



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03823261.8

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1684979A

[22] 申请日 2003.8.29 [21] 申请号 03823261.8
 [30] 优先权
 [32] 2002.8.31 [33] KR [31] 10-2002-0052365
 [86] 国际申请 PCT/KR2003/001765 2003.8.29
 [87] 国际公布 WO2004/019856 英 2004.3.11
 [85] 进入国家阶段日期 2005.3.29
 [71] 申请人 希杰株式会社
 地址 韩国汉城
 [72] 发明人 李垠姪 朴亨基 金贤硕 朴持淑
 金演嚮 李贤秀 高亨坤 吴明锡

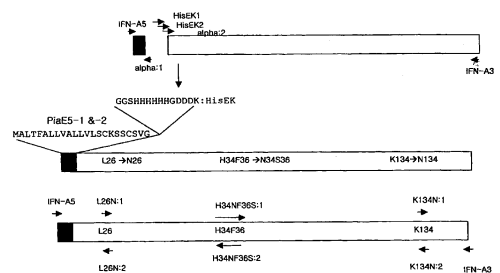
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
 标事务所
 代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 22 页 序列表 4 页
 附图 9 页

[54] 发明名称 糖基化的人干扰素 α 同种型

[57] 摘要

本发明涉及氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型，它具有在特定位点处形成的至少一个 Asn - X - Ser/Thr (N - X - S/T) 序列，以便在该位点发生糖基化。本发明还涉及编码所述同种型的基因，包括所述基因的表达载体，以及用于生产糖基化的人干扰素 α 同种型的方法，该方法包括用所述表达载体转化或转染真核细胞，培养所述转染或转化过的细胞，并且从所述培养物中分离所述糖基化的人干扰素 α 同种型。本发明也涉及通过这种方法生产的糖基化的人干扰素 α 同种型以及包含所述同种型的药物组合物。



1. 一种氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型,它具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列,以便在这些位点发生糖基化:

-Cys1-Ser8 (Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52 (Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Lys134-Ser137 (Lys134-Tyr-Ser137); 和

-Gln158-Glu165 (Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165)。

2. 如权利要求 1 的氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型,它具有下列修饰: 用天冬酰胺修饰 26 号亮氨酸, 分别用天冬酰胺和丝氨酸修饰 34 号组氨酸和 36 号苯丙氨酸, 或用天冬酰胺修饰 134 号赖氨酸, 或所有上述修饰。

3. 一种编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因, 所述同种型具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列, 以便在这些位点发生糖基化:

-Cys1-Ser8 (Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52 (Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Lys134-Ser137 (Lys134-Tyr-Ser137); 和

-Gln158-Glu165 (Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165)。

4. 如权利要求 3 的基因, 其中, 所述人干扰素 α 具有下述修饰: 用天冬酰胺修饰 26 号亮氨酸, 分别用天冬酰胺和丝氨酸修饰 34 号组氨酸和 36 号苯丙氨酸, 或用天冬酰胺修饰 134 号赖氨酸, 或所有上述修饰。

5. 一种用于生产糖基化的人干扰素 α 同种型的方法, 包括以下步骤: 培养被包括权利要求 3 或 4 的编码所述干扰素 α 同种型的基因的表达载体转化或转染了的真核宿主细胞, 和从培养物中分离糖基化的人干扰素 α 同种型。

6. 一种药物组合物, 其中包含如权利要求 1 或 2 的糖基化的人干扰素 α 同种型和药用可接受载体。

糖基化的人干扰素 α 同种型

技术领域

本发明涉及糖基化的人干扰素 α 同种型。更具体地讲，本发明涉及人干扰素 α 同种型，它有至少一个氨基酸被另一氨基酸所修饰，以便在特定区域形成 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，从而提高体内稳定性。本发明还涉及糖基化的人干扰素 α 同种型。

背景技术

干扰素是由 Isaacs 和 Lindenmann (Proc. R Soc. Lond[Biol.], 1957, 147, 258-267) 在 1957 年发现的，并且已知它具有强的抗病毒作用。

干扰素被划分成包括干扰素- α / - β 的 I 型干扰素，和包括干扰素 γ 的 II 型干扰素。干扰素- α 源于 B 淋巴细胞或巨噬细胞，干扰素- β 源于成纤维细胞，而干扰素- γ 源于 T 淋巴细胞。

在人体中，业已鉴定了至少 20 种干扰素- α 基因和假基因。业已证实所述干扰素- α 的蛋白质都具有两个二硫键 (Cys1-Cys98; Cys29-Cys138)。人干扰素- α 不包含 N-型糖基化成键位点，不过，野生型成熟蛋白在 106 号 Thr 处包含 O-型糖基化的键 (Adolf 等, Biochem. J., 276 (Pt 2), 511-518, 1991)。

干扰素- α 可以在很多组织的细胞中生产，不过，生产力非常低。一般，它主要是在诸如单核细胞/巨噬细胞和 B 淋巴细胞之类的白细胞中生产的。在这里，所产生的干扰素亚型的比例根据生产的细胞类型和生产条件而改变。业已了解的是，干扰素的生产是由病毒感染诱导的。另外，细菌，支原体和原生动物等可能诱导干扰素的产生，特别是革兰氏阴性细菌的脂多糖 (LPS) 是强的干扰素诱导剂。

即使是在正常人的组织中，干扰素- α 的 mRNA 也是连续产生的

(Tovey 等, Proc Natl Acad Sci USA, 1987, vol. 84, 5038-5042)。据信, 这种干扰素是自分泌干扰素, 它在细胞的生长和分化中发挥重要作用。

干扰素的体内工作机制尚不清楚。根据 Branca 和 Baglioni 的报导 (Nature, 294, 768-770, 1981), 业已证实干扰素- α 和- β 能结合人淋巴瘤细胞样细胞上的相同受体。

当病毒感染在体内发生时, 就产生了干扰素, 并且产生的干扰素诱导出发挥干扰素功能的蛋白。所述蛋白的典型例子包括 2'-5'-寡聚腺苷酸合成酶, 以及 eIF2 (延伸因子 2) 的蛋白激酶磷酸化, 它是参与启动肽链合成的因子。这两种酶是活化的双链 RNA (Lengyel P., Annu. Rev. Biochem., 51, 251-282, 1982; Pestka 等, Annu. Rev. Biochem., 56, 727-777, 1982; De Maeyer 和 De Maeyer-Guignard J., *interferon and other regulatory cytokines*, Wiley, New York)。

干扰素在临床上被用于治疗慢性活动性乙型肝炎, 急性病毒性脑炎, 和鼻咽癌等。

由于被用作药品的大部分生物活性蛋白在活体中表现出低的稳定性, 需要使用所述活性蛋白的患者应当频繁接受过量的蛋白, 以便维持所述蛋白的某一水平, 从而发挥功能。因此, 患者会遭受痛苦和不方便性, 故需要生产具有增强了的体内稳定性、以便减轻所述患者所遭受的痛苦生物活性蛋白。

国际专利申请号 WO 98/48840 披露了与聚乙二醇缀合的干扰素 α 的制剂, 其中聚乙二醇作为聚合物用于提高生物活性蛋白的体内稳定性, 或者美国专利号 6, 399, 103 披露了通过将人生长激素微胶囊化制成的药品。不过, 上述方法伴随着复杂的工艺, 包括首先从微生物生产蛋白, 然后进行纯化, 再进行加成反应。另外, 有可能在不需要的部位发生交联, 并且最终产物的均质性可能是一个问题。另一种方法是使用糖基化的方法。可以通过糖基化修饰由真核细胞产生的细胞表面蛋白和分泌蛋白。已知所述糖基化不仅能够影响蛋白的物理学特性, 而且还能影响蛋白在活体内的稳定性和功能。

发明公开

因此，本发明的目的是通过采用基因重组技术对人干扰素 α 进行糖基化，由细胞系方便地生产靶蛋白，以及制备增强了体内稳定性的蛋白。

在一方面，本发明提供了氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型，它具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，以便在这些位点发生糖基化：

-Cys1-Ser8 (Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8)；

-Arg22-Thr52 (Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52)；

-Ser68；

-Asp77；

-Lys134-Ser137 (Lys134-Tyr-Ser137)； 和

-Gln158-Glu165 (Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165)。

另一方面，本发明提供了编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因，该同种型具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，以便在该位点发生糖基化。

另一方面，本发明提供了包含编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因的表达载体，该同种型具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，以便在该位点发生糖基化。

另一方面，本发明提供了被包含编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因的表达载体转化或转染了的宿主细胞，该同种型具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，以便在该位点发生糖基化。

另一方面，本发明提供了用于制备糖基化的人干扰素 α 的方法，包括在合适的培养基中，在合适的条件下培养被包含编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因的表达载体转化或转染了的宿主细胞，该同种

型具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列, 以便在该位点发生糖基化, 以分离糖基化的人干扰素 α 同种型。

另一方面, 本发明提供了可以通过氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的额外糖基化而获得的糖基化的人干扰素 α 同种型, 它具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列, 以便在该位点发生糖基化。

另一方面, 本发明提供了包含糖基化的人干扰素 α 同种型以及药用可接受载体的药物组合物, 这种同种型可以通过氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的额外糖基化获得, 它具有在特定位点处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列, 以便在该位点发生糖基化。

另一方面, 本发明提供了被用作引物而在人干扰素 α 蛋白上产生糖基化位点的合成寡脱氧核苷酸。

附图的简要说明

通过以下详细说明, 并结合附图, 可以更全面地了解本发明的其他目的和优点, 其中:

