



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102234334 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201110082150. 8

A61K 38/18 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 05. 06

A61P 7/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/469, 600 2003. 05. 06 US

60/487, 964 2003. 07. 17 US

60/539, 207 2004. 01. 26 US

(56) 对比文件

US 5605689 A, 1997. 02. 25, 全文.

US 5910573 A, 1999. 06. 08, 全文.

US 6030613 A, 2000. 02. 29, 全文.

WO 0018881 A, 2000. 04. 06, 全文.

(62) 分案原申请数据

200480019188. 9 2004. 05. 06

M. J. Glennie et al. Univalent antibodies
kill tumour cells in vitro and in vivo.

《Nature》. 1982, 第 295 卷 712-714.

(73) 专利权人 辛托尼克斯药品公司

地址 美国麻萨诸塞州

审查员 李谦

(72) 发明人 R·T·彼得斯 A·R·梅佐

D·S·赖夫拉 A·J·比通蒂

J·M·斯塔特尔 S·C·罗

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 梁谋 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006. 01)

C07K 16/46 (2006. 01)

A61K 39/395 (2006. 01)

A61K 47/48 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书55页 附图25页

(54) 发明名称

免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体

(57) 摘要

本发明涉及免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体。本发明涉及嵌合单体-二聚体杂合体蛋白, 其中所述蛋白包含第一和第二多肽链, 所述第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子, 所述第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区, 不含第一链的生物活性分子。本发明还涉及本发明嵌合单体-二聚体杂合体蛋白的使用方法和制备方法。

1. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;其中所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体,所述第二链不含生物活性分子并且不含免疫球蛋白可变区;

其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。

2. 权利要求 1 的嵌合蛋白,其中所述第二链还包含亲合标记。

3. 权利要求 2 的嵌合蛋白,其中所述亲合标记是 FLAG 标记。

4. 权利要求 1 的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白部分是 Fc 片段。

5. 权利要求 1 的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白是 IgG。

6. 权利要求 5 的嵌合蛋白,其中所述 IgG 是 IgG1 或 IgG2。

7. 权利要求 1-6 中任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是凝血因子。

8. 权利要求 7 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 VIII 因子。

9. 权利要求 7 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 VII 或 VIIa 因子。

10. 权利要求 7 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 IX 因子。

11. 权利要求 1-6 中任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是干扰素。

12. 权利要求 11 的嵌合蛋白,其中所述干扰素是 α 干扰素且具有 15-25 个氨基酸的接头。

13. 权利要求 12 的嵌合蛋白,其中所述 α 干扰素具有 15-20 个氨基酸的接头。

14. 权利要求 1-6 中任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是促红细胞生成素。

15. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;其中所述第二链由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记组成,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;

其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。

16. 权利要求 15 的嵌合蛋白,其中所述亲合标记是 FLAG 标记。

17. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;其中所述第二链基本由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记组成,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;

其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。

18. 权利要求 17 的嵌合蛋白,其中所述亲合标记是 FLAG 标记。

19. 权利要求 15 或 17 的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白部分是 Fc 片段。

20. 权利要求 15 或 17 的嵌合蛋白,其中所述免疫球蛋白是 IgG。

21. 权利要求 15-18 中任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是干扰素。

22. 权利要求 21 的嵌合蛋白,其中干扰素是 α 干扰素且具有 15-25 个氨基酸的接头。

23. 权利要求 22 的嵌合蛋白,其中所述 α 干扰素具有 15-20 个氨基酸的接头。

24. 权利要求 15-18 任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是凝血因子。

25. 权利要求 24 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 VIII 因子。

26. 权利要求 24 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 VII 或 VIIa 因子。

27. 权利要求 24 的嵌合蛋白,其中所述凝血因子是 IX 因子。
28. 权利要求 15 或 17 任何一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是促红细胞生成素。
29. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1-6 或 15-18 任何一项的嵌合蛋白和药物可接受赋形剂。
30. 权利要求 1-6 或 15-18 中任何一项的嵌合蛋白在制备用于治疗患有受益于给予干扰素、促红细胞生成素或凝血因子的疾病或病症的患者的药物中的用途。
31. 权利要求 30 的用途,其中所述嵌合蛋白通过静脉内、皮下、口服、口颊、舌下、鼻、胃肠外、直肠、阴道或通过肺部途径给予。
32. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述疾病或病症是病毒感染。
33. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述生物活性分子是干扰素。
34. 权利要求 33 的用途,其中所述干扰素是 α 干扰素且具有 15-25 个氨基酸的接头。
35. 权利要求 34 的用途,其中所述 α 干扰素具有 15-20 个氨基酸的接头。
36. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述疾病或病症是止血障碍。
37. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述疾病或病症是 A 型血友病。
38. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述疾病或病症是 B 型血友病。
39. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述生物活性分子是 VIII 因子。
40. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述生物活性分子是 VII 或 VIIa 因子。
41. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述生物活性分子是 IX 因子。
42. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述疾病或病症是贫血。
43. 权利要求 30 或 31 的用途,其中所述生物活性分子是促红细胞生成素。
44. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含连接在一起的第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体,但是其不含第一链的生物活性分子并且不含免疫球蛋白可变结构域,且其中所述第二链不与分子量大于 2kD 的任何分子共价连接,并且其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。
45. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含连接在一起的第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体,所述第二链不与所述第一多肽链的免疫球蛋白恒定区部分之外的任何其他分子共价连接,并且其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。
46. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含连接在一起的第一和第二多肽链,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;所述第二链由至少一部分免疫球蛋白恒定区组成,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体,并且其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。
47. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含连接在一起的第一和第二多肽链,其中所述第一

链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体;所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和共价连接的分子量小于 2kD 的分子,但是其不含第一链的生物活性分子和免疫球蛋白可变结构域,其中所述免疫球蛋白恒定区部分是 FcRn 结合配偶体,并且其中所述生物活性分子选自干扰素、促红细胞生成素和凝血因子。

48. 权利要求 13 的嵌合蛋白,其中所述接头是 (GGGS)³。

49. 权利要求 1-6 任一项的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是 VIII 因子、IX 因子、XI 因子、XII 因子、纤维蛋白原、凝血酶原、V 因子、VII 因子、X 因子、XIII 因子或 von Willebrand 因子。

50. 权利要求 11 的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是 α 干扰素或 β 干扰素。

51. 权利要求 15 或 17 的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是 VIII 因子、IX 因子、XI 因子、XII 因子、纤维蛋白原、凝血酶原、V 因子、VII 因子、X 因子、XIII 因子或 von Willebrand 因子。

52. 权利要求 21 的嵌合蛋白,其中所述生物活性分子是 α 干扰素或 β 干扰素。

53. 权利要求 30 的用途,其中所述生物活性分子是 VIII 因子、IX 因子、XI 因子、XII 因子、纤维蛋白原、凝血酶原、V 因子、VII 因子、X 因子、XIII 因子或 von Willebrand 因子。

54. 权利要求 33 的用途,其中所述生物活性分子是 α 干扰素或 β 干扰素。

55. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含 VIII 因子和免疫球蛋白恒定区 Fc 片段;

其中所述第二链包含免疫球蛋白恒定区 Fc 片段,但不含 VIII 因子。

56. 权利要求 55 的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白还包含亲合标记。

57. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含 VII 或 VIIa 因子和免疫球蛋白恒定区 Fc 片段;

其中所述第二链包含免疫球蛋白恒定区 Fc 片段,但不含 VII 或 VIIa 因子。

58. 权利要求 57 的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白还包含亲合标记。

59. 一种嵌合蛋白,所述嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中所述第一链包含 IX 因子和免疫球蛋白恒定区 Fc 片段;

其中所述第二链包含免疫球蛋白恒定区 Fc 片段,但不含 IX 因子。

60. 权利要求 59 的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白还包含亲合标记。

免疫球蛋白嵌合单体-二聚体杂合体

[0001] 本申请是以下申请的分案申请：申请日：2004年5月6日；申请号：200480019188.9(PCT/US2004/014064)；发明名称：同上。

[0002] 本发明要求2003年5月6日提出的美国临时申请号60/469,600、2003年7月17日提出的美国临时申请号60/487,964、2004年1月26日提出的美国临时申请号60/539,207的优先权，所有上述临时申请通过引用整体结合到本文中。2004年5月6日同时申请的题为“免疫球蛋白嵌合蛋白的化学合成方法”的美国非临时申请通过引用结合到本文中。

发明领域

[0003] 本发明主要涉及由两条多肽链组成的治疗性嵌合蛋白，其中第一链由治疗性生物活性分子组成，第二链不由第一链的治疗性生物活性分子组成。更具体的说，本发明涉及由两条多肽链组成的嵌合蛋白，其中两条链都由至少一部分免疫球蛋白恒定区组成，其中第一链被修饰成进一步包含生物活性分子，而第二链没有被如此修饰。因此，本发明涉及为单体-二聚体杂合体的嵌合蛋白，即具有二聚体方面和单体方面的嵌合蛋白，其中二聚体方面涉及如下事实，即嵌合蛋白由两条多肽链组成，每条链由一部分免疫球蛋白恒定区组成，而单体方面涉及如下事实，即两条链中只有一条链由治疗性生物活性分子组成。图1阐明了单体-二聚体杂合体的一个实例，其中生物活性分子是促红细胞生成素(EPO)，免疫球蛋白恒定区部分是IgG Fc区。

[0004] 发明背景

[0005] 免疫球蛋白由四条多肽链组成，其中两条是重链，另两条是轻链，它们通过二硫键结合，形成四聚体。每条链还由一个可变区和一个恒定区组成。可变区介导抗原识别与结合，而恒定区特别是重链恒定区介导多种效应子功能，例如补体结合和Fc受体结合（参见例如美国专利6,086,875；5,624,821；5,116,964）。

[0006] 恒定区还可表示为CH（恒定区重链）结构域（CH1、CH2等）的结构域组成。取决于同种型（即IgG、IgM、IgA、IgD、IgE），恒定区可由三个或四个CH结构域组成。一些同种型（例如IgG）恒定区还包含铰链区（Janeway等，2001，Immunobiology，Garland Publishing，N.Y.，N.Y.）。

[0007] 已有文献描述了由目的蛋白或其片段与免疫球蛋白恒定区连接组成的嵌合蛋白的构建（参见例如美国专利5,480,981和5,808,029；Gascoigne等，1987，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2936；Capon等，1989，Nature 337:525；Traunecker等，1989，Nature 339:68；Zettmeissl等，1990，DNA Cell Biol.USA 9:347；Byrn等，1990，Nature 344:667；Watson等，1990，J.Cell.Biol.110:2221；Watson等，1991，Nature 349:164；Aruffo等，1990，Cell 61:1303；Linsley等，1991，J.Exp.Med.173:721；Linsley等，1991，J.Exp.Med.174:561；Stamenkovic等，1991，Cell 66:1133；Ashkenazi等，1991，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535；Lesslauer等，1991，Eur.J.Immunol.27:2883；Peppel等，1991，J.Exp.Med.174:1483；Bennett等，1991，J.Biol.Chem.266:23060；Kurschner等，1992，J.Biol.Chem.267:9354；Chalupny等，1992，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10360；Ridgway和

Gorman, 1991, J. Cell Biol. 115, 摘要号 1448 ;Zheng 等, 1995, J. Immun. 154 :5590)。这些分子通常具有与所连接的目的分子相关的生物活性以及效应子功能,或者某些与免疫球蛋白恒定区相关的其他合乎需要的特性(例如生物稳定性、细胞分泌)。

[0008] 取决于免疫球蛋白的同种型,免疫球蛋白恒定区的 Fc 部分可包括 CH2、CH3 和 CH4 结构域以及铰链区。包含免疫球蛋白 Fc 部分的嵌合蛋白赋予嵌合蛋白某些合乎需要的性质,包括稳定性提高、血清半寿期提高(参见 Capon 等, 1989, Nature 337 :525) 以及与 Fc 受体如新生 Fc 受体 (FcRn) 的结合(美国专利 6, 086, 875、6, 485, 726、6, 030, 613 ;WO 03/077834 ;US2003-0235536A1)。

[0009] FcRn 活跃于成人上皮组织中,并表达于肠内腔、肺气道、鼻表面、阴道表面、结肠和直肠表面(美国专利 6, 485, 726)。包含 FcRn 结合配偶体(如 IgG、Fc 片段)的嵌合蛋白通过 FcRn 能有效地穿过上皮屏障,从而提供了全身性给予所需治疗性分子的非侵入性方法。另外,包含 FcRn 结合配偶体的嵌合蛋白被表达 FcRn 的细胞所胞吞。但是这些嵌合蛋白不是被标记进行降解,而是被再循环到体内循环中,从而增加这些蛋白的体内半寿期。

[0010] 免疫球蛋白恒定区各部分(例如 FcRn 结合配偶体)通常通过二硫键和其他非特异性相互作用互相结合形成二聚体和更高等级的多聚体。本发明部分基于这样的意外发现,即包含 FcRn 结合配偶体的嵌合蛋白的胞转作用似乎受限于嵌合蛋白的分子量,分子量较高的蛋白转运效率较低。

[0011] 一旦给予包含生物活性分子的嵌合蛋白,其通常会与靶分子或细胞发生相互作用。本发明还部分基于这样的意外发现,即只有一个生物活性分子、但有两个免疫球蛋白恒定区部分(例如两个 FcRn 结合配偶体)的单体-二聚体杂合体比同源二聚体(在本文中也简称“二聚体”)或具有两个或更多个生物活性分子拷贝的更高等级多聚体能更有效地发挥功能和被转运。这在部分上是由于这样一个事实,即包含两个或多个生物活性分子、以二聚体和更高等级的多聚体形式存在的嵌合蛋白,由于存在两个或多个相互邻近的生物活性分子,且生物活性分子对其本身具有很高的亲合性,在空间上会被阻碍与其靶分子或细胞发生相互作用。

[0012] 因此,本发明的一个方面提供可被转运穿过上皮屏障的包含生物活性分子的嵌合蛋白。本发明的另一方面提供包含至少一个能与其靶分子或细胞发生相互作用、而又少有或没有位阻或自身聚集作用的生物活性分子的嵌合蛋白。

[0013] 本发明各方面提供了包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,第一链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中免疫球蛋白恒定区部分已被修饰成包括生物活性分子,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中免疫球蛋白恒定区部分没有同样被修饰成包括第一链的生物活性分子。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明涉及包含一个生物活性分子和两个免疫球蛋白恒定区至少一部分分子的嵌合蛋白。所述嵌合蛋白与由至少两个生物活性分子和至少两个免疫球蛋白恒定区的一部分组成的嵌合蛋白相比,能够以较小的位阻与靶分子或细胞发生相互作用。本发明还涉及包含至少一个生物活性分子和两个免疫球蛋白恒定区至少一部分分子的嵌合蛋白,所述嵌合蛋白比相应的同源二聚体(即其中两条链连接到同一个生物活性分子上)能更有效地转运穿过上皮屏障。因此,本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所

述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区并不连接有任何生物活性分子。

[0016] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区或任何生物活性分子,且其中所述第二链不与分子量大于 1kD、2kD、5kD、10kD 或 20kD 的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于 0-2kD 的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于 5-10kD 的任何分子共价连接。在一个实施方案中,第二链不与分子量大于 15-20kD 的任何分子共价连接。

[0017] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述部分不与除所述第一多肽链免疫球蛋白部分之外的任何其他分子共价连接。

[0018] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记物组成。

[0019] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链基本由至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选的亲合标记物组成。

[0020] 本发明涉及包含连接在一起的第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含免疫球蛋白可变区或任何生物活性分子,任选包含分子量小于 10kD、5kD、2kD 或 1kD 的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于 15-20kD 的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于 5-10kD 的分子。在一个实施方案中,第二链包含分子量小于 1-2kD 的分子。

[0021] 本发明涉及包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一链包含生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第一结构域,所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体,其中所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第二结构域,但不含任何免疫球蛋白可变区或生物活性分子,其中所述第二结构域是所述第一结构域的特异性结合配偶体。

[0022] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码第一多肽链(包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区)的 DNA 分子和任选接头的第一 DNA 构建物,及包含编码第二多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区)的 DNA 分子和任选接头的第二 DNA 构建物转染细胞;在第一 DNA 构建物编码多肽链得以表达和第二 DNA 构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离包含第一 DNA 构建物编码多肽链和第二 DNA 构建物编码多肽链的单体-二聚体杂合体。

[0023] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,其中所述第一多肽链包含生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第一结构域,所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体,其中所述第二

多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少第二结构域,其中所述第二结构域是所述第一结构域的特异性结合配偶体,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区,所述方法包括用包含编码所述第一多肽链的 DNA 分子的第一 DNA 构建物,及包含编码所述第二多肽链的 DNA 分子的第二 DNA 构建物转染细胞;在第一 DNA 构建物编码多肽链得以表达和第二 DNA 构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离由第一 DNA 构建物编码多肽链和第二 DNA 构建物编码多肽链组成的单体-二聚体杂合体。

[0024] 本发明涉及制备本发明嵌合蛋白的方法,所述方法包括用包含编码第一多肽链(包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区)的 DNA 分子和任选接头的第一 DNA 构建物转染细胞;在第一 DNA 构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离第一 DNA 构建物编码的多肽链;用包含编码第二多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白可变区)的 DNA 分子的第二 DNA 构建物转染细胞;在第二 DNA 构建物编码多肽链得以表达的条件下培养细胞;分离第二 DNA 构建物编码的多肽链;在包含第一 DNA 构建物编码多肽链和第二 DNA 构建物编码多肽链的单体-二聚体杂合体得以形成的条件下,合并第一 DNA 构建物编码多肽链和第二 DNA 构建物编码多肽链;分离所述单体-二聚体杂合体。

[0025] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的 DNA 分子的 DNA 构建物转染细胞;在 DNA 构建物编码多肽链得以表达,其 N 末端为半胱氨酸,从而形成多肽链二聚体的条件下培养细胞;分离由两个拷贝的 DNA 构建物编码多肽链组成的二聚体;并使分离的二聚体与生物活性分子在生物活性分子主要只与二聚体一条多肽链反应的条件下发生化学反应,其中所述生物活性分子具有 C 末端硫酯,从而形成单体-二聚体杂合体。

[0026] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的 DNA 分子的 DNA 构建物转染细胞;在 DNA 构建物编码多肽链得以表达,其 N 末端为半胱氨酸,从而形成多肽链二聚体的条件下培养细胞;分离由两个拷贝的 DNA 构建物编码多肽链组成的二聚体;使分离的二聚体与生物活性分子发生化学反应,其中所述生物活性分子具有 C 末端硫酯,使得生物活性分子与二聚体的每条链连接;使由与生物活性分子连接的免疫球蛋白部分组成的二聚体变性,形成单体链;将单体链与包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(其没有连接生物活性分子)的多肽链结合,形成单体-二聚体杂合体;分离单体-二聚体杂合体。

[0027] 本发明涉及制备包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白的方法,其中所述第一多肽链和第二多肽链不相同,所述方法包括用包含编码多肽链(包含至少一部分免疫球蛋白恒定区)的 DNA 分子的 DNA 构建物转染细胞;在以下条件下培养细胞:DNA 构建物编码的多肽链被表达为两条多肽链的混合物,其中所述混合物包含具有 N 末端半胱氨酸的多肽和邻近 N 末端处具有半胱氨酸的多肽;分离由 DNA 构建物编码多肽链的混合物组成的二聚体;使分离二聚体与生物活性分子发生化学反应,其中所述生物活性分子具有活性硫酯,从而形成至少一些单体-二聚体杂合体;从所述混合物分离单体-二聚体杂合体。

[0028] 本发明涉及治疗疾病或病症的方法,所述方法包括给予本发明嵌合蛋白,从而治

疗疾病或病症。

[0029] 本发明另外的目标和优点将在下述说明中进行部分阐述,部分从下述说明中将容易理解到,或可从本发明的实施中发现。通过所附权利要求书中具体指出的要素和组合,本发明的目标和优点将得以实现和达到。

[0030] 应当理解,以上概述和以下详述只是示范性和说明性内容,并不对要求保护的本发明构成限制。

[0031] 附图简述

[0032] 图 1 是比较 EPO-Fc 同源二聚体或二聚体的结构与 EPO-FC 单体-二聚体杂合体的结构的示意图。

[0033] 图 2a 是嵌合蛋白 VII 因子-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,以及前肽(粗线),其被维生素 K 依赖性 γ 羧化酶识别,所述羧化酶能修饰 VII 因子,以获得完全活性。所述序列随后被 PACE 切割,产生 VII 因子-Fc。

[0034] 图 2b 是嵌合蛋白 IX 因子-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,以及前肽(粗线),其被维生素 K 依赖性 γ 羧化酶识别,所述羧化酶能修饰 IX 因子,以获得完全活性。所述序列随后被 PACE 切割,产生 IX 因子-Fc。

[0035] 图 2c 是嵌合蛋白 IFN α -Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 IFN α -Fc。

[0036] 图 2d 是嵌合蛋白 IFN α -Fc Δ 接头的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 IFN α -Fc Δ 接头。

[0037] 图 2e 是嵌合蛋白 Flag-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 Flag-Fc。

[0038] 图 2f 是嵌合蛋白 Epo-CCA-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 Epo-CCA-Fc。酸性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0039] 图 2g 是嵌合蛋白 CCB-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 CCB-Fc。碱性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0040] 图 2h 是嵌合蛋白 Cys-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 Cys-Fc。当该序列在 CHO 细胞中产生时,一部分序列分子被信号肽酶不正确地切割,使得在 N 末端保留两个多余的氨基酸,从而防止具有 C 末端硫酯的生物活性分子的连接(例如通过自然连接反应)。当这些不正确切割的序列分子与正确切割的 Cys-Fc 形成二聚体并随后与具有 C 末端硫酯的生物活性分子反应时,就形成单体-二聚体杂合体。

[0041] 图 2i 是嵌合蛋白 IFN α -GS15-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 IFN α -GS15-Fc。

[0042] 图 2j 是嵌合蛋白 Epo-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其被细胞切割,产生成熟的 Epo-Fc。8 氨基酸接头也以粗线表示。

[0043] 图 3a 是嵌合蛋白 VII 因子-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线)和被维生素 K 依赖性 γ 羧化酶识别的前肽(粗线),所述羧化酶能修饰 VII 因子,以获得完全活性。翻译序列随后被 PACE 切割,产生成熟的 VII 因子-Fc。

[0044] 图 3b 是嵌合蛋白 IX 因子-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线)和被维生素 K 依赖性 γ 羧化酶识别的前肽(粗线),所述羧化酶能修饰 IX 因子,以获得完全活性。

翻译序列随后被 PACE 切割,产生成熟的 IX 因子-Fc。

[0045] 图 3c 是嵌合蛋白 IFN α -Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 IFN α -Fc。

[0046] 图 3d 是嵌合蛋白 IFN α -Fc Δ 接头的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 IFN α -Fc Δ 接头。

[0047] 图 3e 是嵌合蛋白 Flag-Fc 的氨基酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 Flag-Fc。

[0048] 图 3f 是嵌合蛋白 Epo-CCA-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 Epo-CCA-Fc。酸性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0049] 图 3g 是嵌合蛋白 CCB-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 CCB-Fc。碱性卷曲螺旋结构域也以粗线表示。

[0050] 图 3h 是嵌合蛋白 Cys-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 Cys-Fc。

[0051] 图 3i 是嵌合蛋白 IFN α -GS15-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 IFN α -GS15-Fc。

[0052] 图 3j 是嵌合蛋白 Epo-Fc 的核酸序列。该序列包括信号肽(下划线),其在翻译后被细胞切割,产生成熟的 Epo-Fc。编码 8 氨基酸接头的核酸序列也以粗线表示。

[0053] 图 4 表示通过自然连接反应形成单体-二聚体杂合体的方法。

[0054] 图 5a 显示 Fc MESNA 的氨基酸序列(SEQ ID NO :4)。

[0055] 图 5b 显示 Fc MESNA 的 DNA 序列(SEQ ID NO :5)。

[0056] 图 6 比较 IFN α 同源二聚体(即由 2 个 IFN α 分子组成)和 IFN α 单体-二聚体杂合体(即包含 1 个 IFN α 分子)的抗病毒活性。

[0057] 图 7 是 VIIa 因子-Fc 嵌合单体-二聚体杂合体(一个 VII 因子分子)和 VIIa 因子-Fc 嵌合同源二聚体(两个 VII 因子分子)的凝血活性的比较。

[0058] 图 8 比较 VIIa 因子-Fc 嵌合单体-二聚体杂合体(一个 VII 因子分子)和 VIIa 因子-Fc 嵌合同源二聚体(两个 VII 因子分子)在新生大鼠中的口服剂量。

[0059] 图 9 比较 IX 因子-Fc 嵌合单体-二聚体杂合体(一个 IX 因子分子)和嵌合同源二聚体在新生大鼠中的口服剂量。

[0060] 图 10 是比较口服给予新生大鼠 IX 因子-Fc 嵌合单体-二聚体杂合体(一个 IX 因子分子)和口服给予嵌合同源二聚体的时间进程研究。

[0061] 图 11 说明肺部单剂量给药后与 Epo-Fc 单体-二聚体杂合体相比 Epo-Fc 二聚体在食蟹猴(cynomolgus monkey)中的药物动力学。

[0062] 图 12 比较皮下给药的 Epo-Fc 单体-二聚体杂合体和皮下给药的Aranesp[®](阿法达贝泊汀)在猴中的血清浓度。

[0063] 图 13 比较静脉内给药的 Epo-Fc 单体-二聚体杂合体和静脉内给药的Aranesp[®](阿法达贝泊汀)和Epogen[®](阿法依泊汀)在猴中的血清浓度。

[0064] 图 14 显示获自 Mimetic Red2[™] 柱(ProMetic LifeSciences, Inc., Wayne, NJ) 的曲线及含 EpoFc 单体-二聚体杂合体、EpoFc 二聚体和 Fc 的柱级份的 SDS-PAGE。EpoFc 单

体-二聚体杂合体出现在级份 11、12、13 和 14。EpoFc 二聚体出现在级份 18。Fc 出现在级份 1/2。

[0065] 图 15 显示肺部单剂量给药后带有 8 氨基酸接头的 IFN β Fc 在食蟹猴中的药物动力学。

[0066] 图 16 显示食蟹猴中应答 IFN β -Fc 同源二聚体和 IFN β -Fc N297A 单体-二聚体杂合体的新蝶呤刺激作用。

[0067] 图 17a 显示 β 干扰素-Fc 的核苷酸序列；图 17b 显示 β 干扰素-Fc 的氨基酸序列。

[0068] 图 18 显示 T20(a)、T21(b) 和 T1249(c) 的氨基酸序列。

[0069] 实施方案的说明

[0070] A. 定义

[0071] 亲合标记物，在本文中用以指与另一个目的分子连接的分子，其能够与特异性结合配偶体相互作用，以分离或鉴定所述另一个目的分子。

[0072] 本发明嵌合蛋白或者与本发明嵌合蛋白实际等同的蛋白质或肽的类似物，在本文中用以指蛋白质或肽的相关氨基酸序列与特定序列具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99% 或 100% 的一致性。举例说，这种序列可以是源自各种物种的变体，或者它们可以通过截短、缺失、氨基酸置换或添加从特定序列衍生。两个氨基酸序列之间的一致性百分率通过标准的比对算法确定，所述算法例如 Altschul 等, 1990, J. Mol. Biol., 215:403-410 中描述的基本局部比对工具 (BLAST) ; Needleman 等, 1970, J. Mol. Biol., 48:444-453 的算法 ; Meyers 等, 1988, Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 的算法 ; 或者 Tatusova 等, 1999, FEMS Microbiol. Lett., 174:247-250 等。这些算法整合到 BLASTN、BLASTP 和“BLAST2 序列”程序中 (参见 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)。当采用这些程序时，可以使用缺省参数。例如，对于核苷酸序列，以下设置可用于“BLAST2 序列”：程序 BLASTN、匹配奖分 2、错配罚分 -2、开放空位罚分和拓展空位罚分分别为 5 和 2、gap x_dropoff50、期望值 10、字长 11、滤器开。对于氨基酸序列，以下设置可用于“BLAST2 序列”：程序 BLASTP、矩阵 BLOSUM62、开放空位罚分和拓展空位罚分分别为 11 和 1、gapx_dropoff50、期望值 10、字长 3、滤器开。

[0073] 生物利用度，在本文中用以指某物质被吸收到生命系统中或在生理活动位点得以利用的程度和速度。

[0074] 生物活性分子，在本文中用以指能够在生物背景中 (例如在生物体、细胞或它们的体外模型中) 治疗疾病或病症，或者通过发挥某种功能或作用，或通过刺激或应答某种功能、作用或反应，将某种分子局限于或靶向体内疾病或病症位点的非免疫球蛋白分子或其片段。生物活性分子可包括至少多肽、核酸、小分子 (如有机或无机小分子) 之一。

[0075] 嵌合蛋白，在本文中用以指由源自第一来源的第一氨基酸序列与源自第二来源的第二氨基酸序列共价或非共价连接组成的任何蛋白质，其中第一和第二来源不相同。互不相同的第一来源和第二来源可包括两种不同的生物实体，或同一生物实体的两种不同的蛋白质，或某种生物实体和某种非生物实体。嵌合蛋白可包括例如源自至少两种不同生物来源的蛋白质。生物来源可包括任何非合成法产生的核酸或氨基酸序列 (例如基因组或 cDNA 序列、质粒或病毒载体、天然病毒颗粒或者上述任何一种的突变体或类似物 (如本文的进

一步描述))。合成来源可包括通过化学法而不是通过生物系统产生的蛋白质或核酸序列(例如氨基酸序列的固相合成)。嵌合蛋白也可包括衍生自至少两种不同的合成来源的蛋白质或者衍生自至少一种生物来源和至少一种合成来源的蛋白质。嵌合蛋白还可包含衍生自第一来源的、与衍生自任何来源的核酸或者衍生自任何来源的有机或无机小分子共价或非共价连接的第一氨基酸序列。嵌合蛋白在第一和第二氨基酸序列之间,或在第一氨基酸序列和核酸之间,或在第一氨基酸序列和有机或无机小分子之间,可包含接头分子。

[0076] 凝血因子,在本文中用以指在患有止血病症的对象中防止或缩短出血发作持续时间的任何天然或重组产生的分子或其类似物。换句话说,凝血因子指具有凝血活性的任何分子。

[0077] 凝血活性,在本文中用以指参与最终导致形成血纤蛋白块和/或减少出血或流血发作的严重性、持续时间或频率的生化反应级联的能力。

[0078] 二聚体,在本文中用以指包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白,其中所述第一和第二多肽链均包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区。同源二聚体指其中两个生物活性分子相同的二聚体。

[0079] 以二聚体形式连接的单体-二聚体杂合体指包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(例如免疫球蛋白的Fc片段)、生物活性分子和连接上述两者从而使一个生物活性分子与两条多肽链(每条链包含一部分免疫球蛋白恒定区)结合的接头的嵌合蛋白。图4给出以二聚体形式连接的单体-二聚体杂合体的一个实例。

[0080] DNA 构建物,在本文中用以指这样的单链或双链DNA分子或这种分子的克隆,所述DNA分子已通过人工干预而被修饰,从而含有以某种方式结合在一起的各DNA区段,所述方式使得所述各区段作为整体不会在自然界中另外存在。DNA构建物含有指导目的多肽的表达所需的信息。DNA构建物可包括启动子、增强子和转录终止子。含有指导目的多肽分泌所需信息的DNA构建物也含有至少一种分泌信号序列。

[0081] 结构域,在本文中用以指多肽(根据这个术语的定义,包括蛋白质)中具有某些区别性物理特征或功能的区域,包括例如由多肽链的一段组成的独立折叠结构。结构域可含有多肽的区别性物理特征序列,或可含有保留其结合特性(即其能结合第二结构域)的物理特征片段。结构域可与另一结构域联合。换句话说,第一结构域可自然结合第二结构域。

[0082] 片段,在本文中用以指包含具有至少2个连续氨基酸残基、至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少100个连续氨基酸残基或至少200个连续氨基酸残基的氨基酸序列,或者包含蛋白质、肽或多肽的任何缺失或截短的肽或多肽。

[0083] 止血,在本文中用以指停止流血或出血;或者停止血液流过血管或身体部位。

[0084] 止血障碍,在本文中用以指由于血纤蛋白块形成能力受损或无此能力导致的、以自发性或创伤性出血倾向为特征的遗传性或获得性病症。

[0085] 连接,在本文中用以指第一核酸序列与第二核酸序列共价结合。第一核酸序列可直接与第二核酸序列直接结合或并列,或者插入序列可将第一序列与第二序列共价结合。连接在本文中也可用以指第一氨基酸序列与第二氨基酸序列共价或非共价结合。第一氨基酸序列可直接与第二氨基酸序列直接结合或并列,或者插入序列可将第一氨基酸序列与第

二氨基酸序列共价结合。

[0086] 有效连接,在本文中用以指第一核酸序列与第二核酸序列连接,从而两个序列都能够被表达为生物活性蛋白质或肽。

[0087] 多肽,在本文中用以指氨基酸聚合物,但不是指特定长度的产物;因此,肽、寡肽和蛋白质都包括在多肽的定义内。这个术语并不排斥多肽的表达后修饰,例如糖基化、乙酰化、磷酸化、聚乙二醇化、脂质部分的添加或者任何有机或无机分子的添加。包括在此定义内的例如有含有一个或多个氨基酸类似物(包括例如非天然氨基酸)的多肽和含有取代键的多肽,以及其他本领域公知的天然或非天然修饰的多肽。

