



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107847564 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 09

(21) 申请号 201680026585.1  
 (22) 申请日 2016.05.11  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 107847564 A  
 (43) 申请公布日 2018.03.27  
 (30) 优先权数据  
 62/160,006 2015.05.12 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2017.11.07  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/CN2016/081678 2016.05.11  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 WO2016/180335 EN 2016.11.17  
 (73) 专利权人 远东超级实验室有限公司  
 地址 英属维尔京群岛托托拉岛  
 (72) 发明人 魏光文  
 (74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
 公司 11021  
 代理人 张莹  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 33/68 (2006.01)  
 G01N 33/574 (2006.01)  
 C12Q 1/6886 (2018.01)  
 A61K 38/21 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
 CN 105722525 A, 2016.06.29  
 US 2013273527 A1, 2013.10.17  
 US 2013273527 A1, 2013.10.17  
 CN 102101886 A, 2011.06.22  
 WO 2013003475 A1, 2013.01.03  
 WO 2014106459 A2, 2014.07.10  
 US 2005169885 A1, 2005.08.04  
 US 2009220456 A1, 2009.09.03  
 Michael D. Thompson, et al..Pegylated  
 interferon alpha targets Wnt signaling by  
 inducing nuclear export of b-catenin.  
 《Journal of Hepatology》.2010,第54卷第506  
 页左栏第3-4段、右栏倒数第1段、第508页左栏倒  
 数第1段、第511页左栏第2段.  
 Chulbul M. Ahmed, et al..Short  
 Peptide Type I Interferon Mimetics:  
 Therapeutics for Experimental Allergic  
 Encephalomyelitis, Melanoma, and Viral  
 Infections.《JOURNAL OF INTERFERON &  
 CYTOKINE RESEARCH》.2014,第34卷(第10期),第  
 802-809页.  
 Gideon Schreiber, et al..The  
 molecular basis for functional plasticity  
 in type I interferon signaling.《Trends  
 in Immunology》.2015,第36卷(第3期),第139-  
 149页.

审查员 陈皓

权利要求书3页 说明书43页  
序列表6页 附图17页

(54) 发明名称  
 鉴定对肿瘤具有直接抑制作用的干扰素的方法及其用途

干扰素的效力的方法,这些方法的鉴定试剂盒,和具有所述活性的干扰素或干扰素替代物。

(57) 摘要  
 本发明提供了对测试干扰素相对于rSIFN-co(一种对实体瘤具有治疗效果的干扰素)的效力进行确定或比较的新方法;建立测试干扰素与rSIFN-co间的基本等效性的方法;以及确定测试

CN 107847564 B

1. 一种对测试干扰素相对于超级干扰素 (rSIFN-co) 的效力进行确定或比较或建立测试干扰素与rSIFN-co间的等效性的方法,包括:

(1) 提供所述测试干扰素和rSIFN-co;和

(2) 在相同的特定条件下,通过所述测试干扰素和rSIFN-co在体外分别测定如下活性:

(i) 对HT-29细胞中LRP6和FZD6的表达的下调;和

(ii) 与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲合力和更低的结合IFNAR2的亲合力;

从而通过所述测试干扰素以统计学显著方式存在(i)中指定的活性和通过所述测试干扰素存在(ii)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co具有相同的效力,或表示所述测试干扰素与rSIFN-co是等效的。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中步骤(2)中进一步测定如下任一种或更多种活性:

(iii) 对任一或更多种荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;

(iv) 对癌细胞生存力的降低;

(v) 对癌细胞迁移的抑制;

(vi) 对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制;

(vii) 对癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制;

(viii) 对癌细胞中伪足形成的抑制;

(ix) 对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;

(x) 对癌细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;和

(xi) 在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性;

其中活性(iv)-(xi)在体外条件下测定,并且通过所述测试干扰素以统计学显著方式存在(i)中指定的活性和通过所述测试干扰素存在(ii)中指定的活性,结合下述活性进一步表示所述测试干扰素与rSIFN-co具有相同的效力,或表示所述测试干扰素与rSIFN-co是等效的:

以统计学显著方式存在(iii), (iv), (v), (vi)和(vii)中指定的任何1种、或2种、或3种、或4种、或5种活性,和/或所述测试干扰素存在(viii), (ix), (x)和(xi)中指定的任一种或更多种活性。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定上述一种或更多种活性中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞、结肠癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定上述一种或更多种活性中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、Hela细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞、PANC-1细胞、SW620细胞、SPC-A4细胞、H1299细胞、H460细胞和HT-29细胞。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少2倍更高的结合IFNAR1的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少3倍更高的结合IFNAR1的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少4倍更高的结合IFNAR1的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少4.5倍更高的结合IFNAR1的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少5倍更低的结合IFNAR2的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

10. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少7倍更低的结合IFNAR2的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少9倍更低的结合IFNAR2的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

12. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少11倍更低的结合IFNAR2的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

13. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在测定活性(ii)中,通过测定解离常数( $K_D$ )确定IFN $\alpha$ -2b、测试干扰素和/或rSIFN-co结合IFNAR1和/或IFNAR2的亲合力。

14. 根据权利要求2所述的方法,其中在测定活性(xi)中使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和HeLa细胞。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中在测定活性(xi)中在与癌细胞接触前将IFN $\alpha$ -2b、测试干扰素和/或rSIFN-co与5ng/ml至20ng/ml的B18R温育。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中在测定活性(xi)中在与癌细胞接触前将IFN $\alpha$ -2b、测试干扰素和/或rSIFN-co与10ng/ml的B18R温育。

17. 根据权利要求14-16任一项所述的方法,其中在测定活性(xi)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比在对癌细胞p-STAT表达的上调中测试干扰素具有更低的对B18R抑制的敏感性时,则所述测试干扰素和rSIFN-co被认为具有相同的效力或等效。

18. 根据权利要求2所述的方法,其中在测定活性(xi)中通过蛋白质印迹测定p-STAT表达的上调。

19. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.05。

20. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.01。

21. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.005。

22. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.001。

23. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.0005。

24. 根据权利要求1或2所述的方法,其中统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.0001。

25. 根据权利要求19所述的方法,其中所述对照不用测试干扰素或rSIFN-co处理,或用生理盐水或PBS处理,或用IFN $\alpha$ -2b处理,或所述对照为未处理对照(Mock)。

26. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述测试干扰素与rSIFN-co具有相同的氨基酸序列SEQ ID NO:1且为相同的核苷酸序列SEQ ID NO:2所编码。

27. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述测试干扰素与rSIFN-co具有相同的比活性。

## 鉴定对肿瘤具有直接抑制作用的干扰素的方法及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明在此涉及对测试干扰素相对于rSIFN-co的效力进行确定或比较的新方法,建立测试干扰素与rSIFN-co间的基本等效性(substantial equivalence)的方法,对癌细胞迁移、伪足(pseudopod)形成、 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录活性和 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平进行抑制的方法,下调Wnt相关受体或共受体(co-receptor)的表达的方法,抑制Wnt信号转导通路的靶标基因的表达的方法,上调肿瘤抑制基因的方法,以及用于进行任何和所有上述方法的检测试剂盒。本发明还涉及具有上述活性的干扰素或干扰素替代物。

### 背景技术

[0002] 超级干扰素(在下文中称为“rSIFN-co”或“sIFN-I”,一种对实体瘤具有治疗作用的干扰素)已经在美国专利7,364,724(重组高效复合干扰素)和美国专利7,585,647(编码重组干扰素的核酸)中有过描述。rSIFN-co从编码与INFERGEN®(干扰素alfacon-1)(在美国专利4,695,623中公开的一种复合干扰素 $\alpha$ )相同的氨基酸序列的工程化基因构建体表达而来。然而,rSIFN-co由与编码INFERGEN®的核酸序列不同的新的核酸序列所编码。与INFERGEN®相比,rSIFN-co蛋白具有新的三级结构以及改善的生物学特性。

[0003] 如美国专利8,114,395、美国专利8,287,852和美国专利8,425,896中所记载的,与INFERGEN®相比,rSIFN-co还具有更广谱的生物学活性,包括直接抑制实体瘤活性以及抗病毒活性。

### [0004] 发明概述

[0005] 鉴于rSIFN-co具有与其它当前市售干扰素相比独特的生物学活性及其用于人类用途的可能性,希望提供方法来评测rSIFN-co和其它测试干扰素的生物学活性和/或效力,例如出于在制造过程中或其它方面的质量控制目的,以保证最终产品保持有或具有所希望的活性并与当前市售干扰素相区分。还希望提供rSIFN-co的其它用途,以及具有期望活性的干扰素或干扰素替代物。

[0006] 在一个方面,本发明提供了一种对测试干扰素相对于rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力进行确定或比较的方法,包括:(1)提供所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物;和(2)在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分别测定选自如下的任一种或更多种活性:(a)对任一或更多种荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;(b)对癌细胞生存力的降低;(c)对癌细胞迁移的抑制;(d)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制;(e)对癌细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调;(f)对癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制;(g)对癌细胞中伪足形成的抑制;(h)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;(i)对癌细胞例如A549细胞或SW620细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;(j)与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲力和/或更低的结合IFNAR2的亲力和;和(k)在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性;从而测试干扰素以统计学显著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1种、或2种、或3种、或4种、或5种、或6种活性,

和/或测试干扰素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一种或更多种活性,例如2种、或3种、或4种、或5种活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力,即,它们具有基本上相同的有效性或可产生基本上相同的结果。在此,“基本上相同”指至少约70%相同;任选地,至少约80%相同;进一步任选地,至少约90%相同;更任选地,至少约95%相同。

[0007] 在另一个方面,本发明提供了一种建立测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物间的基本等效性的方法,包括:(1)提供所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物;和(2)在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分别测定选自如下的任一种或更多种活性:(a)对任一或更多种荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;(b)对癌细胞生存力的降低;(c)对癌细胞迁移的抑制;(d)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制;(e)对癌细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调;(f)对癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制;(g)对癌细胞中伪足形成的抑制;(h)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;(i)对癌细胞例如A549细胞或SW620细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;(j)与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲力和/或更低的结合IFNAR2的亲力和;和(k)在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性;从而测试干扰素以统计学显著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1种、或2种、或3种、或4种、或5种、或6种活性,和/或测试干扰素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一种或更多种活性,例如2种、或3种、或4种、或5种活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物是基本等效的。

[0008] 在一些实施方式中,在测定上述一种或更多种活性中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞、结肠癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞。在一些实施方式中,在测定上述一种或更多种活性中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、HeLa细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞、PANC-1细胞、SW620细胞、SPC-A4细胞、H1299细胞、H460细胞和HT-29细胞。

[0009] 在一些实施方式中,在测定活性(a)对体内癌细胞生长的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肝癌细胞、宫颈癌细胞、结肠癌细胞和肺癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(a)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:SMMC-7721细胞、HeLa细胞、HT-29细胞、SPC-A4细胞和A549细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:HT-29细胞、SPC-A4细胞和A549细胞;进一步任选地,包括A549细胞。在一些实施方式中,在测定活性(a)抑制作用中生理盐水或PBS被用作对照。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以约0.02mg至约0.30mg;任选地,约0.05mg至约0.15mg的量施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以每隔一天施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物施用持续约2周至约6周;任选地,约3周至约4周。

[0010] 在一些实施方式中,在测定活性(b)对癌细胞生存力的降低中,测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物在约6.25mcg/ml至约25mcg/ml;任选地,约10mcg/ml至约18mcg/ml;更任选地,约10mcg/ml至约15mcg/ml的浓度范围下,各自引起癌细胞生存力约

50%下降。在一些实施方式中,在测定活性(b)中,测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物在至少约25mcg/ml;任选地,至少约50 mcg/ml,进一步任选地,至少约75mcg/ml;更任选地,至少约100mcg/ml的浓度下,各自引起癌细胞生存力至基本上无法检测的水平。在一些实施方式中,在测定活性(b)中,测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物的浓度包括在约0.2 mcg/ml至约100mcg/ml的浓度。在一些实施方式中,在测定活性(b)中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理癌细胞至少约1天;任选地,至少约2天。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞、结肠癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞、结肠癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、HeLa细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞和PANC-1细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞和PANC-1细胞。

[0011] 在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(b)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞被处理约1天至约10天;任选地,约1天至约6天。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW620细胞。

[0012] 在一些实施方式中,在测定活性(c)对癌细胞迁移的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(c)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,其中使用Transwell法测定活性(c)中对癌细胞迁移的抑制。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(c)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(c)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。

[0013] 在一些实施方式中,在测定活性(d)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(d)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H1299细胞、H460细胞、HT-29细胞和SW620细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H1299细胞、H460细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(d)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(d)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中, $\beta$ -联蛋白/TCF的转录活性通过使用报告系统(reporter system)来测定。在一些实施方式中,所述报告系统包括TOPFlash或pSV40-RL质粒。

[0014] 在一些实施方式中,在测定活性(e)对癌细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式

中,在测定活性(e)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H460细胞、SW620细胞和HT-29细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、SW620细胞和HT-29细胞;更任选地,包括HT-29细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(e)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(e)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(e)中通过测定LRP6和/或FZD6的mRNA水平来确定LRP6和/或FZD6的表达。

[0015] 在一些实施方式中,在测定活性(f)对Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制中所使用的癌细胞包括肺癌细胞;任选地,包括A549细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(f)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(f)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(f)中通过测定Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2的mRNA水平来确定其相应的表达。在一些实施方式中,在测定活性(f)中,当与对照相比测试干扰素降低癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的至少约30%;任选地,至少约40%;更任选地,至少约50%;还更优选地,至少约60%的表达,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被认为具有基本上相同的效力或基本上等效。

[0016] 在一些实施方式中,在测定活性(g)对癌细胞中伪足形成的抑制中所使用的癌细胞包括肺癌细胞;任选地,A549细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(g)中所使用的癌细胞至少约4天;任选地,至少约8天。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(g)中所使用的癌细胞。

[0017] 在一些实施方式中,在测定活性(h)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(h)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW480细胞。在一些实施方式中,在测定活性(h)中通过蛋白质印迹测定对 $\beta$ -联蛋白表达的抑制。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(h)中所使用的癌细胞至少约48小时;任选地,至少约72小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(h)中所使用的癌细胞。

[0018] 在一些实施方式中,在测定活性(i)对癌细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(i)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H460细胞、SW620细胞和HT-29细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(i)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或

rSIFN-co替代物处理在测定活性(i)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(i)中通过测定DKK-3、KLF-4和/或BATF2的mRNA水平来确定其相应的表达。

[0019] 在一些实施方式中,在测定活性(j)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少约2倍;任选地,至少约3倍;更任选地,至少约4倍;还更任选地,至少约4.5倍,例如4.72倍更高的结合IFNAR1的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被认为具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些实施方式中,在测定活性(j)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比测试干扰素具有至少约5倍;任选地,至少约7倍;更任选地,至少约9倍;还更任选地,至少约11倍,例如11.9倍更低的结合IFNAR2的亲合力,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被认为具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些实施方式中,在测定活性(j)中,通过测定解离常数( $K_D$ )确定IFN $\alpha$ -2b、测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物结合IFNAR1和/或IFNAR2的亲合力。

[0020] 在一些实施方式中,在测定活性(k)中使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和HeLa细胞。在一些实施方式中,在测定活性(k)中在与癌细胞接触前将IFN $\alpha$ -2b、测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物与约5ng/ml至约20ng/ml、任选地约10ng/ml的B18R温育。在一些实施方式中,在测定活性(k)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比在对癌细胞p-STAT表达的上调中测试干扰素具有更低的对B18R抑制的敏感性时,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被认为具有基本上相同的效力或基本上等效。在一些实施方式中,在测定活性(k)中通过蛋白质印迹测定p-STAT表达的上调。

[0021] 在一些实施方式中,统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.05,或小于或等于0.01,或小于或等于0.005,或小于或等于0.001,或小于或等于0.0005,或小于或等于0.0001。

[0022] 在一些实施方式中,所述对照不用测试干扰素或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理,或用生理盐水或PBS处理,或用IFN $\alpha$ -2b处理,或所述对照为未处理对照(Mock)。

[0023] 在另一个方面,本发明提供确定或比较化合物(例如,测试干扰素)的效力的方法,包括:(a)提供多个浓度的测试干扰素;(b)使用该多个浓度的测试干扰素,在特定条件下确定测试干扰素针对第一组癌细胞的生存力的第一剂量反应;(c)提供多个浓度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物;(d)使用该多个浓度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物,在相同的特定条件下确定rSIFN-co或rSIFN-co替代物针对第二组癌细胞的生存力的第二剂量反应;以及(e)比较第一剂量反应与第二剂量反应。以这种方式,确定化合物例如测试干扰素相对于rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力。

[0024] 在一些实施方式中,rSIFN-co包含特定的比活性,且比活性在约 $4 \times 10^8$  IU/mg至约 $1 \times 10^9$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $4.4 \times 10^8$  IU/mg至约 $9 \times 10^8$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $5 \times 10^8$  IU/mg至约 $8 \times 10^8$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $6 \times 10^8$  IU/mg至约 $7.5 \times 10^8$  IU/mg的范围内。任选地,比活性在约 $4 \times 10^8$  IU/mg至约 $5 \times 10^8$  IU/mg的范围内。

[0025] 在一些实施方式中,在确定或比较化合物效力的方法中,测试干扰素或rSIFN-co的浓度在约0.2mcg/ml至约100mcg/ml的范围内。在一些实施方式中,测试干扰素或rSIFN-co的浓度为至少两种或更多种的以下浓度:0.2mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78mcg/ml、1.56mcg/ml、3.13mcg/ml、6.25mcg/ml、12.5mcg/ml、25mcg/ml、50mcg/ml和100mcg/ml。

[0026] 在一些实施方式中,用测试干扰素或rSIFN-co处理癌细胞至少约20小时,任选地为至少约24小时,还任选地为至少约48小时,和更任选地为至少约72小时。

[0027] 在一些实施方式中,本发明提供如本文所述的方法,其中,rSIFN-co具有能够在约6.25mcg/ml至约25mcg/ml的浓度范围内(取决于癌细胞类型)使癌细胞生存力降低50%的效力。在一些实施方式中,rSIFN-co能够在约6.25mcg/ml至12.5mcg/ml的浓度范围内使癌细胞生存力降低50%。在另一实施方式中,rSIFN-co能够在约12.5mcg/ml至25mcg/ml的浓度范围内使癌细胞生存力降低50%。在一些实施方式中,rSIFN-co的 $IC_{50}$ 在约10mcg/ml至约18mcg/ml的范围内,任选地,在约10mcg/ml至约15mcg/ml的范围内。

[0028] 在另一个方面,本发明提供确定或比较化合物(例如测试干扰素)相对于rSIFN-co或rSIFN-co替代物的针对癌细胞生存力的效力的方法,包括:(a)提供多个癌细胞;(b)在特定条件下用某一量的测试干扰素测试第一组癌细胞,以生成第一组生存力数据;(c)在相同的特定条件下,用有效量的rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理第二组癌细胞,以生成第二组生存力数据;以及(d)比较第一组生存力数据与第二组生存力数据,从而确定测试干扰素的效力。

[0029] 在一些实施方式中,在约1天至约6天的范围内处理癌细胞。在一些实施方式中,以约6.25mcg/ml至约50mcg/ml范围内的浓度使用rSIFN-co;任选地为约7 mcg/ml至约25mcg/ml;更任选地为约8mcg/ml至约12.5mcg/ml;还更任选地为约10mcg/ml。在一些实施方式中,以约5mcg/ml至约20mcg/ml范围内的浓度使用rSIFN-co。在一些实施方式中,rSIFN-co包含特定的比活性。

[0030] 在一些实施方式中,本文使用的癌细胞选自人肿瘤细胞和动物肿瘤细胞。在一些实施方式中,肿瘤细胞是肺肿瘤细胞、或宫颈肿瘤细胞、或肝肿瘤细胞、或结肠直肠肿瘤细胞、或乳腺肿瘤细胞、或胰腺肿瘤细胞、或前列腺肿瘤细胞、或病毒引发的肿瘤细胞或病毒转化的细胞。在一些实施方式中,癌细胞选自A549细胞、Calu-1细胞、CL-1细胞、H460细胞、H1299细胞、HeLa细胞、HT29细胞、Huh-7细胞、MDA-MB-231细胞、PANC-1细胞、RAW264.7细胞、SMMC-7721细胞、SW480细胞和SW620细胞中的至少一种。

[0031] 在一些实施方式中,测试干扰素也是干扰素,包括得自与rSIFN-co不同的生产批次的干扰素。在一些实施方式中,所述测试干扰素的氨基酸序列与rSIFN-co的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)具有至少90%的同源性,任选地,至少95%、96%、97%、98%、99%、100%的同源性。在一些实施方式中,编码所述测试干扰素的核苷酸序列与编码rSIFN-co的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)具有至少90%的同源性,任选地,至少95%、96%、97%、98%、99%、100%的同源性。在一些实施方式中,所述测试干扰素与rSIFN-co具有相同的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)且为相同的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)所编码。在一些实施方式中,所述测试干扰素与rSIFN-co具有基本上相同的比活性。在一些实施方式中,所述比活性在约 $4 \times 10^8$  IU/mg至约 $1 \times 10^9$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,所述测试干扰素可获得自包含将SEQ ID NO:2中所示的多核苷酸序列导入大肠杆菌(E.coli)中的方法。在一些实施方式中,所述测试干扰素通过在大肠杆菌宿主中表达多核苷酸(SEQ ID NO:2)而制成,任选地,在大肠杆菌宿主中在 $P_{BAD}$ 启动子的控制下表达。

[0032] 在另一个方面,本发明提供抑制(例如在肿瘤转移中发生的)细胞迁移的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而抑制细胞迁移。

[0033] 在一些实施方式中，rSIFN-co的有效量包括约5mcg/ml至约100mcg/ml；任选地为约8mcg/ml至约50mcg/ml；更任选地为约10mcg/ml至约25mcg/ml；更 任选地为约12mcg/ml至约18mcg/ml。在一些实施方式中，rSIFN-co的有效量包 括约5mcg/ml至约20mcg/ml，任选地，约10mcg/ml。

[0034] 在另一个方面，本发明提供抑制癌细胞中伪足形成的方法，包括将癌细胞 暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间，从而抑制伪足形成。在一些实施方式中， rSIFN-co的有效量包括约5mcg/ml至约20mcg/ml，任选地，约10mcg/ml。

[0035] 在另一个方面，本发明提供抑制细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录活性的 方法，包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间。在一些实施方式中， 使用报告系统，任选地，荧光素酶报告系统，来确定 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录 活性。在一些实施方式中，报告系统是TOPFlash报告系统。在一些实施方式中， 使用质粒pSV40-RL。

[0036] 在另一个方面，本发明还提供降低细胞中 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平的方法，包 括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间。在一些实施方式中，使用 $\beta$ -联 蛋白的特异性抗体经蛋白质印迹来检测 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平。在一些实施方式 中，使用GAPDH作为对照。

[0037] 在另一个方面，本发明提供下调细胞中的Wnt相关受体或共受体的表达的 方法，包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间，从而下调Wnt相关受 体或共受体。在一些实施方式中，Wnt相关受体或共受体包括LRP蛋白，例如 LRP6。在一些实施方式中，Wnt 信号转导的受体或共受体包括FZD蛋白，例如 FZD6。在一些实施方式中，确定Wnt相关受体 或共受体的表达包括确定这些受 体或共受体的mRNA水平。在一些实施方式中，制备与这些 mRNA对应的cDNA 来确定这些mRNA水平。

[0038] 在另一个方面，本发明提供抑制细胞中某些基因(包括Wnt信号转导通路 的至少一个靶标基因)的表达的方法，例如用于治疗靶标基因过度活跃 (over-active)的疾病或 症状。这些下调基因包括Axin2、CD24、存活蛋白 (Survivin)、和/或ID2。该方法包括将细胞 暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间，从而抑制靶标基因的表达。

[0039] 在本发明的一些实施方式中，细胞暴露于rSIFN-co的特定时间为至少约12 小时；任选地，至少约20小时；再任选地，至少约24小时；再任选地，至少约36 小时；再任选地，至少约48小时；再任选地，至少约72小时。在一些实施方式中， rSIFN-co处理的细胞是癌细胞。

[0040] 在另一个方面，本发明提供上调细胞中某些基因(包括至少一种肿瘤抑制 基因)的表达的方法，包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间，从而 实现对至少一种肿瘤抑制基因的表达的上调。在一些实施方式中，上调的基因包 括DKK3、KLF4和BATF2中的至少一种。在一些实施方式中，通过测定这些的 mRNA水平来确定上调基因的表达。在一些 实施方式中，从这些mRNA合成cDNA 并任选地扩增以用于测定目的。

[0041] 在另一个方面，本发明提供在至少1种、任选地为至少2、3、4、5、6、7、 8、9、10或11 种下列活性上建立测试化合物与rSIFN-co或rSIFN-co替代物间的基 本等效性的方法，包 括对其比较这些活性并显示出基本相同的反应：(a)对任一 或更多种荷瘤动物模型体内癌 细胞生长的抑制；(b)对癌细胞生存力的降低；(c) 对癌细胞迁移的抑制；(d)对癌细胞中 $\beta$ - 联蛋白/TCF转录活性的抑制；(e)对癌 细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调；(f)对癌细胞 中Axin2、CD24、存活蛋白 和ID2中任一种或更多种的表达的抑制；(g)对癌细胞中伪足形成

的抑制；(h) 对 癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制；(i) 对癌细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种 或更多种的表达的上调；(j) 与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲力和/或更 低的结合IFNAR2的亲合力；和(k) 在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b 相比更低的对B18R抑制的敏感性。在一些实施方式中，本发明提供在至少2种上 述活性中建立基本等效性；任选地，本发明提供在至少3种上述活性中建立基本 等效性；任选地在至少4种上述活性中建立基本等效性；更任选地为在至少5种上 述活性中建立基本等效性；更任选地为在至少6种上述活性中建立基本等效性； 还更任选地为在至少7种、或8种、或9种、或10种、或 11种上述活性中建立基本 等效性。

[0042] 在另一个方面，本发明提供用于确定测试干扰素效力、抑制至少一种Wnt- 相关靶 基因表达、上调肿瘤抑制基因、和/或下调LRP6和/或FZD6表达的检 测试剂盒，包含(a) rSIFN-co或rSIFN-co替代物，以及(b) 用于执行本文描述 的一个以上方法的说明书和用于 执行这些方法的试剂中的至少一者。这些试剂可 以包含磷酸盐缓冲盐水(PBS)或缓冲剂。 在一些实施方式中，检测试剂盒中的 rSIFN-co或rSIFN-co替代物包括特定的比活性。

[0043] 在另一个方面，本发明提供一种干扰素或干扰素替代物，包含选自以下的 一种或 多种活性，任选地为选自其中的2、3、4、5、6、7、8、9、10或11种活性：对任一或更多种荷瘤动 物模型体内癌细胞生长的抑制；对癌细胞生存力的降低；对癌细胞迁移的抑制；对癌细胞 中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制；对癌细胞中 LRP6和/或FZD6的表达的下调；对癌细胞中 Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任 一种或更多种的表达的抑制；对癌细胞中伪足形成的抑 制；对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白 表达的抑制；对癌细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种 的表达的上 调；与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲力和/或更低的结合IFNAR2的亲 和 力；和在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏 感性；其 中所述干扰素或干扰素替代物不是rSIFN-co。

