

PCT

世界知识产权组织
国际局



按照专利合作条约(PCT)所公布的国际申请

<p>(51) 国际专利分类号⁶: C12N 15/12, C07K 14/495, C12N 15/64, 1/13, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国际公布号: WO00/17350 (43) 国际公布日: 2000年3月30日(30.03.2000)</p>
<p>(21) 国际申请号: PCT/CN99/00138 (22) 国际申请日: 1999年9月6日(06.09.1999) (30) 优先权: 98119759.0 1998年9月22日(22.09.1998) CN (71)(72) 发明人/申请人: 余龙(YU, Long) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码:200433, Shanghai (CN)。 (72) 发明人;及 (75) 发明人/申请人(仅对美国): 张宏来(ZHANG, Honglai) [CN/CN]; 傅强(FU, Qiang) [CN/CN]; 戴方彦(DAI, Fangyan) [CN/CN]; 赵寿元(ZHAO, Shouyuan) [CN/CN]; 中国上海市邯郸路220号复旦大学遗传学研究所, 邮政编码:200433, Shanghai (CN)。 (74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, 邮政编码:200233, Shanghai (CN)。</p>	<p>(81) 指定国: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) 本国际公布: 包括国际检索报告。</p>	
<p>(54) Title: NEW HUMAN GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR ENCODING SEQUENCE AND POLYPEPTIDE ENCODED BY SUCH DNA SEQUENCE AND PRODUCING METHOD THEREOF</p>		
<p>(54) 发明名称: 新的人生长分化因子编码序列、其编码的多肽及制备方法</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>The invention provides a cDNA sequence of a new human growth differentiation factor (hGDF3-2). The protein encoded by such sequence is a splice variant of hGDF3. The present invention also relates to peptides encoded by the nucleotide sequences, to uses of these polynucleotides and polypeptides, and methods for producing the said polynucleotides and polypeptides.</p>		

(57) 摘要

本发明提供了一种新的人生长分化因子(hGDF3-2)的 cDNA 序列, 其编码蛋白是 hGDF3 的变异剪切体。本发明还涉及由该核苷酸序列编码的多肽, 这些多核苷酸和多肽的应用, 以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。

以下内容仅供参考

在按照PCT所公布的国际申请小册子首页上所采用的PCT成员国国家代码如下:

AE 阿拉伯联合酋长国	DK 丹麦	KP 朝鲜民主主义人民共和国	RO 罗马尼亚
AG 安提瓜和巴布亚	DM 多米尼加	KR 韩国	RU 俄罗斯联邦
AL 阿尔巴尼亚	DZ 阿尔及利亚	KZ 哈萨克斯坦	SD 苏丹
AM 亚美尼亚	EE 爱沙尼亚	LC 圣卢西亚	SE 瑞典
AT 奥地利	ES 西班牙	LI 列支敦士登	SG 新加坡
AU 澳大利亚	FI 芬兰	LK 斯里兰卡	SI 斯洛文尼亚
AZ 阿塞拜疆	FR 法国	LR 利比里亚	SK 斯洛伐克
BA 波斯尼亚-黑塞哥维那	GA 加蓬	LS 莱索托	SL 塞拉利昂
BB 巴巴多斯	GB 英国	LT 立陶宛	SN 塞内加尔
BE 比利时	GD 格拉纳达	LU 卢森堡	SZ 斯威士兰
BF 布基纳法索	GE 格鲁吉亚	LV 拉托维亚	TD 乍得
BG 保加利亚	GH 加纳	MA 摩洛哥	TG 多哥
BJ 贝宁	GM 冈比亚	MC 摩纳哥	TJ 塔吉克斯坦
BR 巴西	GN 几内亚	MD 摩尔多瓦共和国	TM 土库曼斯坦
BY 白俄罗斯	GR 希腊	MG 马达加斯加	TR 土耳其
CA 加拿大	GW 几内亚比绍	MK 前南斯拉夫马其顿共和国	TT 特立尼达和多巴哥
CF 中非共和国	HR 克罗地亚	ML 马里	TZ 坦桑尼亚
CG 刚果	HU 匈牙利	MN 蒙古	UA 乌克兰
CH 瑞士	ID 印度尼西亚	MR 毛里塔尼亚	UG 乌干达
CI 科特迪瓦	IE 爱尔兰	MW 马拉维	US 美国
CM 喀麦隆	IL 以色列	MX 墨西哥	UZ 乌兹别克斯坦
CN 中国	IN 印度	NE 尼日尔	VN 越南
CR 哥斯达黎加	IS 冰岛	NL 荷兰	YU 南斯拉夫
CU 古巴	IT 意大利	NO 挪威	ZA 南非
CY 塞浦路斯	JP 日本	NZ 新西兰	ZW 津巴布韦
CZ 捷克共和国	KE 肯尼亚	PL 波兰	
DE 德国	KG 吉尔吉斯斯坦	PT 葡萄牙	

新的人生长分化因子编码序列、其编码的多肽及制备方法

发明领域

本发明涉及基因工程领域，具体地，本发明涉及一种新的人基因核苷酸序列。更具体地说，本发明涉及一种新的人生长分化因子(hGDF3-2)的cDNA序列，该蛋白是hGDF3的变异剪切体。本发明还涉及由该核苷酸序列编码的多肽，这些多核苷酸和多肽的应用，以及所述多核苷酸和所述多肽的生产方法。

背景技术

转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)是约15年前采用生物化学方法发现的具有多种生物调节活性的蛋白质。其后不久，人们发现TGF- β 代表了一类具有广泛功能的生长因子。在不同生物中，这些因子在包括细胞生长、分化以及组织形态发生等方面都发挥着重要的调节作用(Handbook of Experimental Pharmacology, 1990, Vol.95, pp419-475, Springer Verlag, Geidelberg)。TGF- β 与这些相关蛋白质构成了一个超家族，该家族被命名为TGF- β 超家族。迄今为止，TGF- β 超家族已经包括了超过30个不同的成员。在TGF- β 超家族内又大致可以分成四个主要的家族(Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 214(1), 27-40)，它们是：(1)穆勒氏抑制物MIS家族(Mullerian inhibitory substance family)——MIS蛋白能调节雄性胚胎中副肾管的退化；(2)抑制素/活化素家族(inhibin/activin family)——抑制素能抑制脑垂体细胞释放促卵泡激素，活化素则能刺激促卵泡激素的释放；(3)Vg-相关家族——包括骨形态发生蛋白BMP、dorsalin-1(该蛋白调节神经管的分化)、生长分化因子GDF-1、DPP、非洲爪蛙的Vg1和其在小鼠中的同系物Vgr-1等；(4)TGF- β 家族——包括TGF- β 的五种异构体(TGF- β 1-5)。

