

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480031909.8

[51] Int. Cl.

*C07K 14/00 (2006.01)*

*C12N 1/00 (2006.01)*

*C12N 5/10 (2006.01)*

*C12N 15/11 (2006.01)*

*C12N 15/63 (2006.01)*

*C12P 21/02 (2006.01)*

[43] 公开日 2007年2月7日

[11] 公开号 CN 1910195A

[51] Int. Cl. (续)

*C12Q 1/68 (2006.01)*

[22] 申请日 2004.8.26

[21] 申请号 200480031909.8

[30] 优先权

[32] 2003.8.28 [33] US [31] 60/498,449

[32] 2003.8.28 [33] US [31] 60/498,785

[32] 2003.8.28 [33] US [31] 60/498,923

[32] 2004.3.5 [33] IN [31] 279/MUM/2004

[32] 2004.3.5 [33] IN [31] 280/MUM/2004

[86] 国际申请 PCT/US2004/028068 2004.8.26

[87] 国际公布 WO2005/021777 英 2005.3.10

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.28

[71] 申请人 辉阳科技美国公司

地址 美国纽约州

[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

代理人 程金山

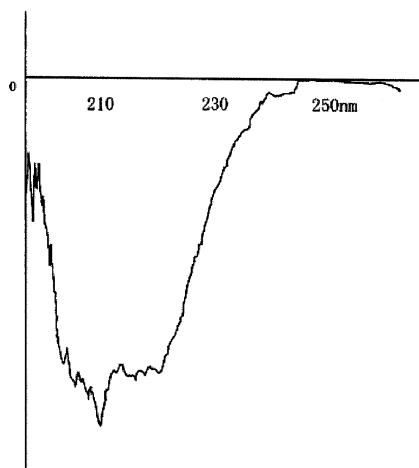
权利要求书 2 页 说明书 21 页 附图 10 页

[54] 发明名称

通过空间构象调节蛋白质功能

[57] 摘要

本发明提供了一组调节蛋白质空间构象的方法。首先,根据宿主密码子的使用,选择用于编码目标蛋白质的氨基酸密码子。第二,从中选择可能调节空间构象的组合,并将其构建入可转染多种宿主的载体。第三,在组合目标蛋白质和启动子的编码序列后,通过监测碱基对的组合来对载体的启动子进行选择。最后,选择合适的表达宿主来表达目标蛋白质,重折叠并纯化,测定其活性和空间构象。



- 1、 一种用于调节蛋白质功能而不改变所述蛋白质一级氨基酸序列的方法，其包括以下步骤：
  - 1) 改变所述蛋白质的密码子的使用；
  - 2) 使用改变的密码子来表达所述蛋白质以获得纯化的蛋白质；和
  - 3) 将用改变的密码子所表达的蛋白质与没有使用改变的密码子所表达的蛋白质进行比较，其中功能出现增强或鉴定出新的功能表明蛋白质的功能已经得到了调节。
- 2、 权利要求 1 所述的方法，其特征在于改变的密码子的使用引起所述蛋白质的高表达。
- 3、 一种用来制备具有增强的或者新的功能的蛋白质而不改变所述蛋白质一级氨基酸序列的方法，其包括以下步骤：
  - 1) 改变所述蛋白质的密码子的使用；
  - 2) 使用改变的密码子来表达所述蛋白质以获得纯化的蛋白质；和
  - 3) 将用改变的密码子所表达的蛋白质与没有使用改变的密码子所表达的蛋白质进行比较，其中功能出现增强或鉴定出新的功能表明已经制备出了具有增强的或新的功能的蛋白质。
- 4、 权利要求 1 所述的方法，其特征在于改变的密码子的使用引起所述蛋白质的高表达。
- 5、 由权利要求 3 或 4 所述的方法制备的蛋白质。
- 6、 权利要求 5 所述的蛋白质，其具有独特的二级或三级结构。
- 7、 一种带有改变的密码子的合成基因，其特征是当其表达时，
- 8、 一种含有权利要求 7 中所述基因的载体。
- 9、 一种含有权利要求 7 中所述基因的表达系统。
- 10、 一种含有权利要求 7 中所述基因的宿主细胞。
- 11、 一种生产具有增强的或者新的功能的蛋白质的方法，其包括：将含有优选密码子的人工基因引入适当的宿主细胞，在适当的培养条件下培养所述的宿主细胞以使所述的蛋白质表达，和收获所表达的蛋白质。
- 12、 权利要求 11 所述的方法，其中所述的人工基因被有效连接到载体。
- 13、 权利要求 11 所述的方法，其包括从发酵液中提取所述蛋白质，或收集包涵体，和变性及复性收获的蛋白质。

- 
- 14、 由权利要求 11—13 所述的任一方法生产的所述蛋白质。
  - 15、 一种含有权利要求 5、6 或 14 所述的蛋白质以及适当载体的组合物。
  - 16、 一种含有权利要求 5、6 或 14 所述的蛋白质以及适当药用载体的药用组合物。

## 通过空间构象调节蛋白质功能

本申请要求了提交于 2003 年 8 月 28 日的美国专利申请 No. 60/498, 449、提交于 2003 年 8 月 28 日的美国专利申请 No. 60/498, 785 和提交于 2003 年 8 月 28 日的美国专利申请 No. 60/498, 923 的优先权。本申请同时要求了提交于 2004 年 3 月 5 日的印度专利申请 No. 279/MUM/2004 和提交于 2004 年 3 月 5 日的印度专利申请 No. 280/MUM/2004 的优先权。以上申请的内容全部被加入到本申请中作为参考。

在本申请中引用了各种参考文献。将这些出版物全部加入本申请作为参考，其与本发明相结合有助于全面地描述与本发明有关的技术状况。

### 背景技术

目前人们已完成的人类基因组计划已证实很多基因对疾病具有治疗作用，并且已采用基因重组技术开发出一些具有治疗作用的蛋白质类药物，但大部分具有治疗作用的基因在采用基因重组技术翻译成蛋白质后往往不再具有该基因在体内表现出的作用，或只具有部分作用。大量有治疗作用的基因不能顺利地利用基因重组技术获得相应的有治疗作用的蛋白质，这其中最大的障碍在于蛋白质空间构象的影响，怎样获得有效的蛋白质空间构象已成为一个充满竞争的研究领域。

在一级结构不变的情况下改变蛋白质的空间构象可使蛋白质的功能发生转变，例如：蛋白质异常的三维空间结构可以引发疾病，如：疯牛病 (bovine spongiform encephalopathy)、老年性痴呆症 (Alzheimer's Disease)、囊性纤维病变 (cystic fibrosis)、家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolacemia)、家族性淀粉样蛋白质症 (familial amyloid disease)、某些肿瘤 (carcinoma) 或白内障 (cataract)。这些疾病也被叫做“折叠病”。造成疯牛病的“朊 (Prion)”蛋白质可以感染

正常蛋白质并在蛋白质之间传染。

在蛋白质结构研究中，大多数研究者认为，获得有效的蛋白质空间构象最主要在于重组蛋白质变性和重折叠技术。有大量文献报道各种分子伴侣、反向胶团（reverse micelles）等对重折叠有促进作用。虽然有种类繁多的使蛋白质在较天然的环境下表达的分泌型表达载体已经被研制出来，但它们都仅能对原有蛋白质的疗效产生量的提高而无质的变化。

### 附图说明

#### 图 1. Infergen<sup>®</sup>（干复津）的圆二色谱图

波长范围：250nm—190nm

灵敏度：2m° /cm

光程：0.20cm

仪器：圆二色谱仪 J-500C

样品：含 30μg/ml 的 IFN-con1, 5.9mg/ml 的 NaCl 和 3.8mg/ml 的 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0。

#### 图 2. 重组高效复合干扰素 (rSIFN-co) 的圆二色谱图

波长范围：250nm—190nm

灵敏度：2m° /cm

光程：0.20cm

仪器：圆二色谱仪 J-500C

样品：含 30μg/ml 的 rSIFN-co, 5.9mg/ml 的 NaCl 和 3.8mg/ml 的 Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0。