## 附图说明

[0044] 图1显示实施例1中所描述的在开始处理之后21天的期间中人肝癌肿瘤 SMMC- 7721在裸鼠中的生长曲线，用平均相对肿瘤体积(RTV)表示，各个组 用MMC(5mg/kg)或 0.15mg/小鼠的rSIFN-co或0.10mg/小鼠的rSIFN-co或0.05 mg/小鼠的rSIFN-co处理、或用 赋形剂生理盐水(NS)(0.15ml/小鼠)注射。

[0045] 图2显示实施例2中所描述的在28天处理期间的人宫颈肿瘤在裸鼠中的生 长曲 线，用RTV表示，各个组用MMC(5mg/kg)或0.15mg/小鼠的rSIFN-co或0.10 mg/小鼠的rSIFN- co或0.05mg/小鼠的rSIFN-co处理、或用赋形剂生理盐水(0.15 ml/小鼠)注射。

[0046] 图3显示实施例3中所描述的在28天处理期间的人结肠肿瘤HT-29在裸鼠 中的生 长曲线，用RTV表示，各个组用MMC(5mg/kg)或0.15mg/小鼠的rSIFN-co 或0.10mg/小鼠的 rSIFN-co或0.05mg/小鼠的rSIFN-co处理、或0.15mg/小鼠的 IFN $\alpha$ -2b、或用赋形剂生理盐 水(0.15ml/小鼠)注射。

[0047] 图4显示实施例4中所描述的在21天处理期间的人肺肿瘤SPC-A4在裸鼠中 的生 长曲线，用RTV表示，各个组用MMC(5mg/kg)或0.15mg/小鼠的rSIFN-co 或0.10mg/小鼠的 rSIFN-co或0.05mg/小鼠的rSIFN-co处理、或0.15mg/小鼠的 IFN $\alpha$ -2b、或用赋形剂生理盐 水(0.15ml/小鼠)注射。

[0048] 图5显示在用0、0.2、0.39、0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25、50和100 mcg/ml ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 浓度的rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理48小时后针对不同肿瘤细胞的生存力的剂量反应曲线。测试的细胞是:A549肺肿瘤细胞(图5A);HeLa宫颈肿瘤细胞(图5B);CL-1肝肿瘤细胞(图5C);Huh-7肝肿瘤细胞(图5D);SW480 结肠肿瘤细胞(图5E);MDA-MB-231乳腺肿瘤细胞(图5F);Calu-1肺肿瘤细胞(图5G);SMMC-7721肝肿瘤细胞(图5H);以及PANC-1前列腺肿瘤细胞(图5I)。结果表示为相对于对照细胞的细胞生存力百分比,并且呈现为至少两个独立实验的均值。

[0049] 图6是分别显示在1、2、3、4、5和6的所示天数的处理后,10mcg/ml下的 IFN $\alpha$ -2b处理和rSIFN-co处理对A549细胞(图6A)和SW620细胞(图6B)生存力的作用的生存力曲线。细胞生存力通过MTT法来评测。结果表示为相对于对照细胞的细胞生存力百分比并呈现为至少两个独立实验的均值。(\*\* $p < 0.01$ )

[0050] 图7是分别显示与Mock对照(图7,A列)相比,rSIFN-co处理(图7,C列)和IFN $\alpha$ -2b处理(图7,B列)对肺癌细胞A549在3D培养中的4天后群落形成(第一排)(放大100 $\times$ )和8天后伪足形成(第二排和第三排)(放大400 $\times$ )的作用的图片。A列和B列中的黑色箭头指向由癌细胞突出的伪足。C列中的带星号箭头指向没有伪足的细胞。

[0051] 图8A-8E是分别显示与mock对照相比,rSIFN-co处理和IFN $\alpha$ -2b处理对不同的肺癌细胞A549(图8A)、H1299(图8B)和H460(图8C);和不同的结肠癌细胞HT-29(图8D)和SW620(图8E)的 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录活性的作用的柱形图。数值是3次试验的均值。(\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ )

[0052] 图9A和9B是分别显示与mock对照相比,rSIFN-co处理和IFN $\alpha$ -2b处理对不同的癌细胞A549、H460、SW620和HT-29中Wnt相关受体或共受体LRP6(图9A)和FZD6(图9B)的表达的作用的柱形图(通过相对于GAPDH表达的mRNA水平来测量)。以三组平行进行实验,结果用mock对照组标准化。

[0053] 图10A和10B是蛋白质印迹,并分别显示在分别处理24、48和72小时后,与mock对照相比,rSIFN-co处理和IFN $\alpha$ -2b处理对癌细胞A549(图10A)和SW480(图10B)中 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平的作用。GAPDH表达用作对照。以三组平行进行实验。

[0054] 图11A-11D是显示用rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理A549肺癌细胞24小时后,与mock对照相比,作为Wnt信号转导通路下游的4种基因的相对mRNA表达水平的柱形图:Axin2(图11A);CD24(图11B);存活蛋白(图11C);和ID2(图11D)。以三组平行进行实验,并用mock对照组标准化。

[0055] 图12A-12C是显示用rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理后,与mock对照相比,在不同的肿瘤细胞A549、H460、SW620和HT-29中的3种肿瘤抑制基因DKK-3(图12A)、BATF2(图12B)和KLF4(图12C)的相对mRNA表达水平的柱形图。以三组平行进行实验,并用mock对照组标准化。

[0056] 图13A和13B是显示与Mock对照相比,在用IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理后,A549细胞(图13A)和SW620细胞(图13B)的肿瘤细胞迁移的柱形图。结果表示为该处理后的单位区域中迁移细胞平均数 $\pm$ SD。(\*\* $p < 0.01$ )

[0057] 图14是与Mock对照和5FU处理的细胞相比,在A549细胞(图14A)和SW620细胞(图14B)用IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理24小时或48小时后,分别用针对半胱天冬酶-3酶原(procaspase-3)、切割的半胱天冬酶-3(cleaved caspase-3)、半胱天冬酶-8酶原

(procaspase-8)、切割的半胱天冬酶-8(cleaved caspase-8)、PARP 和 $\beta$ -微管蛋白的特异性抗体进行染色得到的蛋白质印迹。

[0058] 图15是A549细胞用10mcg/ml的IFN $\alpha$ -2b(图15A)、或10mcg/ml的rSIFN-co(图15B)处理后,或者HeLa细胞用10mcg/ml的IFN $\alpha$ -2b(图15C)、或10mcg/ml的rSIFN-co(图15D)处理后,用针对P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3和GAPDH的特异性抗体进行染色得到的蛋白质印迹。

[0059] 图16是显示与PBS处理的对照相比,在开始处理之后的27天期间,经 IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理后对肿瘤生长的抑制的肿瘤生长曲线。数据表示为平均 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) $\pm$ SD (n=8)。

[0060] 图17A显示通过稳态分析(steady-analysis)模型分析得到的IFNAR1干扰素受体的亲和常数: $K_D$ (IFNAR1-EC/IFN $\alpha$ -2b): $2.835 \times 10^{-6}$ mol/L(黑色菱形)和  $K_D$ (IFNAR1-EC/rSIFN-co): $6.003 \times 10^{-7}$ mol/L(黑色圆形)。图17B显示了通过动态分析模型分析得到的IFNAR2干扰素受体的亲和常数: $K_D$ (IFNAR2-EC/IFN $\alpha$ -2b) $1.843 \times 10^{-9}$ mol/L和 $K_D$ (IFNAR2-EC/rSIFN-co): $2.192 \times 10^{-8}$ mol/L。图17C是显示IFN $\alpha$ -2b和rSIFN-co分别对IFNAR1-EC或IFNAR2-EC的受体结合亲和力的比较结果的柱形图,表明rSIFN-co/IFNAR1显示出更强的结合亲和力,较IFN $\alpha$ -2b/IFNAR1强约4.72倍,以及rSIFN-co/IFNAR2显示出较弱的结合亲和力,较IFN $\alpha$ -2b/IFNAR2弱约11.9倍。

[0061] 图18是在用1ng/ml(最终的测定浓度)rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理癌细胞后,用针对P-STAT1、STAT1、P-STAT2、STAT2、P-STAT3、STAT3、肌动蛋白和GAPDH的特异性抗体进行染色得到的蛋白质印迹,该癌细胞在处理前分别与1、10或100ng/ml的B18R重组蛋白温育,其中所述癌细胞是A549细胞(图18A)或HeLa细胞(图18B)。

[0062] 发明详述

[0063] 定义

[0064] 除非另外指出,否则本文使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员赋予它们的含义或为本领域普通技术人员所通常理解的含义。

[0065] 此外,除非上下文另有规定,否则单数词将包括复数形式,复数词将包括单数形式。

[0066] 此外,除非另作说明,本文中使用的术语“或(or)”应指“和/或(and/or)”。

[0067] 本文所用的术语“化合物”应指任何蛋白(包括任何抗体、任何活性抗体片段、和任何二聚体蛋白或多聚体蛋白)、多肽、小分子、和具有一种或更多种生物学活性的其它分子。

[0068] 本文使用的术语“包括(comprise or comprising)”应被广义解读且不受限,并应包含“是(is or are)”。

[0069] 本文使用的术语“症状”和“疾病”可互换使用或者共同使用来指示受试者中的疾病、感染、炎症、癌症、治疗引起的副作用、或较差健康状况的其它成因。

[0070] 本文使用的术语“有效量”应指产生所希望效果,例如用于降低细胞生存力、下调或上调蛋白的表达或活性、或治疗疾病或病症的量。

[0071] 本文使用的术语“建立基本等效性”应指进行某一或某些测试来表明基本相同水平的反应、活性、有效性或结果,其在实验误差的限制内(例如 $\pm$ 标准差(SD))。

[0072] 本文使用的术语“基本上相同”应指至少约70%相同;任选地,至少约80%相同;进一步任选地,至少约90%相同;更任选地,至少约95%相同。

[0073] 本文使用的术语“在约.....的范围”或“在约.....之间的范围”应指该范围内的数,以及在此特定范围内的所有个位和小数点。例如,“在约 $4 \times 10^8$  IU/mg 与约 $5 \times 10^8$  IU/mg之间的范围”将包括 $4 \times 10^8$  IU/mg、 $4.1 \times 10^8$  IU/mg、 $4.2 \times 10^8$  IU/mg、 $4.3 \times 10^8$  IU/mg、 $4.4 \times 10^8$  IU/mg等,且“8mcg/ml至20mcg/ml”应包括9mcg/ml、10mcg/ml等。

[0074] 本文使用的术语“包含(include or including)”应理解为是非限制性的,并且涵盖指定的元素以及非指定的元素。

[0075] 本文使用的术语“干扰素”或“IFN”应指任何天然出现的或人为产生的干扰素,包括题为“复合人白细胞干扰素”的美国专利4,695,623中记载的复合干扰素 $\alpha$ ,以及rSIFN-co。

[0076] 本文使用的术语“干扰素活性”应指作为天然出现的干扰素和rSIFN-co的特征的一种或更多种生物学活性,例如抗肿瘤活性和/或抗病毒活性。

[0077] 本文使用的术语“rSIFN-co”按照上下文,应指具有如美国专利7,364,724 和美国专利7,585,647中记载的多核苷酸序列和氨基酸序列、或其活性片段的蛋白或核酸分子。所述在美国专利7,364,724和美国专利7,585,647中记载的多核苷酸序列和氨基酸序列如下所示:

M C D L P Q T H S L G N R R A L I L L A  
 1 ATGTGCGACC TGCCGAGAC CCACTCCCTG GGTAACCGTC GTGCTCTGAT CCTGCTGGCT  
 TACACGCTGG ACGGCGTCTG GGTGAGGGAC CCATTGGCAG CACGAGACTA GGACGACCGA

[0078] Q M R R I S P F S C L K D R H D F G F P  
 61 CAGATGCGTC GTATCTCCCC GTTCTCCTGC CTGAAAGACC GTCACGACTT CGGTTTCCCC  
 GTCTACGCAG CATAGAGGGG CAAGAGGACG GACTTTCTGG CAGTGCTGAA GCCAAAGGGC

Q E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E

121 CAGGAAGAAT TCGACGGTAA CCAGTTCAG AAAGCTCAGG CTATCTCCGT TCTGCACGAA  
GTCCTTCTTAAGCTGCCATT GGTC AAGGTC TTTCGAGTCC GATAGAGGCAAGACGTGCTT

M I Q Q T F N L F S T K D S S A A W D E

181 ATGATCCAGC AGACCTTCAA CCTGTTCTCC ACCAAAGACT CCTCCGCTGC TTGGGACGAA  
TACTAGGTCG TCTGGAAGTT GGACAAGAGG TGGTTTCTGA GGAGGCGACG AACCTGCTT

S L L E K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C

241 TCCCTGCTGG AAAAATTCTA CACCGAAGT TACCAGCAGC TGAACGACCT GGAAGCTTGC  
AGGGACGACC TTTTAAAGAT GTGGCTTGAC ATGGTCGTCG ACTTGCTGGA CCTTCGAACG

V I Q E V G V E E T P L M N V D S I L A

[0079]

301 GTTATCCAGG AAGTTGGTGT TGAAGAAACC CCGCTGATGA ACGTTGACTC CATCCTGGCT  
CAATAGGTCC TTCAACCACA ACTTCTTTGG GCGACTACT TGCAACTGAG GTAGGACCGA

V K K Y F Q R I T L Y L T E K K Y S P C

361 GTTAAAAAAT ACTTCCAGCG TATCACCTG TACCTGACCG AAAAAAATA CTCCCCGTGC  
CAATTTTTTA TGAAGGTCGC ATAGTGGGAC ATGGACTGGC TTTTTTTTAT GAGGGGCACG

A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q

421 GCTTGGGAAG TTGTTTCGTGC TGAAATCATG CGTTCCTTCT CCCTGTCCAC CAACCTGCAG  
CGAACCTTC AACAAGCACG ACTTAGTAC GCAAGGAAGA GGGACAGGTG GTTGGACGTC

E R L R R K E (SEQ ID NO:1)

481 GAACGTCTGC GTCGTAAAGAATAA (SEQ ID NO:2)

CTTGCAGACG CAGCATTCT TATT (SEQ ID NO:3)

[0080] 本文使用的术语“rSIFN-co替代物”应指已经或将要针对rSIFN-co测定其效力并可以在测试化合物效力或活性的确定中出于比较的目的替代rSIFN-co使用的任何化合物。rSIFN-co替代物可以是干扰素或具有干扰素特性的化合物。

[0081] 本文使用的比活性是生物学活性与蛋白质含量之比。该生物学活性可以是任何本领域惯用的相关生物学活性，例如通过中华人民共和国药典2010版三部附录XC中公布的细胞病变抑制法测定的生物学活性。蛋白质含量可通过本领域惯用的任意方法，例如中

中华人民共和国药典2010版三部附录VI B中公布的Lowry法测定的。

[0082] 本文使用的术语“治疗(treatment)”应包括引起疾病的完全或部分痊愈、引起或引发疾病的不进展、改善或降低疾病或病症的严重度、防止疾病复发、降低疾病复发的频率、减少疾病的副作用、使疾病缓解、引起健康状况改善的总体感觉等。

[0083] 术语“Wnt相关受体或共受体”应包括独自或共同结合到Wnt家族蛋白以引发细胞中经典Wnt信号转导通路或非经典Wnt信号转导通路中的信号转导的一种或更多种分子。该术语包括,例如LRP6,其是已知与DKK1相互作用的低密度脂蛋白受体相关蛋白6,一种Wnt共受体;和FZD6,其是Wnt信号转导的受体,据信其是Wnt-4配体的受体。

[0084] 本文使用的术语“Wnt信号转导活性”是指经由与卷曲蛋白(Frizzled,FZD)家族受体以及LRP5/LRP6共受体结合而转导的Wnt信号转导级联反应,引起 $\beta$ -联蛋白的释放及其向细胞核的迁移以进行细胞活化。

[0085] 本文使用的术语“IFNAR1”指Uze等,Cell,60:225-234(1990)克隆的557个氨基酸的受体蛋白,如Uze等的第229页图5所示,包括409个残基的胞外域,21个残基的跨膜域和100个残基的胞内域。在一些实施方式中,前述术语包括IFNAR1的片段,其包含有IFNAR1的胞外域(EC或ECD)(或EC或ECD的片段)。

[0086] 本文使用的术语“IFNAR2”指Domanski等,J.Biol.Chem.,37:21606-21611(1995)克隆的515个氨基酸的受体蛋白,如Domanski等的第21608页图1所示,包括217个残基的胞外域,21个残基的跨膜域和250个残基的胞内域。在一些实施方式中,前述术语包括IFNAR2的片段,其包含有IFNAR2的胞外域(EC或ECD)(或EC或ECD的片段)。

[0087] 本发明的发明者发现由rSIFN-co的施用或治疗引起的某些生物学作用,并且这些生物学作用可以用于评测rSIFN-co以及其它可能具有相似特性的化合物的效力,特别是在制造过程中需要效力的一致性时或是在药物开发过程中想要改善效力时。本发明的发明者还发现迄今未知的使用rSIFN-co治疗的某些生物学作用,并且这些生物学作用可以用于rSIFN-co的其它用途,包括用于治疗需要上调或下调某些基因的其它症状或疾病。

[0088] 在一个方面,本发明提供了一种对测试干扰素相对于rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力进行确定或比较的方法,包括:(1)提供所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物;和(2)在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物分别测定选自如下的任一种或更多种活性:(a)对任一或更多种荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;(b)对癌细胞生存力的降低;(c)对癌细胞迁移的抑制;(d)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制;(e)对癌细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调;(f)对癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制;(g)对癌细胞中伪足形成的抑制;(h)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;(i)对癌细胞例如A549细胞或SW620细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;(j)与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合IFNAR1的亲合力和/或更低的结合IFNAR2的亲合力;和(k)在对癌细胞p-STAT表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性;从而测试干扰素以统计学显著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1种、或2种、或3种、或4种、或5种、或6种活性,和/或测试干扰素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一种或更多种活性,例如2种、或3种、或4种、或5种活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力。

[0089] 在另一个方面,本发明提供了一种建立测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co 替代物间的基本等效性的方法,包括:(1) 提供所述测试干扰素和rSIFN-co或 rSIFN-co替代物;和(2) 在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或 rSIFN-co替代物分别测定选自如下的任一种或更多种活性:(a) 对任一或更多种 荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;(b) 对癌细胞生存力的降低;(c) 对癌细胞迁移的抑制;(d) 对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制;(e) 对癌细胞中 LRP6和/或FZD6的表达的下调;(f) 对癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2 中任一种或更多种的表达的抑制;(g) 对癌细胞中伪足形成的抑制;(h) 对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;(i) 对癌细胞例如A549细胞或SW620细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;(j) 与IFN $\alpha$ -2b相比更高的结合 IFNAR1的亲合力和/或更低的结合IFNAR2的亲合力;和(k) 在对癌细胞p-STAT 表达的上调中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性;从而测试干扰素以统计学显著方式存在(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)中指定的任何1种、或2种、或3种、或4种、或5种、或6种活性,和/或测试干扰素存在(g)、(h)、(i)、(j)和(k)中指定的任一或更多种活性,例如2种、或3种、或4种、或5种活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物是基本等效的。任选地,在测试干扰素处理或施用的情况下,以统计学显著方式存在对体外癌细胞生存力的降低,例如在A549 细胞和/或SW620细胞中,以及对 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制,例如在如下的任一种或更多种中:A549细胞、H1299细胞、H460细胞和HT-29细胞,以及任选地,额外存在JAK/STAT信号转导,指示测试干扰素与rSIFN-co间是基本等效的。还任选地,可在使用例如约10mcg/ml的测试干扰素处理合适的细胞约1天至约6 天的情况下,进行细胞生存力的测定。任选地,在如下的任一种或更多种癌细胞 中:A549细胞、H1299细胞、H460细胞或HT-29细胞,测定对 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制,例如,通过用约10mcg/ml的测试干扰素处理这些细胞约24小时。任选地,通过测定STAT蛋白,例如STAT1、STAT2和/或STAT3磷酸化的存在测定JAK/STAT信号转导,例如用约10mcg/ml的测试干扰素对A549细胞或HeLa细胞 进行处理不同的时间,例如约5、15、30、60、120和/或240分钟。

[0090] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少2种上述活性,例如(a)和(b);(a)和(c);(a)和(d);(a)和(e);(a)和(f);(a)和(g);(a)和(h);(a)和(i);(a)和(j);(a)和(k);(b)和(c);(b)和(d);(b)和(e);(b)和(f);(b)和(g);(b)和(h);(b)和(i);(b)和(j);(b)和(k);(c)和(d);(c)和(e);(c)和(f);(c)和(g);(c)和(h);(c)和(i);(c)和(j);(c)和(k);(d)和(e);(d)和(f);(d)和(g);(d)和(h);(d)和(i);(d)和(j);(d)和(k);(e)和(f);(e)和(g);(e)和(h);(e)和(i);(e)和(j);(e)和(k);(f)和(g);(f)和(h);(f)和(i);(f)和(j);(f)和(k);(g)和(h);(g)和(i);(g)和(j);(g)和(k);(h)和(i);(h)和(j);(h)和(k);(i)和(j);(i)和(k);(j)和(k)。

[0091] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少3种上述活性,例如(a)、(b)和(c);(a)、(b)和(d);(a)、(b)和(e);(a)、(b)和(f);(a)、(b)和(g);(a)、(b)和(h);(a)、(b)和(i);(a)、(b)和(j);(a)、(b)和(k);(a)、(c)和(d);(a)、(c)和(e);(a)、(c)和(f);(a)、(c)和(g);(a)、(c)和(h);(a)、(c)和(i);(a)、(c)和(j);(a)、(c)和(k);(a)、(d)和(e);(a)、(d)和(f);(a)、(d)和(g);(a)、(d)和(h);(a)、(d)和(i);(a)、(d)和(j);(a)、(d)和(k);(a)、(e)

和(f); (a)、(e)和(g); (a)、(e)和(h); (a)、(e)和(i); (a)、(e)和(j); (a)、(e)和(k); (a)、(f)和(g); (a)、(f)和(h); (a)、(f)和(i); (a)、(f)和(j); (a)、(f)和(k); (a)、(g)和(h); (a)、(g)和(i); (a)、(g)和(j); (a)、(g)和(k); (a)、(h)和(i); (a)、(h)和(j); (a)、(h)和(k); (a)、(i)和(j); (a)、(i)和(k); (a)、(j)和(k); (b)、(c)和(d); (b)、(c)和(e); (b)、(c)和(f); (b)、(c)和(g); (b)、(c)和(h); (b)、(c)和(i); (b)、(c)和(j); (b)、(c)和(k); (b)、(d)和(e); (b)、(d)和(f); (b)、(d)和(g); (b)、(d)和(h); (b)、(d)和(i); (b)、(d)和(j); (b)、(d)和(k); (b)、(e)和(f); (b)、(e)和(g); (b)、(e)和(h); (b)、(e)和(i); (b)、(e)和(j); (b)、(e)和(k); (b)、(f)和(g); (b)、(f)和(h); (b)、(f)和(i); (b)、(f)和(j); (b)、(f)和(k); (b)、(g)和(h); (b)、(g)和(i); (b)、(g)和(j); (b)、(g)和(k); (b)、(h)和(i); (b)、(h)和(j); (b)、(h)和(k); (b)、(i)和(j); (b)、(i)和(k); (b)、(j)和(k); (c)、(d)和(e); (c)、(d)和(f); (c)、(d)和(g); (c)、(d)和(h); (c)、(d)和(i); (c)、(d)和(j); (c)、(d)和(k); (c)、(e)和(f); (c)、(e)和(g); (c)、(e)和(h); (c)、(e)和(i); (c)、(e)和(j); (c)、(e)和(k); (c)、(f)和(g); (c)、(f)和(h); (c)、(f)和(i); (c)、(f)和(j); (c)、(f)和(k); (c)、(g)和(h); (c)、(g)和(i); (c)、(g)和(j); (c)、(g)和(k); (c)、(h)和(i); (c)、(h)和(j); (c)、(h)和(k); (c)、(i)和(j); (c)、(i)和(k); (c)、(j)和(k); (d)、(e)和(f); (d)、(e)和(g); (d)、(e)和(h); (d)、(e)和(i); (d)、(e)和(j); (d)、(e)和(k); (d)、(f)和(g); (d)、(f)和(h); (d)、(f)和(i); (d)、(f)和(j); (d)、(f)和(k); (d)、(g)和(h); (d)、(g)和(i); (d)、(g)和(j); (d)、(g)和(k); (d)、(h)和(i); (d)、(h)和(j); (d)、(h)和(k); (d)、(i)和(j); (d)、(i)和(k); (d)、(j)和(k); (e)、(f)和(g); (e)、(f)和(h); (e)、(f)和(i); (e)、(f)和(j); (e)、(f)和(k); (e)、(g)和(h); (e)、(g)和(i); (e)、(g)和(j); (e)、(g)和(k); (e)、(h)和(i); (e)、(h)和(j); (e)、(h)和(k); (e)、(i)和(j); (e)、(i)和(k); (e)、(j)和(k); (f)、(g)和(h); (f)、(g)和(i); (f)、(g)和(j); (f)、(g)和(k); (f)、(h)和(i); (f)、(h)和(j); (f)、(h)和(k); (f)、(i)和(j); (f)、(i)和(k); (f)、(j)和(k); (g)、(h)和(i); (g)、(h)和(j); (g)、(h)和(k); (g)、(i)和(j); (g)、(i)和(k); (g)、(j)和(k); (h)、(i)和(j); (h)、(i)和(k); (h)、(j)和(k); (i)、(j)和(k)。

[0092] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少4种上述活性,例如(a)、(b)、(c)和(d); (a)、(b)、(c)和(e); (a)、(b)、(c)和(f); (a)、(b)、(c)和(g); (a)、(b)、(c)和(h); (a)、(b)、(c)和(i); (a)、(b)、(c)和(j); (a)、(b)、(c)和(k); (a)、(c)、(d)和(e); (a)、(c)、(d)和(f); (a)、(c)、(d)和(g); (a)、(c)、(d)和(h); (a)、(c)、(d)和(i); (a)、(c)、(d)和(j); (a)、(c)、(d)和(k); (a)、(d)、(e)和(f); (a)、(d)、(e)和(g); (a)、(d)、(e)和(h); (a)、(d)、(e)和(i); (a)、(d)、(e)和(j); (a)、(d)、(e)和(k); (a)、(e)、(f)和(g); (a)、(e)、(f)和(h); (a)、(e)、(f)和(i); (a)、(e)、(f)和(j); (a)、(e)、(f)和(k); (a)、(f)、(g)和(h); (a)、(f)、(g)和(i); (a)、(f)、(g)和(j); (a)、(f)、(g)和(k); (a)、(g)、(h)和(i); (a)、(g)、(h)和(j); (a)、(g)、(h)和(k); (a)、(h)、(i)和(j); (a)、(h)、(i)和(k); (a)、(i)、(j)和(k); (b)、(c)、(d)和(e); (b)、(c)、(d)和(f); (b)、(c)、(d)和(g); (b)、(c)、(d)和(h); (b)、(c)、(d)和(i); (b)、(c)、(d)和(j); (b)、(c)、(d)和(k); (b)、(d)、(e)和(f); (b)、(d)、(e)和(g); (b)、(d)、(e)和(h); (b)、(d)、(e)和(i); (b)、(d)、(e)和(j); (b)、(d)、(e)和(k); (b)、(e)、(f)和(g); (b)、(e)、(f)和(h); (b)、(e)、(f)和(i); (b)、(e)、(f)和(j); (b)、(e)、(f)和