图 1 表示人干扰素 α 基因和蛋白的序列。序列上方的箭头或直线表示在人干扰素 α 蛋白的三维结构中的螺旋构象区域, 箭头方向表示按照氨基酸序列顺序的螺旋方向。

成熟干扰素 α 的 23 号氨基酸精氨酸具有与现有技术中已知序列不同的 DNA 序列, 不过它编码相同的氨基酸。在修饰之前, 成熟干扰素 α 蛋白的 106 号苏氨酸是在人衍生细胞或真核细胞中生产时发生糖基化 (O-型) 的位点。

图 2 表示人干扰素 α 的蛋白结构中发生本发明的糖基化氨基酸修饰的位点, 其中, 所述位点包括前序列、6 个组氨酸 (作为能够结合金属离子的氨基酸, 以便纯化) 以及肠激活消化位点 (4 个天冬氨酸和随后的赖氨酸序列)。

图 3 是用天冬酰胺修饰 26 号亮氨酸的方法的示意图;

图 4 是表示分别用天冬酰胺和丝氨酸修饰 34 号组氨酸和 36 号苯丙

氨酸的方法的示意图；

图 5 是表示用天冬酰胺修饰野生型干扰素 α 的 134 号赖氨酸的方法的示意图；

图 6 是表示分别用天冬酰胺、天冬酰胺和丝氨酸同时修饰野生型干扰素 α 的 26 号亮氨酸、34 号苯丙氨酸和 36 号苯丙氨酸的方法的示意图；

图 7 是表示分别用天冬酰胺同时修饰 26 号亮氨酸和 134 号赖氨酸的方法的示意图；

图 8 表示人干扰素 α 衍生物的 western 印迹的结果。

一级抗体是抗人干扰素 α 的单克隆抗体，而二级抗体是与 HRP 酶结合的抗小鼠免疫球蛋白的兔抗体的抗体。在这里，1 表示标记，2 表示 O-糖基化的 IFN- α ，3 表示 L26N 突变体，4 表示 L26N/H34NF36S 突变体，5 表示 H34NF36S 突变体，6 表示 K134N 突变体，而 7 表示 L26N/K134N 突变体；和

图 9 是人干扰素 α 衍生物在小鼠体内的残余浓度随时间变化的曲线图。

本发明的最佳实施方式

本文所使用的术语“人干扰素 α 的同种型”表示具有用另一种氨基酸对野生型人干扰素 α 的一个或多个固有氨基酸序列残基进行过修饰、同时保留了它的固有活性的类似物或突变体。

本文所使用的三个字母（单字母）按照生物化学领域的标准缩写规则表示以下氨基酸：

Ala (A)：丙氨酸；Asx (B)：天冬酰胺或天冬氨酸；Cys (C)：半胱氨酸；

Asp (D)：天冬氨酸；Glu (E)：谷氨酸；Phe (F)：苯丙氨酸；

Gly (G)：甘氨酸；His (H)：组氨酸；Ile (I)：异亮氨酸；Lys (K)：赖氨酸；Leu (L)：亮氨酸；Met (M)：甲硫氨酸；Asn (N)：天冬酰胺；Pro (P)：脯氨酸；

Gln (Q)：谷氨酰胺；Arg (R)：精氨酸；Ser (S)：丝氨酸；Thr (T)：

苏氨酸; Val (V): 缬氨酸; Trp (W): 色氨酸; Tyr (Y): 酪氨酸; Glx (Z): 谷氨酰胺或谷氨酸。

本文所使用的“(氨基酸单字母)(氨基酸位置)(氨基酸单字母)”表示位于人干扰素 α 上的相应氨基酸位置处的前一种氨基酸被后一种氨基酸所取代。例如, L26N 表示相当于野生型人干扰素 α 的 26 号位置处的亮氨酸被天冬酰胺所取代。

在本说明书中, 用于生产糖基化位点的引物被表示成“(氨基酸单字母)(氨基酸位置)(氨基酸单字母) 1 或 2”, 其中, 1 是互补于双链模板中沿 5' \rightarrow 3' 方向的单链模板的引物, 而 2 是互补于双链模板中沿 3' \rightarrow 5' 方向的单链模板的引物。

可以通过至少一个寡糖对用真核细胞作为宿主细胞生产的分泌蛋白进行修饰。已知这种被称为糖基化的修饰可能对蛋白的物理特性产生巨大影响, 并且对于该蛋白的稳定性、分泌和在细胞中的定位来说是重要的。适当的糖基化可能是生物学活性所必须的。在实践中, 当源于真核细胞的基因在缺少将蛋白糖基化的细胞内加工的细菌中表达时, 会生产出由于缺乏糖基化而导致活性受损的蛋白。

根据多肽主链, 糖基化发生在某些位置上, 通常包括两种类型。一种类型是 O-型糖基化, 它包括将寡糖结合在丝氨酸或苏氨酸残基的 OH 基团上, 而另一种是 N-型糖基化, 它包括将寡糖结合在天冬酰胺残基的 -NH 基团上。具体地讲, N-型糖基化是在具有特殊氨基酸序列的情况下发生的, 并且已知该序列为 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T), 其中, X 可以是除了脯氨酸以外的任何氨基酸。N-连接的寡糖和 O-连接的寡糖具有不同的结构, 并且存在于每一种类型中的残基也是彼此不同的。例如, 在 O-连接的糖残基中, N-乙酰半乳糖胺总是与丝氨酸或苏氨酸连接, 而在 N-连接的糖残基中, N-乙酰葡萄糖胺总是与天冬酰胺连接。O-连接的寡糖通常包括 4 个或 4 个以下糖残基, 而 N-连接的寡糖总是包括 N-乙酰葡萄糖胺和甘露糖, 并且至少包括 5 个糖残基。

本发明涉及氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型, 以便提高在特定位点处形成了至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列、从而在该位点上

发生糖基化的蛋白的体内稳定性。

本发明人业已发现，通过氨基酸修饰进行的糖基化可以在人干扰素 α 蛋白的氨基酸序列中除了螺旋区以外的任何区域诱导。

在一种实施方案中，本发明涉及氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型，它具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)序列，以便在这些位点发生糖基化：

-Cys1-Ser8(Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8)；

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52)；

-Ser68；

-Asp77；

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137)；和

-Gln158-Glu165(Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165)。

在优选实施方案中，本发明涉及氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型，它具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个Asn-X-Ser/Thr(N-X-S/T)序列，以便在这些位点发生糖基化：

-Arg22-Thr52(Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52)；和

-Lys134-Ser137(Lys134-Tyr-Ser137)。

在更优选的实施方案中，本发明涉及氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型，其中26号亮氨酸被天冬酰胺修饰，34号组氨酸和36号苯丙氨酸分别被天冬酰胺和丝氨酸修饰，或134号赖氨酸被天冬酰胺修饰，或所有上述修饰。

本发明包括对至少一个核苷酸的修饰,以便 N-型糖基化可能发生在编码人干扰素 α 的 DNA 序列上,从而具有额外糖基化位点,将所述 DNA 糖基化导入执行所述糖基化的真核细胞,然后表达,以便天然地发生所述额外糖基化。本发明的额外糖基化的人干扰素 α 可通过修饰 DNA 序列、产生 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列而实现。

在一种实施方案中,本发明涉及编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因,该同种型具有在以下氨基酸残基位置处形成的至少一个 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列,以便在这些位点上发生糖基化:

-Cys1-Ser8 (Cys1-Asp-Leu-Pro-Gln-Thr-His-Ser8);

-Arg22-Thr52 (Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52);

-Ser68;

-Asp77;

-Lys134-Ser137 (Lys134-Tyr-Ser137); 和

-Gln158-Glu165 (Gln158-Glu-Ser-Leu-Arg-Ser-Lys-Glu165)。

在优选实施方案中,本发明涉及编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因,该同种型有至少一个氨基酸被另一种氨基酸所修饰,以便在以下氨基酸残基位置处形成 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列:

-Arg22-Thr52 (Arg22-Arg-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-His-Asp-Phe-Gly-Phe-Pro-Gln-Glu-Glu-Phe-Gly-Asn-Gln-Phe-Gln-Lys-Ala-Glu-Thr52); 和

-Lys134-Ser137 (Lys134-Tyr-Ser137)。

在更优选的实施方案中,本发明涉及编码氨基酸修饰过的人干扰素 α 同种型的基因,该同种型中,26号亮氨酸被天冬酰胺修饰,34号组氨酸和36号苯丙氨酸分别被天冬酰胺和丝氨酸修饰,或134号赖氨酸

被天冬酰胺修饰，或具有所有上述修饰。

在本发明的一种实施方案中，编码人干扰素 α 的基因是从用于动物细胞表达的人干扰素 α 生产菌株中获得的。为了进行基因克隆和分离，可以使用本领域公知的方法。

通过上述方法获得的人干扰素 α 基因可以在至少一个选定的密码子处进行修饰。在本说明书中，修饰可以被定义为取代编码人干扰素 α 的基因上的一个或多个密码子，以便在人干扰素 α 氨基酸序列中引起改变。更具体地讲，它表示用另一种氨基酸取代至少一个氨基酸，以便在人干扰素 α 的氨基酸序列上形成用于额外 N-型糖基化的 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列。例如，在本发明的实施例 3 中，当 26 号亮氨酸被天冬酰胺取代时，由于 28 号氨基酸是丝氨酸，就形成了 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，从而可以进行额外的 N-型糖基化。另外，当 34 号组氨酸和 36 号苯丙氨酸分别被天冬酰胺和丝氨酸取代时，就形成了 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，从而可以进行额外的 N-型糖基化。另外，当 134 号赖氨酸被天冬酰胺取代时，由于 136 号氨基酸是丝氨酸，就形成了 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列，从而可以进行额外的 N-型糖基化。