#### 图 3. 不同干扰素对乙肝病毒基因表达抑制作用的比较

#### 图 4A-1. A 组受试者体温变化曲线（5 位患者）

此图是 A 组 5 名受试者体温变化的记录

#### 图 4A-2. A 组受试者体温变化曲线（6 位患者）

此图是 A 组其余 6 名受试者体温变化的记录

**图 4B-1.** B 组受试者体温变化曲线（5 位患者）

此图是 B 组 5 名受试者体温变化的记录

**图 4B-2.** B 组受试者体温变化曲线（5 位患者）

此图是 B 组其余 5 名受试者体温变化的记录

**图 5.** rsIFN-co 晶体 I

**图 6.** rsIFN-co 晶体 II

**图 7.** rsIFN-co 晶体的 X-射线衍射图谱

## 发明详述

本发明提供了一组调节蛋白质空间构象的方法。首先，根据宿主密码子的使用，选择用于编码目标蛋白质的氨基酸密码子。第二，从中选择可能调节空间构象改变的组合，并将其构建入可转染多种宿主的不同载体。这样，可以选择出一个适当宿主的适当载体。第三，在组合目标蛋白质和启动子的编码序列后，通过监测碱基对的组合来对载体的启动子进行选择。最后，选择合适的表达宿主来表达目标蛋白质，重折叠并纯化，测定其活性和空间构象。

本发明发现，在构建蛋白质的过程中，目标蛋白质的氨基酸编码密码子的变化、所选载体的不同、启动子的改变及宿主表达载体的选择，甚至变性复性的条件及试剂等都是调节目标蛋白质空间结构的可调因素。所以，调节蛋白质空间构象并获取新的功能和提高活性是系统分析的结果。

本发明提供了一种不改变蛋白质一级氨基酸序列而调节该蛋白质功能的方法，其步骤包括：a) 改变所述蛋白质的密码子使用；b) 通过改变的密码子表达所述的蛋白以得到纯化的蛋白质；和 c) 对改变编码密码子表达的蛋白质与原密码子表达的蛋白质进行比较，其中所获得的蛋白质的

功能增强或表现出新功能即表明所述蛋白质的功能已经得到了调节。

在一个实施方案中，改变的密码子的使用使得蛋白质的表达量提高。

本发明还提供了一种用来制备具有增强的或者新的功能的蛋白质而不改变所述蛋白质一级氨基酸序列的方法，其包括以下步骤：a. 改变所述蛋白质的密码子的使用；b. 使用改变的密码子来表达所述蛋白质以获得纯化的蛋白质；和 c. 将用改变的密码子所表达的蛋白质与没有使用改变的密码子所表达的蛋白质进行比较，其中功能出现增强或鉴定出新的功能表明已经制备出了具有增强的或新的功能的蛋白质。

在一个实施方案中，改变的密码子的使用可使蛋白质的表达量提高。本发明还提供了由以上所述方法制备的蛋白质。在一个实施方案中，所述的蛋白质具有独特的二级或三级结构。

本发明还提供了一种带有改变的密码子的合成基因，当其表达时，可产生增强的或新的功能。在一个实施方案中，本发明提供了包含以上所述基因的载体。在另一个实施方案中，本发明还提供了包含以上所述基因的表达系统。在另一个实施方案中，本发明还提供了含有以上所述基因的宿主细胞。

本发明还提供了一种生产具有增强的或者新的功能的蛋白质的方法，其包括：将含有优选密码子的人工基因引入适当的宿主细胞，在适当的培养条件下培养所述的宿主细胞以使所述的蛋白质表达，和收获所表达的蛋白质。

在本发明提供的上述方法中，所述的人工基因序列被有效地与载体连接。在一个实施方案中，该方法还包括从发酵液中提取所述蛋白质，或收集包涵体，并对收获的蛋白质进行变性及复性。

本发明还提供了通过以上任何方法所生产的蛋白质。

本发明提供了一种含有任何以上所述蛋白质及适当载体的组合物。本发明还提供了一种含有任何以上所生产的蛋白质及适当药用载体的药用组合物。

本发明的意义在于将具有治疗作用的基因翻译成蛋白质的过程中，对蛋白质的空间构象进行调控，从而使该蛋白质具有来源自该基因的功能，或具有传统技术生产的蛋白质所不具有的功能，或者甚至具有与那些存在

的蛋白质相比较而言增强的活性。

以干扰素为例，将人 IFN- $\alpha$  构建入逆转录表达载体得到 PDOR-IFN- $\alpha$  表达载体，转染 2.2.15 细胞，测定细胞培养上清液中的 HBsAg, HBeAg。结果显示，rSIFN-co 对 HBsAg, HBeAg 的抑制率分别达到 62% 和 67.7%。但如通过基因重组技术获得的重组干扰素蛋白质在体外就不具有抑制 HBsAg, HBeAg 分泌的作用。另外，用逆转录病毒载体构建了人 IFN- $\alpha_2$  的表达载体并转染至 HIV 细胞株-A3.01 细胞内表达，证实 IFN- $\alpha_2$  能完全抑制 HIV-DNA 的复制和转录。但直接用干扰素对 HIV 感染进行治疗，效果有限。

以下实施例可以有助于更好地理解本发明。然而，具备专业技术的人员应当知道，讨论的具体的方法和结果只是对本文后所附的权利要求中所指的发明的例证。

### 实施例 1:

#### 对 IFN-con1 的构象改造

rSIFN-co 是一种根据人 INF- $\alpha$  亚型中的保守性氨基酸，用遗传工程的方法建构而成的一种新干扰素分子。该干扰素分子在美国专利 4,695,263 和 4,897,471 中已经有所描述，而且 rSIFN-co 已在一些文献和专利中被证明具有广谱的干扰素活性，较强的抗病毒和抗肿瘤及天然杀伤细胞活性。

本发明根据大肠杆菌密码子使用对其 DNA 编码序列重新进行了设计：将插入体首先构建入 PHY-4 载体，用 P<sub>BAD</sub> 启动子介导下游表达，而后将大肠杆菌选择为宿主。产物通过 6mol/L 盐酸胍变性→4mol/L 精氨酸复性→POROS HS/M-阳离子交换层析→Cu<sup>2+</sup>螯合亲和层析纯化，得到高纯度的目标蛋白质。

通过与 IFN-con1 进行抑制乙肝病毒 DNA，及抑制 HBsAg 与 HBeAg 分泌的比较试验，结果表明 rSIFN-co 具有 IFN-con1 所不具备的对 HBsAg、HBeAg 分泌的抑制作用。在另一试验中，将 HBV 核心/前基因组 (C/P) 启动子与相关的顺式作用元件放置于荧光素酶编码质粒的上游。将该报告构



建体转染入 HepG2 细胞。然后,用不同干扰素处理该细胞,并测量荧光素酶报道基因的表达量。结果显示 rSIFN-co 对荧光素酶报道基因的表达抑制率是 68%;而作为对照的 IFN-con1 及 IFN- $\alpha$  2b 仅有 35%和 27%。因此, rSIFN-co 对 HBVAg 的抑制作用明显提高。

同时,圆二色谱图也证明 rSIFN-co 与 IFN-con1 的二级结构不同。

以下是具体比较实验:

### 1) 圆二色谱图比较

实验地点:四川大学分析测试中心

仪器:圆二色谱仪 J-500C (波长范围 250—190nm,灵敏度:2m° /cm,光程:0.20cm,见附图 1、2)

### 2) rSIFN-co 抑制 HBV-DNA 的复制及 HBsAg 和 HbeAg 的分泌

材料

溶剂及配制方法:每支瓶内加入 1ml 生理盐水,溶解后,再根据所设不同浓度用 MEM 培养液调配。现用现配。

对照药品: IFN- $\alpha$  2b (Intron A) 为冻干粉剂,购自先灵葆雅公司。每支  $3 \times 10^6$ U,用培养液配成  $3 \times 10^6$  IU/ml 溶液。干复津(液体溶液),购自安进公司,每支 9 $\mu$ g, 0.3ml,相当于  $9 \times 10^6$  IU,用培养液配成  $9 \times 10^6$  IU/ml 溶液,4℃保存;2.2.15 细胞: HBV DNA 转染并克隆的人肝癌细胞 (Hep G2) 2.2.15 细胞株,美国 MountSinai 医学中心构建。

试剂: MEM 干粉,美国 Gibco 公司产品。胎牛血清,美国 HycloneLab 公司产品。G-418 (Geneticin); MEM 调剂,美国 Gibco 公司产品; L-谷氨酰胺,京科化学试剂公司进口分装; HBsAg, HBeAg 固相放射免疫测定盒,购自中国同位素公司北方免疫试剂研究所; 卡那霉素,华北制药厂产品; Lipofectin, 美国 Gibco 公司产品。

实验用品及仪器: 培养瓶,丹麦 Tunclon™; 24 孔和 96 孔培养板,美

国 Corning 公司产品：二氧化碳孵箱，美国 Shel-Lab 产品；MEM 培养液 100ml：含胎牛血清 10%，谷氨酰胺 0.03%，G418 380  $\mu$ g/ml，卡那霉素 50U/ml。