TGF- β 作为该超家族中的代表者，对其的研究开展得十分广泛和深入。对其功能的研究表明，TGF- β 受伤组织修复的有力的内源中介体，它通过在受伤组织中对趋化性、血管生成和胞外基质(ECM)沉积的刺激作用而发挥作用(Clin Immunol Immunopathol, 1997, 83(1), 25-30)。TGF- β 还对多种细胞的生长和分化有调节作用(Bioessays, 1997, 19(7), 581-591)，这种调节即可以是正调节，也可以是负调节。现有的大多数证据显示TGF- β 是在细胞周期的G1期发挥其调控作用的。除此之外，还有报导称TGF- β 可以诱导某些敏感细胞的死亡，这些细胞包括肝癌细胞、髓系和骨系细胞等。体外实验还发现，TGF- β 对多种细胞株的分化有调控作用，虽然对其作用机理还不清楚。TGF- β 对细胞生长分化的调控作用很自然使人联想到它在化疗中的防护作用

以及在肿瘤治疗中可能的应用, 有关这些方面的报导已有相当数量(Clin Immunol Immunopathol, 1997,83(1),25-30; Bioessays,1997,19(7),581-591)。

在多种物种中(如非洲爪蛙、鸡、鼠、猪、牛等)中都已发现了TGF- β 家族成员。人的TGF- β (-1, -2, -3)都是在80年代后期被克隆的。其中, TGF- β 1是由Derynck R 等于1985年完成测序(Nature, 1985, 316(6030), 701-705), 通过对TGF- β 1的编码序列的分析, 他们发现具有功能的TGF- β 其实是由一个比成熟蛋白长得多的前体经剪切加工而成。这一特性后来被发现是TGF- β 超家族的一个共性。TGF- β 2和TGF- β 3的核酸序列则是Madisen L等和ten Dijke P等人于1988年测得(Proc Natl Acad Sci U S A, 1988, 85(13), 4715-4719; DNA, 1988, 7(1), 1-8)。通过同源比较发现, TGF- β 2和TGF- β 3与TGF- β 1的氨基酸的同源性达到了70%-80%。

90年代以来, 随着基因克隆和测序技术的不断发展完善, 越来越多TGF- β 超家族成员被克隆。1993年, Alexandra,C等发表论文称发现了一个新的TGF- β 超家族成员——小鼠生长分化因子 3, GDF- 3(growth/differentiation factor 3) (J.Biol. Chem., 1993,268(5),3444-3449)。与TGF- β 超家族中的其它成员相比, 该蛋白与它们的同源性都不是很高, 然而它具有TGF- β 超家族的特有的保守序列。特别的是, 它缺少该超家族七个保守半胱氨酸中的第四个, 这可能暗示它具有某种特殊的性质。

GDF-3在人中的同系物于1998年被克隆(Oncogene,1998,16,95-103)。该蛋白与小鼠GDF-3显示了极高的同源性, 因而被命名为hGDF3。然而, 值得注意的是, hGDF3的长度较GDF-3短许多。这主要是由于它的氨基端比GDF-3少了近50个残基, 并且在对应于小鼠GDF-3的128位和248位处少了两个残基。这一变化据猜测可能是由于hGDF3基因存在可变剪切, 或是该基因在进化上发生了变化。

但在本发明之前, 还没有人分离出或公开过其它形式的人生长分化因子3。

发明概述

本发明的一个目的是提供一种新的多核苷酸序列, 该多核苷酸序列编码人生长分化因子hGDF3的一个变异剪切蛋白, 本发明的hGDF3基因的变异剪切体被命名为hGDF3-2。

本发明的另一个目的是提供一种新的蛋白, 该蛋白被命名为hGDF3-2。

本发明的再一个目的是提供一种利用重组技术生产所述的新的人hGDF3-2蛋白的方法。

本发明还提供了这种人hGDF3-2核酸序列和蛋白的应用。

在本发明的一个方面，提供了一种分离出的DNA分子，它包括：编码具有人hGDF3-2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列有至少70%的同源性；或者所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列杂交。较佳地，所述的序列编码一多肽，该多肽具有SEQ ID NO: 6所示的序列。更佳地，该序列具有SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列。

在本发明的另一方面，提供了一种分离的hGDF3-2蛋白多肽，它包括：具有SEQ ID NO: 6氨基酸序列的多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。较佳地，该多肽是具有SEQ ID NO: 6序列的多肽。

在本发明的另一方面，提供了一种载体，它含有上述分离出的DNA。

在本发明的另一方面，提供了一种所述载体转化的宿主细胞。

在本发明的另一方面，提供了一种产生具有hGDF3-2蛋白活性的多肽的方法，该方法包括：

(a)将编码具有hGDF3-2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成hGDF3-2蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列有至少70%的同源性；

(b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成hGDF3-2蛋白的重组细胞；

(c)在适合表达hGDF3-2蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；

(d)分离出具有hGDF3-2蛋白活性的多肽。

在本发明的一个具体实施方案中，本发明的分离的多核苷酸全长为1141个核苷酸，其详细序列见SEQ ID NO: 5，其中开放读框位于14-1105位核苷酸。

在本发明中，“分离的”、“纯化的”或“基本纯的”DNA是指，该DNA或片段已从天然状态下位于其两侧的序列中分离出来，还指该DNA或片段已经与天然状态下伴随核酸的组份分开，而且已经与在细胞中伴随其的蛋白质分开。

在本发明中，术语“hGDF3-2蛋白(或多肽)编码序列”指编码具有HGDF3-2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，如SEQ ID NO: 5中14-1105位核苷酸序列及其简并序列。该简并序列是指，位于SEQ ID NO: 5序列的编码框14-1105位核苷酸中，有一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后而产生的序列。由于密码子的简并性，所以与SEQ ID NO: 5中14-1105位核苷酸序列同源性低至约70%的简并序列也能编码出SEQ ID NO: 6所述的序列。该术语还包括能在中度严紧条件下，更佳地在高度严紧条件下与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。此外，该术语还包括与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105

位的核苷酸序列的同源性至少70%，较佳地至少80%，更佳地至少90%的核苷酸序列。

该术语还包括能编码具有与人HGDF3-2相同功能的蛋白的、SEQ ID NO: 5序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1-90个, 较佳地1-60个, 更佳地1-20个, 最佳地1-10个)核苷酸的缺失、插入和/或取代, 以及在5和/或3端添加数个(通常为60个以内, 较佳地为30个以内, 更佳地为10个以内, 最佳地为5个以内)核苷酸。

在本发明中, “基本纯的”蛋白质或多肽是指其至少占样品总物质的至少20%, 较佳地至少50%, 更佳地至少80%, 最佳地至少90%(按干重或湿重计)。纯度可以用任何合适的方法进行测量, 如用柱层析、PAGE或HPLC法测量多肽的纯度。基本纯的多肽基本上不含天然状态下的伴随其的组分。