在一个实施方案中，构建了包括编码人干扰素 α 上的所需氨基酸修饰的密码子的合成寡核苷酸。通常，使用长度为大约 25 个核苷酸的寡核苷酸。尽管可以使用长度更短的寡核苷酸，最佳的寡核苷酸在编码所述修饰的核苷酸两侧具有与模板互补的 12-15 个核苷酸。这样的寡核苷酸可以与模板 DNA 充分杂交。在表 2 中示出了在本发明中用于产生额外糖基化位点的合成寡核苷酸。所述寡核苷酸可以通过本领域公知的技术合成。

在本发明的一个实施方案中，提供了具有一个氨基酸修饰的人干扰素 α 同种型 DNA。用人干扰素 α DNA 作模板，并且用编码修饰的合成寡核苷酸作引物，进行 PCR。在 PCR 的加热步骤中，双链模板分开，并且互补的引物与各单链模板杂交。DNA 聚合酶沿 5' \rightarrow 3' 方向将互补于所述模板的核苷酸结合在编码所述修饰的引物的 -OH 基团上。因此，第二

条链包含编码所述修饰的引物，并因此编码基因上的所需修饰。所述第二条链在 PCR 的重复复制步骤中起着模板 DNA 的作用，并且编码所述修饰的基因能够连续地扩增，例如，在本发明的实施例 3 中，为了用天冬酰胺修饰 26 号氨基酸残基亮氨酸，用野生型干扰素 α DNA 作模板，和引物对 IFN-A5' 和 L26N2，以及 L26N1 和 IFN-A3' 进行 PCR。结果获得了两种 DNA 片段，其中，26 号氨基酸位置处的亮氨酸密码子改变成了天冬酰胺的密码子。然后，用由此获得的两种 DNA 片段作模板，并且使用引物对 IFN-A5' 和 IFN-A3' 作引物进行二次 PCR，获得 IFN- α -L26N 的被修饰基因，其中，26 号氨基酸被修饰成天冬酰胺，而不是亮氨酸，以便可以进行糖基化。

在本发明的另一个实施方案中，提供了包括两个或两个以上氨基酸修饰的人干扰素 α 同种型。可通过各种方法构建具有两个或两个以上氨基酸修饰的突变体。当所述两个或两个以上待修饰的氨基酸在多肽上彼此相邻时，可以使用编码所有氨基酸修饰的寡核苷酸同时进行修饰。因此，所述突变体的构建与用于构建具有一个氨基酸修饰的人干扰素 α 基因的方法相同，所不同的是其中使用具有两个或两个以上氨基酸修饰的寡核苷酸作引物。不过，当所述两个或两个以上氨基酸在多肽上彼此相隔较远时（间隔 10 个或 10 个以上氨基酸），则不太可能构建出编码所有需要的修饰的寡核苷酸。

此外，应当引入其他方法。第一种方法是构建包括每一种氨基酸修饰的各个寡核苷酸。如果所述寡核苷酸同时与单链模板 DNA 退火，则由所述模板合成的第二股 DNA 链将编码所有需要的氨基酸修饰。本发明的另一种方法包括两次或两次以上诱变，以便产生这种同种型。在第一种诱变中，将野生型 DNA 用作模板，并且将包括所述第一种所需氨基酸修饰的寡核苷酸与所述模板退火，从而形成异源 DNA（异源双链体）。在第二种诱变中，将在所述第一种诱变中制备的修饰过的 DNA 用作模板。因此，该模板业已包含至少一种修饰。将包括额外氨基酸修饰的寡核苷酸与该模板退火，所得到的 DNA 具有由所述第一和第二种诱变编码的所有修饰。

所得到的 DNA 可以用作第三次诱变的模板。总之，以上用于修饰两个或两个以上核苷酸的方法就是将用于修饰一个核苷酸的方法重复若干次。例如，在本发明的实施例 3 中，为了用天冬酰胺修饰野生型干扰素 α 蛋白的 26 号亮氨酸，同时用天冬酰胺修饰 134 号赖氨酸，可以首先修饰 134 号位置，并且用前面修饰的 DNA 作模板对 26 号氨基酸进行修饰。结果获得了这两个残基修饰过的人干扰素 α 基因。

可以通过本领域已知的任何标准方法合成本发明的编码人干扰素 α 同种型的 DNA 序列，例如使用自动 DNA 合成仪 (ex. Biosearch, Applied BiosystemTM)。

本发明的糖基化的同种型通常是通过以下步骤生产的：(a) 将编码人干扰素 α 同种型的 DNA 序列插入具有可操作地与所述 DNA 序列连接的一个或多个表达控制序列的载体上，以便控制它的表达，(b) 用所得到的重组表达载体转化或转染宿主，(c) 在合适的培养基和条件下培养所述转化或转染细胞，以便表达人干扰素 α 同种型 DNA 序列，然后分离所述糖基化的人干扰素 α 同种型。

在这方面，本发明提供了被包括编码人干扰素 α 同种型的 DNA 序列的重组表达载体转化或转染了的宿主细胞。

当然，应当理解的是，所有载体和表达控制序列不会相同地发挥功能而表达本发明的 DNA 序列。类似地，对于相同的表达系统来说，所有的宿主细胞也不会相同地发挥功能。不过，本领域技术人员可以正确地选择载体，表达控制序列和宿主细胞，而不超出本发明的范围，同时不必进行过多的实验。例如，在选择载体时，必须考虑宿主细胞。这是因为载体应当能够在宿主细胞中复制。另外，还应当考虑到载体的复制数以及控制所述复制数的能力，以及所述载体编码的其他蛋白的表达，例如抗生素标记。在选择表达控制序列时，应当考虑各种因素。例如，序列的相对强度，可控制性，与本发明 DNA 序列的兼容性，特别是应当考虑可能的二维结构。另外，在选择宿主时，应当考虑与选定载体的兼容性，毒性，分泌特性以及正确地折叠由所述核苷酸序列编码的多肽产物的能力，发酵或培养要求和条件，以及纯化由所述核苷酸序列编码

的产物的方便性。

本文所使用的术语“载体”表示能够将外源基因稳定地携带到宿主细胞中的载体的DNA分子。作为有用载体，载体应该能够被复制，具有导入宿主细胞并且检测自我存在的方式。

术语“重组表达载体”表示环状DNA分子，其中外源基因可操作地连接在载体上，以便所述基因能够在宿主细胞中表达。所述重组表达载体能够作为几个拷贝生产，并且在其中插入异源DNA。正如本领域所熟知的，为了提高转染基因在宿主细胞中的表达水平，所述基因应当可操作地连接在开放读框表达控制序列上，该序列可以在选择的表达宿主中发挥作用。所述基因优选包含在包括选择标记和复制起点的表达载体上。当表达宿主是真核细胞时，所述表达载体还应当包括可用于真核表达宿主细胞中的表达标记。

可以将各种表达载体用于表达编码人干扰素 α 同种型的DNA序列。优选的是适合真核宿主细胞的表达载体，因为可以在人干扰素 α 同种型上进行糖基化。

可用于真核宿主细胞的表达载体的例子包括源于SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列。所述载体的特定例子包括pCDNA3.1(+)\ Hyg(Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA)和pCI-neo(Stratagen, La Jolla, Calif., USA)。可用于酵母细胞的表达载体包括2 μ 质粒及其衍生物，POT1载体(美国专利号4,931,373)和pPICZ A, B, 或C(Invitrogen)。可用于昆虫细胞的表达载体包括pVL 941, pBluebac 4.5和pMelbac(Invitrogen)。

“表达控制序列”指多肽表达所需要或有益的核酸序列。相应的表达控制序列可以是编码多肽的核酸的天然或异源序列。控制序列的例子包括，但不局限于前导序列，聚腺苷酸化序列，前肽序列，启动子，增强子或上游活化序列，信号肽序列和转录终止因子。表达控制序列包括启动子。

为了表达本发明的DNA序列，可以将各种表达控制序列用作载体。适合指导在哺乳动物细胞中表达的表达控制序列的例子包括SV40和腺

病毒的早期和晚期启动子, MT-1 (金属硫蛋白基因) 启动子, 人巨细胞病毒早期基因 (CMV), 劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子和人泛素 C (UbC) 启动子。为了进一步改善在哺乳动物细胞中的表达, 可以将合成的内含子插入编码多肽的核苷酸序列的非转录区。

适合指导在昆虫细胞中的表达的表达控制序列的例子包括多角体蛋白启动子, P10 启动子, 杆状病毒 39K 延迟早期基因启动子和 SV40 聚腺苷酸化序列。适合在酵母细胞中使用的表达控制序列的例子包括 α -配合系统启动子, 酵母磷酸丙糖异构酶 (TPI) 启动子, 和 ADH2-4c 启动子。适合指导在真菌细胞中表达的表达控制序列的例子包括 ADH3 启动子和终止因子。

用于实施本发明的载体的其他有用成分是信号肽。该序列通常位于编码蛋白的基因的 5' 末端, 并因此被转录成蛋白的氨基末端。信号肽的存在或缺乏根据用于生产要表达的多肽中使用的表达宿主细胞 (根据待表达多肽是胞内还是胞外多肽) 以及回收分泌产物的偏好性而改变。若多肽被表达细胞分泌出来, 则存在信号肽, 如果存在信号肽, 它应当能够被选择用于多肽表达的细胞识别。所述信号肽可以与多肽同源 (通常与所述多肽相关) 或与多肽异源 (源于所述多肽以外的多肽), 并且可能与宿主细胞同源或异源。