(k); (b)、(f)、(g) 和 (h); (b)、(f)、(g) 和 (i); (b)、(f)、(g) 和 (j); (b)、(f)、(g) 和 (k); (b)、(g)、(h) 和 (i); (b)、(g)、(h) 和 (j); (b)、(g)、(h) 和 (k); (b)、(h)、(i) 和 (j); (b)、(h)、(i) 和 (k); (b)、(i)、(j) 和 (k); (c)、(d)、(e) 和 (f); (c)、(d)、(e) 和 (g); (c)、(d)、(e) 和 (h); (c)、(d)、(e) 和 (i); (c)、(d)、(e) 和 (j); (c)、(d)、(e) 和 (k); (c)、(d)、(f) 和 (g); (c)、(d)、(f) 和 (h); (c)、(d)、(f) 和 (i); (c)、(d)、(f) 和 (j); (c)、(d)、(f) 和 (k); (c)、(d)、(g) 和 (h); (c)、(d)、(g) 和 (i); (c)、(d)、(g) 和 (j); (c)、(d)、(g) 和 (k); (c)、(d)、(h) 和 (i); (c)、(d)、(h) 和 (j); (c)、(d)、(h) 和 (k); (c)、(e)、(f) 和 (g); (c)、(e)、(f) 和 (h); (c)、(e)、(f) 和 (i); (c)、(e)、(f) 和 (j); (c)、(f)、(g) 和 (h); (c)、(f)、(g) 和 (i); (c)、(f)、(g) 和 (j); (c)、(f)、(g) 和 (k); (c)、(g)、(h) 和 (i); (c)、(g)、(h) 和 (j); (c)、(g)、(h) 和 (k); (c)、(h)、(i) 和 (j); (c)、(h)、(i) 和 (k); (c)、(i)、(j) 和 (k); (d)、(e)、(f) 和 (g); (d)、(e)、(f) 和 (h); (d)、(e)、(f) 和 (i); (d)、(e)、(f) 和 (j); (d)、(e)、(f) 和 (k); (d)、(f)、(g) 和 (h); (d)、(f)、(g) 和 (i); (d)、(f)、(g) 和 (j); (d)、(f)、(g) 和 (k); (d)、(g)、(h) 和 (i); (d)、(g)、(h) 和 (j); (d)、(g)、(h) 和 (k); (d)、(h)、(i) 和 (j); (d)、(h)、(i) 和 (k); (d)、(i)、(j) 和 (k); (e)、(f)、(g) 和 (h); (e)、(f)、(g) 和 (i); (e)、(f)、(g) 和 (j); (e)、(f)、(g) 和 (k); (e)、(g)、(h) 和 (i); (e)、(g)、(h) 和 (j); (e)、(g)、(h) 和 (k); (e)、(h)、(i) 和 (j); (e)、(h)、(i) 和 (k); (e)、(i)、(j) 和 (k); (f)、(g)、(h) 和 (i); (f)、(g)、(h) 和 (j); (f)、(g)、(h) 和 (k); (f)、(h)、(i) 和 (j); (f)、(h)、(i) 和 (k); (f)、(i)、(j) 和 (k); (g)、(h)、(i) 和 (j); (g)、(h)、(i) 和 (k); (g)、(i)、(j) 和 (k); (h)、(i)、(j) 和 (k)。

[0093] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少5种上述活性,例如(a)、(b)、(c)、(d)和(e);(a)、(b)、(c)、(d)和(f);(a)、(b)、(c)、(d)和(g);(a)、(b)、(c)、(d)和(h);(a)、(b)、(c)、(d)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)和(k);(a)、(c)、(d)、(e)和(f);(a)、(c)、(d)、(e)和(g);(a)、(c)、(d)、(e)和(h);(a)、(c)、(d)、(e)和(i);(a)、(c)、(d)、(e)和(j);(a)、(c)、(d)、(e)和(k);(a)、(d)、(e)、(f)和(g);(a)、(d)、(e)、(f)和(h);(a)、(d)、(e)、(f)和(i);(a)、(d)、(e)、(f)和(j);(a)、(d)、(e)、(f)和(k);(a)、(e)、(f)、(g)和(h);(a)、(e)、(f)、(g)和(i);(a)、(e)、(f)、(g)和(j);(a)、(e)、(f)、(g)和(k);(a)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(f)、(g)、(h)和(k);(b)、(c)、(d)、(e)和(f);(b)、(c)、(d)、(e)和(g);(b)、(c)、(d)、(e)和(h);(b)、(c)、(d)、(e)和(i);(b)、(c)、(d)、(e)和(j);(b)、(c)、(d)、(e)和(k);(b)、(d)、(e)、(f)和(g);(b)、(d)、(e)、(f)和(h);(b)、(d)、(e)、(f)和(i);(b)、(d)、(e)、(f)和(j);(b)、(d)、(e)、(f)和(k);(b)、(e)、(f)、(g)和(h);(b)、(e)、(f)、(g)和(i);(b)、(e)、(f)、(g)和(j);(b)、(e)、(f)、(g)和(k);(b)、(f)、(g)、(h)和(i);(b)、(f)、(g)、(h)和(j);(b)、(f)、(g)、(h)和(k);(c)、(d)、(e)、(f)和(g);(c)、(d)、(e)、(f)和(h);(c)、(d)、(e)、(f)和(i);(c)、(d)、(e)、(f)和(j);(c)、(d)、(e)、(f)和(k);(c)、(e)、(f)、(g)和(h);(c)、(e)、(f)、(g)和(i);(c)、(e)、(f)、(g)和(j);(c)、(e)、(f)、(g)和(k);(c)、(f)、(g)、(h)和(i);(c)、(f)、(g)、(h)和(j);(c)、(f)、(g)、(h)和(k);(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(d)、(f)、(g)、(h)和(i);(d)、(f)、(g)、(h)和(j);(d)、(f)、(g)、(h)和(k);(f)、(g)、(h)、(i)和(j);(f)、(g)、(h)、(i)和(k);(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0094] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试

干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少6种上述活性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(k);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)。

[0095] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少7种上述活性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k)。

[0096] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少8种上述活性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(k);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(k);(a)、(b)、(c)、

(d)、(e)、(f)、(g)和(i);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j);(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k)。

[0097] 在一些实施方式中,在上述方法的步骤(2)中,在相同的特定条件下,对所述测试干扰素和rSIFN-co或rSIFN-co替代物测定至少9种、10种或所有11种上述活性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0098] 在一些实施方式中,在测定活性(a)中,当与对照相比测试干扰素以统计学显著方式(例如 $p < 0.05$ ,任选地, $p < 0.01$ ,进一步任选地, $p < 0.005$ ,更任选地, $p < 0.001$ ,还任选地, $p < 0.0005$ ,还更任选地, $p < 0.0001$ )存在(a)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0099] 在一些实施方式中,在测定活性(a)中使用的荷瘤动物模型包括小鼠,任选地,裸小鼠,更任选地,BALB/cAnu/nu小鼠。在一些实施方式中,所述小鼠,例如,BALB/cAnu/nu小鼠,包括约3至约7周龄,任选地,约4至约6周龄的小鼠。在一些实施方式中,所述小鼠,例如,BALB/cAnu/nu小鼠,体重在约 $15 \pm 2$ g至约 $30 \pm 2$ g,任选地,约 $19 \pm 2$ g至约 $23 \pm 2$ g的范围内。

[0100] 在一些实施方式中,在测定活性(a)对体内癌细胞生长的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肝癌细胞、宫颈癌细胞、结肠癌细胞和肺癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(a)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:SMMC-7721细胞、HeLa细胞、HT-29细胞、SPC-A4细胞和A549细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:HT-29细胞、SPC-A4细胞和A549细胞;进一步任选地,包括A549细胞。

[0101] 在一些实施方式中,在测定活性(a)抑制作用中生理盐水或PBS,任选地,生理盐水被用作对照。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以约0.02mg至约0.30mg;任选地,约0.05mg至约0.15mg,进一步任选地,约0.075mg至约0.10mg的量施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以每隔一天施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物施用持续约2周至约6周;任选地,约3周至约4周。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的对照以约0.05ml至约0.30ml;任选地,约0.10ml至约0.20ml的量施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的对照以每隔一天施用。在一些实施方式中,在测定活性(a)中被施用于荷瘤动物模型的对照施用持续约2周至约6周;任选地,约3周至约4周。在一些实施方式中,瘤内施用测试干扰素和/或对照。

[0102] 在一些实施方式中,在测定活性(a)中当使用SMMC-7721细胞时,与对照(例如生理盐水)相比,测试干扰素以统计学显著方式(例如对于约0.05mg和约0.10mg, $p < 0.05$ ,任选地,对于约0.15mg, $p < 0.01$ )存在(a)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以约0.02mg至约0.30mg;任选地,约0.05mg至约0.15mg,进一步任选地,约0.075mg至约0.10mg的量每隔一天施用,持续约3周。

[0103] 在一些实施方式中,在测定活性(a)中当使用HeLa细胞时,与对照(例如生理盐水)相比,测试干扰素以统计学显著方式(例如对于约0.15mg, $p < 0.05$ ,任选地,对于约

0.05mg和约0.10mg,  $p < 0.01$ ) 存在 (a) 中指定的活性, 表示所述 测试干扰素与rSIFN-co或 rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等 效的。在一些实施方式中, 测试干 扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以约0.02 mg至约0.30mg; 任选地, 约0.05mg至约 0.15mg, 进一步任选地, 约0.075mg 至约0.10mg的量每隔一天施用, 持续约4周。

[0104] 在一些实施方式中, 在测定活性 (a) 中当使用HT-29细胞时, 与对照 (例如 生理盐 水) 相比, 测试干扰素以统计学显著方式 (例如对于约0.10mg和约0.15 mg,  $p < 0.01$ , 任选 地, 对于约0.05mg,  $p < 0.001$ ) 存在 (a) 中指定的活性, 表示 所述测试干扰素与rSIFN-co或 rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基 本等效的。在一些实施方式中, 测试干 扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物以约 0.02mg至约0.30mg; 任选地, 约0.05mg至约 0.15mg, 进一步任选地, 约0.075mg 至约0.10mg的量每隔一天施用, 持续约4周。

[0105] 在一些实施方式中, 在测定活性 (a) 中当使用SPC-A4细胞时, 与对照 (例 如生理盐 水) 相比, 测试干扰素以统计学显著方式 (例如对于约0.05mg、约0.10 mg和约0.15mg,  $p < 0.01$ ) 存在 (a) 中指定的活性, 表示所述测试干扰素与rSIFN-co 或rSIFN-co替代物具有基 本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式 中, 测试干扰素和/或rSIFN-co或 rSIFN-co替代物以约0.02mg至约0.30mg; 任选 地, 约0.05mg至约0.15mg, 进一步任选地, 约 0.075mg至约0.10mg的量每隔一 天施用, 持续约3周。

[0106] 在一些实施方式中, 在测定活性 (a) 中当使用A549细胞时, 与对照 (例如 PBS) 相 比, 测试干扰素以统计学显著方式 (例如 $p < 0.0001$ ) 存在 (a) 中指定的活 性, 表示所述测试 干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/ 或是基本等效的。在一些 实施方式中, 测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代 物以约0.02mg至约0.30mg; 任选 地, 约0.05mg至约0.15mg, 进一步任选地, 约0.075mg至约0.10mg的量每隔一天施用, 持续 约3周。

[0107] 在一些实施方式中, 在测定活性 (b) 对癌细胞生存力的降低中, 当测试干 扰素在 约6.25mcg/ml至约25mcg/ml; 任选地, 约10mcg/ml至约18mcg/ml; 更任 选地, 约10mcg/ml至 约15mcg/ml的浓度范围下, 引起癌细胞生存力约50%下降, 表示所述测试干扰素与rSIFN-co 或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或 是基本等效的。在一些实施方式中, 在 测定活性 (b) 中, 当测试干扰素在至少约 25mcg/ml; 任选地, 至少约50mcg/ml, 进一步任 选地, 至少约75mcg/ml; 更任 选地, 至少约100mcg/ml的浓度下, 引起癌细胞生存力至基本上 无法检测的水平, 表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的 效力和/或 是基本等效的。

[0108] 在一些实施方式中, 在测定活性 (b) 中, 测试干扰素和/或rSIFN-co或 rSIFN-co替 代物的浓度包括在约0.2mcg/ml至约100mcg/ml的浓度。在一些实施 方式中, 测试干扰素 和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物的浓度为至少两种或更多种 的以下浓度: 0.2mcg/ml、 0.39mcg/ml、0.78mcg/ml、1.56mcg/ml、3.13mcg/ml、 6.25mcg/ml、12.5mcg/ml、25mcg/ml、 50mcg/ml和100mcg/ml。在一些实施方 式中, 在测定活性 (b) 中, 用测试干扰素和/或rSIFN-co 或rSIFN-co替代物处理癌细 胞至少约1天; 任选地, 至少约2天。

[0109] 在一些实施方式中, 在测定活性 (b) 中所使用的癌细胞包括如下的任一种 或更多 种: 肺癌细胞、结肠癌细胞、宫颈癌细胞、肝癌细胞、乳腺癌细胞和前列 腺癌细胞; 任选地, 包括如下的任一种或更多种: 肺癌细胞、结肠癌细胞、肝癌 细胞、乳腺癌细胞和前列腺癌细

胞。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、Hela细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞和PANC-1细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、SW480细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞、SMMC-7721细胞和PANC-1细胞。

[0110] 在一些实施方式中,在测定活性(b)中,当所述测试干扰素在约6.25mcg/ml至约12.5mcg/ml的浓度范围下进行处理后,引起SW480细胞、MDA-MB-231细胞和PANC-1细胞中的任一种或更多种的生存力约50%下降,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0111] 在一些实施方式中,在测定活性(b)中,当所述测试干扰素在约12.5mcg/ml至约25mcg/ml的浓度范围下进行处理后,引起A549细胞、Hela细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、Calu-1细胞和SMMC-7721细胞中的任一种或更多种的生存力约50%下降,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0112] 在一些实施方式中,在测定活性(b)中,当使用A549细胞和/或SW620细胞,与对照(例如IFN $\alpha$ -2b)相比,测试干扰素以统计学显著方式(例如 $p < 0.01$ )存在(b)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(b)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(b)中所使用的癌细胞被处理约1天至约10天;任选地,约1天至约6天。

[0113] 在一些实施方式中,在测定活性(b)中,通过Am-Blue法或MTT法测定癌细胞生存力。

[0114] 在一些实施方式中,在测定活性(c)中,当与对照相比测试干扰素以统计学显著方式(例如 $p < 0.01$ )存在(c)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,所述对照是未处理的对照(Mock)。

[0115] 在一些实施方式中,在测定活性(c)对癌细胞迁移的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(c)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,其中使用Transwell法测定活性(c)中对癌细胞迁移的抑制。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(c)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(c)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。

[0116] 在一些实施方式中,在测定活性(d)中,当与对照相比测试干扰素以统计学显著方式(例如 $p < 0.05$ ,任选地, $p < 0.01$ )存在(d)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,所述对照是未处理的对照(Mock)。

[0117] 在一些实施方式中,在测定活性(d)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式

中,在测定活性(d)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H1299细胞、H460细胞、HT-29细胞和SW620细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H1299细胞、H460细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(d)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(d)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中, $\beta$ -联蛋白/TCF的转录活性通过使用报告系统来测定。在一些实施方式中,所述报告系统包括TOPFlash或pSV40-RL质粒。

[0118] 在一些实施方式中,在测定活性(e)中,当与对照相比测试干扰素以统计学显著方式(例如 $p < 0.005$ ,任选地, $p < 0.001$ ,进一步任选地, $p < 0.0005$ )存在(e)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,所述对照是未处理的对照(Mock)。

[0119] 在一些实施方式中,在测定活性(e)对癌细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(e)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H460细胞、SW620细胞和HT-29细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞、SW620细胞和HT-29细胞;更任选地,包括HT-29细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(e)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(e)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(e)中通过测定LRP6和/或FZD6的mRNA水平来确定LRP6和/或FZD6的表达。在一些实施方式中,当测定mRNA水平时,使用GAPDH作为对照。

[0120] 在一些实施方式中,在测定活性(f)中,当与对照相比测试干扰素以统计学显著方式(例如, $p < 0.0005$ ,任选地, $p < 0.0001$ )存在(f)中指定的活性,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在一些实施方式中,所述对照是未处理的对照(Mock)。

[0121] 在一些实施方式中,在测定活性(f)对Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的表达的抑制中所使用的癌细胞包括肺癌细胞;任选地,包括A549细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(f)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(f)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(f)中通过测定Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2的mRNA水平来确定其相应的表达。在一些实施方式中,当测定mRNA水平时,使用GAPDH作为对照。

[0122] 在一些实施方式中,在测定活性(f)中,当与对照相比测试干扰素降低癌细胞中Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或更多种的至少约30%;任选地,至少约40%;更任选地,至少约50%;还更优选地,至少约60%的表达,则所述测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物被认为具有基本上相同的效力或基本上等效。

[0123] 在一些实施方式中,在测定活性(g)中,当所述测试干扰素基本上抑制了癌细胞

中伪足的形成,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在此,“基本上抑制”指至少约60%抑制;任选地,至少约70%抑制;更任选地,至少约80%抑制;进一步任选地,至少约90%抑制;还更任选地,至少约95%抑制。

[0124] 在一些实施方式中,在测定活性(g)对癌细胞中伪足形成的抑制中所使用的癌细胞包括肺癌细胞;任选地,A549细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(g)中所使用的癌细胞至少约4天;任选地,至少约8天。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(g)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在Matrigel中培养在测定活性(g)中所使用的癌细胞。

[0125] 在一些实施方式中,在测定活性(h)中,当所述测试干扰素引起癌细胞中 $\beta$ -联蛋白水平明显下降,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。在此,当例如在蛋白质印迹上与处理前相比表示蛋白质的条带变得暗淡或消失时,则处理后癌细胞中 $\beta$ -联蛋白水平明显下降。

[0126] 在一些实施方式中,在测定活性(h)对癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(h)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW480细胞。在一些实施方式中,在测定活性(h)中通过蛋白质印迹测定对 $\beta$ -联蛋白表达的抑制。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(h)中所使用的癌细胞至少约48小时;任选地,至少约72小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(h)中所使用的癌细胞。

[0127] 在一些实施方式中,在测定活性(i)中,当与IFN $\alpha$ -2b相比所述测试干扰素能更有效地上调癌细胞中如下的任一种或更多种的表达:DKK-3、KLF-4和BATF2,表示所述测试干扰素与rSIFN-co或rSIFN-co替代物具有基本上相同的效力和/或是基本等效的。

[0128] 在一些实施方式中,在测定活性(i)对癌细胞中DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:肺癌细胞和结肠癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(i)中所使用的癌细胞包括如下的任一种或更多种:A549细胞、H460细胞、SW620细胞和HT-29细胞;任选地,包括如下的任一种或更多种:A549细胞和SW620细胞。在一些实施方式中,用测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(i)中所使用的癌细胞至少约20小时;任选地,至少约24小时。在一些实施方式中,使用约5mcg/ml至约20mcg/ml;任选地,约10mcg/ml的测试干扰素和/或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处理在测定活性(i)中所使用的癌细胞。在一些实施方式中,在测定活性(i)中通过测定DKK-3、KLF-4和/或BATF2的mRNA水平来确定其相应的表达。在一些实施方式中,当测定mRNA水平时,使用GAPDH作为对照。

[0129] 在一些实施方式中,统计学显著指当与对照相比,p值小于或等于0.05,或小于或等于0.01,或小于或等于0.005,或小于或等于0.001,或小于或等于0.0005,或小于或等于0.0001。

[0130] 在一些实施方式中,所述对照不用测试干扰素或rSIFN-co或rSIFN-co替代物处

理,或用生理盐水或PBS处理,或用IFN $\alpha$ -2b处理,或所述对照为未处理对照(Mock)。

[0131] 在一个方面,本发明提供确定或比较化合物(例如,测试干扰素)的效力的方法,包括:(a)提供多个浓度的测试干扰素;(b)使用该多个浓度的测试干扰素,在特定条件下确定测试干扰素针对第一组癌细胞的生存力的第一剂量反应;(c)提供多个浓度的rSIFN-co或rSIFN-co的替代物(下文中称为“rSIFN-co替代物”);(d)使用该多个浓度的rSIFN-co或rSIFN-co替代物,在相同的特定条件下确定rSIFN-co或rSIFN-co替代物针对第二组癌细胞的生存力的第二剂量反应;以及(e)比较第一剂量反应与第二剂量反应。以这种方式,确定化合物例如测试干扰素相对于rSIFN-co或rSIFN-co替代物的效力。

[0132] 在本发明的一些实施方式中,通过在大肠杆菌宿主中,任选地在大肠杆菌宿主中在启动子P<sub>BAD</sub>的控制下表达新的多核苷酸(SEQ ID NO:2)来制备如美国专利7,364,724(重组高效复合干扰素)中记载的rSIFN-co(SEQ ID NO:1)。在本发明的一些实施方式中,rSIFN-co可获得自包括将SEQ ID NO:2所示的多核苷酸序列导入大肠杆菌中的方法。在本发明的一些实施方式中,rSIFN-co具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并为SEQ ID NO:2的核苷酸序列所编码,其中与不为SEQ ID NO:2的核苷酸序列所编码的干扰素例如干扰素 alfacon-1 (INFERGEN®)相比,所述干扰素对乙肝病毒表面抗原(HbsAg)和乙肝病毒e抗原(HbeAg)的表达具有增加的抑制活性。

[0133] 在一些实施方式中,用于本文方法中的rSIFN-co包括特定的比活性,该比活性可以是,例如在约 $4 \times 10^8$  IU/mg至约 $1 \times 10^9$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $4.4 \times 10^8$  IU/mg至约 $9 \times 10^8$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $5 \times 10^8$  IU/mg至约 $8 \times 10^8$  IU/mg的范围内。在一些实施方式中,比活性在约 $6 \times 10^8$  IU/mg至约 $7.5 \times 10^8$  IU/mg的范围内。任选地,比活性在约 $4 \times 10^8$  IU/mg至约 $5 \times 10^8$  IU/mg的范围内。

[0134] 在一些实施方式中,在确定或比较化合物效力的方法中,测试干扰素或rSIFN-co的浓度在约0.2mcg/ml至约100mcg/ml的范围内。在一些实施方式中,测试干扰素或rSIFN-co的浓度为至少两种或更多种的以下浓度:0.2mcg/ml、0.39 mcg/ml、0.78mcg/ml、1.56mcg/ml、3.13mcg/ml、6.25mcg/ml、12.5mcg/ml、25mcg/ml、50mcg/ml和100mcg/ml。

[0135] 在一些实施方式中,用于本文的确定rSIFN-co效果的方法中的细胞是癌细胞,其是人细胞或是动物细胞。使用测试干扰素或rSIFN-co处理细胞至少约24小时,任选地为至少约48小时,且再任选地,至少约72小时,除非另外指出,在标准培养条件下,在完全培养基中,在37°C下,在5%CO<sub>2</sub>氛中。培养基可以是适于培养肿瘤细胞的任何标准完全培养基,例如可得自Shanghai Cell Collection,(中国上海)的培养基,并补充有10%胎牛血清(Biochrom,Germany)、4mM谷氨酰胺、50U/ml青霉素和50mg/ml链霉素。IFN $\alpha$ -2b可以得自上海华新生物高技术有限公司(中国上海),以及rSIFN-co可以得自四川辉阳生命工程股份有限公司(中国成都)。

[0136] 在一些实施方式中,本发明提供具有能够在约6.25mcg/ml至约25mcg/ml的浓度范围内(取决于癌细胞类型)使癌细胞生存力降低50%的能力的rSIFN-co。在一些实施方式中,rSIFN-co能够在约6.25mcg/ml至12.5mcg/ml的浓度范围内使细胞的生存力降低50%。在另一实施方式中,rSIFN-co能够在约12.5mcg/ml至25 mcg/ml的浓度范围内使细胞生存力降低50%。在一些实施方式中,rSIFN-co的IC<sub>50</sub>在约10mcg/ml至约18mcg/ml的范围内。

[0137] 在一些实施方式中,测试干扰素也是干扰素,但是得自与在比较中使用的 rSIFN-co不同的生产批次。

[0138] 因此,例如,在确定化合物例如测试干扰素的效力时,测试干扰素被稀释到多种浓度,并将适于所使用容器的一定数量的制备细胞(例如 $5 \times 10^3$ 细胞于100 微升完全培养基中),与这些多种浓度的测试干扰素一起温育一定时间,例如48 小时。在温育之后,确定细胞的生存力并与相似地用rSIFN-co而非测试干扰素处理的细胞生存力进行比较。可以从结果中生成对于各个用测试干扰素处理的和用 rSIFN-co处理的细胞的剂量反应曲线并进行比较。以这种方式,可以在50%有效 剂量或 $IC_{50}$ 的层面上,确定测试干扰素相对于rSIFN-co的效力。

[0139] 在另一个方面,本发明提供确定或比较化合物(例如测试干扰素)相对于 rSIFN-co或rSIFN-co替代物的针对癌细胞生存力的效力的方法,包括:(a)提供 多个癌细胞;(b)在特定条件下用一定量的测试干扰素测试第一组癌细胞,以 生成第一组生存力数据;(c)在相同的特定条件下,用有效量的rSIFN-co或 rSIFN-co替代物处理第二组癌细胞,以生成第二组生存力数据;以及(d)比较 第一组生存力数据与第二组生存力数据,从而确定测试干扰素的效力。

[0140] 在一些实施方式中,在约1天至约6天的范围内处理癌细胞。在一些实施方式中,以约6.25mcg/ml至约50mcg/ml范围内的浓度使用rSIFN-co;任选地为约7 mcg/ml至约25mcg/ml;还任选地为约8mcg/ml至约12.5mcg/ml;更任选地为约 10mcg/ml。在一些实施方式中,rSIFN-co包含特定的比活性。

[0141] 在一些实施方式中,本文使用的癌细胞选自人肿瘤细胞和动物肿瘤细胞。在一些实施方式中,肿瘤细胞是肺肿瘤细胞、或宫颈肿瘤细胞、或肝肿瘤细胞、或结肠肿瘤细胞、或乳腺肿瘤细胞、或胰腺肿瘤细胞、或前列腺肿瘤细胞、或病毒引发的肿瘤细胞或病毒转化的细胞。在一些实施方式中,癌细胞选自A549细胞、Calu-1细胞、CL-1细胞、H460细胞、H1299细胞、HeLa细胞、HT29细胞、Huh-7细胞、MDA-MB-231细胞、PANC-1细胞、RAW264.7细胞、SMMC-7721 细胞、SW480细胞和SW620细胞中的至少一种。

[0142] 因此,例如,适于测试容器的合适体积的一定数量的癌细胞,例如 $2 \times 10^3$ 细胞于100微升完全培养基中,可以放置在96孔板中,使用约10mcg/ml的测试干 扰素或rSIFN-co处理,或不处理作为对照,其中处理持续1、2、3、4、5或6天,并且每天确定处理细胞的生存力相对于未处理对照组的生存力。在结束实验时,相对于未处理对照组生存力的处理细胞的生存力可以针对干扰素处理的天数进 行绘图。以这种方式,可以比较测试化合物降低癌细胞生存力的能力,并确定其 相对于rSIFN-co的效力。

[0143] 在一些实施方式中,本发明提供抑制(例如在肿瘤转移中发生的)细胞迁 移的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而抑制细胞迁 移。