[0088] 高严格性,在本文中用以包括技术人员根据例如 DNA 的长度容易确定的条件。通常,这种条件在 Sambrook 等, Molecular Cloning :ALaboratory Manual, 第 2 版, 第 1 卷, 1. 101-104 页, Cold Spring HarborLaboratory Press(1989) 中定义,包括使用硝酸纤维素滤膜预漂洗溶液 :5X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA(PH 8.0);杂交条件 :50%甲酰胺, 6X SSC, 42℃ (或其他类似的杂交溶液如 Stark 溶液, 50%甲酰胺中, 42℃);和漂洗条件 :约 68℃, 0.2X SSC, 0.1% SDS。技术人员会认识到,温度和漂洗溶液盐浓度可根据例如探针的长度等因素按需要进行调整。

[0089] 中等严格性,在本文中用以包括本领域普通技术人员根据例如 DNA 的长度容易确定的条件。Sambrook 等, Molecular Cloning :ALaboratory Manual, 第 2 版, 第 1 卷, 1. 101-104 页, Cold Spring HarborLaboratory Press(1989) 规定了基本的条件,包括使用硝酸纤维素滤膜预漂洗溶液 :5X SSC, 0.5% SDS, 1.0mM EDTA(pH 8.0);杂交条件 :50%甲酰胺, 6X SSC, 42℃ (或其他类似的杂交溶液如 Stark 溶液, 50%甲酰胺中, 42℃);和漂洗条件 :60℃, 0.5X SSC, 0.1% SDS。

[0090] 无机小分子,在本文中用以指不含碳原子且不大于 50kD 的分子。

[0091] 有机小分子,在本文中用以指含至少一个碳原子且不大于 50kD 的分子。

[0092] 治疗,在本文中用以指以下任何一项 :降低疾病或病症的严重性 ;减少疾病过程持续时间 ;改善与疾病或病症相关的一种或多种症状 ;为患有疾病或病症的对象提供有益效果,而不必治愈疾病或病症 ;预防与疾病或病症相关的一种或多种症状。

[0093] B. 本发明一些实施方案提供的改进效果

[0094] 本发明提供包含第一和第二多肽链的嵌合蛋白(单体-二聚体杂合体),其中所述第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,所述第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,但不含任何生物活性分子或免疫球蛋白的可变区。图 1 将传统的融合蛋白二聚体与本发明单体-二聚体杂合体的一个实例进行对比。

[0095] 如同其他包含至少一部分免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白一样,本发明提供的嵌合蛋白与单独的生物活性分子相比,其稳定性提高,生物利用度增加。而且此外,由于嵌合蛋白的两条链中只有一条包含生物活性分子,所述嵌合蛋白的分子量比其中所有的链均包含生物活性分子的嵌合蛋白更低,虽然不想囿于任何理论,但这确会导致嵌合蛋白更容易地例如通过与 FcRn 受体结合而被胞转穿过上皮屏障,从而增加嵌合蛋白的半寿期。在一个实施方案中,本发明因此提供给予本发明治疗性嵌合蛋白的改进非侵入性方法(例如通过任何黏膜表面如口腔、口颊、舌下、鼻、直肠、阴道,或者通过肺部或眼部途径)。本发明因此提供与前述嵌合蛋白(例如由至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子组成的嵌合蛋白)

白,其中嵌合蛋白所有的链均包含生物活性分子)相比,使用更低频率和更少剂量而达到本发明嵌合蛋白的治疗水平的方法。

[0096] 在另一实施方案中,本发明提供给予本发明治疗性嵌合蛋白的侵入性方法,例如皮下、静脉内给药。本发明治疗性嵌合蛋白的侵入性给药方法能增加治疗性嵌合蛋白的半寿期,结果与前述嵌合蛋白(例如由至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子组成的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白所有的链均包含生物活性分子)相比,可采用更低频率和更少剂量。

[0097] 其中只有一条链包含生物活性分子的嵌合蛋白的又一个优点是,其与其中所有的链均包含生物活性分子的嵌合蛋白相比,由于位阻减少、疏水作用减少、离子相互作用减少或分子量降低,生物活性分子对靶细胞或分子的可达性提高。

[0098] C. 嵌合蛋白

[0099] 本发明涉及包含一个生物活性分子、至少一部分免疫球蛋白恒定区和任选至少一个接头的嵌合蛋白。所述免疫球蛋白部分须同时具有N末端或氨基末端和C末端或羧基末端。所述嵌合蛋白可含有与所述免疫球蛋白部分的N末端连接的生物活性分子。或者,生物活性分子可与所述免疫球蛋白部分的C末端连接。在一个实施方案中,连接键是共价键。在另一个实施方案中,连接键是非共价键。

[0100] 嵌合蛋白可任选包含至少一个接头;因此,生物活性分子不必直接与免疫球蛋白恒定区部分连接。接头可插入在生物活性分子和免疫球蛋白恒定区部分中间。接头可连接到免疫球蛋白恒定区部分的N末端,或免疫球蛋白恒定区部分的C末端。如果生物活性分子包含至少一个氨基酸,该生物活性分子须具有N末端和C末端,接头可连接到生物活性分子的N末端,或生物活性分子的C末端。

[0101] 本发明涉及式 $X-L_a-F:F$ 或 $F:F-L_a-X$ 的嵌合蛋白,其中X是生物活性分子,L是任选的接头,F是至少一部分免疫球蛋白恒定区,a是任何任何整数或零。本发明还涉及式 $T_a-X-L_a-F:F$ 或 $T_a-F:F-L_a-X$ 的嵌合蛋白,其中X是生物活性分子,L是任选的接头,F是至少一部分免疫球蛋白恒定区,a是任何任何整数或零,T是第二接头或者可用以帮助嵌合蛋白纯化的标记,例如FLAG标记、组氨酸标记、GST标记、麦芽糖结合蛋白标记,(:)表示化学缔合作用,例如至少一个非肽键。在某些实施方案中,化学缔合作用即(:)是共价键。在其他实施方案中,化学缔合作用即(:)是非共价键,例如离子相互作用、疏水相互作用、亲水相互作用、范德华相互作用和氢键。技术人员应能理解,当a等于0时,X将直接与F连接。因此,例如,a可以是0、1、2、3、4、5或大于5。

[0102] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2a的氨基酸序列(SEQ ID NO:6)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2b的氨基酸序列(SEQ ID NO:8)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2c的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2d的氨基酸序列(SEQ ID NO:12)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2e的氨基酸序列(SEQ ID NO:14)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2f的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2g的氨基酸序列(SEQ ID NO:18)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2h的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2i的氨基酸序列(SEQ ID NO:22)。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含图2j的氨基酸序列(SEQ ID NO:24)。在一个实施方案

中,本发明嵌合蛋白包含图 17b 的氨基酸序列 (SEQ ID NO :27)。

[0103] 1. 嵌合蛋白变体

[0104] 本发明嵌合蛋白的衍生物、抗本发明嵌合蛋白的抗体和抗本发明嵌合蛋白结合配偶体的抗体均被考虑在内,它们可通过置换、添加和 / 或缺失 / 截短从而改变氨基酸序列,或者通过引入能导致产生功能相当分子的化学修饰来制备。本领域普通技术人员应能理解到,任何蛋白质序列中的某些氨基酸可被其他氨基酸置换,而不会对蛋白质的活性产生不利的影响。

[0105] 在本发明嵌合蛋白的氨基酸序列或其 DNA 编码序列中可制造各种变化,而又不明显丧失本发明嵌合蛋白的活性、功能或效用。由这种变化产生的衍生物、类似物或突变体及这种衍生物的应用都在本发明的范围内。在某个具体的实施方案中,所述衍生物具有功能活性,即能够表现出与本发明嵌合蛋白相关的一种或多种活性,例如 FcRn 结合、病毒抑制、止血、红细胞生成。有许多能够检测包含生物活性分子的嵌合蛋白的活性的试验法为本领域所公知。在生物活性分子是 HIV 抑制剂的情况中,可通过使用公知方法测量逆转酶活性来检测活性 (参见例如 Barre-Sinoussi 等,1983, Science 220 :868 ;Gallo 等,1984, Science 224 :500)。或者,可通过测量促融活性来检测活性 (参见例如 Nussbaum 等,1994, J. Virol. 68(9) :5411)。在生物活性为止血的情况中,可进行 StaCLot FVIIa-rTF 试验来评估 VIIa 因子衍生物的活性 (Johannessen 等,2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11 :S159)。

[0106] 序列中氨基酸的置换物可选自该氨基酸所属类别的其他成员 (参见表 1)。此外,各种氨基酸通常都用中性氨基酸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸来置换 (参见例如 MacLennan 等,1998, Acta Physiol. Scand. Suppl. 643 :55-67 ;Sasaki 等,1998, Adv. Biophys. 35 :1-24)。

[0107] 表 1

[0108]

原始残基	示例性置换	典型置换
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Gly (G)	Pro, Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, 1,4-二氨基丁酸, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Gly
Ser (S)	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 正亮氨酸	Leu

[0109]

[0110] 2. 生物活性分子

[0111] 本发明考虑任何生物活性分子作为本发明治疗性分子的用途。生物活性分子可以是多肽。生物活性分子可以是单个氨基酸。生物活性分子可包括修饰多肽。

[0112] 生物活性分子可包括脂质分子（例如类固醇或胆固醇、脂肪酸、三酰甘油、甘油磷脂或鞘脂）。生物活性分子可包括糖分子（例如葡萄糖、蔗糖、甘露糖）。生物活性分子可

包括核酸分子（例如 DNA、RNA）。生物活性分子可包括有机小分子或无机小分子。

[0113] a. 细胞因子和生长因子

[0114] 在一个实施方案中，生物活性分子是生长因子、激素或细胞因子或者它们的类似物或片段。生物活性分子可以是能够诱导细胞生长和增殖的任何作用物。在某个具体的实施方案中，生物活性分子是能诱导红细胞增殖的任何作用物。因此，本发明考虑的生物活性分子的一个实例是 EPO。生物活性分子还可包括但不限于 RANTES、MIP1 α 、MIP1 β 、IL-2、IL-3、GM-CSF、生长激素、肿瘤坏死因子（例如 TNF α 或 β ）。

[0115] 生物活性分子可包括合成法或重组法生产的 α 干扰素，包括但不限于约 25 种结构相关的亚型之任一种，例如现市售供临床使用的 α 2a 干扰素（**ROFERON[®]**, Roche）和也被批准供临床使用的 α 2b 干扰素（**INTRON[®]**, Schering），以及各种亚型的基因工程体，包括但不限于市售的共有 α 干扰素（**INFERGEN[®]**, Intermune, Amgen 开发）和共有入白细胞干扰素（参见例如美国专利 4,695,623 ;4,897,471）、 β 干扰素、表皮生长因子、促性腺素释放激素（GnRH）、亮丙立德、促卵泡激素、孕酮、雌激素或睾酮。

[0116] 可用于本发明嵌合蛋白的细胞因子和生长因子清单已有在先描述（参见例如美国专利 6,086,875、6,485,726、6,030,613 ;WO 03/077834 ;US2003-0235536A1）。

[0117] b. 抗病毒剂

[0118] 在一个实施方案中，生物活性分子是抗病毒剂，包括其片段和类似物。抗病毒剂可包括能抑制或防止病毒复制，或者能抑制或防止病毒进入细胞，或者能抑制或防止病毒逸出细胞的任何分子。在一个实施方案中，抗病毒剂是融合抑制剂。在一个实施方案中，抗病毒剂是抑制病毒复制的细胞因子。在另一实施方案中，抗病毒剂是 α 干扰素。

[0119] 供用于嵌合蛋白的病毒融合抑制剂可以是减少或防止病毒穿过靶细胞细胞膜的任何分子。病毒融合抑制剂可以是减少或防止在至少两个易感细胞之间形成合胞体的任何分子。病毒融合抑制剂可以是减少或防止真核细胞的脂双层膜与有包膜病毒的脂双层结合的任何分子。有包膜病毒的实例包括但不限于 HIV-1、HIV-2、SIV、流感病毒、副流感病毒、Epstein-Barr 病毒、CMV、单纯疱疹病毒 1、单纯疱疹病毒 2 和呼吸道合胞病毒。

[0120] 病毒融合抑制剂可以是减少或防止病毒融合的任何分子，包括但不限于多肽、有机小分子或无机小分子。在一个实施方案中，融合抑制剂是多肽。在一个实施方案中，病毒融合抑制剂是 3-36 个氨基酸的多肽。在另一实施方案中，病毒融合抑制剂是 3-50、10-65、10-75 个氨基酸的多肽。多肽可包含天然氨基酸序列（例如 gp41 片段），包括该序列的类似物和突变体，或者多肽可包含自然界中不存在的氨基酸序列，只要该多肽能表现出病毒融合抑制活性。

[0121] 在一个实施方案中，病毒融合抑制剂是多肽，该多肽可通过使用至少一种计算机算法，例如 ALLMOT15、107x178x4 和 PLZIP（参见例如美国专利 6,013,263 ;6,015,881 ;6,017,536 ;6,020,459 ;6,060,065 ;6,068,973 ;6,093,799 和 6,228,983）鉴定为病毒融合抑制剂。

[0122] 在一个实施方案中，病毒融合抑制剂是 HIV 融合抑制剂。在一个实施方案中，HIV 是 HIV-1。在另一实施方案中，HIV 是 HIV-2。在一个实施方案中，HIV 融合抑制剂是由 HIV-1gp41 包膜蛋白片段组成的多肽。HIV 融合抑制剂可包含例如 T20 (SEQ ID NO :1) 或其类似物、T21 (SEQ ID NO :2) 或其类似物、T1249 (SEQ ID NO :3) 或其类似物、NCCGp41 (Louis 等，

2001, J. Biol. Chem. 276 : (31) 29485) 或其类似物、或 5 螺旋 (Root 等, 2001, Science 291 : 884) 或其类似物。

[0123] 可用本领域公知的试验检测多肽、有机小分子或无机小分子的病毒融合抑制活性。这些试验包括逆转录酶试验、p24 试验或合胞体试验 (参见例如美国专利 5, 464, 933)。

[0124] 可用于本发明嵌合蛋白的抗病毒剂的清单已有在先描述 (参见例如美国专利 6, 086, 875、6, 485, 726、6, 030, 613 ; WO 03/077834 ; US2003-0235536A1)。

[0125] c. 止血剂

[0126] 在一个实施方案中, 生物活性分子是凝血因子或其他能促进止血的作用物, 包括其片段和类似物。凝血因子可包括具有凝血活性或能激活凝血活性分子的任何分子。凝血因子可由多肽组成。凝血因子可以是例如但不限于 VIII 因子、IX 因子、XI 因子、XII 因子、血纤蛋白原、凝血酶原、V 因子、VII 因子、X 因子、XIII 因子或 von Willebrand 因子。在一个实施方案中, 凝血因子是因子 VII 或因子 VIIa。凝血因子可以是参与外源途径的因子。凝血因子可以是参与内源途径的因子。或者, 凝血因子可以是参与外源和内源两种途径的因子。

[0127] 凝血因子可以是人凝血因子, 或者是非人凝血因子, 例如源自非人灵长目动物、猪或任何哺乳动物的凝血因子。凝血因子可以是嵌合凝血因子, 例如凝血因子可包含人凝血因子的一部分和猪凝血因子的一部分, 或者包含第一非人凝血因子的一部分和第二非人凝血因子的一部分。

[0128] 凝血因子可以是活化凝血因子。或者, 凝血因子可以是非活性形式的凝血因子, 例如酶原。非活性凝血因子可在连接到至少一部分免疫球蛋白恒定区后被激活。非活性凝血因子可在给药于对象后被激活。或者, 非活性凝血因子可在给药前激活。

[0129] 在某些实施方案中, 可用内肽酶例如成对碱性氨基酸切割酶 (PACE) 或任何 PACE 家族成员如 PCSK1-9, 包括其截短形式或其酵母同等物 Kex2 (来自酿酒酵母 (*S. cerevisiae*)) 和 Kex2 的截短形式 (参见例如美国专利 5, 077, 204 ; 5, 162, 220 ; 5, 234, 830 ; 5, 885, 821 ; 6, 329, 176) 切割前肽, 以形成成熟的本发明嵌合蛋白 (例如 VII 因子、IX 因子)。

[0130] d. 其他蛋白质类生物活性分子

[0131] 在一个实施方案中, 生物活性分子是受体或其片段或类似物。受体可在细胞外表面上表达, 或者受体可在细胞内表面上表达。受体可以是病毒受体, 例如 CD4、CCR5、CXCR4、CD21、CD46。生物活性分子可以是细菌受体。生物活性分子可以是在细菌定居和感染中有重要作用的胞外基质蛋白或其片段或类似物 (参见美国专利 5, 648, 240 ; 5, 189, 015 ; 5, 175, 096) 或者是在粘附和感染中有重要作用的细菌表面蛋白 (参见美国专利 5, 648, 240)。生物活性分子可以是生长因子、激素或细胞因子受体或者它们的片段或类似物, 例如 TNF α 受体、促红细胞生成素受体、CD25、CD122 或 CD132。

[0132] 可用于本发明嵌合蛋白的其他蛋白质类分子的清单已有在先描述 (参见例如美国专利 6, 086, 875、6, 485, 726、6, 030, 613 ; WO 03/077834 ; US2003-0235536A1)。

[0133] e. 核酸

[0134] 在一个实施方案中, 生物活性分子是核酸, 例如 DNA、RNA。

[0135] 在一个具体的实施方案中, 生物活性分子是可用于 RNA 干扰 (RNAi) 的核酸。核酸

分子可以是例如但不限于反义分子或核酶或适体。

[0136] 反义 RNA 和 DNA 分子通过与靶 mRNA 杂交并防止蛋白质翻译来发挥作用,从而直接阻断 mRNA 的翻译。反义方法涉及与靶基因 mRNA 互补的寡核苷酸的设计。反义寡核苷酸会与互补的靶基因 mRNA 转录物结合,从而防止翻译。并不要求绝对的互补性。

[0137] 本文所指的序列与 RNA 的一部分“互补”,是指序列具有足够的互补性,从而能够与 RNA 杂交形成稳定的双链体;在双链反义核酸的情况中,双链体 DNA 的单链可由此得以检测,或者可以检验出三链体的形成。杂交的能力取决于互补程度和反义核酸的长度。一般的说,杂交核酸越长,其可含有更多与 RNA 的碱基错配,且仍能形成稳定的双链体(或三链体,视情况而定)。本领域技术人员通过使用标准的方法测定杂交复合体的熔点,能确定可容忍的错配程度。

[0138] 反义核酸的长度应至少为六个核苷酸,优选反义核酸是长度为 6 个至约 50 个核苷酸的寡核苷酸。在具体的各方面,所述寡核苷酸是至少 10 核苷酸,至少 17 个核苷酸,至少 25 个核苷酸或至少 50 个核苷酸。

[0139] 寡核苷酸可以是 DNA 或 RNA 或嵌合混合体或者它们的衍生物或修饰形式,不管是单链还是双链。寡核苷酸可以在碱基部分、糖部分或磷酸主链上被修饰,例如以提高分子的稳定性、杂交等。寡核苷酸可包括其他附属基团如多肽(例如用以靶向宿主体内细胞受体)、或者能促进转运通过细胞膜(参见例如 Letsinger 等,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553;Lemaitre 等,1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:648;WO 88/09810,)或血脑屏障(参见例如 WO 89/10134)的作用物、杂交引发的切割剂(参见例如 Krol 等,1988, BioTechniques 6:958)或嵌入剂(参见例如 Zon 1988, Pharm. Res. 5:539)。为此,寡核苷酸可缀合到另一分子,例如多肽、杂交引发的交联剂、转运剂或杂交引发的切割剂。

[0140] 设计来催化切割靶基因 mRNA 转录物的核酶分子也可用来防止靶基因 mRNA 的翻译,从而防止靶基因产物的表达(参见例如 WO90/11364;Sarver 等,1990, Science 247, 1222-1225)。

[0141] 核酶是能够催化 RNA 的特异性切割的酶性 RNA 分子。(参见 Rossi 1994, Current Biology 4:469)。核酶的作用机制涉及核酶分子与互补靶 RNA 的序列特异性杂交及随后的内切核苷酸切割事件。核酶分子的组成成分必须包括一种或多种与靶基因 mRNA 互补的序列,且必须包括公知的引起 mRNA 切割的催化序列。后者序列参见例如美国专利 5,093,246。

[0142] 在一个实施方案中,在位点特异性识别序列切割 mRNA 的核酶可用来破坏靶基因 mRNA。在另一个实施方案中,考虑采用锤头核酶。在由与靶 mRNA 形成互补碱基对的侧翼区指示的位置,锤头核酶对 mRNA 进行切割。唯一的要求是靶 mRNA 具有以下两碱基序列: 5'-UG-3'。锤头核酶的构建和生产在本领域是公知的,在 Myers 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York 及在 Haseloff 和 Gerlach 1988, Nature, 334:585 中有更全面的描述。

[0143] f. 小分子

[0144] 本发明还考虑使用任何治疗性小分子或药物作为本发明嵌合蛋白中的生物活性分子。可用于本发明嵌合蛋白的小分子和药物的清单已有在先描述(参见例如美国专利 6,086,875、6,485,726、6,030,613;WO 03/077834;US2003-0235536A1)。

[0145] 2. 免疫球蛋白

[0146] 本发明嵌合蛋白包含至少一部分免疫球蛋白恒定区。免疫球蛋白由共价缔合的四条蛋白链——两条重链和两条轻链组成。每条链进一步由一个可变区和一个恒定区组成。取决于免疫球蛋白的同种型,重链恒定区由 3 或 4 个恒定区结构域组成(例如 CH1、CH2、CH3、CH4)。某些同种型还包含铰链区。

[0147] 免疫球蛋白恒定区部分可获自任何哺乳动物。免疫球蛋白恒定区部分可包括人免疫球蛋白恒定区、非人灵长目动物免疫球蛋白恒定区、牛免疫球蛋白恒定区、猪免疫球蛋白恒定区、鼠免疫球蛋白恒定区、绵羊免疫球蛋白恒定区或大鼠免疫球蛋白恒定区的一部分。

[0148] 免疫球蛋白恒定区部分可通过重组法或合成法生产。免疫球蛋白可从 cDNA 文库分离。免疫球蛋白恒定区部分可从噬菌体文库分离(参见例如 McCafferty 等,1990,Nature 348 :552, Kang 等,1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :4363 ;EP 0 589 877 B1)。免疫球蛋白恒定区部分可通过已知序列的基因重排获得(Mark 等,1992, Bio/Technol. 10 :779)。免疫球蛋白恒定区部分可通过体内重组来分离(Waterhouse 等,1993, Nucl. Acid Res. 21 :2265)。免疫球蛋白可以是人源化免疫球蛋白(美国专利 5, 585, 089, Jones 等,1986,Nature 332 :323)。

[0149] 免疫球蛋白恒定区部分可包括 IgG、IgA、IgM、IgD 或 IgE 的一部分。在一个实施方案中,免疫球蛋白是 IgG。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是 IgG1。在另一个实施方案中,免疫球蛋白是 IgG2。

[0150] 免疫球蛋白恒定区部分可包括整个重链恒定区或其片段或类似物。在一个实施方案中,重链恒定区可包含 CH1 结构域、CH2 结构域、CH3 结构域和 / 或铰链区。在另一个实施方案中,重链恒定区可包含 CH1 结构域、CH2 结构域、CH3 结构域和 / 或 CH4 结构域。

[0151] 免疫球蛋白恒定区部分可包括 Fc 片段。Fc 片段可由免疫球蛋白的 CH2 和 CH3 结构域及免疫球蛋白的铰链区组成。Fc 片段可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc 片段。在一个具体的实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是 IgG1 的 Fc 片段。在另一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是 IgG2 的 Fc 片段。

[0152] 在另一个实施方案中,免疫球蛋白恒定区部分是 Fc 新生受体 (FcRn) 结合配偶体。FcRn 结合配偶体是能被 FcRn 受体特异性结合的任何分子,结果 FcRn 结合配偶体被 FcRn 受体主动转运。特异性结合指两个分子形成在生理条件下相对稳定的复合体。特异性结合的特征是高亲合性及低至中等容量,这与通常具有低亲合性及中等至高容量的非特异性结合区别开来。通常,当亲合常数 K_A 大于 $10^6 M^{-1}$, 或更优选大于 $10^8 M^{-1}$ 时,可认为结合是特异性的。如有必要,可通过改变结合条件减少非特异性结合,而又不使特异性结合发生实质改变。适当的结合条件如分子浓度、溶液的离子强度、温度、允许的结合时间、阻断剂(例如血清白蛋白、牛奶酪蛋白)的浓度等,可由技术人员使用常规技术进行优化。

[0153] 已从几种哺乳动物(包括人类)中分离出 FcRn 受体。人 FcRn、猴 FcRn、大鼠 FcRn 和小鼠 FcRn 的序列是公知的(Story 等,1994, J. Exp. Med. 180 :2377)。FcRn 受体在相对较低的 pH 下结合 IgG(但不结合其他种类的免疫球蛋白,如 IgA、IgM、IgD 和 IgE),沿着腔至浆膜的方向跨细胞主动转运 IgG,然后在见于间质流体中的相对较高的 pH 下释放 IgG。FcRn 受体表达于成人上皮组织(美国专利 6, 485, 726、6, 030, 613、6, 086, 875 ;WO 03/077834 ; US2003-0235536A1),包括肺部和肠道上皮(Israel 等,1997, Immunology 92 :69)、肾近端小管上皮(Kobayashi 等,2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282 :F358)以及鼻上皮、阴道表

面和胆管表面。

[0154] 本发明 FcRn 结合配偶体包括能被 FcRn 受体特异性结合的任何分子,包括完整的 IgG、IgG 的 Fc 片段和其他包括 FcRn 受体的完全结合区的片段。已根据 X 射线晶体学对 IgG 的 Fc 部分中 FcRn 受体的结合区进行了描述 (Burmeister 等,1994, Nature 372 :379)。Fc 与 FcRn 的主要接触区域在 CH2 和 CH3 结构域的连接处附近。所有 Fc-FcRn 接触均在单条 Ig 重链之内。FcRn 结合配偶体包括完整的 IgG、IgG 的 Fc 片段和其他包括 FcRn 的完全结合区的 IgG 片段。主要接触位点包括 CH2 结构域的氨基酸残基 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 和 314 和 CH3 结构域的氨基酸残基 385-387、428 和 433-436。所有提及的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或区域的氨基酸编号均基于 Kabat 等,1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD。

[0155] IgG 的 Fc 区可按照公认方法如定点诱变等进行修饰,以产生能被 FcRn 结合的修饰 IgG 或其 Fc 片段或部分。这种修饰包括远离 FcRn 接触位点的修饰以及接触位点内的修饰,所述修饰能保持或甚至提高与 FcRn 的结合能力。例如,下列人 IgG1 Fc (Fc γ 1) 中的单氨基酸残基可被置换,而不明显损失 Fc 与 FcRn 的结合亲合性: P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A 和 K447A,其中例如 P238A 表示野生型脯氨酸在 238 位被丙氨酸置换。举例说,一个具体的实施方案掺入了 N297A 突变,从而除去高度保守的 N-糖基化位点。除丙氨酸之外,也可在以上指定的位置用其他氨基酸置换野生型氨基酸。可个别地向 Fc 中引入突变,产生一百多种不同于天然 Fc 的 FcRn 结合配偶体。或者,可一起引入两个、三个或更多个这种单个突变的组合,再产生几百种 FcRn 结合配偶体。此外,单体-二聚体杂合体的一个 FcRn 结合配偶体可被突变,而另一个 FcRn 结合配偶体根本没有突变,或者它们都可被突变,但突变类型不同。不管什么生物活性分子(例如 EPO、IFN、IX 因子、T20),本文描述的任何突变(包括 N297A)均可用来修饰 Fc。

[0156] 以上突变中有些能赋予 FcRn 结合配偶体新的功能性。例如,有一个实施方案掺入了 N297A,从而除去高度保守的 N-糖基化位点。这个突变的效果是,减少了免疫原性,从而增加 FcRn 结合配偶体的循环半寿期,并使得 FcRn 结合配偶体不能够与 Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB 和 Fc γ RIIC 结合,而又不损害对 FcRn 的亲合性 (Routledge 等,1995, Transplantation 60 :847 ;Friend 等,1999, Transplantation 68 :1632 ;Shields 等,1995, J. Biol. Chem. 276 :6591)。作为上述突变带来新功能的另一个实例,在某些情况下对 FcRn 的亲合性可增加至超过野生型。亲合性增加可反映在“结合”速度增加、“脱离”速度降低或“结合”速度增加且“脱离”速度降低。相信增加对 FcRn 亲合性的突变包括 T256A、T307A、E380A、N434A (Shields 等,2001, J. Biol. Chem. 276 :6591)。

[0157] 另外,至少有三种人 Fc γ 受体似乎能识别 IgG 的下铰链区的结合位点,通常为氨基酸 234-237。因此,新功能和潜在的免疫原性降低的另一个实例可由这个区域的突变产生,所述突变例如通过将人 IgG1 “ELLG”的氨基酸 233-236 置换成 IgG2 “PVA”的相应序列(缺失一个氨基酸)。已显示当引入了这种突变时,介导各种效应子功能的 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 将不会结合 IgG1。Ward 和 Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77 及 Armour 等,1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613。

[0158] 在一个实施方案中, FcRn 结合配偶体是包含序列 PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:26) 并任选还包含选自 HQSLGTQ (SEQ ID NO:27)、HQNLSDGK (SEQ ID NO:28)、HQNISDGK (SEQ ID NO:29) 或 VISSHLGQ (SEQ ID NO:30) 的序列的多肽(美国专利 5,739,277)。

[0159] 有两种 FcRn 受体能结合单个 Fc 分子。结晶学数据提示每个 FcRn 分子各结合 Fc 同源二聚体的单条多肽。在一个实施方案中,将 FcRn 结合配偶体(例如 IgG 的 Fc 片段)与生物活性分子连接,提供了生物活性分子的以下递送方式:经口、口腔内、舌下、直肠内、阴道内、作为气雾剂鼻内给药或者通过肺部途径或眼部途径给药。在另一个实施方案中,嵌合蛋白可通过侵入方式给药,例如皮下给药、静脉内给药。

[0160] 技术人员会理解,用于本发明嵌合蛋白的免疫球蛋白恒定区部分可包括其突变体或类似物,或者可包括经化学修饰的免疫球蛋白恒定区(例如聚乙二醇化)或其片段(参见例如 Aslam 和 Dent 1998, *Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences* Macmillan Reference, London)。在一个实例中,突变体能提高 FcRn 结合配偶体对 FcRn 的结合能力。还考虑用于本发明嵌合蛋白的是至少一部分免疫球蛋白恒定区的肽模拟物,例如 Fc 片段的肽模拟物或 FcRn 结合配偶体的肽模拟物。在一个实施方案中,肽模拟物用噬菌体展示或通过化学文库筛选来鉴定(参见例如 McCafferty 等,1990, *Nature* 348:552, Kang 等,1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363;EP 0 589 877 B1)。

[0161] 3. 任选的接头

[0162] 本发明嵌合蛋白可任选包含至少一个接头分子。接头可由任何有机分子组成。在一个实施方案中,接头是聚乙二醇(PEG)。在另一个实施方案中,接头由氨基酸组成。接头可包含 1-5 个氨基酸、1-10 个氨基酸、1-20 个氨基酸、10-50 个氨基酸、50-100 个氨基酸、100-200 个氨基酸。在一个实施方案中,接头是八个氨基酸的接头 EFAGAAAV (SEQ ID NO:31)。不管何种生物活性分子(例如 EPO、IFN、IX 因子),本文描述的任何接头(包括 EFAGAAAV)均可用于本发明嵌合蛋白(例如单体-二聚体杂合体)。

[0163] 接头可含 G_n 序列。接头可包含 $(GA)_n$ 序列 (SEQ ID NO:32)。接头可包含 $(GGS)_n$ 序列 (SEQ ID NO:33)。接头可包含 $(GGS)_n(GGGGS)_n$ 序列 (SEQ ID NO:34)。在这些实例中, n 可以是 1-10 的整数,即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10。接头的实例包括但不限于 GGG (SEQ ID NO:35)、SGGSGGS (SEQ ID NO:36)、GGSGGSGGSG GSGGG (SEQ ID NO:37)、GGSGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:38)、GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO:39)。接头不消除或减少嵌合蛋白的生物活性。任选接头提高嵌合蛋白的生物活性,例如通过进一步减少位阻的影响和使生物活性分子更容易达到其靶结合位点。

[0164] 在一个具体的实施方案中, α 干扰素的接头长度为 15-25 个氨基酸。在另一个具体的实施方案中, α 干扰素的接头长度为 15-20 个氨基酸。在一个具体的实施方案中, α 干扰素的接头长度为 10-25 个氨基酸。在一个具体的实施方案中, α 干扰素的接头长度为

15 个氨基酸。在一个实施方案中， α 干扰素的接头是 (GGGS)_n (SEQ ID NO :40)，其中 G 表示甘氨酸、S 表示丝氨酸，n 是 1-10 的整数。在一个具体的实施方案中，n 是 3。

[0165] 接头也可掺入能够通过化学法（例如酯键的水解）、酶法（即掺入蛋白酶切割序列）或光解法（例如生色团如 3-氨基-3-(2-硝基苯基)丙酸 (ANP)）切割的部分，以从 Fc 蛋白中释放出生物活性分子。