当一种核酸与另一种核酸以功能性关系排列时, 它们就是“可操作地连接”的。这意味着合适的分子 (例如转录激活物) 与调控序列结合, 基因或调控序列以可以调控所述基因表达的方式连接。例如, 当前序列或分泌前导序列参与成熟蛋白的分泌时, 它们是可操作地连接在所述启动子上的。当启动子影响编码序列的转录时, 所述启动子可操作地连接在所述编码序列上。当核糖体结合位点位于能够阅读编码序列的位置上时, 所述核糖体结合位点即与所述编码序列可操作地连接。一般地, “可操作地连接”表示与连接的 DNA 和分泌前导序列接触, 并且位于读框内。

不过, 增强子不必接触。上述序列的连接可通过在方便的限制酶位点处连接 (联接) 而实现。如果不存在这样的位点, 则可以使用常规合成的寡核苷酸衔接子或接头。

包括编码所述人干扰素 α 同种型的基因和上述成分（即控制序列）的合适载体的构建可以通过基础重组技术进行。为了制备需要的载体，首先用限制酶消化相应的DNA片段，然后根据特定的顺序和方向彼此连接在一起。

可以在合适的缓冲液中，用特定的限制酶消化DNA。通常，将大约0.2-1 μ g的质粒或DNA片段与大约1-2个单位的所需限制酶一起在大约20 μ l的缓冲液中使用。合适的缓冲液，DNA含量，温育时间和温度是由限制酶的生产商规定的。通常，在37 $^{\circ}$ C下温育大约1-2小时是合适的，尽管某些酶需要更高的温度。在温育之后，可以通过用苯酚和氯仿的混合物提取消化溶液，除去酶和其他杂质，并且通过用乙醇沉淀而从含水层中回收DNA。在这里，所述DNA片段的末端是彼此兼容的，以便这些DNA片段能够形成功能性载体。

通过电泳，根据它们的大小对消化的DNA片段进行分类和选择。DNA可以通过琼脂糖或聚丙烯酰胺基质电泳。基质的选择是由要分离的DNA片段的大小决定的。在电泳之后，通过电洗脱从所述基质中提取DNA。在使用低熔点琼脂糖时，可以从中提取DNA。

应当以等摩尔的数量将要连接的DNA片段添加到所述溶液中。所述溶液包括ATP，连接酶缓冲液，连接酶，如大约10个单位的T4连接酶/0.5 μ g DNA。为了将DNA片段连接在载体上，应当通过用合适的限制酶消化而将所述载体线性化。用碱性磷酸酶或牛肠道碱性磷酸酶处理所述线性化的载体。用磷酸酶进行的所述处理在连接步骤中能抑制载体的自我连接。然后将通过上述方法制备的重组表达载体用于转化或转染宿主细胞。

在选择宿主细胞时，选择具有高的DNA导入效率并且高效率表达所导入的DNA的宿主细胞。具体地讲，在本发明中，使用真核宿主细胞，以便对所述人干扰素 α 同种型实现糖基化。酵母宿主细胞的合适例子包括酵母属和汉逊酵母属菌株。真菌宿主细胞的合适例子包括木霉属，镰孢属和曲霉属菌株。昆虫宿主细胞的合适例子包括鳞翅目细胞系，如Sf9或Sf21。哺乳动物宿主细胞的例子包括CHO细胞系，COS细胞系，如COS

1, COS 7, BHK 细胞系和动物细胞, 如小鼠细胞, 组织培养的植物细胞和人类细胞。

可以通过披露于基础实验手册中的方法将多核苷酸导入宿主细胞, 如 [Davis 等, Basic Methods in Molecular Biology(1986)] 和 [Sambrook 等, (1989) Molecular Cloning 2nd Edition]。用于将多核苷酸导入宿主细胞的优选方法包括例如磷酸钙转染法, DAEA-葡聚糖介导的转染法, 缩并 (transvection), 显微注射, 阳离子脂质体介导的转染, 电穿孔, 转导, 刮擦加载 (scrape loading), 弹道导入或感染。

在本发明的生产方法中, 采用已知技术, 在适合多肽生产的营养培养基中培养宿主细胞。例如, 可以在实验室或工业用发酵罐中在合适的培养基中培养细胞, 培养是在可用于通过小规模或大规模发酵、摇瓶培养而表达和/或分泌多肽的条件下进行的。培养在包括碳, 氮源和无机盐的合适营养培养基中使用已知技术进行。所述培养基为本领域技术人员所熟知, 并且可以通过商业渠道购买或者可以生产。当肽被直接分泌到营养培养基中时, 可以直接从所述培养基中分离所述多肽。当多肽不分泌时, 可以从细胞裂解液中分离。

可以通过本领域公知的方法分离多肽。例如, 可以通过传统方法从营养培养基中分离, 包括、但不局限于离心, 过滤, 提取, 喷雾干燥, 蒸发或沉淀。另外, 可以通过公众已知的多种方法纯化多肽, 包括层析 (例如离子交换, 亲和力, 亲水, 疏水, 大小排阻), 电泳, 分级溶解度 (例如硫酸铵沉淀), SDS-PAGE 或提取。

本发明提供了可以通过上述方法获得的具有额外糖基化的糖基化人干扰素 α 同种型。在本说明书中, 所述糖基化的人干扰素 α 同种型可以被定义为通过以下方法获得的表达产物: 将被修饰成增加 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) 序列的人干扰素 α 基因导入真核宿主细胞, 然后表达, 以便自发地发生糖基化。就是说, 它表示通过将糖残基共价结合在 Asn-X-Ser/Thr (N-X-S/T) (它是人干扰素 α 同种型的额外糖基化位点) 的天冬酰胺-NH 基团上而形成的异质分子。

本发明提供了药物组合物, 其中包含具有额外糖基化的糖基化人干

扰素 α 同种型和药用可接受载体。用于治疗性给药的所述糖基化人干扰素 α 同种型的治疗制剂可以制备成冷冻干燥块和水溶液，其中将任何药用可接受载体、赋形剂、稳定剂具有需要的纯度的所述糖基化人干扰素 α 同种型组合在一起。可以通过将所述糖基化的人干扰素 α 同种型与药用可接受载体组合成可以给药的制剂（溶液，悬浮液，或乳液）而制备用于肠胃外给药的制剂。

所述药用可接受载体，赋形剂或稳定剂在给药的剂量和浓度下对接受它们的患者没有毒性，并且与其他成分兼容。例如，所述制剂不应当包含氧化剂或已知对多肽有害的其他物质。

合适的载体包括缓冲液，如磷酸，柠檬酸和其他有机酸；抗氧化剂，如抗坏血酸；低分子量多肽；蛋白，如血清白蛋白，明胶和免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸，谷氨酰胺，精氨酸或赖氨酸；单糖，如甘露糖或糊精，二糖，其他碳水化合物；螯合因子，如EDTA；金属离子，如锌，钴或铜；糖醇，如甘露糖醇或山梨糖醇；成盐抗衡离子，如钠；和/或非离子型表面活性剂，如Tween, Pluronic或聚乙二醇(PEG)。

为了将所述糖基化的人干扰素 α 同种型用于治疗性给药，应当对它进行消毒。消毒可以通过无菌过滤膜过滤而方便地完成。

所述糖基化的人干扰素 α 同种型的治疗组合物通常保存在具有无菌入口的容器中，例如具有盖子的血管注射袋，该袋具有皮下注射针头可以穿透的盖，或者小瓶。所述人干扰素 α 能够以水溶液或冷冻干燥的制剂形式保存在单一剂量或多剂量容器中，例如密封的小瓶或安瓿瓶。对于冷冻干燥的制剂来说，将5 ml 无菌过滤的1% (w/v) 人干扰素 α 水溶液填充到10 ml 小瓶中，并且对该混合物进行冷冻干燥。可以通过用抑菌性注射用水重建所述冷冻干燥的人干扰素 α 而制备注射液。

可以通过适当的技术给动物直接施用所述糖基化的人干扰素 α 同种型，包括肠胃外施用，或者局部或系统性施用。具体的施用途径取决于例如患者的病史，包括由所述人干扰素 α 认识到的或预计的副作用。肠胃外给药的例子包括皮下，肌内，静脉内，动脉内，腹膜内给药。更

优选的是，所述给药是通过持续注射（例如，微型泵，如渗透泵）或注射而通过例如静脉内或皮下途径实现的。所述糖基化的人干扰素 α 同种型优选经皮下给药。

以治疗有效量给患者施用所述糖基化的人干扰素 α 同种型。术语“治疗有效量”可以被定义为在特定条件和给药方法中足以表现出需要的治疗效果的用量。在制备和施用所述用于治疗的人干扰素 α 组合物时，应当考虑要治疗的特定症状、患者个体的临床状态（特别是仅仅用人干扰素 α 治疗时的副作用），所述糖基化的人干扰素 α 同种型的给药位置，给药方法，给药方案，本领域技术人员已知的其他因素，并且与优选的医学实践一致。用所述糖基化的人干扰素 α 同种型进行治疗的治疗有效量是通过以上因素确定的。本发明的所述糖基化的人干扰素 α 同种型的每日有效量在大约 2×10^6 单位— 500×10^6 单位的范围内。

下面将通过以下实施例对本发明作更详细的说明。不过，这些实施例只是用于说明本发明，本发明不局限于这些实施例。

<实施例 1>

制备人干扰素 α 基因

作为人干扰素 α 基因，使用了本申请人所拥有的修饰过的干扰素 α 生产菌株。由本申请人所拥有的干扰素 α 基因不包含用于在大肠杆菌中表达的完整序列。因此，用化学合成的寡脱氧核苷酸进行PCR，以制备所述完整序列。用PiaE5-1和IFN-A5'合成寡脱氧核苷酸扩增没有所述完整序列的人干扰素 α 基因。使用PiaE5-2和IFN-A3'的合成寡脱氧核苷酸，通过PCR扩增所述扩增的DNA片段，以便将完整的信号肽序列导入人干扰素 α 基因的5'-末端。在表1中示出了使用的合成寡脱氧核苷酸。

