

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 14/47



[12] 发明专利申请公开说明书

C12N 15/12 C12N 15/63

C12N 15/11 C12Q 1/68

C07K 16/18 G01N 33/53

A61K 38/17 A01K 67/027

[21] 申请号 00818429.1

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423657A

[22] 申请日 2000.12.13 [21] 申请号 00818429.1

[30] 优先权

[32] 1999.12.13 [33] GB [31] 9929453.0

[32] 2000.2.11 [33] GB [31] 0003274.8

[86] 国际申请 PCT/GB00/04791 2000.12.13

[87] 国际公布 WO01/42301 英 2001.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2002.7.16

[71] 申请人 太平洋药品有限公司

地址 澳大利亚维多利亚州

[72] 发明人 让-弗朗西斯·麦里泰特

米歇尔·德朗

迈克尔·杰拉德·托维

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 黄 健

权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 4 页
附图 2 页

[54] 发明名称 α -干扰素诱导的基因

[57] 摘要

本发明涉及被干扰素— α 给药上调的相应于 SEQ.ID. No. 1 中阐明的 cDNA 序列的基因的鉴定，这种基因的表达产物的检测，被认为在预测对干扰素— α 和其它干扰素处理的应答时有用，这些干扰素作用于 I 型干扰素受体。也设想了被同样基因编码的蛋白在治疗中的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种分离的多肽, 包括:
 - (i) SEQ ID No: 2 的氨基酸序列;
 - (ii) 它的变异体, 具有选自于与免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性的实质性相似功能; 或
 - 5 (iii) (i) 或(ii)的片段, 它保留有选自于与免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性的实质性相似功能。
2. 一种多肽的变异体或片段, 该多肽是被 SEQ. ID. No. 2 中阐明的氨基酸序列所限定的, 适于提高对所述的多肽和/或它的自然出现的变异体的特异性抗体。
- 10 3. 一种编码权利要求 1 或 2 中所述的一种多肽的多聚核苷酸。
4. 根据权利要求 3 所述的一种多聚核苷酸, 其是一种 cDNA。
5. 一种编码权利要求 1 中所述的多肽的多聚核苷酸, 该多聚核苷酸包括:
 - (a) SEQ ID No: 1 的核苷酸序列或它的编码序列和/或它的互补序列;
 - (b) 与 (a) 中定义的一个序列杂交的一个序列;
 - 15 (c) 作为遗传密码的结果, 简并为 (a) 或 (b) 中定义的一个序列的一个序列; 或
 - (d) 与 (a), (b), 或 (c) 中定义的一个序列有至少 60%同一性的一个序列。
- 20 6. 一种表达载体, 它包括权利要求 3-5 中任一项中所述的多聚核苷酸序列, 它能够表达根据权利要求 1 或 2 的一个多肽。
7. 一种宿主细胞, 它包含一个根据权利要求 6 所述的表达载体。

8. 一种对权利要求 1 或 2 中所述的多肽具有特异性的抗体。
9. 一种分离的多聚核苷酸，它引导权利要求 1 中所述的多肽的体内表达。
10. 根据权利要求 1 中要求的一种多肽或根据权利要求 9 中所述的一种多聚核苷酸在人或非人动物的医疗治疗中的用途。
- 5 11. 一种药物组合物，它包括根据权利要求 1 中所述的一种多肽或根据权利要求 9 所述的一种多聚核苷酸和一种药用可接受的载体或稀释剂。
12. 根据权利要求 1 中所述的一种多肽或根据权利要求 9 所述的一种多聚核苷酸在药剂制备中的用途，该药剂是作为一种抗病毒，抗肿瘤或免疫调节因子用于治疗中。
- 10 13. 治疗患有 I 型干扰素可治疗性疾病的患者的一种方法，包括：给药所述的患者一个有效剂量的权利要求 1 所述的一种多肽或权利要求 9 所述的一种多聚核苷酸。
14. 一种生产权利要求 1 或 2 所述的一种多肽的方法，包括：在适合于得到多肽表达和分离所述的多肽的条件下培养权利要求 7 所述的宿主细胞。
- 15 15. 一种鉴定具有免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性的化合物的方法，包括：提供一种能表达 SEQ. ID. No. 2 或其自然出现的变异体的多肽的细胞，在试验条件下，温育所述的细胞与化合物，和监测编码所述的多肽或它的变异体的基因的上调作用。
- 20 16. 一种核苷酸序列，能在体内表达被 SEQ. ID. No. 2 所限定的氨基酸序列的编码序列的一种反义序列或所述编码序列的自然出现的变异体，在人或非人动物的医疗治疗中的用途。

17. 根据权利要求 8 所述的一种抗体在医疗治疗中的用途。
18. 一套用于核苷酸扩增的引物，它以权利要求 4 所述的一个 cDNA 中的序列为靶序列。
19. 一种衍生于根据权利要求 3-5 中任何一项所述的一种多聚核苷酸的核酸
5 探针。
20. 根据权利要求 19 所述的一种探针，它被附着于固相载体。
21. 一种预测患者对 I 型干扰素治疗的应答的方法，包括：检测来自于所述的患者
的一个细胞样品中被 SEQ. ID. No. 2 或其自然出现的变异体氨基酸序列定义的蛋白质的水平，或相应的 mRNA 的水平，所述的样品来自于给药
10 过一个 I 型干扰素后或在所述测量前在体外使用过 I 型干扰素治疗过的所述的患者。
22. 根据权利要求 21 所述的一种方法，其中在获得所述的样品前给药的干扰素或在体外处理所述的样品时所用的干扰素是建议用于治疗所述的患者
的干扰素。
- 15 23. 根据权利要求 21 或 22 所述的一种方法，其中一个样品包括从体外用 I 型干扰素处理的患者血液样品中分离的外周血单核细胞。
24. 根据权利要求 21-23 所述的任何一项的一种方法，其中所述的检测包括检测编码蛋白的 mRNA 的水平，该蛋白是被 SEQ. ID. No. 2 或所述的蛋白自然出现的变异体中的序列所阐明的。
- 20 25. 一种非人的转基因动物，它能够表达权利要求 1 所述的多肽。

α -干扰素诱导的基因

发明领域:

- 5 本发明涉及被干扰素- α (IFN- α) 给药上调 (upregulated) 的人基因的鉴定, 据信它的编码序列以前是未知的。发现这种基因表达产物的检测在预测对作用于 I 型干扰素受体的 IFN- α 和其它干扰素的应答的用途。也设想了同样基因编码的分离的新的蛋白的治疗用途。

10 发明背景:

- IFN- α 广泛应用于大量疾病的治疗中。可以用 IFN- α 治疗的疾病包括肿瘤类疾病, 如白血病, 淋巴瘤和实体瘤, AIDS 相关的卡波西肉瘤和病毒感染, 如慢性肝炎。IFN- α 也被建议通过口腔黏膜途径给药用于治疗自身免疫的, 分支杆菌的, 神经变性的, 寄生性的和病毒的疾病。尤其是, 建议 IFN- α
- 15 用于, 例如, 多发性硬化症, 麻风, 结核, 脑炎, 疟疾, 宫颈癌, 生殖器疱疹, B 型和 C 型肝炎, HIV, HPV, 和 HSV-1 和 HSV-2 的治疗。也建议用于关节炎, 狼疮和糖尿病的治疗。同时, 对于肿瘤类疾病如多发性骨髓瘤, 毛细胞白血病, 慢性骨髓性白血病, 低分化淋巴瘤, 皮肤 T-细胞淋巴瘤, 类癌肿瘤, 宫颈癌, 肉瘤包括卡波西肉瘤, 肾肿瘤, 癌包括肾细胞癌, 肝细胞癌,
- 20 鼻咽癌, 血液学恶性肿瘤, 结肠直肠癌, 成胶质母细胞瘤, 喉乳头癌, 肺癌, 结肠癌, 恶性的黑色素瘤和脑肿瘤, 也被建议通过口腔黏膜途径, 如口服途径和鼻的途径给药, 应用 IFN- α 进行治疗。