[0166] 4. 用特异性结合配偶体进行的嵌合蛋白二聚化

[0167] 在一个实施方案中，本发明嵌合蛋白包括包含至少第一结构域的第一多肽链和包含至少第二结构域的第二多肽，其中所述第一结构域具有至少一种特异性结合配偶体，所述第二结构域是所述第一结构域的特异性结合配偶体。因此，所述嵌合蛋白包含由于第一结构域和第二结构域的相互作用而能够与另一条多肽形成二聚体的多肽。用异源结构域使抗体二聚化的方法是本领域公知的（美国专利 5,807,706 和 5,910,573 ;Kostelny 等，1992, J. Immunol. 148(5) :1547）。

[0168] 二聚化可通过形成共价键或者非共价键来产生，所述非共价键例如疏水相互作用；范德华力；两性肽（例如但不限于 α 螺旋）的交错；带有相反电荷的氨基酸，如但不限于赖氨酸和天冬氨酸、精氨酸和谷氨酸的电荷-电荷相互作用。在一个实施方案中，结构域是包含螺旋、转角和其它螺旋的螺旋束。在另一个实施方案中，结构域是包含具有几个重复氨基酸的肽的亮氨酸拉链，其中每第七个氨基酸是亮氨酸残基。在一个实施方案中，特异性结合配偶体是 fos/jun。（参见 Branden 等，1991, Introduction To Protein Structure, Garland Publishing, NewYork）。

[0169] 在另一个实施方案中，结合由化学连接键介导（参见例如 Brennan 等，1985, Science 229 :81）。在这个实施方案中，完整的免疫球蛋白或包含至少一部分免疫球蛋白恒定区的嵌合蛋白被切割，产生重链片段。这些片段在二巯基化物络合剂亚砷酸钠存在时被还原，以使邻近的二巯基化物稳定，防止形成分子间二硫键。所产生的片段随后被转化为硫代硝基苯甲酸酯 (TNB) 衍生物。然后，其中一种 TNB 衍生物通过用巯基乙胺还原再次被转化为重链片段，接着与等摩尔量的其他 TNB 衍生物混合，形成嵌合二聚体。

[0170] D. 核酸

[0171] 本发明涉及第一核酸构建物和第二核酸构建物，各构建物包含编码至少一部分本发明嵌合蛋白的核酸序列。在一个实施方案中，第一核酸构建物包含编码一部分免疫球蛋白恒定区的核酸序列，该序列与编码生物活性分子的第二 DNA 序列有效连接，所述第二 DNA 构建物包含编码免疫球蛋白恒定区的 DNA 序列，不含表面生物活性分子的第二 DNA 序列。

[0172] 生物活性分子可包括例如但不限于病毒融合抑制剂、凝血因子、生长因子或激素，或者前述任一项的受体或类似物或片段。核酸序列也可包括另外的本领域公知的序列或元件（例如启动子、增强子、polyA 序列、亲合标记物）。在一个实施方案中，第二构建物的核酸序列可任选包括编码接头的核酸序列，所述接头序列位于编码生物活性分子和编码免疫球蛋白恒定区部分的核酸序列之间。第二 DNA 构建物的核酸序列可任选包括接头序列，所述序列位于编码生物活性分子和 / 或免疫球蛋白恒定区部分的核酸序列之前或之后。

[0173] 在一个实施方案中，核酸构建物由 DNA 组成。在另一个实施方案中，核酸构建物由 RNA 组成。核酸构建物可以是载体，例如病毒载体或质粒。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体或者鼠白血病病毒载体。质粒的实例包括但不限于 pUC、pGEM

和 pGEX。

[0174] 在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3a 的核酸序列 (SEQ IDNO :7)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3b 的核酸序列 (SEQ IDNO :9)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3c 的核酸序列 (SEQ IDNO :11)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3d 的核酸序列 (SEQ IDNO :13)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3e 的核酸序列 (SEQ IDNO :15)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3f 的核酸序列 (SEQ IDNO :17)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3g 的核酸序列 (SEQ IDNO :19)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3h 的核酸序列 (SEQ IDNO :21)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3i 的核酸序列 (SEQ IDNO :23)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 3j 的核酸序列 (SEQ IDNO :25)。在一个实施方案中,核酸构建物包含图 17a 的核酸序列 (SEQ ID NO :27)。

[0175] 由于公知的遗传密码的简并性,即不只一个密码子能编码同一个氨基酸,DNA 序列可以不同于 SEQ ID NO :7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 或 27 所示的序列,且仍编码分别具有 SEQ ID NO :6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 或 26 的相应氨基酸序列的多肽。这种变体 DNA 序列可由沉默突变导致(例如在 PCR 扩增过程中产生),或者可以是天然序列的有意诱变的产物。因此,本发明提供选自以下的编码本发明多肽的分离 DNA 序列:(a) 包含 SEQ ID NO :7、9、11、13、15、17、19、21、23、25 或 27 核苷酸序列的 DNA ;(b) 编码 SEQ ID NO :6、8、10、12、14、16、18、20、22、24 或 26 多肽的 DNA ;(c) 能够在中等严格性条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交且编码本发明多肽的 DNA ;(d) 能够在高严格性条件下与 (a) 或 (b) 的 DNA 杂交且编码本发明多肽的 DNA ;(e) 遗传密码与 (a)、(b)、(c) 或 (d) 中定义的 DNA 简并且编码本发明多肽的 DNA。当然,这种 DNA 序列所编码的多肽都为本发明所包括。

[0176] 在另一个实施方案中,包含本发明嵌合蛋白编码序列的核酸分子也可包含与天然序列具有至少 80%一致性的核苷酸序列。还考虑了这样的实施方案,其中包含本发明嵌合蛋白编码序列的核酸分子包含与天然序列具有至少 90%、至少 95%、至少 98%、至少 99%、或至少 99.9%一致性的序列。天然序列可包括没有人工改变过的任何 DNA 序列。一致性百分数可通过目视检查或数学计算来确定。或者,两种核酸序列的一致性百分数可通过用 GAP 计算机程序(版本 6.0, Devereux 等,1984, Nucl. Acids Res. 12 :387 描述, the University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG) 提供)对序列信息进行比较来确定。GAP 程序的优选缺省参数包括:(1) 核苷酸一元比较矩阵(其中一致的值为 1,不一致的值为 0)及 Gribskov 和 Burgess 1986, Nucl. Acids Res. 14 :6745 的加权比较矩阵,如 Schwartz 和 Dayhoff(编辑)1979, Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, 第 353-358 页所描述;(2) 每个空位罚分为 3.0,每个空位中的每个符号附加罚分 0.10 ;(3) 末端空位无罚分。也可使用序列比较领域的技术人员所用的其他程序。

[0177] E. 嵌合蛋白的合成

[0178] 包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子的嵌合蛋白可用本领域公知的技术来合成。例如,本发明嵌合蛋白可在细胞中重组合成(参见例如 Sambrook 等,1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 和 Ausubel 等,1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y.)。或者,本发明嵌合蛋白可用公知的合成方法如固相合成法来

合成。合成技术是本领域公知的（参见例如 Merrifield, 1973, *Chemical Polypeptides*, (Katsoyannis 和 Panayotis 编辑) 第 335-61 页; Merrifield 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85 : 2149 ; Davis 等, 1985, *Biochem. Intl.* 10 : 394 ; Finn 等, 1976, *The Proteins* (第 3 版) 2 : 105 ; Erikson 等, 1976, *The Proteins* (第 3 版) 2 : 257 ; 美国专利 3, 941, 763)。或者, 本发明嵌合蛋白可通过联合使用重组方法和合成方法来合成。在某些应用方案中, 使用重组方法或者联合使用重组和合成方法可有好处。

[0179] 编码生物活性分子的核酸可方便地用本领域公知的重组技术来合成。或者, 肽本身可通过化学法合成。本发明核酸可通过本领域公知的标准方法来合成, 例如通过使用自动 DNA 合成仪（如 Biosearch、Applied Biosystems 等市售的 DNA 合成仪）来合成。举例说, 寡核苷酸硫代磷酸酯可通过 Stein 等, 1988, *Nucl. Acids Res.* 16 : 3209 的方法合成, 寡核苷酸甲基磷酸酯可通过使用 Sarin 等, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 7448 中描述的可控多孔玻璃聚合物支持体来制备。另外的核酸合成方法是本领域公知的。（参见例如美国专利 6, 015, 881 ; 6, 281, 331 ; 6, 469, 136）。

[0180] 编码免疫球蛋白恒定区或其片段的 DNA 序列可从各种本领域公知的基因组或者 cDNA 文库中克隆。使用基于探针的方法分离这种 DNA 序列的技术是常规的技术, 为本领域技术人员所公知。用以分离这种 DNA 序列的探针可基于公布的 DNA 序列（参见例如 Hieter 等, 1980, *Cell* 22 : 197-207）。可使用 Mullis 等（美国专利 4, 683, 195）和 Mullis（美国专利 4, 683, 202）公开的聚合酶链反应（PCR）方法。文库的选择和用于分离这种 DNA 序列的探针的挑选工作在本领域普通技术人员的水平之内。或者, 编码免疫球蛋白或其片段的 DNA 序列可获自本领域公知含免疫球蛋白或其片段的载体。

[0181] 为进行重组生产, 将编码一部分本发明嵌合蛋白（例如一部分免疫球蛋白恒定区）的第一多核苷酸序列和编码一部分本发明嵌合蛋白（例如一部分免疫球蛋白恒定区和生物活性分子）的第二多核苷酸序列插入合适的表达载体, 即含有转录和翻译插入编码序列所需的元件的载体, 或者在 RNA 病毒载体的情况中, 含有复制和翻译所需的元件的载体。编码嵌合蛋白的核酸以合适的可读框插入载体中。

[0182] 然后, 表达载体转染或共转染到合适的靶细胞中, 后者将表达多肽。本领域公知的转染技术包括但不限于磷酸钙沉淀法 (Wigler 等, 1978, *Cell* 14 : 725) 和电穿孔法 (Neumann 等, 1982, *EMBO, J.* 1 : 841) 以及基于脂质体的试剂。可采用各种宿主 - 表达载体系统来表达本文描述的嵌合蛋白, 包括原核细胞或真核细胞。这些细胞包括但不限于微生物, 例如用含合适编码序列的重组噬菌体 DNA 或质粒 DNA 表达载体转化的细菌（例如大肠杆菌）; 用含合适编码序列的重组酵母或真菌表达载体转化的酵母或丝状真菌; 用含合适编码序列的重组病毒表达载体（例如杆状病毒）感染的昆虫细胞系统; 用含合适编码序列的重组病毒表达载体（例如花椰菜花叶病毒或烟草花叶病毒）感染或用含合适编码序列的重组质粒表达载体（例如 Ti 质粒）转化的植物细胞系统; 或动物细胞系统, 包括哺乳动物细胞（例如 CHO、Cos、HeLa 细胞）。

[0183] 当本发明嵌合蛋白在原核细胞中重组合成时, 有必要使嵌合蛋白重折叠。可用本领域公知的条件, 例如在还原条件下变性, 然后慢慢透析到 PBS 中, 将这种方法生产的嵌合蛋白重折叠成生物活性构象。

[0184] 取决于所用的表达系统, 表达的嵌合蛋白接着通过本领域的既定程序（例如亲合

层析、尺寸排阻层析、离子交换层析) 进行分离。

[0185] 表达载体可以编码用以方便纯化重组产生的嵌合蛋白的标记。其实例包括但不限于 pUR278 载体 (Ruther 等, 1983, EMBO J. 2 :1791), 其中本文描述的嵌合蛋白的编码序列可在载体中框内连接到 lac z 编码区, 以产生杂交蛋白; 可用 pGEX 载体表达带有谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST) 标记的本发明嵌合蛋白。这些蛋白质通常是可溶的, 可以容易地通过吸附到谷胱甘肽-琼脂糖珠, 然后在游离谷胱甘肽存在下洗脱, 从细胞中纯化出来。载体包括切割位点 (凝血酶或 Xa 因子蛋白酶或 PreScission ProteaseTM (Pharmacia, Peapack, N. J.)), 以方便在纯化后除去标记。

[0186] 为提高生产效率, 可将多核苷酸设计成能编码多个本发明嵌合蛋白单位, 所述各单位被酶切割位点分隔。可切割所得多肽 (例如通过用合适的酶处理), 以回收多肽单位。这样就能够提高由单个启动子驱动的多肽产率。当在合适的病毒表达系统中使用时, mRNA 编码的各条多肽的翻译在转录物内部被例如内部核糖体进入位点 (IRES) 指导。因此, 多顺反子构建物指导单个巨大的多顺反子 mRNA 的转录, 后者又指导多个个体多肽的翻译。这种方法消除了多蛋白的产生和酶加工, 可以显著地提高由单个启动子驱动的多肽产率。

[0187] 在转化中使用的载体通常会含有用以鉴定转化子的选择性标记。在细菌系统中, 这可包括抗生素抗性基因, 所述抗生素如氨苄青霉素或卡那霉素。用于培养哺乳动物细胞的选择性标记包括能赋予药物抗性的基因, 所述药物如新霉素、潮霉素和氨甲蝶呤。选择性标记可以是可扩增的选择性标记。一种可扩增的选择性标记是 DHFR 基因。另一种可扩增的选择性标记是 DHFR cDNA (Simonsenh 和 Levinson 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 2495)。Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA) 对选择性标记进行了综述, 选择性标记的挑选在本领域普通技术人员的技术水平范围内。

[0188] 选择性标记可在单独的质粒上与目的基因一起同时引入细胞, 或者它们可以在同一质粒上引入。如果在同一质粒上, 选择性标记和目的基因可以在不同启动子或相同启动子的控制下, 后一种方式产生双顺反子信息。这种类型的构建物是本领域公知的 (例如美国专利 4, 713, 339)。

[0189] 表达系统的表达元件的强度和特异性各不相同。取决于所采用的宿主 / 载体系统, 在表达载体中可使用多种合适转录和翻译元件的任一种, 包括组成型和诱导型启动子。例如, 当在细菌系统中克隆时, 可使用诱导型启动子, 如 λ 噬菌体的 pL、plac、ptrp、ptac (ptrp-lac 杂合启动子) 等等; 当在昆虫细胞系统中克隆时, 可使用杆状病毒多角体启动子之类的启动子; 当在植物细胞系统中克隆时, 可使用源自植物细胞基因组的启动子 (例如热休克启动子; RUBISCO 小亚基的启动子; 叶绿素 a/b 结合蛋白的启动子) 或源自植物病毒的启动子 (例如 CaMV 的 35S RNA 启动子; TMV 的外被蛋白启动子); 当在哺乳动物细胞系统中克隆时, 可使用源自哺乳动物基因组的启动子 (例如金属硫蛋白启动子) 或源自哺乳动物病毒的启动子 (例如腺病毒晚期启动子; 痘苗病毒 7.5K 启动子); 当产生含有表达产物多重拷贝的细胞系时, 基于 SV40、BPV 和 EBV 的载体可与合适的选择性标记一起使用。

[0190] 在使用植物表达载体的情况中, 编码线型或非环状本发明嵌合蛋白的序列其表达可通过多种启动子的任一种来驱动。例如, 可使用病毒启动子如 CaMV 的 35S RNA 和 19S RNA 启动子 (Brissori 等, 1984, Nature 310 :511-514) 或 TMV 的外被蛋白启动子

(Takamatsu 等, 1987, EMBO J. 6 :307-311) ;或者,也可使用植物启动子如 RUBISCO 的小亚基启动子 (Comazzi 等, 1984, EMBO J. 3 :1671-1680 ;Broglie 等, 1984, Science 224 :838-843) 或热休克启动子,例如大豆 hsp17.5-E 或 hsp17.3-B (Gurley 等, 1986, Mol. Cell. Biol. 6 :559-565)。这些构建物可通过使用 Ti 质粒、Ri 质粒、植物病毒载体、直接 DNA 转化、微注射、电穿孔等,引入到植物细胞中。有关这种技术的综述参见例如 Weissbach 和 Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 第 VIII 节, 第 421-463 页 ;Grierson 和 Corey 1988, Plant Molecular Biology, 第 2 版, Blackie, London, 第 7-9 章。

[0191] 在可用以生产本发明嵌合蛋白的一个昆虫表达系统中,使用苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) 核型多角体病毒 (AcNPV) 作为载体来表达外源基因。该病毒生长于草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞中。可将编码序列克隆到该病毒的非必需区 (例如多角体基因) 并置于 AcNPV 启动子 (例如多角体启动子) 的控制下。编码序列的成功插入会导致多角体基因失活和产生非包含体重组病毒 (即缺乏由多角体基因编码的蛋白外被的病毒)。然后用这些重组病毒感染草地夜蛾细胞,插入基因在细胞中得以表达。(参见例如 Smith 等, 1983, J. Virol. 46 :584 ;美国专利 4, 215, 051)。这种表达系统的更多实例见 Ausubel 等 (编辑) 1989, Current Protocols in Molecular Biology, 第 2 卷, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience。

[0192] 可用来表达本发明嵌合蛋白的另一个系统是谷氨酰胺合成酶基因表达系统,也称为“GS 表达系统” (Lonza Biologics PLC, BerkshireUK)。这个表达系统在美国专利 5, 981, 216 中有详细的描述。

[0193] 在哺乳动物宿主细胞中,可采用多种基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况中,可将编码序列连接到腺病毒转录 / 翻译控制复合体,例如晚期启动子和三联前导序列。然后可通过体外或体内重组法将嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入到病毒基因组的非必需区 (例如 E1 或 E3 区) 会导致出现可生存且能够在感染宿主中表达肽的重组病毒 (参见例如 Logan 和 Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3655)。或者,可使用痘苗 7.5K 启动子 (参见例如 Mackett 等, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :7415 ;Mackett 等, 1984, J. Virol. 49 :857 ;Panicali 等, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :4927)。

[0194] 在腺病毒用作表达载体的情况中,可将编码序列连接到腺病毒转录 / 翻译控制复合体,例如晚期启动子和三联前导序列。然后可通过体外或体内重组法将嵌合基因插入腺病毒基因组中。插入到病毒基因组的非必需区 (例如 E1 或 E3 区) 会导致出现可生存且能够在感染宿主中表达肽的重组病毒 (参见例如 Logan 和 Shenk 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :3655)。或者,可使用痘苗 7.5K 启动子 (参见例如 Mackett 等, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :7415 ;Mackett 等, 1984, J. Virol. 49 :857 ;Panicali 等, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 :4927)。

[0195] 将含有嵌合蛋白 DNA 构建物的宿主细胞在合适的生长培养基中培养。本文所用术语“合适的生长培养基”指含有细胞生长所需的营养成分的培养基。细胞生长所需的营养成分可包括碳源、氮源、必需氨基酸、维生素、矿物质和生长因子。培养基可任选含有牛血清或胎牛血清。在一个实施方案中,培养基基本不含 IgG。通常,生长培养基通过例如药物选择性或者缺乏必需营养成分,来选出含有 DNA 构建物的细胞,所述营养成分由在 DNA 构建物上或与 DNA 构建物共转染的选择性标记补充。培养哺乳动物细胞通常在市售的含血清或无

血清培养基（例如 MEM、DMEM）中培养。选择适合所用具体细胞系的培养基在本领域普通技术人员的技术水平内。

[0196] 重组生产的本发明嵌合蛋白可从培养基中分离。适当生长的转化或转染宿主细胞的培养基分离出细胞材料后，嵌合蛋白的存在可得以证实。检测嵌合蛋白的一种方法是例如通过将嵌合蛋白或部分嵌合蛋白与能识别本发明嵌合蛋白的特异性抗体结合。抗嵌合蛋白抗体可以是针对所研究的嵌合蛋白而产生的单克隆或多克隆抗体。例如嵌合蛋白含有至少一部分免疫球蛋白恒定区。能识别多种免疫球蛋白恒定区的抗体是本领域公知的，且可通过市售获得。可用抗体进行 ELISA 或蛋白质印迹，以检测本发明嵌合蛋白的存在。

[0197] 本发明嵌合蛋白可以在转基因动物，如啮齿动物、牛、猪、绵羊或山羊中合成。术语“转基因动物”指其基因组中已掺入外源基因的非人类动物。因为外源基因存在于种系组织中，其可从亲代传到子代。外源基因可引入到单细胞胚胎中（Brinster 等，1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :4438）。生产转基因动物的方法是本领域公知的，包括生产免疫球蛋白分子的转基因学方法（Wagner 等，1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 :6376 ;McKnight 等，1983, Cell 34 :335 ;Brinster 等，1983, Nature 306 :332 ;Ritchie 等，1984, Nature 312 :517 ;Baldassarre 等，2003, Theriogenology 59 :831 ;Robl 等，2003, Theriogenology 59 :107 ;Malassagne 等，2003, Xenotransplantation 10(3) :267）。

[0198] 本发明嵌合蛋白也可通过联合使用化学合成技术和重组技术来生产。例如免疫球蛋白恒定区部分可如上所述进行重组表达。生物活性分子可使用公知的化学合成技术（例如固相合成）来生产。

[0199] 免疫球蛋白恒定区部分可用合适的化学连接技术与生物活性分子连接，然后与没有连接生物活性分子的一部分免疫球蛋白恒定区结合，形成本发明嵌合蛋白。在一个实施方案中，免疫球蛋白恒定区部分是 Fc 片段。Fc 片段可重组产生，形成 Cys-Fc，并与带有硫酯的生物活性分子反应，制备单体 - 二聚体杂合体。在另一个实施方案中，制备 Fc- 硫酯，并使其与带有 N 末端半胱氨酸的生物活性分子反应（图 4）。

[0200] 在一个实施方案中，与生物活性分子连接的免疫球蛋白恒定区部分会形成同源二聚体。所述同源二聚体可通过将其暴露于变性和还原条件中（例如 β -巯基乙醇和 8M 尿素）来破坏，随后与没有连接生物活性分子的一部分免疫球蛋白恒定区结合，形成单体 - 二聚体杂合体。然后单体 - 二聚体杂合体通过透析到 PBS 中而恢复活性和重新折叠，通过例如尺寸排阻层析或亲和层析进行分离。

[0201] 在另一个实施方案中，免疫球蛋白恒定区部分在与生物活性分子连接之前会形成同源二聚体。在这个实施方案中，可调整生物活性分子与同源二聚体连接的反应条件（例如通过调整每种反应物的摩尔当量），以使生物活性分子只与同源二聚体的一条链连接。

[0202] 生物活性分子可化学合成为带有 N 末端半胱氨酸。编码一部分免疫球蛋白恒定区的序列可亚克隆到载体中，所述载体编码与壳多糖结合结构域连接的内含肽（New England Biolabs, Beverly, MA）。内含肽可连接到免疫球蛋白恒定区部分的 C 末端。在一个实施方案中，其 C 末端连接有内含肽的免疫球蛋白部分可在原核细胞中表达。在另一个实施方案中，其 C 末端连接有内含肽的免疫球蛋白部分可在真核细胞中表达。与内含肽连接的免疫球蛋白恒定区部分可与 MESNA 反应。在一个实施方案中，与内含肽连接的免疫球蛋白恒定区部分结合到柱例如壳多糖柱上，然后用 MESNA 洗脱。生物活性分子和免疫球蛋白部分可一起

反应,使得发生亲核重排,生物活性分子通过酰胺键共价连接到免疫球蛋白部分。(Dawsen等,2000,Annu. Rev. Biochem. 69 :923)。通过这种方式合成的嵌合蛋白可任选在免疫球蛋白部分和生物活性分子之间包括接头肽。接头可例如在生物活性分子的N末端上合成。接头可包括肽和/或有机分子(例如聚乙二醇和/或短的氨基酸序列)。这种重组合成和化学合成的组合方法能够快速筛选生物活性分子和接头,以最优优化所需的本发明嵌合蛋白性质,例如病毒抑制、止血、红细胞的生产、生物半寿期、稳定性、与血清蛋白的结合性或者嵌合蛋白的某些其它性质。这种方法也使得可以将非天然氨基酸掺入到本发明嵌合蛋白中,这对于最优优化所需的本发明嵌合蛋白性质是有用的。如需要,可使用本领域公知的条件,例如还原条件,然后慢慢透析到PBS中,将这种方法生产的嵌合蛋白再折叠成生物活性构象。

[0203] 或者,N末端半胱氨酸可以在免疫球蛋白恒定区部分(例如Fc片段)上。可利用天然Fc在226位具有半胱氨酸这个事实,产生具有N末端半胱氨酸的Fc片段(参见Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda, MD)。

[0204] Fc片段可进行重组表达,以使末端半胱氨酸暴露。在一个实施方案中,Fc片段在原核细胞(例如大肠杆菌)中表达。可使以Cys226(EU编号)为起始的编码Fc部分的序列紧接于编码信号肽(例如OmpA、PhoA、STII)的序列后。原核细胞可进行渗透冲击,以释放重组Fc片段。在另一个实施方案中,Fc片段在真核细胞(例如CHO细胞、BHK细胞)中生产。可使编码Fc片段的序列紧接于编码信号肽(例如小鼠Ig κ 轻链或MHC I类Kb信号序列)的序列后,使得当重组嵌合蛋白由真核细胞合成时,信号序列能被切合,留下N末端半胱氨酸,其然后可被分离并与带有硫酯的分子(例如如果所述分子由氨基酸组成时,为C末端硫酯)进行化学反应。

[0205] Fc片段上的N末端半胱氨酸也可用在N末端切割其底物的酶(例如X^a因子、肠激酶)来产生,然后分离产物并使其与带有硫酯的分子反应。

[0206] 重组表达的Fc片段可用来制备同源二聚体或单体-二聚体杂合体。

[0207] 在一个具体的实施方案中,表达其226位的Cys附近具有人 α 干扰素信号肽的Fc片段。当编码该多肽的构建物在CHO细胞中表达时,CHO细胞在两个不同的位置(在Cys226和信号肽内N末端方向上游2个氨基酸的Val)切割信号肽。这会产生两种Fc片段的混合物(一种具有N末端Val,另一种具有N末端Cys)。而这又会导致出现二聚体的混合物(具有末端Val的同源二聚体、具有末端Cys的同源二聚体和其中一条链具有末端Cys、另一条链具有末端Val的异源二聚体)。Fc片段可与具有C末端硫酯的生物活性分子反应,所得单体-二聚体杂合体可从混合物中分离(例如通过尺寸排阻层析)。设想当其他信号肽序列用于在CHO细胞中表达Fc片段时,会产生具有至少两种不同N末端的Fc片段的混合物。

[0208] 在另一个实施方案中,重组产生的Cys-Fc可形成同源二聚体。同源二聚体可与C末端上具有分支接头的肽反应,其中分支接头具有两个可与Cys-Fc反应的C末端硫酯。在另一个实施方案中,生物活性分子具有单个可与Cys-Fc反应的非末端硫酯。或者,分支接头可具有两个可与Fc硫酯反应的C末端半胱氨酸。在另一个实施方案中,分支接头具有两个可与Fc硫酯反应的官能团,例如2-巯基胺。生物活性分子可由氨基酸组成。生物活性分子可包括有机小分子或无机小分子。

[0209] F. 嵌合蛋白的使用方法

[0210] 本领域技术人员会认识到,本发明嵌合蛋白具有许多用途,包括但不限于患有疾病或病症的对象的的治疗方法。疾病或病症可包括但不限于病毒感染、止血障碍、贫血症、癌症、白血病、炎症或自身免疫病(例如关节炎、牛皮癣、红斑狼疮、多发性硬化症)、或细菌感染(参见例如美国专利 6,086,875、6,030,613、6,485,726 ;WO 03/077834 ;US2003-0235536A1)。

[0211] 1. 治疗具有红细胞缺乏的对象的方法

[0212] 本发明涉及治疗具有红细胞缺乏(例如贫血症)的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种能够诱导红细胞增殖的作用物(例如 EPO),第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的能够诱导红细胞增殖的作用物。

[0213] 2. 治疗病毒感染对象的方法

[0214] 本发明涉及治疗受病毒感染或暴露于病毒的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种抗病毒剂(例如融合抑制剂或 α 干扰素),第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的抗病毒剂。在一个实施方案中,对象感染能够用 IFN α 治疗的病毒,例如丙肝病毒。在一个实施方案中,对象感染 HIV,例如 HIV-1 或 HIV-2。

[0215] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白抑制病毒复制。在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白防止或抑制病毒进入靶细胞,从而阻止、防止或限制病毒感染在对象中的扩散,减少受感染对象的病毒数量。通过将免疫球蛋白的一部分连接到病毒融合抑制剂,本发明提供了具有病毒融合抑制活性的嵌合蛋白,与单独的病毒融合抑制剂(例如 T20、T21、T1249)相比,其稳定性和生物利用度更高。因此,在一个实施方案中,病毒融合抑制剂减少或防止 HIV(例如 HIV-1)对靶细胞的感染。

[0216] a. 可以治疗的病症

[0217] 本发明嵌合蛋白可用来抑制或防止肝炎病毒(例如丙肝病毒)对靶细胞的感染。嵌合蛋白可包含抑制病毒复制的抗病毒剂。

[0218] 在一个实施方案中,本发明嵌合蛋白包含融合抑制剂。本发明嵌合蛋白可用来抑制或防止任何病毒对任何靶细胞的感染(参见例如美国专利 6,086,875、6,030,613、6,485,726 ;WO 03/077834 ;US2003-0235536A1)。在一个实施方案中,病毒是有包膜病毒,例如但不限于 HIV、SIV、麻疹病毒、流感病毒、EB 病毒、呼吸道合胞病毒或副流感病毒。在另一个实施方案中,病毒是无包膜病毒,如鼻病毒或脊髓灰质炎病毒。

[0219] 本发明嵌合蛋白可用来治疗已经感染病毒的对象。对象可急性感染病毒。或者,病毒也可慢性感染病毒。本发明嵌合蛋白也可用来预防性治疗有受病毒感染风险的对象,例如已知或据信与病毒或者据信感染或携带病毒的对象有密切接触的对象。本发明嵌合蛋白可用来治疗已经暴露于病毒、但尚未诊断为阳性的对象。

[0220] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染 HCV 的对象的方法,所述方法包括给予对象治疗有效量的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含 IgG 的 Fc 片段和细胞因子,例如 IFN α 。

[0221] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染 HIV 的对象的方法,所述方法包括给予

对象治疗有效量的嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含 IgG 的 Fc 片段和包括 T20 的病毒融合抑制剂。

[0222] 3. 治疗止血障碍对象的方法

[0223] 本发明涉及治疗止血障碍对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二链,其中第一链包含至少一种凝血因子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区。

[0224] 本发明嵌合蛋白通过促进血纤蛋白块的形成来治疗或防止止血障碍。本发明嵌合蛋白能激活凝血级联的任何成员。凝血因子可以是外源途径、内源途径或这两种途径的参与者。在一个实施方案中,凝血因子是 VII 因子或 VIIa 因子。VIIa 因子能激活 X 因子,后者于 Va 因子相互作用,将凝血酶原切割成凝血酶,而凝血酶又将血纤蛋白原切割成血纤蛋白。在另一个实施方案中,凝血因子是 IX 因子或 IXa 因子。在又一个实施方案中,凝血因子是 VIII 因子或 VIIIa 因子。在又一个实施方案中,凝血因子是 von Willebrand 因子、XI 因子、XII 因子、V 因子、X 因子或 XIII 因子。

[0225] a. 可以治疗的病症

[0226] 本发明嵌合蛋白可用来治疗任何止血障碍。可通过给予本发明嵌合蛋白治疗的止血障碍包括但不限于 A 型血友病、B 型血友病、(冯) 韦尔布兰德病、XI 因子缺乏 (PTA 缺乏)、XII 因子缺乏以及血纤蛋白原、凝血酶原、V 因子、VII 因子、X 因子或 XIII 因子的缺乏或结构异常。

[0227] 在一个实施方案中,止血障碍是遗传性疾病。在一个实施方案中,对象患有 A 型血友病,嵌合蛋白包含 VIII 因子或 VIIIa 因子。在另一个实施方案中,对象患有 A 型血友病,嵌合蛋白包含 VII 因子或 VIIa 因子。在另一个实施方案中,对象患有 B 型血友病,嵌合蛋白包含 IX 因子或 IXa 因子。在另一个实施方案中,对象患有 B 型血友病,嵌合蛋白包含 VII 因子或 VIIa 因子。在另一个实施方案中,对象具有抗 VIII 因子或 VIIIa 因子的抑制性抗体,嵌合蛋白包含 VII 因子或 VIIa 因子。在又一个实施方案中,对象具有抗 IX 因子 IXa 因子的抑制性抗体,嵌合蛋白包含 VII 因子或 VIIa 因子。

[0228] 本发明嵌合蛋白可用来预防性地治疗患有止血障碍的对象。本发明嵌合蛋白可用来治疗患有止血障碍的对象的急性出血发作。

[0229] 在一个实施方案中,止血障碍由缺乏凝血因子 (例如 IX 因子、VIII 因子) 导致。在另一个实施方案中,止血障碍可由缺陷凝血因子 (例如 von Willebrand 因子) 导致。

[0230] 在另一个实施方案中,止血障碍可能是获得性疾病。获得性疾病可由潜在的继发疾病或病症导致。不相关的病症可以是例如但不限于癌症、自身免疫病或妊娠。获得性疾病可由年老或潜在继发疾病的治疗用药 (例如癌症的化疗) 导致。

[0231] 4. 治疗需要普通止血剂的对象的方法

[0232] 本发明也涉及治疗没有止血障碍或没有患导致获得止血障碍的继发疾病或病症的对象。因此,本发明涉及治疗需要普通止血剂的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种嵌合蛋白,其中嵌合蛋白包含第一和第二多肽链,其中第一多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和至少一种凝血因子,第二多肽链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一多肽链的凝血因子。