表 1
构建完整序列时被用作引物的合成寡脱氧核苷酸

引物名称	引物序列	SEQ ID NO
PiaB5-1	5'-GTGCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTC AAACCCAC-3'	1
PiaB5-2	5'-ATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGCTCAGCT GCAAGTCA-3'	2
IFN-A5'	5'-TCCCAAGCTTATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTG-3'	3
IFN-A3'	5'-TGGGATCCTCATTCTTACTTCTTAACTTTCTTG-3'	4
HisEK: 1	5' -AAGCTTCCCATGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGTTGGG -3'	5
HisEK: 2	5' -CATCATCATCATCATCATGTTGGGACGATGACGATAAG -3'	6
α : 1	5' -ACCCCCATGGAGCCCACAGAGCAGCTTGA -3'	7
α : 2	5' -GGGGACGATGACGATAAGTGTGATCTGCCTCAAACC -3'	8

<实施例 2>

在人干扰素 α 基因上选择修饰位点

为了在人干扰素 α 上选择用于额外糖基化的位点，使用了参考文献中的结果 [Walter (Structure (1996) vol. 4, 1453)]。在选择位点时，首先排除人干扰素 α 蛋白氨基酸序列中的螺旋区 (图 1)。从排除了所述螺旋区的序列上选择第二个位点，同时考虑野生型干扰素的 106 苏氨酸残基在三维结构中具有 O-型糖基化。从所述二次选择的位点中，最终选择出能够方便地转化成目标 N-型糖基化位点的位点。

如图 1 所示，要进行修饰以便增加额外糖基化位点的位点是 L26，H34 和 F36，以及 K134，其中，用天冬酰胺修饰 26 号亮氨酸，用天冬酰胺和丝氨酸修饰 34 号组氨酸和 36 号苯丙氨酸，以及用天冬酰胺修饰 134 号赖氨酸。示出了用于本实验的合成的寡脱氧核苷酸。箭头的方向

表示相应的寡脱氧核苷酸的 5' → 3' 方向。

为了纯化人干扰素 α 蛋白，将额外的氨基酸序列 (HisEK) 插入成熟的人干扰素 α 蛋白的前序列和氨基酸序列之间。所述氨基酸序列是 M-G-G-S-H-H-H-H-H-G-D-D-D-D-K-。通过插入该氨基酸序列，可以通过金属亲和柱层析分离表达的人干扰素 α 衍生蛋白。用肠激酶处理分离的蛋白，并且进行金属亲和柱层析，仅获得人干扰素 α 衍生物蛋白。

HisEK 序列的插入是通过以下方法进行的：用 IFN-A5 和 α : 1 引物通过 PCR 扩增前序列区的 DNA，然后用限制酶 NcoI 消化。接着，首先用 α : 2 和 IFN-A3 扩增成熟的人干扰素 α 基因区。用 HisEK: 2 和 IFN-A3、再用 HisEK: 1 和 IFN-A3 再次扩增得到的 DNA 片段，获得 DNA 片段。用限制酶 NcoI 消化得到的 DNA 片段，并且用 T4 DNA 连接酶将得到的两种 DNA 片段结合在一起。

使用 IFN-A5 和 IFN-A3 引物通过 PCR 再次扩增连接的人干扰素 α 基因。用限制酶 HindIII 和 BamHI 消化扩增的 DNA 片段，并且使用 T4 DNA 连接酶，插入业已用相同的限制酶消化过的 pcDNA3.1Hygro+ 质粒载体中，形成表达载体。

<实施例 3>

构建人干扰素 α 同种型

可以用合成的寡脱氧核苷酸作引物，通过 PCR 修饰编码具有至少一个被修饰成提供额外糖基化位点的氨基酸的人干扰素 α 的基因。所使用的合成寡脱氧核苷酸如表 2 所示。

表 2

用于生产额外糖基化的合成寡脱氧核苷酸

引物名称	引物序列	SEQ ID NO
L26N1	5'-GCACAGATGAGGCCATCTCTAACTTCTCCTGCTGAAGGACAG A-3'	9
L26N2	5'-TCTGTCCTTCAAGCAGGAGTTAAGAGAGATGCGCCTCATCTGTG C-3'	10
H34NF36S: 1	5' -TTGAAGGACAGAAACGACAGCGGATTTCCCCAG-3'	11
H34NF36S: 2	5' -CTTCATCAGGGGAGTCTCGTTCACCCCCACCCC-3'	12
K134N1	5'-ACTCTCTATCTGAAAGAGAAGAACTACAGCCCTTGTGCCTGGGA G-3'	13
K134N2	5'-CTCCCAGGCACAAGGGCTGTAGTTCTTCTTTTCAGATAGAGAG T-3'	14
IFN-A5'	5' -TCCCAAGCTTATGGCCTTGACCTTTGCTTTACTG-3'	15
IFN-A3'	5'-TGGGATCCTCATTCCTTACTTCTTAACTTTCTTG-3'	16

(1) L26N 修饰的人干扰素 α 同种型的构建 (图 3)

使用合成的寡脱氧核苷酸引物 IFN-A5' 和 L26N2, L26N1 和 IFN-A3', 通过 PCR 扩增由实施例 1 获得的人干扰素 α 基因, 制备 DNA 片段。纯化每一种制备的 DNA 片段, 用 0.2M NaOH/2mM EDTA 变性, 并且进行 PCR, 以制备在需要的位点上具有氨基酸改变 (Leu \rightarrow Asn) 的基因。结果获得了具有相当于取代 26 氨基酸位置处的亮氨酸被天冬酰胺取代的密码子的两种 DNA 片段。用引物对 IFN-A5' 和 IFN-A3' 对所述两种 DNA 片段进行二次 PCR, 以便获得 IFN- α -L26N 的修饰过的基因, 其中, 26 号氨基酸被修饰成天冬酰胺, 以便可以进行额外糖基化。

(2) H34NF36S 修饰的人干扰素 α 衍生物 (图 4) 的构建

使用用于 L26N 修饰的修饰过的人干扰素 α 衍生物相同的方法, 利用合成的寡脱氧核苷酸 IFN-A5 和 H34NF36S: 2 以及 H34NF36S: 1 和 IFN-A3 通过 PCR 扩增人干扰素 α 基因, 以便制备 DNA 片段。

纯化每一种 DNA 片段, 并且按上述相同方法处理, 以便制备 IFN- α H34NF36S 修饰的基因, 其中, 34 号氨基酸位置上的组氨酸被改变成

天冬酰胺，而 36 号氨基酸位置上的苯丙氨酸被改变成丝氨酸。

(3) 构建 K134N 修饰的人干扰素 α 同种型 (图 5)

使用与构建 L26N 修饰的人干扰素 α 衍生物相同的方法，利用合成的寡脱氧核苷酸 IFN-A5' 和 K134N2 以及 K134N1 和 IFN-A3' 通过 PCR 扩增人干扰素 α 基因，以便制备 DNA 片段。

结果如图 4 所示，获得了相当于在 134 号氨基酸位置处具有天冬酰胺而非赖氨酸的密码子的两种 DNA 片段。

用引物对 IFN-A5' 和 IFN-A3' 对这两种 DNA 片段进行二次 PCR，以便获得 IFN- α -K134N 的修饰基因，其中，134 号氨基酸被修饰成天冬酰胺，以便可以进行额外的糖基化。

(4) 构建具有 L26N 和 H34NF36S 修饰的人干扰素 α 衍生物 (图 6)

使用 H34NF36S 修饰的人干扰素 α 衍生物，采用与 L26N 修饰的干扰素 α 衍生物相同的方法。

(5) 构建具有 L26N 和 K134N 修饰的人干扰素 α 同种型 (图 7)

使用 K134N 修饰的人干扰素 α 同种型，采用与 L26N 修饰的人干扰素 α 衍生物相同的方法。换句话说，通过与图 5 所示相同的方法修饰 134 号位置，并且将所述产物用作模板，通过与图 3 所示相同的方法修饰 26 号位置。结果获得了同时具有两个位点修饰的人干扰素 α 基因。

<实施例 4>

转染到 CHO 细胞中并且表达

在 60mm 细胞培养皿中，让 CHO 细胞 (DG44) 生长到 40-80% 的铺满度 ($1-4 \times 10^5$ 细胞/60mm 培养皿)。将 $3 \mu\text{l}$ Superfectin 试剂 (BM) 和 $97 \mu\text{l}$ 细胞培养基 (含有 α -MEM 的培养基，无血清，无抗生素) 充分混合，并且添加人干扰素 α 衍生物表达载体 DNA ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 或更高，大约 $2 \mu\text{g}$) 和包含 dhfr 的载体 pLTRdhfr26 (ATCC37295，大约 $0.2 \mu\text{g}$)。让该

反应在室温下进行 5-10 分钟，然后添加到所述制备的细胞中。一天之后，将所述培养基换成含有 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 潮霉素的培养基（不含 α -MEM 的培养基，10% FBS），并且培养大约 7-10 天。在含有浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的潮霉素的培养基中，选择导入了人干扰素 α 衍生物的细胞系。培养每一个选择的细胞系，并且通过使用人干扰素 α (Hu-IFN- α) Multi-Specific ELISA Kit (PBL, Product No. 41105-1;) 证实人干扰素 α 衍生物的表达。

<实施例 5>

纯化人干扰素 α 衍生物

通过以下方法纯化在 CHO 细胞中表达的人干扰素 α ：使用 Centriprep (Mw Cut 10, 000, Milipore) 浓缩培养液，并且用 ProBond Purification System (Invitrogene) 进行金属亲和方法处理。

