多种形式。在制备用于口服剂型的组合物时,任何常用的药物介质都可用作载体,例如在口服液体剂型(如悬浮液、溶液和酞剂)或气溶胶的情况下的水、二醇、油、醇、调味剂、防腐剂、着色剂等;或者在口服固体制剂的情况下可使用诸如淀粉、糖、微晶纤维素、稀释剂、成粒剂、润滑剂、粘合剂和崩解剂等载体,在一些实施方案中不使用乳糖。例如,在固体口服制剂中,合适的载体包括粉末、胶囊和片剂。如果需要的话,片剂可以通过标准水性或非水性技术进行包衣。

[0179] 适用于药物组合物和剂型的粘合剂包括但不限于,玉米淀粉、马铃薯淀粉或其它

淀粉,明胶,天然和合成的树胶如阿拉伯胶、藻酸钠、藻酸、其它藻酸盐、粉状西黄蓍胶、瓜尔胶,纤维素及其衍生物(例如乙基纤维素、醋酸纤维素、羧甲基纤维素钙、羧甲基纤维素钠),聚乙烯吡咯烷酮,甲基纤维素,预胶化淀粉,羟丙基甲基纤维素,微晶纤维素,以及它们的混合物。

[0180] 用于本文公开的药物组合物和剂型中的合适的填充剂的实例包括但不限于,滑石、碳酸钙(例如,颗粒或粉末)、微晶纤维素、粉状纤维素、葡萄糖结合剂、高岭土、甘露醇、硅酸、山梨醇、淀粉、预胶化淀粉以及它们的混合物。

[0181] 崩解剂可用于本发明的组合中,以提供当暴露于水性环境时崩解的片剂。过多的崩解剂可产生在瓶中即可崩解的片剂。过少则可能不足以发生崩解并因此可以改变活性成分从剂型中的释放速率和程度。因此,可以使用既不过少也过多从而不会有害地改变活性成分的释放的足量的崩解剂来形成本文公开的化合物的剂型。使用的崩解剂的量可以根据制剂的类型和给药方式而不同,并且本领域普通技术人员可以很容易地辨别。约0.5至约15重量%的崩解剂或约1至约5重量%的崩解剂可以在药物组合物中使用。可用于形成本发明的药物组合物和剂型的崩解剂包括但不限于,琼脂、藻酸、碳酸钙、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、聚克立林钾、羟乙酸淀粉钠、马铃薯或木薯淀粉、其它淀粉、预胶化淀粉、其它淀粉、粘土、其它藻胶、其它纤维素、树胶或其混合物。

[0182] 可用于形成本发明的药物组合物和剂型的润滑剂包括但不限于,硬脂酸钙、硬脂酸镁、矿物油、轻质矿物油、甘油、山梨醇、甘露醇、聚乙二醇、其它二醇、硬脂酸、月桂基硫酸钠、滑石、氢化植物油(例如花生油、棉籽油、葵花籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油)、硬脂酸锌、油酸乙酯、月桂酸乙酯、琼脂或它们的混合物。其它的润滑剂包括,例如syloid硅胶、合成二氧化硅的凝聚型气溶胶或其混合物。可任选地以低于药物组合物的约1重量%的量加入润滑剂。

[0183] 当需要水性悬浮液和/或酞剂供口服给药时,其内的活性成分可与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料以及(如果需要的话)乳化剂和/或悬浮剂,连同诸如水、乙醇、丙二醇、甘油及其各种组合的稀释剂一起组合。

[0184] 片剂可以是未包衣的,或通过已知技术进行包衣以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,从而提供在较长时期内的持续作用。例如,可采用时间延迟材料,例如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。口服使用的制剂还可以呈现为硬明胶胶囊,其中活性成分与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙或高岭土混合,或者呈现为软明胶胶囊,其中活性成分与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0185] 可用于形成本发明的药物组合物和剂型的表面活性剂包括但不限于亲水性表面活性剂、亲脂性表面活性剂以及它们的混合物。即,可采用亲水性表面活性剂的混合物,可采用亲脂性表面活性剂的混合物,或者可采用至少一种亲水性表面活性剂和至少一种亲脂性表面活性剂的混合物。

[0186] 具有较低HLB值的表面活性剂是更亲脂性或疏水性的,并且在油中具有较高的溶解度,而具有较高HLB值的表面活性剂是更亲水性的,并且在水溶液中具有更高的溶解度。亲水性表面活性剂通常被认为是HLB值大于约10的那些化合物以及HLB标度通常不适用的阴离子、阳离子或两性离子化合物。类似地,亲脂性(即疏水性)表面活性剂是HLB值等于或小于约10的化合物。然而,表面活性剂的HLB值仅仅是粗略的指导,通常用来支持工业、药物

和化妆品乳液的配制。

[0187] 亲水性表面活性剂可以是离子型的或非离子型的。合适的离子型表面活性剂包括但不限于,烷基铵盐;夫西地酸盐;氨基酸、寡肽和多肽的脂肪酸衍生物;氨基酸、寡肽和多肽的甘油酯衍生物;卵磷脂和氢化卵磷脂;溶血卵磷脂和氢化溶血卵磷脂;磷脂及其衍生物;溶血磷脂及其衍生物;肉碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸酯的盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸酯;单甘油酯和二甘油酯的单乙酰化酒石酸酯和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化的单甘油酯和二甘油酯;单甘油酯和二甘油酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。

[0188] 在上述组中,离子型表面活性剂包括,例如:卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂、溶血磷脂及其衍生物;肉碱脂肪酸酯盐;烷基硫酸酯的盐;脂肪酸盐;多库酯钠;酰基乳酸酯;单甘油酯和二甘油酯的单乙酰化酒石酸酯和二乙酰化酒石酸酯;琥珀酰化的单甘油酯和二甘油酯;单甘油酯和二甘油酯的柠檬酸酯;和它们的混合物。

[0189] 离子型表面活性剂可以是卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰甘油、磷脂酸、磷脂酰丝氨酸、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰甘油、溶血磷脂酸、溶血磷脂酰丝氨酸、PEG-磷脂酰乙醇胺、PVP-磷脂酰乙醇胺、脂肪酸的乳酰酯、硬脂酰-2-乳酸酯、硬脂酰乳酸酯、琥珀酰化单甘油酯、单/二甘油酯的单/二乙酰化的酒石酸酯、单/二甘油酯的柠檬酸酯、胆酰肌氨酸(cholylsarcosine)、己酸酯、辛酸酯、癸酸酯、月桂酸酯、肉豆蔻酸酯、棕榈酸酯、油酸酯、蓖麻油酸酯、亚油酸酯、亚麻酸酯、硬脂酸酯、月桂基硫酸酯、四鲸蜡基硫酸酯(teracecyl sulfate)、多库酯、月桂酰肉碱、棕榈酰肉碱、肉豆蔻酰肉碱及其盐和混合物的离子化形式。

[0190] 亲水性非离子型表面活性剂可以包括但不限于,烷基糖苷;烷基麦芽糖苷;烷基硫代糖苷;月桂基聚乙二醇甘油酯;聚氧化烯烷基醚如聚乙二醇烷基醚;聚氧化烯烷基酚如聚乙二醇烷基酚;聚氧化烯烷基酚脂肪酸酯如聚乙二醇脂肪酸单酯和聚乙二醇脂肪酸二酯;聚乙二醇甘油脂肪酸酯;聚甘油脂肪酸酯;聚氧化烯脱水山梨醇脂肪酸酯如聚乙二醇脱水山梨醇脂肪酸酯;多元醇与由甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和甾醇组成的组的至少一个成员的亲水性酯交换产物;聚氧乙烯甾醇及其衍生物和类似物;聚氧乙烯化维生素及其衍生物;聚氧乙烯-聚氧丙烯嵌段共聚物;和它们的混合物;聚乙二醇脱水山梨醇脂肪酸酯以及多元醇与由甘油三酯、植物油和氢化植物油组成的组的至少一个成员的亲水性酯交换产物。该多元醇可以是甘油、乙二醇、聚乙二醇、山梨醇、丙二醇、季戊四醇或糖类。

[0191] 其它亲水性非离子型表面活性剂包括但不限于,PEG-10月桂酸酯、PEG-12月桂酸酯、PEG-20月桂酸酯、PEG-32月桂酸酯、PEG-32二月桂酸酯、PEG-12油酸酯、PEG-15油酸酯、PEG-20油酸酯、PEG-20二油酸酯、PEG-32油酸酯、PEG-200油酸酯、PEG-400油酸酯、PEG-15硬脂酸酯、PEG-32二硬脂酸酯、PEG-40硬脂酸酯、PEG-100硬脂酸酯、PEG-20二月桂酸酯、PEG-25三油酸甘油酯、PEG-32二油酸酯、PEG-20月桂酸甘油酯、PEG-30月桂酸甘油酯、PEG-20硬脂酸甘油酯、PEG-20油酸甘油酯、PEG-30油酸甘油酯、PEG-30月桂酸甘油酯、PEG-40月桂酸甘油酯、PEG-40棕榈仁油、PEG-50氢化蓖麻油、PEG-40蓖麻油、PEG-35蓖麻油、PEG-60蓖麻油、PEG-40氢化蓖麻油、PEG-60氢化蓖麻油、PEG-60玉米油、PEG-6癸酸酯/辛酸酯甘油酯、PEG-8癸酸酯/辛酸酯甘油酯、聚甘油基-10月桂酸酯、PEG-30胆固醇、PEG-25植物甾醇、PEG-30大豆甾醇、PEG-20三油酸酯、PEG-40脱水山梨醇油酸酯、PEG-80脱水山梨醇月桂酸酯、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、POE-9十二烷基醚、POE-23十二烷基醚、POE-10油基醚、POE-20