#### 试验方法：

2.2.15 细胞培养：在长满 2.2.15 细胞的培养瓶内加 0.25% 胰酶，37℃ 消化 3 分钟，加培养液终止消化并使细胞分散。以 1:3 传代，10 天长满。

毒性试验：实验分无药物细胞对照组和不同药物浓度给药组。细胞消化，配制成每毫升 10 万个细胞的溶液，接种 96 孔培养板，每孔 200  $\mu$ l，37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 24 小时，细胞长成单层后进行实验。

将 rSIFN-co 配制成  $1.8 \times 10^7$  IU/ml 的溶液，而后 2 倍梯度稀释以制备一系列溶液。将其加入 96 孔细胞培养板，每浓度 3 孔，每 4 天换液。8 天后显微镜下观察细胞病变。完全破坏为 4；75% 为 3；50% 为 2；25% 为 1；无病变为 0。计算不同浓度药液平均细胞病变程度和抑制率。按 Reed Muench 法计算半数有毒浓度 (TC<sub>50</sub>) 和最大无毒浓度 (TC<sub>0</sub>)。

$$TC_{50} = \text{Antilog} \left( B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

A = log > 50% 药物浓度      B = log < 50% 药物浓度      C = log 稀释倍数

(dilution power)

对 HBeAg、HBsAg 抑制试验：试验设 HBeAg、HBsAg 阳性对照组，阴性对照组，细胞对照组及不同药物浓度给药组。每毫升 70 万个 2.2.15 细胞接种 6 孔细胞培养板，每孔 3ml，37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 24 小时，3 倍稀释试验药液以制备 5 个梯度稀释溶液 (制备 5 个溶液，每个有不同的蛋白质浓度。溶液 2 比溶液 1 浓度低 3 倍，溶液 3 比溶液 2 浓度低 3 倍，等等)，分别为  $4.5 \times 10^6$  IU/ml、 $1.5 \times 10^6$  IU/ml、 $0.5 \times 10^6$  IU/ml、 $0.17 \times 10^6$  IU/ml、

和  $0.056 \times 10^6$  IU/ml, 每浓度 1 孔,  $37^\circ\text{C}$  5% $\text{CO}_2$  培养 24 小时, 每 4 天用相同溶液换液。第 8 天时收获所有培养液,  $-20^\circ\text{C}$  保存。试验重复三批, 分别用固相放射免疫测定盒(中国同位素公司北方免疫试剂研究所产品)测定 HBsAg 和 HBeAg。用  $\gamma$ -计数器测定每孔 cpm 值。

药物效果计算: 计算细胞对照组及每个浓度组的 cpm 均值及其标准差, P/N 值如抑制百分率, 半数有效浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 及选择指数 (SI)。

$$1) \text{ 抗原抑制百分率 } (\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

A=细胞对照组 cpm;      B=给药组 cpm;

2) 计算药物抑制抗原半数有效浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ):

$$\text{抗原抑制 } \text{IC}_{50} = \text{Antilog} \left( B + \frac{50 - B}{A - B} \times C \right)$$

A=log>50% 药物浓度      B=log<50% 药物浓度      C=log 稀

释倍数

3) 改变了空间构象的 rSIFN-Co 在 2.2.15 细胞培养内对 HBsAg 和 HBeAg 的选择指数 (SI):

$$\text{SI} = \frac{\text{TC}_{50}}{\text{IC}_{50}}$$

4) 以 t 检验法 (student t test) 计算各稀释度和对照组间 cpm 的差别

DNA 印迹: (1) 2.2.15 细胞内 HBV-DNA 提取: 细胞培养 8 天, 吸除培养液(通过移除培养液将细胞从培养液中分离出)。加入细胞裂解液以裂解细胞, 而后用苯酚、氯仿、异戊醇混合物 (1:1:1) 抽提 2 次, 高速 10,000g 离心。取上清, 加无水乙醇沉淀核酸, 真空抽干, 重溶于  $20 \mu\text{l}$  TE 缓冲液中。(2) 电泳: 加入 6X DNA 上样缓冲液, 将样品加于 1.5% 琼脂糖胶上电泳, IV/cm, 恒压, 14-18 小时。(3) 变性和杂交: 将胶分别浸于 HCl、变性液、中和液中。(4) 转膜: 按程序将 DNA 转至 Hybond-N 膜上。同斑

点杂交一同进行烤膜、杂交、曝光。扫描光片，以 gel-pro 凝胶分析软件分析相对密度，计算抑制率及  $IC_{50}$ 。

### 结果

表 1、表 2、表 3 中的结果表明：样品以最大无毒浓度指数加入 2.2.15 细胞培养 8 天，最大无毒浓度 rSIFN-Co  $9.0 \pm 0 \times 10^6$  IU/ml 对 HBeAg 的平均抑制率为  $46.0 \pm 5.25\%$  ( $P < 0.001$ )， $IC_{50}$  为  $4.54 \pm 1.32 \times 10^6$  IU/ml，选择指数 SI 为 3.96；对 HBsAg 的平均抑制率为  $44.8 \pm 6.6\%$ ， $IC_{50}$   $6.49 \pm 0.42 \times 10^6$  IU/ml，选择指数 SI 为 2.77。因此，重组 rSIFN-Co 能明显的抑制 HBeAg 和 HBsAg 的活性，而对照组干扰素和干复津则不具该功能。在临床上也证实了 rSIFN-Co 能使 HBeAg 和 HBsAg 降低或恢复到正常水平。

表 1: 测定 rSIFN-co 对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

第一批实验: (rSIFN-co)

对 e 抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	9026	8976	10476	0.436227	0.43935	0.345659	0.407079	0.945909	0.592921	0.614593546
300	9616	12082	10098	0.3993754	0.245347	0.369269	0.337997	0.5388299	1.254924	0.300392321
100	9822	16002	12800	0.386508	0.0005	0.2005	0.195836	0.200833	2.059088	0.08867188
33.33333	15770	19306	16824	0.014991	0	0	0.004997	0.0049969	3.054091	0.001633453
11.11111	19172	22270	18934	0	0	0	0	0	4.054091	0
对照	细胞	16010	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	602.74446016
对表面抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	7706	7240	7114	0.342155	0.381936	0.392693	0.372261	0.922258	0.627739	0.595006426
300	8856	7778	9476	0.2439816	0.336008	0.191053	0.257014	0.5499972	1.370724	0.286349225
100	10818	10720	10330	0.07649	0.084856	0.118149	0.093165	0.292983	2.27756	0.113977019
33.33333	10744	11114	10570	0.082807	0.051221	0.097661	0.07723	0.1998179	3.20033	0.058767408
11.11111	10672	9352	10810	0.088953	0.201639	0.077173	0.122588	0.122588	4.077742	0.02918541
对照	细胞	11714	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	641.7736749

第二批实验: (rSIFN-co)

对 e 抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	7818	8516	9350	0.554378	0.514592	0.467054	0.512008	1.371181	0.487992	0.737521972
300	10344	10628	9160	0.4103967	0.394209	0.477884	0.427497	0.8591731	1.060496	0.447563245
100	12296	14228	13262	0.299134	0.18901	0.244072	0.244072	0.4316522	1.816423	0.79201839
33.33333	15364	17414	16188	0.124259	0.00741	0.77291	0.069653	0.1876045	2.74677	0.063933386
11.11111	17386	13632	15406	0.009006	0.222982	0.121865	0.117951	0.117951	3.628819	0.03148073
对照	细胞	16962	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	365.9357846
对表面抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	5784	6198	5792	0.498265	0.462353	0.497571	0.486063	0.893477	0.513937	0.634835847
300	7150	8534	8318	0.379771	0.259715	0.278452	0.30598	0.4074138	1.207957	0.252210647
100	9830	11212	10210	0.147294	0.027412	0.11433	0.096345	0.101434	2.111612	0.04683464
33.33333	13942	12368	13478	0	0	0	0	0.0050891	3.111612	0.001632835
11.11111	12418	11634	11352	0	0	0.015267	0.005089	0.005089	4.106523	0.001237728
对照	细胞	16962	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	611.0919568

第三批实验: (rSIFN-co)