[0144] 在一些实施方式中,通过在有效量的rSIFN-co的存在下于 $37^{\circ}\text{C}$ 将细胞温育 一段时间,例如24小时,或通过向动物或受试者施用有效量的rSIFN-co从而使一 定浓度的rSIFN-co保持足以获得所希望效果的一段时间,可在体外或体内实施本 文中提到的细胞例如肿瘤细胞暴露于rSIFN-co,上述所希望效果例如抑制转移中 的肿瘤细胞迁移、或抑制伪足生成、抑制 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性、抑制 $\beta$ -联蛋白 的表达、下调Wnt相关受体和/或共受体、下调Wnt信号转导下游靶标基因、上调 肿瘤抑制基因、以及本文中记载的其它情况。

[0145] 可以使用任何合适的市售试剂盒进行细胞迁移检测。例如,在本文中可以使用放置在Becton-Dickinson Biosciences (N.J.,USA)的24孔板中的含有微孔膜的8微米插入式小室(insert)。对于该检测,可以将37°C不含FBS的温热碳酸氢盐培养基添加到插入式小室的内部以及孔的底部,并允许在加湿组织培养箱中于37°C、5%CO<sub>2</sub>氛下复水约2小时。在复水之后,可以小心除去培养基,并且可以以约 $0.5 \times 10^4$ 细胞/插入式小室的密度将混悬于无FBS培养基的约500微升所制备细胞(例如在37°C下用rSIFN-co预处理24小时的细胞)接种到插入式小室滤器的上侧。之后,可以向24孔板的下室添加500微升含有10% FBS的完全培养基。然后可以在37°C下温育细胞/插入式小室/板约24小时,且可以用例如棉拭子除去在室膜上侧的非迁移细胞。可以例如用4%多聚甲醛固定含有迁移细胞的插入式培养小室的下表面,并用2%结晶紫染色。可以对在室膜相反侧的迁移细胞的数量进行计数,并确定单位区域的平均迁移细胞数。以这种方式,可以表明测试干扰素抑制肿瘤细胞迁移的能力。

[0146] 在一些实施方式中,rSIFN-co的有效量包括约5mcg/ml至约100mcg/ml;任选地为约8mcg/ml至约50mcg/ml;更任选地为约10mcg/ml至约25mcg/ml;更任选地为约12mcg/ml至约18mcg/ml。

[0147] 在另一个方面,本发明提供抑制癌细胞中伪足形成的方法,包括将癌细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而抑制伪足形成。

[0148] 在另一个方面,本发明提供抑制细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录活性的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间。

[0149] 在一些实施方式中,可以使用荧光素酶报告系统来确定 $\beta$ -联蛋白/TCF-介导的转录活性。在一些实施方式中,报告系统是TOPFlash报告系统。在一些实施方式中,使用质粒pSV40-RL。因此,例如,将待评测的细胞铺到96孔板上,例如每孔约 $1 \times 10^4$ 细胞,在37°C下温育约12小时,之后,用约100ng的TOPFlash (Millipore Corporation,Billerica,MA,USA)对其进行瞬时转染。为使转染效率标准化,还用1ng由SV40启动子驱动的内参报告基因海肾(Renilla reniformis)荧光素酶(pRL-SV40,Promega,Madison,WI)对细胞进行共转染。在转染6小时后,用于体外分析的细胞可以在之后用rSIFN-co处理约24小时。在用于体外分析的rSIFN-co处理之后或用于体内分析的转染之后,可以使用双荧光素酶检测系统试剂盒根据制造商的操作指南(Cat#:E1960,Promega)进行荧光素酶检测。相对荧光素酶活性可以确定为萤火虫荧光素酶/海肾荧光素酶(firefly/renilla luciferase)活性的比率。

[0150] 在另一个方面,本发明还提供降低细胞中 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间。在一些实施方式中,使用其特异性抗体经蛋白质印迹来检测 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平。在一些实施方式中,使用GAPDH作为对照。

[0151] 对于确定细胞(细胞来自体外培养或来自体内肿瘤样本)中 $\beta$ -联蛋白水平的蛋白质印迹分析,可以采用标准步骤。例如,可以使用提取试剂(Cat#:P0013)遵循制造商的操作指南(Beyotime,China)来提取总细胞蛋白。可以使用Bio-Rad Lowry蛋白检测系统来确定蛋白浓度。可以通过SDS-PAGE在10%~12%胶上来分离总蛋白,之后将其转移到0.45微米的硝酸纤维素膜(Millipore Corporation, Billerica,MA,USA)上。该膜可以用封闭缓冲液(5%牛血清白蛋白、10mmol/L Tris-HCl pH8.0、150mol/L NaCl,和0.05%吐温20)在4

℃下封闭过夜,之后与一抗(1:1000稀释)一起温育,接着与HRP结合的二抗温育。抗体可以来自任何卖家,例如可以使用以下抗体:小鼠单克隆β-联蛋白抗体(1:1000,Santa Cruz Technology,Santa Cruz,CA)、小鼠单克隆GAPDH抗体(1:2000,Kangwei Biotechnology,China)和抗小鼠HRP结合的二抗(1:2000,Santa Cruz Technology)等。可以使用冷光/荧光成像LAS4000系统(GE Healthcare Life Sciences,USA)和super signal west pico化学发光底物试剂盒(Thermo Scientific,USA)来对印迹进行可视化。

[0152] 在另一个方面,本发明提供下调细胞中Wnt相关受体或共受体的表达的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而下调Wnt相关受体或共受体。在一些实施方式中,Wnt相关受体或共受体包括LRP蛋白,例如LRP6。在一些实施方式中,Wnt信号转导受体或共受体包括FZD蛋白,例如FZD6。如上所述,将细胞暴露于rSIFN-co的方法可以是体外方法或体内方法。

[0153] 在一些实施方式中,确定Wnt相关受体或共受体的表达包括确定这些受体或共受体的mRNA水平。可以通过任何标准方法确定这些mRNA水平。在一些实施方式中,制备与这些mRNA对应的cDNA来确定这些mRNA水平。例如,可以使用TRIZOL试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)根据制造商的说明书来分离总mRNA。可以使用RT-PCT试剂盒(Cat#:FSQ-101,TOYOBO,Japan)根据制造商的说明书来合成互补DNA(cDNA),之后使用SYBR Green PCR试剂盒(Cat#:QPK-201,TOYOBO,Japan)来进行定量PCR(qPCR)。可使用合适的引物,例如,用于LRP6的引物可以是,正义引物:5'-TGAAGAACCAGCACACAGG-3'(SEQ ID NO:4);反义引物:5'-CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3'(SEQ ID NO:5),且用于FZD6的引物可以是,正义引物:5'-GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3'(SEQ ID NO:6);反义引物:5'-TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC-3'(SEQ ID NO:7)。扩增方案可以是,在95℃下温育1分钟,40个循环(95℃,15秒;60℃,15秒;以及72℃,30秒)。SYBR Green染料结合入PCR产物中可以用Bio-Rad检测系统进行实时监测,然后使用Bio-Rad CFX manager 2.1软件进行分析。可对各个条件汇集样品,并平行运行。可以使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法将干扰素处理的样品与Mock未处理样品进行比较,并针对倍率变化来绘图。可以使用GAPDH作为标准化对照。该 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法通常用于分析来自实时定量PCR实验的基因表达的相对变化。

[0154] 在另一个方面,本发明提供下调细胞中某些基因(包括Wnt信号转导通路中的至少一个靶标基因)的表达的方法,例如用于治疗靶标基因突变或过度活跃的疾病或症状。这些下调基因包括例如Axin2、CD24、存活蛋白和/或ID2。该方法包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而抑制靶标基因的表达。下调的程度可以通过标准技术例如之前所述的qPCR来确定。例如,对于这些qPCR,对于Axin2,可以使用正义引物:5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3'(SEQ ID NO:8)和反义引物:5'-GCTGTTGTTCTCAATGTA-3'(SEQ ID NO:9);对于CD24,可以使用正义引物5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC-3'(SEQ ID NO:10)和反义引物5'-GAAAACCTGAATCTCCATTCCACAA-3'(SEQ ID NO:11);对于存活蛋白,可以使用正义引物:5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3'(SEQ ID NO:12)和反义引物5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTC-3'(SEQ ID NO:13);以及对于ID2,可以使用正义引物5'-CACAACAACAACAACAAC-3'(SEQ ID NO:14)和反义引物5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3'(SEQ ID NO:15)。

[0155] 在本发明的一些实施方式中,细胞暴露于rSIFN-co的特定时间为至少约12小时;

任选地,至少约20小时;再任选地,至少约24小时;再任选地,至少约36 小时;再任选地,至少约48小时;再任选地,至少约72小时。在一些实施方式中, rSIFN-co处理的细胞是癌细胞。

[0156] 在另一个方面,本发明提供上调细胞中某些基因(包括至少一种肿瘤抑制 基因)的表达的方法,包括将细胞暴露于有效量的rSIFN-co一段特定时间,从而 实现对至少一种肿瘤抑制基因的表达的上调。在一些实施方式中,上调的基因包 括DKK3、KLF4和BATF2中的至少一种。可以通过标准技术确定这些基因的上 调程度。在一些实施方式中,通过测定 mRNA水平来确定上调基因的表达。在一 些实施方式中,从这些mRNA合成cDNA并任选地扩增以用于此测定目的。作为 一个实例,对于扩增目的,可以使用以下引物:对于BATF2,正义引物 5' - CAGAGCAGGGAGCACAACC - 3' (SEQ ID NO:16) 和反义引物 5' - TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG - 3' (SEQ ID NO:17); 对于DKK3,正义 引物5' - GGAGCCTGACTGAAGAGATGG - 3' (SEQ ID NO:18) 和反义引物 5' - ACGCCTAAAGCACACCTG - 3' (SEQ ID NO:19); 对于KLF4,正义引 物5' - CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC - 3' (SEQ ID NO:20) 和反义引物 5' - GGCTGCTGCGGCGGAATG - 3' (SEQ ID NO:21)。

[0157] 在另一个方面,本发明提供在至少1种,任选地为至少2、3、4、5、6、7、 8、9、10或11种下列活性上建立测试化合物与rSIFN-co或rSIFN-co替代物间的基 本等效性的方法,包括对其比较这些活性并显示出基本相同的反应:(a) 对任一 或更多种荷瘤动物模型体内癌细胞生长的抑制;(b) 对癌细胞生存力的降低;(c) 对癌细胞迁移的抑制;(d) 对癌细胞中 $\beta$ - 联蛋白/TCF转录活性的抑制;(e) 对癌 细胞中LRP6和/或FZD6的表达的下调;(f) 对癌细胞 中Axin2、CD24、存活蛋白 和ID2中任一种或更多种的表达的抑制;(g) 对癌细胞中伪足形成的 抑制;(h) 对 癌细胞中 $\beta$ -联蛋白表达的抑制;(i) 对癌细胞例如A549细胞或SW620细胞中 DKK-3、KLF-4和BATF2中任一种或更多种的表达的上调;(j) 与IFN $\alpha$ -2b相比更 高的结合 IFNAR1的亲力和/或更低的结合IFNAR2的亲力和;和(k) 在对癌细胞 p-STAT表达的上调 中与IFN $\alpha$ -2b相比更低的对B18R抑制的敏感性。在一些实施 方式中,本发明提供在至少2种 上述活性中建立基本等效性,例如(a) 和(b); (a) 和(c); (a) 和(d); (a) 和(e); (a) 和(f); (a) 和(g); (a) 和(h); (a) 和(i); (a) 和(j); (a) 和(k); (b) 和(c); (b) 和(d); (b) 和(e); (b) 和(f); (b) 和(g); (b) 和(h); (b) 和(i); (b) 和(j); (b) 和(k); (c) 和(d); (c) 和(e); (c) 和(f); (c) 和(g); (c) 和(h); (c) 和(i); (c) 和(j); (c) 和(k); (d) 和(e); (d) 和(f); (d) 和(g); (d) 和(h); (d) 和(i); (d) 和(j); (d) 和(k); (e) 和(f); (e) 和(g); (e) 和(h); (e) 和(i); (e) 和(j); (e) 和(k); (f) 和(g); (f) 和(h); (f) 和(i); (f) 和(j); (f) 和(k); (g) 和(h); (g) 和(i); (g) 和(j); (g) 和(k); (h) 和(i); (h) 和(j); (h) 和(k); (i) 和(j); (i) 和(k); (j) 和(k); 任选地,本发明提供在至少3种上述活性中建 立基本等效性,例如(a)、(b) 和(c); (a)、(b) 和(d); (a)、(b) 和(e); (a)、(b) 和(f); (a)、(b) 和(g); (a)、(b) 和(h); (a)、(b) 和(i); (a)、 (b) 和(j); (a)、(b) 和(k); (a)、(c) 和(d); (a)、(c) 和(e); (a)、(c) 和(f); (a)、(c) 和(g); (a)、(c) 和(h); (a)、(c) 和(i); (a)、(c) 和(j); (a)、(c) 和(k); (a)、(d) 和(e); (a)、(d) 和(f); (a)、(d) 和(g); (a)、(d) 和(h); (a)、(d) 和(i); (a)、(d) 和(j); (a)、(d) 和(k); (a)、(e) 和(f); (a)、(e) 和(g); (a)、(e) 和(h); (a)、(e) 和(i); (a)、(e) 和(j); (a)、(e) 和(k); (a)、 (f) 和(g); (a)、(f) 和(h); (a)、(f) 和(i); (a)、(f) 和(j); (a)、(f) 和(k); (a)、(g) 和(h); (a)、(g) 和(i); (a)、(g) 和(j); (a)、(g) 和(k); (a)、(h) 和(i); (a)、(h) 和(j); (a)、(h) 和

(k); (a)、(i)和(j); (a)、(i)和(k); (a)、(j)和(k); (b)、(c)和(d); (b)、(c)和(e); (b)、(c)和(f); (b)、(c)和(g); (b)、(c)和(h); (b)、(c)和(i); (b)、(c)和(j); (b)、(c)和(k); (b)、(d)和(e); (b)、(d)和(f); (b)、(d)和(g); (b)、(d)和(h); (b)、(d)和(i); (b)、(d)和(j); (b)、(d)和(k); (b)、(e)和(f); (b)、(e)和(g); (b)、(e)和(h); (b)、(e)和(i); (b)、(e)和(j); (b)、(e)和(k); (b)、(f)和(g); (b)、(f)和(h); (b)、(f)和(i); (b)、(f)和(j); (b)、(f)和(k); (b)、(g)和(h); (b)、(g)和(i); (b)、(g)和(j); (b)、(g)和(k); (b)、(h)和(i); (b)、(h)和(j); (b)、(h)和(k); (b)、(i)和(j); (b)、(i)和(k); (b)、(j)和(k); (c)、(d)和(e); (c)、(d)和(f); (c)、(d)和(g); (c)、(d)和(h); (c)、(d)和(i); (c)、(d)和(j); (c)、(d)和(k); (c)、(e)和(f); (c)、(e)和(g); (c)、(e)和(h); (c)、(e)和(i); (c)、(e)和(j); (c)、(e)和(k); (c)、(f)和(g); (c)、(f)和(h); (c)、(f)和(i); (c)、(f)和(j); (c)、(f)和(k); (c)、(g)和(h); (c)、(g)和(i); (c)、(g)和(j); (c)、(g)和(k); (c)、(h)和(i); (c)、(h)和(j); (c)、(h)和(k); (c)、(i)和(j); (c)、(i)和(k); (c)、(j)和(k); (d)、(e)和(f); (d)、(e)和(g); (d)、(e)和(h); (d)、(e)和(i); (d)、(e)和(j); (d)、(e)和(k); (d)、(f)和(g); (d)、(f)和(h); (d)、(f)和(i); (d)、(f)和(j); (d)、(f)和(k); (d)、(g)和(h); (d)、(g)和(i); (d)、(g)和(j); (d)、(g)和(k); (d)、(h)和(i); (d)、(h)和(j); (d)、(h)和(k); (d)、(i)和(j); (d)、(i)和(k); (d)、(j)和(k); (e)、(f)和(g); (e)、(f)和(h); (e)、(f)和(i); (e)、(f)和(j); (e)、(f)和(k); (e)、(g)和(h); (e)、(g)和(i); (e)、(g)和(j); (e)、(g)和(k); (e)、(h)和(i); (e)、(h)和(j); (e)、(h)和(k); (e)、(i)和(j); (e)、(i)和(k); (e)、(j)和(k); (f)、(g)和(h); (f)、(g)和(i); (f)、(g)和(j); (f)、(g)和(k); (f)、(h)和(i); (f)、(h)和(j); (f)、(h)和(k); (f)、(i)和(j); (f)、(i)和(k); (f)、(j)和(k); (g)、(h)和(i); (g)、(h)和(j); (g)、(h)和(k); (g)、(i)和(j); (g)、(i)和(k); (g)、(j)和(k); (h)、(i)和(j); (h)、(i)和(k); (h)、(j)和(k); (i)、(j)和(k); 任选地, 在至少4种上述活性中建立基本等效性, 例如(a)、(b)、(c)和(d); (a)、(b)、(c)和(e); (a)、(b)、(c)和(f); (a)、(b)、(c)和(g); (a)、(b)、(c)和(h); (a)、(b)、(c)和(i); (a)、(b)、(c)和(j); (a)、(b)、(c)和(k); (a)、(c)、(d)和(e); (a)、(c)、(d)和(f); (a)、(c)、(d)和(g); (a)、(c)、(d)和(h); (a)、(c)、(d)和(i); (a)、(c)、(d)和(j); (a)、(c)、(d)和(k); (a)、(d)、(e)和(f); (a)、(d)、(e)和(g); (a)、(d)、(e)和(h); (a)、(d)、(e)和(i); (a)、(d)、(e)和(j); (a)、(d)、(e)和(k); (a)、(e)、(f)和(g); (a)、(e)、(f)和(h); (a)、(e)、(f)和(i); (a)、(e)、(f)和(j); (a)、(e)、(f)和(k); (a)、(f)、(g)和(h); (a)、(f)、(g)和(i); (a)、(f)、(g)和(j); (a)、(f)、(g)和(k); (a)、(g)、(h)和(i); (a)、(g)、(h)和(j); (a)、(g)、(h)和(k); (a)、(h)、(i)和(j); (a)、(h)、(i)和(k); (a)、(i)、(j)和(k); (b)、(c)、(d)和(e); (b)、(c)、(d)和(f); (b)、(c)、(d)和(g); (b)、(c)、(d)和(h); (b)、(c)、(d)和(i); (b)、(c)、(d)和(j); (b)、(c)、(d)和(k); (b)、(d)、(e)和(f); (b)、(d)、(e)和(g); (b)、(d)、(e)和(h); (b)、(d)、(e)和(i); (b)、(d)、(e)和(j); (b)、(d)、(e)和(k); (b)、(e)、(f)和(g); (b)、(e)、(f)和(h); (b)、(e)、(f)和(i); (b)、(e)、(f)和(j); (b)、(e)、(f)和(k); (b)、(f)、(g)和(h); (b)、(f)、(g)和(i); (b)、(f)、(g)和(j); (b)、(f)、(g)和(k); (b)、(g)、(h)和(i); (b)、(g)、(h)和(j); (b)、(g)、(h)和(k); (b)、(h)、(i)和(j); (b)、(h)、(i)和(k); (b)、(i)、(j)和(k); (c)、(d)、(e)和(f); (c)、(d)、(e)和(g); (c)、(d)、(e)和(h); (c)、(d)、(e)和(i); (c)、(d)、(e)和(j); (c)、(d)、(e)和(k); (c)、(d)、(f)和(g); (c)、(d)、(f)和(h); (c)、(d)、(f)和(i); (c)、(d)、(f)和(j); (c)、(d)、(f)

和(k); (c)、(d)、(g)和(h); (c)、(d)、(g)和(i); (c)、(d)、(g)和(j); (c)、(d)、(g)和(k); (c)、(d)、(h)和(i); (c)、(d)、(h)和(j); (c)、(d)、(h)和(k); (c)、(e)、(f)和(g); (c)、(e)、(f)和(h); (c)、(e)、(f)和(i); (c)、(e)、(f)和(j); (c)、(f)、(g)和(h); (c)、(f)、(g)和(i); (c)、(f)、(g)和(j); (c)、(f)、(g)和(k); (c)、(g)、(h)和(i); (c)、(g)、(h)和(j); (c)、(g)、(h)和(k); (c)、(h)、(i)和(j); (c)、(h)、(i)和(k); (c)、(i)、(j)和(k); (d)、(e)、(f)和(g); (d)、(e)、(f)和(h); (d)、(e)、(f)和(i); (d)、(e)、(f)和(j); (d)、(e)、(f)和(k); (d)、(f)、(g)和(h); (d)、(f)、(g)和(i); (d)、(f)、(g)和(j); (d)、(f)、(g)和(k); (d)、(g)、(h)和(i); (d)、(g)、(h)和(j); (d)、(g)、(h)和(k); (d)、(h)、(i)和(j); (d)、(h)、(i)和(k); (d)、(i)、(j)和(k); (e)、(f)、(g)和(h); (e)、(f)、(g)和(i); (e)、(f)、(g)和(j); (e)、(f)、(g)和(k); (e)、(g)、(h)和(i); (e)、(g)、(h)和(j); (e)、(g)、(h)和(k); (e)、(h)、(i)和(j); (e)、(h)、(i)和(k); (e)、(i)、(j)和(k); (f)、(g)、(h)和(i); (f)、(g)、(h)和(j); (f)、(g)、(h)和(k); (f)、(h)、(i)和(j); (f)、(h)、(i)和(k); (f)、(i)、(j)和(k); (g)、(h)、(i)和(j); (g)、(h)、(i)和(k); (g)、(i)、(j)和(k); (h)、(i)、(j)和(k); 更任选地,在至少5种上述活性中建立基本等效性,例如(a)、(b)、(c)、(d)和(e); (a)、(b)、(c)、(d)和(f); (a)、(b)、(c)、(d)和(g); (a)、(b)、(c)、(d)和(h); (a)、(b)、(c)、(d)和(i); (a)、(b)、(c)、(d)和(j); (a)、(b)、(c)、(d)和(k); (a)、(c)、(d)、(e)和(f); (a)、(c)、(d)、(e)和(g); (a)、(c)、(d)、(e)和(h); (a)、(c)、(d)、(e)和(i); (a)、(c)、(d)、(e)和(j); (a)、(c)、(d)、(e)和(k); (a)、(d)、(e)、(f)和(g); (a)、(d)、(e)、(f)和(h); (a)、(d)、(e)、(f)和(i); (a)、(d)、(e)、(f)和(j); (a)、(d)、(e)、(f)和(k); (a)、(e)、(f)、(g)和(h); (a)、(e)、(f)、(g)和(i); (a)、(e)、(f)、(g)和(j); (a)、(e)、(f)、(g)和(k); (a)、(f)、(g)、(h)和(i); (a)、(f)、(g)、(h)和(j); (a)、(f)、(g)、(h)和(k); (b)、(c)、(d)、(e)和(f); (b)、(c)、(d)、(e)和(g); (b)、(c)、(d)、(e)和(h); (b)、(c)、(d)、(e)和(i); (b)、(c)、(d)、(e)和(j); (b)、(c)、(d)、(e)和(k); (b)、(d)、(e)、(f)和(g); (b)、(d)、(e)、(f)和(h); (b)、(d)、(e)、(f)和(i); (b)、(d)、(e)、(f)和(j); (b)、(d)、(e)、(f)和(k); (b)、(e)、(f)、(g)和(h); (b)、(e)、(f)、(g)和(i); (b)、(e)、(f)、(g)和(j); (b)、(e)、(f)、(g)和(k); (b)、(f)、(g)、(h)和(i); (b)、(f)、(g)、(h)和(j); (b)、(f)、(g)、(h)和(k); (c)、(d)、(e)、(f)和(g); (c)、(d)、(e)、(f)和(h); (c)、(d)、(e)、(f)和(i); (c)、(d)、(e)、(f)和(j); (c)、(d)、(e)、(f)和(k); (c)、(e)、(f)、(g)和(h); (c)、(e)、(f)、(g)和(i); (c)、(e)、(f)、(g)和(j); (c)、(e)、(f)、(g)和(k); (c)、(f)、(g)、(h)和(i); (c)、(f)、(g)、(h)和(j); (c)、(f)、(g)、(h)和(k); (d)、(e)、(f)、(g)和(h); (d)、(e)、(f)、(g)和(i); (d)、(e)、(f)、(g)和(j); (d)、(e)、(f)、(g)和(k); (d)、(f)、(g)、(h)和(i); (d)、(f)、(g)、(h)和(j); (d)、(f)、(g)、(h)和(k); (f)、(g)、(h)、(i)和(j); (f)、(g)、(h)、(i)和(k); (g)、(h)、(i)、(j)和(k); 更任选地,在至少6种上述活性中建立基本等效性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(g); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(h); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(i); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(j); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(k); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j); (a)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k); (a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h); (a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i); (a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j); (a)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k); (a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i); (a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j); (a)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k); (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g); (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和

(h) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (b)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ;更任选地,在至少7种上述活性中建立基本等效性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(g) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(h) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)和(k) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ;更任选地,在至少8种上述活性中建立基本等效性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(h) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(b)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(e)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(f)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(g)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(h)和(k) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(i) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(j) ; (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)和(k) ;或任选地,在至少9种、10种或所有11种上述活性中建立基本等效性,例如(a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)、(h)、(i)、(j)和(k)。

[0158] 在另一个方面,本发明提供检测试剂盒,包含(a) rSIFN-co或rSIFN-co替代物,以及(b)用于执行本文描述的一个以上方法的说明书和用于执行这些方法的试剂中的至少一者。这些试剂可以包含磷酸盐缓冲盐水(PBS)或缓冲剂。在一些实施方式中,检测试剂盒中的rSIFN-co或rSIFN-co替代物包括特定的比活性。

[0159] 在一些实施方式中,所述测试干扰素还通过癌细胞中JAK/STAT信号转导通路传递信号和/或与rSIFN-co享有共同的IFNAR1/2受体,从而与rSIFN-co基本等价或与rSIFN-co具有基本上相同的效力。在一些实施方式中,借助于检测来自STAT家族,例如STAT1、

STAT2和/或STAT3的磷酸化蛋白的存在,从而检测通过JAK/STAT途径的信号传导。在一些实施方式中,使用蛋白质印迹来进行这样的检测。在一些实施方式中,癌细胞A549和/或HeLa细胞可用于进行这样的检测。在一些实施方式中,用约10mcg/ml的测试干扰素或rSIFN-co处理所述癌细胞。在一些实施方式中,用所述测试干扰素或rSIFN-co处理癌细胞约5、15、30、60、120和/或240分钟。在一些实施方案中,在用干扰素处理后,收集细胞蛋白用于蛋白质印迹分析。在一些实施方式,GAPDH用作对照。

[0160] 在一些实施方式中,可以使用任何常规的方法且不限于在此披露的方法,来进行用于建立与rSIFN-co或rSIFN-co替代物的等效性或相对其效力的待测测试或活性。