油基醚、POE-20硬脂基醚、生育酚PEG-100琥珀酸酯、PEG-24胆固醇、聚甘油基-10油酸酯、吐温40、吐温60、蔗糖单硬脂酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单棕榈酸酯、PEG10-100壬基酚系列、PEG15-100辛基酚系列和泊洛沙姆(poloxamers)。

[0192] 合适的亲脂性表面活性剂包括,仅举例而言:脂肪醇;甘油脂肪酸酯;乙酰化甘油脂肪酸酯;低级醇脂肪酸酯;丙二醇脂肪酸酯;脱水山梨醇脂肪酸酯;聚乙二醇脱水山梨醇脂肪酸酯;甾醇和甾醇衍生物;聚氧乙烯化甾醇和甾醇衍生物;聚乙二醇烷基醚;糖酯;糖醚;单甘油酯和二甘油酯的乳酸衍生物;多元醇与由甘油酯、植物油、氢化植物油、脂肪酸和甾醇组成的组中的至少一个成员的疏水性酯交换产物;油溶性维生素/维生素衍生物;及其混合物。在这一组中,优选的亲脂性表面活性剂包括甘油脂肪酸酯、丙二醇脂肪酸酯和它们的混合物,或者是多元醇与由植物油、氢化植物油和甘油三酯组成的组中的至少一个成员的疏水性酯交换产物。

[0193] 在一个实施方案中,该组合物可包含增溶剂,以确保本发明的化合物的良好的溶解和/或溶出,并最小化本发明的化合物的沉淀。这对于非口服使用的组合物(例如,注射用组合物)可能尤其重要。也可加入增溶剂来增加亲水性药物和/或其它组分如表面活性剂的溶解度,或者维持组合物作为稳定或均一的溶液或分散体。

[0194] 合适的增溶剂的实例包括但不限于以下物质:醇和多元醇,如乙醇、异丙醇、丁醇、苯醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇及其异构体、甘油、季戊四醇、山梨醇、甘露醇、还原二元醇(transcutol)、二甲基异山梨醇、聚乙二醇、聚丙二醇、聚乙烯醇、羟丙基甲基纤维素和其它纤维素衍生物、环糊精和环糊精衍生物;具有约200至约6000平均分子量的聚乙二醇的醚,如四氢糠醇PEG醚(四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol))或甲氧基PEG醚;酰胺和其它含氮化合物,如2-吡咯烷酮、2-哌啶酮、 ϵ -己内酰胺、N-烷基吡咯烷酮、N-羟烷基吡咯烷酮、N-烷基哌啶酮、N-烷基己内酰胺、二甲基乙酰胺和聚乙烯吡咯烷酮;酯,如丙酸乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰柠檬酸三乙酯、乙酰柠檬酸三丁酯、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、丁酸乙酯、三醋精、丙二醇单乙酸酯、丙二醇二乙酸酯、 ϵ -己内酯及其异构体、 δ -戊内酯及其异构体、 β -丁内酯及其异构体;以及本领域中已知的其它增溶剂,如二甲基乙酰胺、二甲基异山梨醇、N-甲基吡咯烷酮、单辛精、二乙二醇单乙醚和水。

[0195] 也可使用增溶剂的混合物。实例包括但不限于,三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、聚乙二醇200-100、四氢呋喃聚乙二醇醚(glycofurol)、还原二元醇、丙二醇和二甲基异山梨醇。特别优选的增溶剂包括山梨醇、甘油、三醋精、乙醇、PEG-400、四氢呋喃聚乙二醇醚和丙二醇。

[0196] 可包含的增溶剂的量没有特别的限制。给定的增溶剂的量可以限制为生物可接受的量,其可以由本领域技术人员很容易地确定。在一些情况下,可能有利的是:包含远远超过生物可接受量的增溶剂的量,例如,以最大化药物的浓度,在将该组合物提供给受试者之前使用常规技术如蒸馏或蒸发移除过量的增溶剂。因此,如果存在的话,增溶剂以药物和其它赋形剂的合并重量计可以是10%、25%、50%、100%或高达约200%(重量)的重量比。如果需要的话,也可以使用极少量的增溶剂,例如5%、2%、1%或甚至更少。通常,增溶剂可以以大约1%至大约100%,更典型地约5%至约25%(重量)的量存在。

[0197] 该组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受的添加剂和赋形剂。这样的添

加剂和赋形剂包括但不限于,防粘剂、消泡剂、缓冲剂、聚合物、抗氧化剂、防腐剂、螯合剂、粘度调节剂(viscomodulators)、张力调节剂(tonicifiers)、调味剂、着色剂、添味剂、遮光剂、悬浮剂、粘合剂、填充剂、增塑剂、润滑剂和它们的混合物。

[0198] 此外,为了方便处理、增强稳定性或为了其它原因,可以向组合物中掺入酸或碱。药学上可接受的碱的实例包括氨基酸、氨基酸酯、氢氧化铵、氢氧化钾、氢氧化钠、碳酸氢钠、氢氧化铝、碳酸钙、氢氧化镁、硅酸镁铝、合成硅酸铝、合成二水方解石(hydrocalcite)、氢氧化镁铝、二异丙基乙胺、乙醇胺、乙二胺、三乙醇胺、三乙胺、三异丙醇胺、三甲胺、三(羟甲基)氨基甲烷(TRIS)等。同样合适的是作为药学上可接受酸的盐的碱,所述酸例如是乙酸、丙烯酸、己二酸、藻酸、链烷磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡糖酸、氢醌磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、草酸、对溴苯磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、鞣酸、酒石酸、巯基乙酸、甲苯磺酸、尿酸等。也可以使用多元酸的盐,例如磷酸钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠。当所述碱为盐时,阳离子可以是任何适宜的和药学上可接受的阳离子,例如铵、碱金属、碱土金属等。实例可以包括但不限于钠、钾、锂、镁、钙和铵。

[0199] 合适的酸为药学上可接受的有机或无机酸。合适的无机酸的实例包括盐酸、氢溴酸、氢碘酸、硫酸、硝酸、硼酸、磷酸等。合适的有机酸的实例包括乙酸、丙烯酸、己二酸、藻酸、链烷磺酸、氨基酸、抗坏血酸、苯甲酸、硼酸、丁酸、碳酸、柠檬酸、脂肪酸、甲酸、富马酸、葡糖酸、氢醌磺酸、异抗坏血酸、乳酸、马来酸、甲磺酸、草酸、对溴苯磺酸、丙酸、对甲苯磺酸、水杨酸、硬脂酸、琥珀酸、鞣酸、酒石酸、巯基乙酸、甲苯磺酸、尿酸等。

[0200] 尽管本文已示出和描述了本发明的优选实施方案,但是这些实施方案仅作为实例提供对本领域技术人员来说是显而易见的。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下将会想到许多变化、改变和替换。但是应当理解,本文描述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。其意图在于用下列权利要求限定本发明的范围并从而覆盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等同物。

实施例

[0201] 下文提供的实施例和制备进一步说明和例证了本发明的融合多肽及其使用和制备方法。应当理解,本发明的范围绝不受以下实施例和制备的范围的限制。

[0202] 实施例1:IL28B/IL29融合多肽的克隆和表达

[0203] 在大肠杆菌中设计和表达了SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18和19的融合多肽。简言之,将编码该融合多肽的基因插入至表达载体pET11c的NdeI和BamHI限制酶切位点之间,并且在噬菌体T7启动子的控制下进行表达。将该载体转化到大肠杆菌BL21(DE3)中。细胞在补充有100 μ g/ml氨苄青霉素的LB培养基中生长至OD₄₅₀为0.4-0.6。通过加入1mM IPTG来诱导表达,在37 $^{\circ}$ C下12小时。通过离心收获细胞,悬浮于PBS中,并进行超声处理。离心分离细胞匀浆。进行SDS-PAGE分析,以证明融合多肽,例如SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:12,在不溶性包涵体级分中成功地表达(分别见图1和图2)。

[0204] 实施例2:IL28B/IL29融合多肽的重折叠和纯化

[0205] 如下所述对SEQ ID NO:1、3、5、7、9、11、12、13、14、15、16和17的融合多肽进行重折叠和纯化。将包涵体沉淀物溶解于50mM Tris pH 8.0、6M胍、10mM DTT中并经离心而进行澄