对 e 抗原的抑制作用										
浓度 (x10 <sup>4</sup> U/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	9702	9614	8110	0.428016	0.433204	0.521872	0.461031	1.316983	0.538969	0.709599543
300	8914	10032	8870	0.4744723	0.40856	0.477066	0.453366	0.8559525	1.085603	0.440859127
100	16312	12688	13934	0.038321	0.251975	0.178517	0.156271	0.402586	1.929332	0.172641621
33.33333	15080	12814	13288	0.110954	0.244547	0.216602	0.190701	0.2463153	2.738631	0.082519158
11.11111	21928	15366	15728	0	0.094093	0.072751	0.0055615	0.055615	3.683017	0.014875633
对照	细胞	17544	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	382.0496935

对表面抗原的抑制作用										
浓度 (x10 <sup>4</sup> U/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	5616	6228	5346	0.496864	0.442035	0.521094	0.486651	0.763125	0.513349	0.597838293
300	8542	8590	7096	0.234725	0.230425	0.364272	0.276474	0.2764738	1.236875	0.182690031
100	11420	11360	11394	0	0	0	0	0	2.236875	0
33.33333	12656	11582	13110	0	0	0	0	0	0	0
11.11111	13142	12336	13342	0	0	0	0	0	4.236875	0
对照	细胞	11528	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	694.7027149

e 抗原: IC<sub>50</sub>均值 450.2434 标准差 132315479

表面抗原: IC<sub>50</sub>均值 649.1894 标准差 42.29580

表 2: Intron A (IFN- $\alpha$  2b) 对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

对 e 抗原的抑制作用										
浓度 ( $\times 10^4$ IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
300	14918	11724	9950	0	0.029711	0.176529	0.068747	0.068747	0.931253	0.068746724
100	14868	16890	15182	0	0	0	0	0	1.931253	0
33.33333	16760	21716	16400	0	0	0	0	0	2.931253	0
11.11111	20854	15042	16168	0	0	0	0	0	3.931253	0
3.703704	12083	12083	12083	0	0	0	0	0	4.931253	0
对照	细胞	17544	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE
对表面抗原的抑制作用										
浓度 ( $\times 10^4$ IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
300	9226	8196	9658	0.152489	0.247106	0.521054	0.1708	0.189295	0.8292	0.185857736
100	10946	10340	10828	0	0.050156	0.364272	0.018495	0.0184947	1.810705	0.010110817
33.33333	12250	12980	13934	0	0	0	0	0	2.810705	0
11.11111	12634	12342	12000	0	0	0	0	0	3.810705	0
3.703704	10886	10886	10886	0	0	0	0	0	4.810705	0
对照	细胞	10886	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE



表 3: 干复津对乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制率的实验结果

第一批实验: (干复津)

对 e 抗原的抑制作用												
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率		
900	14172	12156	17306	0.091655	0.220869	0	0.104175	0.306157	0.895825	0.254710274		
300	13390	12288	16252	0.1417767	0.212409	0	0.118062	0.2019827	1.777764	0.102024519		
100	14364	18834	14194	0.079349	0	0.090245	0.056531	0.083921	2.721232	0.029916678		
33.33333	15722	16034	16340	0	0	0	0	0.0273897	3.721232	0.007306592		
11.11111	17504	17652	14320	0	0	0.082169	0.02739	0.02739	4.693843	0.005801377		
对照	细胞	15602		空白		0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE		
对表面抗原的抑制作用												
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率		
900	12080	11692	12234	0	0.01275	0	0.00425	0.025163	0.99575	0.024647111		
300	12840	11484	12350	0	0.030313	0	0.010104	0.0209125	1.985646	0.010422073		
100	12894	14696	15086	0	0	0	0	0.010808	2.985646	0.003606955		
33.33333	15032	12928	13020	0	0	0	0	0.0108081	3.985646	0.002704416		
11.11111	11794	11984	11508	0.004137	0	0.028287	0.010808	0.010808	4.974837	0.002167838		
对照	细胞	11843		空白		0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE		

第二批实验：(干复津)

对 e 抗原的抑制作用												
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率		
900	6278	6376	6408	0.200051	0.187564	0.183486	0.190367	0.274635	0.809633	0.253290505		
300	7692	9092	6394	0.0198777	0	0.18527	0.068383	0.0842678	1.74125	0.046161005		
100	8960	7474	8190	0	0.047655	0	0.015885	0.015885	2.725365	0.005794856		
33.33333	8530	8144	9682	0	0	0	0	0	3.725365	0		
11.11111	7848	7848	7848	0	0	0	0	0	4.725365	0		
对照	细胞	7848		空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE		
对表面抗原的抑制作用												
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率		
900	12364	12268	12274	0.036171	0.043655	0.043187	0.041004	0.140162	0.958996	0.12751773		
300	11590	12708	13716	0.0965076	0.009355	0	0.035287	0.0991581	1.923709	0.0490186		
100	12448	13468	13982	0.029623	0	0	0.009874	0.063871	2.913834	0.02144964		
33.33333	12616	11346	12444	0.016526	0.115529	0.029935	0.053996	0.0539965	3.859838	0.013796309		
11.11111	12828	12828	12828	0	0	0	0	0	4.859838	0		
对照	细胞	12828		空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE		

第三批实验: (干复津)

对 e 抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	7240	6642	6158	0.064599	0.14186	0.204393	0.136951	0.217399	0.863049	0.201211735
300	11072	8786	6902	0	0	0.108269	0.03609	0.0804479	1.82696	0.042176564
100	7016	9726	7552	0.09354	0	0.024289	0.039276	0.044358	2.787683	0.015663017
33.33333	7622	8866	8676	0.015245	0	0	0.005082	0.0050818	3.782601	0.001341671
11.11111	7740	7740	7740	0	0	0	0	0	4.782601	0
对照	细胞	7740	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE

对表面抗原的抑制作用										
浓度 (X10 <sup>4</sup> IU/ml)	第一孔	第二孔	第三孔	第一孔抑制率	第二孔抑制率	第三孔抑制率	平均抑制率	累加	1-累加	累加抑制率
900	11048	11856	11902	0.04775	0	0	0.015917	0.015917	0.984083	0.015916796
300	13454	12896	11798	0	0	0	0	0	1.984083	0
100	12846	13160	12546	0	0	0	0	0	2.984083	0
33.33333	12680	12458	12360	0	0	0	0	0	3.984083	0
11.11111	11602	11602	11602	0	0	0	0	0	4.984083	0
对照	细胞	11602	空白	空白	0	0	稀释倍数	3	IC <sub>50</sub>	FALSE

e 抗原: IC50 均值: 0 标准差: 0

表面抗原: IC50 均值: 0 标准差: 0

## 实施例 2

### 不同干扰素对乙肝病毒基因表达的抑制作用的比较

乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 包含反式激活蛋白的共有元件, 这种蛋白质的结合活性是受干扰素调控的。用干扰素处理 HBV 转染的肝细胞导致 HBV 基因表达的抑制。本研究的目的是研究不同的干扰素对 HBV 转录调控的影响。用含 HBV 增强子 (EnH) I、EnH II 和核心启动子控制下的萤火虫荧光素酶基因的报告质粒 (reporter plasmid) 来瞬时转染人类肝癌细胞, 申请人研究了三种不同干扰素对转录的生物活性影响。

#### 材料和方法:

1. 干扰素: IFN-con1 (干复津<sup>®</sup>)、IFN-Hui-Yang ( $\gamma$ SIFN-co) 及 IFN- $\beta$ 1b。

2. 报告质粒: 用 PCR 制备包含 HBV-增强子 (EnH) I、EnH II 和核心启动子的 DNA 片段, 将其末端切平克隆入无增强子且无启动子的萤火虫荧光素酶基因报告质粒 pGL3-Basic (Promega, WI, USA) 的 SmaI I 位点。所得到的报告质粒命名为 pGL3-HBV-Luc。

3. 细胞培养和 DNA 转染: 将 HepG2 细胞培养于 DMEM 培养基中, 该培养基补加 10% FBS, 100 U/ml 的青霉素和 100  $\mu$ g/ml 链霉素。将细胞放置于温度 30 $^{\circ}$  C, 含 5% 的 CO<sub>2</sub> 的培养箱内。使用 Boehringer 的脂质体转染试剂盒用 pGL3-HBV-Luc 报告质粒转染细胞。经过 18 小时, 移走含有转染试剂的培养基, 注入含有或不含有干扰素的新鲜培养基, 将细胞继续培养 48 小时。

4. 荧光素酶测定: 注入干扰素 48 小时后, 收集并裂解细胞。该细胞溶解产物的蛋白质浓度由 Bio-Rad 蛋白质定量试剂盒检测。荧光素酶活性测定使用 Promega 的荧光素酶报告检测系统, 按照制造商提供的指南进行。