在本发明中, 术语“hGDF3-2蛋白多肽”指具有hGDF3-2蛋白活性的SEQ ID NO: 6序列的多肽。该术语还包括具有与人hGDF3-2相同功能的、SEQ ID NO: 6序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于): 若干个(通常为1-50个, 较佳地1-30个, 更佳地1-20个, 最佳地1-10个)氨基酸的缺失、插入和/或取代, 以及在C末端和/或N末端添加一个或数个(通常为20个以内, 较佳地为10个以内, 更佳地为5个以内)氨基酸。例如, 在本领域中, 用性能相近或相似的氨基酸进行取代时, 通常不会改变蛋白质的功能。又比如, 在C末端和/或N末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。该术语还包括hGDF3-2蛋白的活性片段和活性衍生物。

该多肽的变异形式包括: 同源序列、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严谨度条件下能与hGDF3-2 DNA 杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗hGDF3-2多肽的抗血清获得的多肽或蛋白。本发明还提供了其他多肽, 如包含hGDF3-2多肽或其片段的融合蛋白。除了几乎全长的多肽外, 本发明还包括了hGDF3-2多肽的可溶性片段。通常, 该片段具有hGDF3-2多肽序列的至少约10个连续氨基酸, 通常至少约30个连续氨基酸, 较佳地至少约50个连续氨基酸, 更佳地至少约80个连续氨基酸, 最佳地至少约100个连续氨基酸。

发明还提供hGDF3-2蛋白或多肽的类似物。这些类似物与天然hGDF3-2多肽的差别可以是氨基酸序列上的差异, 也可以是不影响序列的修饰形式上的差异, 或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到, 如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变, 还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如

D-氨基酸)的类似物, 以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。应理解, 本发明的多肽并不限于上述例举的代表性的多肽。

修饰(通常不改变一级结构)形式包括: 体内或体外的多肽的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化, 如那些在多肽的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的多肽。这种修饰可以通过将多肽暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸, 磷酸丝氨酸, 磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的多肽。

本发明还包括hGDF3-2多肽编码序列的反义序列。这种反义序列可用于抑制细胞内hGDF3-2的表达。

本发明还包括一种探针分子, 该分子通常具有hGDF3-2多肽编码序列的8-100个, 较佳地15-50个连续核苷酸。该探针可用于检测样品中是否存在编码hGDF3-2的核酸分子。

本发明还包括检测hGDF3-2核苷酸序列的方法, 它包括用上述的探针与样品进行杂交, 然后检测探针是否发生了结合。较佳地, 该样品是PCR扩增后的产物, 其中PCR扩增引物对应于hGDF3-2多肽的编码序列, 并可位于该编码序列的两侧或中间。引物长度一般为20-50个核苷酸。

在本发明中, 可选用本领域已知的各种载体, 如市售的载体。

在本发明中, 术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。常用的真核宿主细胞包括酵母细胞, 昆虫细胞、和哺乳动物细胞。较佳地, 该宿主细胞是真核细胞, 如CHO细胞、COS细胞等。

另一方面, 本发明还包括对hGDF3-2 DNA或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体, 尤其是单克隆抗体。这里, “特异性”是指抗体能结合于hGDF3-2基因产物或片段。较佳地, 指那些能与hGDF3-2基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制hGDF3-2蛋白的分子, 也包括那些并不影响hGDF3-2蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的hGDF3-2基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体, 而且还包括具有免疫活性的抗体片段, 如Fab'或(Fab)₂片段; 抗体重链; 抗体轻链; 遗传工程改造的单链Fv分子(Ladner等人, 美国专利No. 4,946,778); 或嵌合抗体, 如具有鼠抗体结合特异性但

仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的hGDF3-2基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达hGDF3-2或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发
5 明的抗体包括能阻断hGDF3-2功能的抗体以及不影响hGDF3-2功能的抗体。本发
10 明的各类抗体可以利用hGDF3-2基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获
得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与hGDF3-2
基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如*E. Coli*)中生产的基因产
物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或
15 多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获
得。

本发明的人hGDF3-2核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组
法或人工合成的方法获得。对于PCR扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸
序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的cDNA库或按本领域技术
人员已知的常规方法所制备的cDNA库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较
20 长时，常常需要进行两次或多次PCR扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次
序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常
是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离
得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列。通常，通过先合成多个小片
25 段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。目前，已经可以完全通过化学合成
来编码本发明蛋白(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。此外，还可通过化学合
成将突变引入本发明蛋白序列中。

除了用重组法产生之外，本发明蛋白的片段还可用固相技术，通过直接合成
30 肽而加以生产(Stewart 等人,(1969) Solid-Phase Peptide Synthesis, WH Freeman Co.,
San Francisco; Merrifield J. (1963) J. Am Chem. Soc 85: 2149-2154)。在体外合成蛋
白质可以用手工或自动进行。例如，可以用 Applied Biosystems 的 431A 型肽合成

仪(Foster City, CA)来自动合成肽。可以分别化学合成本发明蛋白的各片段, 然后用化学方法加以连接以产生全长的分子。

本发明蛋白的编码序列还可用于基因定位。例如, 通过荧光原位杂交技术(FISH), 将 cDNA 克隆与分裂中期的染色体进行杂交, 可以准确地进行染色体定位。该技术可以使用短至约 500bp 的 cDNA; 也可以使用长至约 2000bp 或者更长的 cDNA。对于该技术, 可参见 Verma 等人, Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, New York(1988)。

一旦序列被定位于染色体上的某个精确位置, 将可以将序列在染色体上的物理位置与遗传图谱数据相关联。这些遗传图谱数据是可以获得的, 例如通过孟德尔(Mendelian)人遗传数据库(可通过 Johns Hopkins University Welch Medical Library 在网上获得)。然后, 通过连锁分析来鉴定基因与已定位于同一染色体区域的疾病之间的相关性。

接着, 有必要确定患病个体和健康个体之间的 cDNA 或基因组序列方面的差异。如果某一突变存在于部分或全部患病个体但不存在于正常个体, 那么该突变可能就是该疾病的致病因素。

利用本发明蛋白, 通过各种常规筛选方法, 可筛选出与 hGDF3-2 发生相互作用的物质, 如受体、抑制剂或拮抗剂等。

本发明蛋白及其抗体、抑制剂、拮抗剂或受体等, 当在治疗上进行施用(给药)时, 可提供不同的效果。通常, 可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中, 其中 pH 通常为约 5 - 8, 较佳地 pH 约为 6 - 8, 尽管 pH 值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药, 其中包括(但并不限于): 肌内、腹膜内、皮下、皮内、或局部给药。

以本发明的人 hGDF3-2 蛋白为例, 可以将其与合适的药学上可接受的载体联用。这类药物组合物含有治疗有效量的蛋白质和药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于): 盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的人 hGDF3-2 蛋白可以被制成针剂形式, 例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如片剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量, 例如每天约 1 微克/千克体重 - 约 5 毫克/千克体重。此外, 本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