清。然后将溶解的包涵体用50mM Tris pH 7.8、1M胍、2mM GSH、1mM GSSG在4℃下透析(MWCO:3000)过夜。重折叠的融合多肽经使用SP BB(GE Healthcare)的阳离子交换色谱法(50mM NaOAc, pH 5.5, 0-1M NaCl), 随后经使用丁基Sepharose Fast Flow树脂(GE Healthcare)的疏水相互作用色谱法(50mM NaOAc, 1-0M (NH₄)₂SO₄)进行纯化。经使用SP HP树脂(GE Healthcare)的阳离子交换色谱法(50mM NaOAc, pH 5.5, 0-1M NaCl)而实现进一步的纯化。进行SDS-PAGE分析, 并证明在一些情况下, 通过这种方法, 融合多肽(例如SEQ ID NO:8)不产生可见的纯化的蛋白质(图3), 而在其它一些情况下, 融合多肽(例如SEQ ID NO:12)成功地得到重折叠和纯化(图4)。

[0206] 实施例3: IL28B/IL29融合多肽在N-末端处的聚乙二醇化

[0207] 将纯化的SEQ ID NO:3的融合多肽浓缩至1mg/mL, 并将缓冲液更换成50mM NaOAc, pH 5.5, 10mM NaCNBH₃。加入单甲氧基PEG丙醛(20Kd, NOF)(相对于IL28B类似物的5摩尔当量)并且在室温下孵育该反应混合物过夜。然后经使用SP HP的阳离子交换色谱法(50mM NaOAc, pH 5.5, 0-1M NaCl)纯化所得的聚乙二醇化的融合多肽(化合物A)(图5)。

[0208] 使用上述方法, 用20Kd的单甲氧基PEG丙醛对SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的融合多肽各自在N-末端进行聚乙二醇化, 以分别得到化合物B、化合物C、化合物D、化合物E和化合物F(图5)。

[0209] 实施例4: IL28B/IL29融合多肽在半胱氨酸巯基部分处的聚乙二醇化

[0210] 将纯化的SEQ ID NO:14的融合多肽浓缩至1mg/mL, 并将缓冲液更换成pH 7.0的PBS。加入单甲氧基PEG丙醛(20Kd, NOF)(相对于融合多肽的20摩尔当量)并且在4℃下孵育该反应混合物过夜。该融合多肽由此在C168的巯基部分处被聚乙二醇化, 得到化合物G, 继而经使用SP HP的阳离子交换色谱法(50mM NaOAc, pH 5.5, 0-1M NaCl)对其进行纯化(图6)。

[0211] 类似地对SEQ ID NO:15进行聚乙二醇化, 以得到化合物H(图6)。

[0212] 实施例5: IL28B/IL29融合多肽对干扰素刺激的基因的诱导

[0213] IL28B/IL29融合多肽的抗病毒效果在抗病毒基因诱导试验中进行了评估。该试验测量了在加入IL28B/IL29融合多肽后Hep G2细胞(ATCC HB-8065)中的干扰素刺激的基因(ISG)的诱导。

[0214] 将Hep G2细胞以 5×10^5 个细胞/孔的浓度平板接种于具有完全DMEM培养基的6孔板中。接种细胞后二十四小时, 通过将细胞培养基替换为含有0.1ng/ml、1ng/ml、10ng/ml或100ng/ml浓度的测试蛋白质的新培养基来启动药物处理。在药物处理启动后3、12、24、48或72小时收获细胞。作为对照, 细胞或者用人IFN α (PeproTech, 300-02AB)或IL-29(SEQ ID NO:1)予以刺激而作为阳性对照, 或者未予刺激而作为阴性对照。所有处理均一式三份进行。

[0215] 随后, 用MTT试验分析细胞的活力, 结果表明药物处理未引起对细胞的生长和活力的影响。从细胞沉淀物中分离出总RNA并用无RNA酶的DNA酶进行处理。使用2 μ g的总RNA作为cDNA合成的模板, 该cDNA合成使用PrimeScript RT主混合物(Takara, RR036)并使用寡聚(dT)作为引物。在LightCycler 480(Roche Applied Science)上通过使用SYBR Premix Ex Taq(Takara, RR820)的实时PCR来评估ISG基因诱导。每个PCR反应一式三份进行, 并且使用平均值进行计算。将所示数据相对于GAPDH或 β -肌动蛋白进行归一化, 并作为在未刺激的细

胞之上的诱导倍数而示出。

[0216] 1. 剂量依赖性

[0217] 作为一个实例,在处理启动后24小时,参考IL-29肽 (SEQ ID NO:1) 和4种IL-28B/IL-29融合多肽 (SEQ ID NO:3、5、7和12) 在Hep G2细胞中都显示出明显的、剂量依赖性的Mx和OAS诱导 (分别见图7和图8)。在10ng/ml或更高的浓度下,Mx表达增加了200-400倍而OAS水平增加了30-60倍。此外,显示IL-28B/IL-29融合多肽以相当于或略高于参考IL-29蛋白质的水平诱导抗病毒基因表达。

[0218] 2. 时间依赖性

[0219] 在药物处理3小时后观察Mx和OAS表达的诱导,其中在12小时后达到最高诱导 (分别见图9和图10)。

[0220] 3. 当类似物变性时,Mx、OAS诱导活性损失

[0221] 为了证实在上述实验中观察到的效果,IL-28B/IL-29融合多肽通过在95℃蒸煮5分钟而变性。在重复实验中,使用重组人生长激素作为阴性对照。结果表明,当IL-28B/IL-29融合多肽先变性时,抗病毒基因诱导大大降低,而使用重组人生长激素则未观察到对Mx和OAS表达的显著效果,这表明在上述实验中所见到的活性是IL-28B/IL-29融合多肽所固有的 (分别见图11和图12)。

[0222] 4. 聚乙二醇化的IL-28B/IL-29融合多肽显示出类似的生物活性

[0223] 进一步测试聚乙二醇化的IL-28B/IL-29融合多肽,表明与未修饰的多肽相比,其具有类似的抗病毒基因诱导活性 (分别见图13和图14)。

[0224] 实施例6:聚乙二醇化的IL-28B/IL-29融合多肽对HCV在Huh-7.5.1细胞中的复制的抑制

[0225] HCV是单链的、正义RNA病毒,其因受限的向性而不在常规细胞培养物中复制。使用细胞培养物衍生的感染性HCV (HCVcc) 对感染系统的开发已经极大地帮助了对完整病毒复制循环的研究以及相对于整个感染性病毒生命周期的药物发现努力。

[0226] 为了测试聚乙二醇化的IL-28B/IL-29融合多肽抑制HCV复制的能力,在体外从质粒pJFH-1转录2a基因型HCV基因组RNA,并用于转染Huh-7.5.1细胞。从细胞培养基的上清液中收获HCVcc,并通过在Huh-7.5.1细胞中的增殖来生成高滴度的病毒原液。为了确定病毒滴度 (灶形成单位,FFU/ml),将Huh-7.5.1细胞以 2×10^4 个细胞/孔接种于8孔腔室玻片中,用不同量的病毒原液进行感染,并在使用抗HCV核心抗原 (Pierce Antibodies, Thermo Scientific, Clone C7-50, MA1-080) 的免疫染色后对阳性灶的数目进行计数。

[0227] 对于体外药物效力试验,将Huh-7.5.1细胞以 2×10^4 个细胞/孔的密度平板接种于具有完全DMEM培养基的8孔腔室玻片中。24小时后,用JFH-1HCVcc以 $0.1 \times M.O.I$ 感染细胞,并且在4小时后,通过将细胞培养基替换为含有0ng/ml、1ng/ml、10ng/ml或100ng/ml浓度的测试蛋白质的新培养基来启动药物处理;每日用含有相同测试蛋白质的新培养基更换培养基。所有处理均一式三份进行。在药物处理启动48小时后针对HCV核心抗原对细胞进行免疫染色。在使用10倍物镜的荧光显微镜下,对每个孔中的所有阳性灶进行计数。结果表明,相比于PEG-IFN α 和参考PEG-IL-29 (SEQ ID NO:1),衍生物PEG-NO:16 (N-末端20K聚乙二醇化的SEQ ID NO:16) 和PEG-NO:17 (N末端20K聚乙二醇化的SEQ ID NO 17) 类似地强力抑制HCV复制 (图15)。

[0228] 实施例7:IL-28A/IL29融合多肽抑制A549细胞中的甲型流感病毒的复制

[0229] IL-28B/IL29融合多肽抑制流感病毒的复制的能力在H3N2感染的A549细胞(人腺癌肺泡基底上皮细胞)中进行了测试。将A549细胞用测试蛋白质预处理24小时,然后用H3N2病毒感染90分钟;72小时后,将细胞固定并用抗NP抗体进行免疫染色,随后用抗小鼠HRP进行免疫染色;通过ELISA测量每个孔在OD490nm下的读数来评价药物效力。