#### 实验结果:

##### 不同干扰素处理的细胞溶解物中荧光素酶活性的表达

对照	IFN-con1	IFN-Hui-Yang	IFN- $\beta$ 1b
100	48+8	29+6	64+10

以上结果显示： $\gamma$ SIFN-co 对 HBV 基因表达的抑制最有效。

### 实施例 3

#### 使用 $\gamma$ SIFN-co 的副作用及体温变化

现有干扰素类药的副反应较多。副反应包括：恶心、肌肉酸痛、食欲不振、脱发、白细胞减少 (hypoleukmia; hypoleukocytosis; hypoleukia) 及血小板减少等。

#### 方法：

所有受试者分为两组。A 组 11 名受试者注射 9 $\mu$ g 干复津，B 组 10 名受试者注射 9 $\mu$ g  $\gamma$ SIFN-co。注射后，两组受试者临床观察 48 小时。注射 1 小时后进行第一次观察记录，此后每隔 2 小时观察记录一次。

表 4 列出的是 9 $\mu$ g  $\gamma$ SIFN-co 与 9 $\mu$ g 干复津注射后患者的副反应对比。

表 4 副反应

		$\gamma$ SIFN-co 9 $\mu$ g	干复津 <sup>*</sup> 9 $\mu$ g
		人数：n=10	人数：n=11
全身系统	反应	反应例数	反应例数
总体	乏力	3	3
	脚板发热	1	
	畏寒 (frigolability)	3	4
	腿软		3
	腰酸	2	1
	全身疼痛	4	5

中枢神经 系统/周围 神经系统	头痛	3	6
	头晕	2	11
	嗜睡		3
胃肠	厌食	1	
	腹痛	1	
	腹泻	1	
肌肉骨骼 系统	肌痛	1	2
	关节痛	2	
呼吸系统	鼻塞	1	
视觉障碍	眼胀		1

结论:

注射 $\gamma$ SIFN-co 受试者的副反应比较小。其副反应为一般流感样症状,如:头痛,乏力,畏寒,肌肉疼痛,出汗,关节痛(关节疼痛,关节疼)。注射干复津受试者的副反应明显比注射 $\gamma$ SIFN-co 受试者的副反应大。

由附图 4A-1、4A-2、4B-1 和 4B-2,可以观察到 A 组受试者的体温明显高于 B 组受试者。这些结果还反映出 $\gamma$ SIFN-co 比干复津具有更好的耐受性。

#### 实施例 4

##### $\gamma$ SIFN-co 晶体生长及晶体学参数测定

$\gamma$ SIFN-co 的晶体研究。经过系统的摸索与实验,目前已获得两种晶体。(见附图 5-7)

#### 1、晶体生长

用纯水(H<sub>2</sub>O)溶解 $\gamma$ SIFN-co 蛋白质至浓度 3mg/ml。结晶条件搜索使用 Hampton 公司的 Hampton Research Crystal Screen I and II。采用气象悬滴扩散法(Drop Suspension Diffusion Method),池液 500  $\mu$ l,液滴 1  $\mu$ l 蛋白质+1  $\mu$ l 池液,温度为 293K。最初搜索得到两种不同类型的小晶体,见表 5。

表 5  $\gamma$ SIFN-co 晶体蛋白筛选

条件	I	II
稀释剂	0.1M Tris-HCl PH=8.75	0.1M HEPES PH=7.13
沉淀剂	17.5%(w/v) PEG550 MME	10%(w/v) PEG6K
添加剂	0.1M NaCl	3%(v/v) MPD
温度	293K	293K
晶体大小 (mm)	0.2×0.2×0.1	0.6×0.02×0.02
晶体衍射图	图 5	图 6

## 2、数据采集及处理

晶体 I 已用于 X-射线衍射数据收集和初步晶体学分析, 并完成晶体学参数测定。衍射数据收集在常温进行。将晶体 I (条件 I) 封入薄壁石英管中。使用 Bruker AXS Smart CCD 探测器, 光源采用 Nonius FR591 旋转阳极靶 X 光发生器产生的 CuK $\alpha$  射线 ( $\lambda = 1.5418\text{\AA}$ )。光源功率 2000kw (40kv×50mA), 波长 1.00  $\text{\AA}$ , 曝光时间 60 秒,  $\Delta\phi = 2^\circ$ , 晶体到探测器之间的距离为 50mm。数据处理使用 Bruker 公司的 Proteum 程序包。晶体的衍射图谱 (局部) 见附图 7。处理结果见表 6。

表 6 晶体学参数测定结果

参数

a ( $\text{\AA}$ )	82.67
b ( $\text{\AA}$ )	108.04
c ( $\text{\AA}$ )	135.01
$\alpha$ ( $^\circ$ )	90.00
$\beta$ ( $^\circ$ )	90.00
$\gamma$ ( $^\circ$ )	98.35
空间群	P2 或 P2 <sub>1</sub>
分辨率	5 $\text{\AA}$
不对称分子 #	10
溶出 (dissolution)	57.6%

另外, 按照已发表文献,  $\gamma$ SIFN-co 未有晶体长出。与  $\gamma$ SIFN-co 最为相近的结果是 huIFN- $\alpha$  2b, 但是其筛选条件非常复杂。经过三次接种

---

晶体长到  $0.5 \times 0.5 \times 0.3 \text{mm}$ ，其分辨率为  $2.9 \text{ \AA}$ ，空间群为  $P2_1$ ，晶胞也很大，不对称分子有数为 6，溶出为约 60%。



