

[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 200610167734.4

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 11 日

[11] 公开号 CN 1995064A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 35/02 (2006.01)

[22] 申请日 2006.12.20

[21] 申请号 200610167734.4

[71] 申请人 李欣越

地址 吉林省长春市北安路南中胡同 103 栋东
二门 304 号

[72] 发明人 李洪兴

权利要求书 4 页 说明书 15 页 附图 5 页

[54] 发明名称

增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子
融合蛋白及方法

[57] 摘要

本发明涉及一种增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白。该方法把两个/三个相同的能表达红细胞生长因子的基因通过一段/两段连接多肽连起来，并构建入哺乳动物细胞表达质粒，将其转入哺乳动物细胞后得到了表达。融合蛋白不仅具有红细胞生长因子的生理活性，而且延长了蛋白在生物体内的储留时间，进而增强其生物功效，延长体内半衰期，减少给药次数，极大地提高了红细胞刺激因子的临床实用价值。



重组人红细胞生长因子二聚体融合蛋白结构示意图

1. 一种增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于：该结构包括在两单体中间由一个连接片段将两个单体连接为二聚体融合蛋白，或在其三单体中间有两个连接片段将三个单体连接为三聚体融合蛋白，并具有红细胞生长因子的蛋白自然顺序，二聚体融合蛋白具有如下所示的序列：

EPO-L-EPO，

三聚体融合蛋白具有如下所示的序列：

EPO-L-EPO-L-EPO。

2. 按权利要求 1 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于：所述的在两单体中间由一个连接片段，其连接片段是将一红细胞生长因子的 3' 端与另一红细胞生长因子的 5' 连接而成。

3. 按权利要求 1 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于：所述的在三聚体中间由二个段连接片段而成。

4. 按权利要求 3 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于：所述的在三单体中间有二段连接片段是：第一个红细胞生长因子的 3' 端通过连接片段与第二个红细胞生长因子的 5' 端连接，再通过第二个连接片段把第二个红细胞生长因子的 3' 端与第三个红细胞生长因子 5' 端连接而成。

5. 按权利要求 1-3 中任意一项权利要求所述的有增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子双或多聚体融合蛋白，其特征在于：所述的连接片段为连接肽，该连接肽是具有 9-20 个相同的或不相同的氨基酸连接顺序。

6. 按权利要求 5 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于，所述的连接肽包括但不限于如下序列：

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly – Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser;
Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser- Ala;
Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser- Ala- Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;
Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser- Ala-Gly-Ser-Ala-Ala;
Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly- Ser-Ala-Ala;
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly –Ser-Ser- Ala- Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly –Ser-Ser- Ala- Gly- Gly- Gly;
Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly – Gly– Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly –Ser-Ser- Ala;

7. 按权利要求1所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，其特征在于：所述的二聚体/三聚体红细胞生长因子的质粒构建，在构建中使用设计合成的引物寡聚脱氧核苷酸 P1, P2, P3, P4, P5, P6, 它们的核苷酸序列分别是：

P1: 5' TGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3';

P2: 5' TCATCTGTCCCCTGTCCTGCAGG 3';

P3: 5' AAGCTAGGATCCATGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3';

P4: 5' AGCTAGAATCCACCCGCGGATCCACCTCCTGATCCA
CCTCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3';

**P5: 5' AGCTAGAATCCGGATCCGCGGGTGGTGGATCTGGC
GGAGCCCCACCACGCCTCATC 3';**

P6: 5' AGCTAAAGCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3'。

8. 一种制备权利要求 1 所述的有增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子二聚或多聚体融合蛋白，即 EPO-EPO 二聚体/EPO-EPO-EPO 三聚体融合蛋白的方法，包括如下步骤：

(1) 获得 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 的融合基因质粒，首先从细胞中提取信息核糖核酸 mRNA，利用逆转录酶-DNA 聚合酶链反应 RT-PCR 方法制备单链和双链互补脱氧核糖核酸 cDNA，经过分离纯化，将 EPO cDNA 克隆到载体上，以此为基础进行融合蛋白的构建；

(2)利用聚合酶链状反应试验，对 EPO cDNA 进行了亚克隆和末端改造，同时在蛋白之间增加了一小段连接片段；

(3)通过限制性内切酶，构建成了能够表达 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 的融合蛋白质粒，并将其质粒转化进入 CHO(CHO-dhfr)或 COS7 细胞株，转化后的细胞株能分泌 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 融合蛋白；

(4) 通过稀释克隆方法，筛选出均一、高效表达二聚或多聚人红细胞生长因子的工程细胞株；

(5) 蛋白的提取工艺；收集细胞培养液，浓缩，过 CM Sepharose FF 柱，梯度洗脱，收集活性部分，过 Sepharose 分子筛层析柱，收集活性部分。

8、如权利要求 1 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，在用于治疗肾性贫血的药物中的应用。

9、如权利要求 1 所述的增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白，在用于癌症相关性贫血（CRA）、自身免疫性疾病伴发性贫血、骨髓增生异常综合症（MDS）、再生障碍性贫血（AA）、单纯红细胞再生障碍性贫血（PRCA）、

慢性髓系白血病（CML）、特发性骨髓纤维化（IMF）、溶血性贫血、艾滋病引起的贫血和化疗引起的贫血等疾病的治疗、对于造血干细胞移植及用于择期手术的自身输血血液储备的药物中的应用。

增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白及方法

技术领域

本发明涉及一种增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白及其制备方法。

背景技术

红细胞生长因子是红细胞生长分化的重要刺激因子，其功能为调节和促进幼稚红细胞的生长分化，对晚期 BFU-E (Burst Forming Units-Erythrocytes) 及 CFU-E (Colony Forming units-Erythrocytes) 有促进分化作用，并使其合成的血红蛋白变成成熟红细胞。它也能促进网质红细胞的提前释放，并能刺激骨髓巨核细胞。