[0230] 将A549细胞以 3×10^4 个细胞/孔的浓度平板接种于具有完全DMEM培养基的96孔板中。接种细胞后二十四小时,将细胞培养基替换为含有0.5ng/ml、5ng/ml、50ng/ml或500ng/ml浓度的测试蛋白质的新培养基。二十四小时后,将细胞培养基替换为含有 $30 \times \text{TCID}_{50}/50 \mu\text{l}$ H3N2 (A3/Brisbane) 病毒的新培养基。90分钟后,将细胞培养基替换为不含病毒的新培养基。作为对照,细胞或者未予感染且未处理 (CV) 或者予以感染但未处理 (VV)。所有处理均一式三份进行。测试了IFNa2b、参考IL29 (SEQ ID NO:1)、SEQ ID NO:17、N-末端20K聚乙二醇化的融合多肽SEQ ID NO:16 (PEG-NO:16) 和N-末端20K聚乙二醇化的融合多肽SEQ ID NO:17 (PEG-NO:17) 以及CV和VV (图16)。

[0231] 病毒感染启动后72小时,用冰冷的丙酮将该细胞固定,用小鼠抗NP单克隆抗体进行免疫染色,随后用兔抗小鼠-HRP进行免疫染色。使用读板器对每个孔的OD490nm进行评分。结果表明,IL28B/IL29融合多肽SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17以及它们各自的N-末端20K聚乙二醇化的衍生物有效地抑制了流感病毒的复制 (图17)。

[0232] 序列表

[0233] SEQ ID NO 1:

[0234] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKESAGCLEASVT
FNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0235] SEQ ID NO 2:

[0236] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKES
PGCLEASVTFNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0237] SEQ ID NO 3:

[0238] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKESPGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0239] SEQ ID NO 4:

[0240] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKESAG
CLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0241] SEQ ID NO 5:

[0242] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKESPGCLEASVT
FNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0243] SEQ ID NO 6:

[0244] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKES
AGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0245] SEQ ID NO 7:

[0246] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKESPGCLEASVT
FNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0247] SEQ ID NO 8:

[0248] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKES
AGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0249] SEQ ID NO 9:

[0250] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKESAGCLEASVT
FNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0251] SEQ ID NO 10:

[0252] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKES
PGCLEASVTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0253] SEQ ID NO 11:

[0254] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESPGCLEASVT
FNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0255] SEQ ID NO 12:

[0256] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESAGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0257] SEQ ID NO 13:

[0258] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESPGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLKYVADGNLSLRTSTHPEST

[0259] SEQ ID NO 14:

[0260] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESAGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLKYVADGNLCLRTSTHPEST

[0261] SEQ ID NO 15:

[0262] MKPTTTGKGCHIGRFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDRLRLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKESPGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLKYVADGNLCLRTSTHPEST

[0263] SEQ ID NO 16:

[0264] MKPTTTGKGCHIGQFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRQLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKEASAGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLKYVAEGNLSLRTSTHPEST

[0265] SEQ ID NO 17:

[0266] MKPTTTGKGCHIGRQFKSLSPQELASFKKARDALEESLKLKNWSCSSPVFPGNWDLRQLQVRERPVALEA
ELALTLKVLEATADTDPALGDVLDQPLHTLHHILSQLRACIQPQPTAGPRTRGRLHHWLHRLQEAPKKEASPGCLEAS
VTFNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0267] SEQ ID NO 18:

[0268] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKEASPG
CLEASVTFNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

[0269] SEQ ID NO 19:

[0270] MVPVARLRGALPDARGCHIAQFKSLSPQELQAFKRAKDALEESLLLKDSKCRSRLFPRTWDLRQLQVRE
RPVALEAELALTLKVLEAAAGPALEDVLDQPLHTLHHILSQLQACIQPQPTAGPRPRGRLHHWLHRLQEAPKKEASAG
CLEASVTFNLFRLLTRDLNSVASGDLSV

Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser
 130 135 140

Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val
 145 150 155 160

Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr
 165 170 175

<210> 2

<211> 176

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
 20 25 30

[0002]

Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
 35 40 45

Ser Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
 50 55 60

Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly
 85 90 95

Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln
 100 105 110

Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg
 115 120 125

Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu
 130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn
 145 150 155 160

Ser Val Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
 165

<210> 4

<211> 183

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 4

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15

[0004]

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
 20 25 30

Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
 35 40 45

Ser Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
 50 55 60

Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val
 85 90 95

Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln
 100 105 110

Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg

	115	120	125
	Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser		
	130	135	140
	Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu		
	145	150	155 160
	Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr		
		165	170 175
	Ser Thr His Pro Glu Ser Thr		
		180	
	<210> 5		
	<211> 167		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
[0005]	<223> 融合多肽		
	<400> 5		
	Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys		
	1	5	10 15
	Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala		
		20	25 30
	Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val		
		35	40 45
	Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro		
		50	55 60
	Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala		
		65	70 75 80
	Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr		
		85	90 95

Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro
 100 105 110

Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg
 115 120 125

Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser
 130 135 140

Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Ser Val
 145 150 155 160

Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
 165

<210> 6
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0006] <220>
 <223> 融合多肽

<400> 6

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
 20 25 30

Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
 35 40 45

Ser Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
 50 55 60

Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly

	85	90	95
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln			
	100	105	110
Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg			
	115	120	125
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys			
	130	135	140
Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg			
145	150	155	160
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu			
	165	170	175
Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr			
	180	185	

[0007]

<210> 7
 <211> 167
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合多肽

<400> 7

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

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr
85 90 95

Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro
100 105 110

Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg
115 120 125

Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser
130 135 140

Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Ser Val
145 150 155 160

[0008] Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
165

<210> 8

<211> 185

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 8

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
1 5 10 15

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
20 25 30

Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
35 40 45

Ser Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln

50	55	60
Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu		
65	70	75
		80
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly		
	85	90
		95
Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln		
	100	105
		110
Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg		
	115	120
		125
Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys		
	130	135
		140
Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg		
145	150	155
		160
[0009]		
Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu		
	165	170
		175
Arg Thr Ser Thr His Pro Glu Ser Thr		
	180	185
<210> 9		
<211> 167		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 融合多肽		
<400> 9		
Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys		
1	5	10
		15
Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala		
	20	25
		30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
 50 55 60

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr
 85 90 95

Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro
 100 105 110

Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg
 115 120 125

[0010] Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu Ala Ser
 130 135 140

Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Ser Val
 145 150 155 160

Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
 165

<210> 10

<211> 185

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 10

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
 1 5 10 15

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala

	20		25		30										
Phe	Lys	Arg	Ala	Lys	Asp	Ala	Leu	Glu	Glu	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp
	35		40		45										
Ser	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Leu	Phe	Pro	Arg	Thr	Trp	Asp	Leu	Arg	Gln
	50		55		60										
Leu	Gln	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Ala	Glu	Leu	Ala	Leu
65			70		75										80
Thr	Leu	Lys	Val	Leu	Glu	Ala	Thr	Ala	Asp	Thr	Asp	Pro	Ala	Leu	Gly
			85		90										95
Asp	Val	Leu	Asp	Gln	Pro	Leu	His	Thr	Leu	His	His	Ile	Leu	Ser	Gln
			100		105										110
Leu	Arg	Ala	Cys	Ile	Gln	Pro	Gln	Pro	Thr	Ala	Gly	Pro	Arg	Thr	Arg
	115		120		125										
[0011]															
Gly	Arg	Leu	His	His	Trp	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Glu	Ala	Pro	Lys	Lys
	130		135		140										
Glu	Ser	Pro	Gly	Cys	Leu	Glu	Ala	Ser	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Phe	Arg
145			150		155										160
Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Leu	Lys	Tyr	Val	Ala	Asp	Gly	Asn	Leu	Ser	Leu
			165		170										175
Arg	Thr	Ser	Thr	His	Pro	Glu	Ser	Thr							
			180		185										
<210>	11														
<211>	167														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	融合多肽														
<400>	11														

Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
20 25 30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
35 40 45

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
50 55 60

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu His Thr
85 90 95

[0012] Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro
100 105 110

Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu His Arg
115 120 125

Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser
130 135 140

Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn Ser Val
145 150 155 160

Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
165

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 12

Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
20 25 30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
35 40 45

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
50 55 60

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
65 70 75 80

Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
85 90 95

[0013]

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro
100 105 110

Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu
115 120 125

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu
130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys
145 150 155 160

Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu
165 170 175

Ser Thr

<210> 13

<211> 178
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合多肽

<400> 13

Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
 20 25 30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
 50 55 60

[0014] Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
 85 90 95

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro
 100 105 110

Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu
 115 120 125

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu
 130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu
 165 170 175

Ser Thr

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 14

Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys
1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
20 25 30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
35 40 45

[0015]

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Leu Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
50 55 60

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
65 70 75 80

Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
85 90 95

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro
100 105 110

Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu
115 120 125

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu
130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu
 130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys
 145 150 155 160

Tyr Val Ala Asp Gly Asn Leu Cys Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu
 165 170 175

Ser Thr

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 融合多肽

<400> 16

[0017]

Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Gln Phe Lys
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala
 20 25 30

Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val
 35 40 45

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Gln Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro
 50 55 60

Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
 85 90 95

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro

	100	105	110
Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu	115	120	125
His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Ala Gly Cys Leu Glu	130	135	140
Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Lys	145	150	155 160
Tyr Val Ala Glu Gly Asn Leu Ser Leu Arg Thr Ser Thr His Pro Glu	165	170	175
Ser Thr			
<210> 17			
<211> 169			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 融合多肽			
<400> 17			
Met Lys Pro Thr Thr Thr Gly Lys Gly Cys His Ile Gly Arg Phe Lys	1	5	10 15
Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Ala Ser Phe Lys Lys Ala Arg Asp Ala	20	25	30
Leu Glu Glu Ser Leu Lys Leu Lys Asn Trp Ser Cys Ser Ser Pro Val	35	40	45
Phe Pro Gly Asn Trp Asp Leu Arg Gln Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro	50	55	60
Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala	65	70	75 80

[0018]

Thr Ala Asp Thr Asp Pro Ala Leu Gly Asp Val Leu Asp Gln Pro Leu
85 90 95

His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Arg Ala Cys Ile Gln Pro
100 105 110

Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Thr Arg Gly Arg Leu His His Trp Leu
115 120 125

His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser Pro Gly Cys Leu Glu
130 135 140

Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu Thr Arg Asp Leu Asn
145 150 155 160

Ser Val Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val
165

[0019]

<210> 18
<211> 174
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合多肽

<400> 18

Met Val Pro Val Ala Arg Leu Arg Gly Ala Leu Pro Asp Ala Arg Gly
1 5 10 15

Cys His Ile Ala Gln Phe Lys Ser Leu Ser Pro Gln Glu Leu Gln Ala
20 25 30

Phe Lys Arg Ala Lys Asp Ala Leu Glu Glu Ser Leu Leu Leu Lys Asp
35 40 45

Ser Lys Cys Arg Ser Arg Leu Phe Pro Arg Thr Trp Asp Leu Arg Gln
50 55 60

Leu Gln Val Arg Glu Arg Pro Val Ala Leu Glu Ala Glu Leu Ala Leu

65	70	75	80
Thr Leu Lys Val Leu Glu Ala Ala Ala Gly Pro Ala Leu Glu Asp Val			
	85	90	95
Leu Asp Gln Pro Leu His Thr Leu His His Ile Leu Ser Gln Leu Gln			
	100	105	110
Ala Cys Ile Gln Pro Gln Pro Thr Ala Gly Pro Arg Pro Arg Gly Arg			
	115	120	125
Leu His His Trp Leu His Arg Leu Gln Glu Ala Pro Lys Lys Glu Ser			
	130	135	140
Pro Gly Cys Leu Glu Ala Ser Val Thr Phe Asn Leu Phe Arg Leu Leu			
145	150	155	160
Thr Arg Asp Leu Asn Ser Val Ala Ser Gly Asp Leu Ser Val			
	165	170	

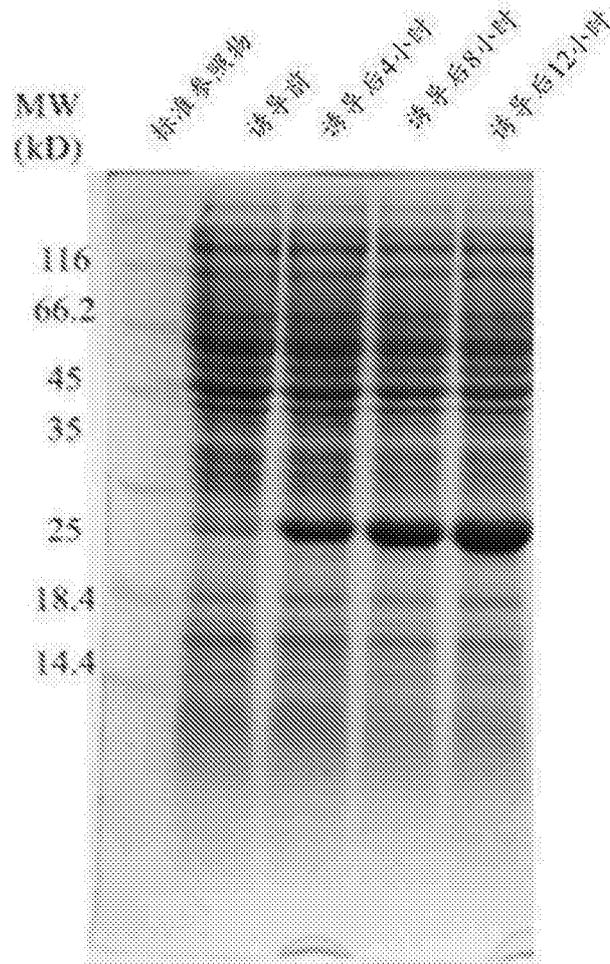
[0020]