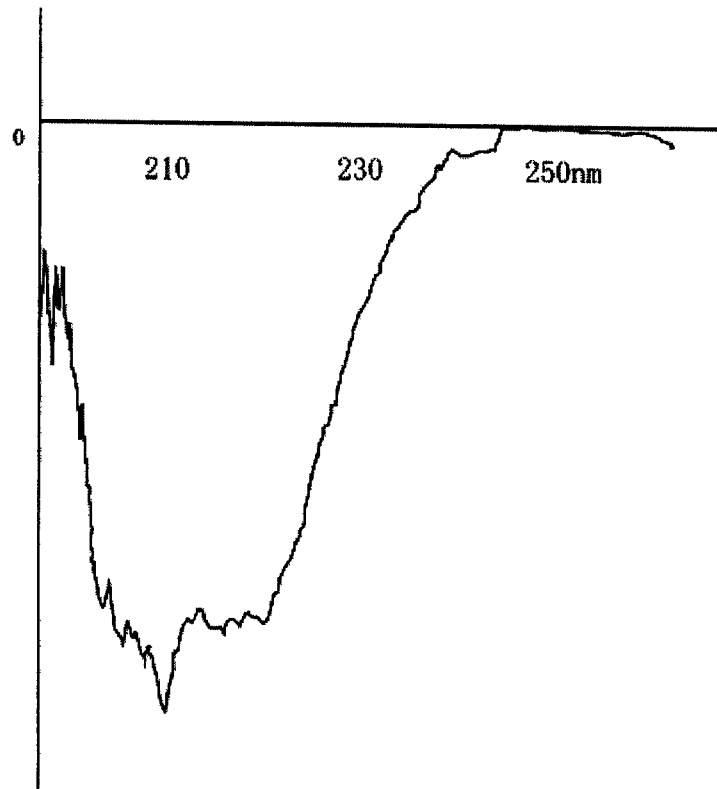


图 1

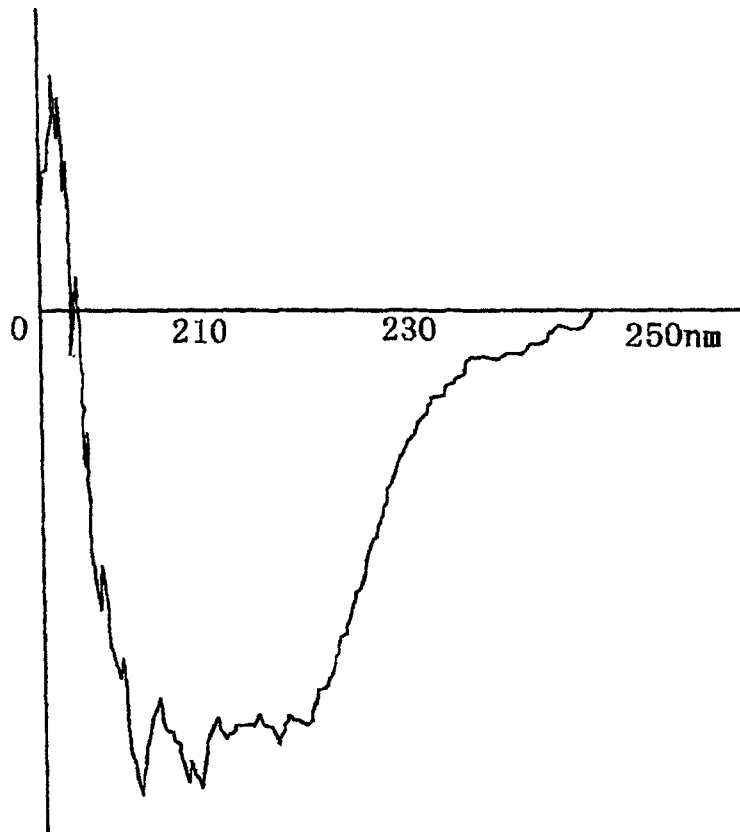


图 2

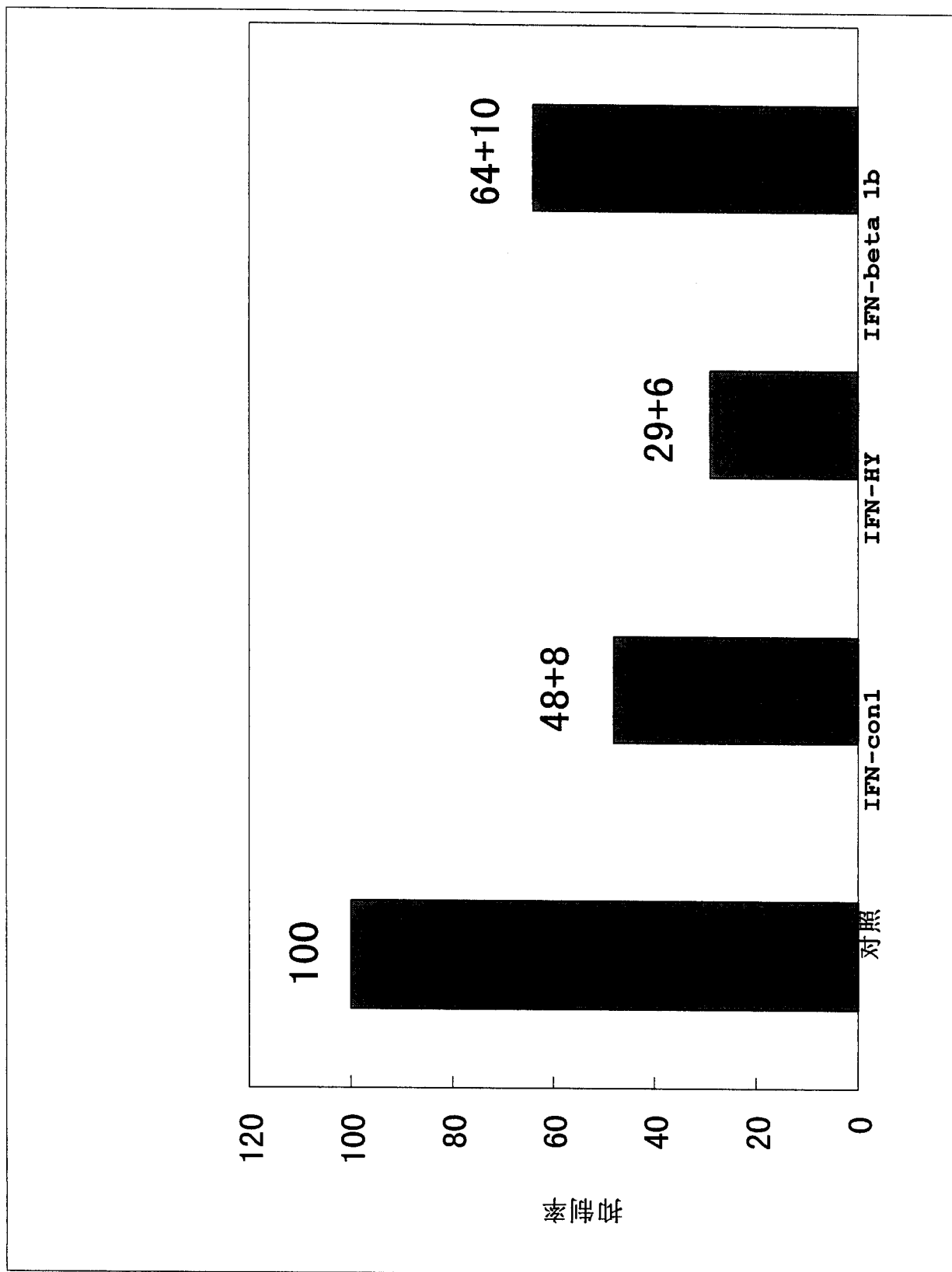


图 3