### 具体实施方式

[0161] 在此通过下列实施例来进一步说明本发明,但是这些实施例并不是意在限制本发明的范围。可以在存在或不存在没有具体提及但本领域普通技术人员认为其可用的任何元素、限制的情况下实践本发明。此外,除非另外指出,文中本发明的描述并不意在成为限制,而应该解读为包括本领域普通技术人员理解的所描述特征、元素或限制或其部分的等同物或修改。应当理解的是,鉴于本文提供的总体描述,可以实践各种其它实施方式。结合附图,根据上述内容,并基于具体描述和实施例以及所附权利要求,本发明的其它目的、特征和有利之处对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0162] 所有数据都表示为均值±标准差(SD)。应用t检验(以及非参数检验)来分析不同变量之间的关系。当 $p < 0.05$ 时,呈现统计显著性。

#### [0163] 实施例1. rSIFN-co对人肝癌的活性

[0164] 使用人肝癌SMMC-7721作为模型进行本研究,以证明rSIFN-co在体内系统中对人肝癌的活性和效力。将测试物rSIFN-co的活性与丝裂霉素C(“MMC”)的活性进行比较。药物rSIFN-co是无色液体,浓度为1mg/ml,由四川辉阳生命工程股份有限公司(中国成都)提供。使用测试物而不经稀释。将其存储在4°C直至解冻用于注射。丝裂霉素C(“MMC”),批号505AGB,浓度为2mg/瓶,由Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd.(日本)提供。MMC在注射时用生理盐水稀释。

[0165] 根据美国国立卫生研究院(NIH)试验动物的护理和使用指南,进行动物实验。

[0166] 使用的动物为4-6周龄雄性BALB/cAnu/nu鼠,称重为约 $23 \pm 2$ g,得自上海药物研究所(中国上海)。研究方案由上海药物研究所动物使用和护理委员会审阅,以符合规章制度,在研究开始前得到委员会批准。尽可能地将研究中所用的流程设计为避免或最小化动物的不适感、痛苦和疼痛。根据规定,经历严重或慢性且不能缓解的疼痛或痛苦的动物经无痛方式安乐死。将6只动物圈养在一个笼内。这些动物通过耳朵打孔识别法进行耳标。室温保持在 $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。光照设定为12小时照明,12小时黑暗。以自由采食方式供应食物。以自由饮水方式通过水瓶向动物提供经5微米( $\mu\text{m}$ )过滤器过滤的城市自来水。研究人员和辉阳生命工程股份有限公司均认为没有任何干扰或影响本发明意向和目的的食品污染或水污染。

[0167] 测试物(rSIFN-co)和赋形剂对照各自进行瘤内(i.t.)给药。根据动物的分组,以每种处理每只小鼠0.05ml-0.15ml的体积施用测试物。MMC以10微升( $\mu\text{l}$ )/g静脉(i.v.)给药。以每只小鼠0.15ml的体积注射生理盐水,用作赋形剂对照。

[0168] 将动物随机分配到处理组。初始时,所有动物都安置在一个大的动物笼中。为分组进行研究,它们在之后被分开进行饲养,每处理组每笼6只动物。各个组的剂量和给药方案记载在表1中。组1和组2是对照组,在第一次处理后每隔一天对各只动物施用赋形剂。组3的动物在开始处理后的第1天和第6天以5mg/kg的剂量给予MMC。组4、组5和组6的动物在第一次处理后分别以0.15mg/小鼠(组4)、或0.10mg/小鼠(组5)或0.05mg/小鼠(组6)每隔一天给予rSIFN-co。在研究的过程中,通过一周两次地测量各个肿瘤的长和宽来监测肿瘤生长。在研究的过程中,还对各只动物进行每周两次称量。

[0169] 通过向各只小鼠中皮下(s.c.)接种 $5 \times 10^6$ 个细胞,在各只动物建立肿瘤,即人肝癌SMMC-7721异种移植物。在研究开始前,异种移植物在裸鼠中传代两次。在无菌条件下,将生长良好的肿瘤切割成 $1.5\text{mm}^3$ 的片段,通过套针将一个这样的片段注射到各只研究动物的右侧腹。当肿瘤达到 $100\text{mm}^3$ - $200\text{mm}^3$ 的体积时,将小鼠随机分成对照组或处理组,各个组以表1所记载的剂量和日程安排接受赋形剂(组1和组2)、rSIFN-co(组4、组5和组6)或MMC(组3),持续3周。用千分卡尺来测量各个肿瘤尺寸(长和宽),每周两次。使用公式 $V = (\text{长} \times \text{宽}^2) / 2$ 来计算肿瘤体积(V)。各个相对肿瘤体积(RTV)使用公式 $\text{RTV} = V_t / V_0$ 来计算,其中 $V_t$ 是在测量当天的肿瘤体积,而 $V_0$ 是第一次处理当天的肿瘤体积。测试物或对照物的治疗效果以T/C(%)和抑制%表示,T/C(%)使用公式: $\text{T/C}(\%) = (\text{处理组的平均RTV} / \text{对照组的平均RTV}) \times 100\%$ ;抑制%使用公式:抑制% =  $100\% - \text{T/C}\%$ 。

[0170] 表1. 实施例1的剂量水平和组别

	组	n	处理	剂量	给药日程
[0171]	1	6	赋形剂	NA	每隔一天
	2	6	赋形剂	NA	每隔一天
	3	6	MMC	5 mg/kg	第1天和第16天
[0172]	4	6	rSIFN-co	0.15 mg/小鼠	每隔一天
	5	6	rSIFN-co	0.10 mg/小鼠	每隔一天
	6	6	rSIFN-co	0.05 mg/小鼠	每隔一天

[0173] 结果示于表2和图1中。表2显示对于各个处理组的第0天的初始肿瘤尺寸、第21天的最终肿瘤尺寸以及所计算的平均RTV、T/C%和抑制%。

[0174] 表2. rSIFN-co对人肝癌SMMC-7721的活性

处理	TV(mm <sup>3</sup> , 均值±SD) (D0)	TV (mm <sup>3</sup> , 均值±SD) (D21)	RTV (均 值±SD)	T/C(%)	抑制%	P 值
生理盐水 (12 只小 鼠)	129±26	1172±302	9.36±3.9			
[0175] MMC	125±35	621±247	5.05±2.1*	52.82	47.18	p<0.05
0.15 mg rSIFN-co	123±20	505±226	4.13±1.9**	43.20	56.80	p<0.01
0.10 mg rSIFN-co	124±15	573±287	4.57±2.3*	47.80	52.20	p<0.05
0.05 mg rSIFN-co	124±26	592±139	4.97±1.7*	51.99	48.01	p<0.05

[0176] 表2显示rSIFN-co在所有的3个测试剂量下有活性且有效地抑制人肝癌细胞的生长。对于第21天(D21)的平均RTV,赋形剂对照组为 $9.36 \pm 3.9$ ,MMC处理组为 $5.05 \pm 2.1$ ,0.15mg rSIFN-co处理组为 $4.13 \pm 1.9$ ,0.10mg rSIFN-co处理组为 $4.57 \pm 2.3$ ,且0.05mg rSIFN-co处理组为 $4.97 \pm 1.7$ 。在第21天(D21)的抑制%:MMC处理组为47.18%,0.15mg rSIFN-co处理组为56.80%,0.10mg rSIFN-co处理组为52.20%,且0.05mg rSIFN-co处理组为48.01%。各个处理组与赋形剂对照组之间的RTV差异被确定为是统计学显著的。

[0177] 图1显示对于各个处理组在21天的研究期间,人肝癌SMMC-7721在裸鼠中的生长进程(由RTV表示),呈现出在开始处理之后第3、7、10、14、17和21天的肿瘤测量结果。结果显示在第7天之前在各个MMC处理组和rSIFN-co处理组中肿瘤生长的延迟,并保持到第21天。结果还显示出在更高的rSIFN-co剂量下更大的抑制趋势。

[0178] 所有用测试物处理的动物都较好地耐受测试剂量,没有毒性或体重减轻的迹象。赋形剂组、MMC处理组、0.15mg rSIFN-co处理组、0.10mg rSIFN-co处理组和0.05mg rSIFN-co处理组的动物的平均体重(以克计)在第0天(和第21天)分别为:22.7(24.8);23.9(25.4);23.7(25.3);24.3(26.2);和22.6(24.4)。

#### [0179] 实施例2.rSIFN-co对人宫颈癌的活性

[0180] 该研究使用HeLa细胞作为模型证实rSIFN-co对于人宫颈肿瘤治疗的活性和效力。结果显示,rSIFN-co有活性并且有效抑制人宫颈癌细胞的生长。如实施例1进行该研究,除了另外具体指出的那些。首先以与实施例1中相似的方式通过在裸鼠中皮下接种 $5 \times 10^6$ 个HeLa细胞并使生长良好的异种移植物在裸鼠中传代两次,建立并制备人宫颈癌异种移植物。之后,制备 $1.5\text{mm}^3$ 片段以s.c.方式植入到动物中。动物的体重在给药初始时平均为 $19 \pm 2\text{g}$ 。与实施例1相比,使用的动物均为雌性。各个处理组的剂量和给药方案与实施例1相似,不同在于在第0天开始处理之后的第1和13天注射MMC,且研究在开始处理后持续28天。

[0181] 结果显示在表3和图2中。表3显示计算出的第0天和第28天的平均TV,以及计算出的平均RTV、T/C(%)和抑制%。对于第28天(D28)的RTV,赋形剂对照组是 $12.45 \pm 4.46$ ,MMC处理组为 $4.97 \pm 1.85$ ,0.15mg rSIFN-co处理组为 $7.42 \pm 1.91$ ,0.10mg rSIFN-co处理组为 $6.64 \pm 2.04$ ,及0.05mg rSIFN-co处理组为 $6.64 \pm 1.60$ 。对于第28天的抑制%,MMC处理组

为60.08%，0.15mg rSIFN-co处理组为40.40%，0.10mg rSIFN-co处理组为46.67%，及0.05mg rSIFN-co处理组为46.67%。与MMC处理组、0.15mg rSIFN-co处理组、0.10mg rSIFN-co处理组和0.05mg rSIFN-co处理组对应的T/C(%)分别为39.92%、59.60%、53.33%和53.33%。各个处理组与赋形剂对照组之间的RTV差异被确定为是统计学显著的。结果显示，rSIFN-co有效抑制测试动物中人宫颈癌的生长。

[0182] 表3.rSIFN-co对人宫颈癌Hela异种移植物的活性

处理	TV (mm <sup>3</sup> , 均值±SD) (D0)	TV (mm <sup>3</sup> , 均值±SD) (D28)	RTV (均值 ±SD)	T/C (%)	抑制%	P 值
生理盐水	138± 25	1720± 756	12.45±4.46			

(12只小鼠)						
MMC	130± 28	676± 358	4.97± 1.85**	39.92	60.08	p<0.01
0.15 mg rSIFN-co	136± 25	1025± 400	7.42± 1.91*	59.60	40.40	p<0.05
0.10 mg rSIFN-co	135± 28	865± 186	6.64±2.04**	53.33	46.67	p<0.01
0.05 mg rSIFN-co	135± 26	886± 232	6.64±1.60**	53.33	46.67	p<0.01

[0185] 图2显示在28天研究期间各个处理组的RTV进展，反映出在开始处理之后第4、7、11、14、18、21、25和28天做出的肿瘤测量。结果显示在第7天之前在各个MMC处理组和rSIFN-co处理组中人宫颈肿瘤生长的延迟，并保持到第28天。

[0186] 研究中的所有动物均耐受rSIFN-co处理，没有毒性迹象。在28天的处理期间观察到极小的平均体重变化。

[0187] 实施例3.rSIFN-co对人结肠癌的活性

[0188] 使用HT-29作为模型进行该研究来证实rSIFN-co对于人结肠癌治疗的活性和效力。结果显示，rSIFN-co有活性并且有效抑制人结肠癌细胞的生长。如实施例1进行该研究，除了另外具体指出的那些。首先以与实施例1中相似的方式通过在裸鼠中皮下接种 $5 \times 10^6$ 个HT-29细胞并使生长良好的异种移植物在裸鼠中传代两次，建立并制备人结肠癌异种移植物。之后，制备1.5mm<sup>3</sup>片段以s.c.方式植入到测试动物中。动物的体重在给药初始时平均为20±2g。与实施例1相比，在该研究中使用的动物均为雌性。各个处理组的剂量和给药方案同实施例1所记载，不同在于在第1天和第10天对组3施用MMC，且增加额外的组，即组7，该组的各只小鼠用体积为0.15ml且剂量为0.15mg/小鼠的IFN $\alpha$ -2b进行处理，如rSIFN-co处理组一样每隔一天进行，处理共执行4周。浓度为1.41mg/ml的IFN $\alpha$ -2b由辉阳生命工程股份有限公司提供。结果显示在表4和图3中。

[0189] 表4.rSIFN-co对人结肠癌HT-29异种移植物的活性

[0190]	处理	TV (mm <sup>3</sup> , 均值 ±SD )	TV (mm <sup>3</sup> , 均值 ±SD )	RTV (均值 ±SD)	T/C (%)	抑制%	P 值
		(D0)	(D28)				
	生理盐水 (12 只小 鼠)	131±23	1107±424	8.41±2.82			
	MMC (5 mg/kg)	132±22	395±95	3.12± 1.19***	37.10	62.9	p<0.001
[0191]	rSIFN-co 0.15 mg	131±36	570±144	4.51± 1.25**	53.63	46.37	p<0.01
	rSIFN-co 0.10 mg	128±39	541±196	4.22±0.87**	50.18	49.82	p<0.01
	rSIFN-co 0.05 mg	130±26	416±166	3.28±1.25***	39	61	p<0.001
	IFN $\alpha$ -2b 0.15 mg	128±44	831±420	6.26±1.43	74.44	25.56	p>0.05

[0192] 表4显示计算出的第0天初始平均TV和第28天最终平均TV,以及计算出的 平均RTV、T/C(%)和抑制%。对于第28天(D28)的RTV,赋形剂对照组为 8.41±2.82,MMC处理组为3.12±1.19,0.15mg rSIFN-co处理组为4.51±1.25,0.10 mg rSIFN-co处理组为4.22±0.87,0.05mg rSIFN-co处理组为3.28±1.25,及IFN $\alpha$ -2b 处理组为6.26±1.43。对于第28天的抑制%,MMC处理组为62.9%,0.15mg rSIFN-co处理组为46.37%,0.10mg rSIFN-co处理组为49.82%,0.05mg rSIFN-co 处理组为61%,及IFN $\alpha$ -2b处理组是25.56%。与MMC处理组、0.15mg rSIFN-co 处理组、0.10mg rSIFN-co处理组、0.05mg rSIFN-co处理组以及IFN $\alpha$ -2b处理组对 应的T/C(%)分别为37.10%、53.63%、50.18%、39.00%和74.44%。结果显示, rSIFN-co比IFN $\alpha$ -2b更有效地抑制人结肠癌细胞的生长。各个处理组与赋形剂对 照组之间的RTV差异被确定为是统计学显著的。

[0193] 图3显示在28天研究期间各个处理组的由RTV表示的对人结肠肿瘤生长的 抑制,反映出在开始处理之后的第3、7、10、14、17、21、24和28天做出的肿瘤 测量。结果显示在第7天之前在各个MMC处理组和rSIFN-co处理组中人结肠肿瘤 生长的延迟,并保持到第28天。3种剂量的rSIFN-co均引起比IFN $\alpha$ -2b更强的肿瘤 生长抑制。

[0194] 同实施例1和2,所有rSIFN-co处理的动物均耐受所测试的剂量,且没有显 示出药物毒性迹象,并显示出最小化的体重变化。

[0195] 实施例4. rSIFN-co对人肺癌的活性

[0196] 使用SPC-A4作为模型进行该研究来证实rSIFN-co对于人肺癌治疗的活性 和效力。结果显示,rSIFN-co对人肺肿瘤生长有显著抑制,并且rSIFN-co比IFN $\alpha$ -2b 有效得多。如实施例3进行该研究,除了另外具体指出的那些。首先以与实施例1 中相似的方式建立并制备用于注射到测试动物中的人异种移植物,不同在于通过 在裸鼠中皮下(s.c.)接种 $2.5 \times 10^6$ 个SPC-A4细胞并使生长良好的肿瘤在裸鼠中传 代两次。之后,使用 $1.5\text{mm}^3$ 片段以s.c. 方式将其植入到测试动物中。动物的体重 在给药初始时平均为 $22 \pm 2\text{g}$ 。与实施例3相比,在

该研究中使用的动物均为雄性且 该研究进行21天处理。各个处理组的剂量和给药方案同实施例3所记载,不同在于在第1和第6天对组3施用MMC。结果显示在表5和图4中。

[0197] 表5.rSIFN-co对人肺癌SPC-A4异种移植在裸鼠中的生长的作用

处理	TV(mm <sup>3</sup> , 均 值 ±SD ) (D0)	TV (mm <sup>3</sup> , 均值±SD) (D21)	RTV (均值±SD)	T/C (%)	抑制%	P 值
生理盐水 (12 只小 鼠)	168±42	7133±2708	42.54±2.82			
[0198] MMC (5 mg/kg)	166±42	1831±540	11.54± 4.37***	27.13	72.87	p<0.001
rSIFN-co 0.15 mg	169±40	2284±653	13.72± 3.96**	32.25	67.75	p<0.01
rSIFN-co 0.10 mg	168±49	2388±1544	14.91±11.19**	35.05	64.95	p<0.01
rSIFN-co 0.05 mg	170±41	2244±1043	15.45±9.07**	36.32	63.68	p<0.01
IFN $\alpha$ -2b 0.15 mg	191±44	4908±2433	27.84±15.51	65.47	34.53	p>0.05

[0199] 图4显示在21天研究期间各个处理组的由RTV表示的人肺肿瘤在裸鼠中 的生长抑制,反映出在开始处理之后的第4、7、11、14、18、和21天做出的肿瘤 测量。结果显示在第7天之前在各个MMC处理组和rSIFN-co处理组中肿瘤生长的 延迟,并保持到研究结束的第21天。直到第11天才在IFN $\alpha$ -2b处理组中观察到肿 瘤抑制。IFN $\alpha$ -2b引起的肿瘤生长抑制低于任一rSIFN-co处理组中的肿瘤生长抑 制且不是统计学显著的(p>0.05)。因此,rSIFN-co比IFN $\alpha$ -2b更有效地抑制人肺癌 细胞的生长。

[0200] 同实施例1-3,所有动物均耐受测试物的测试剂量,没有观察到毒性或体 重减轻的迹象,除0.05mg rSIFN-co处理组中的一只小鼠在第17天原因不明地死 亡之外。

[0201] 实施例5.rSIFN-co降低多种人实体癌细胞的生存力

[0202] 细胞培养和试剂。人肺癌细胞系(A549、H1299、H460、Calu-1)、人肝 癌细胞系(SMMC-7721、Huh-7、CL-1)、人宫颈癌细胞系(Hela)、人乳腺癌 细胞系(MDA-MB-231)、人前 列腺癌细胞系(PANC-1)和人结肠癌细胞系(SW620、HT29、SW480)从Shanghai Cell Collection(中国上海)购买。以上 细胞系均在Shanghai Cell Collection配置的对应的 完全生长培养基中于5%CO<sub>2</sub>和 37℃下培养,该完全生长培养基含有10%热失活胎牛血清 (Biochrom,Germany),并补充有4mM谷氨酰胺、50U/ml青霉素和50mg/ml链霉素。完全生长 培养基为:对于A549为F-12K(批号GNM21127;杭州吉诺生物医药技术有限公司);对于 SW620和MDA-MB-231为L-15(批号41300-039,GIBCO);对于SMMC-7721、Hela、Huh-7、CL-1和 PANC-1为DMEM(批号C11995,GIBCO);对于H460、H1299和SW480为RMPI-1640(批号C11875, GIBCO);对于HT-29为Macro5a(批号M4892,Sigma);以及对于Calu-1为DMEM+10%FBS。

[0203] 对96孔板以每孔约5×10<sup>3</sup>个细胞于100 $\mu$ l完全培养基中进行铺板,温育过 夜,之后分别用IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co以100 $\mu$ g/ml、50 $\mu$ g/ml、25 $\mu$ g/ml、12.5 $\mu$ g/ml、6.25 $\mu$ g/ml、3.13  $\mu$ g/ml、1.56 $\mu$ g/ml、0.78 $\mu$ g/ml、0.39 $\mu$ g/ml和0.20 $\mu$ g/ml的浓度 处理约48小时,然后收集细

胞进行分析。通过SunBio Am-Blue检测试剂盒 (Cat#: SBAB8025, Shanghai SBO Medical Biotechnology Co., Ltd, 中国上海) 评测细胞存活率。根据其操作指南, 向各孔添加10 $\mu$ l的Am-Blue。之后, 细胞在5%CO<sub>2</sub>和37 $^{\circ}$ C下温育4小时。在将96孔板摇动30秒之后, 通过Thermo Scientific酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Lowell, MA) 在570nm和595nm读取各个孔的吸光率。如下计算相对细胞生存力: 细胞生存力 = (处理组<sub>(OD570-OD595)</sub> - 空白<sub>(OD570-OD595)</sub>) / (对照组<sub>(OD570-OD595)</sub> - 空白<sub>(OD570-OD595)</sub>)  $\times$  100%, 其中对照组是对应的未处理细胞。结果显示在图5中, 其中肿瘤细胞的生存力表示为相对于未经处理的对照细胞的百分比。各个数据点表示至少两个独立实验的平均值。

[0204] 图5显示rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理而降低癌细胞的生存力的各个癌细胞系 (A) - (I) 的剂量反应曲线。(A) A549细胞; (B) HeLa细胞; (C) CL-1细胞; (D) Huh-7细胞; (E) SW480细胞; (F) MDA-MB-231细胞; (G) Calu-1细胞; (H) SMMC-7721细胞; (I) PANC-1细胞。

[0205] 结果显示, 即使在最高测试浓度 (100 $\mu$ g/ml) 下, IFN $\alpha$ -2b也对A549细胞、HeLa细胞、CL-1细胞、SW480细胞和SMMC-7721细胞的生存力降低没有效果或几乎没有效果。当用100mcg/ml ( $\mu$ g/ml) 的IFN $\alpha$ -2b处理Huh-7细胞、MDA-MB-231细胞、Calu-1细胞和PANC-1细胞时, 观察到小于50%的生存力降低。相比之下, rSIFN-co能够在低得多的剂量下以剂量依赖的方式降低肿瘤细胞生存力, 对于SW480细胞、MDA-MB-231细胞和PANC-1细胞, 在6.25 $\mu$ g/ml至12.5 $\mu$ g/ml的浓度下, 以及对于A549细胞、HeLa细胞、CL-1细胞、Huh-7细胞、Calu-1细胞和SMMC-7721细胞, 在12.5 $\mu$ g/ml至25 $\mu$ g/ml的浓度下, 达到接近50%的细胞生存力降低。通常而言, rSIFN-co降低细胞生存力的IC<sub>50</sub>, 对于不同的癌细胞在约10 mcg/ml至18mcg/ml的范围内。在100mcg/ml的rSIFN-co下, 对于任何癌细胞系都检测不到细胞生存力。因此, 在各个测试浓度下, rSIFN-co均比IFN $\alpha$ -2b更有效地降低肿瘤细胞生存力。

[0206] 实施例6A. rSIFN-co比IFN $\alpha$ -2b更有效地降低细胞生存力

[0207] 为证实rSIFN-co降低细胞生存力的能力, 将A549和SW620肿瘤细胞 (各自为每孔2 $\times$ 10<sup>3</sup>个细胞于100 $\mu$ l完全培养基中) 铺在96孔板上, 分别用10 $\mu$ g/ml的rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理1-6天。以标准MTT法 (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐检测, Sigma, St. Louis, MO) 评测细胞存活率。对于该检测, 向各孔加入约20 $\mu$ l的MTT (4mg/ml)。细胞在37 $^{\circ}$ C下温育4小时。之后, 仔细移去各孔的上清液, 之后向各孔加入等体积 (150微升) 的二甲亚砷 (DMSO) 并在摇床上彻底混合15分钟。用Thermo Scientific酶标仪 (Thermo Fisher Scientific Inc., Lowell, MA) 在595nm读取96孔板的吸光度。相对细胞生存力如下计算: 细胞生存力 = (处理组<sub>(OD595)</sub> - 空白<sub>(OD595)</sub>) / (对照组<sub>(OD595)</sub> - 空白<sub>(OD595)</sub>)  $\times$  100%。

[0208] 结果表示为相对于未经处理的对照细胞的百分比。各个数据点表示至少两个独立实验的均值。如图6所示, 与IFN $\alpha$ -2b相比, rSIFN-co以时间依赖的方式强烈地降低SW620细胞的细胞生存力, 而IFN $\alpha$ -2b即使有也只有极弱的时间依赖效果。rSIFN-co的时间依赖性效果对于A549细胞而言, 仅在处理的约前三天是明显的。对于各个细胞系, 在各个时间点, rSIFN-co与IFN $\alpha$ -2b之间的效果差异是统计学显著的 ( $p < 0.01$ )。这些数据显示出rSIFN-co的时间依赖性的强抗肿瘤效果。

[0209] 实施例6B. rSIFN-co在体内抑制肿瘤生长

[0210] 根据NIH试验动物的护理和使用指南来进行该实验。4-5周龄的雌性BALB/c裸鼠得自上海实验动物中心 (中国上海)。将约5 $\times$ 10<sup>6</sup>个A549细胞皮下注射到各只小鼠中以建

立异种移植肿瘤。将动物随机分成三组(每组8只小鼠),并用PBS(1X PBS,pH 7.2-7.4)、每只小鼠100 $\mu$ g/100 $\mu$ l的rSIFN-co或每只小鼠100  $\mu$ g/100 $\mu$ l的IFN $\alpha$ -2b每隔一天进行瘤内处理,共12次。每三天测量一次肿瘤,肿瘤体积如下计算:肿瘤体积(mm<sup>3</sup>)=(长 $\times$ 宽<sup>2</sup>)/2。结果显示在图16中。数据显示为均值 $\pm$ SD(n=8)。结果证实,与PBS处理组相比,rSIFN-co可以几乎完全地抑制所建立肿瘤的生长(p<0.0001)。然而,IFN $\alpha$ -2b并没有显示出明显的对肿瘤生长的抑制。结果证实,在体内抑制肿瘤生长方面,rSIFN-co比IFN $\alpha$ -2b更有效。

[0211] 实施例6C.rSIFN-co抑制三维培养体系中肿瘤细胞的群落形成和伪足形成

[0212] 将Matrigel(来自BD Corporation,Cat#:356234)在4 $^{\circ}$ C冰箱中于冰上解冻过夜,并将24孔板在-20 $^{\circ}$ C冷冻过夜。之后,用150 $\mu$ l的1.0mg/ml的Matrigel涂覆冷冻的24孔板的各孔。之后,将涂覆有Matrigel的24孔板在37 $^{\circ}$ C下温育20-30分钟。将肺癌细胞A549胰蛋白酶化并对其计数。在涂覆有Matrigel的孔上接种在含有2%Matrigel以及10mcg/ml的IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co或者没有干扰素(作为对照)的条件培养基中的约 $5\times 10^3$ 个细胞。这些细胞在37 $^{\circ}$ C温育至少约8天。每3天添加一次约200 $\mu$ l的上述条件培养基,以防止培养基变干。在第4天或第8天,拍照以观察群落的尺寸和伪足形成。实验以三组平行进行。

[0213] 结果显示在图7中。4天后,发现rSIFN-co处理组(图7C)比未处理组(图7A)具有更小的群落。8天后,rSIFN-co处理组不仅具有3组中最小的群落,还发现,在细胞周围几乎没有突出的伪足(图7C,第2和3排),而在未处理组(图7A,第2和3排)和IFN $\alpha$ -2b处理组(图7B,第2和3排)的细胞中,伪足形成明显。该实验表明rSIFN-co不仅可以抑制癌细胞群落的生长,而且可以抑制癌细胞中的伪足形成(转移必需的特征)。