<210> 19
 <211> 174
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 融合多肽

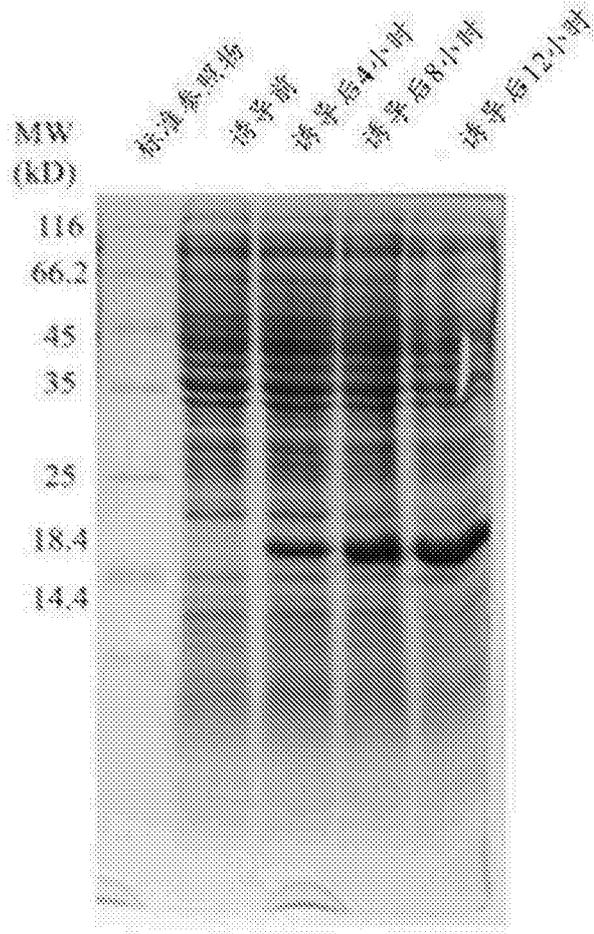
<400> 19

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



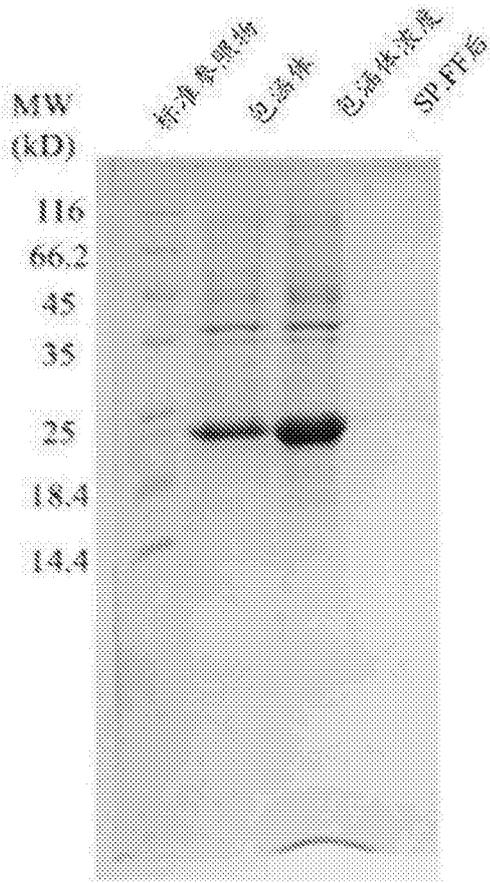
SEQ ID NO: 8的克隆和表达

图1



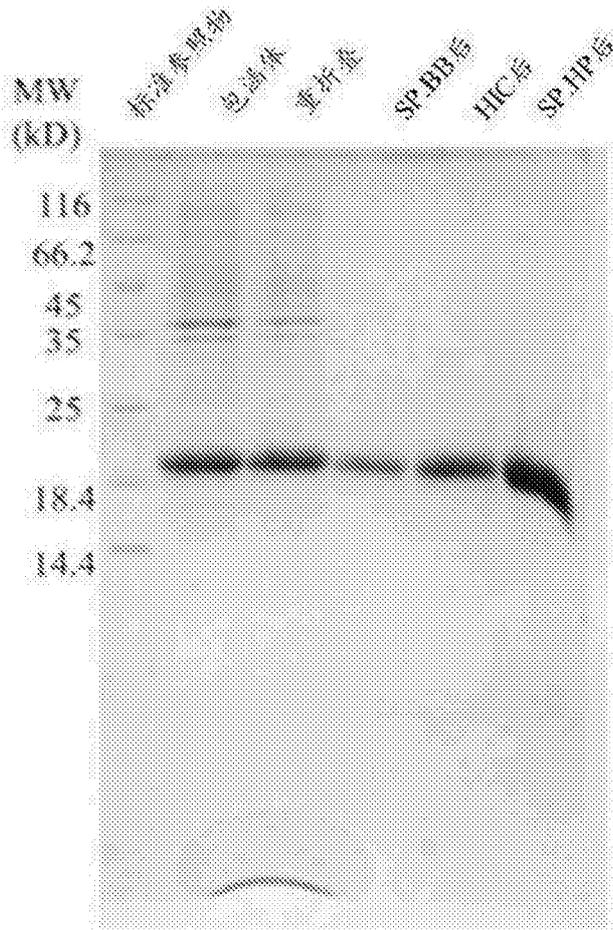
SEQ ID NO: 12的克隆和表达

图2



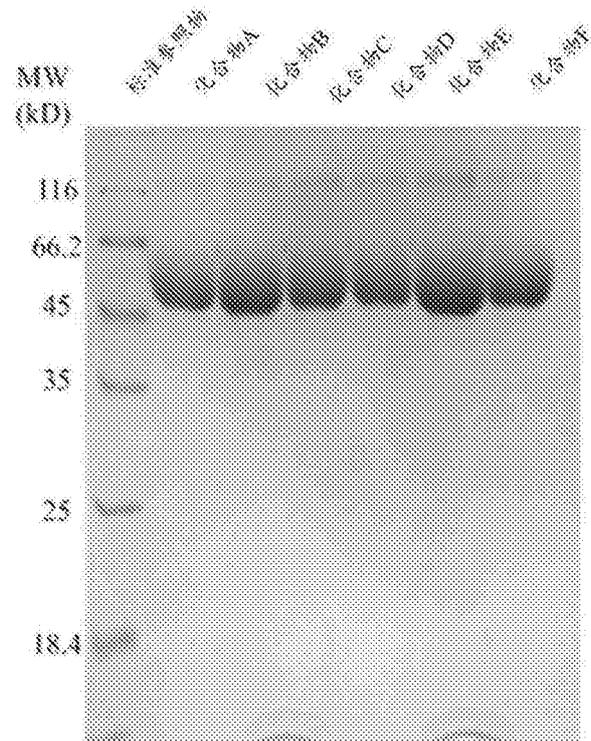
SEQ ID NO: 8的重折叠和纯化

图3



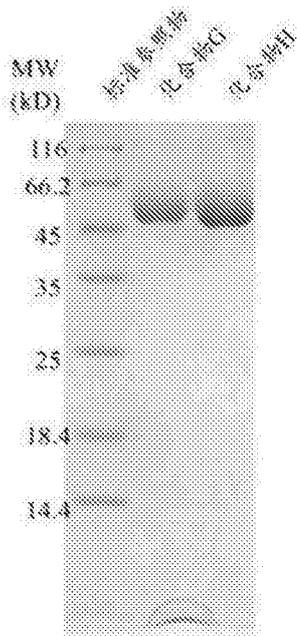
SEQ ID NO: 12的重折叠和纯化

图4



化合物A: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 3, 化合物B: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 5,
化合物C: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 7, 化合物D: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 11,
化合物E: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 12, 化合物F: N-末端聚乙二醇化的SEQ ID NO: 13。