临床已广泛使用红细胞生长因子治疗肾脏疾病引起的贫血，肿瘤病人化疗后引起的贫血，以及外伤引起的大出血，即可以刺激患者自身的造血功能，弥补各种原因造成的红细胞减少。因红细胞生长因子只是造血因子的一种，另有其它造血因子能刺激血细胞的生长发育(如粒细胞和淋巴细胞等)，因此，世界上已有几种构建复合性刺激因子的例子，如 IL3-EPO，EPO-IL3，IL3-6CSF(WO 92/06116，专利)。实验证明，IL3-EPO 和 EPO-IL3 具有刺激 BFU-E 和 CFU-E 的作用。复合因子的构建是根据其自身功能，同时又具有双重协同作用。最新一例证明是生产红细胞生长因子/粒细胞集落因子(EPO/GM-CSF) (Antonio M et al, US Patent 5916773)。

根据红细胞生长因子的生长和代谢过程，其二聚体及三聚体(二聚体以下简称 EPO-EPO，三聚体以下简称 EPO-EPO-EPO)也能够促进其生物活性。红细胞

生长因子产生于肾脏，作用于骨髓，然而它的分子量较低，由肾脏产生进入血液循环后，可很快由肾脏经尿液排出，而且尿液排出后的红细胞生长因子经提纯仍具有生物活性。尽管利用生物工程技术生产的红细胞生长因子已广泛应用，但仍有同样问题。针对其应用与不足，为提高红细胞生长因子的半衰期，增长其在血液中的停留时间以发挥更长功效，研究人员进行了各方面的实验，如用多聚乙二醇连接蛋白，用化学方法将蛋白连接成二聚及多聚体等，其结果均为增大分子量，增长其体内循环时间。在以前的研究中，有的获得成功，有的没有成功。在这里我们利用基因工程的方法制造出二/三聚体的蛋白，经过初步实验证明，其合成药物具有和天然单体一样的生物功效，而且延长了蛋白的生物活性，进而减少了用药次数。

发明内容

本发明提供增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白及方法，目的在于：克服已有的用化学方法将蛋白连接成二聚及多聚体，其结果均为大分子量的混合物，且活性低的缺点，为了提高红细胞生长因子的半衰期，增长其在血液中的停留时间以发挥更长功效，而且延长了蛋白的生物活性，进而减少了用药次数；从而提供一种增强生物活性的长效重组人红细胞生长因子融合蛋白。

本发明的目的是这样实现的：该结构包括在两单体中间出一个连接片段将两个单体连接为二聚体融合蛋白，或在其三单体中间有两个连接片段将三个单体连接为三聚体融合蛋白，并具有红细胞生长因子的蛋白自然顺序，二聚体融合蛋白具有如下所示的序列：

EPO-L-EPO,

三聚体融合蛋白具有如下所示的序列：

EPO-L-EPO-L-EPO。

本发明一种实施方案是：在两单体中间由一个连接片段，其连接片段是将一红细胞生长因子的 3' 端与另一红细胞生长因子的 5' 连接而成。

本发明一种实施方案是：在三聚体中间由二个段连接片段而成。

本发明一种实施方案是：在三单体中间有二段连接片段是：第一个红细胞生长因子的 3' 端通过连接片段与第二个红细胞生长因子的 5' 端连接，再通过第二个连接片段把第二个红细胞生长因子的 3' 端与第三个红细胞生长因子 5' 端连接而成。

本发明一种实施方案是：连接片段为连接肽，该连接肽是具有 9-20 个相同的或不相同的氨基酸连接顺序。

本发明一种实施方案是：所述的连接肽包括但不限于如下序列：

Gly-Gly-Ser-Gly- A1a - A1a -Ser- Gly - Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly- A1a - A1a -Ser- Gly -Ser-Ser;

Gly-Gly- Gly -Gly- A1a - A1a -Ser- Gly -Ser-Ser- A1a;

Gly-Gly- Gly -Gly- A1a - A1a -Ser- Gly -Ser-Ser- A1a- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-A1a-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-A1a-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;

Gly-Gly- Gly -Gly- A1a - A1a -Ser- Gly -Ser-Ser- A1a-Gly-Ser-A1a-Ala;

Gly-Gly-Ser-Gly- A1a - A1a -Ser- Gly -Ser-Ser Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-A1a-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly- Ser-A1a-Ala;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-A1a-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly -Ser-Ser- A1a- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-A1a-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly -Ser-Ser- A1a- Gly- Gly- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly - Gly- Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly
-Ser-Ser- Ala;

本发明一种实施方案是：所述的二聚体/三聚体红细胞生长因子的质粒构建，在构建中使用设计合成的引物寡聚脱氧核苷酸 P1, P2, P3, P4, P5, P6, 它们的核苷酸序列分别是：

P1: 5' TGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3';

P2: 5' TCATCTGTCCCCTGTCCTGCAGG 3';

P3: 5' AAGCTAGGATCCATGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3';

P4: 5' AGCTAGAATCCACCCGCGGATCCACCTCCTGATCCA
CCTCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3';

P5: 5' AGCTAGAATCCGGATCCGCGGGTGGTGGATCTGGC
GGAGCCCCACCACGCCTCATC 3';

P6: 5' AGCTAAAGCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3'。

本发明提供的一种用基因工程方法生产增强其生物活性的红细胞生长因子二聚体/三聚体融合蛋白的制备方法，包括如下步骤：

1. 获得 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 的融合基因质粒，首先从细胞中提取信使核糖核酸(mRNA)，利用逆转录酶-DNA 聚合酶链反应(RT-PCR)方法制备单链和双链互补脱氧核糖核酸(cDNA)，经过分离纯化，将 EPO cDNA 克隆到载体上，以此为基础进行融合蛋白的构建(重组质粒的构建如图 1 所示的)；