IFN- α 是 I 型干扰素家族的一员, 它们通过与 I 型干扰素受体作用而发挥它们的特异的生物学活性。其它 I 型干扰素包括 IFN- β , IFN- ω 和 IFN-

τ。

很不幸，不是所有用 I 型干扰素如 IFN- α 治疗的潜在患者都对 I 型干扰素治疗有利地反应，特别地，例如，慢性病毒性肝炎患者，肿瘤性疾病和复发弛张的多发性硬化症，只有一小部分这样的患者确实反映出存在长期的好处。医师对于确切的预测 I 型干扰素治疗结果的无能为力引起了对于这种治疗的费用—效益比的高度的关注，不仅在于这种治疗的昂贵的生物制剂的浪费和治疗中时间的损失方面，也在于患者面临的严重的副作用方面。此外，IFN- α 的异常产物已经显示出与大量的自身免疫疾病有关。正因如此，由于 I 型干扰素通过调节大量的基因的表达而发挥其治疗作用，才使得对于 I 型干扰素应答基因的鉴定产生了极大的兴趣。确实，正是 I 型干扰素治疗诱导的基因表达的特异性模式决定了患者将对这种治疗有利或不利地反应。

发明概述:

现在已鉴别出人基因 cDNA 与被通过口腔黏膜途径或静脉内途径的 IFN- α 给药上调的鼠基因是相对应的，并且被认为代表一个新的 DNA。这样，相应的人基因现在也被命名为一种 IFN- α 上调基因。

被同样基因编码的蛋白分子量约 28 Kda, 指的是下面的 HuIFRG28-1 蛋白。这种蛋白和它的功能性的变异体现在被设想 (envisage) 为治疗因子，特别是用做抗病毒，抗肿瘤或免疫调节因子。例如，他们可用于自身免疫的，分支杆菌的，神经变性的，寄生性的或病毒性疾病，关节炎，糖尿病，狼疮，多发性硬化症，麻风，结核病，脑炎，疟疾，宫颈癌，生殖器疱疹，B 型或 C 型肝炎，HIV，HPV，HSV-1 或 HSV-2，或肿瘤性疾病，如多发性骨髓瘤，毛细胞白血病，慢性骨髓性白血病，低分化淋巴瘤，皮肤 T-细胞淋巴瘤，类癌肿瘤，宫颈癌，肉瘤包括卡波西肉瘤，肾肿瘤，癌包括肾细胞癌，肝细胞癌，

鼻咽癌，血液学恶性肿瘤，结肠直肠癌，成胶质母细胞瘤，喉乳头瘤，肺癌，结肠癌，恶性黑色素瘤或脑肿瘤的治疗。换言之，这种蛋白可用于治疗任何 I 型干扰素可治疗性疾病。

I 型干扰素治疗的患者，如通过口腔黏膜途径或静脉内途径用 IFN- α 治疗的患者，对其细胞样品中的 HuIFRG28-1 蛋白，或其自然出现的变异体，或相应的 mRNA 的水平检测，也可以被用于预测对这种治疗的应答。此外也发现，可选地，和更优选地，通过在体外用 I 型干扰素处理人外周血单核细胞样品，寻找相应于 HuIFRG28-1 基因的表达产物，优选 mRNA 的上调节或降调节，来判断这种应答。

10 这样，根据本发明的第一方面，提供了一种分离的多肽，包括：

- (i) SEQ. ID. NO: 2 的氨基酸序列；
- (ii) 它的变异体，具有实质性相似功能，如免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性；或
- (iii) (i) 或(ii)的一个片段，它保留有实质性相似功能，如免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性。

15

本发明也提供了用于人或非人的动物医疗治疗的这样一种蛋白，特别是用做抗病毒，抗肿瘤或免疫调节因子。如上所示，这种应用可延伸到任何 I 型干扰素可治疗性疾病。

根据本发明的另外一个方面，本发明提供了一种编码上述定义的本发明的多肽的分离的多聚核苷酸，或它的补体。这种多聚核苷酸典型地包括一个序列，包括：

- (a) SEQ. ID. NO. 1 的核酸或它的编码序列和/或另外的互补序列；
- (b) 一个序列，例如，在严紧的条件下，与 (a) 中定义的一个序列互补的一个序列杂交；
- (c) 一个序列，作为遗传密码的结果，简并为 (a) 或 (b) 中定义的序列；

25

(d) 与 (a), (b) 或 (c) 中定义的一个序列至少有 60% 同一性的一个序列。

本发明也提供了:

- 5 - 一个表达载体, 包含本发明的一个多聚核苷酸, 能表达本发明的多肽;
- 一个宿主细胞, 包含本发明的一个表达载体;
- 一个对本发明的一个多肽特异性的抗体;
- 治疗患有 I 型干扰素可治疗性疾病患者的一个方法, 该法包括给药所述的患者一个有效量的 HuIFRG28-1 蛋白或它的功能性变体;
- 10 - 这样的一种多肽在用于作为抗病毒或抗肿瘤或免疫调节因子治疗中的, 特别是用于 I 型干扰素可治疗疾病的治疗中的药剂制造中的用途;
- 一种药物组合物, 它包含本发明的多肽和一个药用可接受的载体或稀释剂;
- 生产本发明多肽的一种方法, 该方法包括在适合于获得多肽表达和分离
- 15 所述的多肽的条件下维持本发明的宿主细胞;
- 一种本发明的多聚核苷酸, 例如, 以表达载体的形式, 它引导上述定义的多肽的体内表达, 该多肽用于人或非人的动物的医疗治疗中, 特别是作为抗病毒, 抗肿瘤或免疫调节因子使用;
- 一种药物组合物, 它包含这种多聚核苷酸和药用可接受的载体或稀释剂;
- 20 - 一种治疗患有 I 型干扰素可治疗性疾病的一种方法, 该方法包括给药所述的患者一个有效量的这种多聚核苷酸;
- 这种多聚核苷酸在药剂制造中的用途, 如载体制备, 该药剂作为抗病毒, 抗肿瘤或免疫调节因子用于治疗中, 特别是用于 I 型干扰素可治疗性疾病的
- 治疗中的用途; 和
- 25 - 一种鉴定具有免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性的化

合物的方法，包括提供一种能表达 HuIFRG28-1 蛋白或它的自然出现的变异体的细胞，在试验情况下，温育所述的细胞和一个化合物，监测 HuIFRG28-1 基因表达的上调作用。

还有，本发明进一步提供了一种预测患者对 I 型干扰素，如 IFN- α （如
5 通过口腔黏膜途径或非肠道途径治疗，例如静脉内，皮下或肌内的 IFN- α 治疗）治疗的应答的一种方法，它包括检测从所述的患者得到的细胞样品中，如血液样品中的 HuIFRG28-1 蛋白或它的自然出现的变异体的水平，如等位基因变异体，或相应的 mRNA 的水平，其中所述的样品是从 I 型干扰素给药后的
10 所述的患者获得，如通过口腔黏膜途径或静脉内途径给药 IFN- α ，或者在所述
10 的检测前在体外用 I 型干扰素，如 IFN- α 处理。