当本发明的人 hGDF3-2 蛋白多肽被用作药物时, 可将治疗有效剂量的该多肽施用于哺乳动物, 其中该治疗有效剂量通常至少约 10 微克/千克体重, 而且在大多数情况下不超过约 8 毫克/千克体重, 较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重 - 约 1 毫克/千克体重。当然, 具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素, 这些都是熟练医师技能范围内的。

附图简述

在附图中, 图1为本发明hGDF3-2与小鼠GDF3及人GDF3(hGDF3)的氨基酸序列的同源比较图。其中, 相同的氨基酸在序列下方用“*”标出, 相似的氨基酸用“.”标出。

在本发明的一个实例中, 人hGDF3-2的 cDNA核苷酸序列是如此获得的, 以人骨髓 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板, 合成正向引物A1: 5'-GGAGCTCTCCCCGGTCTGAC -3'、 A2: 5'-CACTCCAGAGGCCATGCTTCG-3'和反向引物 B1: 5'- CCTAAGAACAACCTCTTCTATTCC -3'、 B2: 5'-CTAAGTGGTCATAAACCAGATTAGG-3。先用A1B2引物对在人骨髓cDNA文库中扩增, 再以该扩增产物为模板, 用A2B1引物对扩增, 获得1141bp的目的片段。测序后得到SEQ ID NO: 5的全长cDNA序列。

本发明的核苷酸序列及其编码的蛋白质序列与小鼠GDF-3基因显示了极高的同源性。特别是, 它与GDF-3在人中的同系物hGDF3在除5端以外的区域完全一致, 两者的差别仅在于它们编码的蛋白质在N末端的长度不同, 然而本发明的hGDF3-2与小鼠GDF-3的相似程度更高。根据hGDF3在生物组织中的表达特点, hGDF3-2被认为很可能与淋巴细胞生成、红细胞生成以及胚胎的骨骼和软骨发育有关。此外, 人hGDF3蛋白在胚胎癌性(embryonal carcinoma, EC)干细胞中的特异表达的特点提示它可能可以作为一种EC细胞特异的标志性分子, 并且在胚胎癌性干细胞的形成和维持中起作用。

下面结合具体实施例, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件如Sambrook等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。

实施例

实施例1

hGDF3-2的cDNA序列的克隆和测定

1. 引物扩增

5 以人骨髓 λ gt11cDNA文库(购自Clontech公司)为模板, 用两对寡核苷酸为引物——A1: 5'- GGAGCTCTCCCCGGTCTGAC -3' (SEQ ID NO: 1)和 A2: 5'- CACTCCAGAGGCCATGCTTCG-3' (SEQ ID NO: 2)为正向引物, 寡核苷酸B1: 5'- CCTAAGAACAACCTCCTTCTATTCC -3' (SEQ ID NO: 3)和 B2: 5'- CTAAGTGGTCATAAACCAGATTAGG-3 (SEQ ID NO: 4)为反向引物, 进行
10 PCR。先用A1B2引物对在人骨髓cDNA文库中扩增, PCR条件为93°C 4分钟, 随之以93°C 1分钟、66°C 1分钟和72°C 1分钟进行35个循环, 最后72°C 延伸5分钟; 再以该扩增产物为模板, 用A2B1引物对扩增, PCR条件为93°C 4分钟, 随之以93°C 1分钟、64°C 1分钟和72°C 1分钟进行35个循环, 最后72°C 延伸5分钟。电泳检测得到的A2-B1 PCR片断, 1141bp的目的片段。

15

2. PCR产物的测序

将PCR扩增产物A2-B1与pGEM-TTM载体(Promega)连接, 转化大肠杆菌JM103, 用QIAprep Plasmid试剂盒(QIAGEN)提取质粒, 用双链嵌套式缺失试剂盒(Pharmacia)对插入片段进行定向系列缺失, 然后用PCR对缺失子进行快速鉴定及
20 排序。用SequiTherm EXCELTM DNA测序试剂盒(Epicentre Technologies)对依次截短的缺失子进行测序, 最后用电脑软件拼接顺序, 获得全长cDNA序列, 共1141bp, 详细序列见SEQ ID NO: 5, 其中开放读框位于14-1105位核苷酸。

根据得到的全长cDNA序列推导出hGDF3-2的氨基酸序列, 共363个氨基酸残基, 其氨基酸序列详见SEQ ID NO: 6。

25

实施例2

同源比较

首先, 在hGDF3-2编码的蛋白序列中发现了TGF- β 超家族的标志性的保守序列:
30

$$(L/I/V/M)X_2PX_2(F/Y)X_4CXGX_C,$$

其中(L/I/V/M)表示L、I、V、M中的任意一个氨基酸, X₂表示2个任意氨基酸。在hGDF3-2中, 符合该特征的序列为:281IIAPKGFMAN YCHGEC296。

用 hGDF3-2 的全长 cDNA 序列及其编码蛋白在 Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 数据库及 Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+Spupdate+PIR 数据库中用 BLAST 软件进行核酸和蛋白同源检索。结果发现它们与小鼠 GDF-3 和人 hGDF3 显示了极高同源性。用 PCGENE 软件进行分析，它与 GDF-3 在蛋白水平上的同一性和相似性分别达到了 69.1% 和 76.5%。它与 hGDF3 更是在除氨基端以外区域完全相同，两者的差异仅是前者较后者多了近 50 个残基。上述三者间的关系示于图 1。根据 GDF-3、hGDF3 和 hGDF3-2 间的同源性以及它们蛋白质的长度，可以确定 hGDF3-2 和 hGDF3 是由同一个基因编码的，它们的不同是由于基因剪切形式的不同；并且，有理由认为 hGDF3-2，而不是 hGDF3，才是小鼠 GDF-3 在人中的真正同源基因。因此，本发明 hGDF3-2 具有许多与 GDF-3 或 hGDF3 相同或相似的功能。

在成年小鼠中，GDF-3 基因的转录产物仅在少数组织(如胸腺、脾脏、骨髓等)中被发现，这暗示了 GDF-3 在淋巴细胞生成和红细胞生成中的作用(J.Biol.Chem., 1993, 268(5), 3444-3449)。Jones 等在妊娠中期胚胎的骨骼和软骨组织 15 中发现了 GDF3 的表达说明 GDF-3 还可能在骨骼发育中起作用(Mol.Endo., 1992, 6, 1961-1968)。类似的，hGDF3 的表达也呈现出局限于少数特定组织内的特点(Oncogene, 1998, 16, 95-103)。