[0233] a. 可以治疗的病症

[0234] 在一个实施方案中,需要普通止血剂的对象正在进行或将要进行外科手术。本发明嵌合蛋白可在外科手术之前或之后作为预防药而给予。本发明嵌合蛋白可在外科手术过程中或之后给予,用以控制急性出血发作。外科手术可包括但不限于肝移植、肝切除或干细胞移植。

[0235] 本发明嵌合蛋白可用来治疗没有止血障碍的对象急性出血发作。急性出血事件可由严重外伤(例如外科手术)、车祸、创伤、裂伤、枪伤或其他导致不可控出血的创伤事件引起。

[0236] 5. 治疗形式

[0237] 本发明嵌合蛋白可通过静脉内、皮下、肌肉内,或者通过任何黏膜表面,例如口内、舌下、口腔内、舌下、鼻、直肠内、阴道内,或者通过肺部途径给药。嵌合蛋白可植入或连接到生物聚合物固相支持体,以便嵌合蛋白缓慢释放到所需的位点。

[0238] 本发明嵌合蛋白的剂量根据对象和所用的具体给药途径而改变。剂量可为 0.1-100,000 $\mu\text{g/kg}$ 体重。在一个实施方案中,剂量范围是 0.1-1,000 $\mu\text{g/kg}$ 。嵌合蛋白可连续给予,或者按特定的时间间隔给予。可采用体外试验确定最佳的剂量范围和/或给药时间表。许多测量病毒感染力的体外试验是本领域公知的。例如,可使用逆转录酶试验或 rtPCR 试验或分支 DNA 试验来测量 HIV 浓度。可使用 StaClot 试验了测量凝血活性。或者,可从由动物模型获得的剂量-反应曲线推断有效剂量。

[0239] 本发明还涉及包含病毒融合抑制剂、至少一部分免疫球蛋白和药物可接受载体或赋形剂的药物组合物。合适的药物载体的实例在 E. W. Martin 著的 Remington's Pharmaceutical Sciences 中有描述。赋形剂的实例可包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油一硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。组合物还可含有 pH 缓冲液和湿润剂或乳化剂。

[0240] 对于口内给药,药物组合物可采用常规方法制备的片剂或胶囊剂的形式。组合物也可制备成液体形态,例如糖浆剂或混悬剂。液体可包括悬浮剂(例如山梨糖醇糖浆、纤维素衍生物或氢化食用脂肪)、乳化剂(卵磷脂或阿拉伯树胶)、非水介质(例如杏仁油、油状酯、乙醇或分馏植物油)和防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯或者山梨酸)。制剂还可包括矫味剂、着色剂和甜味剂。或者,组合物可为干品,供与水或另一合适的介质进行配制。

[0241] 对于口腔内和舌下给药,组合物可按常规方案采用片剂、锭剂或速溶膜的形式。

[0242] 对于吸入给药,按本发明使用的化合物可以喷雾剂的形式,从压力容器或喷雾器(例如在 PBS 中)通过合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷、二氧化碳或其他合适的气体方便地递送。在加压喷雾剂的情况中,可通过由阀门放出一定的计量数量,来确定剂量单位。可配制供在吸入器或吹入器中使用的胶囊剂和(例如明胶)药筒,使其含有化合物和合适粉末基质(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

[0243] 可配制药物组合物供通过大剂量注射进行胃肠外给药(即静脉内或肌肉内给药)。注射剂型可以是单位剂量形式,例如与添加的防腐剂装在安瓿或多剂量容器中。组合物可以采用油相或水相介质中的混悬剂、溶液剂或乳剂的形式,且含有配方成分,如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。或者,活性成分可以是粉末形式,供与合适的介质(例如无热原的水)一起配制。

[0244] 药物组合物也可配制成栓剂或滞留型灌肠剂(例如含有常规的栓剂基质,如可可

油或其他甘油酯),以供直肠内给药。

[0245] 6. 组合疗法

[0246] 本发明嵌合蛋白可与至少一种治疗疾病或病症的其他已知药物联合使用,来治疗患有所述疾病或病症的对象。

[0247] 在一个实施方案中,本发明涉及治疗感染 HIV 的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种包含第一和第二链的嵌合蛋白,其中第一链包含 HIV 融合抑制剂和至少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的 HIV 融合抑制剂,并联合给予至少一种其他抗 HIV 药物。所述其他抗 HIV 药物可以是证实具有抗 HIV 活性的任何治疗药物。作为实例,所述其他抗 HIV 药物可包括但不限于蛋白酶抑制剂(例如 **Amprenavir[®]**、**Crixivan[®]**、**Ritonivir[®]**)、逆转录酶核苷类似物(例如 AZT、DDI、D4T、3TC、**Ziagen[®]**)、非核苷类似物逆转录酶抑制剂(例如 **Sustiva[®]**)、另一种 HIV 融合抑制剂、HIV 特异性中和抗体、CD4 特异性抗体、CD4 模拟物如 CD4-IgG2 融合蛋白(美国专利申请 09/912,824)或者 CCR5 或 CXCR4 特异性抗体或 CCR5 或 CXCR4 的特异性结合配偶体。

[0248] 在另一个实施方案中,本发明涉及治疗具有止血障碍的对象的方法,所述方法包括给予治疗有效量的至少一种包含第一和第二链的嵌合蛋白,其中第一链包含至少一种凝血因子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的凝血因子,并联合给予至少一种其他凝血因子或促进止血的药物。所述其他凝血因子或促进止血的药物可以是证明具有凝血活性的任何治疗药物。举例说(但不限于这些实例),凝血因子或止血药物可包括 V 因子、VII 因子、VIII 因子、IX 因子、X 因子、XI 因子、XII 因子、XIII 因子、凝血酶原或血纤蛋白原或者以上任一项的活化形式。凝血因子或止血药物也可包括抗纤溶药物,例如 ϵ -氨基己酸、凝血酸。

[0249] 7. 抑制病毒与靶细胞融合的方法

[0250] 本发明还涉及抑制 HIV 与哺乳动物细胞融合的体外方法,所述方法包括使哺乳动物细胞与至少一种嵌合蛋白结合,其中嵌合蛋白包含第一和第二链,其中第一链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区和 HIV 抑制剂,第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含第一链的 HIV 抑制剂。哺乳动物细胞可包括易受 HIV 感染的任何细胞或细胞系,包括但不限于原代人 CD4⁺T 细胞或巨噬细胞、MOLT-4 细胞、CEM 细胞、AA5 细胞或在细胞表面表达 CD4 的 HeLa 细胞。

[0251] G. 分离嵌合蛋白的方法

[0252] 通常,当本发明嵌合蛋白生产出来时,它们包含在其他分子如其他蛋白质或蛋白片段的混和物当中。因此,本发明提供从含有嵌合蛋白的混合物中分离任何上述嵌合蛋白的方法。已明确知道,本发明嵌合蛋白在合适的条件下会与染料配体结合,在结合后改变这些条件能破坏染料配体与嵌合蛋白之间的键,从而提供了分离嵌合蛋白的方法。在某些实施方案中,混合物可能包含单体-二聚体杂合体、二聚体和至少一部分免疫球蛋白恒定区(例如 Fc)。因此,在一个实施方案中,本发明提供分离单体-二聚体杂合体的方法。在另一个实施方案中,本发明提供分离二聚体的方法。

[0253] 因此,在一个实施方案中,本发明提供从混合物中分离单体-二聚体杂合体的方法,其中所述混合物包含

[0254] a) 包含第一和第二多肽链的单体-二聚体杂合体,其中第一链包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区,其中第二链包含至少一部分免疫球蛋白恒定区,不含生物活性分子或免疫球蛋白可变区;

[0255] b) 包含第一和第二多肽链的二聚体,其中第一和第二链均包含生物活性分子和至少一部分免疫球蛋白恒定区;

[0256] c) 免疫球蛋白恒定区的一部分;所述方法包括

[0257] 1) 在合适的条件下,使混合物与连接到固相支持体的染料配体接触,结果单体-二聚体杂合体和二聚体都与染料配体结合;

[0258] 2) 除去未结合的免疫球蛋白恒定区部分;

[0259] 3) 改变1)的合适条件,使单体-二聚体杂合体与连接到固相支持体的染料配体之间的结合被破坏;

[0260] 4) 分离单体-二聚体杂合体。

[0261] 在某些实施方案中,在使混合物与染料配体接触之前,可使混合物先与色谱物质如A蛋白琼脂糖凝胶等接触。用适宜的洗脱缓冲液(例如低pH缓冲液)将混合物从色谱物质上洗脱下来,然后使含有混合物的洗脱液与染料配体接触。

[0262] 使混合物与染料配体接触的合适条件可包括将混合物维持在适宜pH的缓冲液。适宜pH可包含pH 3-10、4-9、5-8。在一个实施方案中,适宜pH是8.0。可使用本领域公知的任何缓冲剂,只要其将pH维持在适宜的范围内,例如tris、HEPES、PIPES、MOPS。合适的条件也可包括用以从染料配体洗脱非结合成分的洗涤缓冲液。洗涤缓冲液可以是不会破坏结合成分结合的任何缓冲液。例如,洗涤缓冲液可以是接触步骤中使用的同一缓冲液。

[0263] 一旦嵌合蛋白与染料配体结合,可通过改变合适的条件来分离嵌合蛋白。改变合适的条件可包括将盐加入到缓冲液中。可使用任何的盐,例如NaCl、KCl。盐的添加浓度应足够高,以破坏染料配体和所需成分(例如单体-二聚体杂合体)之间的结合。

[0264] 在某些其中混合物由Fc、单体-二聚体杂合体和二聚体组成的实施方案中,发现Fc不会与染料配体结合,因而被洗脱流出。二聚体与染料配体的结合比单体-二聚体杂合体更紧密。因此,破坏二聚体和染料配体之间的键(例如洗脱)所需的盐浓度比破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的键所需的盐浓度更高。

[0265] 在某些实施方案中,可使用NaCl从混合物中分离单体-二聚体杂合体。在某些实施方案中,破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的键的适宜盐浓度是200-700mM、300-600mM、400-500mM。在一个实施方案中,破坏染料配体与单体-二聚体杂合体之间的结合所需的NaCl浓度是400mM。

[0266] 也可用NaCl从混合物中分离二聚体。通常,单体-二聚体杂合体先于二聚体从混合物中分离出来。通过将适宜浓度的盐加入到缓冲液中,从而破坏染料配体与二聚体之间的结合来分离二聚体。在某些实施方案中,破坏染料配体与二聚体之间的键的适宜盐浓度是800mM-2M、900mM-1.5M、950mM-1.2M。在一个具体实施方案中,要用1MNaCl破坏染料配体与二聚体之间的结合。

[0267] 染料配体可以是生物模拟物。生物模拟物是模拟自然的人造物质、装置或者系统。因此,在某些实施方案中,染料配体模拟分子的天然配体。染料配体可选自Mimetic Red 1TM、Mimetic Red 2TM、MimeticOrange 1TM、Mimetic Orange 2TM、Mimetic Orange 3TM、

Mimetic Yellow1TM、Mimetic Yellow 2TM、Mimetic Green 1TM、Mimetic Blue 1TM 和 Mimetic Blue 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。在一个具体的实施方案中,染料配体是 Mimetic Red 2TM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。在某些实施方案中,染料配体连接到固相支持体,所述固相支持体例如选自 Mimetic Red1A6XLTM、Mimetic Red 2 A6XLTM、Mimetic Orange 1 A6XLTM、Mimetic Orange 2 A6XLTM、Mimetic Orange 3 A6XLTM、Mimetic Yellow1 A6XLTM、Mimetic Yellow 2 A6XLTM、Mimetic Green 1 A6XLTM、Mimetic Blue 1 A6XLTM 和 Mimetic Blue 2 A6XLTM (Prometic Biosciences (USA) Inc., Wayne, NJ)。

[0268] 染料配体可连接到固相支持体。固相支持体可以是本领域公知的任何固相支持体(参见例如 www.seperationsNOW.com)。固相支持体的实例可包括珠、凝胶、膜、纳米颗粒或微球体。固相支持体可包括能与染料配体连接的任何材料(例如琼脂糖、聚苯乙烯、琼脂糖凝胶、葡聚糖凝胶)。固相支持体可包含任何有机合成聚合物,如聚丙烯酸、乙烯基聚合物、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯和聚丙烯酰胺。固相支持体也可包含碳水化合物聚合物,例如琼脂糖、纤维素或葡聚糖。固相支持体可包含无机氧化物,如二氧化硅、氧化锆、氧化钛、二氧化铈、氧化铝、镁氧(即氧化镁)或氧化钙。固相支持体也可包括某些上述支持体的组合,包括但不限于葡聚糖-丙烯酰胺。

实施例

[0269] 实施例 1:分子量影响 FcRn 介导的胞转作用

[0270] 由各种目的蛋白和 IgG Fc 组成的嵌合蛋白用重组法生产 (Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版, ColdSpring Harbor Laboratory Press, (1989)), 或者在接触蛋白 -Fc、MAB- β -gal(单克隆抗体结合 β -gal 的复合体) (Biodesign International, Saco, ME) 和 MAB-GH(单克隆抗体和生长激素的复合体) (ResearchDiagnostics, Inc. Flanders, NJ) 的情况下,它们通过市售途径购得。简言之,编码目的蛋白的基因通过 PCR 克隆,然后亚克隆到 Fc 融合表达质粒。所述质粒转染到 DG44 CHO 细胞中,挑出稳定转染子,用氨甲蝶呤扩增。嵌合蛋白同源二聚体在 A 蛋白柱上纯化。受试蛋白包括 α 干扰素、生长激素、促红细胞生成素、促卵泡激素、IX 因子、 β -半乳糖苷酶、接触蛋白和 VIII 因子。通过将蛋白连接到免疫球蛋白部分,包括 FcRn 受体结合配偶体,或者使用市售的全抗体(包括 FcRn 结合区)-抗原复合体,可以研究胞转作用与分子量的关系(参见美国专利 6,030,613)。嵌合蛋白经口给予大鼠,给药后 2-4 小时使用 ELISA 测量重组产生的嵌合蛋白在血清中的水平,使用蛋白质印迹和 ELISA 测量市售途径获得的抗体复合体和嵌合蛋白在血清中的水平。或者,所有市售途径获得的蛋白质或复合体以及 VIII 因子 -Fc、IX 因子 -Fc 和 Epo-Fc 对照物用 IODO 珠 (Pierce, Pittsburgh, PA) 进行碘化。结果表明,经口给予大鼠的 Fc 和单克隆抗体嵌合蛋白的血清水平与蛋白质的大小直接相关。经口给予的 Fc 嵌合蛋白的表观截断点是 200-285kD。(表 2)。

[0271] 表 2

[0272]

蛋白质	大小 (kD)	胞转作用
IFN α -Fc	92	++++

GH-Fc	96	+++
Epo-Fc	120	+++
FSH-Fc	170	+++
MAB :GH	172-194	+++
FIX-Fc	200	+
MAB : β Gal	285-420	-
接触蛋白 -Fc	300	-
FVIII Δ -Fc	380	-

[0273] 实施例 2 :pcDNA 3.1-Flag-Fc 的克隆

[0274] 将用来鉴定或纯化蛋白质的普通亲合标记物——FLAG 肽 (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys) 的序列克隆到 pcDNA 3.1-Fc 质粒中,该质粒含有小鼠 Ig κ 信号序列和紧接其后的人 IgG1 Fc 片段 (氨基酸 221-447, EU 编号)。使用以下引物,通过重叠 PCR 创建构建物:

[0275] FlagFc-F1 :5' -GCTGGCTAGCCACCATGGA-3' (SEQ ID NO :41)

[0276] FlagFc-R1 :5' -CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAAGTCGTCA

[0277] CCAGTGGAACTGGAAC-3' (SEQ ID NO :42)

[0278] FlagFc-F2 :5' -GACTACAAGG ACGACGATGA CAAGGACAAA

[0279] ACTCACACAT GCCCACCCTG CCCAGCTCCG GAACTCC-3' (SEQ ID NO :43)

[0280] FlagFc-R2 :5' -TAGTGGATCCTCATTACCCG-3' (SEQ ID NO :44)

[0281] 然后将 pcDNA 3.1-Fc 模板添加到两个单独的 PCR 反应中,每个反应的 50 μ l 反应液中均含有各 50pmol 的引物对 FlagFc-F1/R1 或 FlagFc-F2/R2,按厂商标准方案使用 Pfu Ultra DNA 聚合酶 (Stratagene,CA),在 MJ 热循环仪中进行以下循环 :95 $^{\circ}$ C,2 分钟 ;(95 $^{\circ}$ C,30 秒,52 $^{\circ}$ C,30 秒,72 $^{\circ}$ C,45 秒)30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C,10 分钟。然后将这两个反应的产物混合到另一个 PCR 反应中 (各 2 μ l),在 50 μ l 反应液中含有各 50pmol 的引物对 FlagFc-F1 和 FlagFc-R2 引物,按厂商标准方案使用 Pfu Ultra DNA 聚合酶 (Stratagene,CA),在 MJ 热循环仪中进行以下循环 :95 $^{\circ}$ C,2 分钟 ;(95 $^{\circ}$ C,30 秒,52 $^{\circ}$ C,30 秒,72 $^{\circ}$ C,45 秒)30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C,10 分钟。所得片段经凝胶纯化、消化后,插入 pcDNA 3.1-Fc 质粒 NheI-Bam HI。所得质粒含有能产生 FlagFc 蛋白的小鼠 Ig κ 信号序列。

[0282] 实施例 3 :VII 因子 -Fc 构建物的克隆

[0283] 通过 RT-PCR,从人胎儿肝脏 RNA (Clontech,Palo Alto,CA) 获得 VII 因子的编码序列。克隆区由 bp 36-bp 1430 的 cDNA 序列组成,刚好在终止密码子前终止。在 N 末端引入了 SbfI 位点。在 C 末端引入了 BspEI 位点。用以下引物通过 PCR 克隆构建物:

[0284] 下游 :5' GCTACCTGCAGGCCACCATGGTCTCCAGGCCCTCAGG3' (SEQ ID NO :45)

[0285] 上游 :5' CAGTTCGGAGCTGGGCACGGCGGGCACGTGTGAGTTTTGTCGGGAAAT GG 3' (SEQ

ID NO :46)

[0286] 循环条件如下 :95℃,5 分钟,然后 95℃,30 秒、55℃,30 秒、72℃,1 分 45 秒,30 个循环,最后的延伸循环为 72℃,10 分钟。

[0287] 所得片段用 SbfI-BspE I 消化并插入 pED. dC-Fc——编码 IgG1 的 Fc 片段的质粒。

[0288] 实施例 4 :IX 因子 -Fc 构建物的克隆

[0289] 人 IX 因子编码序列,包括前肽原序列,用以下引物通过 RT-PCR 扩增从成人肝脏 RNA 获得 :

[0290] natFIX-F :5' -TTACTGCAGAAGGTTATGCAGCGCGTGAACATG-3' (SEQ ID NO :47)

[0291] F9-R :5' -TTTTTCGAATTCAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTTAATCC-3' (SEQ ID NO :48)

[0292] 将 20ng 成人肝脏 RNA (Clontech, Palo Alto, CA) 和 25pmol 的各引物加入到 RT-PCR 反应中,在 **PLATINUM®** Taq 系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中按厂商的方案应用 SuperScript.™ 一步 RT-PCR。在 MJ 热循环仪中用以下循环进行反应 :50℃,30 分钟 ;94℃,2 分钟 ;(94℃,30 秒,58℃,30 秒,72℃,1 分钟)35 个循环,最后 72℃,10 分钟。所得片段用 Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) 进行凝胶纯化,用 PstI-EcoRI 消化,凝胶纯化,然后克隆到相应的 pED. dC. XFc 质粒消化物中。

[0293] 实施例 5 :PACE 构建物的克隆

[0294] 人 PACE (成对碱性氨基酸切割酶,一种内切蛋白酶) 的编码序列通过 RT-PCR 获得。使用以下引物 :

[0295] PACE-F1 :5' -GGTAAGCTTGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGC-3' (SEQ ID NO :49)

[0296] PACE-R1 :5' -GTTTTCAATCTCTAGGACCCACTCGCC-3' (SEQ ID NO :50)

[0297] PACE-F2 :5' -GCCAGGCCACATGACTACTCCGC-3' (SEQ ID NO :51)

[0298] PACE-R2 :5' -GGTGAATTCTCACTCAGGCAGGTGTGAGGGCAGC-3' (SEQ ID NO :52)

[0299] PACE-F1 引物将始于起始密码子前 3 个核苷酸的 HindIII 位点加入到 PACE 序列的 5' 末端,而 PACE-R2 引物在氨基酸 715 (出现在 PACE 的胞外结构域的末端) 之后加入终止密码子,并将 EcoRI 位点加入到终止密码子的 3' 末端。PACE-R1 和 PACE-F2 引物分别在内部 BamHI 位点的 3' 和 5' 侧退火。然后分别用各 25pmol 的引物对 PACE-F1/R1 或 PACE-F2/R2 进行两个 RT-PCR 反应,50 μl RT-PCR 反应液中用 20ng 成人肝脏 RNA (Clontech, Palo Alto, CA),在 **PLATINUM®** Taq 系统 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中按厂商的方案应用 SuperScript.™ 一步 RT-PCR。在 MJ 热循环仪中用以下循环进行反应 :50℃,30 分钟 ;94℃,2 分钟 ;(94℃,30 秒,58℃,30 秒,72℃,2 分钟)30 个循环,然后 72℃,10 分钟。所得片段各自连接到载体 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中,并完全测序。然后使用 BamHI/EcoRI 位点,将 F2-R2 片段亚克隆到 pcDNA6V5/His (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中,接着使用 HindIII/BamHI 位点,将 F1-R1 片段克隆到该构建物中。最终质粒 pcDNA6-PACE 产生可溶形式的 PACE (氨基酸 1-715),因为跨膜区已缺失。pcDNA6-PACE 中的 PACE 序列基本如 Harrison 等,1998, Seminars in Hematology 35 :4 中的描述。

[0300] 实施例 6 :IFN α -Fc 八氨基酸接头构建物的克隆

[0301] 人 α 干扰素 2b (hIFN α) 编码序列,包括信号序列,用以下引物通过 PCR 从人基因组 DNA 获得 :

[0302] IFNa-Sig-F :

[0303] 5' -GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3' (SEQ ID NO :53)

[0304] IFN α -EcoR-R :

[0305] 5' -CGTTGAATTCTTCCTTACTTCTTAACTTTCTTGC-3' (SEQ ID NO :54)

[0306] 按标准方法 (Sambrook 等, 1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 从 373MG 人星细胞瘤细胞系制备基因组 DNA。简言之, 离心沉淀约 2×10^5 个细胞, 然后重新悬浮于 100 μ l 磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 中, 接着与等体积的裂解缓冲液 (100mM Tris pH 8.0/200mM NaCl/2% SDS/5mM EDTA) 混合。加入蛋白酶 K, 至终浓度为 100 μ g/ml, 将样品在 37°C 下消化 4 小时, 不时轻微混合。然后用苯酚: 氯仿抽提样品两次, 通过加入乙酸钠 (pH 7.0, 至 100mM) 和等体积的异丙醇沉淀 DNA, 然后在室温下离心沉淀 10 分钟。除去上清液, 沉淀用冷的 70% 乙醇洗涤一次, 风干, 然后重新悬浮于 TE (10mM Tris pH 8.0/1mM EDTA)。

[0307] 然后, 将 100ng 的此基因组 DNA 用于 25 μ l PCR 反应中, 各引物为 25pmol, 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中进行以下循环: 94°C, 2 分钟; (94°C, 30 秒, 50°C, 30 秒, 72°C, 45 秒) 30 个循环, 最后 72°C, 10 分钟。预期大小的条带 (~ 550bp) 用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化, 用 PstI/EcoRI 消化, 再次凝胶纯化, 然后克隆到 pED. dC. XFc 的 PstI/EcoRI 位点, 该位点含 8 氨基酸接头 (EFAGAAAV) 和紧接其后的人 IgG1 的 Fc 区。

[0308] 实施例 7: IFN α Fc Δ 接头构建物的克隆

[0309] 接着, 将 1 μ g 实施例 6 的纯化 pED. dC. 天然人 IFN α Fc DNA 用作 25 μ l PCR 反应的模板, 反应中使用各 25pmol 的 IFN α -Sig-F 引物和以下引物:

[0310] hIFN α NoLinkFc-R :5' CAGTTCCGGAGCTGGGCACGGCGGG

[0311] CACGTGTGAGTTTTGTCTTCCTTACTTCTTAACTTTTTGCAAGT

[0312] TTG-3' (SEQ ID NO :55)。

[0313] 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 RapidCycler 热循环仪 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) 中进行 PCR 反应, 在 94°C 变性 2 分钟; 然后 95°C, 15 秒, 55°C, 0 秒, 72°C, 1 分钟, 斜率为 6, 18 个循环, 然后 72°C 延伸 10 分钟。正确大小 (~ 525bp) 的 PCR 产物用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen; Valencia, CA) 凝胶纯化, 用 PstI 和 BspEI 限制酶消化, 凝胶纯化, 然后亚克隆到修饰 pED. dC. XFc 的相应位点, 其中 Fc 区的氨基酸 231-233 利用遗传密码的简并性加以改变, 以掺入 BspEI 位点, 同时保持野生型氨基酸序列。

[0314] 实施例 8: IFN α FcGS15 接头构建物的克隆

[0315] 用见于 Δ 接头构建物 (在 5' 末端含有 BspEI 和 RsrII 位点, 利用遗传密码的简并性保持氨基酸序列) 的 Fc 创建新的主链载体, 并使用此 DNA 为模板, 用以下引物进行 PCR 反应:

[0316] 5' B2xGGGGS :5' gtcaggatccggcgggtggaggagcgacaaaactcacacgtgccc 3' (SEQ ID NO :56)

[0317] 3' GGGGS :5' tgacgcggccgctcattttacccggagacaggg 3' (SEQ ID NO :57)

[0318] 用各 25pmol 的引物, 按厂商的标准方案使用 Pfu Turbo 酶 (Stratagene, La Jolla, CA), 在 MJ 热循环仪中采用以下方法进行 PCR 反应: 95°C, 2 分钟; (95°C, 30 秒, 54°C, 30 秒,

72℃, 2 分钟) 30 个循环, 然后 72℃, 10 分钟。预期大小的条带 (~ 730bp) 用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化, 用 BamHI/NotI 消化; 再次凝胶纯化, 然后克隆到 BamHI/NotI 消化的载体 pcDNA6 ID 中, 该载体是 IRES 序列和 dhfr 基因插入到 NotI/XbaI 位点的 pcDNA6。

[0319] 然后, 将 500ng 的纯化 pED. dC. 天然人 IFN α Fc DNA 用作 25 μ l PCR 反应的模板, 反应引物如下:

[0320] GGGGS 的 5' IFNa :5' ccgctagcctgcaggccaccatggccttgacc 3' (SEQ ID NO :58)

[0321] GGGGS 的 3' IFNa :5' ccggatccgcccgcaccttccttactacgtaaac 3' (SEQ ID NO :59)。

[0322] 用各 25pmol 的引物, 按厂商的标准方案使用 Expand HighFidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中按以下循环进行 PCR 反应: 95℃, 2 分钟; (94℃, 30 秒, 48℃, 30 秒, 72℃, 1 分钟) 14 个循环, 然后 72℃, 10 分钟。预期大小的条带 (~ 600bp) 用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化, 用 NheI/BamHI 消化; 再次凝胶纯化, 然后克隆到上述 pcDNA6 ID/Fc 载体的 NheI/BamHI 位点, 创建 IFN α Fc 与 10 氨基酸 Gly/Ser 接头 (2xGGGGS) 的融合体 pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc。

[0323] 然后用 500ng 的此 pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc 和以下引物进行 PCR 反应

[0324] 5' B3XGGGGS :5' (SEQ ID NO :60)

[0325] gtcaggatccggtggaggcgggtccggcggtggagggagcgacaaaactcacacgtgccc3' (SEQ ID NO :61)

[0326] fcclv-R :5' atagaagcctttgaccaggc 3' (SEQ ID NO :62)。

[0327] 用各 25pmol 的引物, 按厂商的标准方案使用 Expand HighFidelity System(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中按以下循环进行 PCR 反应: 95℃, 2 分钟; (94℃, 30 秒, 48℃, 30 秒, 72℃, 1 分钟) 14 个循环, 然后 72℃, 10 分钟。预期大小的条带 (504bp) 用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化, 用 BamHI/BspEI 消化, 凝胶纯化 68bp 条带, 并将其克隆到上述 pcDNA6 ID/IFN α -GS10-Fc 载体的 BamHI/BspEI 位点, 创建 IFN α Fc 与 15 氨基酸 Gly/Ser 接头 (3xGGGGS) 的融合体 pcDNA6ID/IFNa-GS15-Fc。

[0328] 实施例 9: 碱性肽构建物的克隆

[0329] 人 IgG1 Fc 片段氨基酸 221-229 (EU 编号) 的铰链区用碱性肽 (CCB) 替换。

[0330] 使用四种重叠寡核苷酸 (IDT, Coralville, IA):

[0331] 1. CCB-Fc 正义 1:

[0332] 5' GCC GGC GAA TTC GGT GGT GAG TAC CAG GCC CTG AAG

[0333] AAG AAG GTG GCC CAG CTG AAG GCC AAG AAC CAG GCC

[0334] CTG AAG AAG AAG 3' (SEQ ID NO :63)

[0335] 2. CCB-Fc 正义 2:

[0336] 5' GTG GCC CAG CTG AAG CAC AAG GGC GGC GGC CCC GCC

[0337] CCA GAG CTC CTG GGC GGA CCG A3' (SEQ ID NO :64)

[0338] 3. CCB-Fc 反义 1:

[0339] 5' CGG TCC GCC CAG GAG CTC TGG GGC GGC GCC GCC

[0340] CTT GTG CTT CAG CTG GGC CAC CTT CTT CTT CAG GGC CTG

[0341] GTT CTT G3' (SEQ ID NO :65)

[0342] 4. CCB-Fc 反义 2 :

[0343] 5' GCC TTC AGC TGG GCC ACC TTC TTC TTC AGG GCC TGG

[0344] TAC TCA CCA CCG AAT TCG CCG GCA 3' (SEQ ID NO :66)

[0345] 将各寡核苷酸用 dH₂O 重建成 50 μM 的浓度。将各 5 μl 的寡核苷酸在装有 2.2 μl 限制缓冲液 #2 (即终浓度为 10mM 的 Tris HCl pH 7.9, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM 二硫苏糖醇) (New England Biolabs, Beverly, MA) 的薄壁 PCR 管中合并, 以互相退火, 并加热至 95℃, 保持 30 秒, 然后缓慢冷却 2 小时至 25℃, 让其退火。按试剂盒说明书的指示, 将 5pmol 已退火的寡核苷酸连接到 pGEM T-Easy 载体。(Promega, Madison WI)。在冰浴上 2 分钟内, 将连接混合物加入到 50 μl DH5 α 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 在 37℃ 孵育 5 分钟, 在冰浴上孵育 2 分钟, 然后涂布于 LB+100 μg/L 氨苄青霉素琼脂平板, 置于 37℃ 下 14 小时。将单个细菌菌落挑至 5ml LB+100 μg/L 氨苄青霉素中, 让其生长 14 小时。在 2000xg、4℃ 下离心 PCR 管 15 分钟, 用 Qiagen miniprep 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA), 按试剂盒说明书的指示分离载体 DNA。用 NgoM IV-Rsr-II 消化 2 μg DNA。所得片段按试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 说明书指示的 Qiaquick 方法进行凝胶纯化, 并用 NgoM IV-Rsr-II 连接到 pED. dcEpoFc 中。连接产物转化到 DH5 α 感受态大肠杆菌细胞中, 按对 pGEM T-Easy 载体的描述制备 DNA。

[0346] 实施例 10 : 促红细胞生成素 - 酸性肽 Fc 构建物的克隆

[0347] EP0-Fc 中人 IgG1 Fc 片段氨基酸 221-229 (EU 编号) 的铰链区用酸性肽 (CCA) 替换。使用四种重叠寡核苷酸 (IDT, Coralville, IA) :

[0348] 1. Epo-CCA-Fc 正义 1 :

[0349] 5' CCG GTG ACA GGG AAT TCG GTG GTG AGT ACC AGG CCC

[0350] TGG AGA AGG AGG TGG CCC AGC TGG AG3' (SEQ ID NO :67)

[0351] 2. Epo-CCA-Fc 正义 2 :

[0352] 5' GCC GAG AAC CAG GCC CTG GAG AAG GAG GTG GCC CAG

[0353] CTG GAG CAC GAG GGT GGT GGT CCC GCT CCA GAG CTG CTG

[0354] GGC GGA CA3' (SEQ ID NO :68)

[0355] 3. Epo-CCA-Fc 反义 1 :

[0356] 5' GTC CGC CCA GCA GCT CTG GAG CGG GAC CAC CAC CCT

[0357] CGT GCT CCA GCT GGG CCA C3' (SEQ ID NO :69)

[0358] 4. Epo-CCA-Fc 反义 2 :

[0359] 5' CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTT CTC GGC CTC CAG CTG

[0360] GGC CAC CTC CTT CTC CAG GGC CTG GTA CTC ACC ACC GAA

[0361] TTC CCT GTC ACC GGA 3' (SEQ ID NO :70)。

[0362] 将各寡核苷酸用 dH₂O 重建成 50 μM 的浓度。将各 5 μl 的寡核苷酸在装有 2.2 μl 限制缓冲液 No. 2 (New England Biolabs, Beverly, MA) 的薄壁 PCR 管中合并, 以互相退火, 并加热至 95℃, 保持 30 秒, 然后让其缓慢冷却 2 小时至 25℃。按试剂盒说明书的指示, 将 5pmol 已退火的寡核苷酸连接到 pGEM T-Easy 载体。(Promega, Madison WI)。在冰浴上 2