<实施例 6>

在大鼠中进行的药物动力学测试

为了证实候选物是否能够在实际的活体中维持，使用了 Sprague Dawley 小鼠。用人干扰素衍生物注射动物，剂量为 1×10^6 U/Kg 体重。每一组有四只动物。为了证实血液浓度，每隔 30 分钟采集血样。利用人干扰素 α (Hu-IFN- α) Multi-Specific ELISA Kit (PBL) 分析所述血液样品。

工业应用性

本发明的糖基化的人干扰素 α 同种型可能具有增强了的体内稳定性，因此降低了临床使用的剂量以及给药频率。

尽管业已结合特定的说明性实施方案对本发明进行了说明，但是本发明并不局限于这些实施方案，而仅仅受所附权利要求书的限制。应当理解的是，本领域技术人员可以在不超出本发明范围和构思的前提下改变或改进所述实施方案。

<110>	CJ Corporation	
<120>	糖基化的人干扰素 α 同种型	
<150>	KR 10-2002-0052365	
<151>	2002-08-31	
<160>	16	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	1	
	gtgctcagct gcaagtcaag ctgctctgtg ggctgtgac tgcctcaaac ccac	54
<210>	2	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	2	
	atggccttga cctttgcttt actggtggcc ctccctggtgc tcagctgcaa gtca	54
<210>	3	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	3	
	tcccaagctt atggccttga cctttgcttt actg	34
<210>	4	
<211>	35	
<212>	DNA	

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	4	
	tgggatcctc attccttact tcttaaactt tcttg	35
<210>	5	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	5	
	aagcttccca tggggggttc tcatcatcat catcatcatg gg	42
<210>	6	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	6	
	catcatcatc atcatcatgg ggacgatgac gataag	36
<210>	7	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物	
<400>	7	
	acccccatg gagccacag agcagcttga	30
<210>	8	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

<223> 引物

<400> 8

ggggacgatg acgataagtg tgatctgcct caaacc

36

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

gcacagatga ggcgcatctc taacttctcc tgcttgaagg acaga

45

<210> 10

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

tctgtccttc aagcaggagt taagagagat gcgcctcatc tgtgc

45

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

ttgaaggaca gaaacgacag cggatttccc cag

33

<210> 12

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>	12		
		cttcatcagg ggagtctcgt tcacccccac ccc	33
<210>	13		
<211>	45		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	引物		
<400>	13		
		actctctatc tgaagagaa gaactacagc ccttgtgcct gggag	45
<210>	14		
<211>	45		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	引物		
<400>	14		
		ctcccaggca caaggctgt agttcttctc tttcagatag agagt	45
<210>	15		
<211>	34		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	引物		
<400>	15		
		tccaagctt atggccttga cctttgcttt actg	34
<210>	16		
<211>	35		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	引物		
<400>	16		
		tgggatcctc attccttact tcttaaacit tcttg	35

1 TCCACAGCTT ATG GCC TTG ACC TTT GCT TTA CTG GTG GCC CTC CTG GTG ATG TGC AGC TGC TCT GTG GGC TGT GAT CTG CCT
 AGGGTTCGAA TAC CGG AAC TGG AAA CGA AAT GAC CAC CGG GAG CAC CAG TCG ACG TTC AGT TCG ACG AGA CAC CCG ACA CTA GAC GGA
 M A L T F A L L V A L L V A L L V L S C K S S C S V G C D L P
 5 10 20 30 34
 92 CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG CGC ATC TCT CTT TTC TCC TGC TGC TGC TGC AGA GAC AGA CAT
 GTT TGG GTG TCG GAC CCA TCG TCC TCC TGG AAC TAC GAG GAC CGT GTC TAG TCC GCG TAG AGA GAA ARG AGG ACG AAC TTC CTG TCT GTA
 Q T H S L G S R R T L M L L A Q M R R I S L F S C L K D R H
 35 40 50 60 64
 182 GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG ATC TTC
 CTG AAA CCT AAA GGG GTC CTC CTC AAA CCG ITG GTC AAC GTT TTC CGA CTT TGG TAG GGA CAG GAG GTA CTC TAC TAG GTC GTC TAG AAG
 D F G F P Q E E F G N Q F Q K A E T I P V L H E M I Q Q I F
 70 80 90 94
 272 AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GGT TGG GAT GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC
 TTA GAG AAG TCG TGT TTC CTG AGT AGA CGA ACC CTA CTC TGG GAG GAT CTG TTT AAG ATG TGA CTT GAG ATG GTC GTC GAC TTA CTG
 N L F S T K D S S A A W D E T L L D K F Y T E L Y Q Q L N D
 95 100 110 120 124
 362 CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG GGG GAG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA
 GAC CTT CGG ACA CAC TAT GTC CCC CAC TET CTC TGA GGG GAG TAC TTC CTC CTG AGG TAA GAC CGA CAC TCC TTT ATG AAG GTT
 L E A C V I Q G V T E T P L M K E D S I L A V R K Y F Q
 130 140 150 154
 452 AGA ATC ACT CTC TAT CTG ABA GAG AAG AAC TAC AGC CCT TGT GCC TGG CAG CTT CTC AGA GCA AAT CAG AAT GAC TCT TTT TCT TTG TCA
 TCT TAG TGA GAG ATA GAC TTT CTC TTC TTT ATG TCG GGA ACA CGG ACC CTC CAA CAG TCT CGT CTT TAG TAC TCT AGA AAA AGA AAC AGT
 R I T L Y L K E K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S
 155 160 165
 542 ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGA GGAATCCCA
 TGT TTG AAC GTT CTT TCA AAT TCT TCA TTC CTT ACT CCTAGGST
 T N L Q E S L R S K E