2. 利用聚合酶链反应(PCR)对 EPO cDNA 进行了亚克隆和末端改造，然后在末端改造的两/三个蛋白之间增加了一/两小段连接片段(连接肽 Linker, L 见图 2A, 2B, 2C)；

3. 通过限制性内切酶，构建成了能够表达如图 3 所示的 EPO-EPO 及如图 4 所示的 EPO-EPO-EPO 的融合蛋白质粒，并将其质粒转化进入细胞株如 CHO 或 COS

细胞株。转化后的细胞能分泌 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 融合蛋白。以下详细描述制备方法:

所使用的材料包括:

一. 细胞株: 包括 CHO 细胞株, COS 细胞株。

菌株: 包括菌株 DH5 α , 菌株 HB101,

质粒: 包括 TopoTA 连接质粒(3.9Kb, Amp^r), pBR322, pUC18.

真核细胞表达质粒: 包括 pBSI(4.6Kb, DHFR), pMCM(5.6Kb, Amp^r).

二. 酶类: DNA 聚合酶(Clontech); 限制性内切酶(Promega, Biolab).

T4 DNA 连接酶(Life Technologies); mRNA 纯化 Kit(Invitrogen);

cDNA 合成 Kit(Stratagen)。

三. 主要生化试剂和材料:

EPO 标准品(Amgen); dNTP(Perkin Elmer); 琼脂糖(BRL); 氨卞青霉素(Sigma); 蛋白分子量标准(Bio-Rad); DNA 分子量标准(Life Technologies); EPO ELISA Kit(R&D)。马丁培养基, 肉汤培养基购自天坛生物制药; 支原体培养基, 购自长春生物制品所。以上所需的材料均是市场上可以买到的。

四. 质粒的制备: 质粒筛选,

1. 将含有目的质粒的细菌培养物培养到对数晚期(OD₆₀₀ 约 0.6), 将含有相应抗生素的 LB 培养液(预温到 37°C)放入烧瓶内, 加入对数晚期培养物, 于 37°C 剧烈振荡培养 25 小时, 所得培养物的 OD₆₀₀ 值约 0.4, 于 4°C 以 4000 转/分离心 15 分钟, 弃上清; 将细菌沉淀重悬于用冰预冷的 STE 溶液中(STE 溶液: 0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris · Cl, pH8.0, 1mmol/L EDTA, pH8.0), 离心收集细菌细胞。将收集细菌的细胞重悬于用冰预冷的含 10%蔗糖, 50mmol/L Tris · Cl, pH8.0 的溶液中, 加溶菌酶溶液, 混匀, 在冰上放 10 分钟, 加 10%十二烷基硫酸钠(SDS), 混匀, 立刻加 5mol/L NaCl(终浓度为 1mol/L)混匀, 在冰上放 1 小时, 离心, 将上清用酚: 氯仿和氯仿各提一次, 将水相于室温加入 2 倍体积乙醇混匀, 于室

温放 1.2 小时，离心，回收质粒。

2. DNA 片段的放大

用 PCR 方法将 EPOcDNA(以及其它 DNA 片段)放大，放置 PCR 仪中进行扩增：94℃，45 秒，55℃，45 秒，72℃，1-2 分钟，循环 35 次后，72℃，7-10 分钟。

3. DNA 片段的连接

用相同限制性内切酶切质粒和 EPOcDNA(以及其它 DNA 片段)，37℃，30-60 分钟，经琼脂糖电泳纯化后，用 T4 DNA 连接酶连接，形成重组质粒的构造。

4. 限制性内切酶分析

用限制性内切酶切重组质粒，经琼脂糖电泳纯化后，得到 EPOcDNA(以及其它 DNA 片段)，由此证明连接的正确性。

5. DNA 序列分析

用 Sanger 双脱氧链终止法，将 dNTP，DNA 模板，Klenow,等量加在 4 个管中，55℃，30 分钟，分别加入 ddA，ddG，ddT,ddC，保存于室温 15-20 分钟，按常规方法处理，用聚丙烯酰胺凝胶电泳测序。

6. SDS-PAGE 电泳等常规方法均参照下述文献(Sambrook J et al, A Laboratory Methods-Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2ndEdition, 1989; Current Protocol of Molecular Biology, John wiley & Sons)进行电泳检测。

五、细胞培养：

从液氮中取出冷冻细胞，置 37℃水浴中迅速融化，将细胞悬液移入离心管内，加入培养基，离心 10 分钟，用含 10%小牛血清(Life Technologies)的培养基重悬细胞，然后移入培养瓶内，接种量为 3×10^4 cells/cm²，将细胞置于 CO₂，培养箱内，37℃，5%CO₂，，活细胞比例>85%(48-72 小时)。

六、样品蛋白含量测定：

1. 染色液的配制：100mg 考马斯亮兰 G-250 溶于 50ml 95%乙醇中，然后与 100ml 85%(w/v)磷酸混合，用水稀释至 1000ml；

2. 测定方法：若蛋白量为 $>0.2\text{mg/ml}$ ，取 0.1ml 样品与 5ml 染色液均匀混合，静置 10-30 分钟后测定 $A_{600\text{nm}}$ ；若蛋白量为 $5\text{—}100\mu\text{g/ml}$ ，取 0.8ml 样品与 0.2ml 染色液均匀混合后进行测定；