图5



化合物G: 在C168处聚乙二醇化的SEQ ID NO: 14, 化合物H: 在C168处聚乙二醇化的SEQ ID NO: 15。

图6

处理时间: 12h

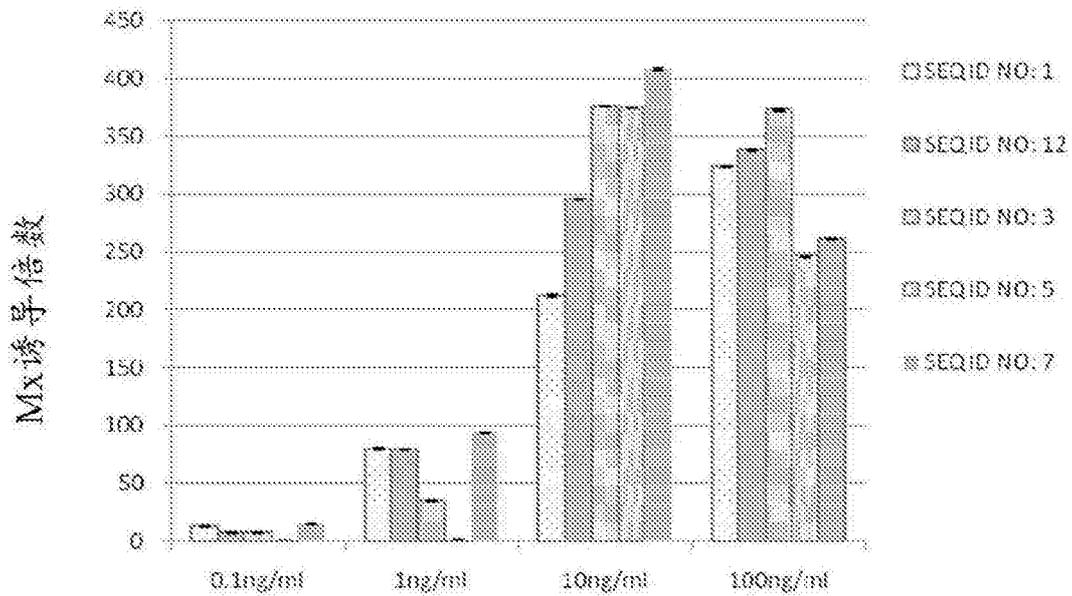


图7

处理时间: 12h

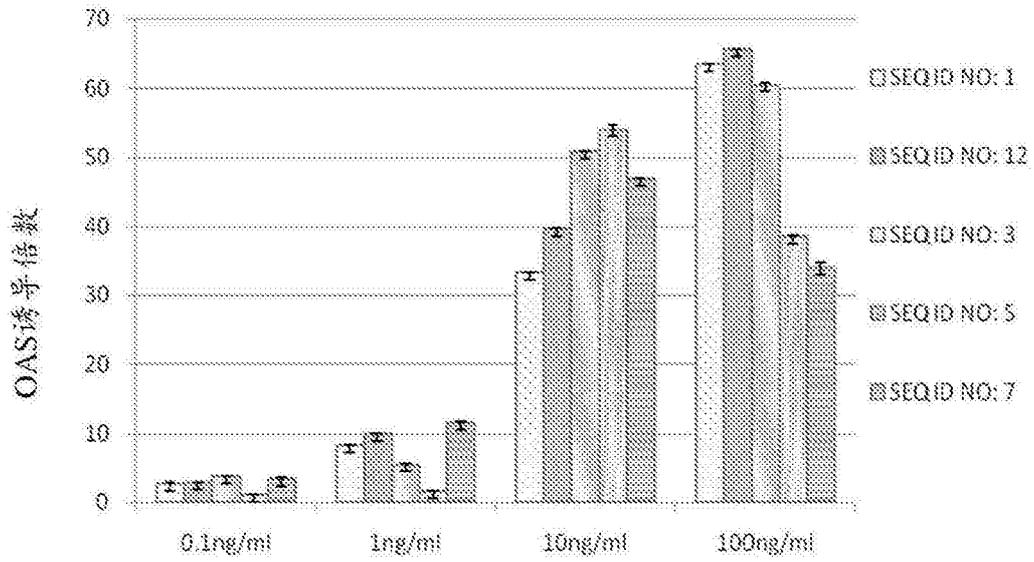


图8

药物浓度: 10 ng/ml

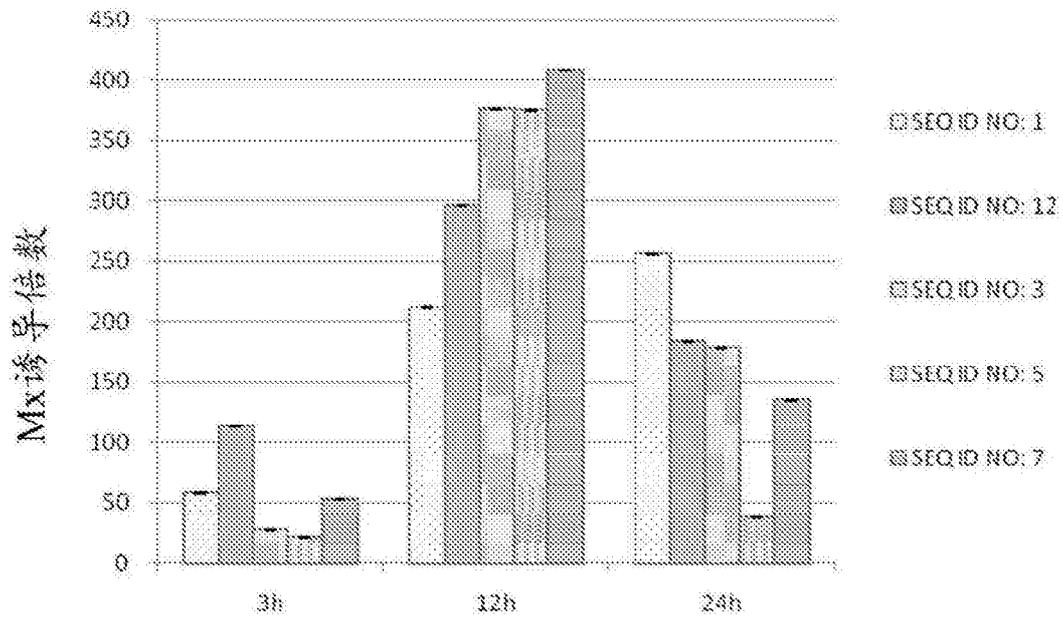


图9

药物浓度：10ng/ml

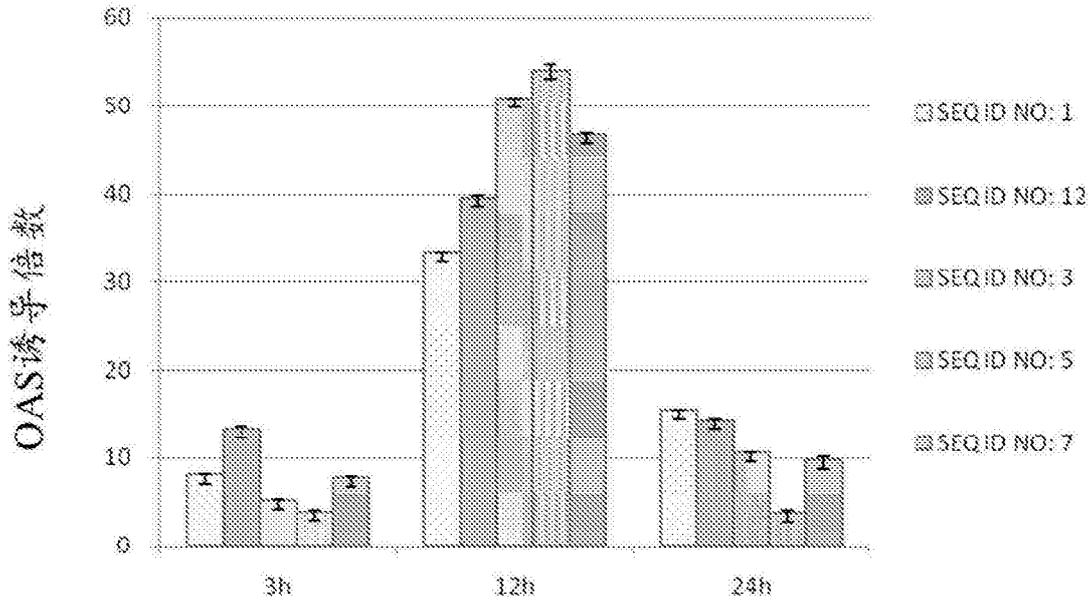


图10

10ng/ml, 12h

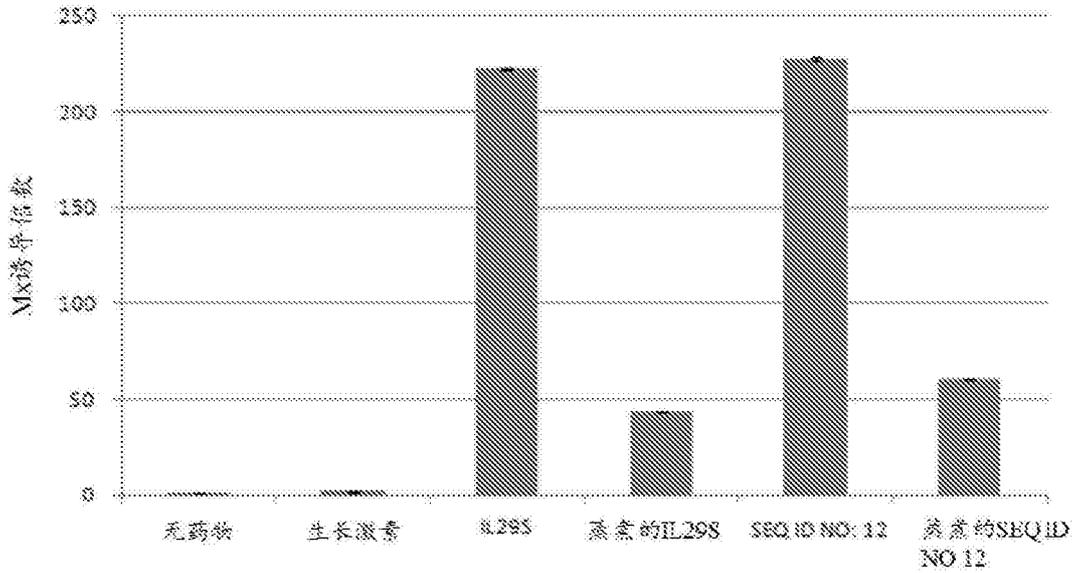


图11

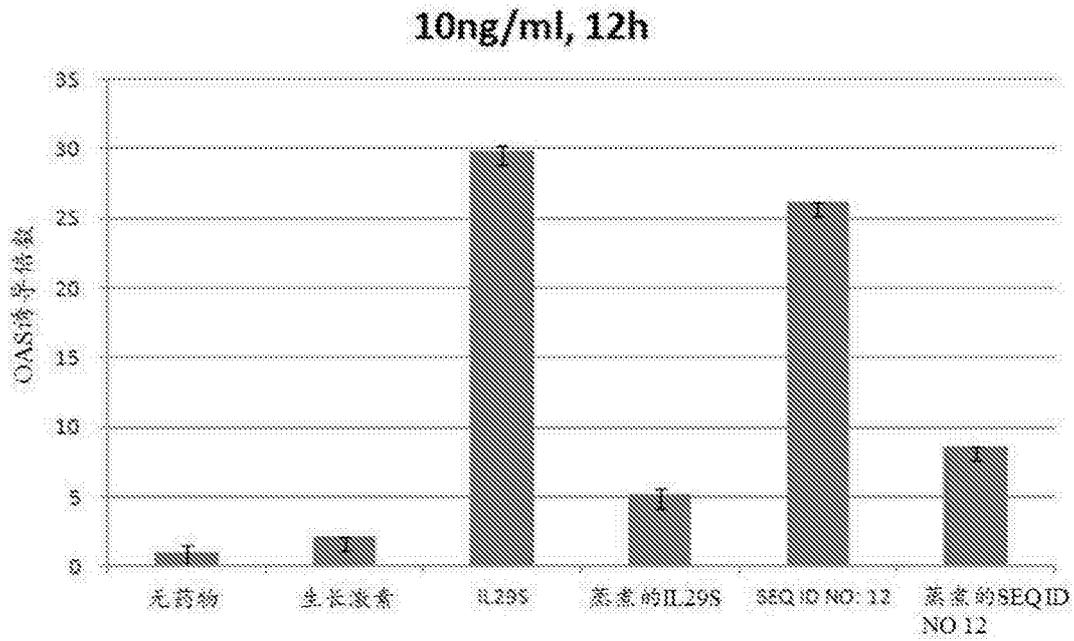
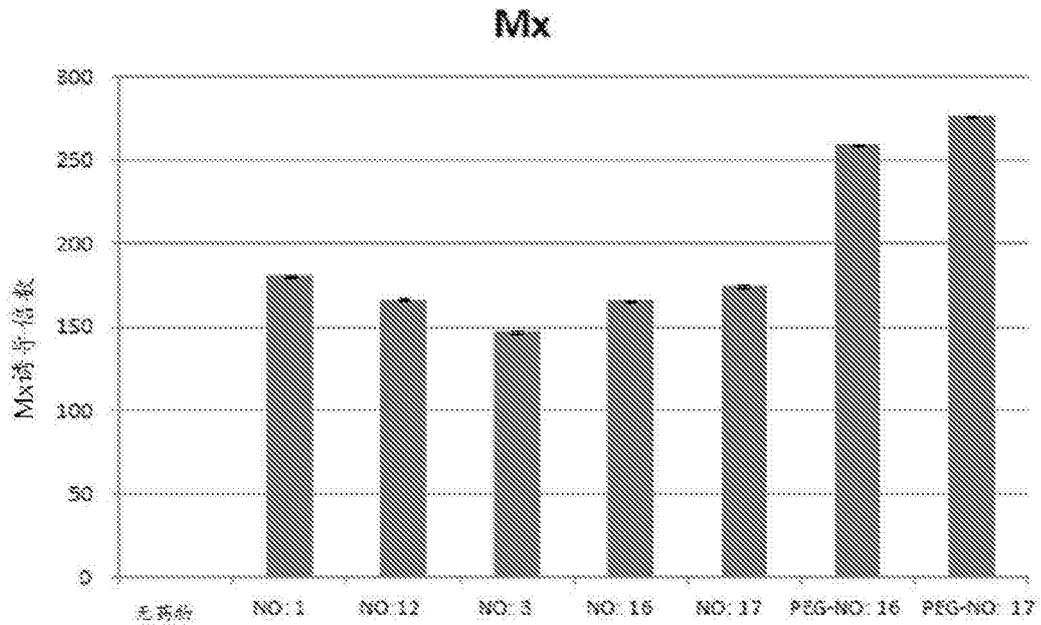
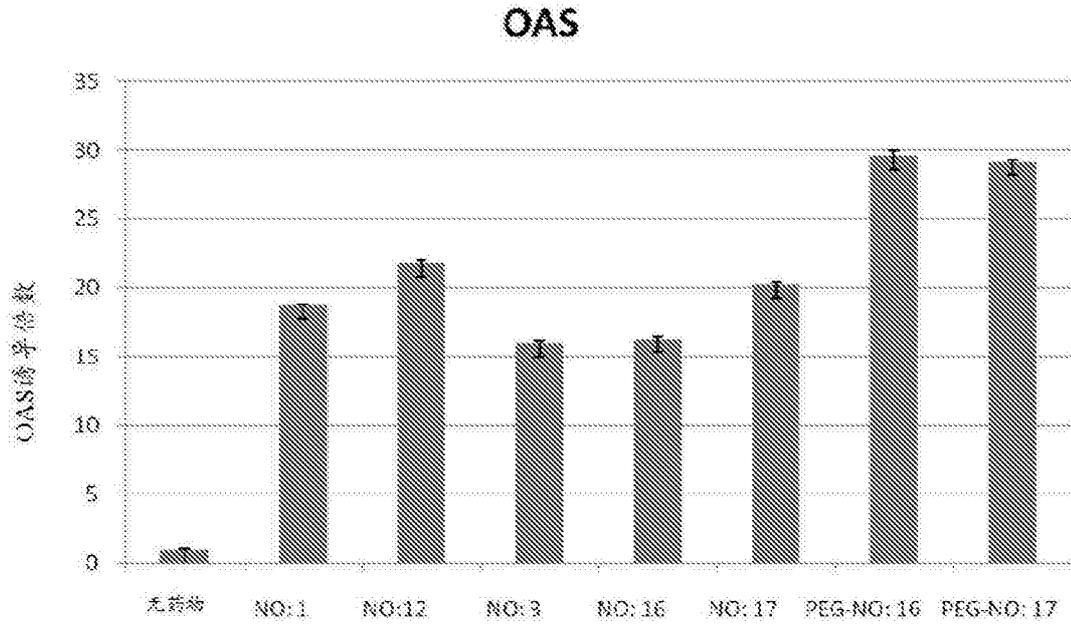