图1

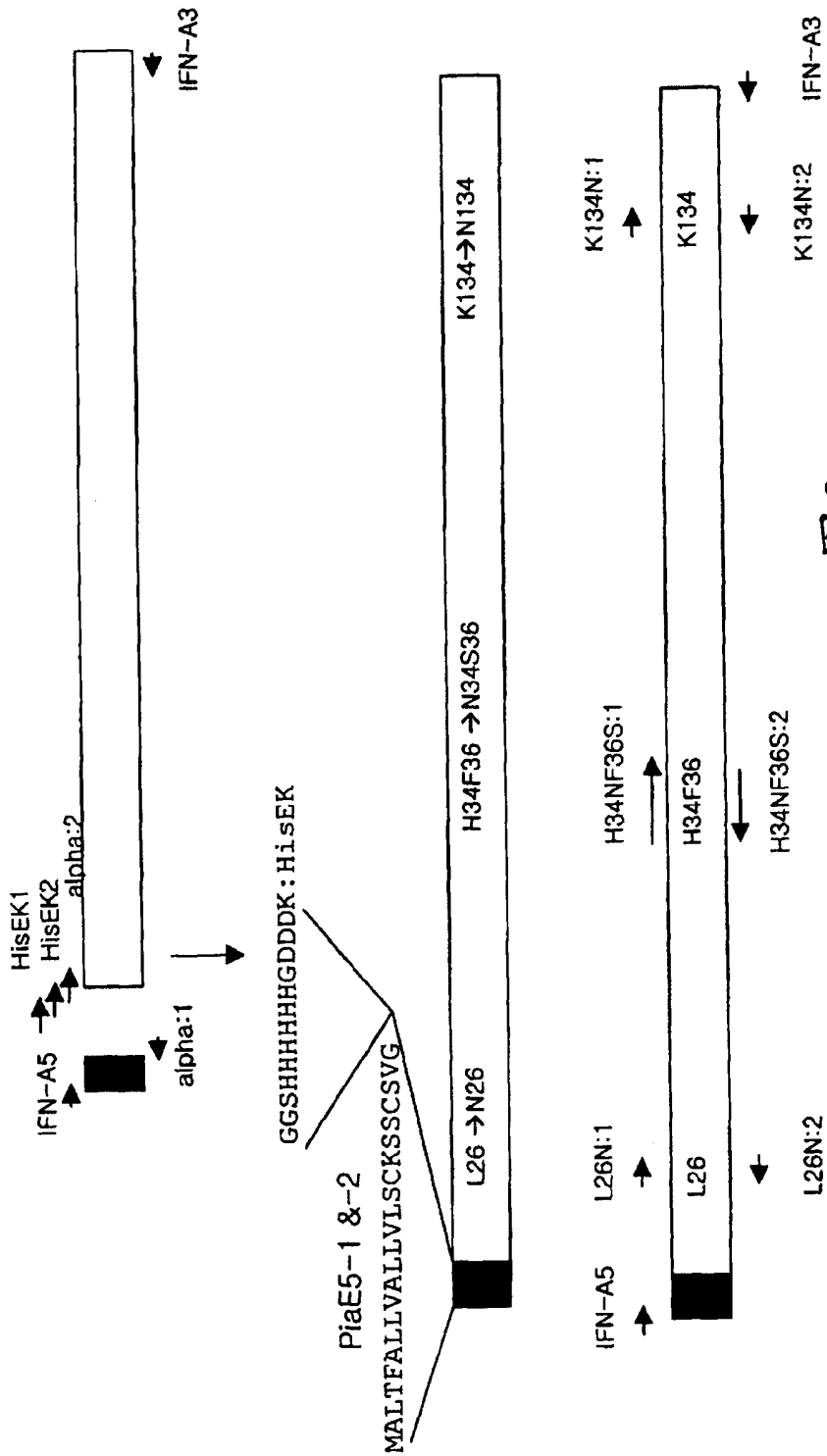


图 2

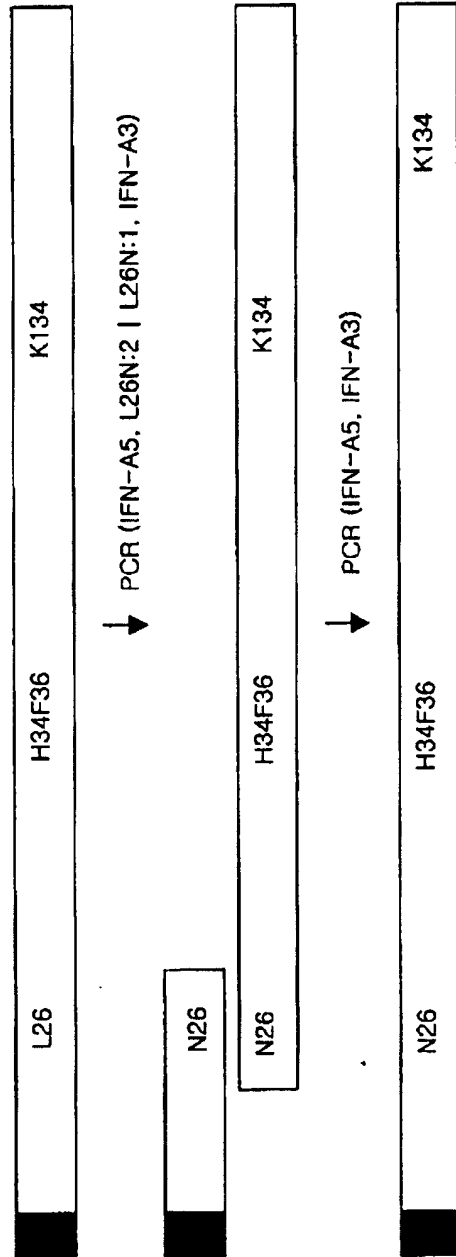


图 3

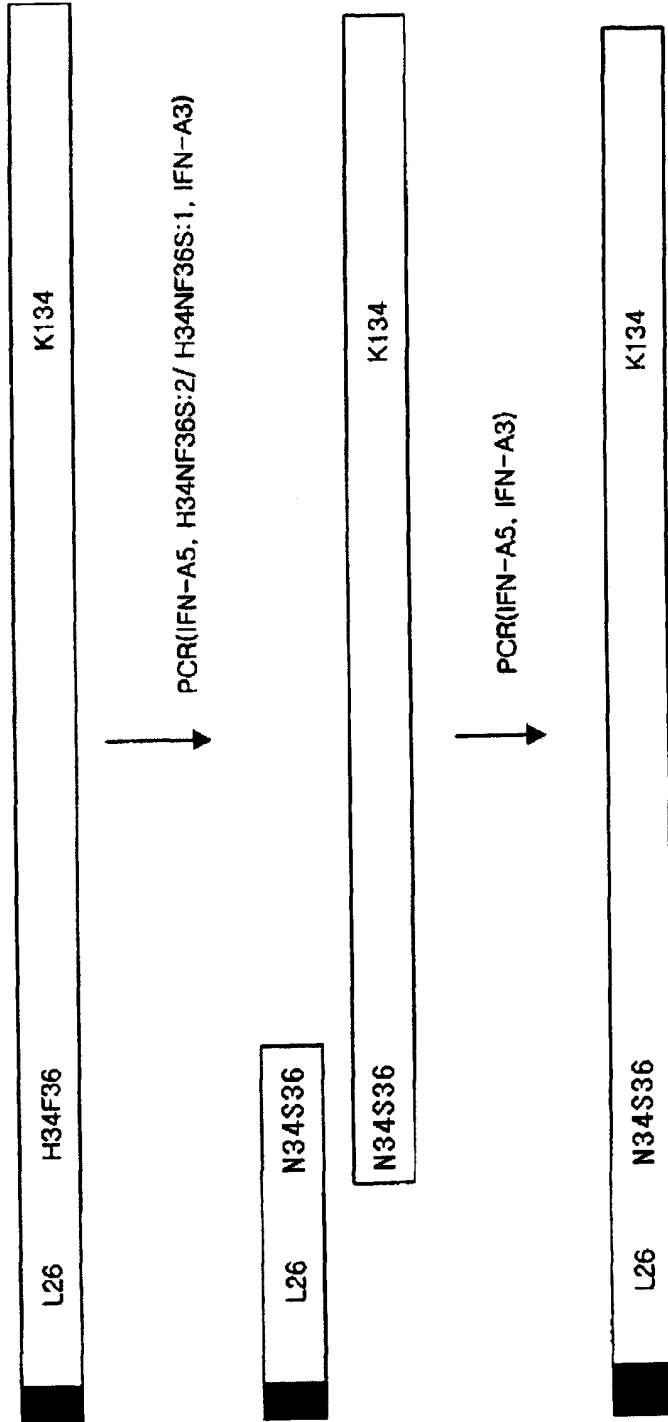


图 4

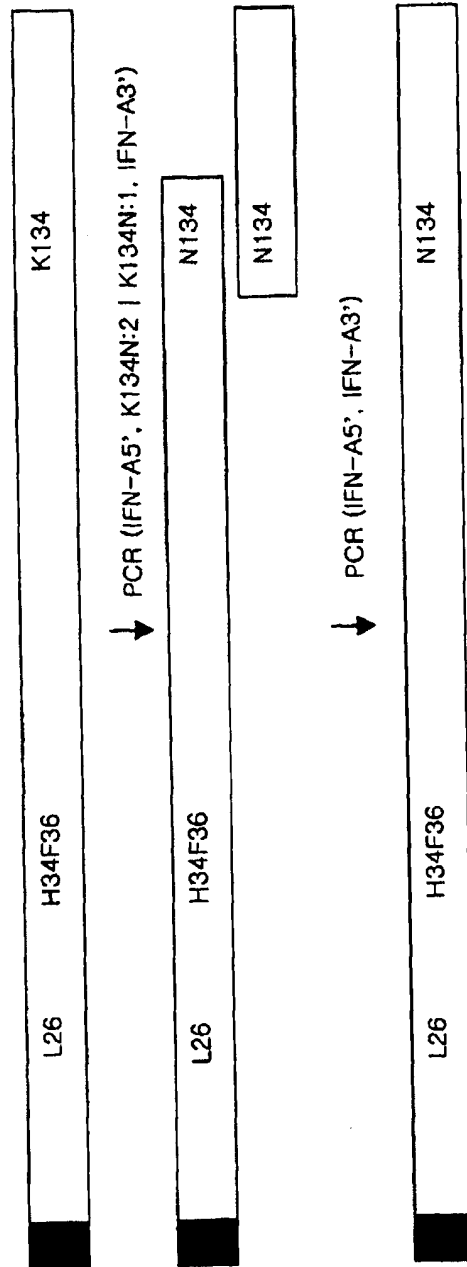


图 5

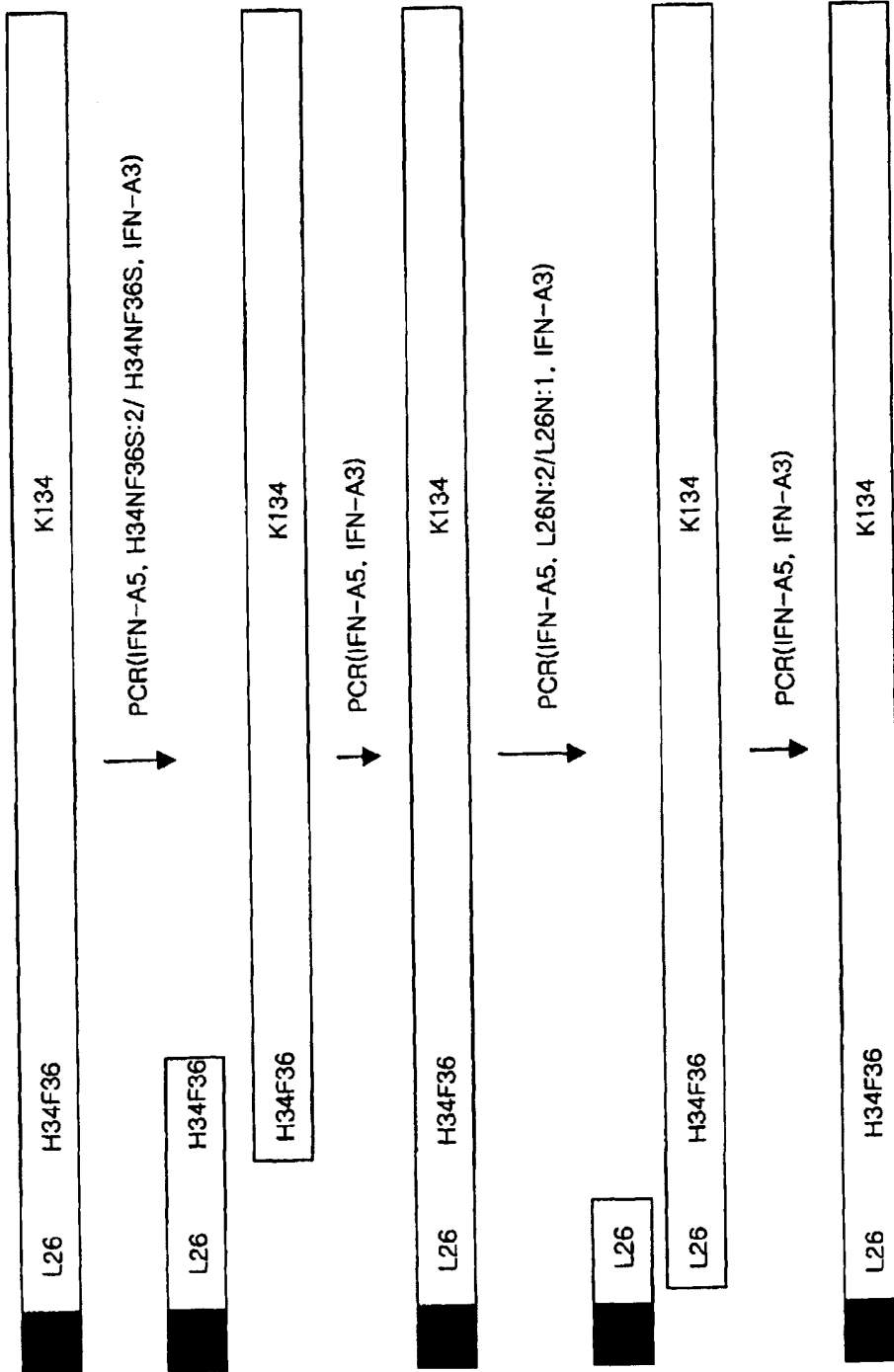


图6