除此之外，GDF-3 和 hGDF3 还在 EC 干细胞中特异性表达。对 hGDF3 的研究表明，在所有检测的 EC 细胞株中，无论该细胞株的分化能力或是滋养依赖性如何，20 都能容易地检测到 hGDF3 的转录。视黄酸可诱导细胞分化。有趣的是，在视黄酸的长时间作用下，多能(pluripotent) EC 细胞的 hGDF3 水平降至很低，而在分化终结(nullipotent) EC 细胞株中，视黄酸的处理并不导致 hGDF3 表达的下降。因此，hGDF3 在人 EC 细胞株中的表达与 EC 干细胞的表型直接相关，并且有实验证明 hGDF3 具有一定的 EC 细胞特异表达，提示它可能可以作为一种 EC 细胞特异的标志性分子。这一特点可用于鉴别和筛选特定细胞类型值得一提的是，hGDF3 被定位于 12p，25 该区域由于在 CIS(carcinoma in situ)、TGCT 和 TGCT 衍生细胞株中过度表达而引人注目。综上所述，虽然 GDF3 与 EC 细胞间的关联的生物学意义仍不清楚，但是以上种种现象都使人有理由推测 hGDF3 在胚胎癌性干细胞的形成和维持中发挥了作用(Oncogene, 1998, 16, 95-103)。

30 本发明的 hGDF3-2 除了可作为该家族一员用于进一步的功能研究，还可用于与其他蛋白一起产生融合蛋白，比如与免疫球蛋白一起产生融合蛋白。此外，本发明 hGDF3-2 还可以与该家族的其他成员进行融合或交换片段，以产生新的蛋

白, 例如可将本发明hGDF3-2的N端与hGDF3或鼠GDF3的N端进行交换, 以产生新的活性更高或具有新特性的蛋白。

针对本发明hGDF3-2的抗体, 用于筛选该家族的其他成员, 或者用于亲和纯化相关蛋白(如该家族的其他成员)。

5

实施例3

hGDF3-2在大肠杆菌中的表达

在该实施例中, 将编码hGDF3-2的cDNA序列(GenBank Accession No. AF064257)(因申请保密, 故在本申请之前登录的基因序列未对公众公开), 用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物进行扩增, 获得hGDF3-2 cDNA作为插入片段。

10

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

5'-ATACGGATCCATGCTTCGTTTCTTGCCAG-3'(SEQ ID NO: 7), 该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点, 在该酶切位点之后是由起始密码子开始的hGDF3-2编码序列的19个核苷酸;

15

3'端引物序列为:

5'-GTTAGTCGACCTACCCACACCCACATTCAT-3 (SEQ ID NO: 8), 该引物含有SalI限制性内切酶的酶切位点、翻译终止子和hGDF3-2的部分编码序列。

20

引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于细菌表达载体pQE-9(Qiagen Inc., Chatsworth, CA)上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r)、一个细菌复制起点(ori)、一个IPTG-可调启动子/操纵子(P/O)、一个核糖体结合位点(RBS)、一个6-组氨酸标记物(6-His)以及限制性内切酶克隆位点。

25

用BamHI和SalI消化pQE-9载体和插入片段, 随后将插入片段连接到pQE-9载体并保持开放读框在细菌RBS起始。随后用连接混合物转化购自Qiagen, 商品名为M15/rep4的*E. coli*菌株, M15/rep4含有多拷贝的质粒pREP4, 其表达lacI阻遏物并携带卡那霉素抗性(Kan^r)。在含有Amp和Kan的LB培养皿上筛选转化子, 抽提质粒, 用BamHI酶切鉴定插入片段大小及方向, 并测序验证hGDF3-2的cDNA片段已正确插入了载体。

30

在补加Amp(100 μg/ml)和Kan(25 μg/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的阳性转化子克隆。过夜(O/N)培养物以1: 100-1: 250的稀释率稀释, 然后接种到大体积培养基中, 培养细胞生长至600光密度(OD₆₀₀)为0.4-0.6时, 加入IPTG(“异丙基硫代-β-D-半乳糖苷”)至终浓度为1mM。通过使lacI阻遏物失

- 活, IPTG诱导启动P/O导致基因表达水平提高。继续培养细胞3-4小时, 随后离心(6000 × g, 20分钟)。超声裂解培养物, 收集细胞裂解液并将其稀释于6M的盐酸胍中。澄清后, 通过在能使含6-His标记物蛋白紧密结合的条件下, 用镍-螯合柱层析从溶液中纯化溶解的hGDF3-2。用6M盐酸胍(pH5.0)从柱中洗脱hGDF3-2。
- 5 可用几种方法从盐酸胍中变性沉淀蛋白。或者使用透析步骤除去盐酸胍, 或者从镍-螯合柱中分离出纯化蛋白, 纯化后的蛋白可以结合到第二个柱中, 该柱中具有递减的线性盐酸胍梯度。在结合到该柱时蛋白质变性, 随后用盐酸胍(pH5.0)洗脱。最后, 将可溶的蛋白质对含PBS进行透析, 然后将蛋白质保存在终浓度为10%(w/v)甘油的贮存液中。
- 10 用12%的SDS-PAGE胶进行电泳, 鉴定表达蛋白的分子量大小为约41KDa。此外, 用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序, 发现与SEQ ID NO: 6的序列一致。

实施例4

- 15 hGDF3-2在真核细胞(CHO细胞株)中的表达
- 在该实施例中, 将编码hGDF3-2的cDNA序列(GenBank Accession No. AF064257)用对应于该DNA序列的5'和3'端的PCR寡核苷酸引物进行扩增, 获得hGDF3-2 cDNA作为插入片段。

PCR反应中使用的5'寡核苷酸引物序列为:

- 20 5 - ATACGGATCCATGCTTCGTTTCTTGCCAG -3'(SEQ ID NO: 7)

该引物含有BamHI限制性内切酶的酶切位点, 在该酶切位点之后是由起始密码子开始的hGDF3-2编码序列的19个核苷酸;

3'端引物序列为:

- 25 5 - GTTAGAATTCCTACCCACACCCACATTCAT -3 (SEQ ID NO: 9)

该引物含有EcoRI限制性内切酶的酶切位点、一个翻译终止子和hGDF3-2的部分编码序列。

- 引物上的限制性内切酶的酶切位点对应于CHO细胞表达载体pcDNA3上的限制性内切酶酶切位点, 该质粒载体编码抗生素抗性(Amp^r和Neo^r)、一个噬菌体复制起点(fl ori)、一个病毒复制起点(SV40 ori)、一个T7启动子、一个病毒启动子
- 30 (P-CMV)、一个Sp6启动子、一个SV40启动子、一个SV40加尾信号和相应的polyA顺序、一个BGH加尾信号和相应的polyA顺序。

用BamHI及EcoRI消化pcDNA3载体和插入片段, 随后将插入片段连接到

pcDNA3载体。随后用连接混合物转化*E.coli* DH5 α 菌株。在含有Amp的LB培养皿上筛选转化子，在补加Amp(100 μ g/ml)的LB液体培养基中过夜培养(O/N)含所需构建物的克隆。抽提质粒，用PstI酶切鉴定插入片段大小及方向，并测序验证hGDF3-2的cDNA片段已正确插入了载体。