本发明也延伸出了进行这种试验的试剂盒。

附图说明:

图 1 表示了 HuIFRG28-1 对水泡性口炎病毒(VSV), 辛德毕斯病毒(sindbis
15 virus) 和脑心肌炎病毒(EMCV) 的病毒复制的影响。

图 2 表示了 HuIFRG28 对 VSV 的病毒复制的影响。

序列的简要说明:

SEQ. ID. NO. 1 是人的蛋白 HuIFRG28-1 的氨基酸序列和它的编码 cDNA。

20 SEQ. ID. NO. 2 是 HuIFRG28-1 蛋白的单独的氨基酸序列。

发明的详细说明:

如上所示，人的蛋白 HuIFRG28-1 和它的功能性变异体现在被认为是对治疗有用的因子，更特别地是，作为抗病毒，抗肿瘤或免疫调节因子的用途。

作为这种用途的 HuIFRG28-1 蛋白的一种变异体可以是一种自然出现的变异体，既有等位基因变异体也有种变异体，它与 HuIFRG28-1 蛋白实质上有相同的功能活性，也被上调对 IFN- α 给药作出反应。可选地，治疗用的 HuIFRG28-1 蛋白的变异体可以包括一种不同于 SEQ. ID. NO. 2 的序列，但它是非自然突变体。

术语“功能性的变异体”是指有 HuIFRG28-1 蛋白相同的本质的特性或基本功能的多肽。HuIFRG28-1 蛋白的本质的特性可以被认为是作为一种免疫调节肽。一种功能性的变异体多肽可另外地或可选地显示出抗病毒活性和/或抗肿瘤活性。在一个优选的方面，一个变异体或片段证实了抗病毒活性。

10 期望的抗病毒活性可以，例如，通过如下测定。待测的编码变异体的序列被克隆到一个反转录病毒的载体，如衍生于莫洛尼鼠白血病病毒 (MoMuLV) 的一个反转录病毒载体，该病毒含有病毒包装信号 Ψ ，和一个抗药性标记。然后，用重组反转录病毒的载体和含有水泡性口炎病毒外壳糖蛋白的质粒，pVSV-G，共转染包含病毒 *gag* 和 *pol* 基因的泛嗜性包装细胞系，以产生高效

15 价的感染性的无复制能力的病毒 (Burns 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5232-5236)。然后，感染性的重组病毒被用于转染干扰素敏感成纤维细胞或成淋巴细胞，之后筛选稳定表达变异体蛋白的细胞系，用标准的干扰素生物检测法 (Tovey 等, Nature, 271, 622-625, 1978) 检测其对病毒感染的抗性。生长抑制可用标准的增殖检测

20 (Mosmann, T., J. Immunol. Methods, 65, 55-63, 1983) 测定，MHC I 类抗原和 II 类抗原的表达可通过标准技术进行检测。

期望的 HuIFRG28-1 功能性的变异体本质上由 SEQ. ID. NO. 2 序列组成。SEQ. ID. NO. 2 的功能性的变异体可以是一种多肽，它们至少与 20，优选至少 30，例如至少 100 个相邻氨基酸或 SEQ. ID. NO. 2 全长的一个区域，具有与

25 SEQ. ID. NO. 2 氨基酸序列至少 60-70%，优选至少 80%或 90%，特别优选至少

95%，97%或99%的同一性。检测蛋白质同一性的方法是本领域熟知的。

氨基酸可以发生置换，例如从1，2或3至10，20或30个置换。例如，根据下表，可以进行保守性置换。同一区域的第二列的，优选第三列的同一行的氨基酸可以互相置换。

脂肪族	非极性	G A P
		I L V
	极性不带电	C S T M
		N Q
	极性带电	D E
		K R
芳香族		H F W Y

5

根据本发明的用于治疗变异体多肽序列可以是较短的多肽序列，例如，提供了长度至少20个氨基酸或多至50，60，70，80，100，150或200个氨基酸的肽，被认为属于本发明的范畴，它保留了HuIFRG28-1蛋白的合适的生物学活性。特别是，但不是排他性地，本发明的这方面包括当变异体是一种完整的天然的自然出现的蛋白质序列的情况。

10

本发明也包括HuIFRG28-1蛋白的修饰形式和这种修饰形式的片段，它们可用于提高抗HuIFRG28-1蛋白抗体。这种变异体也包括HuIFRG28-1蛋白的抗原决定簇。

15

本发明的多肽可以是化学修饰的，如翻译后修饰的。例如，它们可以被糖基化和/或包括修饰的氨基酸残基。它们也可以在N-端和/或C-端的添加序列修饰，例如通过提供组氨酸残基或T7标记帮助其纯化或通过增加信号序列促进其插入细胞膜。这样修饰的多肽属于本发明的术语“多肽”的范畴。

20

本发明的多肽可以用一个可显示的标签标记。可显示标签可以是任何允许多肽被检测的合适的标记。合适的标记包括放射性同位素如¹²⁵I，³⁵S或酶，抗体，多聚核苷酸和连接物如生物素。本发明的标记多肽可在检测中应用。

在这样检测中，可以优选使多肽附着于固相载体（solid support）。本发明也涉及将这些标记和/或固定化多肽以试剂盒形式包装在容器中。试剂盒可选择地包含其它合适的试剂，标准品或用法说明等。

5 本发明的多肽可以被合成或通过重组方法制成。本发明的这种多肽可以被修饰成包含非自然存在的氨基酸，如D-氨基酸。本发明的变异体多肽可以有修饰，以增加其在体外和/或体内的稳定性。当多肽是通过合成方法生产时，这种修饰可在生产期间引入。多肽也可以在合成和重组产品以后被修饰。

大量的侧链修饰对于蛋白质修饰领域是已知的，并且也存在于本发明的多肽中。这种修饰包括，例如，通过与醛反应的还原烷基化，随后用 NaBH₄ 10 还原，用甲基乙酰乙酰基进行脘基化或用醋酸酐进行酰化作用的氨基酸修饰。

本发明的多肽实质上是分离的形式。应该理解，多肽可以与不干扰预期目的载体或稀释剂混合，而且仍被认为实质上是分离的。本发明的多肽也可以是实质上纯化形式，在这种情况下，它通常包括制剂中的多肽，在这种制剂中，重量超过90%，例如超过95%，98%或99%的多肽是本发明中的多肽。

15

多聚核苷酸:

本发明也包括编码 HuIFRG28-1 蛋白或它的变异体的分离的核苷酸序列，也包括与它们互补的分离的核苷酸序列。核苷酸序列可以是 DNA 或 RNA，单链或双链，包括基因组 DNA，合成 DNA 或 cDNA。优选核苷酸序列是一个 DNA 20 序列，最优选是一个 cDNA 序列。

如上所示，这样的多聚核苷酸通常地包括下列组成的序列：

- (a) SEQ. ID. NO. 1 的核酸序列或它的编码序列和/或它们的互补序列；
- (b) 一种序列，例如，在严紧的条件下，与互补于如 (a) 中定义的序列的一种序列杂交；
- 25 (c) 一种序列，作为遗传密码的结果简并为 (a) 或 (b) 中定义的序列；