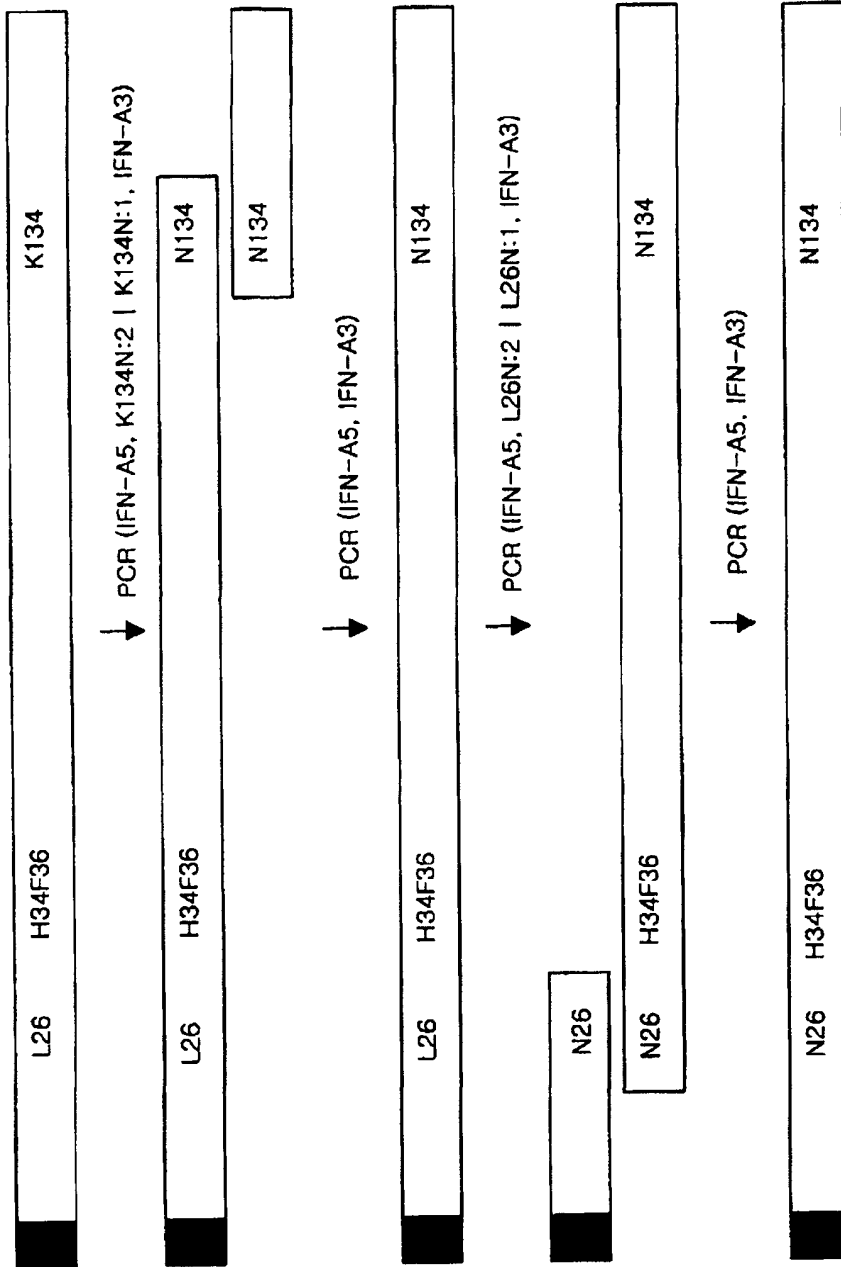
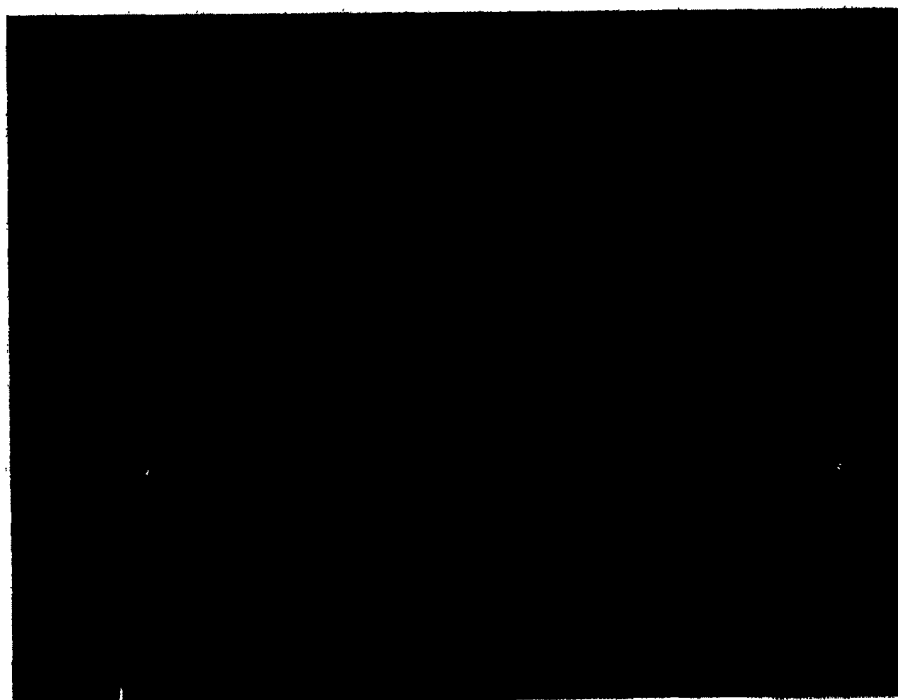


图 7

1 2 3 4 5 6 7



- 1. 标志
- 2. O-糖基化IFN- α
- 3. L26N
- 4. L26N/H34NF36S
- 5. H34NF36S
- 6. K134N
- 7. L26N/K134N

图 8

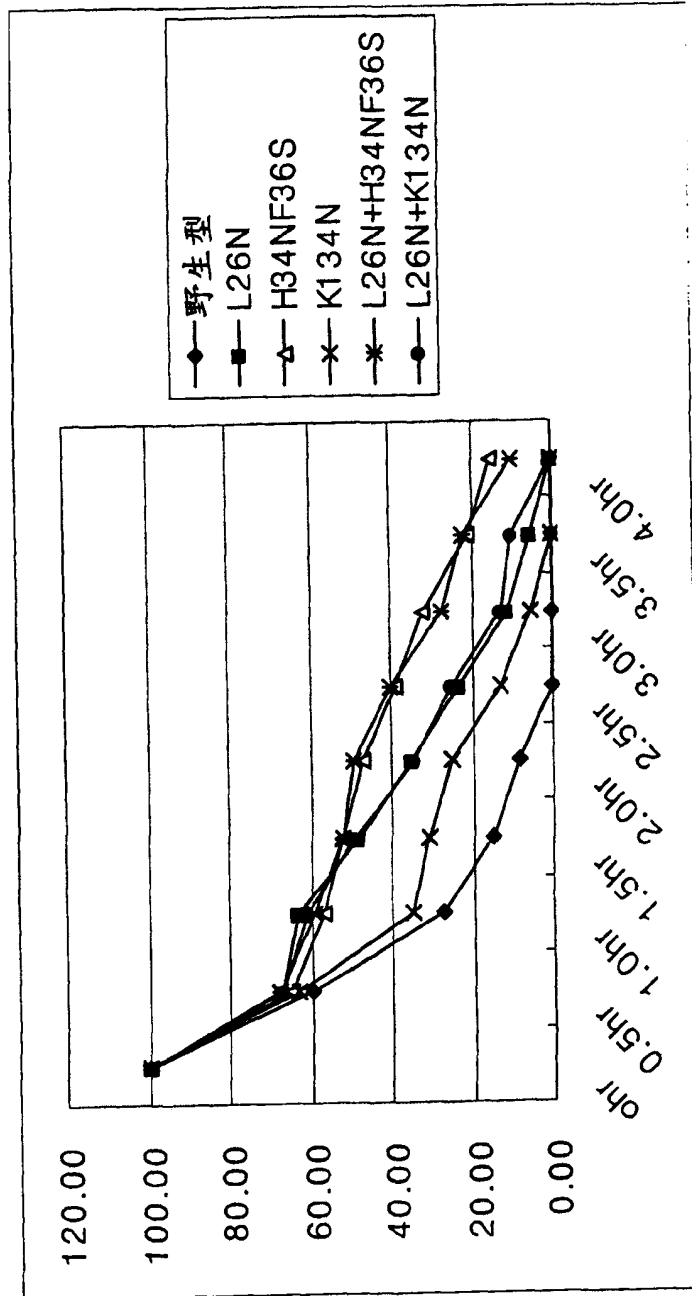


图9