分钟内,将连接混合物加入到 50 μ l DH5 α 感受态大肠杆菌细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA),在 37 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟,在冰浴上孵育 2 分钟,然后涂布于 LB+100 μ g/L 氨苄青霉素琼脂平板,置于 37 $^{\circ}$ C 下 14 小时。将单个细菌菌落挑至 5ml LB+100 μ g/L 氨苄青霉素中,让其生长 14 小时。在 2000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 下离心 PCR 管 15 分钟,用 Qiagen miniprep 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA),按试剂盒说明书的指示分离载体 DNA。用 Age I-Rsr-II 消化 2 μ g DNA。所得片段按试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 说明书指示的 Qiaquick 方法进行凝胶纯化,并用 Age I-Rsr-II 连接到 pED. Epo Fc. 1 中。连接产物转化到 DH5 α 感受态大肠杆菌细胞中,并如上所述制备 DNA。

[0363] 实施例 11 :Cys-Fc 构建物的克隆

[0364] 使用 PCR 和标准的分子生物学技术 (Sambrook 等,1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual,第 2 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press),产生哺乳动物表达构建物,使得人 IFN α 信号肽的编码序列直接紧靠从第一个半胱氨酸残基 (Cys 226, EU 编号) 开始的 Fc 编码序列。经信号肽酶切割和哺乳动物细胞分泌,就产生具有 N 末端半胱氨酸残基的 Fc 蛋白。简言之,在 PCR 反应中使用引物 IFN α -Sig-F (IFN α -Sig-F :5' -GCTACTGCAGCCACCATGGCCTTGACCTTTGCTTTAC-3') (SEQ ID NO :71) 和 Cys-Fc-R (5' -CAGTTCCGGAGCTGGCACGGCGGAGAGCCCACAGAGCAGCTTG-3') (SEQ ID NO :72),来创建连接 IFN α 信号序列和从 Cys 226 开始的 Fc N 末端的片段。将 500ng pED. dC. 天然 hIFN α Δ 接头加入到 PCR 反应中各 25pmol 的引物,反应按厂商的标准方案使用 ExpandHigh Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)。在 MJ 热循环仪中按以下循环进行反应 :94 $^{\circ}$ C, 2 分钟 ;(94 $^{\circ}$ C, 30 秒, 50 $^{\circ}$ C, 30 秒, 72 $^{\circ}$ C, 45 秒) 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C, 10 分钟。预期大小的条带 (~ 112bp) 用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化,用 PstI 和 BspEI 限制酶消化,凝胶纯化,然后亚克隆到 pED. dC. 天然 hIFN α Δ 接头的相应位点,产生 pED. dC. Cys-Fc (图 5)。

[0365] 实施例 12 :蛋白质表达和 Fc-MESNA 的制备

[0366] Fc (人 IgG1 的恒定区) 的编码序列通过 PCR 扩增从含 Fc 质粒获得,PCR 扩增时使用标准的条件和试剂,按照厂商建议的程序亚克隆 Fc 编码序列 NdeI/SapI。简言之,用引物 5' -GTGGTCATATGGGCATTGAAGGCAGAGGCGCCGCTGCGGTCG-3' (SEQ ID NO :73) 和 5' -

[0367] GGTGGTTGCTCTTCCGCAAAAACCCGAGACAGGGAGAGACTCTTCTGCG-3' (SEQ ID NO :74) 扩增 500ng 质粒 pED. dC. Epo-Fc 的 Fc 序列,使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在 RapidCycler 热循环仪 (Idaho Technology Salt Lake City, Utah) 进行反应 :95 $^{\circ}$ C 变性 2 分钟,然后 95 $^{\circ}$ C, 0 秒, 55 $^{\circ}$ C, 0 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1 分钟,斜率为 4,进行 18 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。将 PCR 产物亚克隆到中间克隆载体,完全测序,然后用 NdeI 和 SapI 位点,按标准程序亚克隆至 pTWIN1 载体中。Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. 1989, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 2 版 ;Cold Spring Harbor, New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press。然后用标准方法 (同上) 将此质粒转化到 BL21 (DE3) pLysS 细胞中。待 1 升细胞培养物在 37 $^{\circ}$ C 下生长至吸光度读数为 0.8AU 后,用 1mM 异丙基 β -D-1- 硫代半乳糖苷诱导,然后在 25 $^{\circ}$ C 下生长过夜。离心沉淀细胞,用 20mM Tris 8.8/1% NP40/0.1mM 苯基甲磺酰氟 /1 μ g/ml Benzonase 核酸酶 (Novagen Madison, WI) 裂解,并在 4 $^{\circ}$ C 下与几丁质珠 (New England Biolabs ;Beverly, MA) 结合过夜。

然后用几倍柱床体积的 20mM Tris 8.5/500mM NaCl/1mM EDTA 洗涤珠,并在 -80℃ 下保藏。通过在 20mM Tris 8.5/500mM NaCl/1mM EDTA/500mM 2- 巯基乙磺酸 (MESNA) 中将蛋白质从珠上洗脱下来,产生纯化的 Fc-MESNA,洗脱液直接用于以下偶联反应中。

[0368] 实施例 13 :VII 因子 -Fc 单体 - 二聚体杂合体的表达与纯化

[0369] 建立表达 VII 因子 -Fc 的 CHO DG-44 细胞。将 CHO DG-44 细胞在 37℃、5% CO₂ 下,在加入核苷和核糖核苷及补充 5% 热失活胎牛血清的 MEM Alpha 中培养,直到转染。

[0370] 将 DG44 细胞涂布于 100mm 组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿 50 % -60 %。用共 10 μg DNA 转染一个 100mm 培养皿 :7.5 μg pED. dC. FVII-Fc+1.5 μg pcDNA3/Flag-Fc+1 μg pcDNA6-PACE。按 Superfect 转染试剂手册 (Qiagen, Valencia, CA) 的描述转染细胞。转染 48 小时后,除去培养基,用不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清和 10 μg/ml 杀稻瘟素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 和 0.2mg/ml 遗传霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的 MEM Alpha 取代。10 天后,用 0.25% 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到 T25 组织培养瓶中,继续进行选择 10-14 天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加 25nM 氨甲蝶呤扩大蛋白质的表达。

[0371] 用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Coming, Coming, NY) 中的 300ml 生长培养基,所述生长培养基补充有 5 μg/ml 维生素 K₃ (甲基萘醌亚硫酸氢钠) (Sigma, St Louis, MO)。将滚瓶在 5% CO₂、37℃ 下温育 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基 (含 5 μg/ml 牛胰岛素和 10 μg/ml 庆大霉素的 DMEM/F12) 替换生长培养基,所述生产培养基补充有 5 μg/ml 维生素 K₃。连续 10 天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在 4℃ 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。集中的培养基首先用 Sartoclean 玻璃纤维过滤器 (3.0 μm+0.2 μm) (Sartorius Corp. Gottingen, 德国) 澄清,然后用 Acropack 500 过滤器 (0.8 μm+0.2 μm) (Pall Corp., East Hills, NY) 澄清。然后用 Pellicon Biomax 切向流过滤盒 (10kDa MWC0) (Millipore Corp., Billerica, MA) 将澄清培养基浓缩约 20 倍。

[0372] 然后将浓缩培养基流过 A 蛋白琼脂糖凝胶 4 快速流动柱 (APBiotech, Piscataway, NJ), 以从浓缩培养基中捕捉 Fc 嵌合体。5×5cm (100ml) 柱每 ml 柱体积加样品 < 5mg Fc 蛋白,线性流速为 100cm/ 小时,使残留时间 ≥ 3 分钟。然后用 > 5 倍柱体积的 1X DPBS 洗涤柱,以除去非特异性结合蛋白。结合蛋白用 100mM 甘氨酸 pH 3.0 洗脱。然后通过向 10 份洗脱级份中加入 1 份 1M Tris-HCl (pH8), 中和含蛋白峰的洗脱级份。

[0373] 为从制备产物中除去 FLAG-Fc 同源二聚体 (即其中 FLAG 肽被表达为与两个 Fc 分子的融合体的嵌合 Fc 二聚体), 将 A 蛋白琼脂糖凝胶 4 快速流动集合物流过 Unosphere S 阳离子交换柱 (BioRad Corp., Richmond, CA)。在该柱的操作条件下, FLAG-Fc 单体 - 二聚体杂合体不带电荷 (FLAG-Fc 的理论 pI = 6.19), 从而从柱中流过, 而 hFVII-Fc 构建物带正电荷, 因此与柱子结合, 要用更高的离子强度来洗脱。A 蛋白琼脂糖凝胶 4 快速流动集合物先透析到 20mM MES, 20mM NaCl, pH 6.1 中。然后将透析物料以 150cm/ 小时的流速加样到 1.1×11cm (9.9ml) 柱。在洗涤和洗脱过程中, 将流速提高到 500cm/ 小时。用 8 倍柱体积的 20mM MES, 20mM NaCl, pH 6.1 和 8 倍柱体积的 20mM MES, 40mM NaCl, pH 6.1 依次洗涤柱。结合蛋白用 20mM MES, 750mM NaCl, pH 6.1 洗脱。集中含蛋白峰的洗脱级份, 通过 0.2 μm 滤片过滤除菌, 然后在 -80℃ 下保藏。

[0374] 用抗 FLAG MAB 亲和柱,将其中 hFVII 融合到两个 Fc 分子的嵌合 Fc 二聚体与含一个 FLAG 肽和一个 hFVII 融合体的嵌合 Fc 二聚体分离开来。Unosphere S 洗脱液集合用 20mM Tris, 50mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 8 稀释 (1 : 1), 然后以 60cm/ 小时的线性流速加样到 1.6×5cm² 抗 FLAG 琼脂糖凝胶柱 (Sigma Corp., St. Louis, MO)。加样要做到 < 2.5mg 单体-二聚体杂合体/ml 柱体积。加样后,用 5 倍柱体积的 20mM Tris, 50mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 8.0 洗涤柱子,然后用 100mM 甘氨酸, pH 3.0 洗脱单体-二聚体杂合体。然后,通过向 10 份洗脱级份中加入 1 份 1M Tris-HCl (pH 8), 中和含蛋白峰的洗脱级份。在 -80℃ 下保藏集合物。

[0375] 实施例 14: IX 因子-Fc 同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0376] 建立表达 IX 因子-Fc 的 CHO DG-44 细胞。将 DG44 细胞涂布于 100mm 组织培养培养皿中, 让其生长至铺满培养皿 50% -60%。用共 10 μg DNA 转染一个 100mm 培养皿: 对于同源二聚体转染, 使用 8 μg pED. dC. IX 因子-Fc+2 μg pcDNA6-PACE; 对于单体-二聚体杂合体转染, 使用 8 μg pED. dC. IX 因子-Fc+1 μg pcDNA3-FlagFc+1 μg pcDNA6-PACE。按 Superfect 转染试剂手册 (Qiagen, Valencia, CA) 的描述转染细胞。转染 48 小时后, 除去培养基, 对于两个转染试验, 均用不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清和 10 μg/ml 杀稻瘟素 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 的 MEM Alpha 取代, 而对于单体-二聚体杂合体转染, 还补充 0.2mg/ml 遗传霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。3 天后, 用 0.25% 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来, 并将其转移到 T25 组织培养瓶中, 继续进行选择 10-14 天, 直至细胞开始生长良好, 稳定的细胞系得以建立。随后通过分别对同源二聚体和单体-二聚体杂合体添加 10nM 或 100nM 氨甲蝶呤, 扩大蛋白质的表达。

[0377] 对于两种细胞系, 都是用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的 300ml 生长培养基, 所述生长培养基补充有 5 μg/ml 维生素 K₃ (甲基萘醌亚硫酸氢钠) (Sigma, St Louis, MO)。将滚瓶在 5% CO₂、37℃ 下温育约 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基 (含 5 μg/ml 牛胰岛素和 10 μg/ml 庆大霉素的 DMEM/F12) 替换生长培养基, 所述生产培养基补充有 5 μg/ml 维生素 K₃。连续 10 天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在 4℃ 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基, 并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前, 先用 SuporCap-100 (0.8/0.2 μm) 过滤器 (Pall Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) 澄清培养基。以下所有步骤均在 4℃ 下进行。将澄清培养基加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶, 用 5 倍柱体积的 1X PBS (10mM 磷酸盐, pH 7.4, 2.7mM KCl 和 137mM NaCl) 洗涤, 用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.7) 洗脱, 然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCl (pH 9.0) 中和。然后将蛋白质透析到 PBS 中。

[0378] 因为其中含有 FIX-Fc:FIX-Fc 同源二聚体、FIX-Fc:Flag-Fc 单体-二聚体杂合体和 Flag-Fc:Flag-Fc 同源二聚体的混合物, 故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩, 以 4ml/ 分钟 (36cm/ 小时) 的流速加样到 2.6cm±60cm (318ml) Superdex 200Prep Grade 柱, 然后用 3 倍柱体积的 1X PBS 洗脱。收集与 UV 检测器上的两个峰对应的级份, 用 SDS-PAGE 进行分析。第一个峰的级份含 FIX-Fc:FIX-Fc 同源二聚体或 FIX-Fc:Flag-Fc 单体-二聚体杂合体, 而第二个峰含 Flag-Fc:Flag-Fc 同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含 Flag-Fc 同源二聚体的级份, 以 60cm/ 小时的线性流速直接加样到 1.6×5cm² 抗 FLAG 琼脂糖凝胶柱 (Sigma Corp., St. Louis, MO)。加样后, 用 5

倍柱体积的 PBS 洗涤柱子。然后用 100mM 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入 1/10 体积的 1M Tris-HCl 中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原 SDS-PAGE 进行分析。将级份透析到 PBS 中,浓缩至 1-5mg/ml,并在 -80℃ 下保藏。

[0379] 实施例 15:IFN α 同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0380] 建立表达 hIFN α 的 CHO DG-44 细胞。将 DG44 细胞涂布于 100mm 组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿 50%-60%。用共 10 μ g DNA 转染一个 100mm 培养皿:对于同源二聚体转染,用 10 μ g hIFN α Fc 构建物;对于单体-二聚体杂合体转染,用 8 μ g hIFN α Fc 构建物+2 μ g pcDNA3-FlagFc。按 Superfect 转染试剂手册 (Qiagen,Valencia,CA) 的描述转染细胞。转染 48 小时后,除去培养基,用不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清的 MEM Alpha 取代,而对于单体-二聚体杂合体转染,还补充 0.2mg/ml 遗传霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。3 天后,用 0.25% 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到 T25 组织培养瓶中,继续进行选择 10-14 天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加 10-50nM 氨甲蝶呤,扩大蛋白质的表达。

[0381] 对于所有细胞系,都是用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的 300ml 生长培养基。将滚瓶在 5% CO₂、37℃ 下温育约 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基 (含 5 μ g/ml 牛胰岛素和 10 μ g/ml 庆大霉素的 DMEM/F12) 替换生长培养基。连续 10 天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在 4℃ 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用 Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI) 的 SuporCap-100 (0.8/0.2 μ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在 4℃ 下进行。将澄清培养基加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶,用 5 倍柱体积的 1X PBS (10mM 磷酸盐, pH 7.4, 2.7mM KCl 和 137mM NaCl) 洗涤,用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.7) 洗脱,然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCl (pH 9.0) 中和。然后将蛋白质透析到 PBS 中。

[0382] 因为其中含有 IFN α Fc:IFN α Fc 同源二聚体、IFN α Fc:FlagFc 单体-二聚体杂合体和 FlagFc:FlagFc 同源二聚体 (或者 Δ 接头或 GS15 接头) 的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩,以 4ml/ 分钟 (36cm/ 小时) 的流速加样到 2.6cm $\pm$ 60cm (318ml) Superdex 200Prep Grade 柱,然后用 3 倍柱体积的 1X PBS 洗脱。收集与 UV 检测器上的两个峰对应的级份,用 SDS-PAGE 进行分析。第一个峰的级份含 IFN α Fc:IFN α Fc 同源二聚体或 IFN α Fc:FlagFc 单体-二聚体杂合体,而第二个峰含 Flag-Fc:Flag-Fc 同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含 Flag-Fc 同源二聚体的级份,以 60cm/ 小时的线性流速直接加样到 1.6 $\times$ 5cm M2 抗 FLAG 琼脂糖凝胶柱 (SigmaCorp., St. Louis, MO)。加样后,用 5 倍柱体积的 PBS 洗涤柱子。然后用 100mM 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入 1/10 体积的 1M Tris-HCl 中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原 SDS-PAGE 进行分析。将级份透析到 PBS 中,浓缩至 1-5mg/ml,并在 -80℃ 下保藏。

[0383] 实施例 16:卷曲螺旋蛋白的表达与纯化

[0384] 将质粒 pED. dC Epo-CCA-Fc 和 pED. dC CCB-Fc 单独或者以 1 : 1 的比例共同转染到 CHO DG44 细胞中。细胞按 Superfect 转染试剂手册 (Qiagen,Valencia,CA) 的描述进行转染。48 小时后除去培养基,用不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清的 MEM Alpha 取代。在 A 蛋白柱上按本领域公知的方法进行亲和层析纯化。另外还可用尺寸排阻层析实现纯化。

[0385] 实施例 17 :Cys-Fc 的表达与纯化

[0386] 建立表达 Cys-Fc 的 CHO DG-44 细胞。用 Superfect 转染试剂 (Qiagen ;Valencia, CA) 按厂商的方案,将含小鼠二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因的 pED. dC. Cys-Fc 表达质粒转染到 CHO DG44(dhfr 缺陷型) 细胞,然后在补充有 5% 透析 FBS 和青霉素 / 链霉素抗生素 (Invitrogen ;Carlsbad,CA) 的 α MEM(不含核苷) 组织培养基中培养 10 天,选择稳定的转染子。然后用 50nM 氨甲蝶呤扩增所得的稳定转染细胞集合,以增加表达。用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的 300ml 生长培养基。将滚瓶在 5% CO₂、37℃ 下温育约 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基 (含 5 μ g/ml 牛胰岛素和 10 μ g/ml 庆大霉素的 DMEM/F12) 替换生长培养基。连续 10 天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在 4℃ 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用 PallGelman Sciences (Ann Arbor, MI) 的 SuporCap-100 (0.8/0.2 μ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在 4℃ 下进行。将澄清培养基加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶,用 5 倍柱体积的 1X PBS (10mM 磷酸盐, pH 7.4, 2.7mM KCl 和 137mM NaCl) 洗涤,用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.7) 洗脱,然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCl (pH 9.0) 中和。然后将蛋白质透析到 PBS 中,直接用于偶联反应中。

[0387] 实施例 18 :将 T20- 硫酯与 Cys-Fc 偶联

[0388] 在室温下,将 Cys-Fc (4mg, 终浓度 3.2mg/ml) 和 T20- 硫酯或 T20-PEG- 硫酯 (2mg, 约 5 摩尔当量) 在 0.1M Tris 8/10mM MESNA 中温育 16 小时。用还原性样品缓冲液进行 SDS-PAGE (Tris-Gly 胶) 分析,显示存在比 Fc 对照约大 5kDa 的新条带 (偶联物转化率 > 40-50%)。事先对 Cys-Fc 和未反应 Cys-Fc 进行的 N 末端测序显示,信号肽在一部分分子中被不正确地加工,留下 (Cys)-Fc (其会通过自然连接与肽 - 硫酯反应) 与 (Val)-(Gly)-(Cys)-Fc (其不会通过自然连接与肽 - 硫酯反应) 的混合物。由于反应条件不足以破坏 Cys-Fc 分子的二聚化,该反应产生 T20-Cys-Fc:T20-Cys-Fc 同源二聚体、T20-Cys-Fc:Fc 单体 - 二聚体杂合体和 Cys-Fc:Cys-Fc Fc- 二聚体的混合物。用上述尺寸排阻层析法纯化蛋白,以分离所述三种组分。结果在非还原条件下通过 SDS-PAGE 分析进行确认。

[0389] 实施例 19 :IFN α 抗病毒活性试验

[0390] 用 CPE (致细胞病变效应) 试验确定 IFN α 融合蛋白的抗病毒活性 (IU/ml)。将 A549 细胞涂布于含生长培养基 (补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640) 的 96 孔组织培养板,在 37℃、5% CO₂ 下培养 2 小时。用生长培养基稀释 IFN α 标准品和 IFN α 融合蛋白,并加到细胞中,试验重复三次,在 37℃、5% CO₂ 下温育 20 小时。温育后,除去各孔的所有培养基,用生长培养基稀释脑心肌炎病毒 (EMC),并将其加入到各孔中 (3000pfu/ 孔),但对照孔不加入。将培养板在 37℃、5% CO₂ 下温育 28 小时。用 10% 冷三氯乙酸 (TCA) 固定活细胞,然后用碘基罗丹明 B (SRB) 按公开的方案 (Rubinstein 等, 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113) 染色。SRB 染料用 10mM tris pH 10.5 溶解后,用分光光度计在 490nm 处读数。通过将活性与公知的标准曲线 (世界卫生组织 IFN α 2b 国际标准, 5-0.011IU/ml) 比较,对样品进行分析。结果在以下表 3 和图 6 中显示,表明单体 - 二聚体杂合体抗病毒活性提高。

[0391] 表 3 :干扰素抗病毒试验 :同源二聚体与单体 - 二聚体杂合体

[0392]

蛋白质	抗病毒活性 (IU/nmol)	标准偏差
IFN α Fc 8 氨基酸接头同源二聚体	0.45×10^5	0.29×10^5
IFN α Fc 8 氨基酸接头:FlagFc 单体-二聚体杂合体	4.5×10^5	1.2×10^5
IFN α Fc Δ 接头同源二聚体	0.22×10^5	0.07×10^5
IFN α Fc Δ 接头:FlagFc 单体-二聚体杂合体	2.4×10^5	0.0005×10^5
IFN α Fc GS15 接头同源二聚体	2.3×10^5	1.0×10^5
IFN α Fc GS15 接头单体-二聚体杂合体	5.3×10^5	0.15×10^5

[0393] 实施例 20 :FVIIa 凝血活性分析

[0394] StaClot FVIIa-rTF 检测试剂盒购自 Diagnostica Stago (Parsippany, NJ), 按 Johannessen 等, 2000, Blood Coagulation and Fibrinolysis 11 :S159 的描述进行改装。用 FVIIa 世界卫生组织标准 89/688 制备标准曲线。这个试验用来比较单体 - 二聚体杂合体与同源二聚体的凝血活性。结果显示单体 - 二聚体杂合体的凝血活性是同源二聚体的四倍 (图 7)。

[0395] 实施例 21 :FVIIa-Fc 经口给予 10 天龄大鼠

[0396] 25 克 9 天龄新生 Sprague Dawley 大鼠购自 Charles River (Wilmington, MA), 并让其适应 24 小时。经口给予大鼠 FVIIaFc 同源二聚体、单体 - 二聚体杂合体或两者的 50 : 50 混合物。以 1mg/kg 的剂量给予体积为 200 μ l 的 FVIIaFc 溶液。该溶液由 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.4) 和 5mg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂组成。在几个时间点用 CO₂ 使大鼠安乐死, 通过心脏穿刺法抽取 200 μ l 血液。通过加入 3.8% 柠檬酸钠溶液并在室温下以 1268xg 的速度离心, 获得血浆。血浆样品马上进行试验, 或者在 20°C 下冻藏。经口给予的单体 - 二聚体杂合体与同源二聚的 VII 因子相比, 其最大血清浓度 (C_{max}) 明显更高 (图 8)。

[0397] 实施例 22 :IX 因子 -Fc 经口给予新生大鼠

[0398] 以 10nmol/kg 的近似等摩尔剂量, 经口给予 10 天龄新生 Sprague Dawley 大鼠 200 μ l FIX-Fc 同源二聚体或 FIX-Fc:FlagFc 单体 - 二聚体杂合体, 所用缓冲液为 0.1M 磷酸钠缓冲液, pH 6.5, 含 5mg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂和 0.9% NaCl。注射后 1、2、4、8、24、48 和 72 小时, 用 CO₂ 使大鼠安乐死, 通过心脏穿刺法抽取血液, 通过加入 3.8% 柠檬酸钠溶液并在室温下以 1268xg 的速度离心, 获得血浆。然后离心沉淀样品, 收集血清, 在 -20°C 下冻藏, 直到通过 ELISA 对融合蛋白进行分析。

[0399] 实施例 23 :IX 因子 -FcELISA

[0400] 用 50mM 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 以 1 : 100 稀释山羊抗 IX 因子 IgG (Affinity Biologicals, Ancaster, 加拿大), 以 100 μ l/孔包被 96 孔 Immulon4HBX ELISA 板 (Thermo

LabSystems, Vantaa, 芬兰)。将各板在环境温度下温育 2 小时, 或者在 4℃ 下用塑料膜密封过夜。用 TECAN 洗板机用 PBST 洗涤各孔四次 (300 μ l/ 孔)。各孔用 PBST+6% BSA (200 μ l/ 孔) 封闭, 然后在环境温度下温育 90 分钟。用 TECAN 洗板机用 PBST 洗涤各孔四次 (300 μ l/ 孔)。将标准品和实施例 18 中描述的大鼠血液样品加入各孔 (100 μ l/ 孔), 然后在环境温度下温育 90 分钟。样品和标准品用 HBET 缓冲液 (HBET :5.95g HEPES, 1.46g NaCl, 0.93gNa₂EDTA, 2.5g 牛血清白蛋白, 0.25ml Tween-20, 用 dH₂O 定容至 250ml, pH 调至 7.2) 稀释。标准曲线的范围是 200ng/ml 至 0.78ng/ml, 该范围内的稀释倍数是 2 倍。用 TECAN 洗板机用 PBST 洗涤各孔四次 (300 μ l/ 孔)。用 HBET 以 1 : 25,000 稀释耦合的山羊抗人 IgG-Fc-HARP 抗体 (Pierce, Rockford, IL), 并以 100 μ l/ 孔加入到各孔。将各板在环境温度下温育 90 分钟。用 TECAN 洗板机用 PBST 洗涤各孔四次 (300 μ l/ 孔)。按厂商的说明加入 N- 四甲联苯胺过氧化物酶底物 (TMB) (Pierce, Rockford, IL) (100 μ l/ 孔), 使各板显影。各板在室温下暗处温育 5 分钟, 或者直至显影。反应用 2M 硫酸 (100 μ l/ 孔) 终止。用 SpectraMax plusplate 读数器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 在 450nm 处读取吸光度。对第 4 小时抽取的血液分析显示, IX 因子 -Fc 单体 - 二聚体杂合体和 IX 因子 -Fc 同源二聚体的血清浓度差别超过 10 倍 (图 9)。结果表明 IX 因子 -Fc 单体 - 二聚体杂合体水平始终比 IX 因子 -Fc 同源二聚体高 (图 10)。

[0401] 实施例 24 :Epo-Fc 的克隆

[0402] 从编码成熟促红细胞生成素编码序列的质粒 (事先通过 RT-PCR 从 Hep G2 mRNA 获得) 和以下所示引物 hepoxba-F 和 hepoeco-R, 通过 PCR 扩增获得成熟 Epo 编码区。引物 hepoxba-F 含 XbaI 位点, 而引物 hepoeco-R 含 EcoRI 位点。在 Idaho Technology RapidCycler 中使用 Vent 聚合酶进行 PCR :95℃ 变性 15 秒, 然后 (95℃, 0 秒, 55℃, 0 秒, 72℃, 1 分钟) 28 个循环, 斜率为 6.0, 然后 72℃ 延伸 3 分钟。凝胶纯化约 514bp 的产物, 用 XbaI 和 EcoRI 消化, 再次凝胶纯化, 然后定向亚克隆到经 XbaI/EcoRI 消化和凝胶纯化的上述 pED. dC. XFc 载体。所得构建物命名为 pED. dC. EpoFc。

[0403] 用成人肾脏 QUICK- 克隆 cDNA 制品为模板, 使用下述引物 Epo+Pep-Sbf-F 和 Epo+Pep-Sbf-R, 通过 PCR 扩增获得含内源信号肽和成熟序列的 Epo 序列。引物 Epo+Pep-Sbf-F 含位于起始密码子上游的 SbfI 位点, 而引物 Epo+Pep-Sbf-R 在 Epo 序列的内源 SbfI 位点下游退火。用 Expand 聚合酶在 PTC-200 MJ 热循环仪中进行 PCR 反应 :94℃ 变性 2 分钟, 然后 94℃, 30 秒, 57℃, 30 秒, 72℃, 45 秒, 28 个循环, 然后 72℃ 延伸 10 分钟。凝胶分离约 603bp 的产物, 并亚克隆到 pGEM-T Easy 载体。正确的编码序列通过 SbfI 消化切除, 凝胶纯化, 并克隆到经 PstI 消化、虾碱性磷酸酶 (SAP) 处理、凝胶纯化的 pED. dC. EpoFc 质粒中。带有正确方向插入物的该质粒最初通过 KpnI 消化进行确定。比较此构建物的 XmnI 和 PvuII 消化结果和 pED. dC. EpoFc, 确认在正确方向上。对序列进行了确认, 并将构建物命名为 pED. dC. natEpoFc。

[0404] PCR 引物 :

[0405] hepoxba-F (EPO-F) :

[0406] 5' -AATCTAGAGCCCCACCACGCCTCATCTGTGAC-3' (SEQ ID NO :75)

[0407] hepoeco-R (EPO-R) :

[0408] 5' -TTGAATTCTCTGTCCCCTGTCCTGCAGGCC-3' (SEQ ID NO :76)

[0409] Epo+Pep-Sbf-F :5' -GTACCTGCAGGCGGAGATGGGGGTGCA-3' (SEQ ID NO :77)

[0410] Epo+Pep-Sbf-R :5' -CCTGGTCATCTGTCCCCTGTCC-3' (SEQ ID NO :78)。

[0411] 实施例 25 :Epo-Fc 的克隆

[0412] 本文在此描述克隆 EP0-Fc 的另一种方法。首先设计引物,以扩增全长 Epo 编码序列,包括天然信号序列,如下所示:

[0413] Epo-F :5' -GTCCAACCTG CAGGAAGCTTG CCGCCACCAT

[0414] GGGAGTGCAC GAATGTCCTG CCTGG-3' (SEQ ID NO :79)

[0415] Epo-R :5' -GCCGAATTCA GTTTTGTCGA CCGCAGCGG

[0416] CGCCGGCGAA CTCTCTGTCC CCTGTTCTGC AGGCCTCC-3' (SEQ ID NO :80)。

[0417] 正向引物在 Kozak 序列上游掺入 sbfI 和 HindIII 位点,而反向引物除去内部 sbfI 位点,并将 8 氨基酸接头 (EFAGAAAV) (SEQ ID NO :81) 添加到编码序列的 3' 末端,并加入 SalI 和 EcoRI 限制位点。然后在 25 μ l PCR 反应中使用 25pmol 的这些引物,从肾脏 cDNA 文库 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 扩增 Epo 编码序列,PCR 反应按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (BoehringerMannheim, Indianapolis, IN),在 MJ 热循环仪中进行以下循环:94 $^{\circ}$ C 2 分钟;(94 $^{\circ}$ C 30 秒,58 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 45 秒)30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (641bp),并将其连接到中间克隆载体 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中。将 DNA 转化到 DH5 α 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中,使少量制备培养物生长,并用 Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) 纯化,两者均按厂商的标准方案操作。一旦序列得到确认,将此插入物用 SbfI/EcoRI 限制酶消化,凝胶纯化,并按类似的方式克隆到哺乳动物表达载体 pED. dC 的 PstI/EcoRI 位点中。

[0418] 设计以下引物,以扩增人 IgG1 恒定区 (Fc 区, EU 编号 221-447) 的编码序列:

[0419] Fc-F :5' -GCTGCGGTCG ACAAACCTCA CACATGCCCA

[0420] CCGTGCCCAG CTCCGGAACCT CCTGGGCGGA CCGTCAGTC-3' (SEQ ID NO :82)

[0421] Fc-R5' -ATTGGAATTC TCATTTACCC GGAGACAGGG AGAGGC-3' (SEQ ID NO :83)。正向引物在接头 -Fc 连接处掺入 SalI 位点,并将 BspEI 和 RsrII 位点引入 Fc 区,但不影响编码序列。而反向引物将 EcoRI 位点添加到终止密码子之后。然后在 25 μ l PCR 反应中使用 25pmol 的这些引物,从白细胞 cDNA 文库 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 扩增 Fc 编码序列,PCR 反应按厂商的标准方案使用 Expand HighFidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN),在 MJ 热循环仪中进行以下循环:94 $^{\circ}$ C 2 分钟;(94 $^{\circ}$ C 30 秒,58 $^{\circ}$ C 30 秒,72 $^{\circ}$ C 45 秒)30 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 10 分钟。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (696bp),并将其连接到中间克隆载体 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中。将 DNA 转化到 DH5 α 细胞 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中,使少量制备培养物生长,并用 Plasmid Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA) 纯化,两者均按厂商的标准方案操作。一旦序列得到确认,将此插入物用 SalI/EcoRI 限制酶消化,凝胶纯化,并按类似的方式克隆到质粒 pED. dC. Epo(同上)的 SalI/EcoRI 位点中,以产生哺乳动物表达质粒 pED. dC. EpoFc。在另一个实验中,该质粒也用 RsrII/XmaI 消化,并将含 Asn 297 Ala 突变 (EU 编号) 的来自 pSYN-Fc-002 的相应片段克隆到其中,以创建 pED. dC. EP0-Fc N297A (pSYN-EP0-004)。在哺乳动物细胞中的表达按实施例 26 中的描述进行。带有 8 氨基