[0214] 实施例7.rSIFN-co对 $\beta$ -联蛋白/TCF转录活性的抑制

[0215]  $\beta$ -联蛋白/TCF转录报告系统检测。测定了rSIFN-co对Wnt/ $\beta$ -联蛋白信号转导的体外作用。将癌细胞铺在96孔板上(每孔 $1\times 10^4$ 个细胞),并温育12个小时,之后用100ng TOPFlash(Millipore Corporation,Billerica,MA,USA)对其进行瞬时转染。为使转染效率标准化,将细胞与1ng由SV40启动子驱动的内参报告基因海肾荧光素酶pRL-SV40(Promega,Madison,WI,USA)共转染,之后用10mcg/ml干扰素rSIFN-co或IFN $\alpha$ -2b处理6小时,或在转染后不处理作为对照(Mock)。在干扰素处理24小时后,根据制造商的操作指南(Cat#:E1960,Promega),使用双荧光素酶检测体系试剂盒来进行荧光素酶检测。相对荧光素酶活性表示为萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性的比率。实验以三组平行进行。

[0216] 如图8所示,结果表明,rSIFN-co降低人实体癌细胞中 $\beta$ -联蛋白/TCF介导的转录活性。在处理24小时后,在三种肺癌细胞(A549、H1299、H460)和两种结肠癌细胞(HT-29、SW620)中, $\beta$ -联蛋白/TCF介导的转录活性显著被rSIFN-co抑制(\*,p<0.05;\*\* ,p<0.01)。然而,对于A549细胞、H1299细胞、H460细胞和HT-29细胞,IFN $\alpha$ -2b不存在抑制作用,并且相反地导致了增强作用。

[0217] 简言之,对照组、IFN $\alpha$ -2b处理组和rSIFN-co处理组的萤火虫荧光素酶活性/海肾荧光素酶活性的比率分别为:(A)对于A549细胞为约310、约350和约100;(B)对于H1299细胞为约800、约1000和约500;(C)对于H460细胞为约450、约500和约280;(D)对于HT-29细胞为约300、约600和约200;(E)对于SW620细胞为约1500、约1200和约少于100。该研究表明,在抑制Wnt/TCF信号转导方面,rSIFN-co优于IFN $\alpha$ -2b,因此,其抗肿瘤效果也更优。

[0218] 实施例8.rSIFN-co降低癌细胞中 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平

[0219] 将癌细胞A549和Sw480培养至约85%汇合率并放置到6孔板中。细胞分别用10mcg/ml IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理24小时、48小时或72小时,或不处理作为对照(Mock)。处理后,收集细胞进行蛋白质印迹,使用其特异性抗体检测 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平,以GAPDH作为内源加样对照。实验以三组平行进行重复。

[0220] 蛋白质印迹分析。为确定多种蛋白的表达,从6孔板收集细胞,并根据制造商的操作指南(Beyotime,China)使用提取试剂(Cat#:P0013)来提取细胞总蛋白。通过Lowry蛋白检测试剂盒(Bio-Rad,USA)来测定总蛋白浓度。通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)在10%-12%的胶上分离总蛋白,并将其转移到0.22或0.45 $\mu$ m的PVDF膜上(Millopore Corporation,Billerica, MA,USA)。用5%脱脂奶、牛血清白蛋白、10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、150 mmol/L NaCl和0.05%吐温20在4 $^{\circ}$ C下将膜封闭过夜。然后将封闭的膜与一抗(1:1000稀释)温育,然后与HRP结合的二抗一起温育。使用冷光/荧光成像LAS4000系统(GE Healthcare Life Sciences,USA)和super signal west pico化学发光底物试剂盒(Thermo Scientific,USA)将印迹可视化。

[0221] 对于该研究,所使用的一抗是小鼠单克隆 $\beta$ -联蛋白抗体(1:1000;Santa Cruz Technology,Santa Cruz,CA)和小鼠单克隆GAPDH抗体(1:2000)(Kangwei Biotechnology,China)。抗小鼠HRP结合二抗(Santa Cruz Technology,Santa Cruz,CA)以1:2000的浓度使用。图10所示的结果表明,对于A549细胞,在处理2天(48小时)后,rSIFN-co使 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平巨幅降低。对于这些细胞,在处理3天(72小时)后,观察到进一步的降低。SW480细胞中 $\beta$ -联蛋白的蛋白水平降低在用rSIFN-co处理72小时后较为明显。在肺癌A549细胞和结肠癌SW480细胞中, $\beta$ -联蛋白的下调是明显的时间依赖性的。相比而言,IFN $\alpha$ -2b未引起任何明显的 $\beta$ -联蛋白水平下降,表明其对 $\beta$ -联蛋白的下调没有作用。

[0222] 实施例9.rSIFN-co引起Wnt通路介导的靶标基因的转录下调

[0223] 将肺癌A549细胞接种到6孔板中,并分别用10 $\mu$ g/ml的IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理,或不处理作为对照(Mock)。在处理24小时后,使用TRIZOL试剂来分离细胞总mRNA,合成cDNA,并使用4种Wnt信号转导下游基因Axin2、CD24、存活蛋白和ID2的特异性引物进一步进行qPCR。实验以三组平行进行,并用Mock组标准化。

[0224] 定量PCR(qPCR)分析。根据制造商的说明书,使用TRIZOL试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)分离总mRNA。根据制造商的说明书使用RT-PCR试剂盒(Cat#:FSQ-101,TOYOBO,Japan)合成互补DNA(cDNA),之后使用SYBR Green PCR试剂盒(Cat#:QPK-201,TOYOBO,Japan)进行qPCR。四种Wnt通路靶标基因的引物如下:Axin2正义引物:5'-CGTGGATACCTTAGACTT-3'(SEQ ID NO:8)和反义引物:5'-GCTGTTGTTCTCAATGTA-3'(SEQ ID NO:9);CD24正义引物:5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTAC-3'(SEQ ID NO:10)和反义引物:5'-GAAACTGAATCTCCATTCCACAA-3'(SEQ ID NO:11);存活蛋白正义引物:5'-ACCGCATCTCTACATTCAAG-3'(SEQ ID NO:12)和反义引物:5'-CAAGTCTGGCTCGTTTCTC-3'(SEQ ID NO:13)以及ID2正义引物:5'-CACAACAACAACAAC-3'(SEQ ID NO:14)和反义引物:5'-CACAGTCCAAGTAAGAGA-3'(SEQ ID NO:15)。

[0225] 扩增流程如下:95 $^{\circ}$ C温育1分钟,40个循环(95 $^{\circ}$ C15秒,60 $^{\circ}$ C15秒,72 $^{\circ}$ C30秒)。使用Bio-Rad检测系统,实时监测SYBR Green染料结合入PCR产物的情况,接着使用Bio-Rad CFX manager 2.1软件进行分析。对于各个条件汇集样品,以两组平行进行。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法

比较处理的样品与Mock,并以倍率变化进行绘图。GAPDH用作标准化对照。

[0226] 图11所示的结果表明,rSIFN-co引起Wnt通路介导的靶标基因Axin2、CD24、存活蛋白和ID2的下调。在rSIFN-co处理后这些基因的mRNA水平显著降低,但在IFN $\alpha$ -2b处理后没有显著降低。

[0227] 简言之,当Mock对照的相对表达水平被设定为1时,对于Axin2基因而言(图11A),IFN $\alpha$ -2b处理得到稍高于1的水平,而rSIFN-co处理得到约0.4的水平( $p < 0.0001$ ,将rSIFN-co处理与未处理进行比较)。对于Mock未处理细胞、IFN $\alpha$ -2b处理细胞和rSIFN-co处理细胞,CD24基因的相应水平(图11B)分别为1、约0.9和约0.4( $p < 0.0001$ );存活蛋白基因的相应水平(图11C)分别为1、约0.9和约0.4( $p < 0.0005$ );ID2基因的相应水平(图11D)分别为1、约1和约0.4( $p < 0.0001$ )。

[0228] 实施例10. rSIFN-co能够下调不同细胞中Wnt相关受体或共受体LRP6/FZD6的mRNA水平

[0229] 研究rSIFN-co对LRP6/FZD6的调节。如实施例9中进行的,通过qPCR来执行本实施例。将癌细胞A549、H460、SW620和HT-29接种到6孔板中,并用10 $\mu$ g/ml的IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理,或者不处理作为对照(Mock)。在处理24小时后,使用TRIZOL试剂分离细胞总mRNA,使用LRP6和FZD6的特异性引物对cDNA进行qPCR。使用的引物为,LRP6正义引物:5'-TGAAGAACCAGCACACAGG-3'(SEQ ID NO:4)和反义引物:5'-CATAACCAAGAGGCACAGAAGC-3'(SEQ ID NO:5),以及FZD6正义引物:5'-GCGGAGTGAAGGAAGGATTAGTC-3'(SEQ ID NO:6)和反义引物:5'-TGAACAAGCAGAGATGTGGAACC-3'(SEQ ID NO:7)。实验以三组平行进行,并用Mock对照组标准化。结果记录为LRP6或FZD6相对于GAPDH的相对mRNA水平。

[0230] 图9所示的结果表明,在四种癌细胞系中,rSIFN-co使LRP6和FZD6不同程度地下调。图9A显示在rSIFN-co处理后A549细胞( $p < 0.005$ )、SW620细胞( $p < 0.005$ )和HT-29细胞( $p < 0.005$ )中LRP6mRNA的相对表达有显著降低,但是在IFN $\alpha$ -2b处理中没有观察到显著降低。图9B显示在rSIFN-co处理后在所有4个细胞系A549( $p < 0.001$ )、H460( $p < 0.0005$ )、SW620( $p < 0.001$ )和HT-29( $p < 0.0005$ )中FZD6mRNA的相对表达有显著降低。另一干扰素IFN $\alpha$ -2b造成HT-29细胞中FZD6mRNA表达的加强,但是在A549细胞、H460细胞和SW620细胞中引起FZD6 mRNA表达一定程度的降低,尽管未达到与rSIFN-co相同的程度。结果表明,rSIFN-co引起的Wnt信号转导通路的抑制可能是由Wnt相关的细胞表面受体LRP6和FZD6的表达受抑制而引起。发现rSIFN-co在测试的人癌细胞(例如人肺癌细胞和人结肠癌细胞)中在抑制Wnt通路方面要优于干扰素IFN $\alpha$ -2b,包括对 $\beta$ -联蛋白/TCF介导的转录活性和 $\beta$ -联蛋白水平以及Wnt信号转导通路相关受体、共受体和靶标基因的下调。

[0231] 实施例11. rSIFN-co上调肿瘤抑制基因的表达

[0232] 在本研究中证实rSIFN-co对肿瘤抑制基因的上调作用。将癌细胞A549、H460、SW620和HT-29接种到6孔板中,并用10mcg/ml的IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理,或不处理作为Mock对照。在处理24小时后,使用TRIZOL试剂来分离细胞总mRNA,并合成cDNA,使用DKK3、KLF4和BATF2的特异性引物来进一步进行qPCR。使用以下引物:对于BATF2,正义引物5'-CAGAGCAGGGAGCACAACC-3'(SEQ ID NO:16)和反义引物5'-TGAGCAGAGGAGAGCAGAGG-3'(SEQ ID NO:17);对于DKK3,正义引物5'-GGAGCCTGACTGAAGAGATGG-3'(SEQ ID NO:18)和反义引物5'-ACGCCTAAAGCACACACCTG-3'(SEQ ID NO:19);对于KLF4,正义引物5'-

CCTTCAACCTGGCGGACATCAAC-3' (SEQ ID NO:20) 和反义引物5' -GGCTGCTGCGGCGGAATG-3' (SEQ ID NO:21)。

[0233] 实验以三组平行进行,并用mock对照组标准化。图12所示的结果表示为与GAPDH相比较的相对mRNA表达水平。对于A549细胞,rSIFN-co处理使所有3种肿瘤抑制基因DKK-3(图12A)、BATF2(图12B)和KLF4(图12C)的表达大幅增高,并且比IFN $\alpha$ -2b有效得多。在SW620细胞中,与对照和IFN $\alpha$ -2b处理相比,在rSIFN-co处理之后KLF4表达的上调也大幅增加。IFN $\alpha$ -2b处理显著地增加了H460细胞中DKK-3的表达。

#### [0234] 实施例12.rSIFN-co抑制癌细胞迁移

[0235] 通过在使用IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理24小时(与未处理对照(Mock)对比)后,确定肺癌A549细胞和结肠癌SW620细胞穿过微孔膜迁移的能力来证实rSIFN-co抑制肿瘤细胞迁移的能力。使用24孔板中的8 $\mu$ m细胞培养插入式小室(Becton-Dickinson Biosciences, NJ, USA)进行细胞迁移检测。将不含FBS的温湿(37 $^{\circ}$ C)碳酸氢盐类培养基加到插入式小室的内部以及孔的底部,并使其在加湿组织培养箱中于37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 氛下复水约2小时。在复水之后,小心除去培养基。之后,将500 $\mu$ l混悬在不含FBS的培养基中的制备细胞(在用10 $\mu$ g/ml IFN $\alpha$ -2b或10 $\mu$ g/ml rSIFN-co处理后,或完全不做处理)以 $0.5 \times 10^4$ 细胞/插入式小室的密度接种到插入式小室滤器的上部。在24孔板的下室置入500 $\mu$ l含有10%FBS的完全培养基。在常规培养条件下于37 $^{\circ}$ C,24小时之后,将室膜上部的非迁移细胞用棉拭子除去。培养小室的下部用4%多聚甲醛固定并用2%结晶紫染色。在三组平行孔中的每一个中,对细胞被置入的室膜的相反侧的迁移细胞数量进行计数。各个实验重复至少两次,每次使用三组平行孔。

[0236] 图13所示的结果显示出对于Mock、IFN $\alpha$ -2b处理细胞和rSIFN-co处理细胞各自的单位区域中的迁移细胞平均数量。对于穿膜迁移的A549细胞,在未处理的Mock组中观察到约30个细胞/区域,在IFN $\alpha$ -2b组中观察到约110个细胞,在rSIFN-co处理组中观察到约10个细胞。由IFN $\alpha$ -2b处理造成的迁移增强和由rSIFN-co处理引起的迁移抑制是统计学显著的( $p < 0.01$ )。使用SW620细胞时也观察到rSIFN-co引起的显著抑制。与此相反,IFN $\alpha$ -2b处理导致SW620细胞中肿瘤细胞迁移的增加。因此,rSIFN-co有效抑制肿瘤细胞迁移,并且比IFN $\alpha$ -2b有效得多。

#### [0237] 实施例13.rSIFN-co并不是经细胞凋亡通路发挥作用

[0238] 进行本研究以显示,rSIFN-co通过细胞凋亡通路以外的途径来发挥降低肿瘤细胞生存力的作用。将肿瘤细胞A549和SW620铺在6孔板上,温育过夜并在之后用10mcg/ml的IFN $\alpha$ -2b或10mcg/ml的rSIFN-co或5FU处理24小时或48小时,或不处理(作为Mock对照)。之后,通过蛋白质印迹来监测细胞凋亡相关的分子标记物。使用的一抗是小鼠单克隆 $\beta$ -微管蛋白抗体(1:2000,Cat#:CW0098A)和小鼠单克隆GAPDH抗体(1:2000,Cat#:CW0100A)(Kangwei Biotechnology, China);小鼠单克隆PARP抗体(1:1000,Cat#:sc-2007,Santa Cruz Biotechnology, Inc.);兔单克隆半胱天冬酶-3酶原抗体(1:1000,Cat#:9665)和兔多克隆切割的半胱天冬酶-3抗体(1:1000,Cat#:9661)(Cell Signaling Technology, USA);山羊多克隆半胱天冬酶-8酶原抗体(1:1000,Cat#:sc-6136,Santa Cruz Biotechnology, Inc.);兔单克隆切割的半胱天冬酶-8抗体(1:1000,Cat#:9496)(Cell Signaling Technology, USA)。

[0239] 对于A549细胞的结果显示在图14A中,对于SW620细胞的结果显示在图 14B中。蛋白质印迹显示出,在用5FU(已知的导致细胞凋亡的药物)处理后,细胞的半胱天冬酶-3酶原、半胱天冬酶-8酶原和PARP水平表现出显著降低,但是表现出切割的半胱天冬酶-3和切割的半胱天冬酶-8的水平增加。相反,干扰素 IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co均不造成任何半胱天冬酶-3酶原、半胱天冬酶-8酶原或PARP 水平的降低,或引起任何切割的半胱天冬酶-3或切割的半胱天冬酶-8水平的增加。因此,结果表明,这两种干扰素,特别是rSIFN-co可能是通过细胞凋亡以外的不同机制来造成肿瘤细胞生存力的降低。

#### [0240] 实施例14.rSIFN-co引起STAT磷酸化

[0241] 进行该实验以显示,rSIFN-co同IFN $\alpha$ -2b一样利用JAK/STAT信号转导通路。在本研究中,将A549细胞和Hela细胞分别铺到3.3em的盘中,37 $^{\circ}$ C温育过夜,之后分别用10 $\mu$ g/ml的IFN $\alpha$ -2b或rSIFN-co处理0、5、15、30、60、120和240分钟。在处理后,收集细胞,提取细胞蛋白并加样到SDS-PAGE琼脂糖上进行蛋白质印迹分析,从而观察STAT1(Tyr701)、STAT2(Tyr690)和STAT3(Tyr705)的磷酸化。GAPDH用作加样对照。

[0242] 使用的一抗是:STAT1(1:1000,Cat#:9175S)、Tyr701磷酸化-STAT1(1:1000,Cat#:9167S)、STAT2(1:500,Cat#4594)、Tyr690磷酸化-STAT2(1:1000,Cat#:441S)、STAT3(1:1000,Cat#:9132)、Tyr705磷酸化-STAT3(1:1000,Cat#:9145S)。抗小鼠(Cat#:sc-2005)或抗兔(Cat#:sc-2004)或抗山羊(Cat#:sc-2020)HRP-结合的二抗(Santa Cruz Technology,Santa Cruz,CA)以1:2000的浓度使用。使用冷光/荧光成像LAS4000系统(GE Healthcare Life Sciences,USA)和super signal west pico化学发光底物试剂盒(Thermo Scientific, USA)来对印迹进行可视化。

[0243] 图15所示的结果证实,这两种干扰素,即IFN $\alpha$ -2b和rSIFN-co,在A549细胞和Hela细胞中在STAT1、STAT2和STAT3磷酸化模式上表现相似。因此,rSIFN-co介导的JAK/STAT信号转导水平与IFN $\alpha$ -2b介导的JAK/STAT信号转导水平没有不同,表明rSIFN-co和IFN $\alpha$ -2b可能共享共同的IFNAR1/2受体。

#### [0244] 实施例15.rSIFN-co结合IFNAR1和IFNAR2的亲和力

[0245] 基于表面等离子共振技术,使用Biacore T100蛋白质相互作用阵列系统(General Electric HealthCare Co.)系统测定IFN $\alpha$ -2b和rSIFN-co对IFNAR1-EC(Cat#:13222-H08H,Sino Biological Inc)或IFNAR2-EC(Cat#:10359-H08H,Sino Biological Inc)的结合亲和力。为了固定受体亚基,将CM5传感器芯片分别与20 $\mu$ g/ml的IFNAR1-EC亚基以及50 $\mu$ g/ml的IFNAR2-EC亚基温育,通过蛋白质中的氨基结合至芯片的羧基葡聚糖表面。然后将两种待测的干扰素以不同的浓度垂直注射于配体,对于IFN $\alpha$ -2b/IFNAR1结合在100-3,000nM的范围,对于rSIFN-co/IFNAR1结合在50-1,000nM的范围,以及对于它们与IFNAR2的结合在3.125-80nM的另一范围,在IFNs/IFNAR2结合期间添加更新的2MNaCl缓冲液以持续5秒的再活化程序。根据制造商的操作指南分析数据。根据方程式 $K_D = k_d/k_a$ ( $k_d$ :解离; $k_a$ :结合)由速率常数确定解离常数 $K_D$ 。

[0246] 图17显示了rSIFN-co和IFN $\alpha$ -2b的不同的受体结合亲和力。在该实验条件下,可通过稳态分析模型分析得到IFNAR1干扰素受体的亲和常数: $K_D$ (IFNAR1-EC/\_rSIFN-co): $6.003 \times 10^{-7}$ mol/L; $K_D$ (IFNAR1-EC/IFN $\alpha$ -2b): $2.835 \times 10^{-6}$ mol/L(图17A);可通过动态分析模型分析得到IFNAR2干扰素受体的亲和常数: $K_D$ (IFNAR2-EC/rSIFN-co): $2.192 \times 10^{-8}$ mol/L;

$K_D$  (IFNAR2-EC/IFN $\alpha$ -2b)  $1.843 \times 10^{-9}$  mol/L (图17B); 关于它们的亲和常数的比较结果, 与IFN $\alpha$ -2b相比 rSIFN-co/IFNAR1显示更强的结合亲和力(4.72倍) (图17C)。然而, rSIFN-co/IFNAR2的结合亲和力则显示较IFN $\alpha$ -2b弱11.9倍(图17C)。

[0247] 实施例16. 癌细胞中在B18R预处理后rSIFN-co较IFN $\alpha$ -2b引起更高的p-STATs

[0248] 在该研究中, A549和HeLa细胞温育培养过夜。在培养基中制备10倍连续稀释(1、10和100ng/ml, 最终的测定浓度)的B18R重组蛋白(牛痘病毒编码的中和I型干扰素受体, 也称为I型干扰素抑制剂, Cat#:14-8185, eBioscience, Inc) 并在室温下与恒定量(1ng/ml, 最终的测定浓度)的每种IFN蛋白(IFN $\alpha$ -2b和 rSIFN-co)混合1小时。将B18R/IFN复合物用于处理上述两种细胞并温育30分钟。然后, 收集细胞裂解物, 通过蛋白质印迹来检测STAT1 (Tyr701)、STAT2 (Tyr690) 和STAT3 (Tyr705)的磷酸化。GAPDH和肌动蛋白用作加样对照。

[0249] 使用的一抗为: STAT1 (1:1000, Cat#:9175S) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr701磷酸化的-STAT1 (1:1000, Cat#:9167S) (Cell Signaling Technology, USA)、STAT2 (1:500-1:1000, Cat#4594) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr690磷酸化的-STAT2 (1:500-1:1000, Cat#:441S) (Cell Signaling Technology, USA)、STAT3 (1:1000, Cat#:9132) (Cell Signaling Technology, USA)、Tyr705磷酸化的-STAT3 (1:1000, Cat#:9145S) (Cell Signaling Technology, USA)、GAPDH (Cat#: CW0100A, Kangwei biotech, Inc)、 $\beta$ -肌动蛋白 (Cat#:CW0096, Kangwei biotech, Inc)。

[0250] 图18显示与IFN $\alpha$ -2b组相比, 在A549细胞(图18A)和HeLa细胞(图18B)中于10ng/ml的抑制剂B18R下, rSIFN-co显示更高的对STAT1/2/3磷酸化的诱导。

[0251] 工业实用性

[0252] 本文中描述的方法和检测试剂盒可用于确定测试化合物例如干扰素的效力, 并用于治疗因 $\beta$ -联蛋白或LRP6、FZD6、Axin2、CD24、存活蛋白和ID2中任一种或多种的过度活跃或过表达, 或者DKK3、BATF2、或KLF4的下调而受到不利影响的某些疾病或病症。

## 序列表

<110> 远东超级实验室有限公司  
 <120> 鉴定对肿瘤具有直接抑制作用的干扰素的方法及其用途  
 <130> 1931-PCT  
 <140>  
 <141>  
 <150> US 62/160,006  
 <151> 2015-05-12  
 <160> 21  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 167  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Amino acid sequence of recombinant interferon  
 <400> 1  
 Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu  
 1 5 10 15  
 [0001] Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys  
 20 25 30  
 Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln  
 35 40 45  
 Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln  
 50 55 60  
 Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp  
 85 90 95  
 Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu  
 100 105 110  
 Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile  
 115 120 125  
 Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val  
 130 135 140  
 Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln  
 145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu  
165

<210> 2  
<211> 504  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding recombinant interferon

<400> 2  
atgtgcgacc tgccgcagac cactcctg ggtaaccgtc gtgctctgat cctgctgget 60  
cagatgcgtc gtatctcccc gttctctgctc ctgaaagacc gtcacgactt cggtttcccc 120  
caggaagaat tcgacggtaa ccagttccag aaagctcagg ctatctccgt tctgcacgaa 180  
atgatccagc agaccttcaa cctgttctcc accaaagact cctccgctgc ttgggacgaa 240  
tcctgctgga aaaaattcta caccgaactg taccagcagc tgaacgacct ggaagcttgc 300  
ggtatccagg aagttggtgt tgaagaaacc ccgctgatga acgttgactc catcctgget 360  
gttaaaaaat acttccagcg taccacctg tactgaccg aaaaaaata ctccccgtgc 420  
gcttggaag ttgttctgctc tgaatcatg cgttccttct cctgtccac caacctgcag 480  
gaacgtctgc gtcgtaaaga ataa 504

[0002]

<210> 3  
<211> 504  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Nucleotide sequence encoding recombinant interferon

<400> 3  
tacacgctgg acggcgtctg ggtgaggac ccattggcag cacgagacta ggacgaccga 60  
gtctacgcag catagagggg caagaggacg gactttctgg cagtgtctgaa gccaaagggc 120  
gtccttetta agctgccatt ggtcaaggtc tttcagctc gatagaggca agacgtgctt 180  
tactaggtcg tetggaagtt ggacaagagg tggtttctga ggaggcagc aacctgctt 240  
agggacgacc ttttaagat gtggcttgac atggtcgtcg acttgctgga cttcgaacg 300  
caataggtcc ttcaaccaca acttctttgg ggcgactact tgcaactgag gtaggaccga 360  
caatttttta tgaaggctgc atagtgggac atggactggc tttttttat gaggggcagc 420  
cgaacccttc aacaagcagc acttttagtac gcaaggaaga gggacaggtg gttggacgtc 480  
cttgcagacg cagcatttct tatt 504

<210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	4	
		tgaagaacca gcaccacagg	20
	<210>	5	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	5	
		cataaccaag aggcacagaa gc	22
	<210>	6	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	6	
		gcgagtgaa ggaaggatta gtc	23
[0003]	<210>	7	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	7	
		tgaacaagca gagatgtgga acc	23
	<210>	8	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	8	
		cgtgataacc ttagactt	18
	<210>	9	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	9	
		gctgtgttc tcaatgta	18

	<210> 10	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sense primer	
	<400> 10	
	tgaagaacat gtgagaggtt tgac	24
	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Antisense primer	
	<400> 11	
	gaaaactgaa tetccattcc acaa	24
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sense primer	
[0004]	<400> 12	
	accgcatctc tacattcaag	20
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Antisense primer	
	<400> 13	
	caagtctggc tcgttctc	18
	<210> 14	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sense primer	
	<400> 14	
	cacaacaaca acaacaac	18
	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	15	
		cacagtccaa gtaagaga	18
	<210>	16	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	16	
		cagagcaggg agcacaaacc	20
	<210>	17	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	17	
		tgagcagagg agagcagagg	20
[0005]	<210>	18	
	<211>	21	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	18	
		ggagcctgac tgaagagatg g	21
	<210>	19	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	19	
		acgcetaaag cacacacctg	20
	<210>	20	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
	<220>		
	<223>	Sense primer	
	<400>	20	
		ccttcaacct ggccgacatc aac	23