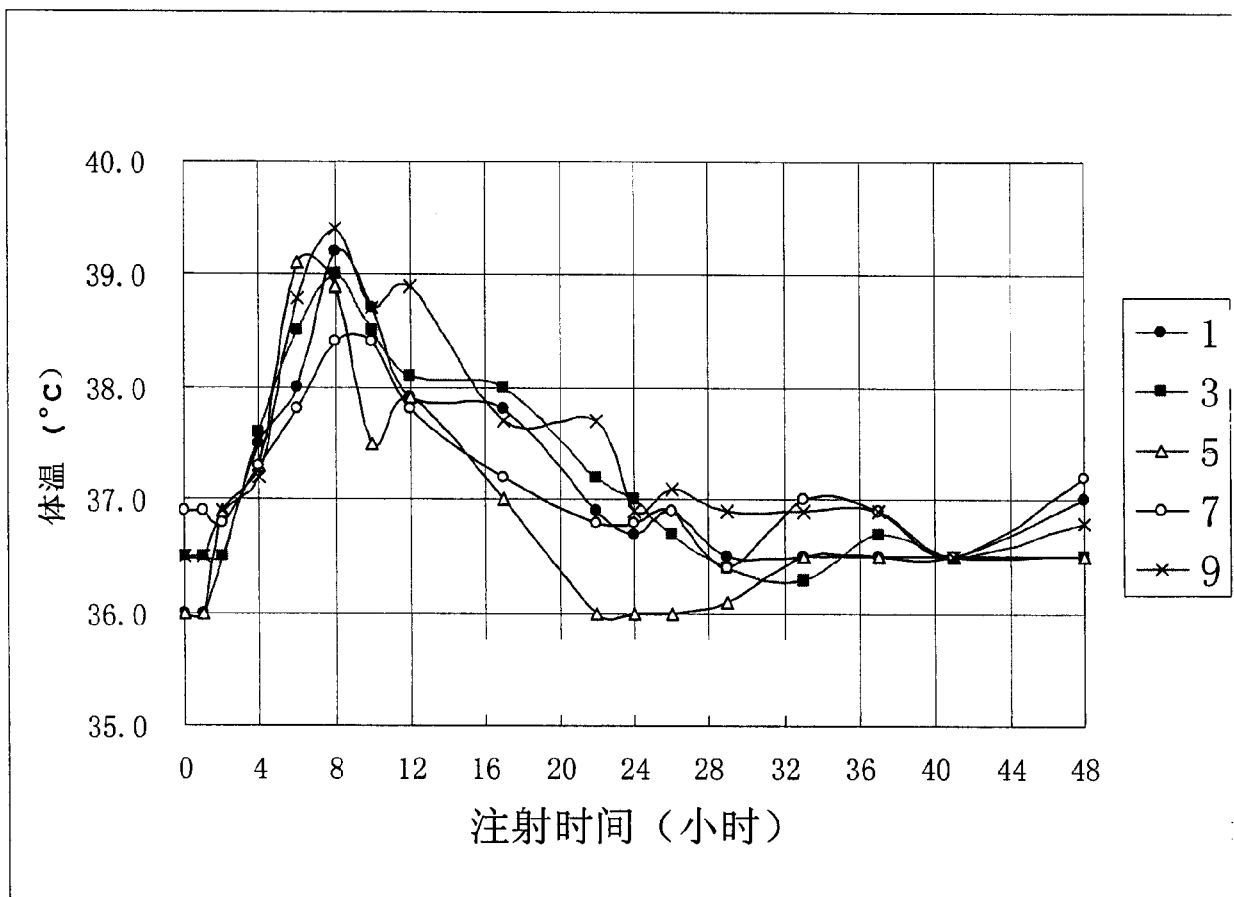


图 4A-1

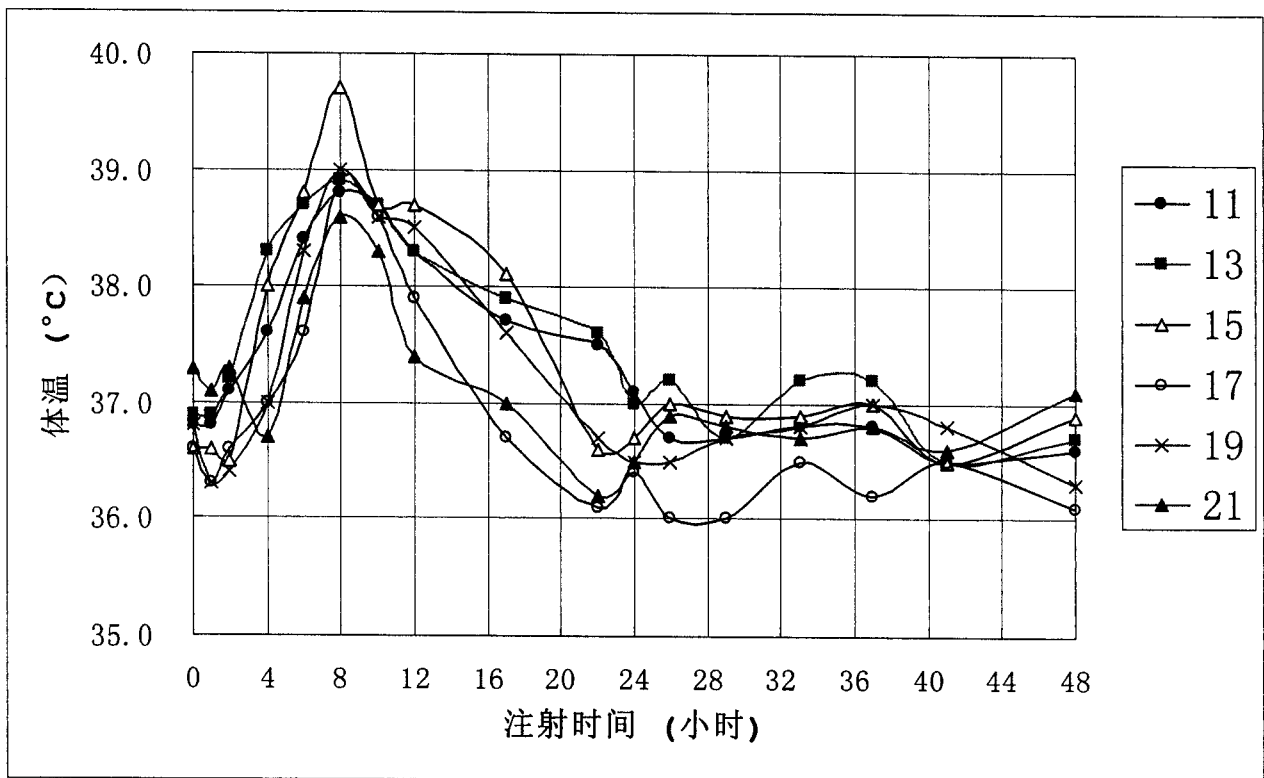


图 4A-2

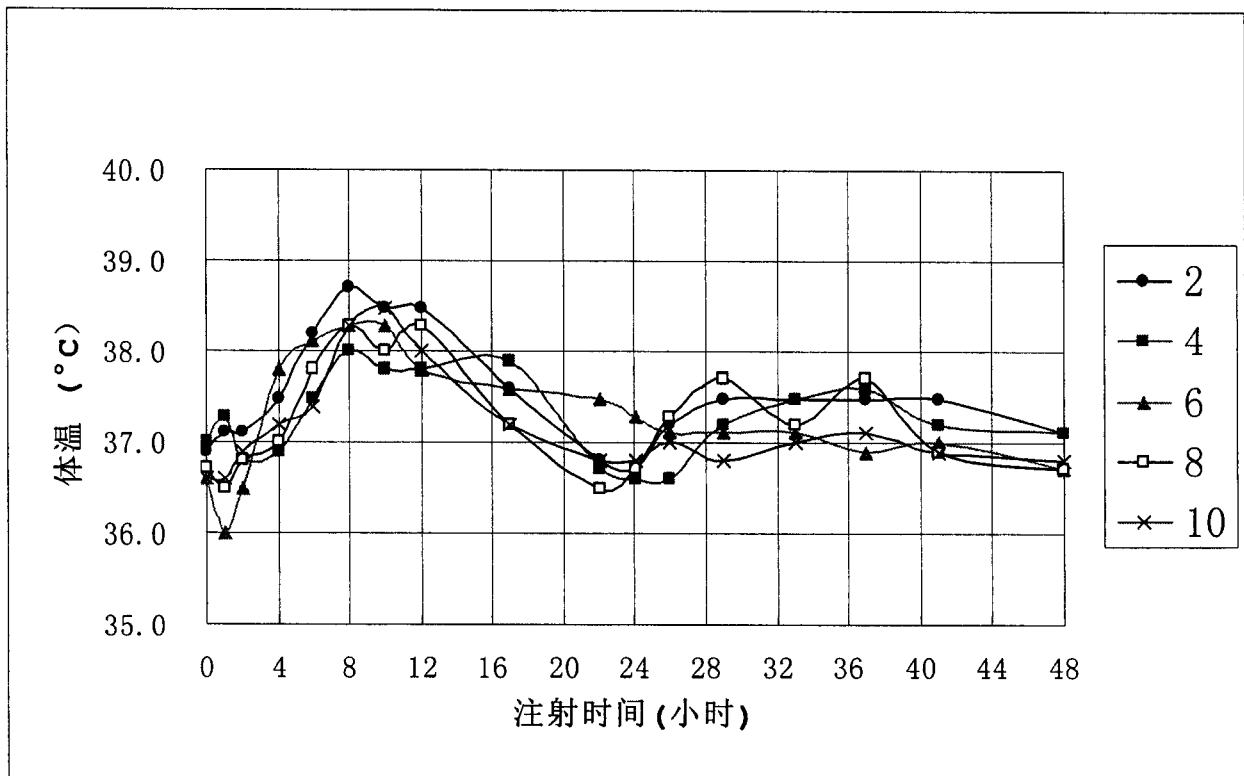


图 4B-1

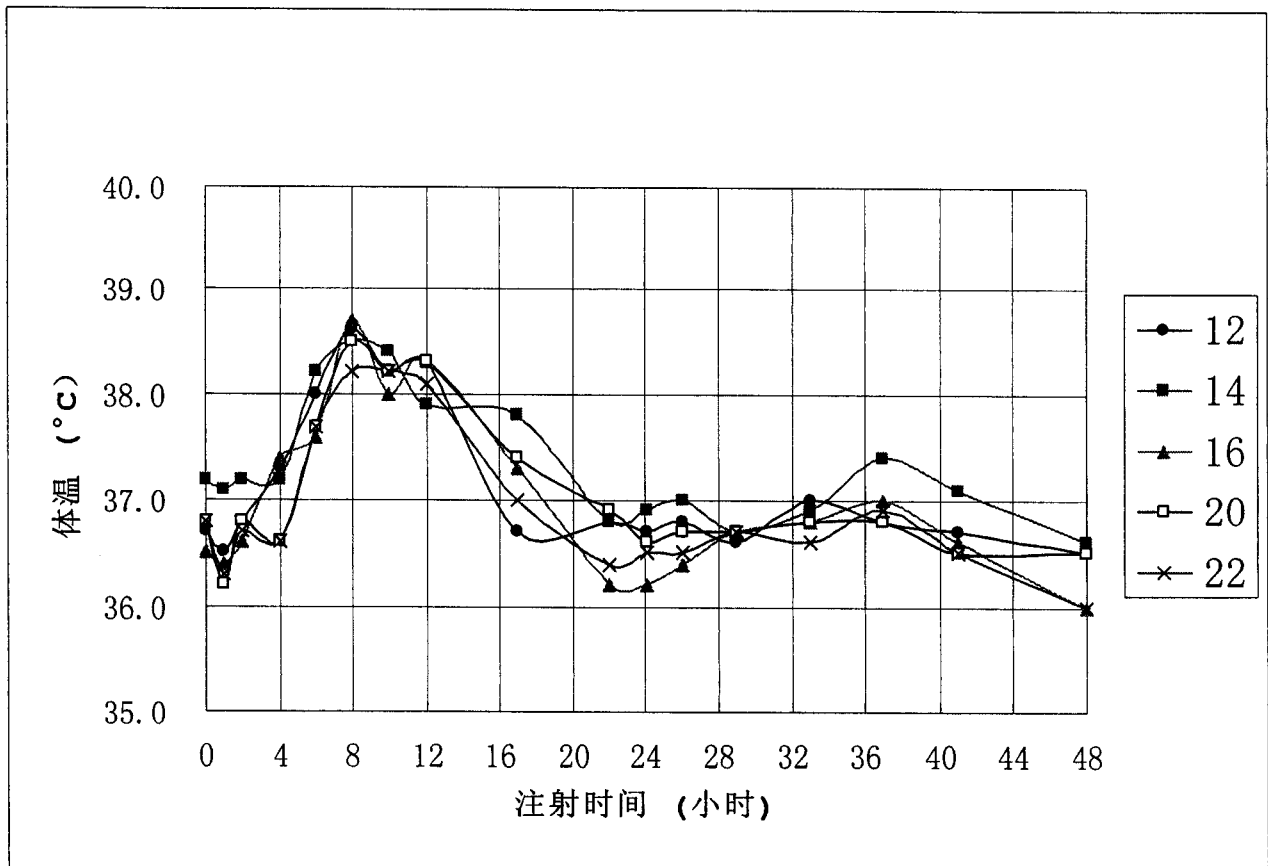