酸接头的 EpoFc 的氨基酸序列在图 2j 中提供。在这个另一克隆方法的进行过程中,虽然准确的 EpoFc 氨基酸序列得以保持(图 2J),但在核苷酸水平上造成了多个非编码变化(图 3J)。这些变化是 G6A(核苷酸 6 处的 G 变成 A)(消除引物中的可能二级结构)、G567A(将内源 SbfI 位点从 Epo 除去)、A582G(将 EcoRI 位点从接头除去)、A636T 和 T639G(将单一 BspEI 位点添加到 Fc 中)、及 G651C(将单一 RsrII 位点添加到 Fc 中)。图 3J 中的核苷酸序列来自实施例 25 中创建的构建物,所述构建物掺入了来自实施例 24 构建物序列的上述这些变化。

[0422] 实施例 26 :EPO-Fc 同源二聚体和单体-二聚体杂合体的表达与纯化

[0423] 将 DG44 细胞涂布于 100mm 组织培养培养皿中,让其生长至铺满培养皿 50% -60%。用共 10 μ g DNA 转染一个 100mm 培养皿:对于同源二聚体转染,用 10 μ g pED. dC. EPO-Fc;对于单体-二聚体杂合体转染,用 8 μ g pED. dC. EPO-Fc+2 μ g pcDNA3-FlagFc。所用构建物如实施例 24 中所述进行克隆。也可用实施例 25 中描述的克隆方法来获得用于本实施例的构建物。按 Superfect 转染试剂手册 (Qiagen, Valencia, CA) 的描述转染细胞。或者, pED. dC. EPO-Fc 与 pSYN-Fc-016 一起共转染,以制备非标记单体。转染 48 小时后,除去培养基,对于两种转染,均用不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清的 MEM Alpha 取代,而对于单体-二聚体杂合体转染,还补充 0.2mg/ml 遗传霉素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。3 天后,用 0.25% 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来,并将其转移到 T25 组织培养瓶中,继续进行选择 10-14 天,直至细胞开始生长良好,稳定的细胞系得以建立。随后通过添加氨甲蝶呤扩大蛋白质的表达。

[0424] 对于两种细胞系,都是用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的 300ml 生长培养基。将滚瓶在 5% CO₂、37°C 下温育约 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基(含 5 μ g/ml 牛胰岛素和 10 μ g/ml 庆大霉素的 DMEM/F12) 替换生长培养基。连续 10 天每天收集生产培养基(条件培养基)并在 4°C 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基,并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前,先用 Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI) 的 SuporCap-100 (0.8/0.2 μ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在 4°C 下进行。将澄清培养基加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶,用 5 倍柱体积的 1X PBS (10mM 磷酸盐, pH 7.4, 2.7mM KCl 和 137mM NaCl) 洗涤,用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.7) 洗脱,然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCl (pH 9.0) 中和。然后将蛋白质透析到 PBS 中。

[0425] 因为含有 EPO-Fc:EPO-Fc 同源二聚体、EPO-Fc:Flag-Fc 单体-二聚体杂合体和 Flag-Fc:Flag-Fc 同源二聚体的混合物,故进一步纯化单体-二聚体杂合体转染蛋白样品。将物料浓缩,以 4ml/分钟 (36cm/小时) 的流速加样到 2.6cm $\pm$ 60cm (318ml) Superdex 200 Prep Grade 柱,然后用 3 倍柱体积的 1X PBS 洗脱。收集与 UV 检测器上的两个峰对应的级份,用 SDS-PAGE 进行分析。第一个峰的级份含 EPO-Fc:EPO-Fc 同源二聚体或 EPO-Fc:Flag-Fc 单体-二聚体杂合体,而第二个峰含 Flag-Fc:Flag-Fc 同源二聚体。集中所有含单体-二聚体杂合体但不含 FlagFc 同源二聚体的级份,以 60cm/小时的线性流速直接加样到 1.6 $\pm$ 5cm M2 抗 FLAG 琼脂糖凝胶柱 (Sigma Corp.)。加样后,用 5 倍柱体积的 PBS 洗涤柱子。然后用 100mM 甘氨酸 (pH 3.0) 洗脱单体-二聚体杂合体。然后通过加入 1/10 体积的 1M Tris-HCl 中和含蛋白质峰的洗脱级份,用还原和非还原 SDS-PAGE 进行分析。将级份透析到 PBS 中,浓缩至 1-5mg/ml,并在 -80°C 下保藏。

[0426] 或者,用 SDS-PAGE 分析 Superdex 200 的第一个峰对应的级份,且只集中含大量 EpoFc 单体-二聚体杂合体 and 少量 EpoFc 同源二聚体的级份。然后将富集了单体-二聚体杂合体的这个集合重新加样到 Superdex 200 柱,再集中只含 EpoFc 单体-二聚体杂合体的级份,透析,并作为纯化蛋白保藏。注意,这种纯化方法也可用来纯化非标记单体-二聚体杂合体。

[0427] 实施例 27:将带有 8 氨基酸接头的 EoFc 二聚体和单体-二聚体杂合体给予猕猴

[0428] 对于肺部给药,用 Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA) 喷雾器配制 EpoFc 二聚体或 EpoFc 单体-二聚体杂合体(两者均带有 8 氨基酸接头)的 PBS (pH 7.4) 气雾剂,并结合 Bird Mark 7A 呼吸器,通过气管内导气管(模拟正常的潮气呼吸)给予麻醉的首次试验的猕猴。还通过静脉注射将这两种蛋白质给予首次试验的猕猴。在不同的时间点进行取样,所得血浆中含 Epo 的蛋白质的量用 Quantikine IVD 人 Epo 免疫测定仪 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行定量。药物动力学参数用 WinNonLin 软件进行计算。表 4 显示用 EpoFc 单体-二聚体杂合体或 EpoFc 二聚体处理的猕猴的生物利用度结果。

[0429] 表 4:将 EpoFc 单体-二聚体杂合体和 EpoFc 二聚体给予猕猴

[0430]

蛋白质	猕猴 #	途径	大约沉积 剂量 ¹ (μg/kg)	C _{max} (ng/ml)	C _{max} (fmol/ml)	T _{1/2} (hr)	平均 T _{1/2} (hr)
EpoFc 单体- 二聚体 杂合体	CO6181	肺部	20	72.3	1014	23.6	25.2
	CO6214	肺部	20	50.1	703	23.5	
	CO7300	肺部	20	120	1684	36.2	
	CO7332	肺部	20	100	1403	17.5	
	CO7285	静脉内	25	749	10508	21.3	22.6
	CO7288	静脉内	25	566	7941	23	
	CO7343	静脉内	25	551	1014	23.5	
EpoFc 二聚体	DD026	肺部	15	10.7	120	11.5	22.1
	DD062	肺部	15	21.8	244	27.3	
	DD046	肺部	15	6.4	72	21.8	
	DD015	肺部	15	12.8	143	20.9	
	DD038	肺部	35	27	302	29	
	F4921	静脉内	150	3701	41454	15.1	14.6
	96Z002	静脉内	150	3680	41219	15.3	
	1261CQ	静脉内	150	2726	30533	23.6	
	127-107	静脉内	150	4230	47379	15.0	
	118-22	静脉内	150	4500	50403	8.7	
	126-60	静脉内	150	3531	39550	9.8	

[0431] ¹ 基于 γ 闪烁照相测定的雾化剂量的 15% 沉积部分

[0432] 用以下方程式计算肺部剂量的生物利用度百分率 (F) :

[0433] $F = (\text{肺部 AUC} / \text{肺部剂量}) / (\text{静脉内 AUC} / \text{静脉内剂量}) * 100$

[0434] 表 5 :EpoFc 单体 - 二聚体杂合体和 EpoFc 二聚体经肺部给予首次试验的猕猴后生物利用度百分率的计算

[0435]

蛋白质	猕猴 #	大约剂量 ¹ (沉积)	AUC ng•hr/mL	生物利用 度 ² (F)	平均生物 利用度
EpoFc 单体- 二聚体 杂合体	C06181	20 µg/kg	3810	25.2%	34.9%
	C06214	20 µg/kg	3072	20.3%	
	C07300	20 µg/kg	9525	63.0%	
	C07332	20 µg/kg	4708	31.1%	
EpoFc 二聚体	DD026	15 µg/kg	361	5.1%	10.0%
	DD062	15 µg/kg	1392	19.6%	
	DD046	15 µg/kg	267	3.8%	
	DD015	15 µg/kg	647	9.1%	
	DD038	35 µg/kg	2062	12.4%	

[0436] ¹ 基于 γ 闪烁照相测定的喷雾化剂量的 15% 沉积部分

[0437] ² 静脉内给药的 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的平均 AUC = 18,913 ng • hr/mL (n = 3 个猕猴), 给药剂量为 25 µg/kg。静脉内给药的 EpoFc 二聚体的平均 AUC = 70,967 ng • hr/mL (n = 6 个猕猴), 给药剂量为 150 µg/kg

[0438] 给予猕猴的带 8 氨基酸接头 EpoFc 的药物动力学在图 11 中显示。该图比较了 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体和 EpoFc 二聚体在肺部单剂量给药后的情况。根据摩尔比较结果, 用单体 - 二聚体杂合体处理的猕猴比用二聚体处理的猕猴血清水平明显更高。

[0439] 实施例 38 :EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的皮下给药

[0440] 为比较公知的促红细胞生成剂和 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的血清浓度, 将 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体和 Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) (后者不是嵌合融合蛋白) 皮下给予不同的猕猴, 并测量两者在不同时间的血清浓度。

[0441] 猕猴 (每组 n = 3) 皮下注射 0.025 mg/kg EpoFc 单体 - 二聚体杂合体。

[0442] 在给药前和给药后 144 小时内收集血液样品。从血液制备血清并冻藏, 直到 ELISA 分析 (人 Epo Quantikine 免疫测定) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。用 WinNonLin[®] 软件 (Pharsight, Mountainview, CA) 测定药物动力学参数。

[0443] 结果显示, 虽然 Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) 的摩尔给药剂量稍高, 但随着时间的推移, EpoFc 单体 - 二聚体杂合体和 Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) 的血清浓度相当 (表 6) (图 12)。

[0444] 表 6

[0445]

	途径	剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量 (nmol/kg)	$C_{\max}$ (ng/mL)	AUC ($\text{ng}\cdot\text{hr}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$T_{1/2}$ (hr)	%生物利 用度(F)
EpoFc 单体 - 二聚体杂合体	皮下	25	0.3	133 $\pm$ 34	10,745 $\pm$ 3,144	26 $\pm$ 5	57 $\pm$ 17
Aranesp [®]	皮下	20	0.54	83 $\pm$ 11	5390 $\pm$ 747	22 $\pm$ 2	53 $\pm$ 8

[0446] 实施例 29 :EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的静脉内给药

[0447] 为比较公知的促红细胞生成剂和 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的血清浓度,将 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体、Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) 和 Epogen[®] (阿法依泊汀) (后两者不是嵌合融合蛋白) 经静脉内给予不同的猕猴,并测量它们在不同时间的血清浓度。

[0448] 猕猴 (每组 $n = 3$) 静脉内注射 0.025mg/kg EpoFc 单体 - 二聚体杂合体。在给药前和给药后 144 小时内收集血液样品。从血液制备血清并冻藏,直到 ELISA 分析 (人 Epo Quantikine 免疫测定) (R&D Systems, Minneapolis, MN)。用 WinNonLin[®] 软件 (Pharsight, Mountainview, CA) 测定药物动力学参数。

[0449] 结果显示,虽然猕猴接受的 Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) 和 Epogen[®] (阿法依泊汀) 的摩尔剂量更高,但随着时间的推移,EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的血清浓度 (AUC) 比 Aranesp[®] (阿法达贝泊汀) 和 Epogen[®] (阿法依泊汀) 更高 (表 7) (图 13)。

[0450] 表 7

[0451]

	途径	剂量 ($\mu\text{g/kg}$)	剂量 (nmol/kg)	$C_{\max}$ (ng/mL)	AUC ($\text{ng}\cdot\text{hr}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$T_{1/2}$ (hr)
EpoFc 单体 - 二聚体杂合体	静脉内	25	0.3	622 $\pm$ 110	18,913 $\pm$ 3,022	23 $\pm$ 1
Aranesp [®]	静脉内	20	0.54	521 $\pm$ 8	10,219 $\pm$ 298	20 $\pm$ 1
Epogen	静脉内	20	0.66	514 $\pm$ 172	3936 $\pm$ 636	6.3 $\pm$ 0.6

[0452] 实施例 30 :EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的另一纯化方法

[0453] 本文在此描述纯化 EPO-Fc 的另一种方法。将含 Fc、EpoFc 单体 - 二聚体杂合体和 EpoFc 二聚体的混合物加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶柱 (Amersham, Uppsala, 瑞典)。按厂商的说明洗脱混合物。将含有混合物的 A 蛋白琼脂糖凝胶洗脱液交换到 50mM Tris-Cl (pH 8.0) 缓冲液中。将蛋白质混合物加样到已在 50mM Tris-Cl (pH 8.0) 中平衡的 8mL Mimetic Red 2 XL 柱 (ProMetic Life Sciences, Inc., Wayne, NJ)。然后用 50mM Tris-Cl (pH 8.0) ; 50mM NaCl 洗涤柱。这个步骤去除了大部分的 Fc。用 50mM Tris-Cl (pH 8.0) ; 400mM NaCl 将 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体从柱特异性地洗脱出来。可洗脱 EpoFc 二聚体,柱可用 5 倍柱体积的 1M NaOH 再生。柱子的洗脱级份用 SDS-PAGE 分析 (图 14)。

[0454] 实施例 31 :克隆 Ig κ 信号序列 -Fc 构建物以单独制备未标记 Fc

[0455] IgG1 恒定区 (EU 编号 221-447 ;Fc 区) 的编码序列用以下引物通过 PCR 扩增从白细胞 cDNA 文库 (Clontech, CA) 获得:

[0456] rcFc-F5' -GCTGCGGTCGACAAAACACACATGCCCCACCGTGCCC

[0457] AGCTCCGGAACCTCTGGGCGGACCGTCAGTC-3' (SEQ ID NO :84)

[0458] rcFc-R5' -ATTGGAATTCTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC-3' (SEQ ID NO :85)。

[0459] 正向引物在 Fc 区的起点前面加入三个氨基酸 (AAV) 和 SalI 克隆位点, 还利用遗传密码的简并性, 在氨基酸 231-233 掺入 BspEI 限制位点, 在氨基酸 236-238 掺入 RsrII 限制位点, 以保持正确的氨基酸序列 (EU 编号)。反向引物在 Fc 终止密码子的后面加入 EcoRI 克隆位点。使用各 25pmol 的引物进行 25 μl PCR 反应, 反应按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中进行以下循环: 94℃ 2 分钟; (94℃ 30 秒, 58℃ 30 秒, 72℃ 45 秒) 30 个循环, 然后 72℃ 10 分钟。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (~ 696bp), 并将其克隆到 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中, 产生中间质粒 pSYN-Fc-001 (pGEM T-Easy/Fc)。

[0460] 使用以下引物, 将小鼠 Ig κ 信号序列添加到 Fc CDS:

[0461] rc-Ig κ 信号序列 -F :5' -TTTAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGA

[0462] CACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCA

[0463] CTGGTGACAAAAC CACACATGCCCCACCG-3' (SEQ ID NO :86)

[0464] Fc-noXma-GS-R :5' -GGTCAGCTCATCGCGGGATGGG-3' (SEQ ID NO :87)

[0465] Fc-noXma-GS-F :5' -CCCATCCCGCGATGAGCTGACC-3' (SEQ ID NO :88)。

[0466] 引物 rc-Ig κ 信号序列 -F 将 HindIII 限制位点添加到分子的 5' 末端, 紧接的是 Kozak 序列 (GCCGCCACC) (SEQ ID NO :89), 再紧接的是小鼠 Ig κ 轻链的信号序列, 与 Fc 序列的起点 (EU 编号 221) 直接邻接。引物 Fc-noXma-GS-F 和 -R 利用遗传密码的简并性, 从 Fc 编码序列除去内部 XmaI 位点, 以保持正确的氨基酸序列。用 25pmol 的 rc-Ig κ 信号序列 -F 和 Fc-noXma-GS-R 或者 Fc-noXma-GS-F 和 rcFc-R, 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中进行两个 25 μl PCR 反应。第一个反应用 500ng 白细胞 cDNA 文库 (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 为模板, 进行以下循环: 94℃ 2 分钟; (94℃ 30 秒, 55℃ 30 秒, 72℃ 45 秒) 30 个循环, 然后 72℃ 10 分钟。第二个反应用 500ng pSYN-Fc-001 为模板 (如上所述), 进行以下循环: 94℃ 2 分钟; (94℃ 30 秒, 58℃ 30 秒, 72℃ 45 秒) 16 个循环, 然后 72℃ 10 分钟。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (分别为 ~ 495bp 和 299bp), 然后在 PCR 反应中与 25pmol 的引物 rc-Ig κ 信号序列 -F 和 RcFc-R 混合, 并如前所述, 在 58℃ 下退火, 进行 16 个循环。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (~ 772bp), 并将其克隆到 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中, 产生中间质粒 pSYN-Fc-007 (pGEM T-Easy/rc-Ig κ 信号序列 -Fc)。然后利用 HindIII 和 EcoRI 位点将整个 Ig κ 信号序列 -Fc 盒亚克隆到 PEE6. 4 (Lonza, Slough, UK) 或 pcDNA3. 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 哺乳动物表达载体中 (取决于所使用的系统), 以产生 pSYN-Fc-009 (pEE6. 4/IgK 信号序列 -Fc) 和 pSYN-Fc-015 (pcDNA3/IgK 信号序列 -Fc)。

[0467] 实施例 32 : 克隆 Ig κ 信号序列 -Fc N297A 构建物以单独制备未标记 FcN297A

[0468] 为将 Fc 的 Asn 297 (EU 编号) 突变成 Ala 残基, 使用以下引物:

[0469] N297A-F5' -GAGCAGTACGCTAGCACGTACCG-3' (SEQ ID NO :90)

[0470] N297A-R5' -GGTACGTGCTAGCGTACTGCTCC-3' (SEQ ID NO :91)。

[0471] 用 25pmol 的 rc-Ig κ 信号序列 -F 和 N297A-R 或者 N297A-F 和 rcFc-R, 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中进行两个 PCR 反应。两个反应均用 500ng pSYN-Fc-007 为模板, 进行以下循环: 94℃ 2 分钟; (94℃ 30 秒, 48℃ 30 秒, 72℃ 45 秒) 16 个循环, 然后 72℃ 10 分钟。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (分别为 ~ 319bp 和 475bp), 然后在 PCR 反应中与 25pmol 的引物 rc-Ig κ 信号序列 -F 和 rcFc-R 混合, 并如前所述, 在 58℃ 下退火, 进行 16 个循环。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (~ 772bp), 并将其克隆到 pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI) 中, 产生中间质粒 pSYN-Fc-008 (pGEM T-Easy/rc-Ig κ 信号序列 -Fc N297A)。然后利用 HindIII 和 EcoRI 位点将单独的整个 Ig κ 信号序列 -Fc 盒亚克隆到 PEE6.4 (Lonza, Slough, UK) 或 pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 哺乳动物表达载体中 (取决于所使用的系统), 以产生 pSYN-Fc-010 (pEE6.4/Ig κ 信号序列 -Fc N297A) 和 pSYN-Fc-016 (pcDNA3/Ig κ 信号序列 -Fc N297A)。

[0472] 上述这些 N297A 引物也与引物 rcFc-F 和 rcFc-R 及 pSYN-Fc-001 一起, 用作 PCR 反应的模板, 然后如上所述进行亚克隆, 以产生 pSYN-Fc-002 (pGEM T Easy/Fc N297A)。

[0473] 实施例 33: 将 EpoFc 和 Fc 克隆到单一质粒中成为双基因载体, 制备 EpoFc 野生型或 N297A 单体 - 二聚体杂合体, 以及表达

[0474] 将 EpoFc 和 Fc 构建物转染到单个质粒的另一种方法是将它们克隆到单一质粒 (也称为双基因载体, 如在 Lonza Biologics (Slough, UK) 系统中使用的载体) 中。按标准程序, 将 pSYN-Fc-002 的 RsrII/EcoRI 片段亚克隆到 pEE12.4 (Lonza Biologics, Slough, UK) 中的相应位点, 产生 pSYN-Fc-006 (pEE12.4/Fc N297A 片段)。质粒 pSYN-EP0-004 用作 PCR 反应的模板, 反应所用引物是实施例 25 的 Epo-F 引物以及以下引物:

[0475] EpoRsr-R :5' -CTGACGGTCCGCCAGGAGTTCCGGAGCTGGG

[0476] CACGGTGGGCATG TGTGAGTTTTGTGACCGCAGCGG-3' (SEQ ID NO :91)。

[0477] 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热循环仪中如上所述进行 PCR 反应, 16 个循环, 退火温度 55℃。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (~ 689bp), 并利用 HindIII/RsrII 限制位点将其克隆到 pSYN-Fc-006 中, 产生 pSYN-EP0-005 (pEE12.4/EpoFc N297A)。然后通过将 pSYN-Fc-010 的 NotI/BamHI 片段克隆到 pSYN-EP0-005 中的相应位点, 产生 pSYN-EP0-008 (pEE12.4-6.4/EpoFc N297A/Fc N297A), 从而构建 EpoFc N297A 单体 - 二聚体杂合体的双基因载体。

[0478] 还通过利用 RsrII 和 EcoRI 位点, 将 pSYN-Fc-001 的野生型 Fc 序列亚克隆到 pSYN-EP0-005 中, 产生 pSYN-EP0-006 (pEE12.4/EpoFc), 来创建野生型构建物。然后通过将 pSYN-Fc-009 的 NotI/BamHI 片段克隆到 pSYN-EP0-006 中的相应位点, 产生 pSYN-EP0-007 (pEE12.4-6.4/EpoFc/Fc), 从而构建 EpoFc 单体 - 二聚体杂合体的双基因载体。

[0479] 按 Lonza 生物试剂手册标准操作程序 (Lonza Biologics, Slough, UK) 的说明, 将各质粒转染到 CHOK1SV 细胞, 鉴定出阳性克隆, 使其适应无血清悬浮液, 并按其他单体-二聚体构建物的纯化方法进行纯化。

[0480] 实施例 34 : 人 IFN β Fc、带有 8 氨基酸接头的 IFN β -Fc N297A 和 Ig κ -Fc-6His 构建物的克隆

[0481] 使用 10ng 得自 Clontech (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) 的人基因组 DNA 文库作为模板, 并使用以下引物, 分离人 IFN β 及其天然信号序列:

[0482] IFN β -F H3/SbfI:

[0483] 5' -CTAGCCTGCAGGAAGCTTGCCGCCACCATGACCA

[0484] ACAAGTGTCTCCTC-3' (SEQ ID NO :92)

[0485] IFN β -R (EFAG) SalI:

[0486] 5' -TTTGTGACCGCAGCGCGCCGCGGAAGTCTGTTTCGG

[0487] AGGTAACCTGTAAG-3' (SEQ ID NO :93)。

[0488] 反向引物也用来在人 IFN β 序列的 3' 末端创建 8 氨基酸接头序列 (EFAGAAAV) (SEQ ID NO :94)。按厂商的标准方案使用 Expand HighFidelity System (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 在 RapidCycler 热循环仪 (Idaho Technology, Salt Lake City, UT) 中进行 PCR 反应。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化正确大小的 PCR 产物 (~ 607bp), 将其克隆到 TA 克隆载体 (Promega, Madison, WI) 中并测序。该构建物命名为 pSYN-IFN β -002。用 SbfI 和 SalI 消化 pSYN-IFN β -002, 并将其克隆到 pSP72 (Promega) 的 PstI 和 SalI 位点, 产生 pSYN-IFN β -005。

[0489] 用 SalI 和 EcoRI 消化纯化的 pSYN-Fc-001 (0.6 μ g), 并将其克隆到 pSYN-IFN β -005 的相应位点, 创建质粒 pSYN-IFN β -006, 其含有通过 8 氨基酸接头序列与人 Fc 连接的人 IFN β 。然后用 SbfI 和 EcoRI 消化 pSYN-IFN β -006, 将全长 IFN β -Fc 序列克隆到 pEDdC.sig 的 PstI 和 EcoRI 位点, 创建质粒 pSYN-IFN β -008。

[0490] 用 BspEI 和 XmaI 消化含人 Fc DNA 和单个氨基酸变化 (其中 297 位的天冬酰胺变成丙氨酸 (N297A; EU 编号)) 的 pSYN-Fc-002, 以分离含 N297A 突变的 ~ 365bp DNA 片段。将此 DNA 片段克隆到 pSYN-IFN β -008 的相应位点, 创建质粒 pSYN-IFN β -009, 其含带有 8 氨基酸接头的 IFN β -Fc 序列, 在表达载体 pED.DC 的 Fc 中具有 N297A 突变。

[0491] Ig κ 信号序列 -Fc N297A-6His 的克隆。用以下引物将 6xHis 标记添加到 Fc N297A 编码序列的 C 末端:

[0492] Fc GS-F: 5' -

[0493] GGCAAGCTTGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCC-3' (SEQ ID NO :95)

[0494] Fc. 6His-R:

[0495] 5' -TCAGTGGTGATGGTGATGATGTTTACCCGGAGACAGGGAG-3' (SEQ ID NO :96)

[0496] Fc. 6His-F :5' -GGTAAACATCATCACCATCACCCTGAGAATTCC

[0497] AATATCACTAGTGAATTCG-3' (SEQ ID NO :97)

[0498] Sp6+T-R :5' -GCTATTTAGGTGACACTATAGAATACTCAAGC-3' (SEQ ID NO :98)。

[0499] 用 50pmol 的 Fc GS-F 和 Fc. 6His-R 或者 Fc. 6His-F 和 Sp6+T-R, 按厂商的标准方案使用 Expand High Fidelity System (BoehringerMannheim, Indianapolis, IN), 在 MJ 热

循环仪中进行两个 PCR 反应。两个反应均用 500ng pSYN-Fc-008 作为 50 μ l 反应的模板, 用标准的循环条件来进行。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 (分别为 $\sim$ 780bp 和 138bp), 然后在 50 μ l PCR 反应中与 50pmol 的引物 Fc GS-F 和 Sp6+T-R 混合, 并使用标准的循环条件如前所述进行反应。用 Gel Extraction 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 凝胶纯化预期大小的条带 ($\sim$ 891bp), 并利用 HindIII 和 EcoRI 位点, 将其克隆到 pcDNA6 V5-His B 中, 产生 pSYN-Fc-014 (pcDNA6/Ig κ 信号序列 -Fc N297A-6His)。

[0500] 实施例 35 : IFN β Fc、IFN β -Fc N297A 同源二聚体和 IFN β -Fc N297A 单体 - 二聚体杂合体的表达与纯化

[0501] 将 CHO DG44 细胞涂布于 100mm 组织培养培养皿中, 让其生长至铺满培养皿 50% -60%。用共 10 μ g DNA 转染一个 100mm 培养皿。对于同源二聚体转染, 使用 10 μ g pSYN-IFN β -008 或 pSYN-IFN β -009 构建物; 对于单体 - 二聚体杂合体转染, 使用 8 μ g pSYN-IFN β -009+2 μ g pSYN-Fc-014 构建物。按厂商说明书用 Superfect 转染试剂 (Qiagen, Valencia, CA) 转染细胞。转染 48-72 小时后, 除去生长培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶使细胞从培养皿中释放出来, 并将其转移到装有选择培养基 (不加核苷但加入 5% 透析胎牛血清的 MEM Alpha) 的 T75 组织培养瓶中。单体 - 二聚体杂合体转染的选择培养基补充有 5 μ g/ml 杀稻瘟素 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。继续进行选择 10-14 天, 直至细胞开始生长良好, 稳定的细胞系得以建立。随后通过添加 10-50nM 氨甲蝶呤, 扩大蛋白质的表达。

[0502] 对于所有细胞系, 都是用约 2×10^7 个细胞接种 1700cm² 滚瓶 (Corning, Corning, NY) 中的 300ml 生长培养基。将滚瓶在 5% CO₂ 培养箱中 37°C 下温育约 72 小时。然后用 300ml 无血清生产培养基 (含 5 μ g/ml 人胰岛素的 DMEM/F12) 替换生长培养基。连续 10 天每天收集生产培养基 (条件培养基) 并在 4°C 下保藏。每次收集后向滚瓶中加入新鲜的生产培养基, 并将滚瓶放回培养箱中。在进行层析前, 先用 Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI) 的 SuporCap-100 (0.8/0.2 μ m) 过滤器澄清培养基。以下所有步骤均在 4°C 下进行。将澄清培养基加样到 A 蛋白琼脂糖凝胶, 用 5 倍柱体积的 1X PBS (10mM 磷酸盐, pH 7.4, 2.7mM KCl 和 137mM NaCl) 洗涤, 用 0.1M 甘氨酸 (pH 2.7) 洗脱, 然后用 1/10 体积的 1M Tris-HCl (pH 8.0), 5M NaCl 中和。同源二聚体蛋白通过 Superdex 200 Prep Grade 尺寸排阻柱, 用 50mM 磷酸钠 (pH 7.5), 500mM NaCl, 10% 甘油洗脱, 来进一步纯化。

[0503] 因为含有 IFN β Fc N297A: IFN β Fc N297A 同源二聚体、IFN β FcN297A: Fc N297A His 单体 - 二聚体杂合体和 Fc N297A His: Fc N297A His 同源二聚体的混合物, 故进一步纯化单体 - 二聚体杂合体蛋白。将 50mM 磷酸钠 (pH 7.5), 500mM NaCl 中的物料加样到镍螯合柱。加样后, 用 50mM 咪唑的 50mM 磷酸钠 (pH 7.5), 500mM NaCl 溶液洗涤柱, 用梯度为 50-500mM 咪唑的 50mM 磷酸钠 (pH 7.5), 500mM NaCl 溶液洗脱蛋白质。收集与 UV 检测器上的洗脱峰对应的级份, 用 SDS-PAGE 进行分析。第一个峰的级份含 IFN β Fc N297A: Fc N297A His 单体 - 二聚体杂合体, 而第二个峰含 Fc N297A His: Fc N297A His 同源二聚体。集中所有含单体 - 二聚体杂合体但不含 Fc 同源二聚体的级份, 直接加样到 Superdex 200 Prep Grade 尺寸排阻柱, 用 50mM 磷酸钠 (pH 7.5), 500mM NaCl, 10% 甘油洗脱。收集含 IFN β -Fc N297A: FcN297A His 单体 - 二聚体杂合体的级份, 并在 -80°C 下保藏。

[0504] 实施例 36 : IFN β 抗病毒活性试验

[0505] 用 CPE (致细胞病变效应) 试验确定 IFN β 融合蛋白的抗病毒活性 (IU/ml)。将 A549 细胞涂布于含生长培养基 (补充有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 2mM L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640) 的 96 孔组织培养板, 在 37°C、5% CO₂ 下培养 2 小时。用生长培养基稀释 IFN β 标准品和 IFN β 融合蛋白, 并加到细胞中, 试验重复三次, 在 37°C、5% CO₂ 下温育 20 小时。温育后, 除去各孔的所有培养基, 用生长培养基稀释脑心肌炎 (EMC) 病毒, 并将其加入到各孔中 (3000pfu/ 孔), 但对照孔不加入。将培养板在 37°C、5% CO₂ 下温育 28 小时。用 10% 冷三氯乙酸 (TCA) 固定活细胞, 然后用磺基罗丹明 B (SRB) 按公开的方案 (Rubinstein 等, 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82, 1113) 染色。SRB 染料用 10mM Tris pH 10.5 溶解后, 用分光光度计在 490nm 处读数。通过将样品的活性与公知的标准曲线 (范围在 10-0.199IU/ml) 比较, 对样品进行分析。结果在下表 8 中显示, 表明单体-二聚体杂合体抗病毒活性提高。

[0506] 表 8: β 干扰素抗病毒试验: 同源二聚体与单体-二聚体杂合体

[0507]	蛋白质	抗病毒活性 (IU/nmol)	标准偏差
	IFN β -Fc 8 氨基酸接头同源二聚体	4.5×10^5	0.72×10^5
	IFN β Fc N297A 8 氨基酸接头同源二聚体	3.21×10^5	0.48×10^5
	IFN β Fc N297A 8 氨基酸接头:Fc His 单体-二聚体杂合体	12.2×10^5	2×10^5

[0508] 实施例 37: 将带有 8 氨基酸接头的 IFN β Fc 同源二聚体和单体-二聚体杂合体给予猕猴

[0509] 对于肺部给药, 用 Aeroneb Pro™ (AeroGen, Mountain View, CA) 喷雾器配制 IFN β Fc 同源二聚体或 IFN β Fc N297A 单体-二聚体杂合体 (两者均带有 8 氨基酸接头) 的 PBS (pH 7.4), 0.25% HSA 气雾剂, 并结合 Bird Mark 7A 呼吸器, 通过气管内导气管 (模拟正常的潮气呼吸) 给予麻醉的首次试验的猕猴。在不同的时间点抽取血样, 所得血浆中含 IFN β 的蛋白质的量用人 IFN β 免疫测定仪 (R&D Systems, Minneapolis, MN) 进行定量。药物动力学参数用 WinNonLin 软件进行计算。表 9 显示用 IFN β Fc N297A 单体-二聚体杂合体或 IFN β Fc 二聚体处理的猕猴的结果。