---

	<210>	21	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	Artificial Sequence	
[0006]	<220>		
	<223>	Antisense primer	
	<400>	21	
		ggctgctgcg gcggaatg	18

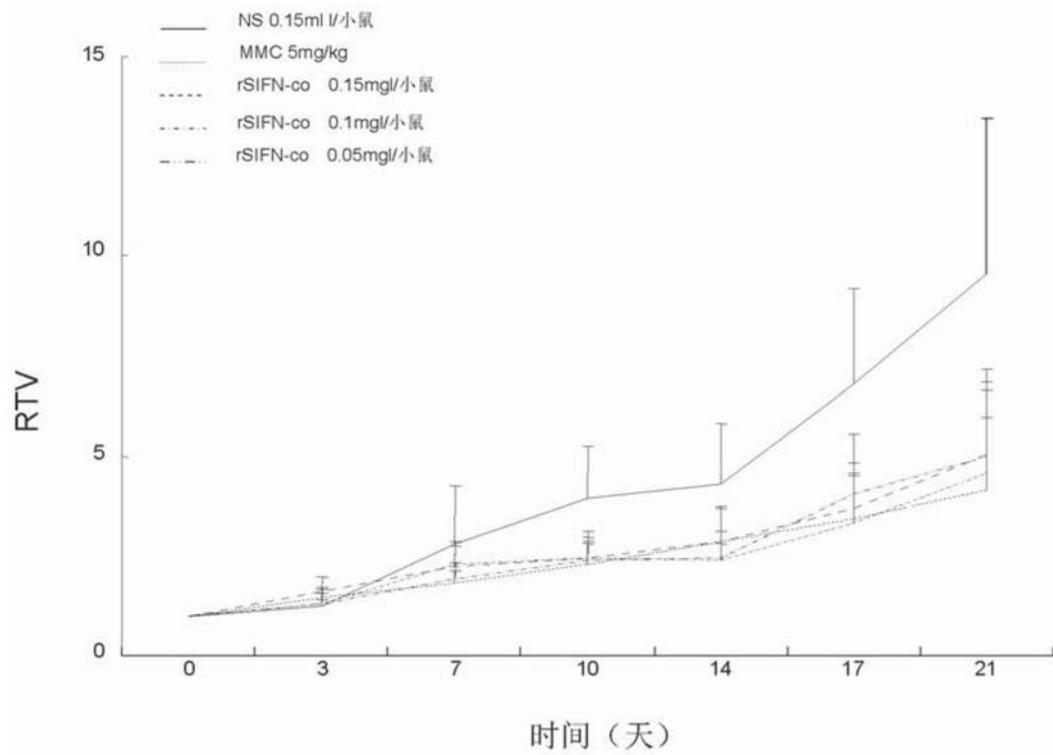


图1

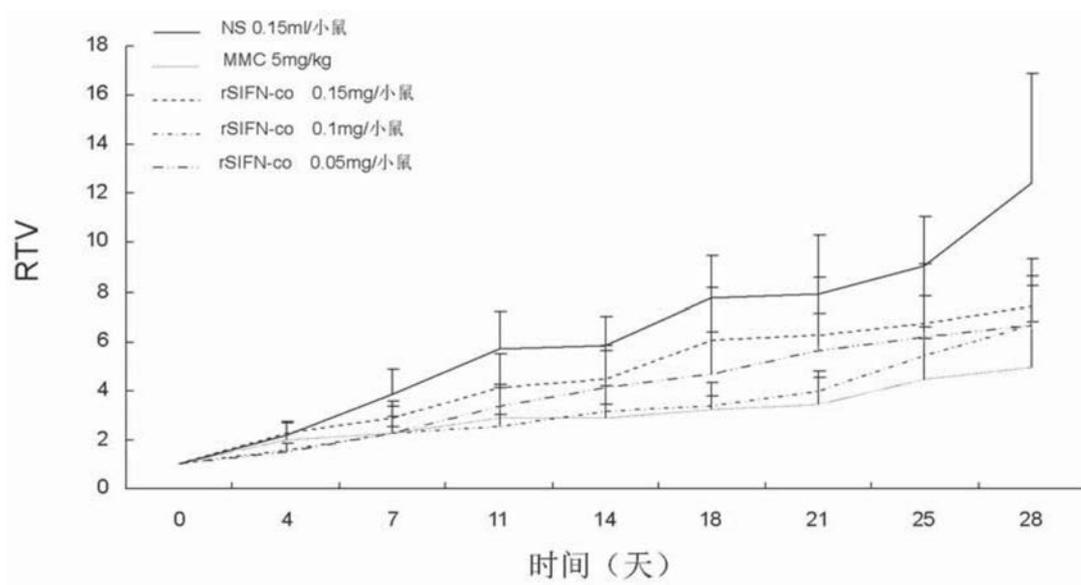


图2

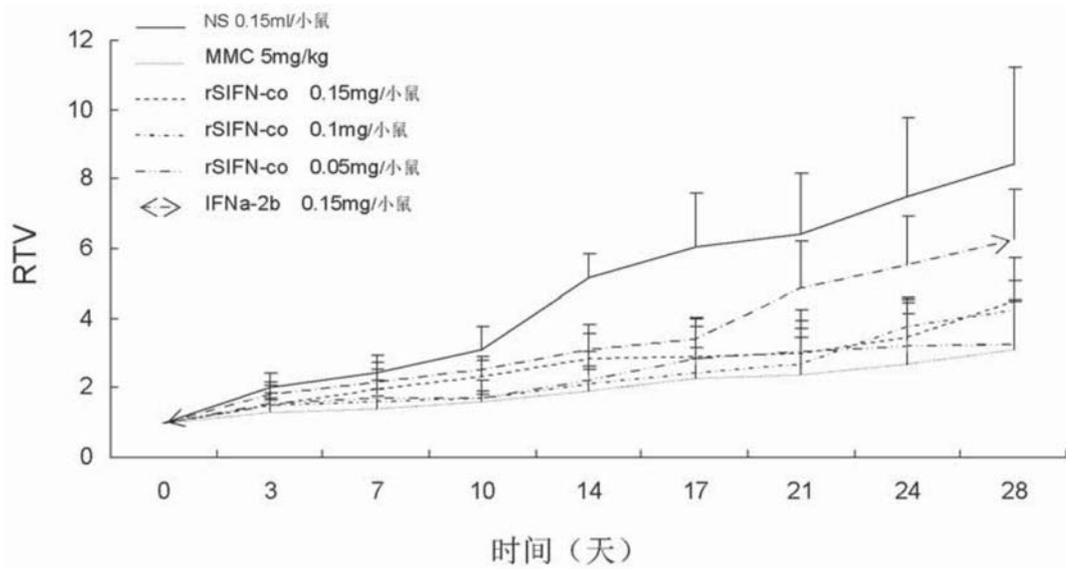


图3

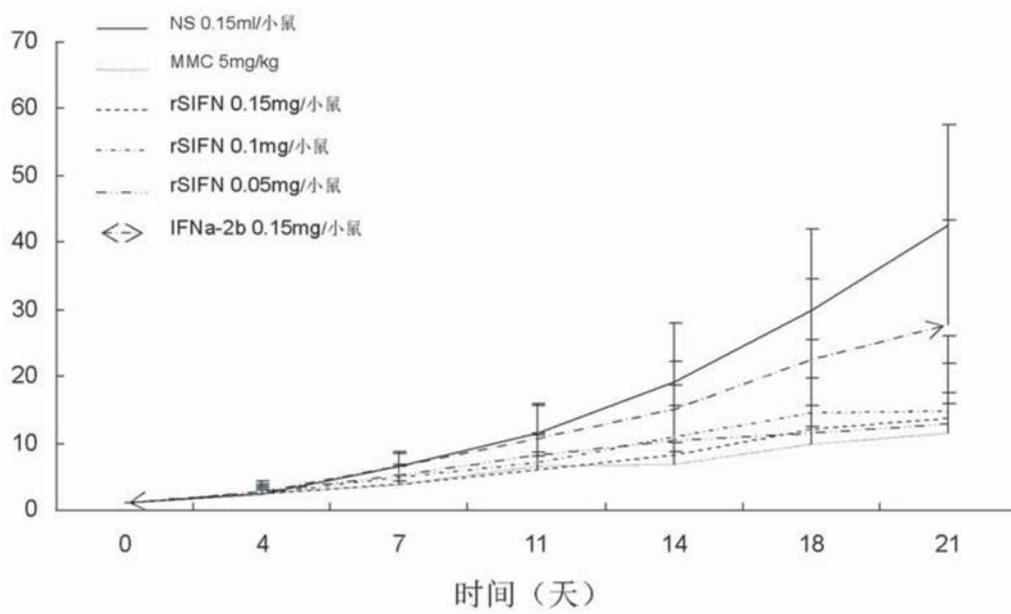


图4

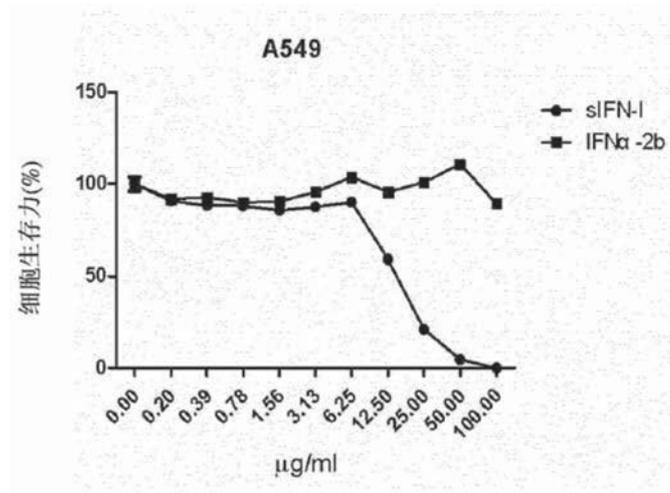


图5A

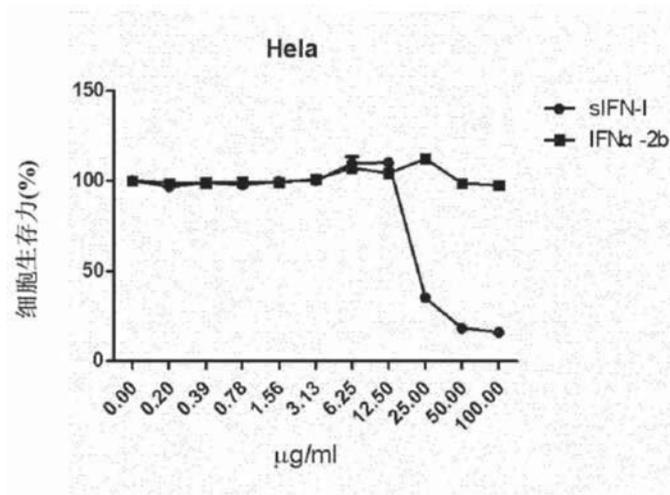


图5B

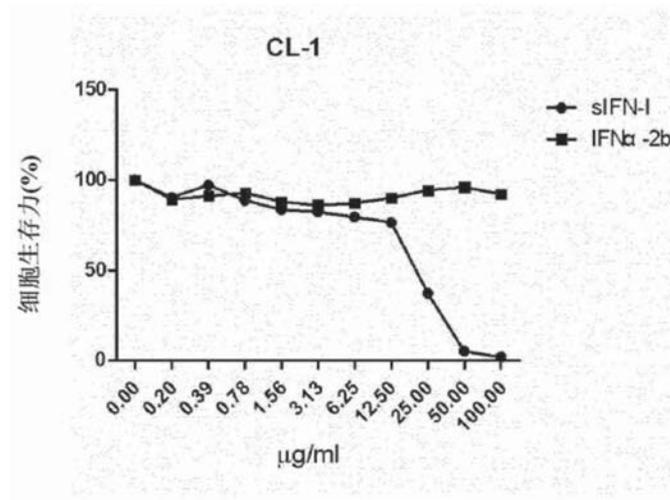


图5C

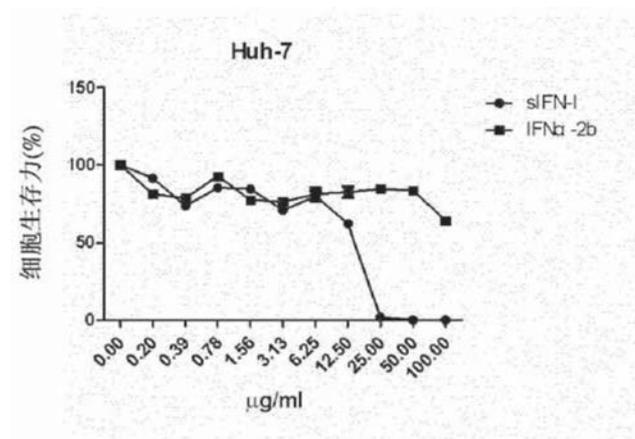


图5D

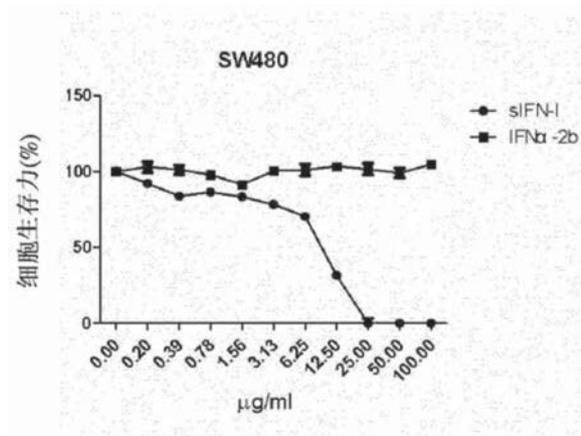


图5E

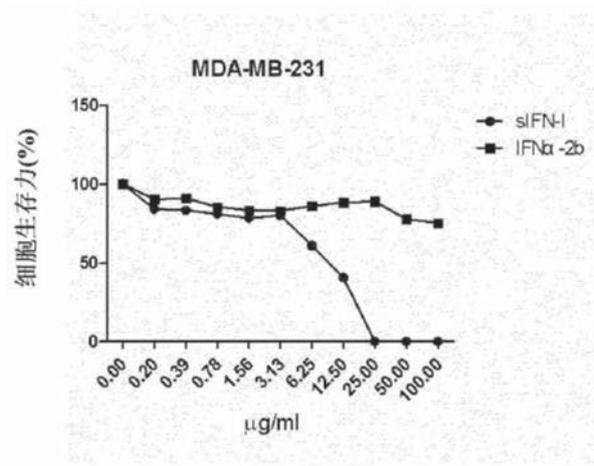


图5F

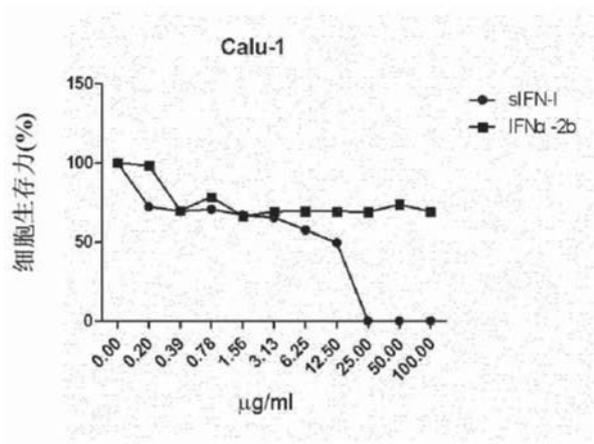


图5G