以 BSA 测得曲线为标准曲线。

本发明的优点在于：本发明为一种利用基因工程技术生产红细胞生长因子(简称 EPO)二聚体/三聚体融合蛋白的亚克隆和末端改造及用聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)方法，把两个/三个相同的能表达红细胞生长因子的基因通过一段/两段多肽连接起来，并接入哺乳动物细胞表达质粒，将其转入哺乳动物细胞后得到了表达。融合蛋白不仅具有红细胞生长因子的生理活性，而且延长了蛋白在生物体内的储留时间，进而增强其生物功效。该方法简单，并且得到的二聚体/三聚体融合蛋白具有天然的红细胞生长因子的生物活性，而且，实施例中 EPO-EPO 具有生物活性为 135000IU/mg ，三聚体 EPO-EPO-EPO 具有生物活性为 $150,000\text{IU/mg}$ ；本发明的 EPO-EPO/EPO-EPO-EPO 通过增强生物效应，延长体内半衰期，减少用药次数，极大地提高了红细胞刺激因子的临床实用价值。

附图说明

图 1 是 EPO cDNA 的合成及重组质粒的构建；

图 2A, 2B, 2C 是中间连接片段的设计，构造以及通过 PCR 方法修饰和构建的 EPO 质粒。cDNA 序列的两端都得到了修饰，即末端改造。

图 3 是构建 pTrm-EPO-Linker-EPO 质粒的流程图。

图 4 是 pMNAD EPO-Linker-EPO-Linker-EPO 质粒的构建流程图。

图 5 是转染 CHO-dhfr⁻细胞的阳性克隆照片。

图 6A 是 CHO-dhfr⁻细胞形态照片，图 6B 是工程细胞株 CHO-BTE 形态照片。

图 7 是 Linker' s 氨基酸序列图例。

图 8 A 是二聚体融合蛋白的序列, 和图 8 B 是三聚体融合蛋白的序列。

图 9 A 是构建后二聚体融合蛋白的示意图, 和图 9 B 是三聚体融合蛋白的示意图。

图 10 是融合蛋白的纯化图(SDS-PAGE)。

具体实施方式

实施例 1 本实施例中所用的连接片段是连接肽, 其连接肽顺序的一级结构, 即连接二聚体/三聚体的蛋白顺序, 是 9—20 个氨基酸连接顺序, 具有这些连接顺序的氨基酸都可以用, 图 7 所示的一种序列是本例中应用的。

引物寡聚脱氧核糖核酸的设计与制备:

P1: 5' TGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3'

P1 是从 EPO 基因起始因子开始, 包括信号肽链。

P2: 5' TCATCTGTCCCCTGTCCTGCAGG 3'

P2 是互补于 3' 末端的寡聚脱氧核糖核酸, 与 P1 一起, 通过 PCR, 放大并克隆全长(蛋白编码)EPO cDNA。以后的亚克隆及二联/三聚体的构建均用该质粒为基础。

P3: 5' AAGCTAGGATCCATGGGGGTGCACGAATGTCCTGC 3'

P3 的后部分与 EPO 的起始密码之后的脱氧核糖核酸序列一致。在起始密码之前, 我们加了一个 BamH I 位点。

P4: 5' AGCTAGAATCCACCCGCGGATCCACCTCCTGATCCAC
CTCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3'

P4 是与 EPO cDNA 终止密码之前的序列互补(不包括终止密码), 并额外加了一段连接肽的核苷酸序列, 其中含有一个 Sac II 位点。在 SacII 位点之后又加了一个 EcoR I 位点。P4 与 P3 一起, 通过 PCR 方法, 将 EPO 基因的 3' 末端的终止密码去掉, 并加上一段连接片段(Linker)。

**P5: 5' AGCTAGAATCCGGATCCGCGGGTGGTGGATCTGGCGGA
GCCCCACCACGCCTCATC 3'**

P5 是与 EPO 成熟蛋白的 5' 脱氧核糖核酸的起始序列一致(在信号肽下游不包括信号肽), 在上游加了一段连接肽的核苷酸序列, 其中包括了 Sac II 位点, 同时在 SacII 位点前插入了一个 EcoR I 位点。P4 和 P5 一起, 通过 PCR 方法, 将 EPO 基因的起始因子和终止因子去掉, 并将 EPO 基因两端各加上一段连接片段(Linker)。

P6: 5' AGCTAAAGCTTTCATCTGTCCCCTGTCCTGCAG 3'

P6 与 EPO cDNA 的末端互补(包括终止密码), 并带有一个 Hind III 位点。P5 和 P6 一起, 通过 PCR 方法, 将 EPO 基因的 5' 末端的起始因子去掉, 并加上一段连接片段(Linker)。

实施例 2 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 所用 LINKER 序列的筛选及确定:

经过一些列预试验及检测, 确定了下述的连接肽序列, 包括但不限于如下序列:

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly - Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly -Ser-Ser;

Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly -Ser-Ser- Ala;

Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly -Ser-Ser- Ala- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;

Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser- Gly -Ser-Ser- Ala-Gly-Ser-Ala-Ala;

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly -Ser-Ser Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly- Ser-Ala-Ala;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly -Ser-Ser-

Ala- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Ser- Gly -Ser-Ser-
Ala- Gly- Gly- Gly;

Gly-Gly-Ser-Gly- Ala - Ala -Ser- Gly - Gly- Gly-Gly- Gly -Gly- Ala - Ala -Ser-
Gly -Ser-Ser- Ala;

以下实施例中均为应用其中由 14 个氨基酸组成的 LINKER 所构建的 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白所得结果, 其它各种 LINKER 所构建的 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白的生物活性及功能与之相似。

实施例 3 EPO, EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合基因全长核苷酸序列的测定:

为了获得 EPO 基因, EPO-EPO 以及 EPO-EPO-EPO 融合基因, 对 cDNA 及改造后序列进行了亚克隆和末端改造, 并利用常规方法对每一 cDNA 及改造后的融合基因进行了核苷酸序列测定(详见实施例 1, 图 2, 图 3, 图 4)。

实施例 4 EPO cDNA 的制备:

用 1 μ g mRNA 为起始物, 将 mRNA 溶于 20 μ l 去离子的水中, 加热 65 $^{\circ}$ C, 10-20 分钟, 置于冰浴中备用; 然后加入 cDNA 合成缓冲混合液和 AMV 逆转录酶, 其中含有 1 μ g mRNA, 50mM Tris \cdot HCl(pH 8.3), 40mM KCl, 6mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0.5mM dNTP, 0.1mM poly(dT)₁₂₋₁₈, 0.1mg/ml BSA。在 37 $^{\circ}$ C 反应一小时。从上面的反应液中, 取 5 μ l, 放入 DNA 聚合酶链反应(PCR)的试管中, 依次加入 100pmol P1 和 P2 的上下游引物, (见实施例 1), 5 μ l PCR 缓冲液(10X), 2.5mmol/L 的 dNTP 和 5 单位的 DNA 聚合酶(Taq DNA Polymerase), 最终体积为 50 μ l; 放置 PCR 仪中进行扩增: 94 $^{\circ}$ C, 45 秒, 55 $^{\circ}$ C, 45 秒, 72 $^{\circ}$ C, 1-2 分钟, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C, 7. 10 分钟; 反应完成后立刻取出, 放置冰浴中待用。

实施例 5 EPO 重组质粒的构建:

按照图 1, PCR 反应完成后, 从试管中取 5 μ l 反应液, 加入另一试管中, 其中含有 Topo 载体以及 T4 DNA 连接酶, 形成 EPO 的基本构造, 成为以后基因改造的基础。本发明对所有质粒均进行了限制性内切酶的分析以保证序列的正确性。

实施例 6 EPO-EPO 重组质粒的构建:

参考图 3, 经过改建和亚克隆后形成 EPO-EPO 重组质粒。经过对其最后表达质粒的限制性内酶的分析 and 序列测定后, 证明其结构与所设计的结构一致。

实施例 7 EPO-EPO-EPO 重组质粒的构建:

参考图 4, 经过改建和亚克隆后形成 EPO-EPO 重组质粒。经过对其最后表达质粒的限制性内酶的分析 and 序列测定后, 证明其结构与所设计的结构一致。

实施例 8 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 融合基因在真核细胞中的高效表达:

用于表达 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白真核细胞株为 CHO-dhfr^r (CHO, DUKXBI)(Urlaub G, et al, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1216)。利用 Lipofectin(Life Technologies)将 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合基因进行转化; 转化克隆生长于含有氨甲蝶呤(Methotrexate, Sigma)的细胞培养液中, 在含 5%CO₂ 培养箱中, 37°C 培养; 逐渐增加氨甲蝶呤浓度以选择出高效表达细胞株。本发明用 EPO ELISA Kit(R & D)对融合蛋白的活性进行了测定。

1. CHO-dhfr^r细胞稳定转染预试验

根据 Lip2000 说明书, 用不同的质粒对应不同体积的转染试剂 Lip2000 进行预试验摸索, 同时设立空白对照。对 CHO-dhfr^r细胞进行转染预试验。

2. CHO-dhfr^r细胞转染

将真核表达质粒及 Lip2000 分别与 DMEM 混合, 室温 20 分钟, 加入 CHO-dhfr^r细胞中, 两周后出现阳性克隆, 参考图 5。

3. MTX 加压方法如下: CHO-dhfr^r细胞 2.4×10^6 + 真核表达质粒 + Lip2000, 完全培养基, 转染 48 小时 + 筛选培养基 + 10 nM MTX 加压, 出现克隆, 逐步提高 MTX 浓度, 用 100 nM 的 MTX 筛选培养基传代, 挑选克隆细胞测 EPO 的表达量, 将高表达细胞株继续加压, 增至 500nM MTX 水平, 将高表达细胞株扩大培养, 冻存, 亚克隆, 获得高效稳定表达株, 经 MTX 反复加压, 逐步加大 MTX 的浓度, 扩大细胞培养, 收取上清, 最终筛选到高效表达的细胞株 CHO-BTE, 参考图 6。

4. CHO-BTE 细胞形态和特征

CHO-BTE 细胞株在体外连续传代 25 代，其形态与转染前的 CHO-dhfr⁻无明显差别。为多角形类似上皮细胞。参考图 7A 及 7B。

5. CHO-BTE 细胞株、细菌、真菌、支原体检查

用配制好的马丁、肉汤培养基，使用前 121℃15 分钟高压灭菌。分装 10ml/枝。将 CHO-BTE 上清（2 天）抽取 1ml 分别加入马丁、肉汤各 1ml，每个样品各两管。盖好盖。同时设阴性对照 2 管，放 37℃培养 7 天。每天观察结果。7 天判定 CHO-BTE 株阴性。

支原体检查

将支原体培养基用前煮沸 15 分钟，冷却 56℃以下，加入牛血清 2ml（培养基 8ml+2ml 血清），充分振摇，取 CHO-BTE 细胞上清 1ml 分别加入支原体培养基中，每个样品接种 4 管，同时设空白对照，放 37℃观察 21 天，结果判定阴性。此细胞株无支原体污染。