[0510] 表 9: 将 IFN β Fc N297A 单体-二聚体杂合体和 IFN β Fc 同源二聚体给予猕猴

[0511]

蛋白质	猕猴 #	途径	大约沉积 剂量 ¹ ($\mu\text{g/kg}$)	C _{max} (ng/ml)	AUC (hr*ng/ml)	T _{1/2} (hr)	平均 T _{1/2} (hr)
IFN β Fc N297A 单体 -二聚体杂 合体	CO7308	肺部	20	23.3	987.9	27.6	27.1
	CO7336	肺部	20	22.4	970.6	25.6	
	CO7312	肺部	20	21.2	1002.7	28.0	
IFN β Fc 同 源二聚体	CO7326	肺部	20	2.6	94.6	11.1	11.4
	CO7338	肺部	20	5.0	150.6	11.7	

[0512] ¹ 基于 γ 闪烁照相测定的喷雾化剂量的 15% 沉积部分

[0513] 给予猕猴的带 8 氨基酸接头 IFN β Fc 的药物动力学在图 15 中显示。该图比较了 IFN β Fc 同源二聚体和 IFN β Fc N297A 单体 - 二聚体杂合体在猴中肺部单剂量给药后的情况。用单体 - 二聚体杂合体处理的猕猴比用同源二聚体处理的猕猴血清水平明显更高。

[0514] 还用新蝶呤免疫测定法 (MP Biomedicals, Orangeburg, NY) 分析血清样品中的新蝶呤水平 (IFN β 活性的一种生物标记)。分析结果在图 16 显示。该图比较了 IFN β -Fc 同源二聚体和 IFN β -Fc N297A 单体 - 二聚体杂合体对新蝶呤的刺激作用。可以看出, 用 IFN β -Fc N297A 单体 - 二聚体杂合体处理的猕猴中检测出的新蝶呤水平比用 IFN β -Fc 同源二聚体处理的猕猴明显更高。

[0515] 在说明书和权利要求书中用以表示分量、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下都被术语“大约”修饰。因此, 除非另外说明, 在说明书及随附的权利要求书中提出的数字参数是近似值, 可根据通过本发明获得的所需性质而改变。并不是企图限制等价原则在权利要求书的范围中的应用, 但至少各数字参数应按有效数字和常规的舍入方法来理解。

[0516] 本文引用的所有参考文献通过引用整体结合到本文中, 且对于所有的目的, 它们结合到本文中的程度如同各个单独的出版物或专利或专利申请被明确、单独地指明为对于所有目的通过引用整体结合的程度。如果通过引用结合到本文的出版物或专利或专利申请与本说明书中的公开内容相抵触, 则规定本说明书取代和 / 或优先于任何此类抵触性资料。

[0517] 本领域技术人员能明白, 可不偏离本发明的精神和范围, 对本发明作出许多修改和变化。本文描述的具体实施方案只以示例的方式提供, 不以任何方式表示限制。要指明的是, 本说明书和实施例应只被认为是示例性的, 本发明的真正范围和精神由以下权利要求书来说明。

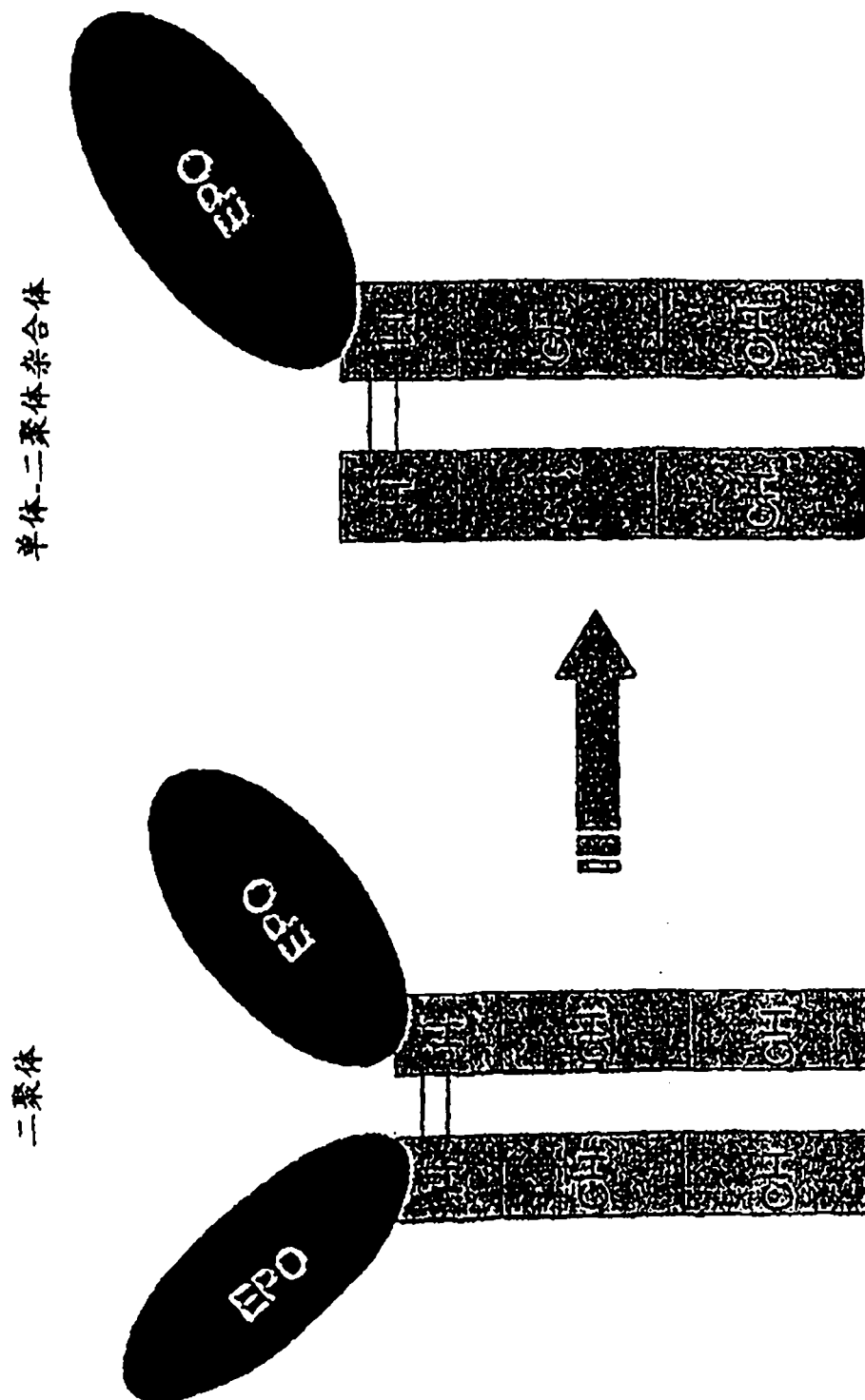


图 1

VII 因子-Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

```

1  MVSQALRLLC LLLGLOGCLA AVFVTQZEAE GVLHRRRRAN AFLEELRPGS
51 LERECKEEQC EFEEAREIPK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCS
101 DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC
151 RCHEGYSLLA DGVSCPTVE YPCGKIPILE KRNASKPQGR IVGGKVCCKG
201 ECPWQVLLLV NGAQLCGGTL INTIWWVSAA HCFDKIKNWR NLIJAVLGEHD
251 LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVPGTTNHD IALLRLHQPV VLTDHVVPCL
301 LPERTPSERT LAFVRFSLVS GNGQLLDGGA TALELNVLVN PRLMTOQCLQ
351 QSRKVGDSFN ITEYMFCAQY SDGSKDSCKG DGGGPHATHY RGTWYLTGIV
401 SWGQGCATVG HFGVYTRVSG YIEMLOKLMR SEPRPGVLLR APFPDKTHTC
451 PCCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKPN
501 WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NETYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK
551 ALPAPIEKT ISKAKGQPRE QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD
601 IAVEWEENGO PENNYKTPP VLDSGSGFLL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS
651 VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K

```

图 2A

IX 因子-Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

```

1  MQRVNMIMAE SPGLITICLL GYLLSAECTV FLDHENANKI LNRPKRYNSG
51 KLEEFVQGNL ERECMEEKCS FEEAREVFEN TERTTEFWKQ YVDGDQCEBN
101 PCLNGGSCKD DINSYECWCP FGFEGKNCCL DVTCNIKNGR CEOFCKNSAD
151 NKVVCSCCTEG YRLAENQKSC EPAVPFPCGR VEVSQTSKLT RAETVFPDND
201 YVNSTEAEET LDNITQSTQS FNDFTRVVGG EDAKPGQFPW QVVLNGKVDA
251 FCGGSIVNEK WIVTAAHCEV TGVKITVAVG EHNIETETHT EQKRVIRII
301 PHHYNAIAIN KYNHPIALLE LDEPLVLNSY VTFICIADEK YTNIFLKFGS
351 GYVSGWGRVT HKGRBALVLQ YLAVPLVDRA TCLRSTKFTI YNNMFCAGFH
401 EGGRDSCQGD SGGPHVTEVE GTSFLTGIIS WGEECAMK GK YGIYTKVSRY
451 VNWIKEKTKL TEFAGAAAVD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL
501 MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR
551 VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTIISKAKG QPREPOVYTL
601 PPSRDELTON QVSLTCLVKG FYPEDIAVEW ESNGQPENNY KTPPVLDSD
651 GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

图 2B

IFN α -Fc 氨基酸序列(8 氨基酸接头)(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAND
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMXEDSIL AVRKYFQRI
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLBTNL QESLRSKEEF AGAAAVDKTH
201 TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTFEVTCVVV DVSHEDPEVK
251 FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
301 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP
351 SDIAVEWESN QPENNYKTT PPVLDSDGSG FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS
401 CSVMHEALHN HYTQKSLSL PGK

```

图 2C

IFN α -Fc Δ 接头氨基酸序列(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCXSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF OKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEDK THTCPPCPAP
201 ELGGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
251 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
301 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PSRDELTKNQ VELTCLVKGF YPSDIAVEWE
351 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMEAL
401 HNHYTQKSLS LSPGK

```

图 2D

FlagFc 氨基酸序列(下划线为信号肽)

```

1  METDTLLLWV LLLWVPGSTG DDYKDDDDKD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF
51 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
101 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP IEKTISKAKG
151 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPDIAVEW ESNGQPENNY
201 KTTTPVLDS GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMEAL LHNHYTQKSL
251 SLSPGK

```

图 2E

Epo-CCA-Fc 氨基酸序列(下划线为 K^b 信号肽, 粗体为酸性卷曲螺旋)

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGSRAPPRLI CDSRVLQRYL LEAKEAENIT
51 TGCAEHCSLN ENITVPDTKV NPYAWKRMV GQOAVEVMQG LALLSEAVLR
101 GQALLVNSSQ PWEFLQLHVD KAVSGLRSLT TLLRALGAQK EAI SPPDAAS
151 AAPLRTITAD TFRKLFRVYS NFLRGKLY TGEACRTGDR EFGEYQALE
201 KEVAQLEAEN QALEKEVAQL EHEGGCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
251 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
301 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQ REPQVYTLPP
351 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSGGS
401 FFLYSKLTV KSRWQQGNVF SCSVMEALH NHYTQKSLSL SPGK

```

图 2F

CCB-Fc 氨基酸序列(下划线为 K^b 信号肽, 粗体为碱性卷曲螺旋)

```

1  MVPCTLLLLL AAALAPTQTR AGEPGGEYQA LXXXVAQLXA KNQALXXXVA
51 QJXHKGGGPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVDVSHEDP
101 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
151 XVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
201 FYPSDIAVEW ESNGOPENNY KTPFPVLDSD GEFFLYSKLT VDKSRWQGN
251 VFSCSVMHRA LHNHYTQKSL SLSPGK

```

图 2G

CysFc 氨基酸序列(下划线为 hIFN α 信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCPFCFAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM
51 ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV
101 VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREQVYTLF
151 PSRDELTKNQ VSLTCLVKG FPSDIAVEWE SNGOPENNYK TTPFPVLDSDG
201 SFFLYSKLTV DKSRWQGNV FSCSVMHREAL HNHYTQKSL LSPGK

```

图 2H

IFN α GS15 Fc 蛋白质序列(下划线为信号肽)

```

1  MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRLSLF
51 SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIFVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD
101 ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGTE TPLMKEDSIL AVRKYFORIT
151 LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKEGG GGSGGGSGG
201 GGSDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
251 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
301 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
351 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPFV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
401 QQGNVVFSCV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

图 2I

EpoFc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头)

```

1  MGVHECPAWL WLLLSLLSLP LGLFVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE
51 NITTGCAEHC SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAQEV WQGLALLSEA
101 VLRGQALLVN SSQPWEPLQL HVDKAVSGLR SLTTLLRALG AQKEAISPPD
151 AASAAFLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL KLYTGEACRT GDREFAGAAA
201 VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLNISRTPEV TCVVVDVSHE
251 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
301 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
351 KGFYPSDIAV EWESNGOPEN NYKTTPFVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
401 GNVVFSCVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

```

图 2J

VII 因子-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

atggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggtgcctggctgcag
tcttcgttaacccaggaggaagccacggcgctcctgcacggcgccggcgcccaacgcgttctt
ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggag
gcccggggatcttcaggagcggaggaggagcgaagctgttctggatttcttacagtgatgggg
accagtgctgcctcaagtcctatgccagaatgggggctcctgcagggaacagctccagtcctatat
ctgcttctgcctccctgccttcgaggggcgggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgac
tgtgtgaacgagaaacggcggtgtgagcagtaactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcct
gtcgggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgtcctgcacacccacagttgaata
tccatgtggaaaaatccctattctagaaaaagaaatgccagcacaaccccaaggccgaattgtg
gggggcaagggtgtgccccaaaggggagtgctccatggcagggtcctgttgttggtgaatggagctc
agtrgtgtggggggacccctgatcaacacccatctgggtggtctccgcggcccaactgttcgacaa
aatcaagaactggagggaacccctgatcggggtgtctgggcgagcagacccagcgagcagcagggg
gatgagcagagccggcggggtggcgagggtcatcatcccagcagctacgtcccgggcaccca
accacgacatcgcgctgtccgcctgcacacagcccggtcctcactgaccatgtggtgccccct
ctgcctgcccgaacggagcgttctctggaggagcagctggccttcgtgcgcttctcattggtcagc
ggctggggccagctgtggaccgtggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgcccc
ggctgatgaccacgggactgcctgcagcagtcacgggaaggtagggagactccccaaatatcacgga
gtacatgttctgtgcccgtactcggtggcagcaaggactcctgcagggggacagtgagggc
ccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgacgggcacgtcagctggggccagggt
ggcgaaccgtgggcccacttgggggtgtacacagggtctccagtagacatcgagtggctgcaaa
gctcatgcgtcagagccacgcccagggtcctcctgcgagcccatttcccgaacaaactcac
acgtgcccgcgtgcccagctccggaactgctgggaggaccgtcagctctcctcttccccca
aacccaagggaacccctcatgatctccgggaacccctgagggtcacatgcgtgggtggagggtgag
ccacgaaggacccctgagggtcagttcaactggtagctggacggcggtggagggtgcataatgccag
scaaagccgcgggaggagcagtagaacagcagtagcgtggtcagcgtcctcacogtccctgc
accaggactggctgaatggcaggagtagaagtgcaagggtctccaacaaaggccctcccagcccc
catcgagaaaaacccatctccaaagccaaaggggcagccccgagaaaccacagggtgtacacccctgcc
ccatccrgggatgagctgaccaaagaaacagggtcagcctgacccctgacctggtcaagggttctatc
ccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggaggaacaaactacaagaccacgcc
tcccgtgttggactccgacgggtccttcttcccctacagcaagctcacccgtggacaaggagcagg
tggcagcagggggaacgtcttctcstgctccgtgatgcatgagggtctgcacaaacccactacacgc
agaagagcctctccctgtctccgggtaatga

图 3A

IX 因子-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为前肽)

atgcagcgcggtgaacatgatcatggcagaatcacccggcctcatcaccatctgccttttaggat
atctactcagtgctgsatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccacaaaattctgaatcg
gccaaaggaggtataattcaggtaaatggaaaggtttgttcaagggaaccttgagagagaatgt
atggaaagaaagtgtagttttgaaagacagagaggtttttgaaaacactgaaagaaacactg
aattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtagtccaatccatgtttaaatggcggcag
ttgcaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgagggaagaaactgt
gaattagatgtaaatgttaacattagaatggcagatggagagcaggttttgtaaaaatagtgctg
atnacaagggtgggtttgctcctgtactgagggtatcgacttgcagaaaaccagaagtccgtga
accagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcacaaacttctaagctcaccctgtct
gagcctgtttttcctgatgtggaactatgtaaatctactgaugctgaaaccattttggataaca
tcactcaaagcacccaatcatttaagtacttcaactcgggttggttggtggagagatgccaaacc
aggtcaattcccttggcaggttggtttgaatggttaagttgatgcattctgtggaggtctctac
gttaatgaaaaatggatttgttaactgctgccactgtgttgaactgggtgttaaattacagttg
tcgcaggtgaaacataatataggaggacagaaacatacagagcaaaagcgaatgtgattcgaat
tattcctcaccacaactacaatgcagctatttaataagtaacaacatgacattgcccttctggaa
ctggargaaaccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcatgtgcsagggaataca
cgaacatcttctcaatttggatctggctatgtaagtggctgggggaagagctctccacaaagg
gagatcagctttagttcttcagtaaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcga
tctccaaagtccaccatctatacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagatt
catgtcaaggagatagtgggggaacccatgttactgaagtggaaagggaaccagtttcttaactgg
aattattagctgggggtgaagagtgctgcaatgaaggcgaatatggaaatatataccaaggtatcc
cggatgtcaactggatttagggaaaaaacaaagctcaactgaattcgccggcgccgctgcgggtcg
acaaactcacacatgccaccgtgccagcaactgaactcctggggggacagtcagttctcct
cttcccccaaaaacccaaaggacacccatcatgatctccgggacccctgaggtcacatgcgtggtg
gtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct
caccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgcagaggtctccaaacaaagcc
ctcccagcccccatcgagaaacacatctccaaagccaaagggaagccccgagaacacacaggtgt
acacccctgcccccatcccgggatgagctgaccaaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaa
aggtctctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccggagaaacactac
aagaccacgctcccgtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcataagggtctgcacaa
ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggttaaatga

图 3B

IFN α -Fc 核苷酸序列(8 氨基酸接头)

atggccttgacctttgctttactggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcaagctcctctg
 tgggctgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
 gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaggacagacatgactttggatttccccaggag
 gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
 tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
 ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatacagggggtgggggtg
 acagagactccctgatgaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
 ctctctatctgaaagagagaaatacagcccttgtgctgggagggttgtcagagcagaaatcat
 gagatctttttcttltgtcaacaaacttgcaagaaagtttaagaaagttaaggagaagaattcgccggc
 gccgtgagggtgcagacaabctcacacatgccacccgtgccagccctgaactcctggggggac
 cgtcagctctcctcttcccccaaaaccgaaggacacctcatgatctcccggaaccttgagggt
 cacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgagggtcaagttcaactggtacgtggac
 gggtggagggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcgtacaaagcagcgtaccgtg
 tggtcagcgtcctcacgctcctgtcacaggagctggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggt
 ctccaaagagccctccagccccctcgagaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
 gaaccacaggtgtacacctgcccccatcccggtgagctgaaccaagaaccaggtcagcctga
 cctgctggtcaaaggcttctatccagcgaactcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc
 ggagacaaactacaaagaccagcctccggtgttggactccgacggctccttctcctctacagc
 aagctcacgctggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcag
 aggtctgcacaaccactacacgcagaaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

图 3C

IFN α -Fc Δ 接头核苷酸序列

atggccttgacctttgctttactggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcaagctcctctg
 tgggctgtgatctgcctcaaacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
 gatgaggagaatctctcttttctcctgcttgaggacagacatgactttggatttccccaggag
 gagtttggcaaccagttccaaaaggctgaaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
 tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatgagaccctcctagacaaatt
 ctacactgaactctaccagcagctgaatgacctggaagcctgtgtgatacagggggtgggggtg
 acagagactccctgatgaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
 ctctctatctgaaagagagaaatacagcccttgtgctgggagggttgtcagagcagaaatcat
 gagatctttttcttltgtcaacaaacttgcaagaaagtttaagaaagttaaggagaagaatactcac
 acgtgccggcgtgccagctccggaaactgctgggcggaccgtcagctctcctcttcccccaaa
 aaccgaaggacacctcatgatctcccggaaccttgagggtcacatgcgtggtggtggacgtgag
 ccacgaagaccctgagggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgocaa
 accaaagccggggaggagcgtacaaagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaagctcctgc
 accagagctggctgaatggcaaggagtacaaagtgcagggtctccaaagagccctccagcccc
 catcgagaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccaaggtgtacacctgccc
 ccatcccggtgagctgaaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctatc
 ccagcgaactcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaaagaccagcc
 tccgtgttggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcacgctggacaagagcagg
 tggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagagggtctgcacaaccactacacgc
 aggaagcctctcctgtctccgggtaaatga

图 3D

FlagFc 核苷酸序列

atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtagc
 actacaaggacgacgatgacaaggacaaactcacacatgccacagtgcccagctccggact
 cctggggggaccgtcagtcctcctctcccccaaaacccaaggacacccctcatgctctccgg
 acccctgagggtcacatgctgggtgggtggacgtgagccacgaagacccctgagggtcaagttcaact
 ggtagctggacggcgtggagggtgcatatgccaagacaaagccgcggggaggagcagtagaacag
 cacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcacctcctgacccaggactggctgaatggcaaggagtag
 aagtgcaagggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaccatctccaagccaaag
 ggagccccgagaaaccacaggtgtacacccctgcccccatccgggatgagctgaccaaagaaaca
 ggtcagcctgacctgctgggtcaaaaggcttctatccagcgaactcgccgtggagtgaggagagc
 aatgggcggccggagaaacaactacaagaaacagcctccgtgttggactccgaaggctccttct
 tctctacagcaagctcacctggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctc
 cgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaagagcctctccctgtctccgggtaaa
 tga

图 3E

Epo-CCA-Fc 核苷酸序列(下划线为 K^b 信号肽, 粗体为酸性卷曲螺旋)

atggtagcctgacacactgctcctgctgttggcggccgcgcctggctccgactcagaaccgcgcgcg
 gctctagagccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctgcagaggtacctcttggaggc
 caaggaggccggagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgagaatatcact
 gtcccagacaccaaagtttaatttctatgectggaagaggatggagggtcgggacagcaggccgtag
 aagtcctggcagggcctggccctgctgtcggagagctgtcctgaggggccagggccctgttggtaa
 ctcttcccagccgtgggagccctgacgtgcatgtggataaagccgtcagtgggccttcgcagc
 ctcaaccaactctgcttcgggctctgggagccacagaaggaaagccatctccctccagatgcggcct
 cagctgctccactccgaacaatcactgctgacacttccgcacaaactcttccgagtctactccaa
 tttcctccgggggaagctgaagctgtacacaggggaggcctgcagggaaccggtgacaggggaattc
 ggtggtagtagcaggccctggaggaaggagggtggccagctggaggccgagaaccaggccctgg
 agaaggagggtggccagctggagcagagggtggtaggtccgcacccagagctgctgggcggacc
 gtcagtccttctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatgatctccggacccctgagggtc
 acatgctggtggtaggtggacgtgagccacgaaggaacctgagggtcaagttcaactggtacgtggacg
 gcgtggagggtgcatatgccaagacaaagccgcggggaggagcagtagaacagcagcgtaccgtgt
 ggtcagcgtcctcacctcctgacccaaggactggctgaatggcaaggagtagcaagtgcagggtc
 tccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaccatctccaagccaaaggggcagcccccgag
 aaccacagggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgacaaagaaaccagggtcagcctgac
 ctgctggtagcagggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
 gagaacaaactacaagaccagcctccgtgttggactccgaaggctccttcttctctacagca
 agctcacctggacaaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatga
 ggctctgcacaaccactacacgcagaaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图 3F

CCB-Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为碱性卷曲螺旋)

atggtaccgtgcacactgctcctgctgttggcggccgcccctggctccgactcagaacccgcgcgcg
gcgaatttcggtgggtgagttaccaggccctgagagagagaggtggcccgctgaaggccaagaaacca
ggccctgaagaagaagggtggcccgactgaagcacaaggcgggcgggcccgccccagagctcctg
ggcggaccgtcagtccttcctcttccccccaaacccaaaggacacccctcatgatctcccggaacc
ctgaggtcacatgcgtgggtgggtggacgtgagccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggta
cgtggacggcgtggaggtgcataatgcccagacaaagccgcgggaggagcagtaacaacagcacg
taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagt
gczaggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaccatctccaaggccaaggggca
gccccgagaaccacaggtgtacacccctgcccccatcccgggatgagctgaaccaagaaccaggtc
agcctgacctgacctgggtcaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatg
ggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccggtgttggactccgacggctccttcttctct
ctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaagctcttctcatgctccgtg
atgcatgaggtctctgcacaaccactacacgcagagagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图 3G

CysFc 核苷酸序列(下划线为 hIFN α 信号肽)

atggccttgacctttgctttactgggtggccctcctggtgctcagctgcaagtcagctgctctg
tgggctgcccgcgctgcccagctccggaactgctgggcggaccgtcagtccttctctcccccc
aaaacccaaggacacccctcatgatctcccggaacccctgaggtcacatgcgtgggtgggtgacgtg
agccacgaagacccctgaggtcaagttcaactggtaagtgacggcggtggaggtgcataatgcca
agacaaagccgcggggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcct
gcaccaggactggctgaatggcaaggagtaacaagtgcaaggctctccacaaagccctccagcc
cccatcgagaaaccatctccaagccaaaggcgagcccccagaaaccacaggtgtacacccctgc
cccatcccggtatgagctgacaaagaaccaggtcagcctgacctgctgggtcaaggcttcta
tcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaaactacaagaaccacg
cctcccggtgttggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagca
gggtggcagcaggggaaagctcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccactacac
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga

图 3H

IFN α GS15 Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽)

atggccttgacctttgctttactggtagccctcctggctcctcagctgcaagtcaagctgctctg
tgggctgtgatctgctcasacccacagcctgggtagcaggaggaccttgatgctcctggcaca
gatgaggagaatctctctttctcctgcttgaaggacagacatgactttggatttccccaggag
gagtttggcaaccagttccaaaggctgaaccatccctgtcctccatgagatgatccagcaga
tcttcaatctcttcagcacaaaggactcatctgctgcttgggatggagacctcctagacaaatt
ctscactgaactctaccagcagctgaatgacctggaggcctgtgtgatacagggggtgggggtg
acagagactccctgatgaaggaggactccattctggctgtgaggaaatacttccaaagaatca
ctctctatctgaagagagagaatacagcccttgtgcctgggagggttgtcagagcagaaatcat
gagatcttttctttgtcaacaaacttgcaagaaagttaagtagtagggagggtggcgccgga
tccgggtggaggcgggtcggcggttggaggagcgacaaactcacacgtgcccgcctgcccag
ctccggaaactgctgggcgggacgtcagttctctcttcccccaaaacccaaaggacacctcat
gatctccgggaccttgagggtcacatgcgtggtggtggagctgagccacgaaagacctgagggtc
aagttcaactggtaagtggaaggcgtggagggtgcatatgccaagacaaagccgcggggaggc
agtaaaacagcagctacgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactgggtgaatgg
caaggagtagaagtgaagggtctccaaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaccatctcc
aaagccaaagggcagcccgagaaacacagggtgtacacctgcccccatccgggatgagctga
ccaagaaccagggtcagcctgacctgcctggtcaagggttctatcccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcaatgggcagccgggagaaactacaagaccaaagccctccgtgttgactccgac
ggctccttcttctctacagcaagctcacctggagcaagagcaggtggcagcaggggaacgtct
tctcctgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaagacctctccctgtc
tccgggtgaatga

图 3I

EpoFc 核苷酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头)

atgggaagtgcacgaatgtcctgcctggctatggcttctcctgtccctgctgtcgctccctctgg
gcctcccagtcctgggcgccccaccacgcctcatctgtgacagccgagtcctggagaggtacct
cttggaggccaaaggaggccgagaatatcacgacgggctgtgctgaacactgcagcttgaatgag
aatatcaactgtccagacacaaagttaatcttatgcctggaagaggatggagggtcgggcagc
aggccgtagaagtctggcaggccctggccctgctgtcggaaagctgtcctgcggggccaggccct
gttgggtcaactcttcccagccgtgggggcccctgcagctgcatgtggataaagccgtcagtggt
cttcgcagcctcaccactctgcttcgggctctgggagccagaaaggaagccatctccctccag
atggggcctcagctgtccactccgaacaaatcaactgctgacacttccgcacactcttccgagt
ctactccaatcttctccggggaaagctgaagctgtacacaggggaggccctgcagaaacaggggac
agagagtgcgcgggcgcgctgagggtgacaaactcacacatgccacccgtgccagctccgg
aactcctgggcggaccgtcagttcttcttcccccaaaacccaaaggacacctcatgatctc
ccggacctctgagggtcacatgcgtggtggtggagctgagccacgaagacctgagggtcaagttc
aactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaaagacaaagccgcggggaggagcagta
acagcagctaccgtgtggtcagcgtcctcacgtcctgcaccaggactggctgaatggcaggga
gtacaagtgcagggtctccaaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaccatctccaaagcc
aaagggcagccccgagaaccacagggtgtacacctgcccccatccgggatgagctgacaaaga
accaggtcagcctgacctgctggtcaagggttctatcccagcgacatcgccgtggagtgga
gagcaatgggcagccggagaaacaaactacaagacaaagccctccgtgttgagctccgacggctcc
ttcttctctacagcaagctcacctggagcaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcat
gctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaaagacctctccctgtctccggg
tgaatga

图 3J

Fc-MESNA 的氨基酸序列 (在 pTWIN1 载体中从 NEB 生产; 当 Fc-内含肽-CBD 用 MESNA 从几丁质珠洗脱时, 产生在最后的 Phe 残基上具有 C 末端硫酯的以下蛋白质)

```

1  MGIEGRGAAA VDTSHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
51  TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
101 HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
151 KNQVSLTCLV KGFYPEDIAV EWESNGOPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK
201 LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGF

```

图 5a

pTWIN1 中 Fc CDS 的核苷酸序列 (最后的 F 残基 ttt 直接连接 pTWIN1 中的 Mxe GyrA 内含肽 CDS)

```

atgggcattgaaggcagagggcgccgctgcggctcgatactagtcaacacatgcccaaccgtgccag
cacctgaactcctggggggaccgtcagttctctcttccccccaaaccacaggaacacctcat
gatctcccggaacctgaggtcacatgcgtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtc
aagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagc
agtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacggtcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctcccgcccccatcgagaaaaccatctcc
aaagccaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctga
ccaagaaccaggctcagcctgacctgcctggtaaggtctctatcccagcgacatcgccgtgga
gtgggagagcaatgggcggcggggaacaaactacaagaccacgcctcccggtgtggactccgac
ggctccttcttctctacagcaagctcacctggacaagagcaggtggcagcagggggaacgtct
tctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagagaaggtctctccctgtc
tccgggtttt