5 质粒转染CHO细胞是用脂转染法，用Lipofectin(GiBco Life)进行，转染48小时后，经2-3周的持续G418加压筛选，收集细胞及细胞上清测定表达蛋白酶活力。去G418，连续传代培养；对混合克隆细胞极限稀释，选择具有较高蛋白活性的细胞亚克隆。按常规方法大量培养上述阳性亚克隆。48小时后，开始收集细胞及上清，用超声裂解方法破碎细胞。以含0.05%Triton的50mMTris·HCl(pH7.6)溶液为平衡液及洗脱液，用经预平衡的Superdex G-75柱收集上述蛋白的活性峰。再用10 50mMTris·HCl(pH8.0)平衡的DEAE-Sepharose柱，以含0-1M NaCl的50mMTris·HCl(pH8.0)溶液为洗脱液进行梯度洗脱，收集上述蛋白的活性峰。然后以PBS(pH7.4)为透析液对表达蛋白溶液进行透析。最后冻干保存。

用12%的SDS-PAGE胶进行电泳，鉴定表达蛋白的分子量大小为41KDa。

15 此外，用常规方法对表达蛋白的N端和C端各10个氨基酸长度的氨基酸进行测序，发现与SEQ ID NO: 6的序列一致。

实施例5

制备抗体

20 将实施例3或4获得的重组蛋白用来免疫动物以产生抗体，具体如下。重组分子用层析法进行分离后备用。也可用SDS-PAGE凝胶电泳法进行分离，将电泳条带从凝胶中切下，并用等体积的完全Freund s佐剂乳化。用50-100 μ g/0.2ml乳化过的蛋白，对小鼠进行腹膜内注射。14天后，用非完全Freund s佐剂乳化的同样抗原，对小鼠以50-100 μ g/0.2ml的剂量进行腹膜内注射以加强免疫。每隔14天进行25 一次加强免疫，至少进行三次。获得的抗血清的特异反应活性用它在体外沉淀hGDF3-2基因翻译产物的能力加以评估。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所30 附权利要求书所限定的范围。

序列表

- 5 (1)一般信息:
- (ii)发明名称: 新的人生长分化因子编码序列、其编码的多肽及制备方法
- (iii)序列数目: 9
- 10 (2)SEQ ID NO: 1的信息
- (i)序列特征
- (A)长度: 20碱基
- (B)类型: 核酸
- (C)链性: 单链
- 15 (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: 寡核苷酸
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 1
- GGAGCTCTCC CCGGTCTGAC 20
- 20 (2)SEQ ID NO: 2的信息
- (i)序列特征
- (A)长度: 21碱基
- (B)类型: 核酸
- (C)链性: 单链
- 25 (D)拓扑结构: 线性
- (ii)分子类型: 寡核苷酸
- (xi)序列描述: SEQ ID NO: 2
- CACTCCAGAG GCCATGCTTC G 21
- 30 (2)SEQ ID NO: 3的信息
- (i)序列特征
- (A)长度: 23碱基
- (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3

5 CCTAAGAACA CTCCTTCTAT TCC 23

(2)SEQ ID NO: 4的信息

(i)序列特征

(A)长度: 24碱基

10 (B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4

15 CTAAGTGGTC ATAAACCAGA TTAGG 24

(2)SEQ ID NO: 5的信息:

(i)序列特征

(A)长度: 1141bp

20 (B)类型: 核酸

(C)链性: 双链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: cDNA.

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5

25 1 CACTCCAGAC GCCATGCTTC GTTTCTTGCC AGATTTGGCT TTCAGCTTCC TGTTAATTCT
61 GGCTTTGGGC CAGGCAGTCC AATTTCAAGA ATATGTCTTT CTCCAATTTT TGGGCTTAGA
121 TAAGGCGCCT TCACCCACA AGTTCCAACC TGTGCCTTAT ATCTTGAAGA AAATTTTCCA
181 GGATCGCGAG GCAGCGGCGA CCACTGGGGT CTCCCGAGAC TTATGCTACG TAAAGGAGCT
241 GGGCGTCCGC GGAATGTAC TTCGCTTTCT CCCAGACCAA GGTTTCTTTC TTTACCCAAA
30 301 GAAAATTTCC CAAGCTTCCT CCTGCCTGCA GAAGCTCCTC TACTTTAACC TGTCTGCCAT
361 CAAAGAAAGG GAACAGCTGA CATTGGCCCA GCTGGTGGAC TTGGGGCCCA ATTCTTACTA
421 TAACCTGGGA CCAGAGCTGG AACTGGCTCT GTTCCTGGTT CAGGAGCCTC ATGTGTGGCG

481 CCAGACCACC CCTAAGCCAG GTAAAATGTT TGTGTTGCGG TCAGTCCCAT GGCCACAAGG
 541 TGCTGTTTAC TTCAGCCTGC TGGATGTAGC TAAGGATTGG AATGACAACC CCCGGAAAAA
 601 TTTCGGGTTA TTCCTGGAGA TACTGGTCAA AGAAAATAGA GACTCAGGGG TGAATTTTCA
 661 GCCTGAAGAC ACCTGTGCCA GACTAAGATG CTCCCTTCAT GCTTCCCTGC TGGTGGTGAC
 5 721 TCTCAACCCT GATCAGTGCC ACCCTTCTCG GAAAAGGAGA GCAGCCATCC CTGTCCCCAA
 781 GCTTTCTTGT AAGAACCTCT GCCACCGTCA CCAGCTATTC ATTAECTTCC GGGACCTGGG
 841 TTGGCACAAG TGGATCATTG CCCCCAAGGG TTTCATGGCA AATTACTGCC ATGGAGAGTG
 901 TCCCTTCTCA CTGACCATCT CTCTCAACAG CTCCAATTAT GCTTTCATGC AAGCCCTGAT
 961 GCATGCCGTT GACCCAGAGA TCCCCCAGGC TGTGTGTATC CCCACCAAGC TGTCTCCCAT
 10 1021 TTCCATGCTC TACCAGGACA ATAATGACAA TGTCATTCTA CGACATTATG AAGACATGGT
 1081 AGTCGATGAA TGTGGGTGTG GGTAGGATGT CAGAAATGGG AATAGAAGGA GTGTTCTTAG
 1141 G

(2)SEQ ID NO: 6的信息:

15 (i)序列特征

(A)长度: 363个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 多肽

20 (xi)序列描述: SEQ ID NO: 6

1 Met Leu Arg Phe Leu Pro Asp Leu Ala Phe Ser Phe Leu Leu Ile
 16 Leu Ala Leu Gly Gln Ala Val Gln Phe Gln Glu Tyr Val Phe Leu
 31 Gln Phe Leu Gly Leu Asp Lys Ala Pro Ser Pro His Lys Phe Gln
 46 Pro Val Pro Tyr Ile Leu Lys Lys Ile Phe Gln Asp Arg Glu Ala
 25 61 Ala Ala Thr Thr Gly Val Ser Arg Asp Leu Cys Tyr Val Lys Glu
 76 Leu Gly Val Arg Gly Asn Val Leu Arg Phe Leu Pro Asp Gln Gly
 91 Phe Phe Leu Tyr Pro Lys Lys Ile Ser Gln Ala Ser Ser Cys Leu
 106 Gln Lys Leu Leu Tyr Phe Asn Leu Ser Ala Ile Lys Glu Arg Glu
 121 Gln Leu Thr Leu Ala Gln Leu Val Asp Leu Gly Pro Asn Ser Tyr
 30 136 Tyr Asn Leu Gly Pro Glu Leu Glu Leu Ala Leu Phe Leu Val Gln
 151 Glu Pro His Val Trp Arg Gln Thr Thr Pro Lys Pro Gly Lys Met
 166 Phe Val Leu Arg Ser Val Pro Trp Pro Gln Gly Ala Val His Phe