图 4B-2

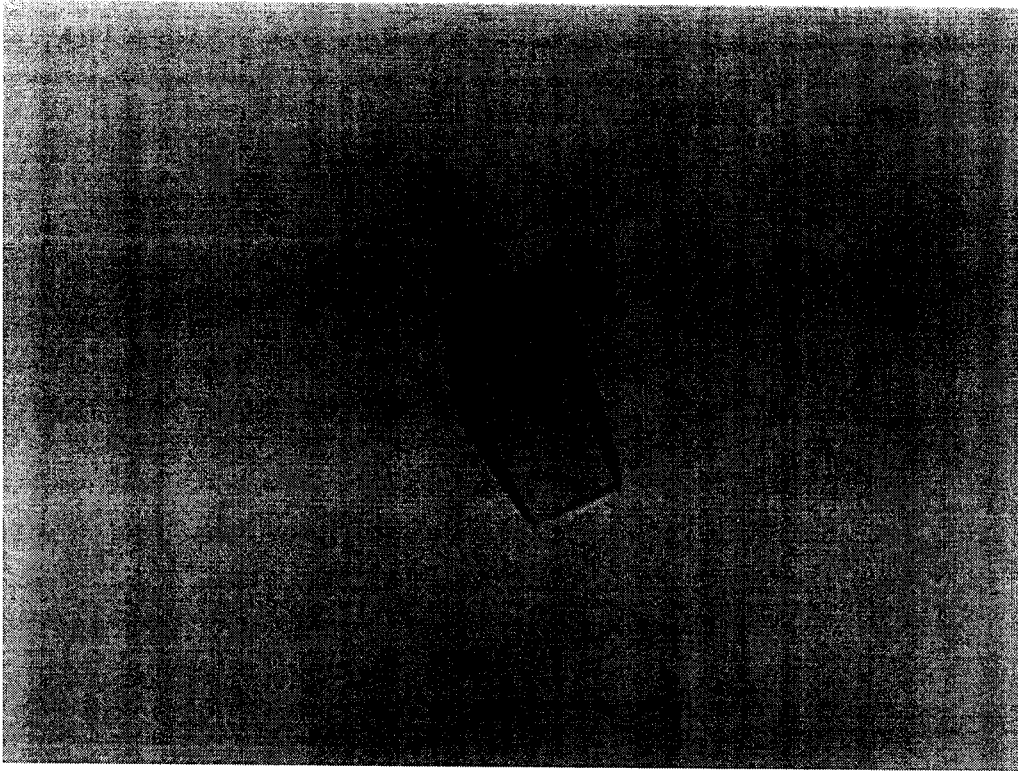


图 5



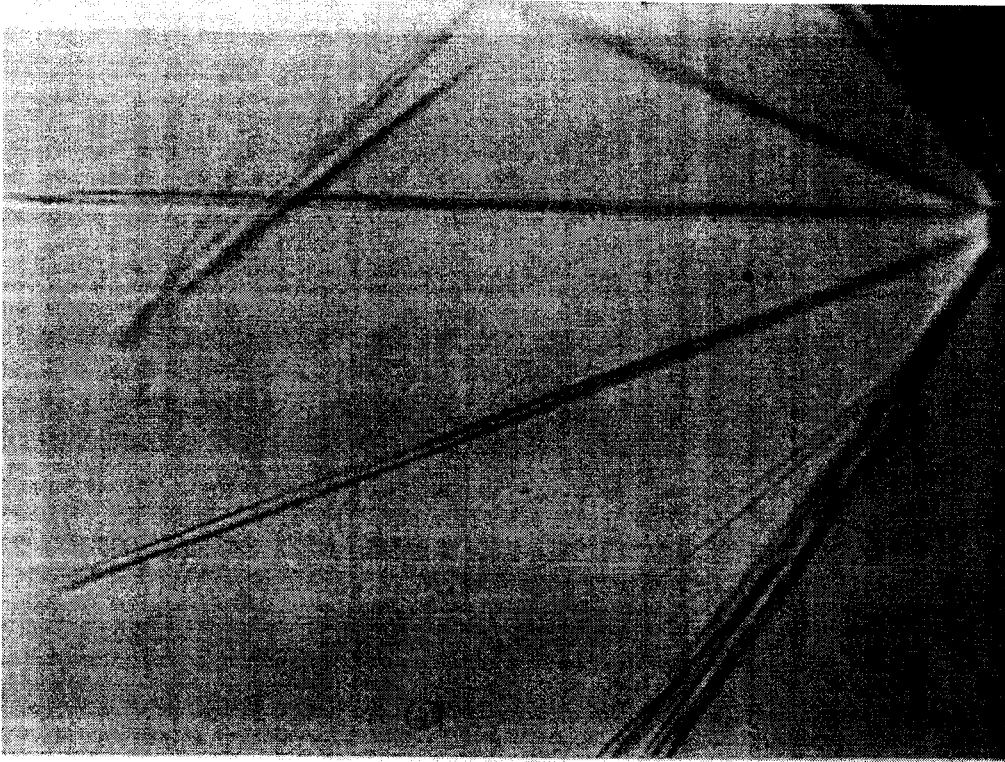


图 6

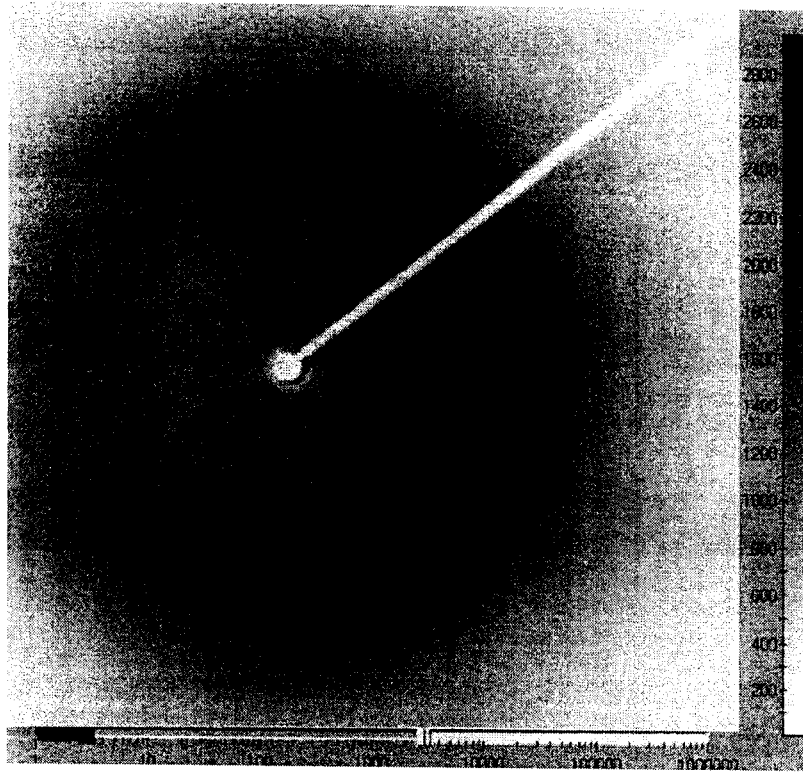


图 7