(d) 一种与 (a), (b), 或 (c) 中定义的序列有至少 60% 同一性的序列。

包括适当编码序列的多聚核苷酸可以从人细胞中分离获得, 也可以根据本领域熟知的方法合成, 如在 Sambrook 等, (1989) 分子克隆: 实验手册, 第二版, 冷泉港出版社, 中描述的例子。

本发明的多聚核苷酸可以包括在合成的或修饰的核苷酸内。大量的多聚核苷酸的不同形式的修饰是本领域已知的。它们包括在分子的 3' 和 / 或 5' 末端的甲基磷酸盐化和硫代磷酸化 (phosphothioate) 骨架及吡啶或多聚赖氨酸链的添加。进行这样的修饰可以进行以提高本发明的多聚核苷酸的体内活性或寿命。

典型地, 本发明的多聚核苷酸包括一个核苷酸序列, 优选其为核苷酸的相邻序列, 它能够在选择条件下与 SEQ. ID. NO. 1 的编码序列或编码序列的互补序列杂交。这种杂交以显著高于背景的水平出现。背景杂交可能发生, 例如由于在 cDNA 文库中存在其它的 cDNA_s。本发明的多聚核苷酸与 SEQ. ID. NO. 1 编码序列或其编码序列的互补序列相互作用产生的信号水平的强度典型地将至少是其它多聚核苷酸与 SEQ. ID. NO. 1 编码序列相互作用强度的 10 倍, 优选至少 100 倍。相互作用强度可以被测量, 例如, 通过放射标记探针, 如用 ³²P。选择性杂交可以用典型的低严谨性条件 (0.3 M 氯化钠和 0.03 M 柠檬酸钠, 在大约 40°C), 中严谨性条件 (例如, 0.3 M 氯化钠和 0.03 M 柠檬酸钠, 在大约 50°C) 和高严谨性条件 (例如, 0.03 M 氯化钠和 0.003 M 柠檬酸钠, 在大约 60°C) 实现。

SEQ. ID. NO. 1 的编码序列可以通过核苷酸置换修饰, 例如从 1, 2 或 3 个至 10, 25, 50 或 100 的置换。简并置换和 / 或当修饰序列被翻译时, 如上表所示的例子, 可产生保守氨基酸置换的置换。SEQ. ID. NO. 1 的编码序列可选择地或另外地通过一种或多种插入和 / 或缺失和 / 或两个任一末端的延伸被

修饰。

能够选择性的与选自于 SEQ. ID. NO. 1 的一个 DNA 序列、它的编码序列和它的互补 DNA 序列杂交的本发明的多聚核苷酸，通常与目标序列有至少 70%，优选至少 80%或 90%和进一步优选至少 95%或 97%的同源性。典型情况下这种同源性可占有至少 20，优选至少 30，例如至少 40，60 或 100 或更多的相邻的核苷酸的一个区域。

由于优选更严紧的结合（如较高的同源性覆盖了较长的长度），上述提及的同源性和最小大小的程度的任何结合都可被用于定义本发明的多聚核苷酸。因此，例如至少 80%同源性的一种多聚核苷酸占有 25 个，优选至少 30 个核苷酸的形式可以发现是适合的，就如同可以是一个至少 90%同源性占有 40 个核苷酸的多聚核苷酸。

这里所指的多聚核苷酸或蛋白序列的同源性，可以根据熟知的同源性计算方法确定，如蛋白质同源性可以根据氨基酸同一性（有时称为“硬同源性”（hard homology））为基础来计算。例如 UWCCG 包提供了 BESTFIT 程序，它可用于计算同源性，例如用于它的默认的设置，（Devereux 等，（1984）Nucleic Acids Research 12, 387-395）。PILEUP 和 BLAST 算法可以用于计算同源性或排序或鉴定等效或相应序列，典型地用其默认设置，例如 Altschul S.F. 在（1993）J.Mol.Evol. 36, 290-300； Altschul S.F. 等（1990）J.Mol. Biol. 215, 403-10 中所描述的。

进行 BLAST 分析的软件可以公开地从 National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到。这种算法包括：首先，当在数据库序列中对比相同长度的序列时，在那些或是匹配或是满足估算的正的域值分 T 的查寻序列中，通过鉴定短片段的长度 W，鉴定出高分序列对（HSPs）。T 是指相邻分域值（Altschul 等，见上文）。这些最初邻近序列命中，

作为开始查寻的线索去发现包含它们的 HSPs。这些序列命中将向每个序列的两个方向尽可能远的延伸，直到积累对比分值增大，这种延伸，当遇到数量 X 获得最大值，积累排序分值回落时；由于一个或更多的负的分值残基对比积累，积累对比分值达到或低于零；两个序列的任一个到达终点时，在每个方向的序列命中延伸被停止。BLAST 算法的参数 W, T 和 X 决定了对比的敏感性和速度。BLAST 程序使用默认的序列长度值 (W) 为 11, BLOSUM62 分值矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919) 对比 (B) 值为 50, 期望值 (E) 为 10, M=5, N=4 和两条链的对比。

10 BLAST 算法实际上是使用统计分析的方法分析两个序列之间的相似性；参见例如 Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787。BLAST 算法提供的相似值是一个最小的和概率 (P(N))，这个值表示两条核苷酸序列或氨基酸序列偶然匹配的可能性。例如一个序列和另一个序列相比较，如果最小和概率 (smallest sum probability) 约小于 1, 优选小于约 0.1, 更优选小于约 0.01, 最优选小于约 0.001, 那么认为
15 这两个序列是相似的。

本发明的多聚核苷酸可以用在本发明的蛋白质的生产中，可以是在体外、体内或离体进行。在这种多聚核苷酸中，本发明的期望的蛋白的编码序列可以通过操作连接启动子序列，这种启动子序列能够引导在所选择的宿主细胞
20 中期望蛋白的表达。这样的一种多聚核苷酸通常是一种表达载体形式。本发明的多聚核苷酸，如以一种表达载体形式，引导本发明的多肽的体内表达，它具有免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性，可被用作治疗因子。

这种目的的表达载体可以用重组 DNA 技术领域的常规操作方法组建。它们将涉及，例如，质粒 DNA 的应用。它们可以被提供一个复制起点。这种载体
25 可包含一个或多个选择的标记基因，如在细菌质粒中的氨苄青霉素抗性基因。

本发明的载体的其他特性可以包括合适的起始因子、增强子和其它元件，例如期望的，且在正确的方向定位的多聚腺苷酸化信号，以便于进行蛋白质表达。其它的适合的非质粒载体对于本领域的熟练的技术人员是显而易见的。Sambrook 等，1989（见上文）在这方面又给出了进一步的例子。此外这种载体包括，例如，病毒载体。适合的病毒载体的例子包括单纯疱疹病毒载体，复制缺陷反转录病毒，包括慢病毒、腺病毒、腺相关病毒，HPV 病毒（如 HPV-16 和 HPV-18）和减毒流感病毒载体。

启动子和其它表达调控信号被选择与设计表达的宿主细胞共存。例如，酵母启动子包括 *S. cerevisiae* GAL4 和 ADH 启动子，*S. pombe nmt1* 和 *adh* 启动子。哺乳动物启动子包括金属硫蛋白启动子，它可以诱导对重金属如镉的应答，和 β -肌动蛋白启动子。病毒启动子如 SV40 大 T 抗原启动子或腺病毒启动子也可以使用。其它可使用的病毒启动子的例子包括莫洛尼鼠白血病毒长末端重复序列（MMLV LTR），劳斯肉瘤病毒（RSV）LTR 启动子，人巨细胞病毒（CMV）IE 启动子，和 HPV 启动子，特别是 HPV 上游调控区（URR）。其它合适的启动子对于重组 DNA 领域的熟练的技术人员是公知的。