6. CHO-BTE 细胞外源性检测（红细胞吸附试验）

取 CHO-BTE 细胞 3 瓶，制成 1×10^5 /ml，每瓶接种 5ml，待细胞生长单层，换维持液（IMDM+2%FCS+丙酮酸钠+非必须氨基酸）10ml/瓶，继续观察 2 周，每三天换液一次，每日镜检细胞，CHO-BTE 细胞基本保持正常形态，即多角形。上皮细胞。14 天后，取 1/3 细胞培养瓶细胞，用 0.2% -0.5% 豚鼠红细胞混合细胞悬液，做红细胞吸附试验，加入红细胞后置 4—8℃，30 分钟，镜下观察结果，阴性，无细胞凝集。然后将其细胞置于 20-25℃、30 分钟。镜下观察结果阴性，无细胞凝集。说明此细胞没有外源性病毒污染。

豚鼠主要检测细胞内核枝分枝杆菌，在注射前观察 4 周，做结核菌素应为阴性。家兔主要检查猴源细胞是否有 B 病毒污染。

具体试验结果如下：

动物体内接种法进行外源病毒检查结果，（其结果见表 1）。

表 1 CHO-BTE 细胞外源性检测

动物组	体重	数量	接种途径	接种细胞数	天数	存活
豚鼠	350g	5	腹腔	2×10^6 /ml	42天	5/5
家兔	1.5g	5	皮下	1.8×10^6 /ml	21天	5/5

7. CHO-BTE 细胞稳定性试验

CHO-BTE 细胞经反复液氮冻存，复苏，细胞形态正常，无改变。经检测 CHO-BTE 细胞株，室温、4℃、-20℃冻存上清，EPO 的表达量无明显影响，说明 CHO-BTE 细胞株稳定表达的细胞株。

实施例 9 EPO-EPO 及 EPO-EPO-EPO 融合蛋白的分离纯化：

经克隆后的细胞株，在无血清细胞培养液中培养（CHO-S-SFM II，Life Technologies），待细胞长到 80% 充满时（约 48—72 小时），收集细胞培养液。将细胞培养液进行浓缩，然后进行透析（pH4.2，100mM 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液）4℃，24 小时。将透析后的溶液上样于已平衡后的 CM Sepharose FF 柱（柱为 5X20cm；用 pH4.2，100mM 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液平衡 5—10 倍柱体积）。分别用含 100mmol/L、300mmol/L、500mol/L NaCl 的缓冲液进行盐梯度洗脱，收集融合蛋白，经活性测定后收集有活性部分，将其浓缩并交换成 pH7.0 10mmol/L 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液。将浓缩并交换缓冲液后的样品上样于已平衡好的 Sepharose 分子筛层析柱（柱为 2.6X100cm；平衡液流动相均为 10mmol/L pH7.0 磷酸氢二钠—柠檬酸缓冲液）。分管收集各洗脱峰，经活性测定有活性部分即为纯化的融合蛋白。所得融合蛋白经 SDS—PAGE 测定（参考图 10）纯度达 95%。

实施例 10 EPO，EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白生物活性的测定：

1. 用 R&D EPO 免疫试剂盒为工具，其中的标准品为标准，进行体外活性测量。对每一个样品用统一的稀释液稀释。稀释液含有细胞培养液，5% 小牛血清，1% 的 β -Mercaptoethanol，和抗菌素(青霉素，链霉素及 Fungizone)(其结果见表 2)。

2. 集落生成实验, 测定红系爆式集落形成单位 (burst forming unit-erythroid, BFU-E) 的集落数目。利用低密度粘着于培养皿的骨髓细胞, 对所有集落进行测定。低密度细胞在 IMDM (Iscov's Modified Dulbecco's Media) 培养液中 (含有小牛血清), 37℃, 培养 1-2 小时, 按 Ficoll-Hypaque 方法分离。对 BFU-E 的测定: 在 1mL IMDM 培养液中 (含有 0.8% 甲基纤维素, 20% 小牛血清, 0.05mM 巯基乙醇, 1IU rhEPO 或者 rhEPO 二聚体融合蛋白) 放置 1×10^5 细胞, 培养十四天后, 检测其集落数目和形态, 通过系列稀释后与标准品对照。

表 3 的结果表明, 培养 14 天后 rhEPO 二聚体及三聚体的 BFU-E 集落数显著高于 rhEPO 单体, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。上述结果表明 rhEPO 二聚体及三聚体的体外生物活性高于 rhEPO 单体。

3. 表 4 中所示的体内活性测量由 8—10 周的小鼠被麻醉后, 从眼眶抽血, 测其血沉计数, 然后按照小鼠体重, 根据表 1 中所测表达蛋白的活性, 以 300IU/Kg 体重给予一次皮下注射。每三只小鼠为一组, 共四组(单体、二聚体、三聚体、对照组), 在第九天麻醉小鼠, 重新从眼眶抽血, 测其血沉, 其结果如表 4 所示。

综上所述, EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白的体内、体外生物活性比单体 EPO 显著提高, 说明本例中的 EPO-EPO 和 EPO-EPO-EPO 融合蛋白有增强的生物活性。

表 2 体外活性测量

表达质粒	比活(IU/Pmole)
单体	5.0-6.3
二聚体融合蛋白	9.8-12.3
三聚体融合蛋白	16.5-20.4
EPO 分子量按 36Kd-45Kd 计算	

表 3 rhEPO 二聚体蛋白的集落生成实验结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BFU-E (Colonies)
对照	8	0
rhEPO 单体	8	26 \pm 0.34
rhEPO 二聚体	8	83 \pm 0.47*
rhEPO 三聚体	8	153 \pm 0.31