```

图 5b

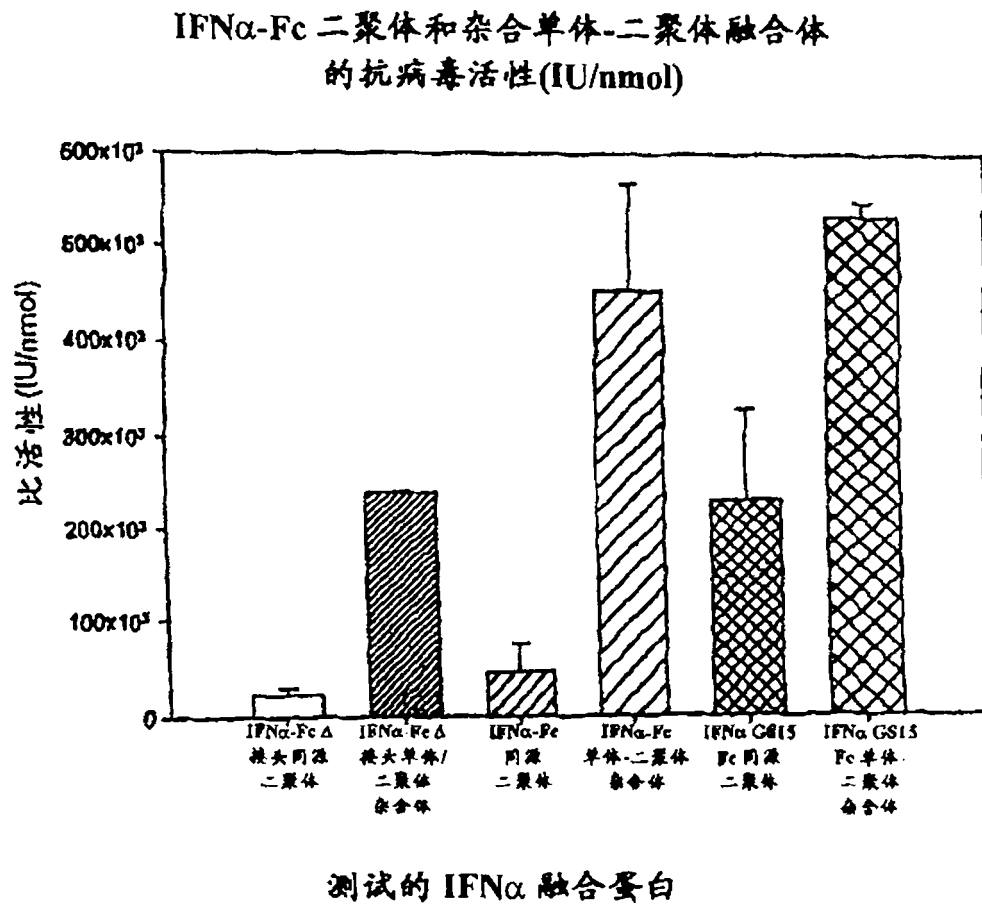


图 6

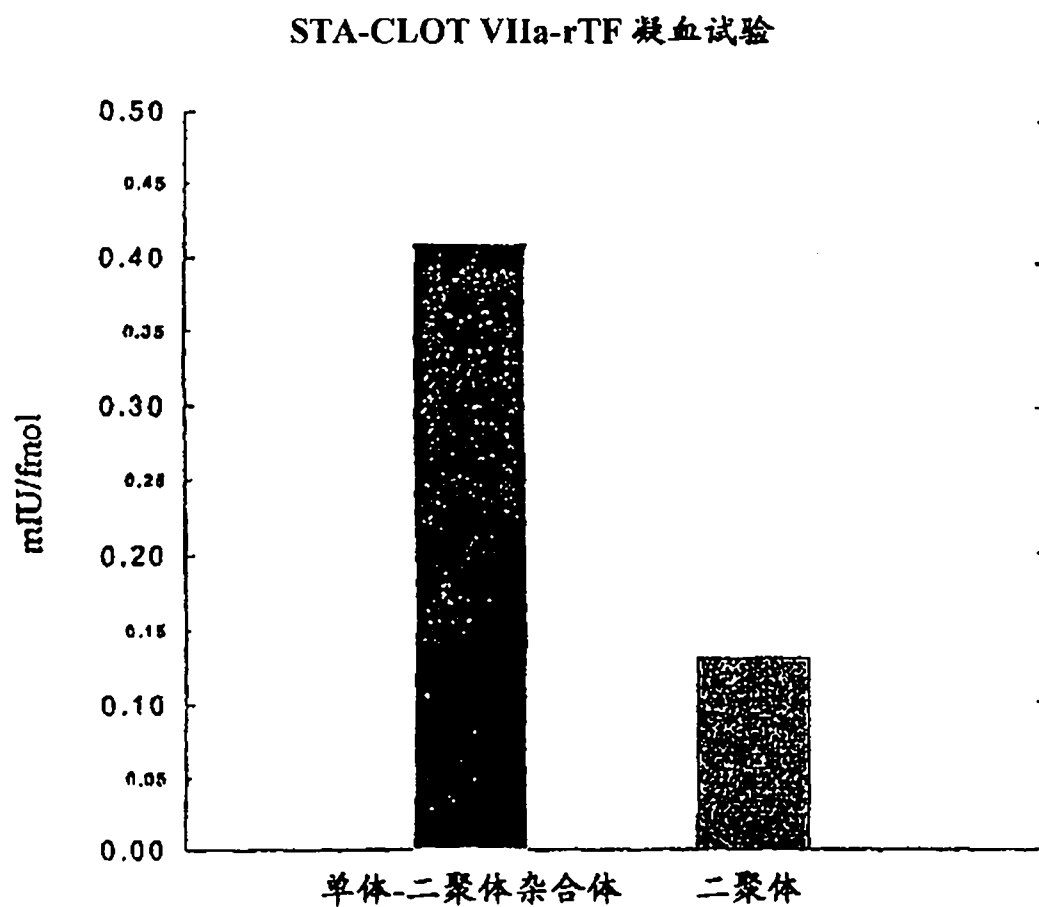


图 7

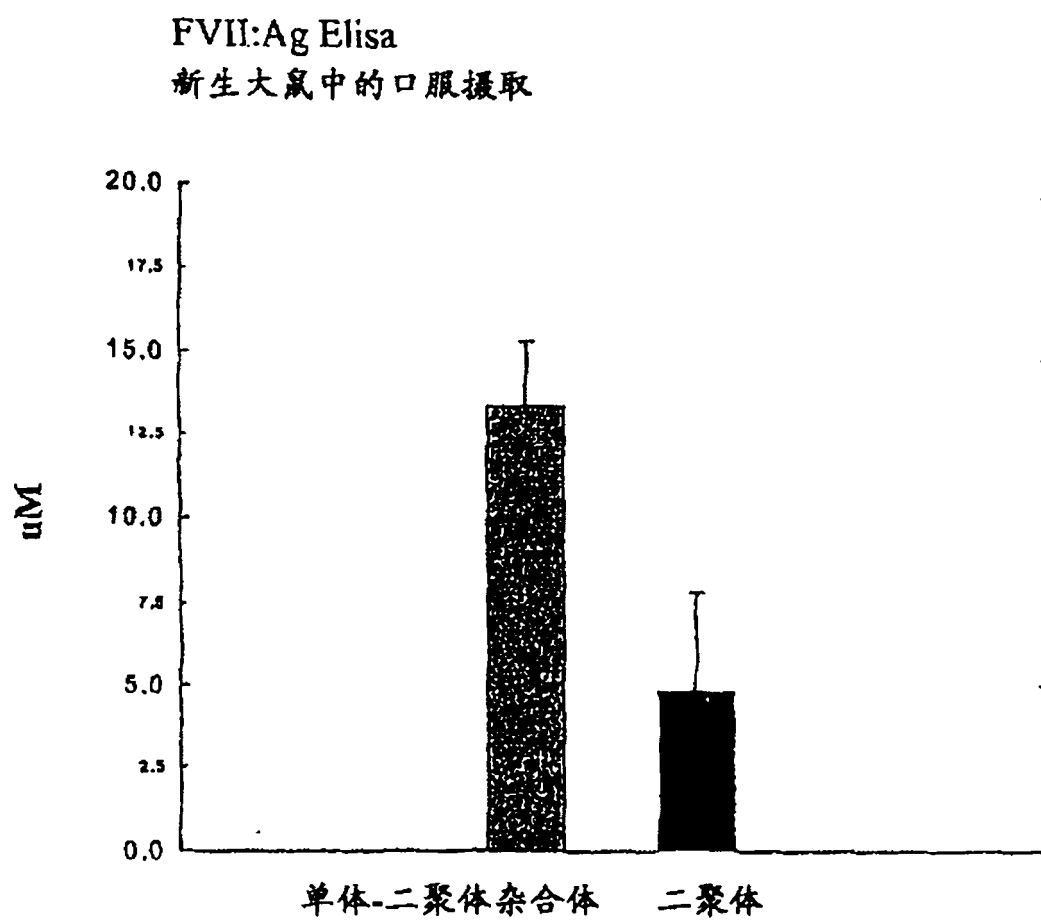


图 8

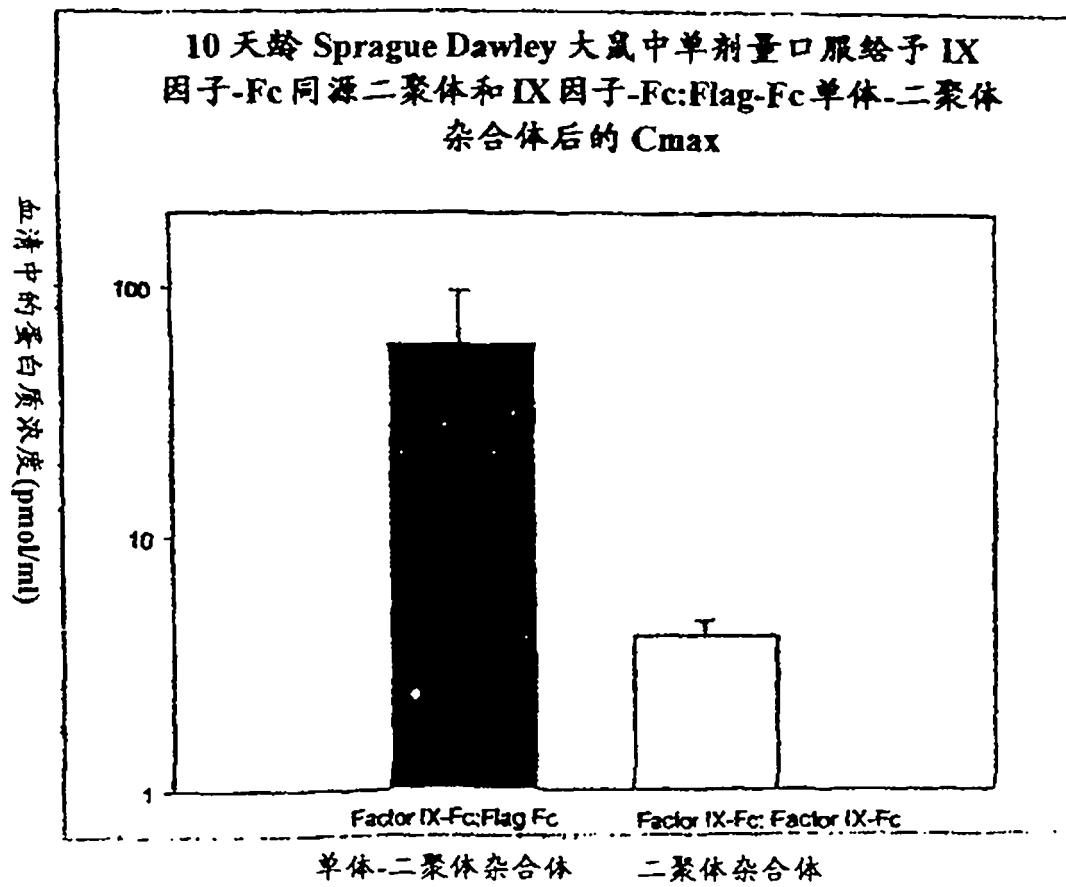


图 9

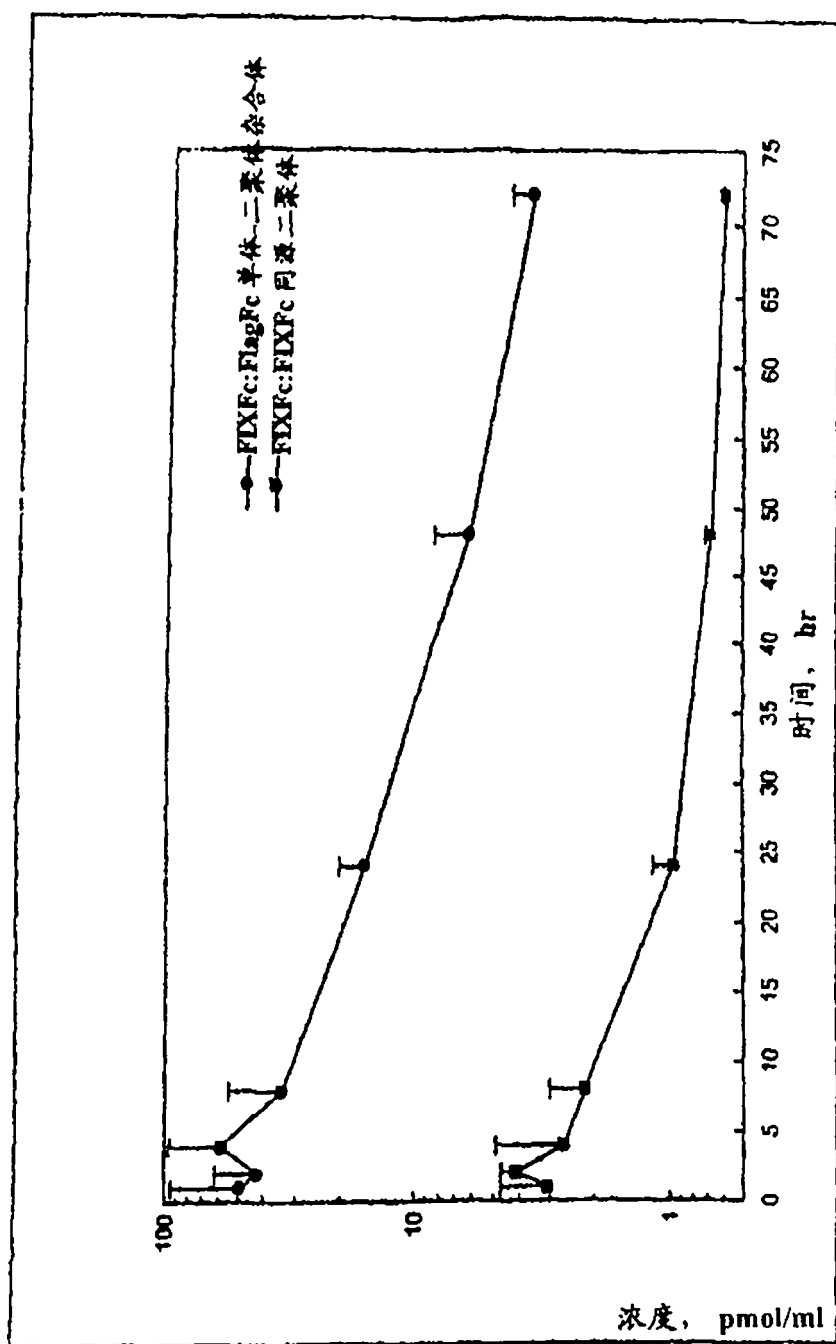


图 10

在猕猴中肺部单剂量给药后 EpoFc 二聚体和
单体-二聚体杂合体的药物动力学
摩尔比较

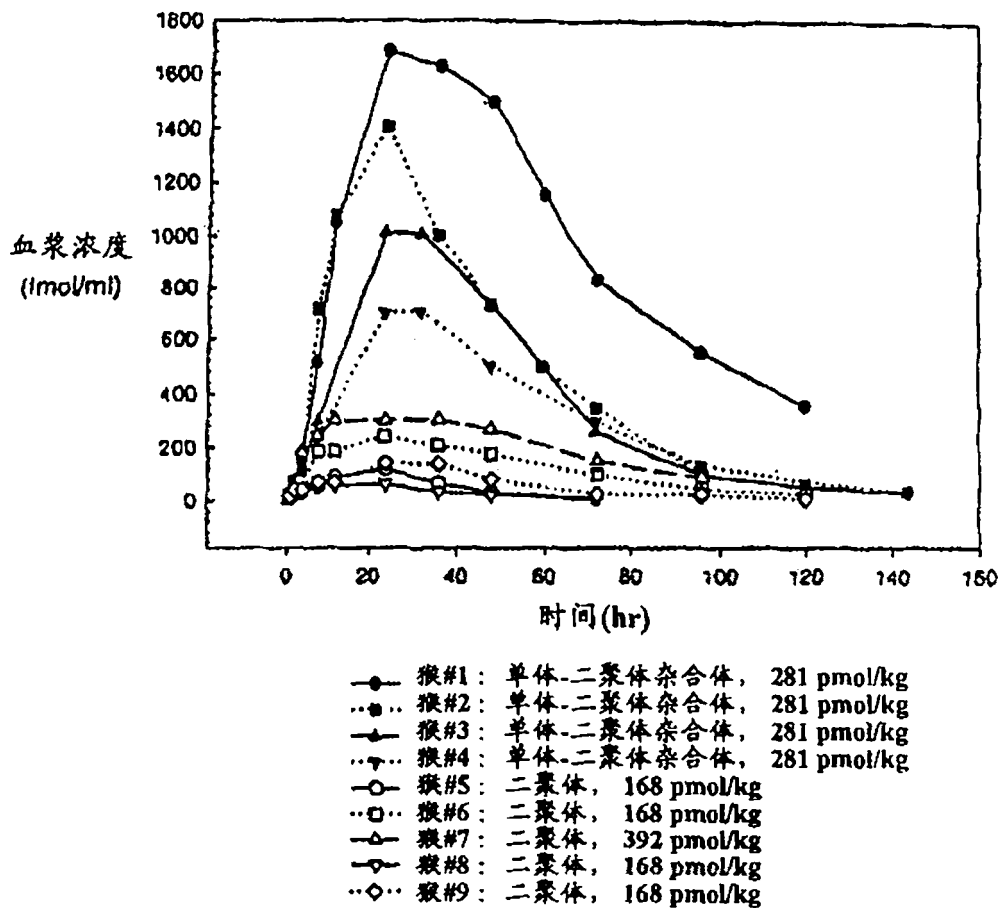


图 11

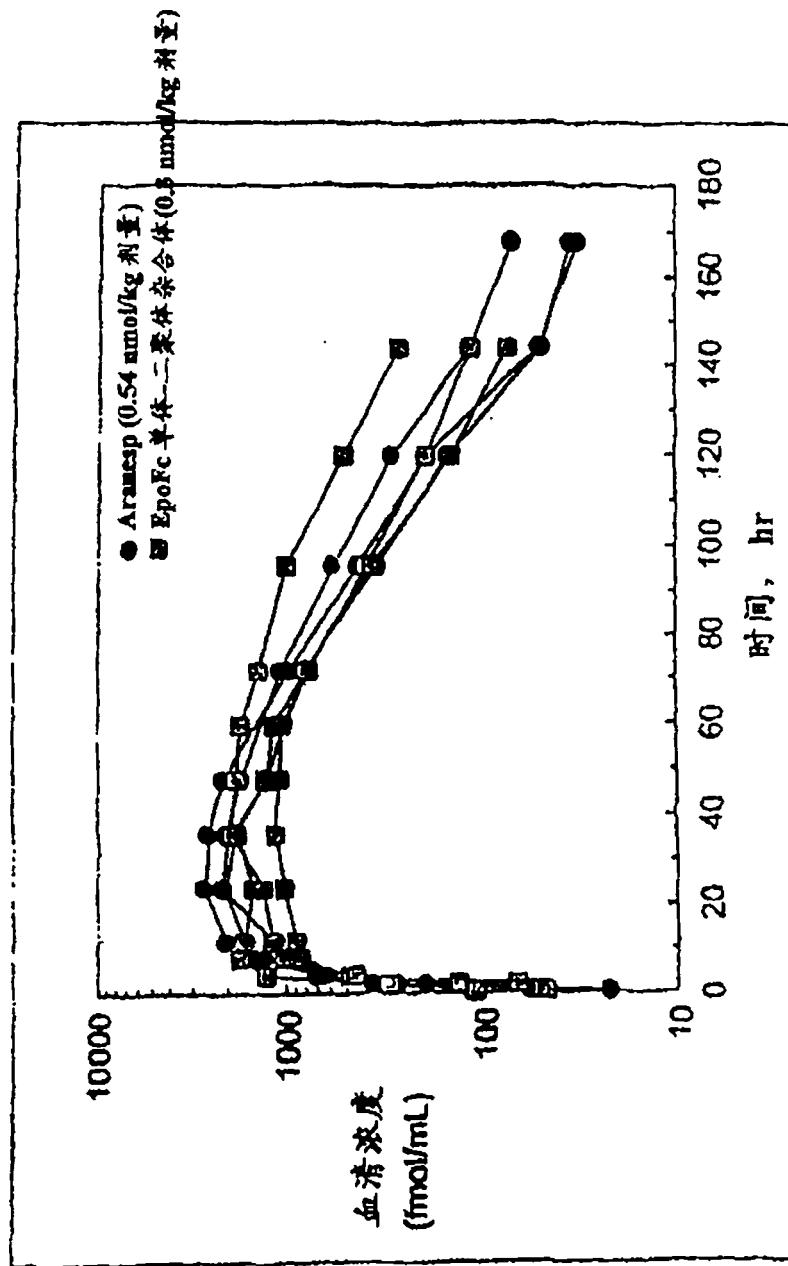


图 12

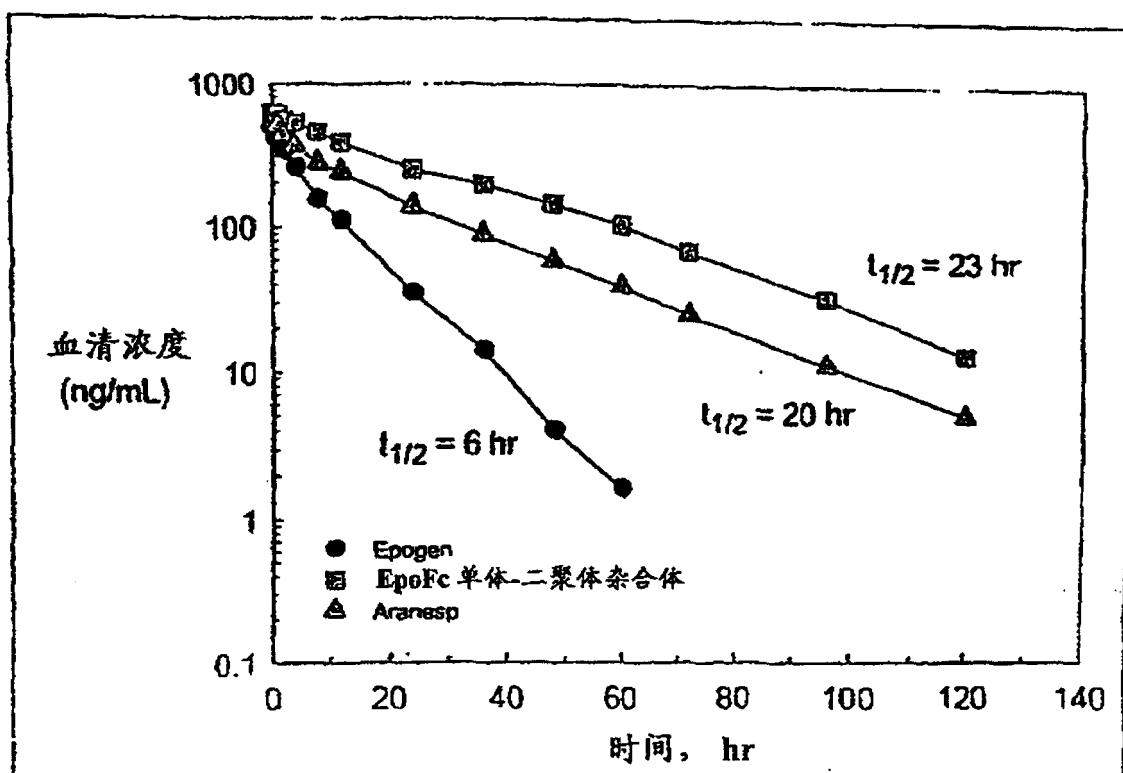


图 13

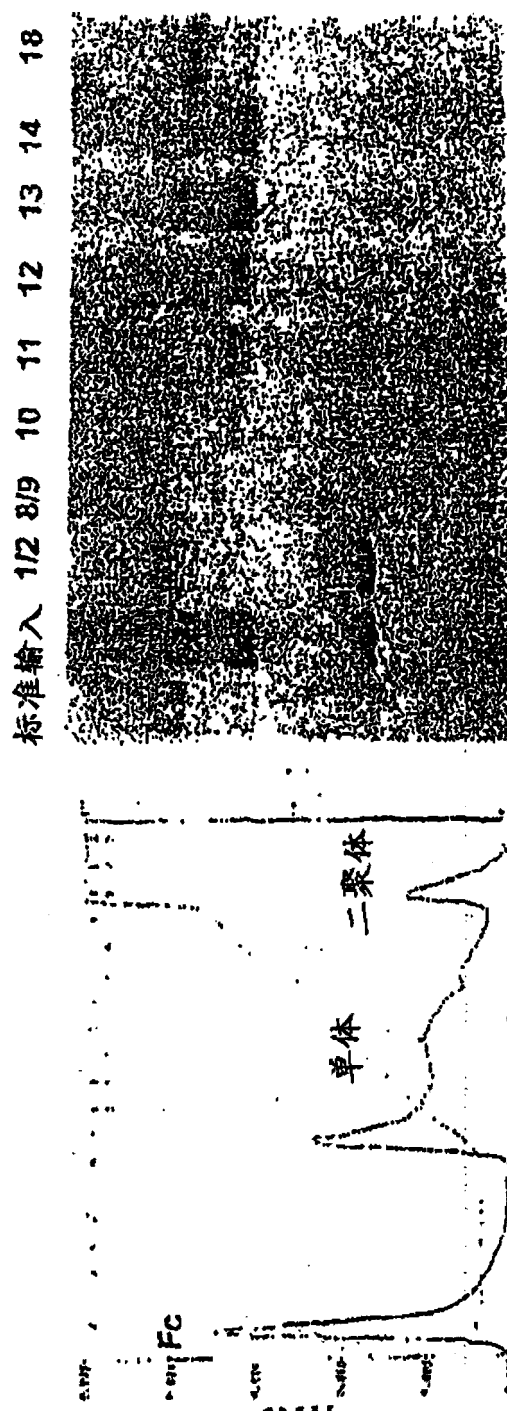


图 14

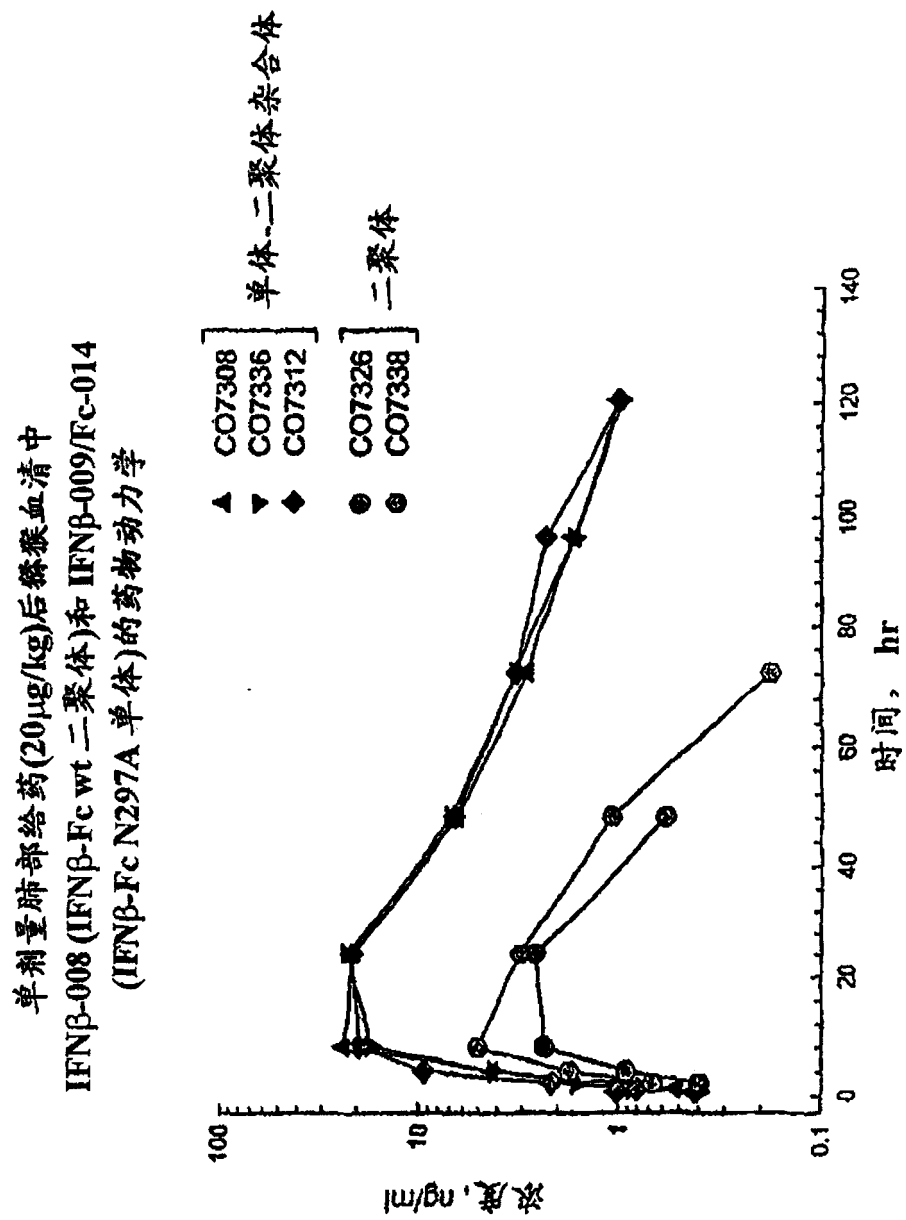


图 15

单剂量肺部给予 IFN β -008 (IFN β -Fc wt 二聚体)
或 IFN β -009/Fc-014 (IFN β -Fc N297A 单体)(20 μ g/kg)
后猕猴血清中的新喋呤水平

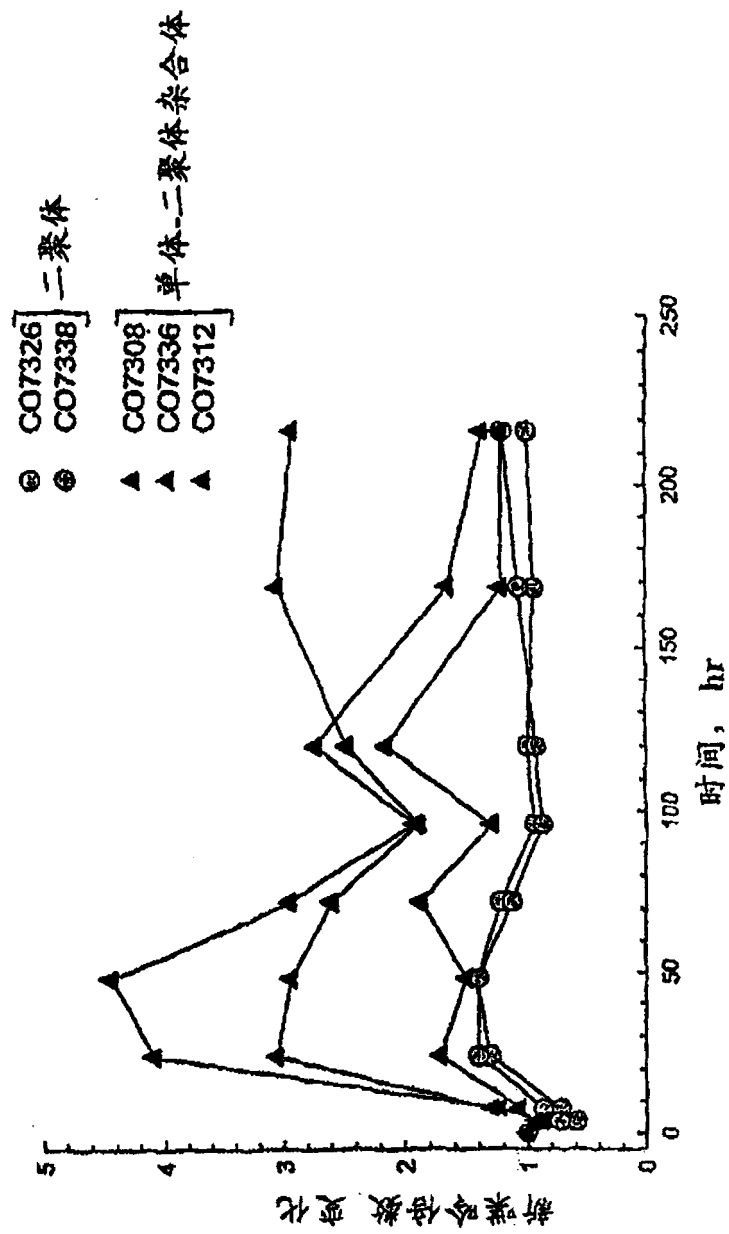


图 16

IFN β -Fc 核苷酸序列(下划线为信号肽)

atgaccaacaagtggtctcctccaaattgctctcctggttggttctccactacagctctttcca
tgagctacaacttgcttggattcctacaaagaagcagcaattttcagtgtcagaagctcctgtg
gcaattgaatgggaggcttgaatattgcctcaaggacaggatgaactttgacatcctgaggag
attaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgcatgacatctatgagatgctccaga
acatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaa
cctcctggctaatagtctatcatcagataaaccatctgaagacagtcctggaagaaaaactggag
aaagaagatttcaccaggggaaaaactcatgagcagtcctgcacctgaaaagatattatgggagga
ttctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgcctggaccatagtcagagtggaat
cctaaggaacttttacttcattaacagacttacagggtacctccgaaacagagttcgccggcgcc
gctgcggtcgacaaaactcacacatgccaccgtgccagctccggaactcctgggcggaccgt
cagtcttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctccgggacccctgaggtcac
atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc
gtggaggtgcataatgccagacaaagccggggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtgg
tcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctc
caacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagaa
ccacaggtgtacacctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgga
gaacaactacaagaccacgcctcccgtgttgagctccgacggctccttcttctctacagcaag
ctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcagagg
ctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga

图 17A

IFN β -Fc 氨基酸序列(下划线为信号肽, 粗体为接头序列, 粗体下划线为 N297)

1 MTNKCLLQIA LLLCPSTTAL SMSYNLLGFL QRSSNFQCQK LLWQLNGRLE
51 YCLKDRMNP DFEEIKQLQQ FOKEDAALTI YEMLQNI FAI PRODSSSTGW
101 NETIVENLLA NVYHQINHLK TVLEEKLEKE DFTRGKLMSS LHLKRYYGRI
151 LHYLKAKKEYS HCAWTIVRVE ILRNIFYFINR LTGYLRNEFA GAAAVDKTHT
201 CPFCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
251 NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
301 KALPAPIEKT ISKAKGPPE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
351 DIAVEWESNG QPENNYKTT PVLDSGDGSP LYSKLTVDKS RWQQGNVFC
401 SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK

图 17B

YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (SEQ ID NO: 99).

图 18A

NNLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (SEQ ID NO: 100)

图 18B

WQEWEQKITALLEQAQIQQEKNEYELQKLDKWASLWEWF (SEQ ID NO: 101)

图 18C