本发明的一个表达载体可以进一步包括在本发明的期望的多肽的编码序列的侧翼序列，这个侧翼序列提供了与真核细胞基因序列同源性，优选哺乳动物基因组序列，或病毒基因组序列。这样将容许通过同源重组将本发明的这种多聚核苷酸引入真核细胞或病毒基因组。特别是，包含病毒序列侧翼的表达盒子的质粒载体可被用于制备适合于将本发明的多聚核苷酸递送给哺乳动物细胞的病毒载体。

本发明也包括体外细胞，例如，原核或真核细胞，它们已经被修饰用于表达 HuIFRG28-1 蛋白或它的变体。这些细胞包括稳定的细胞系，如真核的细胞系，其中编码 HuIFRG28-1 蛋白或它的变异体的多聚核苷酸与宿主基因组结合在一起。本发明的宿主细胞可以是哺乳动物细胞或昆虫细胞，低等真核细

胞，如酵母或原核细胞，如细菌细胞。特别是可以通过插入编码本发明多肽的载体而修饰的细胞，其例子包括哺乳动物 HEK293T, CHO, HeLa 和 COS 细胞。更优选的细胞系为不仅稳定，而且允许多肽的成熟糖基化。例如，在转化的卵母细胞中实现的表达。

- 5 本发明的多肽可以在转基因非人动物细胞中表达，优选鼠。能够表达本发明的多肽的转基因非人动物包含在本发明的范围中。

本发明的多聚核苷酸也可以象上述描述的那样通过反义定向插入载体，以便提供反义序列的制备，反义 RNA 或其它的反义聚核苷酸也可通过合成方法制备。

- 10 一个多聚核苷酸，例如以表达载体的形式，能够在体内表达被 SEQ. ID. No. 2 定义的氨基酸序列的编码序列的反义序列，或它们的自然出现的变体，其用于人或非人动物医疗治疗，也被设想为构成本发明的另外的方面。可发现这种多聚核苷酸用于治疗与 HuIRG28-1 蛋白上调有关的疾病。

- 15 本发明的多聚核苷酸延伸到以本发明的一种多肽的 cDNA 内的序列为靶的核酸扩增的引物组，如用于 PCR 扩增的引物对。本发明也提供了适合于以本发明的一种多肽的一个 cDNA 或 RNA 内的一个序列为靶的探针，这种探针可以用一个可显示标签标记，如放射性标记，或非放射性标记如酶或生物素。这种探针可被结合于固相载体上。这种固相载体可以是一种微量检测装置（通常也指核酸，探针或 DNA 芯片），携带另外的核酸的探针，如 mRNA 或它们的
20 扩增产物，它们是相对应于其它 I 型干扰素上调的基因，如被鉴定为对口腔粘膜或静脉内 IFN- α 给药有上调应答的这样的基因。构建这种微量检测的方法是已知的（参见，如 EP-B 0476014 和 0619321 Affymax Technologies N. V. 和 Nature Genetics Supplement January 1999 entitled α The Chipping Forecast）。

- 25 这样的引物或探针的核酸序列优选是至少 10、15 或 20，例如至少 25、

30 或 40 个核苷酸长度。它也可以长至 40、50、60、70、100 或 150 个核苷酸长度或更长。

本发明另外的方面是其探针或引物用于鉴定 HuIFRG28-1 基因的突变，例如单核苷酸多态性 (SNPs)。

- 5 如上所示，仍旧是本发明的另一个方面提供了一种鉴定具有免疫调节活性和/或抗病毒活性和/或抗肿瘤活性化合物的方法，包括提供了能够表达 HuIFRG28-1 蛋白或其自然出现的变异体的细胞，在试验条件下将所说的细胞与化合物温育，而且监测 HuIFR28-1 基因表达上调作用。这种监测可以通过探测编码 HuIFR28-1 蛋白或它的自然出现变异体的 mRNA 进行的。可选地，
- 10 可使用能够特异性地结合一种或多种 HuIFR28-1 和它的自然出现的变异体的抗体或抗体片段。

抗体

- 根据另外一方面，本发明也涉及抗体（例如多克隆或优选单克隆抗体，嵌
- 15 合抗体，人源化抗体和保留结合抗体能力的片段），该抗体使用常规技术获得并且对本发明的多肽具有专一性。例如，这种抗体在涉及免疫沉淀的纯化、分离或筛查方法中是有用的，并且可作为工具用于进一步阐明 HuIFR28-1 蛋白或它的变异体的功能。它们本身也可以作为治疗因子。这种抗体可被增加
- 20 抗本发明的蛋白的特异性的抗原决定簇。特异性地结合蛋白的这种抗体可与其特异性的蛋白高亲和力结合而不能与其它蛋白结合或只能以低亲和力结合。用于测定抗体特异性结合能力的各种竞争结合或放射免疫测定法是已知的。

药物组合物

- 25 本发明的多肽典型地与药用可接受的载体或稀释剂组成给药使用。例如，

药用载体或稀释剂可以是等渗溶液。例如，固体口服形式连同活性化合物可包括，稀释剂，如乳糖，葡萄糖，蔗糖，纤维素，玉米淀粉或土豆淀粉；润滑剂，如硅土，滑石粉，硬脂酸，硬脂酸镁或硬脂酸钙，和/或聚乙烯乙二醇；结合剂，如淀粉类，阿拉伯胶，明胶，甲基纤维素，羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮；隔离剂（desegregating），如淀粉，藻酸，藻酸盐或甘醇酸酯钠淀粉；发泡混合物；染料；甜味剂；吸湿剂，如卵磷脂，多聚吸着物，十二烷基磺酸盐；和通常用在药物组合物中的无毒无药理活性物质。这些药物制剂可通过已知的方法生产，例如，通过混合，制粒，制片，包糖衣，或包膜工艺。

10 口服用药的液体分散体系可以是糖浆（剂），乳剂和悬浮液。糖浆可包括载体，如蔗糖或蔗糖与甘油和/或甘露醇和/或山梨糖醇。

悬浮液和乳剂可包括载体，如天然胶，琼脂，藻酸钠，果胶，甲基纤维素，羧甲基纤维素，或聚乙烯乙醇。悬浮液或肌肉注射液连同活性化合物可包括，药用可接受的载体，如灭菌水，橄榄油，乙基油酸盐，乙二醇，如丙二醇，以及如果愿意可包含一定量的利多卡因盐酸盐。

静脉用药或输注的溶液可包括载体，如灭菌水或优选灭菌的，水的，等渗盐溶液形式。

HuIFR28-1 蛋白或其功能类似物在本发明中使用的合适剂量可通过不同的参数，特别是依据所用的物质；接受治疗的患者的年龄，体重和身体状况；用药途径；和所需的治疗方案确定。再者，医师能够确定任何特殊患者所需要的用药途径和用药剂量。依据特异性抑制剂的活性，接受治疗患者的年龄，体重和身体状况以及用药频率和途径，一个典型的每日剂量可以从约 0.1 mg/kg 体重至 50mg/kg 体重，优选从约 0.1mg/kg 体重至 10mg/kg 体重。优选日剂量水平为 5mg - 2g。