表 4 体内活性测量

表达蛋白	注射前	注射后
单体	48	49
二聚体融合蛋白	47.5	50
三聚体融合蛋白	48	52
对照 (磷酸缓冲液)	46	45.5

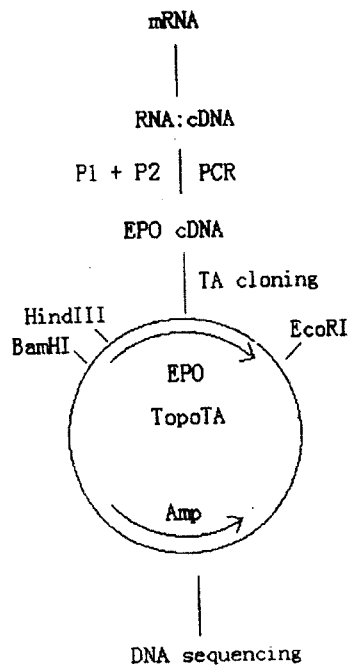


图 1

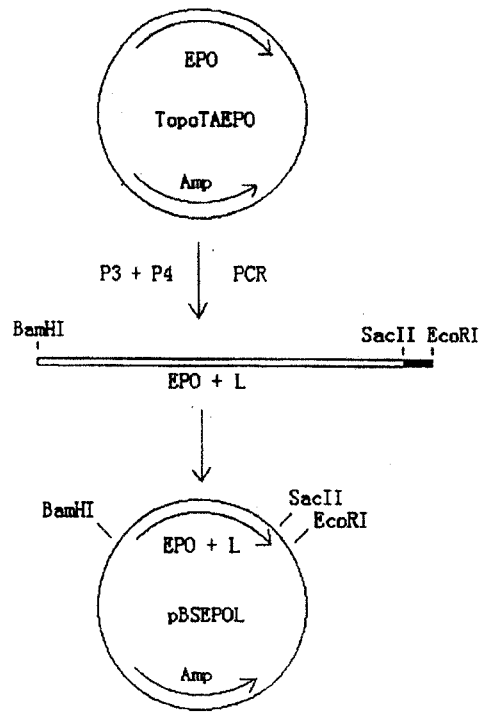


图 2A

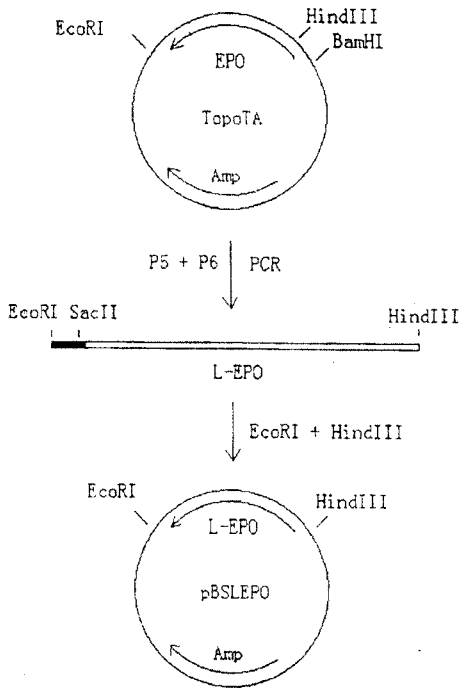


图 2B

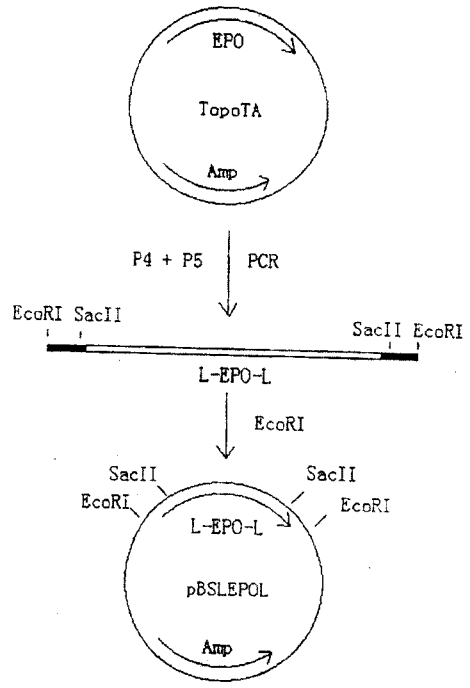


图 2C

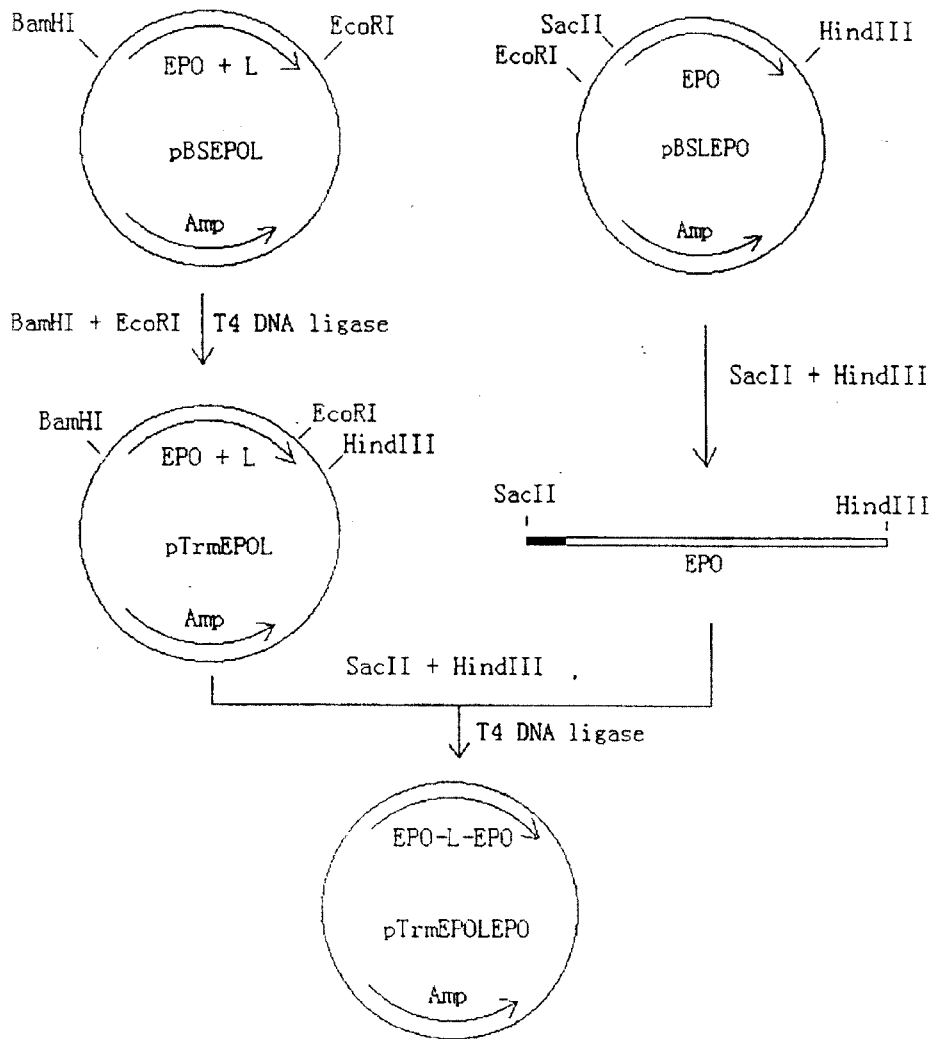


图 3

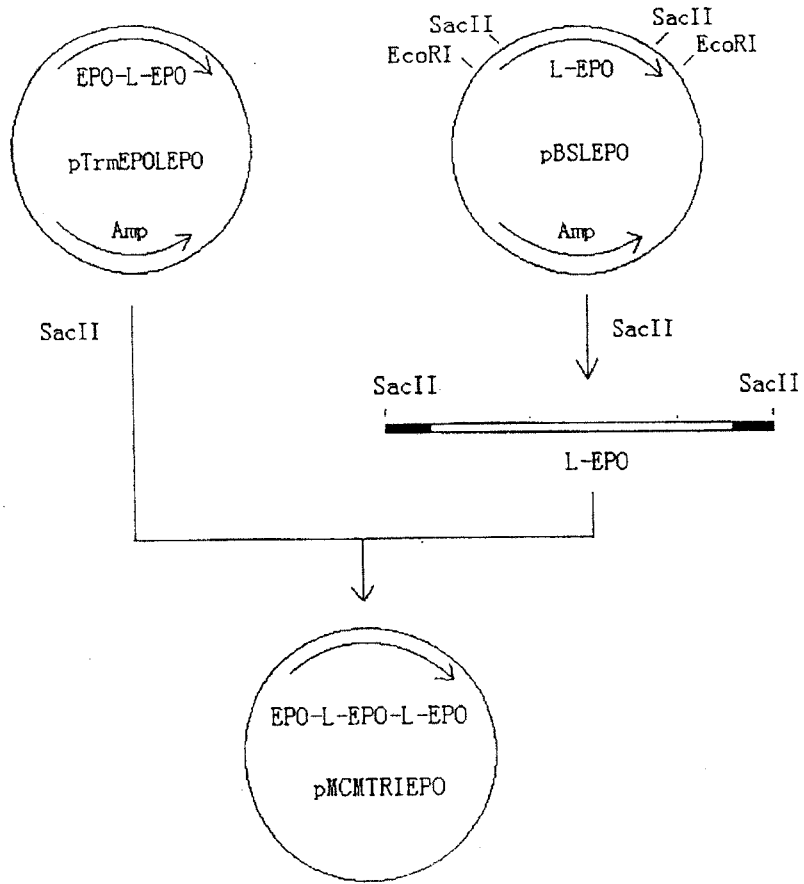


图 4



图 5



图 6A

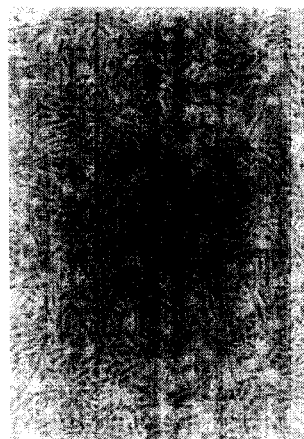


图 6B

Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser-Ala-Ala-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly

图 7

EPO-L-EPO

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK
EAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQ
GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRL
GAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGA
CRTGDRGGSGGSAAGGSGGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT
GCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSE
AVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEA
ISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

图 8A

EPO-L-EPO-L-EPO

MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK
EAENITGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQ
GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRA
LGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGE
ACRTGDRGGSGGSAAGGSGGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENIT
TGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLS
EAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKE
AISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGD
RGGSGGSAAGGSGGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEH
CSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRG
QALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTLLRALGAQKEAISPPDA
ASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR

图 8B

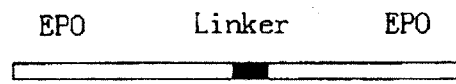


图 9A

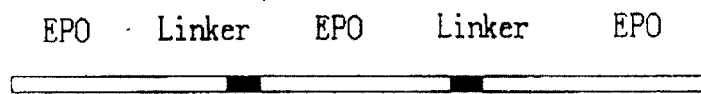


图 9B

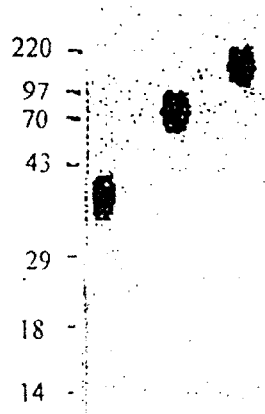


图 10