181 Ser Leu Leu Asp Val Ala Lys Asp Trp Asn Asp Asn Pro Arg Lys
 196 Asn Phe Gly Leu Phe Leu Glu Ile Leu Val Lys Glu Asn Arg Asp
 211 Ser Gly Val Asn Phe Gln Pro Glu Asp Thr Cys Ala Arg Leu Arg
 226 Cys Ser Leu His Ala Ser Leu Leu Val Val Thr Leu Asn Pro Asp
 5 241 Gln Cys His Pro Ser Arg Lys Arg Arg Ala Ala Ile Pro Val Pro
 256 Lys Leu Ser Cys Lys Asn Leu Cys His Arg His Gln Leu Phe Ile
 271 Asn Phe Arg Asp Leu Gly Trp His Lys Trp Ile Ile Ala Pro Lys
 286 Gly Phe Met Ala Asn Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Ser Leu
 301 Thr Ile Ser Leu Asn Ser Ser Asn Tyr Ala Phe Met Gln Ala Leu
 10 316 Met His Ala Val Asp Pro Glu Ile Pro Gln Ala Val Cys Ile Pro
 331 Thr Lys Leu Ser Pro Ile Ser Met Leu Tyr Gln Asp Asn Asn Asp
 346 Asn Val Ile Leu Arg His Tyr Glu Asp Met Val Val Asp Glu Cys
 361 Gly Cys Gly

15 (2)SEQ ID NO: 7的信息

(i)序列特征

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

20 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7

ATACGGATCC ATGCTTCGTT TCTTGCCAG

29

25 (2)SEQ ID NO: 8的信息

(i)序列特征

(A)长度: 30碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

30 (D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8

GTTAGTCGAC CTACCCACAC CCACATTCAT

30

(2)SEQ ID NO: 9的信息

(i)序列特征

5

(A)长度: 29碱基

(B)类型: 核酸

(C)链性: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 寡核苷酸

10

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9

GTTAGAATTC CTACCCACAC CCACATTCAT

29

权 利 要 求 书

1. 一种分离出的DNA分子，其特征在于，它包括：编码具有人hGDF3-2蛋白活性的多肽的核苷酸序列，
- 5 所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列有至少70%的同源性；或者
- 所述的核苷酸序列能在中度严紧条件下与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列杂交。
- 2.如权利要求1所述的DNA分子，其特征在于，所述的序列编码一多肽，该多肽具有SEQ ID NO: 6所示的序列。
- 10 3.如权利要求1所述的DNA分子，其特征在于，该序列是SEQ ID NO: 5中核苷酸14-1105位的序列。
- 4.一种分离的hGDF3-2蛋白多肽，其特征在于，它包括：具有SEQ ID NO: 6氨基酸序列的多肽、或其活性片段，或其活性衍生物。
- 15 5.如权利要求4所述的多肽，其特征在于，该多肽是具有SEQ ID NO: 6序列的多肽。
- 6.一种载体，其特征在于，它含有权利要求1所述的DNA。
- 7.一种用权利要求6所述载体转化的宿主细胞。
- 8.如权利要求7所述的宿主细胞，其特征在于，该细胞是大肠杆菌。
- 20 9.如权利要求7所述的宿主细胞，其特征在于，该细胞是真核细胞。
- 10.一种产生具有hGDF3-2蛋白活性的多肽的方法，其特征在于，该方法包括：
(a)将编码具有hGDF3-2蛋白活性的多肽的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列，形成hGDF3-2蛋白表达载体，所述的核苷酸序列与SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位的核苷酸序列有至少70%的同源性；
- 25 (b)将步骤(a)中的表达载体转入宿主细胞，形成hGDF3-2蛋白的重组细胞；
(c)在适合表达hGDF3-2蛋白多肽的条件下，培养步骤(b)中的重组细胞；
(d)分离出具有hGDF3-2蛋白活性的多肽。
- 11.如权利要求10所述的方法，其特征在于，该序列为SEQ ID NO: 5中从核苷酸14-1105位。
- 30 12.一种能与权利要求4所述的hGDF3-2蛋白多肽特异性结合的抗体。
- 13.一种核苷酸分子，其特征在于，它是权利要求1所述DNA分子的反义序列。
- 14.一种探针分子，其特征在于，它含有权利要求1所述的DNA分子中8-100个连续核苷酸。

hGDF3-2	MLRFLPDLAFSFLLI-LALGQAVQFQEYVFLQLGLDKAPSPHKFQPV	49
hGDF3	M-----	1
GDF3	MQPYQRLLALGFLLLTLPGWQTSEFQSDLLQLGLEKAPSPHRFQVPR	50
	*	
hGDF3-2	ILKKIFQDREAAATTGVSRLCYVKELGVRGNVLRFLPDQGFLLYPKKIS	99
hGDF3	KEISQDREAAATTGVSRLCYVKELGVRGNVLRFLPDQGFLLYPKKIS	49
GDF3	VLRKIIIRAREAAAASGASQDLCYVKELGVRGNLLQLLPDQGFLLNTQKPF	100
	..* ..***** ..* * ..***** ..* ..***** ..*	
hGDF3-2	QASSCLQKLLYFNLSAIKEREQLTLAQL-VDLGPNSYYNLGPELELALFL	148
hGDF3	QASSCLQKLLYFNLSAIKEREQLTLAQL-VDLGPNSYYNLGPELELALFL	98
GDF3	QDGSCLQKVLVFNLSAIKEKAKLTMAQLTLDLGPNSYYNLRPVVALSV	150
	* ..***** ..***** ..** ..*** ..*** ..***** ** ..**	
hGDF3-2	VQEPHVWRQTTPKPGKMFVLRVWPWPQAVHFSLLDVAKDWNDNPRKNFG	198
hGDF3	VQEPHVWRQTTPKPGKMFVLRVWPWPQAVHFSLLDVAKDWNDNPRKNFG	148
GDF3	VQDRGVWGRSHPKVGRLLFLRSVPGPQQLQFNLQGALKDWSSNRLKNLD	200
	** .. ** .. ** * .. ***** ** ..* * .. *** ..* ..** ..	
hGDF3-2	LFLEILVKENRDSGVNFQPEDTCARLRCSLHASLLVVTLNPDQCHPS-RK	247
hGDF3	LFLEILVKENRDSGVNFQPEDTCARLRCSLHASLLVVTLNPDQCHPS-RK	197
GDF3	LHLEILVKEDRYSRVTVQPENPCDPLLRSLHASLLVVTLNPKHCHPSSRK	250
	* ..***** * * * ..*** ..* * ..***** ..**** **	
hGDF3-2	RRAAIPVPKLSCKNLCHRHQLFINFRDLGWHKWI IAPKGFMANYPCHGEC	297
hGDF3	RRAAIPVPKLSCKNLCHRHQLFINFRDLGWHKWI IAPKGFMANYPCHGEC	247
GDF3	RRAAISVPGFCRNFCHRHQLFINFQDLGWHKWI IAPKGFMANYPCHGEC	300
	***** ** * * ..***** ..***** ..***** ..*****	
hGDF3-2	FSLTISLNSSNYAFMQALMHAVDPEIPQAVCIPTKLSPI SMLYQDNDNV	347
hGDF3	FSLTISLNSSNYAFMQALMHAVDPEIPQAVCIPTKLSPI SMLYQDNDNV	297
GDF3	FSMTTYLNSSNYAFMQALMHMADPKVAVCVPTKLSPI SMLYQDSDKNV	350
	** * ..***** ..** ..* ..*** ..***** ..**	
hGDF3-2	ILRHYEDMVVDECGCG	363
hGDF3	ILRHYEDMVVDECGCG	313
GDF3	ILRHYEDMVVDECGCG	366