25 适合于治疗用途的本发明的多聚核苷酸也可以典型地与药用可接受的载

体或稀释剂组和给药。这种多聚核苷酸可以通过任何已知技术给药，通过这些技术可以在体内得到期望的多肽的表达。例如，多聚核苷酸可以通过注射引入，优选皮内、皮下或肌肉注射。可选地，可以通过颗粒介导递送装置将核酸直接递送到皮肤。适合于治疗用途的核酸的本发明的多聚核苷酸，例如，
5 通过鼻内或口服用药可以选择地给药到口腔粘膜表面。

适用于治疗用途的本发明的非病毒载体可被包装到脂质体或包装到包含载体递送颗粒的表面活性剂。几种已知的转染技术可以提高本发明的核酸构建物的摄入，例如，包括转染因子的应用。这些应用的例子包括阳离子剂，磷酸钙和 DEAE 葡聚糖和脂转染试剂 (Lipofectants)，例如，脂转染胺试剂
10 (Lipofectam) 和转染胺试剂 (Transfectam)。核酸的给药剂量可以是不同的。典型地，对于颗粒介导基因递送的核酸，核酸给药剂量范围可以从 1pg - 1mg，优选 1pg - 10 μg，而对于其他途径则是从 10 μg - 1mg。

本发明的多肽和多聚核苷酸可以用于病毒感染，肿瘤的治疗或作为免疫调节因子，以及治疗 I 型干扰素可治疗性疾病的治疗中。优选将多肽和多聚核苷酸用于治疗病毒感染，如 DNA 或 RNA 病毒，优选 RNA 病毒。
15

本发明的多聚核苷酸和多肽对下列疾病的治疗是有用的例子：自身免疫的，分支杆菌的，神经变性的和寄生性的疾病，关节炎，糖尿病，狼疮多发性硬化症，麻风，结核，脑炎，疟疾，宫颈癌，生殖器疱疹，B 型和 C 型肝炎，HIV，HPV 和 HSV-1，HSV-2，或肿瘤性疾病如多发性骨髓瘤，毛细胞白血病，慢性骨髓性白血病，低分化淋巴瘤，皮肤 T 细胞淋巴瘤，类癌肿瘤，宫颈
20 癌，肉瘤包括卡波西肉瘤，肾肿瘤，癌包括肾细胞癌，肝细胞癌，鼻咽癌，血液学恶性肿瘤，结肠直肠癌，成胶质母细胞瘤，喉乳头癌，肺癌，结肠癌，恶性的黑色素瘤和脑肿瘤。

25 I 型干扰素应答的的预测

如上所示,本发明进一步提供了预测患者对用 I 型干扰素治疗,如 IFN- α , 如经口腔粘膜或静脉途径的 IFN- α 治疗的患者的应答的方法,包括测量 HuIRG28-1 蛋白或它的自然出现的变体,或相应的 mRNA 在所述的患者细胞样品中的水平,这里所述的样品来自于一个 I 型干扰素给药后或在测量前在
5 体外使用过 I 型干扰素治疗的所述的患者。

优选地,检测应答的 I 型干扰素是被选择用于治疗的 I 型干扰素。通过建议的治疗途径在推荐的剂量下用药。优选地,随后的分析的样品可以是,例如,血液样品或从血液样品分离的外周血单核细胞(PBMCs)的样品。

更方便和优选地,是将包含血液中分离出的 PBMCs 的患者样品在体外用 I
10 型干扰素处理,如,使用剂量范围在约 1-10,000IU/ml。这种处理可以是几个小时,如 7-8 个小时。这种体外检测的优选处理条件可以通过检测来自于接受同样干扰素的正常供体的 PBMCs 来确定,并且寻找合适表达产物的上调作用。再者,所用的 I 型干扰素优选是推荐用于患者治疗的 I 型干扰素,如重组 IFN- α 。这种检测所用的 PBMCs 是使用聚葡萄糖-泛影葡胺密度梯度离心
15 从血液样品中按常规方法分离出来的。下述实施例 3 给出了一种这种体外检测 I 型干扰素应答的合适方案的例子。

在用 I 型干扰素体外适当处理后,样品可用于分析 HuIFRG28-1 蛋白或其
自然出现的变异体的水平。这种分析可以通过抗体或能特异性结合一种或多
种 HuIFRG28-1 蛋白和它的自然出现的变异体的抗体来完成,如它的等位基因
20 变体,然而,优选地,是将样品用于分析编码 HuIFRG28-1 蛋白或其自然出
现的变异体的 mRNA。这种 mRNA 分析可以使用任何已知的 mRNA 检测技术,如
Northern blot 或 mRNA 差示显示分析。在检测前,各种已知的核酸扩增方案
可以用来扩增存在于样品中的目标 mRNA 或它的一部分。用附着于固相载体上
的核酸探针可查明目标 mRNA 或相应的扩增核酸。这种固相载体可以是前面讨
25 论过的微量检测装置,它装有探针用于检测对应于 I 型干扰素上调基因的更

多的 mRNA 或其扩增产物的水平，例如，被鉴定对口腔粘膜或静脉内 IFN- α 给药有上调应答的这样的基因。

下面的实施例阐明了本发明：

5 实施例

实施例 1

先前的实验已经表明，用 P20 Eppendorf 微离心管向正常成年鼠的每个鼻孔给予 5 μ l 结晶紫，可立即导致几乎口咽腔整个表面的染料分布。口咽腔的染色在给予染料后约 30 分钟仍是明显的。这种结果通过用同样的方法给予 125 I 标记的重组人 IFN- α 1-8 得到了证实。在下面描述的研究中使用同样的给药方法实现口腔粘膜用药。

用购自于 Life Technologies Inc. 的用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释的重组鼠 α -干扰素 (IFN α) 100, 000IU，购自于 Protein Institute Inc. 的 10 μ g 重组人白介素 15 (IL-15)，含 100 μ g/ml 牛血清蛋白 (BSA) 的 PBS 处理 6 周龄雄性 DBA/2 鼠，还有一组不处理。8 小时后，用颈椎脱位处死小鼠，通过手术从口咽腔取出淋巴样组织，在液氮中短暂冷冻并贮存在 -80 $^{\circ}$ C 条件下。通过 Chomczynski 和 Sacchi 1987 的方法 (Anal. Biochem. 162, 156-159) 从淋巴样组织中提取 RNA，并用于 mRNA 差异显示分析 (Lang, P. and Pardee, 20 A. B., Science, 257, 967-971)。

差异显示分析

差异显示分析使用 GenHunter Corporation 的信息清除 (Message Clean) 和 RNA 图像 (RNA image) 试剂盒，按照生产商的说明完成。简要过程为，用 25 无 DNA 酶的 RNA 酶处理 RNA，将 1 μ g 在 100 μ l 的反应缓冲溶液用三个一

碱基的锚定寡核苷酸-(dT)引物 A, C, 或 G 的一种或其它种进行反转录, 也可以将 RNA 用九个两个碱基的锚定寡核苷酸-(dT)引物 AA, CC, GG, AC, CA, GA, AG, CG, GC 的一种或其它种进行反转录。所有被比较的样品用同样的实验进行反转录, 等分后冻存。用 1 μg 反转录样品在 10 μl 含 *Taq* DNA 聚合酶和 α -³³PdATP (3, 000Ci/mmol) 的扩增混合物中进行扩增。80 个 5' 末端 (HAP) 随机序列引物和每个 (HT11) A, C, G, AA, CC, GG, AC, CA, GA, AG, CG 或 GC 引物结合使用。然后将样品在 7% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上走电泳, 并放射自显影。切出推定的差异表达片段, 按照供应商的说明再次扩增, 然后用作探针与从 IFN 处理, IL-15 处理和赋型剂处理的动物口咽腔提取的 RNA 进行 Northern blot 杂交。