图12



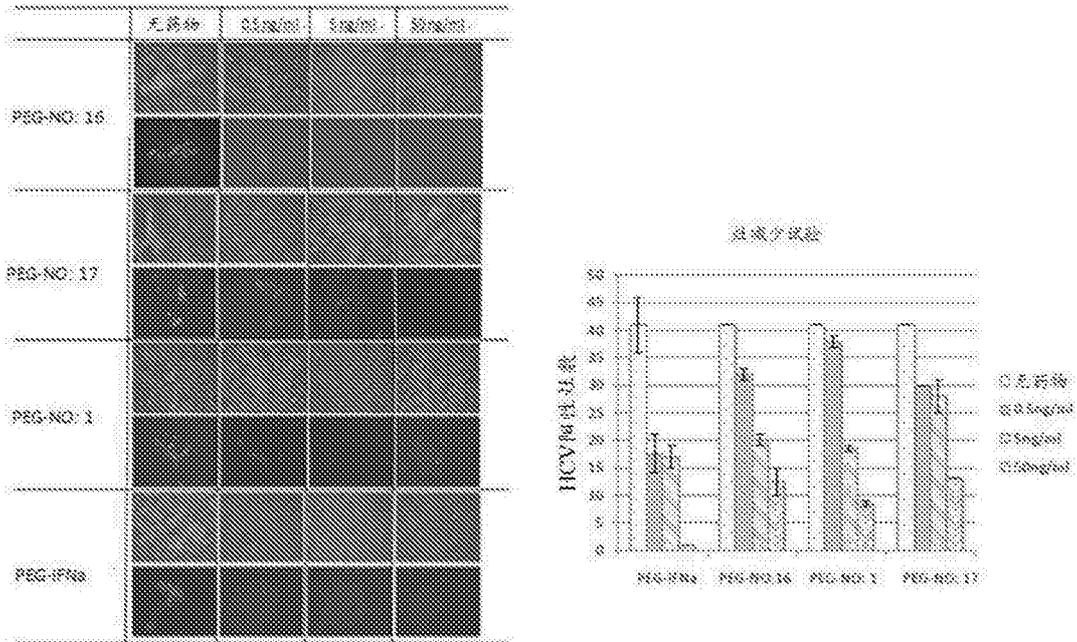
10 ng/ml 的 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17
 100 ng/ml 的聚乙二醇化的 SEQ ID NO: 16 和聚乙二醇化的 SEQ ID NO: 17
 诱导后 12 小时

图13



10 ng/ml 的 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 16 和 SEQ ID NO: 17
 100 ng/ml 的聚乙二醇化的 SEQ ID NO: 16 和聚乙二醇化的 SEQ ID NO:17
 诱导后 12 小时

图14



右图是左图的数值总结

图15

	SEQ ID NO: 16			SEQ ID NO: 17			SEQ ID NO: 1			13	14	12
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
A	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	CV		
B	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml			
C	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml			
D	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml			
E	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	500ng/ml	VV		
F	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml	50ng/ml			
G	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml	5ng/ml			
H	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml	0.5ng/ml			
	PEG-NO: 16			PEG-NO: 17			IFN-α2b					

图16

H3N2抑制

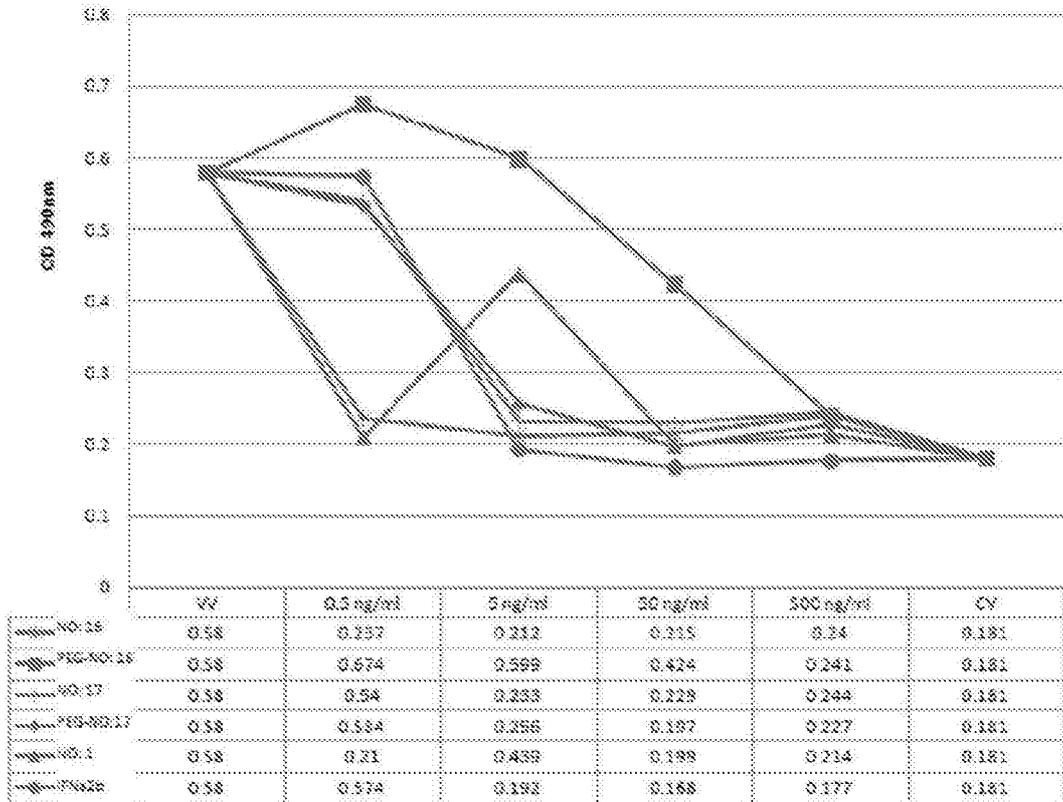


图17