图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00138

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC ⁷ : C12N15/12,C07K14/495,C12N15/64,C12N1/13,C12P21/02 According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched(classification system followed by classification symbols) C12N,C07K, C12P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the field searched CNPAT,Chinese Scientific and Technical Journals Electronic data base consulted during the international search(name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank,EMBL,DDBJ,PDB,SwissProt,SPupdate,PIR,WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant claim No.
X	WO,A,9415965 (JOHNS HOPKINS UNIV SCHOOL OF MED) 21 JUL 1994 See the whole document, especially Figure 2	1,4,6-10,12-14
X	gb L06443 MUSGDF3, LOCUS: MUSGDF3, accession L06443 J. Biol. Chem. 268(5), 3444-3449(1993) McPherron,A.C., Lee,S.J. "GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines"	1,4,6-10,12-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason(as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 23 November 1999 (23. 11. 99)		Date of mailing of the international search report 09 DEC 1999 (09 12, 99)
Name and mailing address of the ISA/ The State Intellectual Property Office Patent Office 6, Xitucheng Road, Haidian District, Beijing, 100088, China Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer ZHOU LI Telephone No. 86-10-62093933

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN99/00138

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	gb S52658 S52658, LOCUS: S52658, accession S52658 Mol. Endocrinol. 6 (11), 1961-1968(1992) Jones,C.M., Simon-Chazottes,D. et al. "Isolation of Vgr-2, a novel member of the transforming growth factor-beta-related gene family"	1,4,6-10,12-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN99/00138

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO-A- 9415965	21-07-1994	EP-A- 0679163	02-11-1995
		JP-T- 8505771T	25-06-1996
		US-A- 5808007	15-09-1998
		CA-A- 2153652	21-07-1994

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 99/00138

<p>A. 主题的分类</p> <p>IPC⁷:C12N15/12,C07K14/495,C12N15/64,C12N1/13,C12P21/02</p> <p>按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类</p>											
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)</p> <p>C12N,C07K,C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>CNPAT, 中文科技期刊光盘</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)</p> <p>GenBank,EMBL,DDBJ,PDB, SwissProt,SPupdate,PIR,WPI</p>											
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明</th> <th>相关的权利要求编号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO,A,9415965 (JOHNS HOPKINS UNIV SCHOOL OF MED) 1994. 7. 21 全文, 特别是附图 2</td> <td>1,4,6-10,12-14</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>gb L06443 MUSGDF3, LOCUS: MUSGDF3, accession L06443 J. Biol. Chem. 268(5), 3444-3449(1993) McPherron,A.C., Lee,S.J. "GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines"</td> <td>1,4,6-10,12-14</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号	X	WO,A,9415965 (JOHNS HOPKINS UNIV SCHOOL OF MED) 1994. 7. 21 全文, 特别是附图 2	1,4,6-10,12-14	X	gb L06443 MUSGDF3, LOCUS: MUSGDF3, accession L06443 J. Biol. Chem. 268(5), 3444-3449(1993) McPherron,A.C., Lee,S.J. "GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines"	1,4,6-10,12-14
类型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号									
X	WO,A,9415965 (JOHNS HOPKINS UNIV SCHOOL OF MED) 1994. 7. 21 全文, 特别是附图 2	1,4,6-10,12-14									
X	gb L06443 MUSGDF3, LOCUS: MUSGDF3, accession L06443 J. Biol. Chem. 268(5), 3444-3449(1993) McPherron,A.C., Lee,S.J. "GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines"	1,4,6-10,12-14									
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>											
<p>* 引用文件的专用类型:</p> <p>"A" 明确表示了一般现有技术、不认为是特别相关的文件</p> <p>"E" 在先文件, 但是在国际申请日的同一日或之后公布的</p> <p>"L" 对优先权要求可能产生怀疑或者用来确定另一篇引用文件的公布日期或其它特殊理由而引用的文件(如详细说明)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他手段的文件</p> <p>"P" 在国际申请日之前但迟于所要求的优先权日公布的文件</p> <p>"T" 在国际申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理</p> <p>"X" 特别相关的文件; 当该文件被单独使用时, 要求保护的发明不能认为是新颖的或不能认为具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件; 当该文件与其他一篇或多篇这类文件结合在一起, 这种结合对本领域技术人员是显而易见的, 要求保护的发明不能认为具有创造性</p> <p>"&" 同族专利成员的文件</p>											
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>23. 11 月 1999 (23.11.99)</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>09. 12. 1999 (09. 12. 99)</p>									
<p>国际检索单位名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局专利局 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)</p> <p>传真号: 86-10-62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>周莉</p> <p>电话号码: 86-10-62093933</p>									

C(续). 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 包括相关段落的说明	相关的权利要求编号
X	gb S52658 S52658, LOCUS: S52658, accession S52658 Mol. Endocrinol. 6 (11), 1961-1968(1992) Jones, C.M., Simon-Chazottes, D. et al. "Isolation of Vgr-2, a novel member of the transforming growth factor-beta-related gene family"	1,4,6-10,12-14

国际检索报告
同族专利成员的情报

国际申请号

PCT/CN99/00138

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO-A-9415965	21-07-1994	EP-A- 0679163 JP-T- 8505771T US-A- 5808007 CA-A- 2153652	02-11-1995 25-06-1996 15-09-1998 21-07-1994