克隆和测序

差示显示筛选的再次扩增片段克隆到 pPCR-Script SK(+) 质粒 (Stratagene) 的 *Sfr* 1 位点, 通过在 pCR3 质粒 (Invitrogen) 中的 TA 克隆通过快速扩增 cDNA 末端扩增得到 cDNAs。用自动双脱氧测序仪 (Perkin Elmer ABI PRISM 377) 进行测序。

人的 cDNA 的分离

将从差示显示筛选中鉴定出的差示表达鼠 3' 序列与 United States National Center For Biotechnology Information (NCBI) 的 GenBank™ 的 dbEST 数据库中的随机人的表达序列标签进行比较。将差示显示筛选分离的与鼠 EST 相关的潜在的序列在一个毗连群中结合, 用于构建相应于推定的 cDNA 的人共有序列。发现一个长度为 1014 个核苷酸的这种 cDNA。它对应于一个鼠基因, 小鼠在口腔黏膜给药 IFN- α 后, 口腔淋巴样组织中这种基因的表达提高约三倍。

为了确定这种相应于一个已知人基因的推定的 cDNA, 用衍生于共有序列的 5' 和 3' 末端的引物从 mRNA 合成 cDNA, 该 mRNA 是通过特异性的反转录和 PCR 扩增从人外周血白细胞 (PBL) 中提取的。获得了一个预测大小的独特的 cDNA 片断, 克隆和测序 (SEQ. ID. No. 1)。这种人 cDNA 在 55-795 位包含一个长 741bp 的开放阅读框 (ORF), 编码一个 246 个氨基酸的蛋白 (SEQ. ID. No. 2)。

实施例 2 —— IFN- α 的静脉给药

将雄性 DAB/2 小鼠静脉注射 100, 000IU 的用 PBS 200 μ l 稀释的购自于 Life Technologies Inc. 的重组鼠 IFN- α , 或者用等体积的 PBS 单独处理。8 小时后, 用颈椎脱位处死动物, 并用常规程序取出脾脏。用 Chomczynski 和 Sacchi 的方法 (Anal. Biochem. (1987), 162, 156-159) 提取总 RNA, 并将每个样品的 10.0 μ g 总 RNA 在乙二醛存在下进行 Northern blotting, 按照 Dandoy-Dron 等描述的方法 (J. Biol. Chem. (1998) 273, 7691-7697) 与 HuIFRG28-1 mRNA 的 cDNA 探针杂交。先将印迹放射自显影, 然后按照生产商的说明用 PhosphorImager 定量。从 IFN- α 处理的动物肾脏中提取的 RNA 样品中检测到比单独使用赋形剂处理的动物的 HuIFRG28-1 蛋白的 mRNA 增加的水平 (大约 5-10 倍)。

实施例 3 —— 体外检测 I 型干扰素应答

用聚葡萄糖-泛影葡胺密度梯度离心法分离正常供体的人外周血单核细胞 (PBMCs), 在体外用 10, 000IU 经 PBS 稀释的重组人 IFN- α 2 (来自于 Schering-Plough 的内含子 A) 处理, 或单独用等体积的 PBS 处理。8 小时后, 将细胞离心 (800 x g, 10 分钟), 收集细胞沉淀。通过 Chomczynski 和 Sacchi 的方法从细胞沉淀中提取总 RNA, 将每份样品的 10.0 μ g 总 RNA 在乙二醛存

在下进行 Northern blotting, 并按照前面实施例 2 描述的方法与 HuIFRG28-1 mRNA 的 cDNA 探针杂交。从 IFN- α 处理的 PBMCs 中提取的 RNA 样品中检测到了比单独用 PBS 处理的样品的 HuIFRG28-1 蛋白的 mRNA 增加的水平 (大约 10 倍)。

- 5 用取自于建议用 I 型干扰素治疗的患者的 PBMCs, 按照同样的程序可预测 I 型干扰素应答。

实施例 4——HuIFRG28-1 抗病毒活性的检测

10 将 HuIFRG28-1 cDNA 或编码 HuIFRG28-1-GFP 融合蛋白的 cDNA 亚克隆到质粒 pRev-TRE 中, 然后按照生产商的说明被用于转染两层包裹的壳体化 (Amphopack encapsidation) 系 (Clonetech)。然后收集含反转录病毒载体的细胞上清液, 而且并按照生产商的说明在靶细胞 (Clonetech) 上连续感染 Hela Tet/On 或 WISH Tet。用衍生于两层包裹 (Amphopack) 细胞系的病毒持续连续地感染靶细胞两或三天之后, 将靶细胞用潮霉素处理, 并通过有限稀
15 释分离抗性克隆。

在细胞克隆中检测天然的 HuIFRG28-1 蛋白或 HuIFRG28-1-GFP 融合蛋白表
20 达对三种不同 RNA 病毒复制的影响, 这种细胞是用编码天然的 HuIFRG28-1 蛋白或 HuIFRG28-1-GFP 融合蛋白的基因在强力霉素存在和无强力霉素存在的情况下转染过的。检测的 RNA 病毒是: 脑心肌炎病毒 (EMCV), 一种小 RNA 病毒; 辛德毕斯病毒, 原型甲病毒和水泡性口炎病毒 (VSV), 一种弹状病毒。

简要地讲, 用特定病毒在 1.0 感染复数下感染在 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 强力霉素存在
25 或无强力霉素存在下处理 24 小时的细胞。1 小时后, 去除病毒接种物, 冲洗细胞 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下在生长培养基中温育 24 小时。然后将细胞在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下冻融 6 次, 离心除去细胞残余物, 通过检测细胞病变对猴 CV1 Vero 细胞的影响, 检测上清液中的病毒, 每个 10 倍稀释的样品作 8 次分离的检测, 取平均