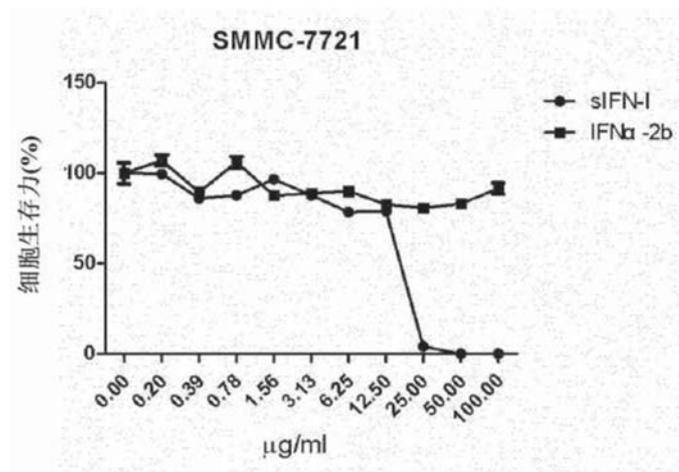


图5H

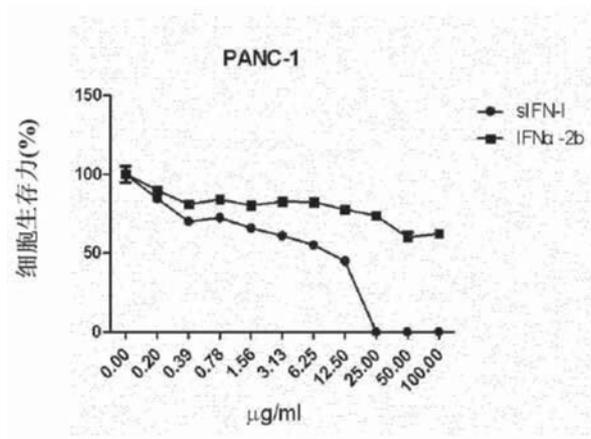


图5I

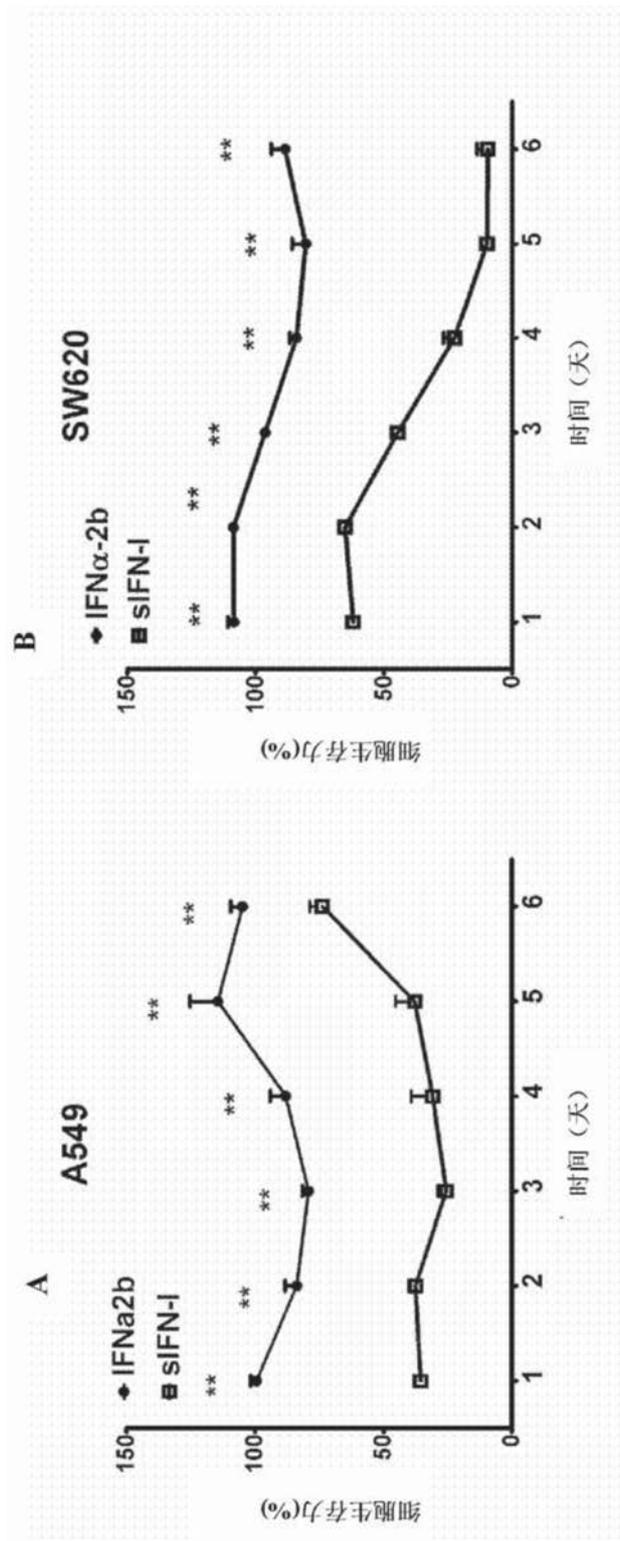


图6

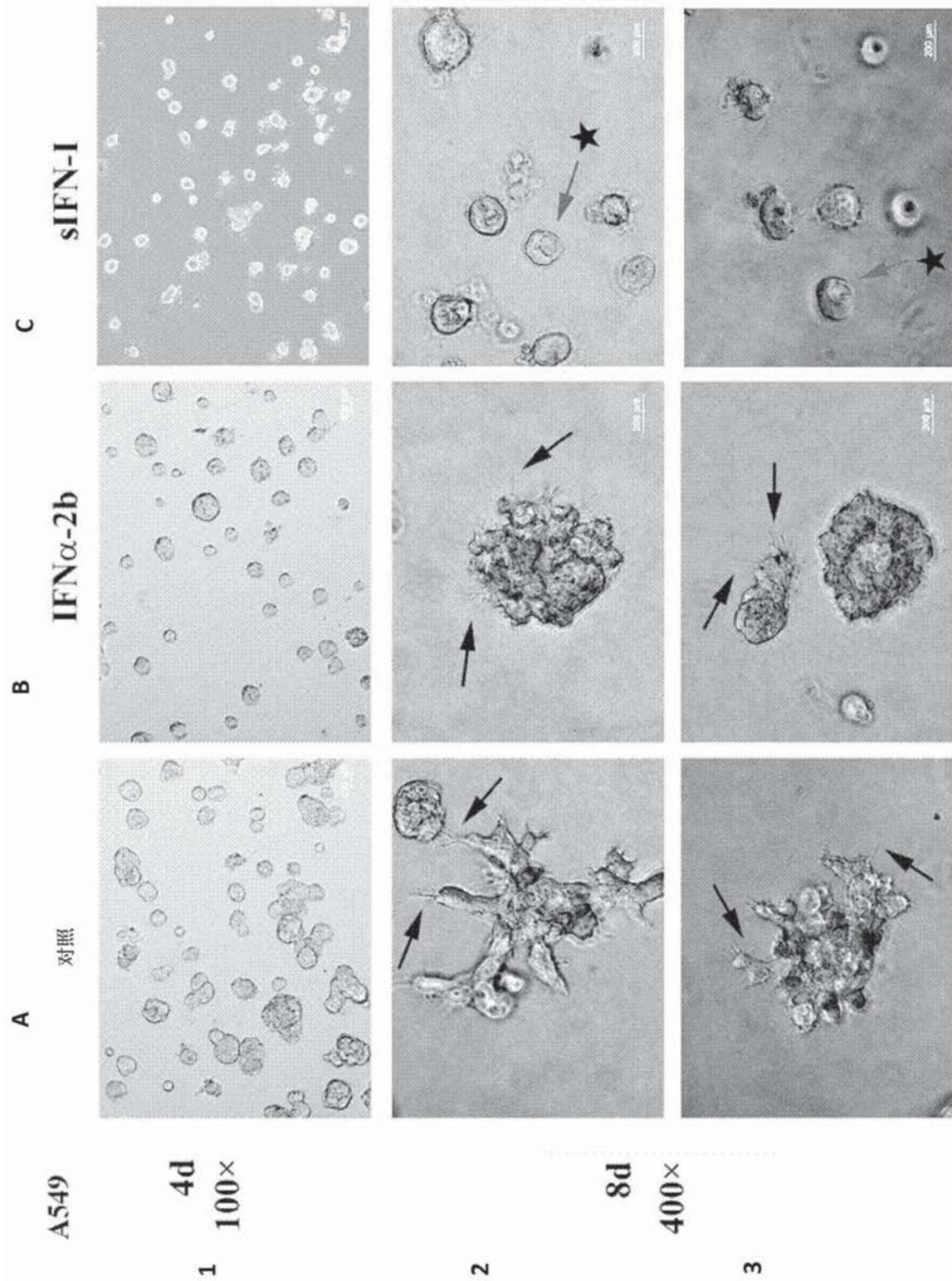


图7

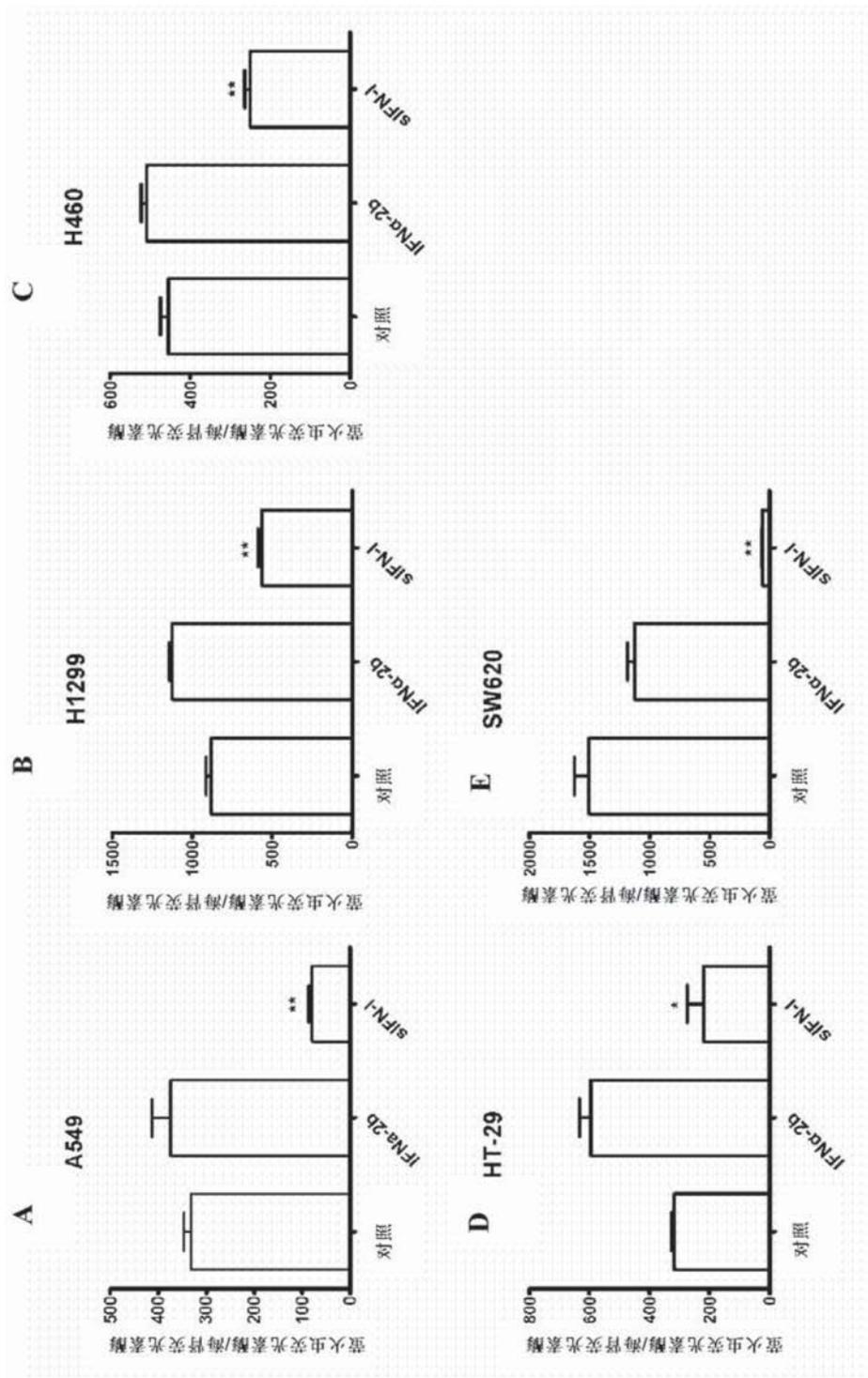


图8

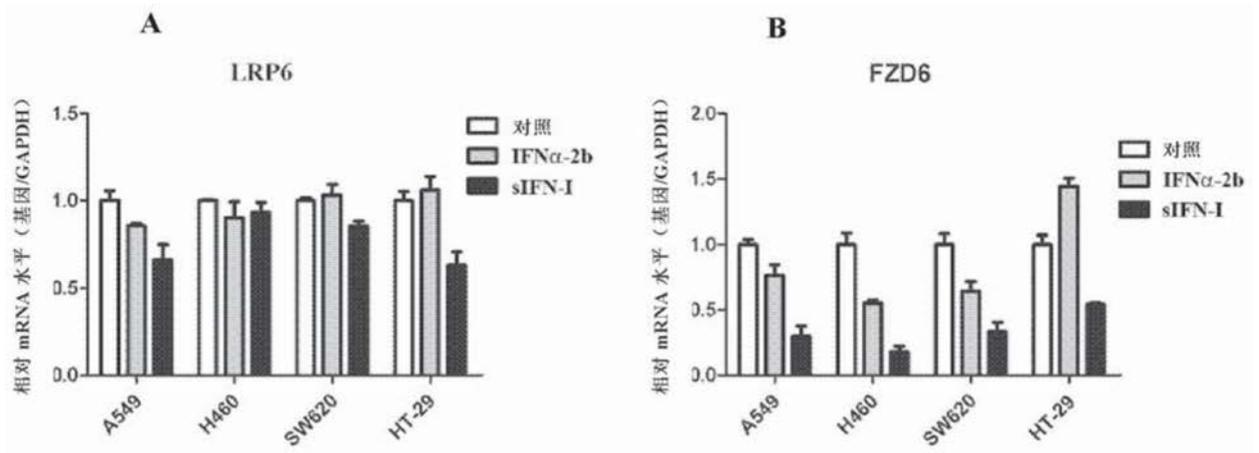


图9

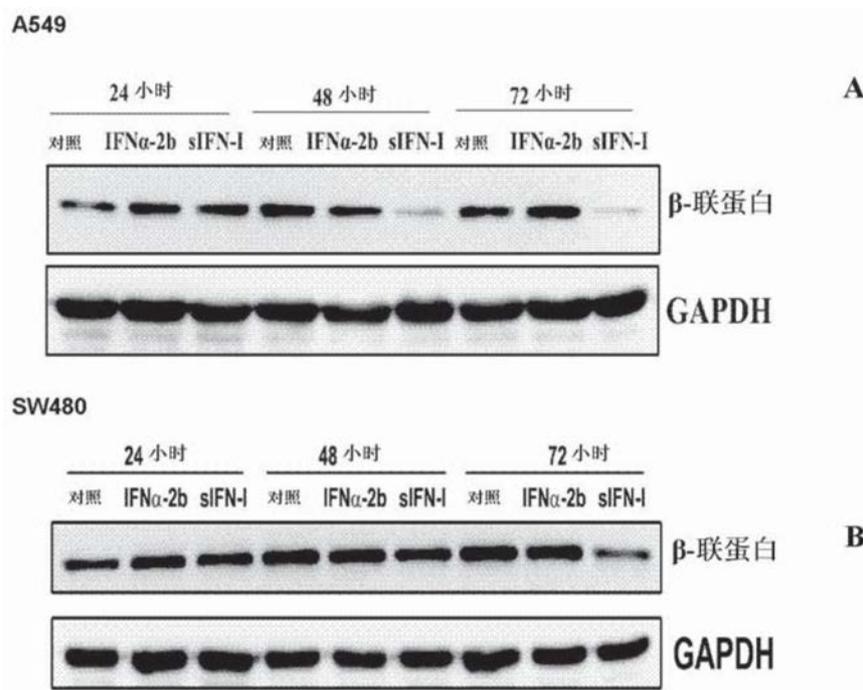


图10

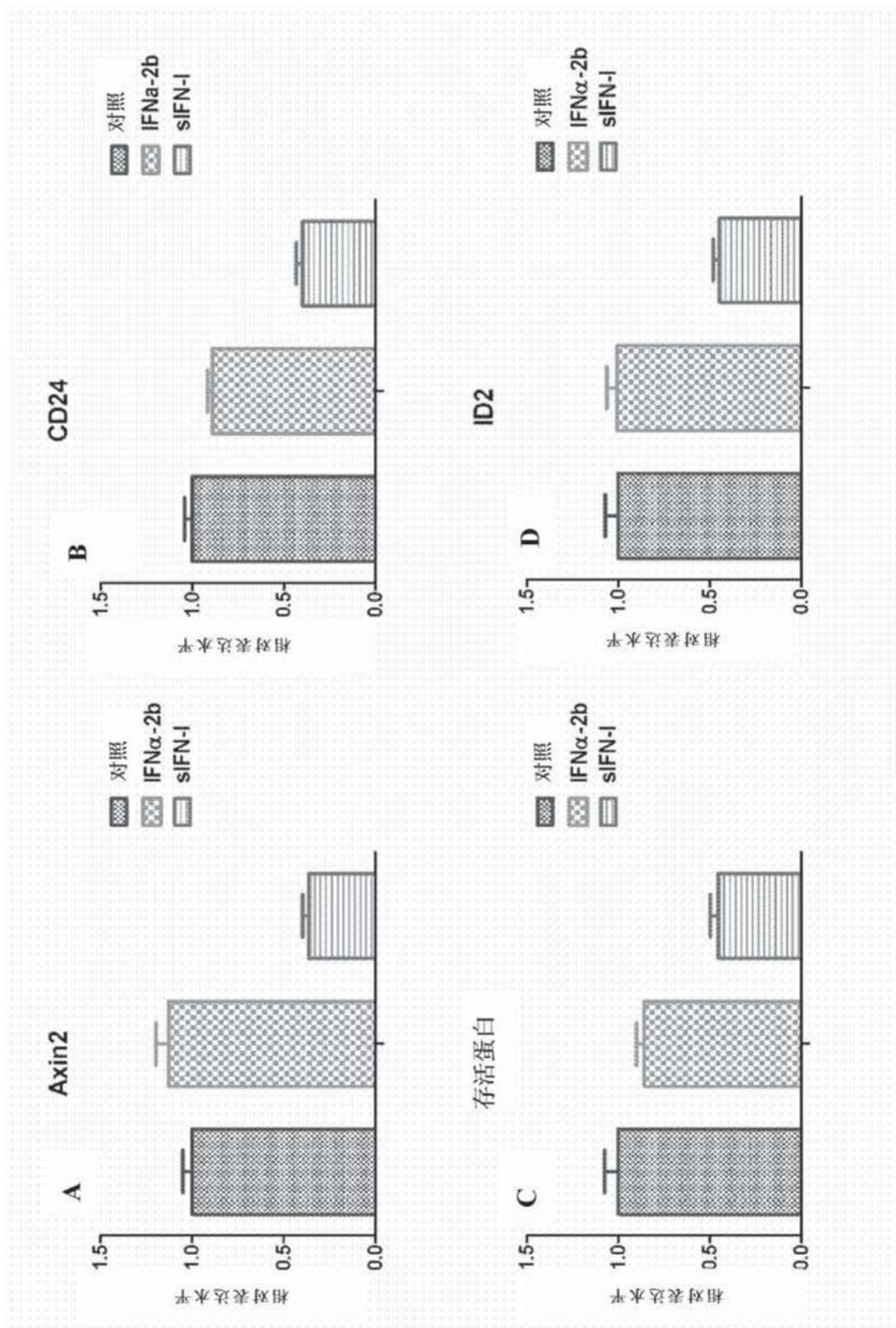


图11

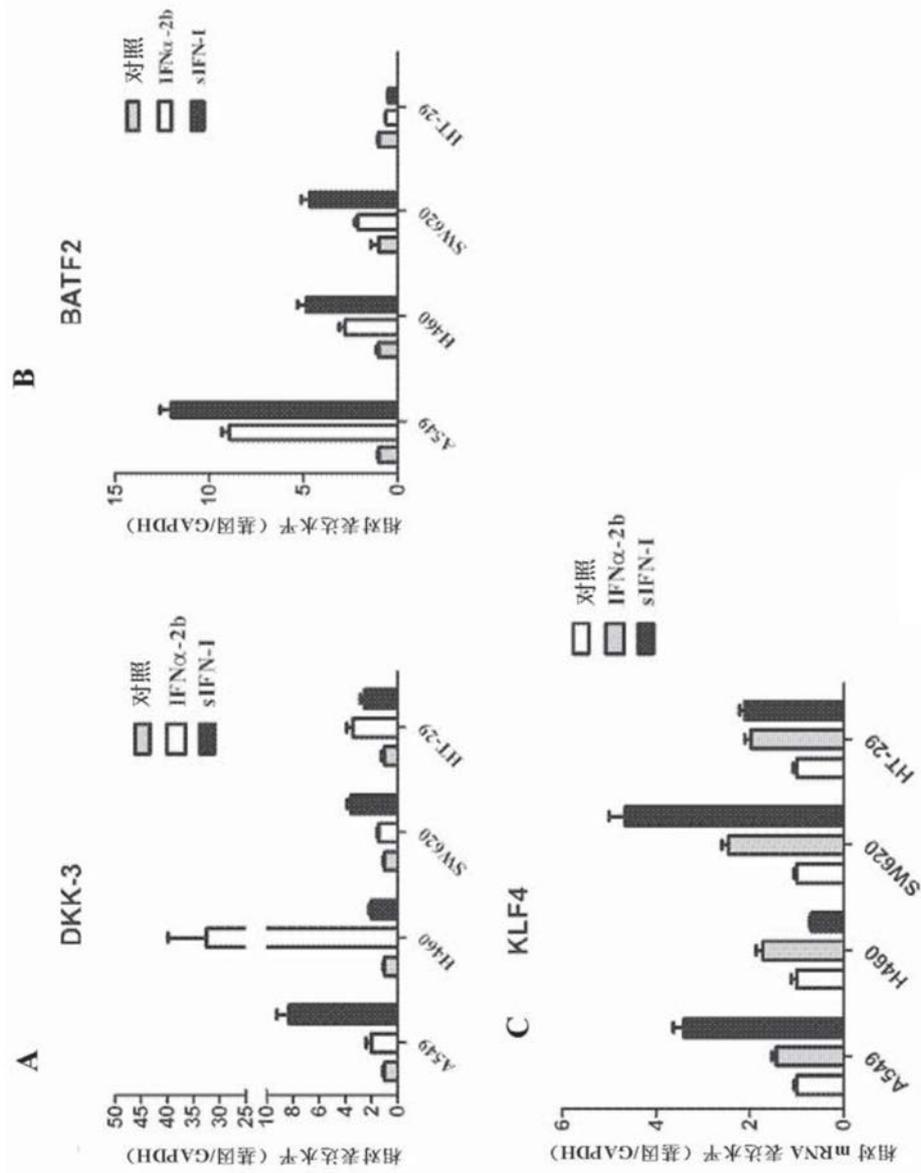


图12

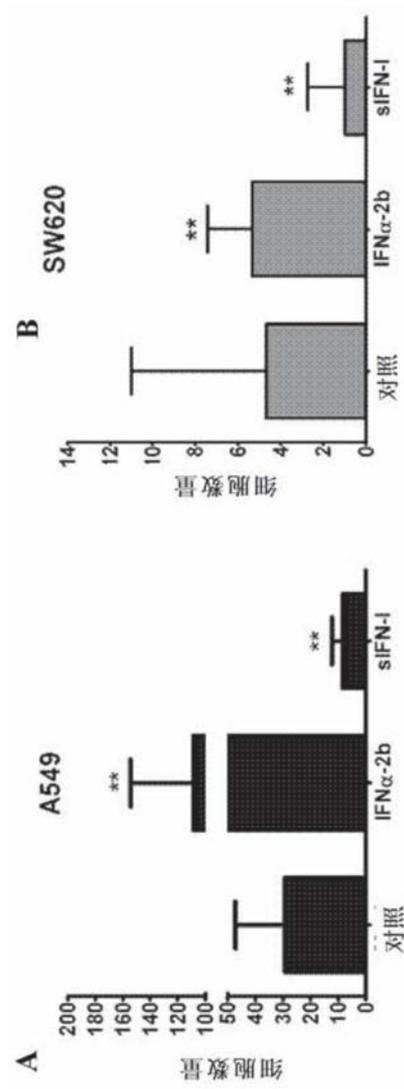


图13

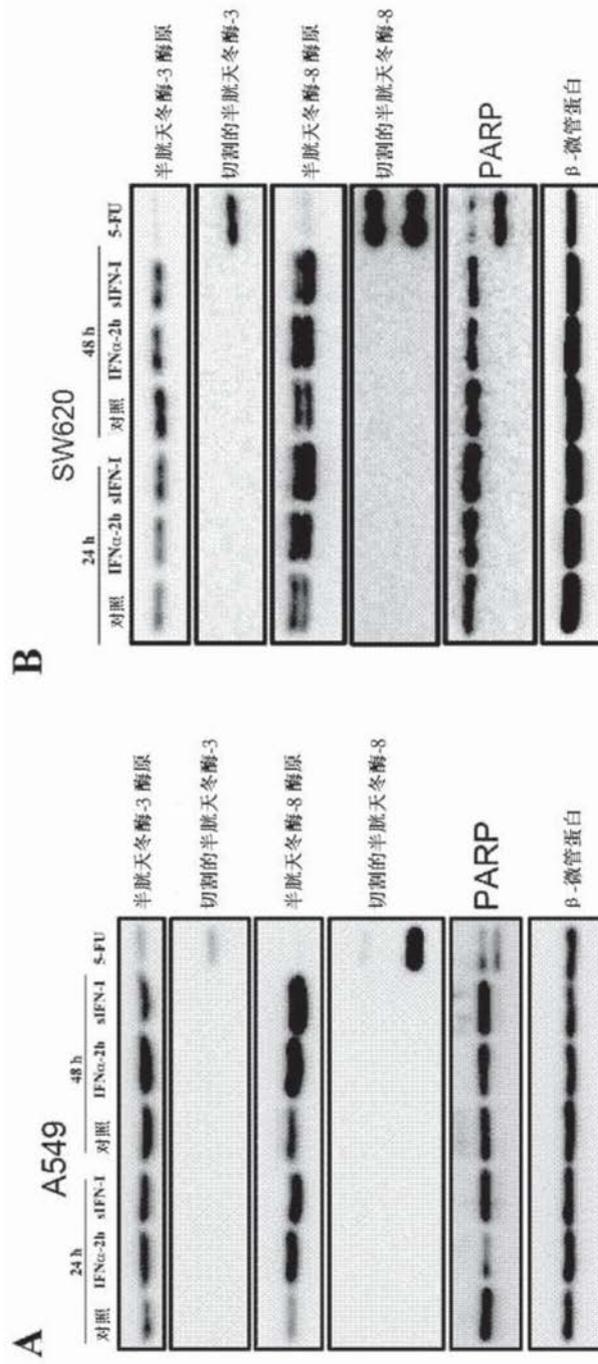


图14

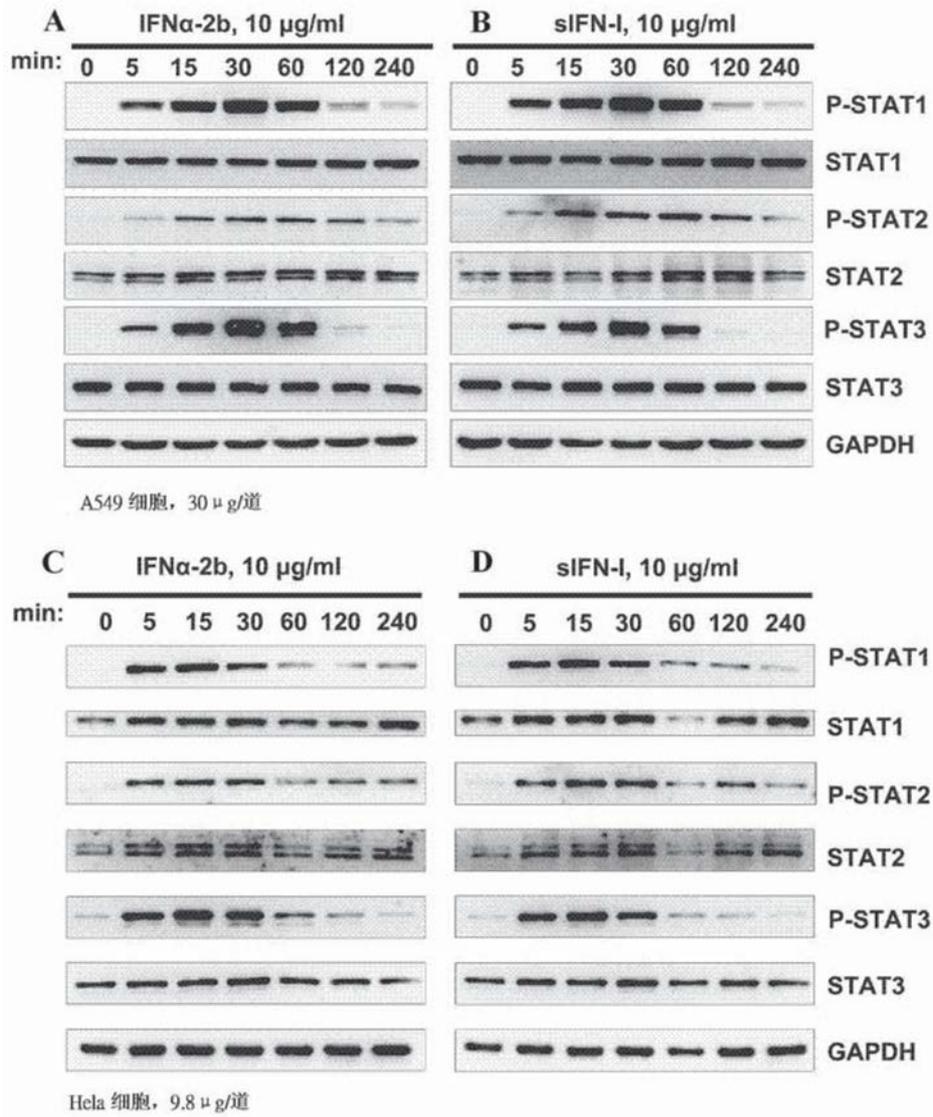


图15

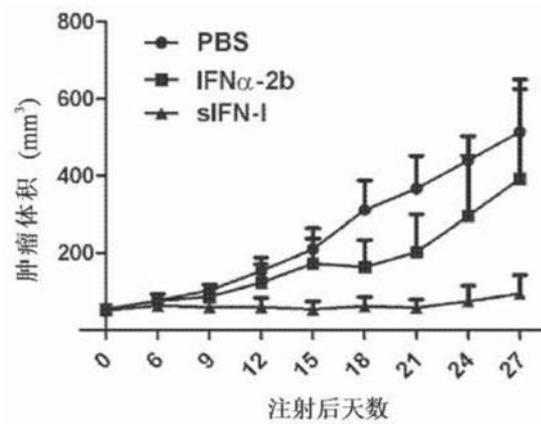


图16

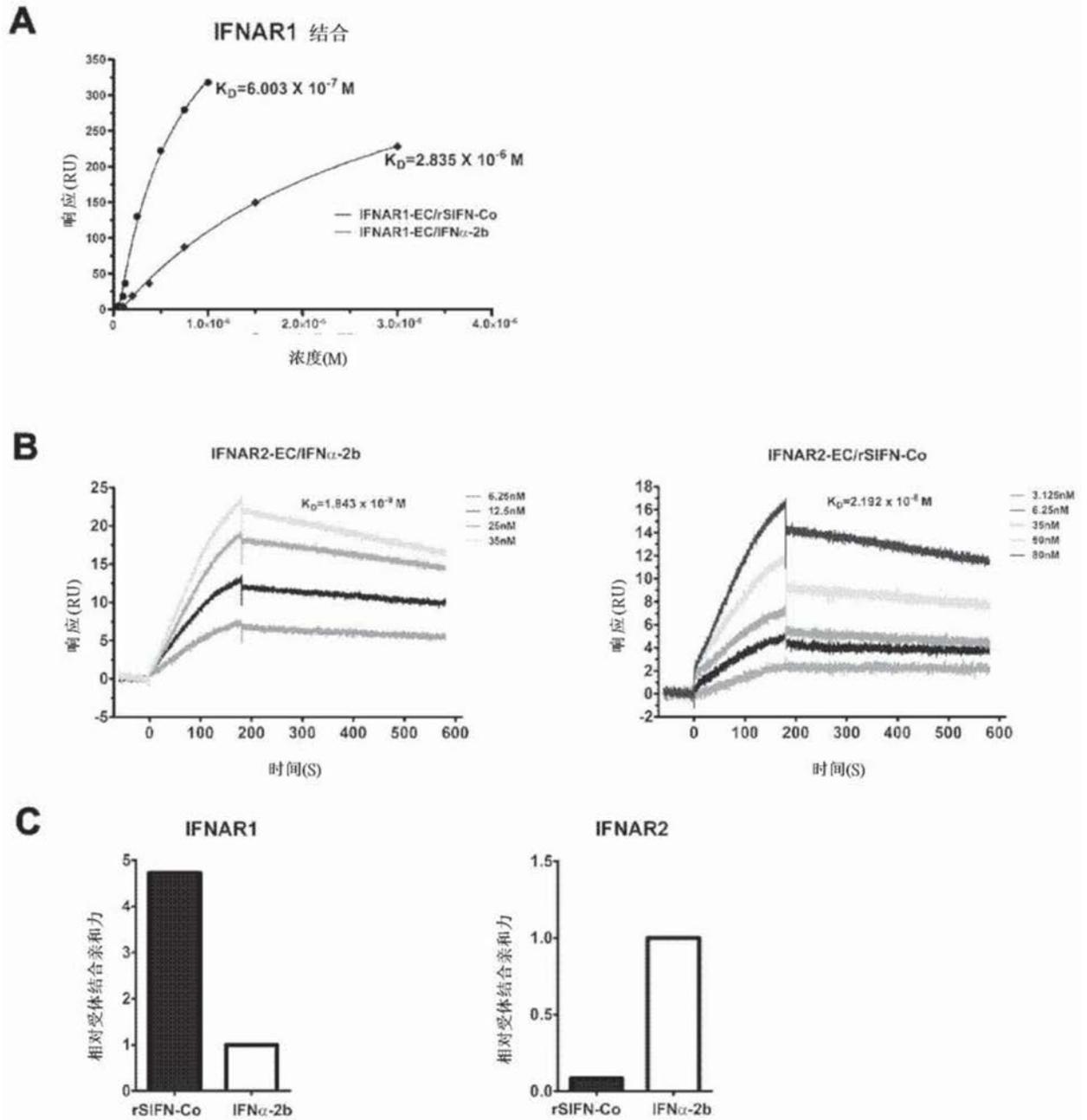


图17

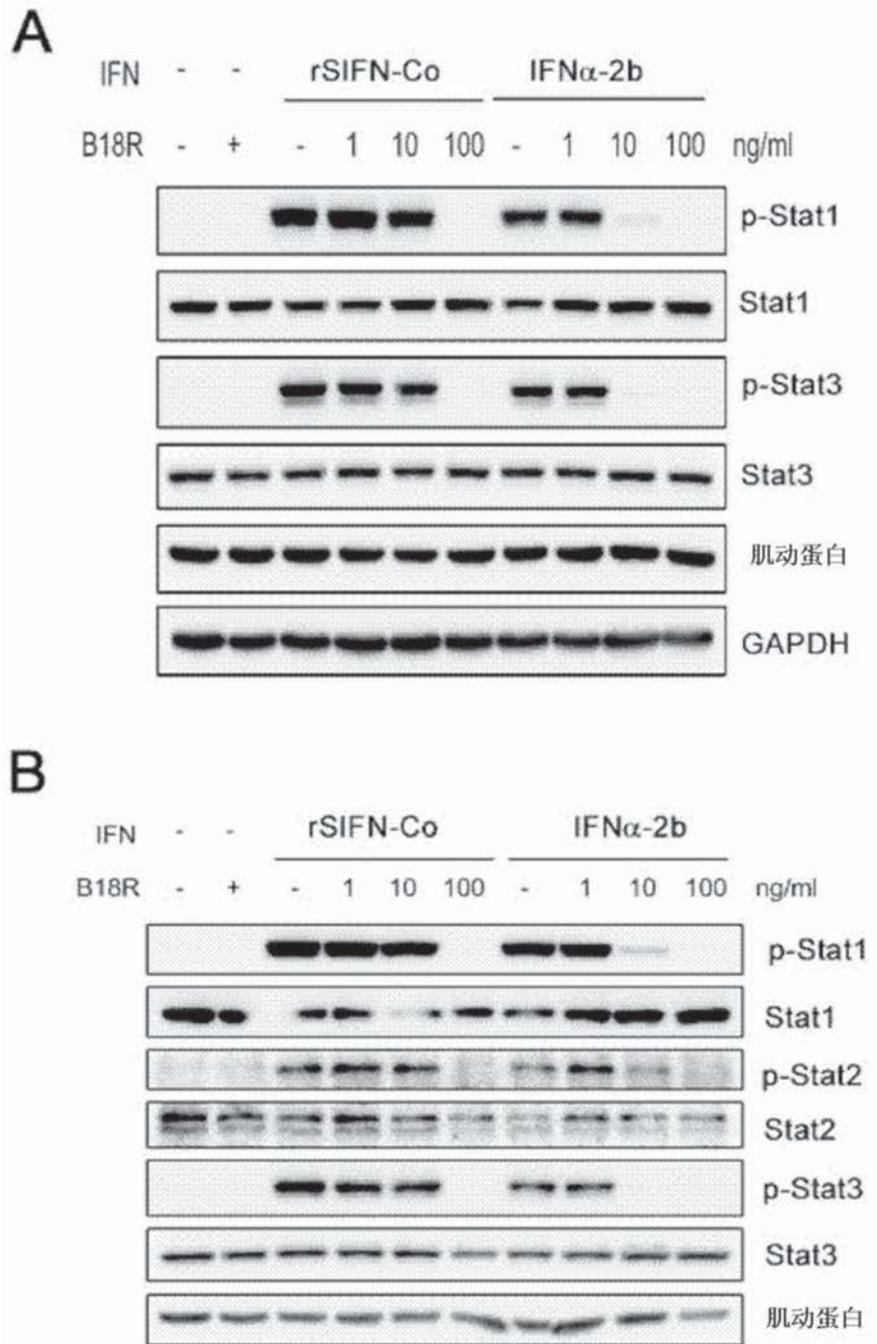


图18