值，稀释范围从 10^3 - 10^{10} 。

发现不论是在总细胞群（图 1），还是在单个的克隆（图 2）中，天然的 HuIFRG28-1 蛋白或 HuIFRG28-1-GFP 融合蛋白的表达都产生显著的对 EMCV, VSV, 和辛德毕斯病毒的抗病毒活性。


```

atggtagtca atgaactggc tgccacttta atataactga aaattcattt tgagaccaag      892
5  caggatcaag tttgtagaat aaacactggt ttcctagcta tcctctgaaa acagtatgaa      952
   acatgaccaa gtacataatg gatttagtaa taaatattgt cgaattgcta aaaaaaaaaa      1012
10 aa                                                                                   1014

<210> 2
<211> 246
<212> PRT
15 <213> 人类

<400> 2
20

Met Val Val Asp Phe Trp Thr Trp Glu Gln Thr Phe Gln Glu Leu Ile
1          5          10          15

25 Gln Glu Ala Lys Pro Arg Ala Thr Trp Thr Leu Lys Leu Asp Gly Asn
   20          25          30

30 Leu Gln Leu Asp Cys Leu Ala Gln Gly Trp Lys Gln Tyr Gln Gln Arg
   35          40          45

35 Ala Phe Gly Trp Phe Arg Cys Ser Ser Cys Gln Arg Ser Trp Ala Ser
   50          55          60

40 Ala Lys Leu Gln Ile Leu Cys His Thr Tyr Trp Glu His Trp Thr Ser
   65          70          75          80

   Gln Gly Gln Val Arg Met Arg Leu Phe Gly Gln Arg Cys Gln Lys Cys
   85          90          95

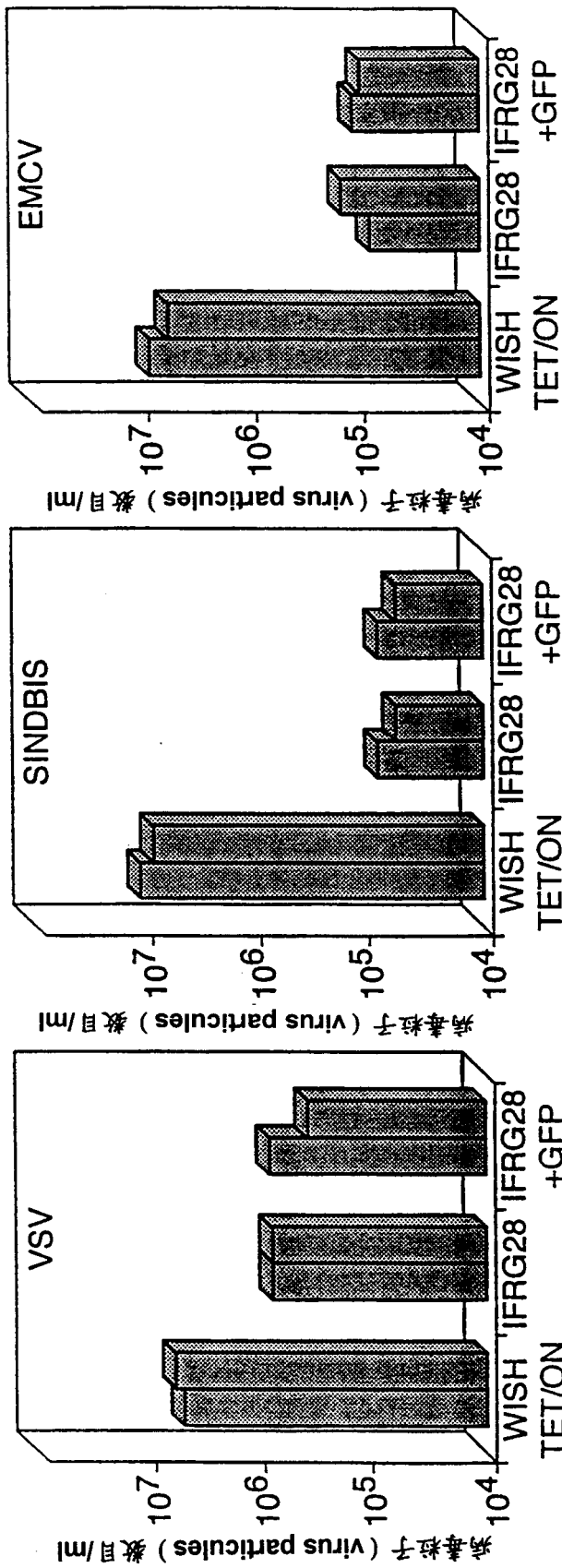
45 Ser Trp Ser Gln Tyr Glu Met Pro Glu Phe Ser Ser Asp Ser Thr Met
   100         105         110

   Arg Ile Leu Ser Asn Leu Val Gln His Ile Leu Lys Lys Tyr Tyr Gly
   115         120         125

50 Asn Gly Met Arg Lys Ser Pro Glu Met Pro Val Ile Leu Glu Val Ser
   130         135         140

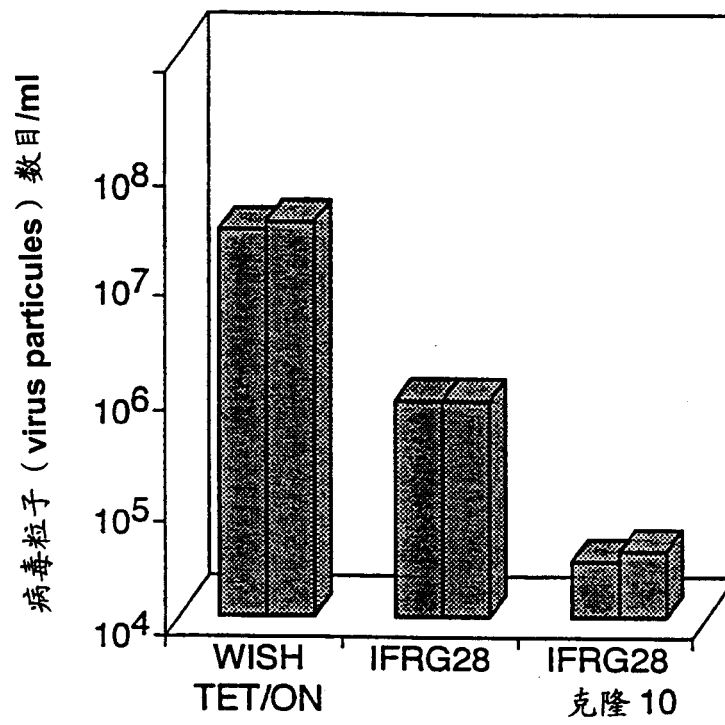
   Leu Glu Gly Ser His Asp Thr Ala Asn Cys Glu Ala Cys Thr Leu Gly
   145         150         155         160

```

IFRG28 对病毒复制的影响

图 1



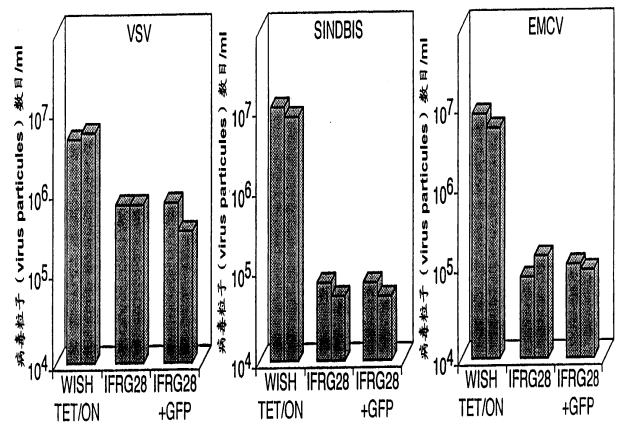
IFRG28 对 VSV 复制的影响

图 2

专利名称(译)	α - 干扰素诱导的基因		
公开(公告)号	CN1423657A	公开(公告)日	2003-06-11
申请号	CN00818429.1	申请日	2000-12-13
[标]发明人	米歇尔·德朗 迈克尔·杰拉德·托维		
发明人	让-弗朗西斯·麦里泰特 米歇尔·德朗 迈克尔·杰拉德·托维		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P3/10 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/28 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12Q1/68 C12N15/63 C12N15/11 G01N33/53 A61K38/17		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 C07K14/4718 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/28		
代理人(译)	黄健		
优先权	1999029453 1999-12-13 GB 2000003274 2000-02-11 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及被干扰素 - α 给药上调的相应于 SEQ.ID.No.1 中阐明的 cDNA 序列的基因的鉴定,这种基因的表达产物的检测,被认为在预测对干扰素 - α 和其它干扰素处理的应答时有用,这些干扰素作用于 I 型干扰素受体。也设想了对同样基因编码的蛋白在治疗中的用途。



IFRG28 对病毒复制的影响